فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۷۰- ۱۵۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۶

شناسایی مولکولی باکتری *Streptomyces scabies* عامل جرب معمولی سیب‌زمینی در استان‌های آذربایجان شرقی و کردستان

علی احمدی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تبریز، ایران، ahmadiali1361@yahoo.com
رضا خاک ور *: استادیار باکتری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تبریز، ایران، khakvar@tabrizu.ac.ir

چکیده

مقدمه: جنس *Streptomyces* از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین جنس‌های باکتریایی است که بعضی از اعضای آن بیمارگر گیاهان و محصولات کشاورزی محسوب می‌شوند. بیماری جرب معمولی از بیماری‌های مهم گیاهی است که به‌وسیلهٔ باکتری *Streptomyces scabies* و برخی دیگر از گونه‌های مشابه عمدتاً روی سیب‌زمینی و ندرتاً روی برخی دیگر از محصولات غده‌ای نظیر چغندر، تربچه، شلغم و غیره ایجاد می‌شود. با توجه به جایگاه استراتژیک کشت سیب‌زمینی در منطقهٔ شمال غرب کشور و علی‌رغم انتشار گستردهٔ این بیماری در استان‌های آذربایجان و کردستان، هنوز گزارش دقیقی از عامل اصلی بیماری، میزان پراکنش و نژادهای مختلف این بیماری در دسترس نیست. هدف این پژوهش شناسایی مولکولی عامل اصلی اسکب سیب‌زمینی در استان‌های آذربایجان شرقی و کردستان و بررسی ارتباط بین بیماری‌زایی این باکتری و وجود ژن *تاکستومین A* بود

مواد و روش‌ها: در فصل برداشت سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۸۹ از غده‌های دارای علائم جرب در مزارع سیب‌زمینی نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از جداسازی و خالص‌سازی باکتری، جدایه‌های باکتریایی براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، تست‌های بیوشیمیایی و نیز با استفاده از آزمون PCR توسط آغازگر عمومی جنس *Streptomyces* و آغازگر اختصاصی گونهٔ *S. scabies* ارزیابی شدند. همچنین قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی غدهٔ سیب‌زمینی و تربچه و نیز حضور ژن تولیدکنندهٔ *توکسین تاکستومین A* در نمونه‌ها بررسی شد.

نتایج: از بین جدایه‌ها، براساس صفات مورفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی و آزمون PCR ، ۳۲ جدایه متعلق به جنس *Streptomyces* شناسایی شد. در تست بیماری‌زایی روی غدهٔ سیب‌زمینی و تربچه ۲۶ جدایه از ۳۲ جدایه واکنش مثبت نشان دادند. نتیجهٔ آزمون PCR با آغازگر اختصاصی گونهٔ *S. scabies* به‌صورت مولکولی نیز اثبات کرد که این ۲۶ جدایه به گونهٔ *S. scabies* متعلق هستند. ضمناً نتایج آزمون PCR با آغازگر اختصاصی ژن بیماری‌زایی *تاکستومین A* (*txt A*) نشان داد این ژن در تمام ۲۶ جدایه با قدرت بیماری‌زای وجود دارد که بیانگر همبستگی کامل قدرت بیماری‌زایی این باکتری در گیاهان و وجود این ژن در باکتری است.

بحث و نتیجه‌گیری: این اولین گزارش علمی است که وجود این بیمارگر را به‌صورت مولکولی در منطقه اثبات می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده و وجود جدایه‌های مثبت فراوان در داخل نمونه‌ها، حاکی از آلودگی گستردهٔ مزارع سیب‌زمینی استان‌های آذربایجان و کردستان به بیماری جرب معمولی است.

واژه‌های کلیدی: جرب معمولی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ژن *تاکستومین A*، *Streptomyces*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

سیب‌زمینی یکی از محصولات مهم کشاورزی در ایران است که از نظر تولید سالیانه بعد از گندم، برنج، ذرت و جو در مقام پنجم قرار دارد. بیماری جرب [1] معمولی سیب‌زمینی یکی از بیماری‌های مهم گیاهی است که به‌وسیله باکتری *Streptomyces scabies* و سایر گونه‌های مشابه دیگر روی سیب‌زمینی و سایر سبزیجات غده‌ای (تربچه، شلغم و غیره) ایجاد می‌شود (۱). ایجاد علائمی نظیر زخم‌های نکروتیک برجسته، سطحی یا فرورفته از علائم مشخص جرب معمولی بر روی غده‌های سیب‌زمینی است که ارزش بازارپسندی و کیفیت غده‌های سیب‌زمینی را کاهش می‌دهد و باعث خسارت اقتصادی به محصول می‌شود (۲). گونه‌های مهم عامل جرب سیب‌زمینی، *Streptomyces scabies*، *S. acidiscabies* و *S. turgidiscabies* هستند (۳). *S. acidiscabie* به‌عنوان عامل جرب معمولی سیب‌زمینی در خاک‌های اسیدی نام‌گذاری شده است. *S. acidiscabies* و *S. turgidiscabies* دارای پراکنش کمتری در جهان هستند. سایر گونه‌های بیماری‌زای *Streptomyces* شامل *S. setonii* ، *S. griseus* ، *S. tendae*، *S. aureofaciens* و *S. caviscabies* است که شدت بیماری‌زایی کمتری دارند (۴ و ۵).

گونهٔ *S. scabies* به‌عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد جرب معمولی سیب‌زمینی در جهان، دارای پراکنش وسیعی در جهان است و در اکثر نقاط جهان به‌عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد جرب شناخته شده است (۶). در ایران برخی از گونه‌های بیماری‌زای گیاهی *Streptomyces* نظیر *S. scabies*، *S. acidiscabies*، *S. turgidiscabies*، *S. aureofaciens*، *S. reticuliscabies* و ... از برخی مناطق ایران گزارش شده‌اند اما از میزان دقیق خسارت و پراکنش واقعی آن‌ها اطلاع دقیقی در دست نیست (۷).

در بیماری‌زایی گونه‌های جنس *Streptomyces* به‌خصوص گونه‌های بیماری‌زای گیاهی، توکسین‌ها نقش بسیار مهمی دارند. در بین توکسین‌های *S. scabies* غالب‌ترین توکسین تولیدشده، *تاکستومین A* [2] و بعد از آن *تاکستومین B* است که مقدار آن ۵درصد مقدار *تاکستومین A* گزارش شده است (۸). ردیابی ژن سنتزکنندهٔ *تاکستومین A* (*txtA*) اهمیت زیادی در شناخت مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری ایفا می‌کند. ژن *تاکستومین A* تاکنون فقط در سه گونهٔ *S. scabies*، *S. acidiscabies* و *S. turgidiscabies* شناسایی شده و در سایر گونه‌های بیماری‌زای گیاهی یا این ژن وجود نداشته و یا اندازهٔ این ژن در آن‌ها متفاوت با طول ژن در این دو گونه است (۳) بنابراین با توجه به مشکلات و پیچیدگی‌های موجود در تفکیک اعضای جنس *Streptomyces* در سطح گونه و نیز مشکلات تشخیص نژادهای بیماری‌زا از نژادهای غیربیماری‌زا، شناسایی وجود ژن *تاکستومین* راهی آسان برای اثبات گونه و قدرت بیماری‌زایی عامل اسکب سیب‌زمینی خواهد بود.

جرب معمولی سیب‌زمینی در سال‌های اخیر در بعضی مناطق کشت سیب‌زمینی در استان‌های آذربایجان شرقی و کردستان به وفور مشاهده شده است. ازآنجایی‌که در بعضی مزارع شدت بیماری بالا است و به‌صورت یکی از مسائل عمده در کشت سیب‌زمینی در آمده است و نیز به‌علت عدم وجود گزارش رسمی از عامل اصلی این بیماری در استان‌های آذربایجان شرقی و کردستان، شناسایی عامل اسکب معمولی سیب‌زمینی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی و همچنین شناسایی ژن

سنتز کنندهٔ *تاکستومین* در جدایه‌ها می‌تواند سودمند باشد. نتایج این پژوهش همچنین می‌تواند جهت اتخاذ استراتژی مناسب برای کاهش خسارت بیماری در استان‌های آذربایجان شرقی و کردستان کاربردهای فراوانی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و تهیه جدایه‌ها: طی فصول زراعی سال ۱۳۸۹-۱۳۹۱ در زمان برداشت از مناطق مختلف سیب‌زمینی کاری استان‌های آذربایجان شرقی (شهرستان‌های سراب و بستان‌آباد) و کردستان (شهرستان‌های قروه و ده‌گلان) بازدید و غده‌های دارای علائم بیماری از نقاط مختلف مزارع جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. قسمت‌های آلوده از غده‌های دارای علائم اسکب به‌روش شاد[۳] و همکاران (۹) جداسازی شد. برای جداسازی از محیط کشت YME [۴] (عصارهٔ مخمر ۴ گرم ؛ عصارهٔ مالت ۱۰ گرم ؛ دکستروز ۴ گرم؛ آگار ۲۰ گرم، در یک لیتر آب مقطر با pH=7.2) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ۵۰ میلی‌گرم نیستاتین، ۵ میلی‌گرم پلی‌میکسین‌سولفات، ۱۰میلی‌گرم سدیم پنی‌سیلین G و ۵۰ میلی‌گرم سیکلوهیگزامید در لیتر استفاده شد. تشتک‌ها به‌صورت وارونه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از ۵ تا ۷ روز از پرگنه‌های رشدکرده که ظاهری شاخه و پودری داشتند، انتخاب شد و مجدداً تا خالص‌سازی کامل روی محیط YME به‌صورت مخطط کشت شدند. جهت نگهداری باکتری از کشت‌های ۱۰ تا ۱۴روزه هر جدایه سوسپانسیونی از اسپور در آب مقطر سترون تهیه و در شیشه‌های کوچک دردار داخل یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اثبات بیماری‌زایی: اثبات بیماری‌زایی استرین‌ها روی غدهٔ سیب‌زمینی به‌روش لوریا و همکاران[۵] (۱۰) انجام شد. ابتدا غدهٔ سیب‌زمینی رقم آگریا[۶] با آب شستشو و در شرایط استریل پوست غده‌ها جدا شد و از قسمت وسط غده قطعاتی به اندازهٔ دو سانتی‌متر مربع تهیه شد و در تشتک‌های پتری استریل حاوی کاغذ صافی و مقداری آب مقطر استریل قرار داده شدند. از هر جدایه که قبلاً روی محیط غذایی OMA[۷] کشت و تولید اسپور شده بود (کشت‌های ۱۴روزه) قطعه‌ای از محیط کشت برداشته شد و به‌طور وارونه روی قطعات سیب‌زمینی قرار گرفت. از محیط OMA تلقیح‌نشده به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری شدند، این آزمایش برای هر جدایه سه بار تکرار شد. ایجاد نکروز و یا نکروز همراه با فرورفتگی به‌عنوان بیماری‌زایی جدایه‌ها در نظر گرفته شد. اثبات بیماری‌زایی روی گیاهچه تربچه به‌روش شاد و همکاران (۹) انجام شد. بذر تربچه به‌طور سطحی با هیپوکلریت‌سدیم ۵ تا ۱۰درصد به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی شد و به‌منظور جوانه‌زنی روی محیط آب آگار ۱درصد به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بذرهای جوانه‌زده با سوسپانسیونی از اسپور باکتری مایه‌زنی و در لوله‌های حاوی محیط کشت آب آگار (۱درصد) سترون قرار داده شدند. علائم بیماری روی گیاهچه تربچه یک تا دو هفته بعد بررسی شد.

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها: رنگ‌آمیزی گرم، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی (OF[۸])، تست کاتالاز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز کازئین به‌روش شاد و همکاران (۸) انجام شد. ویژگی‌های مورفولوژیکی

جدایه‌ها شامل تعیین نوع و طول زنجیرهٔ اسپور، شکل پرگنه و نیز رنگ پرگنه به‌روش شیرلینگ و گوتلیب[۹] (۱۱) بررسی شد. به‌منظور بررسی تولید ملانین، جدایه‌ها به‌ترتیب برروی محیط کشت PYIA[۱۰] و YME کشت شد و نتایج ۷ تا ۱۰ روز بعد یادداشت شد. تولید رنگدانهٔ ملانین قهوه‌ای‌رنگ به‌عنوان نتیجهٔ مثبت تست ارزیابی شد (۴). محیط کشت فوق، اختصاصی باکتری است که فقط بعضی از جدایه‌ها تولید ملانین[۱۱] می‌کنند.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR): استخراج DNA ژنومی از جدایه‌ها به‌روش تعدیل‌یافتهٔ لی و دبور[۱۲] (۱۲) انجام شد. برای استخراج DNA ژنومی، جدایه‌ها ابتدا در محیط NA[۱۳] کشت شدند و به‌مدت چند روز در شیکر قرار داده شدند. سپس محیط کشت در لولهٔ فالکن ریخته و در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد تا باکتری در ته لوله رسوب کند. چند لوپ از باکتری به داخل تیوب جدید منتقل و به آن ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه شد. به سوسپانسیون حاصل ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج ۲X (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۲۵ میلی‌مولار EDTA[۱۴]، ۱درصد SDS[۱۵] و ۱۰ میکروگرم بر لیتر پروتئیناز K[۱۶]) اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت سه ساعت در دمای ۵۵ سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از آمونیوم استات ۷/۵ مولار به هر لوله اضافه و به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه تکان داده شد. بعد از این مرحله، لوله‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۷۵۰ میکرولیتر از رونشین به لولهٔ جدید منتقل شد و ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و به‌وسیلهٔ دست تکان داده شد. نمونه‌ها به‌مدت یک شب در دمای ۲۰- تا ۳۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مدت نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل با ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد سرد دو بار شسته شد و در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه خشک شد. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و در چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. DNA خارج‌شده در واکنش PCR با آغازگرهای مختلف استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA خارج‌شده با اسپکروفتومتر و الکتروفورز در ژل آگارز بررسی شد.

از آغازگرهای *StrepB* و *StrepF* برای شناسایی جنس *Streptomyces* استفاده شد. این جفت آغازگر برای ناحیهٔ *16srRNA* طراحی شده است و قادر به شناسایی تقریباً همه گونه‌های جنس *Streptomyces* است (جدول ۱)(۹). چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی[۱۷] اولیه به‌مدت پنج دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه، اتصال[۱۸] آغازگر در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط[۱۹] در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و درنهایت یک چرخه بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

از آغازگرهای *ASE3* و *scab2m* نیز که اختصاصی برای شناسایی گونهٔ *S. scabies* و چند گونه نزدیک آن که بیماری‌زای گیاهی هستند استفاده شد (جدول۱)(۹). چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و درنهایت یک چرخه بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

از آغازگرهای *txtA F2* و *txtA R2* برای شناسایی

ژن سنتزکنندهٔ تاکستومین *A* در گونه‌های بیماری‌زای گیاهی *S. scabies* استفاده شد (جدول ۱) (۱۳). چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و درنهایت یک چرخه بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

نتایج

درمجموع بیش از ۱۲۰ غده با علائم مشکوک به بیماری اسکب عمومی سیب‌زمینی شناسایی و جمع‌آوری شد. بیشتر غده‌های جمع‌آوری‌شده از ارقام مارفونا، اسپریت و اگریا بودند. علائم موجود در روی غده‌های جمع‌آوری‌شده متفاوت و عمدتاً شامل جرب برجسته، فرورفته و سطحی و یا زخم‌های سطحی یا عمیق بودند (شکل ۱).

پس از جداسازی باکتری، مجموعاً ۳۲ جدایه با خصوصیات مورفولوژیک جنس *Streptomyces* (با پیکره‌های هیفی‌شکل) بر روی محیط کشت YME جداسازی و خالص‌سازی شد. پرگنه جدایه‌ها به‌رنگ خاکستری روشن یا تیره بر روی محیط کشت عصارهٔ مخمر مالت آگار مشاهده شد. آزمون گرم، تست کاتالاز، تست OF (هوازی و بی‌هوازی‌بودن) و تست تجزیهٔ نشاسته برای این جدایه‌ها مثبت و تست تجزیه ژلاتین منفی بود (جدول ۲).

جدول ۱- آغازگرهای استفاده‌شده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز و توالی آن‌ها و اندازهٔ جفت محصول این آغازگرها

نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)
StrepF	5´- ACG TGT GCA GCC CAA GAC A -3´	۱۰۲۷
StrepB	5´- ACA AGC CCT GGA AAC GGG GT -3´	
ASE3	5´- AAC GGC CAG AGA TGG TCG C -3´	۴۷۵
scab2m	5´- TTC GAC AGC TCC CTC CCT TAC -3´	
txtA F2	5´- TGC GGT TCC GGT CTG CTG CTC TC -3´	۵۲۲
txtA R2	5´- GGC GTC GTA CCC GCC GTT GA -3´	

شکل ۱- علائم مختلف باکتری اسکب بر روی غده‌های سیب‌زمینی

جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی

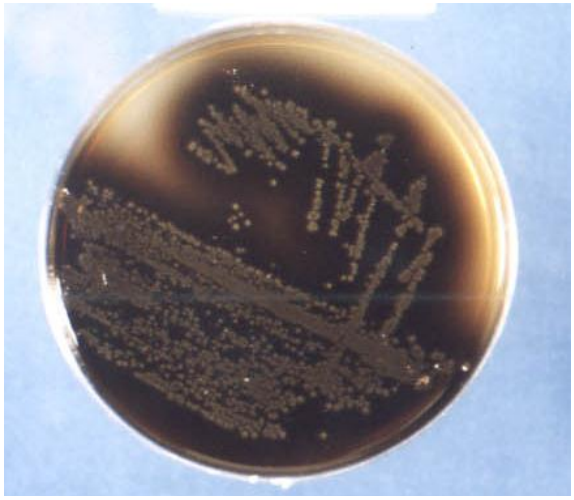
آزمون	واکنش
رنگ پرگنه روی محیط کشت *YME*	خاکستری
نوع زنجیره اسپور	مارپیچی
گرم	+
OF (هوازی)	+
کاتالاز	+
تجزیه ژلاتین	+
تجزیه نشاسته	-
تولید رنگدانه ملانین در محیط کشت (PYIA)	فقط سه جدایه تولید ملانین کردند

اسپور جدایه‌ها با میکروسکوپ نوری عموماً به‌صورت زنجیره‌ای صاف و بعضاً مارپیچ مشاهده شدند که دلالت بر تعلق آن‌ها به جنس *Streptomyces* داشت (شکل ۲)(۹).

آزمون بیماری‌زایی روی جدایه‌های جمع‌آوری‌شده نشان داد ۲۶ جدایه از ۳۲ جدایه خالص‌شده، قادر به ایجاد علائم نکروز روی تکه‌های سیب‌زمینی و گیاهچه تربچه هستند و ۶ جدایه باقیمانده دارای قدرت بیماری‌زای خفیف و یا فاقد توانایی ایجاد نکروز روی سیب‌زمینی و یا گیاهچه تربچه هستند. نتایج بررسی تولید رنگدانه ملانین برروی محیط کشت PYIA و YME نشان داد که فقط سه جدایه روی محیط کشت PYIA تولید ملانین کردند و باقی جدایه‌ها قادر به تولید ملانین نیستند (شکل ۳).

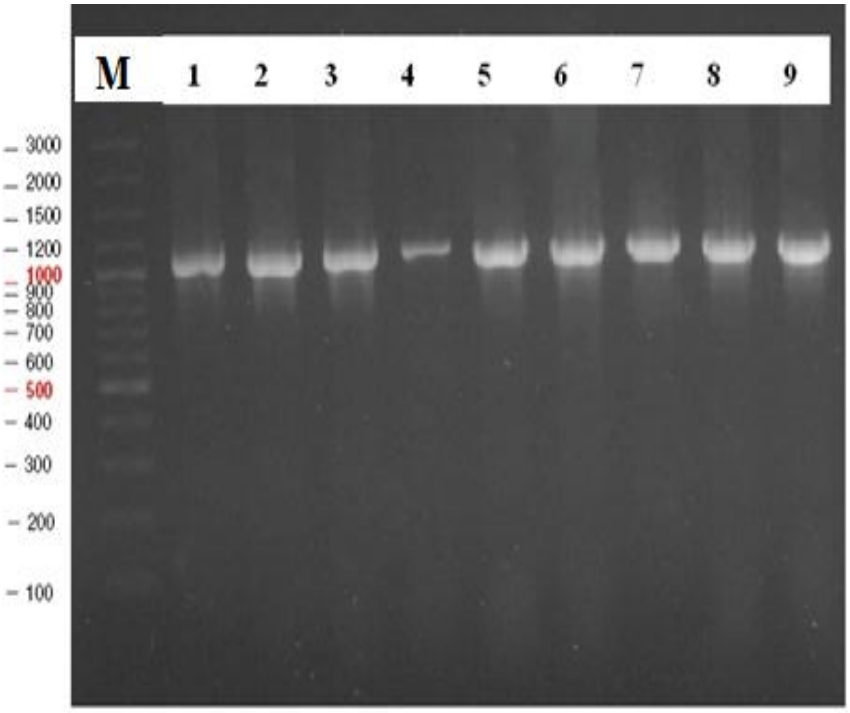
برای شناسایی جنس *Streptomyces* از جفت پرایمر *Strep B* و *Strep F* استفاده شد که باندهایی به‌اندازهٔ ۱۰۲۷ باز برای هر ۳۲ جدایه منتخب پس از الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۴).

شکل ۲-.زنجیره اسپورهای *Streptomyces scabies*

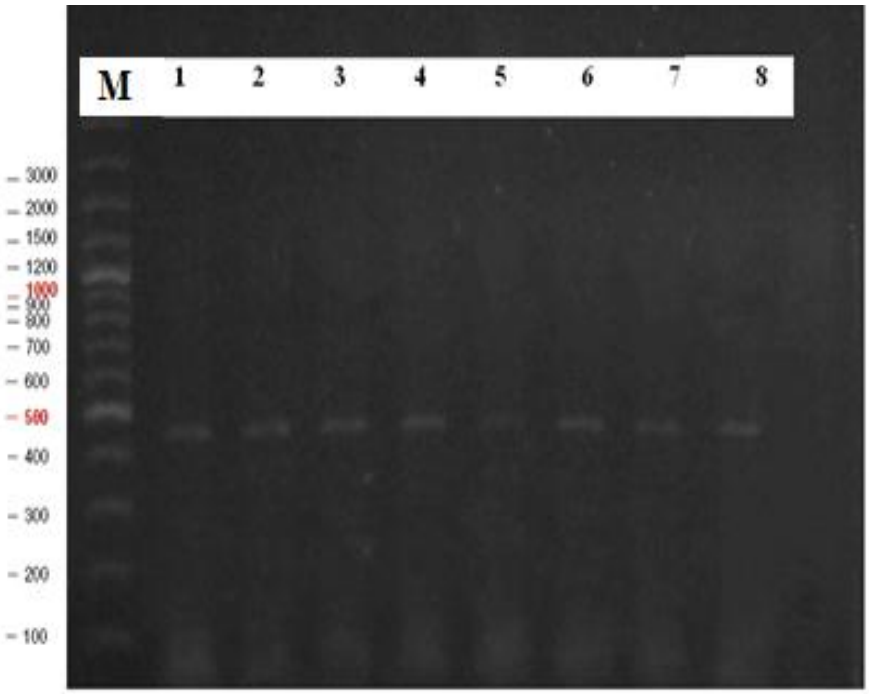


شکل ۳- تولید رنگدانه قهوه‌ای‌رنگ ملانین برروی محیط کشت PYIA

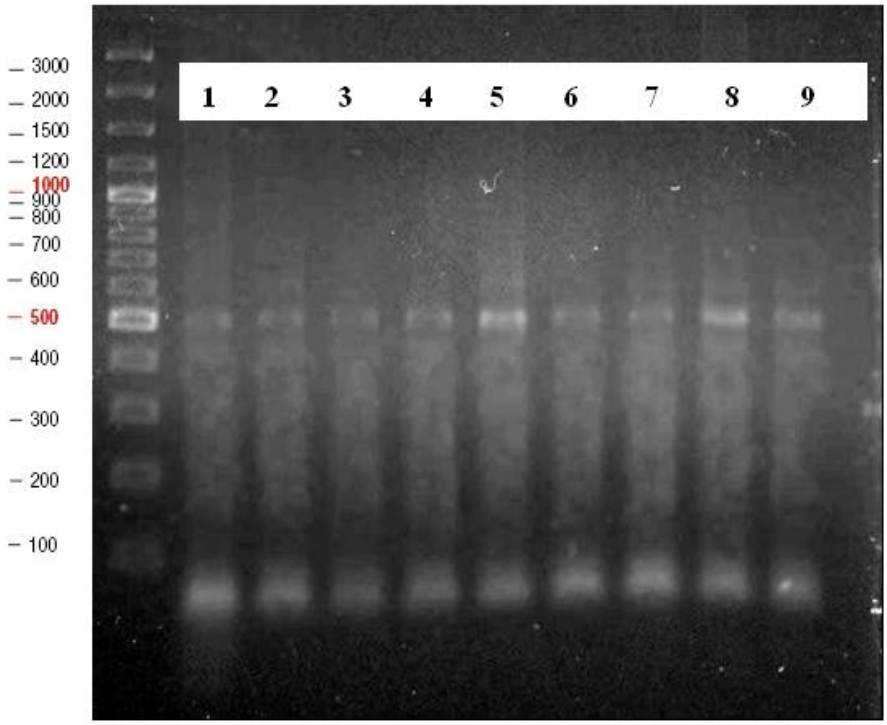
از ۳۲ جدایهٔ منتخب، ۲۶جدایه با استفاده از آغازگر اختصاصی *scab2m* و *ASE3* باندهای به وزن ۴۷۵ باز را تکثیر کردند (شکل ۵) ولی ۶ جدایه علی‌رغم تولید قطعهٔ ۱۰۲۷ بازی با جفت پرایمر اول، قادر به تولید باند ۴۷۵ نوکلئوتیدی نبودند و باندی برای آن‌ها مشاهده نشد. برای شناسایی ژن سنتزکنندهٔ *تاکستومین A* از جفت آغازگر *txtA F2* و *txtA R2* استفاده شد که قطعهٔ ۵۲۲ نوکلئوتیدی در هر ۲۶ جدایه با قدرت بیماری‌زایی روی سیب‌زمینی و تربچه تکثیر شد (شکل ۶).



شکل ۴-.الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲درصد، *PCR* با آغازگرهای *Strep F* و *Strep R*. چاهک‌های ۱ تا ۶ (از چپ به راست) جدایه‌های منتخب جمع‌آوری‌شده از آذربایجان شرقی، چاهک‌های ۷-۹ جدایه‌های منتخب جمع‌آوری‌شده از کردستان، چاهک ۹ شاهد مثبت، *M* *DNA Ladder*



شکل ۵-الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲درصد قطعات *DNA* تولیدشده در *PCR* با آغازگرهای اختصاصی *scab2m* و *ASE3*. چاهک شماره ۱: جدایه جمع‌آوری شده از کردستان، چاهک‌های ۲ تا ۸ (از چپ به راست) جدایه‌های منتخب از آذربایجان شرقی، ۸:شاهد مثبت، *M* : *DNA Ladder*



شکل ۶- الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲درصد قطعات *DNA* در *PCR* با آغازگرهای *txtA F2* و *txtAR2*، چاهک‌های ۱ تا ۴ (از چپ به راست) جدایه‌های منتخب از کردستان، چاهک‌های ۵-۸ جدایه‌های منتخب از آذربایجان شرقی، چاهک شماره ۹ شاهد مثبت

بحث و نتیجه‌گیری

از ۱۲۰ نمونه با علائم اسکب، فقط ۳۲ جدایه جنس *Streptomyces* جداسازی و شناسایی شد. با توجه به اینکه سایر بیمارگرهای گیاهی نظیر قارچ *Rhizotonia* و برخی آفت حشره‌ای نظیر لارو پروانه بید سیب‌زمینی (*Phthorimaea operculella*) علائم مشابه با اسکب در غدهٔ سیب‌زمینی ایجاد می‌کنند (۲)، احتمالاً تعدادی از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده متعلق به آن‌ها بود و آلوده به اسکب نبودند. براساس نتایج بررسی تولید ملانین نیز فقط سه جدایه از ۳۲ جدایه قادر به تولید ملانین در محیط کشت بودند. هرچند براساس گزارش بووسیژیور و بیولیو (۱۴) جدایه‌های با قدرت تولید ملانین دارای توان بیماری‌زایی بالاتری هستند، براساس گزارش حاضر فقط برخی از جدایه‌های بیماری‌زا قادر به تولید ملانین روی این محیط کشت هستند (۱۴). در این پژوهش نیز ارتباط معنی‌داری بین توان تولید ملانین و قدرت بیماری‌زایی روی غدهٔ سیب‌زمینی و یا تربچه مشاهده نشد.

برای شناسایی اولیه جدایه‌ها از جفت آغازگر عمومی *Strep B* و *Strep F* استفاده شد. قبلاً اختصاصیت این جفت آغازگر برای جنس *Streptomyces* اثبات شده بود (۹) بنابراین وجود باند موردِنظر در محصول PCR دلالت بر تعلق هر ۳۲ جدایه به جنس ذکرشده دارد. تست‌های بیوشیمیایی انجام‌شده نیز نتایج کار مولکولی را تعیین می‌کند.

برای شناسایی اختصاصی‌تر در سطح گونه از آغازگر اختصاصی *scab2m* و *ASE3* استفاده شد که فقط ۲۶ جدایه توان تولید باند موردِنظر را داشتند. این

جفت پرایمر برای شناسایی گونه های بیماری‌زایی گیاهی جنس *Streptomyces* طراحی شده‌اند و تنها قادر به شناسایی معدودی از گونه‌های جنس *Streptomyces* است که عمدتاً در روی گیاهان بیماری‌زا هستند. احتمالاً ۶ جدایه‌ای که با این آغازگر شناسایی نشدند، گونه‌های دیگری غیر از باکتری اصلی عامل اسکب یعنی *S. scabies* هستند. چون این ۶ جدایه با رنگی متفاوت و به‌رنگ خاکستری روی محیط کشت مشاهده شدند و با توجه به اینکه اسپورهای آن‌ها به‌شدت مارپیچی بودند، بیشترین شباهت را به گونه *S. turgidiscabies* دارند (۵،۱۱و۱۵) که در صورت توالی‌یابی و کارهای مولکولی بیشتر، این اولین گزارش از وجود این باکتری بیماری‌زای گیاهی در شمال غرب ایران خواهد بود.

در۲۶ جدایه از ۳۲ جدایهٔ مثبت، وجود ژن *تاکستومین* با استفاده از آغازگر اختصاصی اثبات شد. این ژن فقط در گونه‌های بیماری‌زای *S. scabies* و دو گونهٔ نزدیک به آن یعنی (*S. acidiscabies* و *S. turgidiscabies*) وجود دارد و در سایر گونه‌ها یا وجود ندارد و یا اندازهٔ باند PCR با پرایمرهای *txtA* برای آن‌ها متفاوت است (۳). با توجه به نتایج PCR با پرایمرهای *scab2m* و *ASE3* و نیز مورفولوژی زنجیره‌های صاف اسپوری این ۲۶ جدایه، احتمال تعلق آن‌ها به گونهٔ *S. turgidiscabies* منتفی است. چرا که اسپورهای *S. turgidiscabies* به‌شدت به‌صورت مارپیچ دیده می‌شوند و با پرایمر *scab2m* و *ASE3* قابلِ شناسایی نیستند. از طرفی با توجه به قلیایی‌بودن خاک هر دو استان و اینکه گونهٔ *S. acidiscabies* فقط در خاک‌های به‌شدت اسیدی (pH= ۵ >) یافت می‌شود، بنابراین هر ۲۶ جدایه با اطمینان بالا و به‌صورت مولکولی متعلق به گونهٔ *S. scabies* شناسایی شدند. این اولین گزارش علمی از وجود این بیمارگر در استان‌های آذربایجان شرقی و کردستان است. با توجه به درصد جدایه‌های مثبت به نمونه‌های جمع‌آوری‌شده، نتایج حاکی از گسترش شدید این بیماری در منطقه است. ضمناً در پژوهش مشابه، حسنی و تقوی (۷) از آغازگرهای اختصاصی مشابه (*scab2m* و *ASE3*) برای شناسایی گونهٔ *S. scabies* استفاده کردند و توانستند جدایه‌های مختلف این بیمارگر را در استان فارس و شهرستان بهار همدان حتی بدون نیاز به جداسازی از بافت شناسایی کنند.

از طرفی با توجه به اینکه صددرصد جدایه‌هایی که این باند را تولید کردند در آزمایش بیماری‌زایی روی غدهٔ سیب‌زمینی و گیاهچه تربچه نیز بیماری‌زا تشخیص داده شدند، همبستگی کاملاً معنی‌داری بین حضور این ژن و قدرت بیماری‌زایی گونه‌های *Streptomyces* دیده شد. کینگ [۲۰] و همکاران (۸) اظهار داشتند که شدت علائم ایجادشده بر روی سیب‌زمینی با میزان تولید *تاکستومین* در ارتباط است، آن‌ها با جداسازی و خالص‌سازی این توکسین از محیط کشت و اندازه‌گیری میزان آن نشان دادند که میزان تولید توکسین با شدت تولید علائم مختلف اسکب (سطحی، فرورفته و یا برجسته) ارتباط معنی‌داری دارد.

هلی [۲۱] و همکاران (۱۳) نیز در تأیید نتایج پژوهش حاضر نشان دادند در برخی نژادهای باکتری *S. turgidiscabies* و *S. acidiscabie* ژن *txtA* کاملاً ازبین‌رفته و یا به‌شدت تحلیل‌رفته هستند و قادر به سنتز *تاکستومین* نیستند، بنابراین روی غده‌های سیب‌زمینی، بیماری‌زایی خفیف نشان می‌دهند. در این پژوهش نیز ۶ جدایه علی‌رغم اینکه از بافت‌های آلوده جداسازی شده بودند، فاقد قدرت بیماری‌زایی و فاقد ژن *تاکستومین*

تشخیص داده شدند بنابراین احتمال وجود این گونه در منطقه بسیار بالاست.

معصومی و تقوی (۱۶) نشان دادند که ژن *TxtA* می‌تواند نشانگر مناسبی جهت تشخیص بیماری‌زایی در نژادهای *استرپتومایسس* باشد و نشان دادند که ژن بیماری‌زای *TxtA* در همه جدایه‌های بیماری‌زا موجود و در جدایه‌های غیربیماری‌زا وجود ندارد که بیانگر نقش مستقیم این ژن در بیماری‌زایی این پاتوژن است. البته خداکرمیان و همکاران (۱۷) در مغایرت با نتایج این پژوهش و پژوهش‌های مشابه، نشان دادند که فقط جدایه‌هایی که تولید اسکب برجسته می‌کنند توان تولید *تاکستومین* را دارند و سایر نژادهایی که تولید اسکب حفره‌ای یا زخم فرورفته می‌کنند قادر به تولید این توکسین نیستند.

References

(1) Goyer C, Beaulieu C. Host range of Streptomyces strains causing common scab. *Plant Disease*. 1997; 81(8): 901–904.

(2) Agrios GN. *Plant Pathology*. 5th edition. USA: Elsevier Academic Press; 2005.

(3) Loria R, Kers J, Joshi M. Evolution of plant pathogenicity in Streptomyces. *Annual Review Phytopathology*. 2006; 44(1): 469–487.

(4) Lambert DH, Loria R. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1989; 39(4): 387-392.

(5) Miyajima K, Tanaka F, Takeuchi T, Kuninaga S. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1998; 48(1): 495–502.

(6) Hill J, Lazarovits G. A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Canadian Journal Plant Pathology*. 2005; 27(1): 46–52.

(7) Hasani S, Taghavi SM. Phenotypic and genotypic diversity of Iranian Streptomyces isolates that cause potato common scab. *Journal of Plant Pathology*. 2014; 96 (3): 459-464

(8) King RR, Lawrence CH, Clark MC, Calhoun LA. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected tubers. *Journal of American Potato Association*. 1991; 68(10): 675–680.

(9) Schaad NW, Jones JB, Chun W. *Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria*. New York: American Phytopathological society Press. 2001; 373p.

(10) Loria R, Bukhliad RA, Creath RH, Leiner M, Steffens JC. Differential production of thaxtomins by pathogenic Streptomyces species in vitro. *Phytopathology*. 1995; 85(5): 537-541.

(11) Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1966; 16(3): 313–340.

(12) Li X, De Boer SH. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology*. 1995; 85(8): 837-842.

(13) Healy FG, Wach M, Krasnoff SB, Gibson DM, Loria R. The txt AB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology* 200; 38(4): 794–804.

(14) Beausejour J, Beaulieu C. Characterization of Streptomyces scabies mutants deficient in melanin biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004; 50(9): 705-709.

(15) Khayat maher R, Amoozegar M, Seyyedmahdi S, Hamedi J, Naghavi M, Foroozan far F et al .Isolation and screening of phytotoxin producing actinomycetes and determination of phytotoxin effect spectrum of selected strains. *Biological Journal of Microorganism*. 2012; 1 (2): 1-22.

(16) Masoomi F, Taghavi SM. *Identification of Pathogenicity genes and their roles in pathogenicity* of *Streptomyces isolates causal agent of potato common scab*. *Proceeding of the 20th Iranian Plant Protection Congress*. Shiraz; Page 607.

(17) Khodakaramian G, Zafari D, Soleimani Pari MJ. Diversity of *Streptomyces* strains of causal agent of potato common scab in hamadan province and their capability in production of Taxtomin. *Journal of Plant Pests and Diseases*. 2011; 79(1): 53-70.

[1]- Common Scab
[2]- Thaxtomin
[3]- Schaad
[4]- Yeast malt extract agar
[5]- Loria
[6]- Agria
[7]- Oat Meal Agar
[8]- Oxidative fermentative test
[9]- Shirling & Gottlieb
[10]- Pepton-yeast extract iron agar
[11]- Melanin
[12]- Li & DeBoer
[13]- Nutrient Broth
[14]- Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
[15]- *Sodium dodecyl sulfate*
[16]- Proteinase K
[17]- Denaturation
[18]- Annealing
[19]- Extension
[20]- King
[21]- Healy