مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۴، سال ۱۳۸۲ (۸۴۵-۸۳۷)

الگوی پروتئین و اسیدهای چرب جدایه‌های *Streptomyces* عامل جرب سیب زمینی در ایران

غلام خداکرمیان[1]، امید عینی[2] و حشمت ا ... رحیمیان[3]
۱، استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
۲، عضو هیات علمی دانشگاه زنجان ۳، استاد دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه مازندران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۱۱/۳۰

خلاصه

تعداد ۸۸ جدایه *Streptomyces* از غده‌های سیب زمینی جمع آوری شده از استانهای همدان، خراسان، اصفهان و چهارمحال بختیاری در سال ۱۳۷۹ جداسازی گردید. از بین استرینهای جدا شده ٤٦ استرین آن به عنوان نماینده انتخاب و به همراه استرینهای استاندارد *S. scabies*، *S. acidiscabies* و *S. stelliscabies* از نظر الگوی پروتئین و اسید چرب مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که الگوی الکتروفورز پروتئین گروهی از استرینها با استرینهای استاندارد *S. scabies* یکسان بود. در حالیکه گروهی دیگر شباهت بالایی با *S. acidiscabies* داشتند. پروتئین این دو گروه شباهت کمتری با استرین استاندارد *S.stelliscabies* نشان دادند. آنالیز اسیدهای چرب با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و گاز کروماتوگرافی (GC) به ترتیب وجود سه لکه و ۱۲ تا ۱۸ اسید چرب که در بین آنها دو اسید چرب عمده که از ویژگیهای استرینهای مورد بررسی بود را محرز ساخت. در کروماتوگرافی لایه نازک وجود لکه‌های چربی مشابه استرینهای استاندارد بود. با توجه به تنوع نسبتا زیادی که در بین استرینهای مورد بررسی وجود داشت، احتمالا گونه یا زیر گونه‌های جدیدی در بین آنها وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: جرب سیب زمینی، الکتروفورز، اسید چرب.

مقدمه

سیب زمینی یکی از محصولات مهم کشاورزی در ایران بوده که از نظر تولید سالیانه بعد از گندم، برنج، ذرت و جو در مقام پنجم قرار دارد. استانهای اردبیل، اصفهان، همدان، فارس، آذربایجان شرقی و خراسان از مهمترین مناطق کشت این محصول در کشور می‌باشند (۱). بیماری جرب سیب‌زمینی[1] از بیماریهای باکتریایی این محصول می‌باشد که عامل آن گونه‌های مختلف جنس *Streptomyces* می‌باشند. باکتریهای وابسته به این جنس به خاطر تولید مواد متابولیکی ثانویه خصوصا آنتی‌بیوتیکها به خوبی شناخته شده‌اند. در میان بیماریهایی که گونه‌های *Streptomyces* در گیاهان ایجاد می‌کنند جرب سیب‌زمینی مهمترین آنهاست که به عنوان چهارمین بیماری مهم سیب‌زمینی در نواحی شمال آمریکا در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است (۲).

اهمیت این بیماری به خاطر کاهش بازارپسندی و ارزش محصول به دلیل ایجاد علایم ظاهری روی غده و نیز غده‌زاد بودن آن است. این بیماری در خاکهای خنثی و نسبتاً قلیایی بیشتر مشاهده شده است ولی از نواحی با خاکهای اسیدی (pH کمتر از۵/۲) نیز گزارش شده است. بیماری جرب سیب‌زمینی توسط باکتری *S. scabies* (۸، ۲۲، ۲۳، ۳۱) و سایر گونه‌های *Streptomyces* ایجاد می‌شود (۳، ۷، ۱۲، ۱۳، ۲۲، ۲۴).

علایم ناشی از باکتری *Streptomyces* به اندامهای زیر زمینی گیاه محدود می‌شود و اولین علایم این بیماری اغلب به

---

1 . *Solanum tuberosum*

مکاتبه کننده: امید عینی

صورت نکروز شدن محل آلودگی نمایان می‌شود. آلودگی سیستمیک تا کنون گزارش نشده است. اگرچه قسمتهای هوایی گیاه نیز در آلودگیهای شدید ریشه کاهش رشد پیدا کرده یا پژمرده می‌گردند علایم بیماری جرب سیب‌زمینی به صورت زخمهای کوچک برجسته بر روی اندامهای زیر زمینی در اطراف عدسکها یا حفره‌های نکروزه عمیق تا عمق هفت میلیمتر در بافت میزبان می‌باشد که این علایم با توجه به استرین عامل بیماری و شرایط محیطی متغیر می‌باشند. شدت علایم بستگی به اثر متقابل بین میزبان، شرایط محیطی و استرین پاتوژن دارد (۱۰، ۱۶، ۲۳).

گونه‌های بیماریزای جنس *Streptomyces* از نظر ویژگیهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و ترکیب اسیدهای چرب مختلف می‌باشند، که بیانگر آن است که این گونه‌ها ارتباط نزدیکی با هم ندارند. هیبریداسیون DNA-DNA نیز مبین این مطلب است. درتمام استرینهای *S. scabies* و *S. acidiscabies* که توسط روش هیبریداسیون DNA-DNA مقایسه شده‌اند همولوژی DNA کمتر از ۲۰ درصد بوده است. سایر مطالعات نیز نشان داده است که *S. ipomoeae* با سایر گونه‌ها از قبیل *S. scabies* (همولوژی DNA ۳۹ درصد)، *S. acidiscabies* (همولوژی DNA ۱۷ درصد) و با گونه‌های غیر بیماریزا ارتباط نزدیکی ندارد (۱۴، ۲۰).

یکی از روشهای سریع برای شناسایی باکتریهای ناشناخته آنالیز اسیدهای چرب دیواره سلولی است (۴، ۶، ۱۱). با استفاده از تغییر اسیدهای چرب دیواره سلولی می‌توان استرینهای بیماریزای *S. scabies*، *S. acidiscabies* و *S. albidoflavus* و استرینهای تولید کننده آنتی بیوتیک را از همدیگر متمایز ساخت (۲۵).

مطالعه اسیدهای چرب (۲۶ اسید چرب) در ۲۷ استرین *S. scabies* (۲۰ استرین بیماریزا و هفت استرین بازدارنده *Streptomyces*) نشان داده که این استرینها کلاً دارای ۱۶ تا ۱۸ اسید چرب بوده‌اند که اسیدهای چرب iso 16:0 ، 15:0 anteiso بیشترین درصد اسیدهای چرب دیواره سلولی را در کلیه استرینها تشکیل داده اند. آنالیز واریانس (ANOVA) اسیدهای چرب، تفاوتهای مهمی را در میزان برخی اسیدهای چرب در استرینهای بیماریزاها در مقایسه با غیر بیماریزاها نشان داده است (۲۵).

امروزه روشهای شیمیایی، مولکولی و تاکسونومی عددی جهت مقایسه گونه‌های *Streptomyces* به کار می‌روند که این روشها شامل: Phage typing ، هیبریداسیون DNA-DNA، ELISA ، تشخیص سریع بیوشیمیایی با استفاده از مواد 4- metyl- umbeliferon-linked، مقایسه پروتئینهای ریبوزومی، آنالیز قطعات DNA حاصل از برش آنزیمهای محدودگر و مقایسه توالیrRNA s ۱۶و rRNA ۲۳s می‌باشند (۳).

بیماری جرب معمولی سیب‌زمینی که به وسیله باکتری *S. scabies* ایجاد می‌شود تا کنون از کشورهای اروپای شرقی و غربی، آفریقای جنوبی، استرالیا، نیوزلند، اسرائیل، آمریکا و کانادا گزارش شده است. عامل بیماری در برخی نواحی روی تربچه، شلغم و هویج نیز علایمی ایجاد می‌کند (۲۳).

تاکنون هیچ گزارش مدونی از بررسی و شناسایی عامل بیماری جرب سیب‌زمینی در ایران ارائه نشده است. با توجه به وجود علایم این بیماری بر روی غده‌های سیب زمینی جمع‌آوری شده از اکثر مناطق سیب‌زمینی کاری کشور بررسی عامل بیماری به منظور شناسایی گونه یا گونه‌های باکتری و سایر میزبانهای آن جهت اتخاذ استراتژی مناسب جهت کاهش خسارت بیماری در آینده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، جداسازی و نگهداری استرینها

در سال ۱۳۷۹ از مزارع مختلف سیب زمینی استانهای همدان (ایستگاه تحقیقاتی تجرک، شهرستانهای بهار، قهاوند و همدان)، اصفهان (شهرهای دامنه، خوانسار، کمیتک، وران شمالی، فریدن)، چهارمحال و بختیاری (شهرهای نافچ، گندمان، سفید دشت، فرادنبه، بلداجی) و خراسان (شهرهای مشهد، تربت حیدریه، جلگه رخ) به طور تصادفی از غده‌های دارای علایم بیماری نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در پاکتهای کاغذی قرار داده و به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری گردید.

جهت جداسازی عامل بیماری، هر یک از نمونه‌ها ابتدا زیر جریان ملایم آب و سپس با آب مقطر استریل شسته شدند. نمونه با هیپوکلرید سدیم پنج تا ۱۰ درصد (از ماده تجاری) ضدعفونی کرده و سپس با آب مقطر استریل شستشو شدند و در اتاق کشت از لایه نازک حصیری رنگ زیر ناحیه آلوده (مرز بین

بافت سالم و آلوده) تکه‌هایی از بافت غده جدا گردید و در آب مقطر سترون خرد شد. از سوسپانسیون ایجاد شده دو تا سه لوپ روی محیط کشت YMA (عصاره مخمر چهار گرم، عصاره مالت ۱۰ گرم، دکستروز چهار گرم، آگار ۲۰ گرم در یک لیتر آب مقطر با pH=۷/۳) و محیط آب آگار دارای آنتی‌بیوتیک (۱۰ میلی لیتر از محلول پایه حاوی نیستاتین[1] ۵۰۰ میلی‌گرم، سولفلت پلی‌میکسین[2] بی ۵۰ میلی‌گرم، پنی‌سیلین جی[3] ۱۰ میلی‌گرم و سیکلوهگزامید[4] ۵۰۰ میلی‌گرم در یک لیتر محیط کشت)به صورت مخطط کشت شد. تشتکهای پتری کشت شده به صورت وارونه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از گذشت پنج تا هفت روز از تک کلنیهای رشد کرده که ظاهری شاخه شاخه داشتند، انتخاب و مجدداً تا خالص سازی کامل، روی محیطهای مذکور مخطط‌گردیدند(۲۷). پس‌از جداسازی، تشخیص و انتخاب جدایه‌های *Streptomyces* جهت نگهداری از روشهای سوسپانسیون در آب چهار درجه سانتی‌گراد، کشت بر روی محیط YMEA مورب در زیر پارافین در یخچال یا سوسپانسیون اسپور در گلیسرول ۲۰ درصد و نگهداری در دمای۱۰درجه سانتیگراد زیر صفر استفاده شد(۲۸).

اثبات بیماریزایی

اثبات بیماریزایی روی تکه‌های سیب زمینی: ابتدا غده سیب زمینی را با آب شسشو داده و سپس با هیپوکلریت سدیم پنج تا ۱۰ درصد از ماده تجاری و ۰/۱ درصد کربنات کلسیم به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی گردید، در شرایط استریل پوست غده را جدا کرده و از قسمت وسط غده قطعاتی به اندازه یک در دو سانتی‌متر تهیه کرده و در تشتکهای پتری سترون قرار داده شد. سپس از هر ایزوله که قبلاً کشت شده و تولید اسپور کرده (کشت ۱۴ روزه) به همراه محیط کشت برداشته و به طور وارونه روی قطعات سیب زمینی قرار داده، برای شاهد منفی از محیط کشت OM تلقیح نشده و شاهد مثبت از استرین استاندارد بیماریزای *S. scabies* (دریافتی از آمریکا، دانشگاه کرنل، بخش بیماری‌شناسی‌گیاهی) استفاده گردید. مقداری آب مقطر سترون نیز در تشتکهای پتری ریخته تا رطوبت قطعات سیب زمینی حفظ گردد. نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه تا پنج روز نگهداری شدند. این آزمایش برای هر استرین سه بار تکرار شد (۲۳).

اثبات بیماریزایی روی گیاهچه تربچه: بذر تربچه را ابتدا به طور سطحی با هیپو کلرید سدیم پنج تا ۱۰ درصد ضد عفونی کرده، سپس به منظور جوانه‌زنی بذرها، آنها را روی محیط آب آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه نگهداری کرده تا بذرها جوانه‌زنی کنند. بذرهای جوانه زده را با سوسپانسیونی از اسپور باکتری (نماینده ای از استرین ها) تلقیح کرده و در لوله‌های حاوی محیط کشت آب آگار (۱۰ درصد) استریل قرار داده شدند. علائم بیماری روی گیاهچه تربچه یک تا دو هفته بعد بررسی گردید (۲۸).

اثبات بیماریزایی روی قلمه جوانه برگ: از ارقام سیب زمینی شامل اگریا[5] و دیامونت[6] که ظاهراً به این بیماری حساس می‌باشند، قلمه‌هایی تهیه گردید و در گلدانهای حاوی شن استریل، تلقیح شده با سوسپانسیونی از اسپور باکتری، به طوریکه حداقل یک جوانه جانبی زیر شن قرار گیرد، کشت گردید و به مدت دو تا چهار هفته در شرایط گلخانه‌ای نگهداری شد (۹).

بررسی خصوصیات الکتروفورز پروتئین

استخراج پروتئینهای سلولی: از کلیه استرینها که بر اساس خصوصیات فنوتیپی در گروههای مختلف قرار گرفته بودند، تعدادی استرین به عنوان نماینده انتخاب گردید و پروتئین محلول از میسلیومهای باکتری به روش زیر استخراج شد. یک لوپ از اسپورهای باکتری در ۱۲۵ میلی‌لیتر از محیط YGM کشت شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه لرزانک[7] (g × ۱۲۰) قرار داده شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری در g × ۶۰۰۰ سانتریفوژ گردید. رسوب میسیلیومی[8] باکتری را سه بار با بافر فسفات شسته و یک لوپ ازمیسیلیوم باکتری با یک میلی‌لیتر از بافر A (تریس-اسید کلریدریک با pH=۷/۵، ۲۰ میلی مول؛ ای‌دی‌تی‌آ، دو میلی‌مول؛ ۲- مرکاپتواتانول، یک درصد) مخلوط گردید.

1 . Nistatine
2 . Polymixin B sulfate
3 . Penicillin G
4 . Cycloheximide
5 . Agria
6 . Diamont
7 . Shaker
8 . Pellet

جهت شکستن دیواره باکتری از دستگاه سونیکاتور[1] در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه استفاده شد. سپس به هر نمونه به مقدار یک درصد از غلظت نهایی سدیم دودسیل سولفات (SDS) اضافه شد و نمونه ها به مدت سه دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه ها را چند بار از سرنگ انسولین عبور داده و سپس به مدت ۱۲ دقیقه در میکروسانتریفوژ یخچال دار در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی به تیوپهای اپندورف منتقل گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۲۶).

الکتروفورز پروتئین: الکتروفورز پروتئین استخراج شده در ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) تخت عمودی بر مبنای روش اصلاح شده لاملی انجام شد (۲۱).

در این روش از ژل جدا کننده[2] ۱۴ درصد و ژل متراکم کننده[3] پنج درصد استفاده گردید. بعد از تهیه ژل ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهکهای ژل قرار داده شد و الکتروفورز به کمک جریان ۸۰ ولتی تا رسیدن ماده رنگی به ابتدای ژل زیری و سپس ۱۰۰ ولت و آمپر ثابت در بافر تانک تریس- گلیسین (۳/۲ گرم تریس،۱۴/۴ گلیسین، ۱ گرم SDS با حجم نهایی یک لیتر با pH = ۸/۳ انجام شد (۲۶).

رنگ آمیزی و رنگبری: بعد از اتمام الکتروفورز، ژل را در محلول رنگ ۰/۱ درصد کوماسی بلو آر - ۲۵۰[4] در متانل، آب و اسید استیک به نسبت حجمی ۱:۵:۵ به مدت حداقل دو ساعت رنگ آمیزی گردید. سپس در همان محلول (بدون کوماسی بلو) رنگبری شد. جهت نگهداری ژلها از اسید استیک پنج درصد استفاده شد.

بررسی خصوصیات کروماتوگرافی چربی‌های سلولی

استحصال چربی‌های سلولی: از کشتهای ۱۰ تا ۱۴ روزه یک لوپ از اسپور باکتری در فلاسک حاوی ۱۲۵ میلی‌لیتر محیط Trypticase soy broth تلقیح گردید و نمونه‌ها به مدت ۷۲- ۴۸ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه لرزانک (۱۴۰×g) قرار داده شدند. سپس میسیلیومهای باکتری در ۶۰۰۰×g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. یک توده از میسیلیوم باکتری در لوله آزمایش ۱۰۰ × ۱۳ میلی‌متر درب‌دار قرار داده و یک میلی‌لیتر از محلول سود ۱۵ درصد در متانول ۵۰ درصد به آن اضافه کرده و به مدت پنج تا ۱۰ ثانیه آن را تکان داده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول اسیدکلریدریک ۶ نرمال در متانول ۵۰ درصد به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰- ۵۰ ثانیه مخلوط شد و در حمام آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد، سپس سریعاً سرد گردید. یک میلی‌لیتر از محلول هگزان و دی‌اتیل اتر به نسبت مساوی اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. فاز زیری لوله خارج گردید، ۳ میلی‌لیتر سود ۱/۲ درصد به فاز رویی نمونه اضافه و مخلوط گردید و لوله به مدت پنج دقیقه به حالت ساکن نگه داشته و دو سوم فاز رویی در اپندورف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۷).

کروماتوگرافی لایه نازک

مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه چربی طی چند مرحله روی صفحه سیلیکاژل لکه گذاری شد. لکه‌ها به قطر حدود پنج میلی‌متر، به فاصله ۱/۵ سانتی‌متر و یک سانتی‌متر بالاتر از قاعده صفحه ژل قرار داده شدند. صفحه به تانک کروماتوگرافی محتوی ۱۵۰ میلی‌لیتر حلال پترولیوم بنزن، دی اتیل اتر، به نسبت حجمی ۸۵ : ۱۵ منتقل شد و تا رسیدن حلال به یک تا دو سانتی‌متری بالای صفحه کار ادامه یافت.

ردیابی و ظهور لکه‌ها: برای ظهور لکه‌ها، صفحه کروماتوگرافی بمدت پنج دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس زیر نور ماورا، بنفش مشاهده گردید.

کروماتوگرافی گاز (GC): مقدار ۲ میکرولیتر از هر نمونه چربی به دستگاه GC[5] با طول ستون ۲۵ متر، پوشیده شده با سیلیکا و گاز حامل نیتروژن، تزریق شد.

دمای اولیه ستون ۸۰ درجه سانتی‌گراد بود که ۲۰ درجه در دقیقه تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. دمای محل تزریق ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شناسگر ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. اسیدهای چرب مختلف بر اساس نقطه جوش مختلف از یکدیگر متمایز شدند.

1 . Sonicator
2 . Separating gel
3 . Staeking gel
4 . Coommasi blue R-250
5. Gas Chromotography Shima DZU

نتایج و بحث

پس از خالص سازی جدایه‌های *Streptomyces* از سیب زمینی در روی محیط کشت MEA و Water Agarحاوی آنتی‌بیوتیک، از محیط YMEA جهت انجام آزمونهای فنوتیپی و مورفولوژیکی استفاده شد. با بررسی خصوصیات فنوتیپی و مورفولوژیکی ۴۶ استرین منتخب جدا شده از غده‌های سیب زمینی مشخص شد که همه استرینها روی محیط کشت YMEA کلنیهای مجزا به صورت گل‌سنگی یا چرمی کره‌ای شکل به قطر ۱۰-۱ میلی‌متر به رنگهای مختلف ایجاد کردند که با مسن شدن کلنی، تولید میسیلیومهای هوایی (اسپورفور) کرده که نحوه شاخه شاخه شدن آنها متنوع بود. همه جدایه‌ها گرم مثبت و هوازی بودند، بنابراین همگی متعلق به جنس *Streptomyces* بودند (۳، ۲۳، ۲۸).

بین ایجاد علایم نکروز توسط جدایه‌های *Streptomyces* روی تکه‌های سیب زمینی و ایجاد بیماری روی محصول در شرایط گلخانه‌ای ارتباط بالایی وجود دارد. همچنین بین علایم ایجاد شده روی تکه‌های سیب زمینی و تولید Thaxtomin در استرینهای *S .scabies* رابطه مستقیم وجود دارد. البته تعداد معدودی استرین *S. scabies* جدا شده از خاک، نیز زخمهای فرورفته روی تکه‌های سیب زمینی ایجاد کرده ولی تولید Thaxtomin نکردند. برخی جدایه‌های تولید کننده Thaxtomin در شرایط گلخانه‌ای روی غده‌های سیب زمینی علایمی ایجاد نکردند که این امر ممکن است به خاطر از دست رفتن بیماریزایی بیمارگر و یا شرایط محیطی نامناسب برای بروز بیماریزایی جدایه‌های *Streptomyces* جداسازی شده از این محصول باشد (۵).

از ۸۸ جدایه ۴۶ جدایه روی تکه های سیب زمینی در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد ایجاد علایم نکروز فرورفته کردند. جدایه‌هایی که به عنوان نماینده انتخاب شده بودند سبب نکروز و مرگ گیاهچه های تربچه شدند. همچنین این جدایه‌ها روی غده های کوچک سیب زمینی حاصل از قلمه جوانه برگ علایم نکروز ایجاد کردند. پس از کشت قسمتهای دارای علایم بیماری،مجددا باکتری جدا شد و با انجام تعدادی از آزمونهای تشخیصی مهم (فیزیولوژیک و بیوشیمیایی) مشخص شد که خصوصیات فنوتیپی این باکتریها شبیه جدایه‌های اولیه می‌باشد.

باندهای الکتروفورزی جدایه‌های SK 87, MG78, H83 , ChF 84 و H 73 در تعداد و محل قرارگیری باندهای قوی و ضعیف کاملا با هم شبیه بودند و با استرینهای استاندارد *S. scabies Msh2* ، *S. scabies* Mss-DD4 و *S. stelliscabies* نیز در تعداد و محل قراگیری باندهای قوی و ضعیف شباهت بالایی داشتند و نقوش الکتروفورز پروتئین استرینهای Ch28, MT43 و MT46 با استرین استاندارد *S. acidiscabies* شباهت زیادی نشان دادند (شکل۳). مطالعات قبلی نیز نشان داده که استرینهای *S. scabies* بر اساس همولوژی DNA و الگوی اسیدهای چرب و پروتئین‌های سلولی، یک گروه ناهمگن[1] است. بنابراین ارتباط بین این گونه‌ها نیاز به مطالعات وسیعتری در آینده دارد (۱۴، ۳۰).

به طور کلی استرینهای *Streotomyces* عامل جرب سیب زمینی در نواحی مورد مطالعه از لحاظ الگوی الکتروفورز پروتئین در سه گروه عمده قرار گرفتند. گروه اول، شامل ۱۸ استرین بود که با استرینهای استاندارد *S. scabies* شباهت بیشتری داشتند و گروه دوم شامل ۱۰ استرین بود شباهت بالایی با استرین استاندارد *S. acidiscabies* داشتند این گونه برای اولین بار از ایران گزارش می‌گردد. گروه سوم شباهت کمتری با دو گروه قبل داشته ودارای الگوی پروتئینی متنوعی بودند. که بیانگر تنوع بالا و ناهمگن بودن جدایه‌های عامل بیماری جرب سیب زمینی می‌باشد.

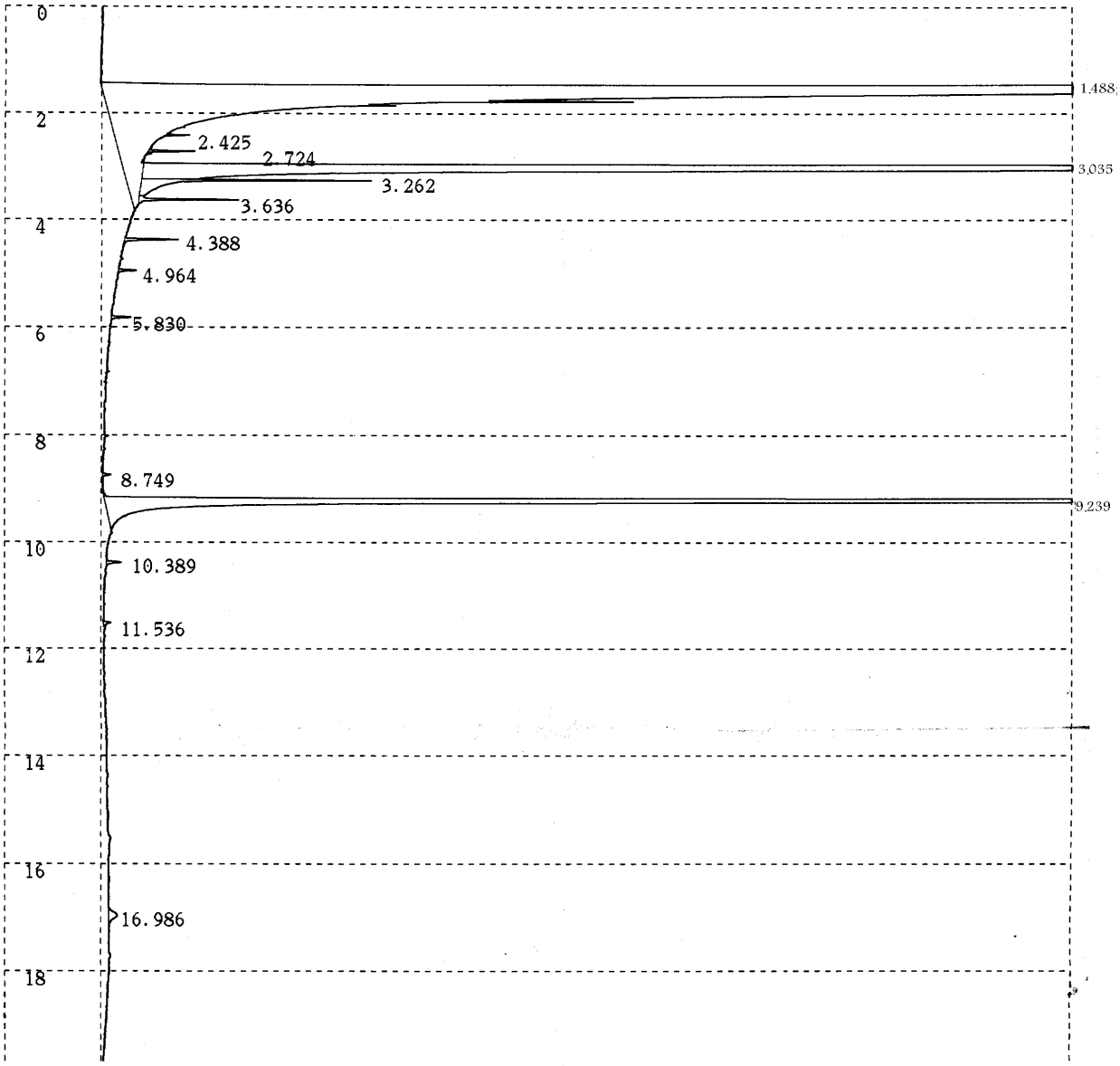
در بررسی کروماتوگرافی چربیهای سلولی، کلیه استرینهای انتخاب شده سه لکه روی صفحه کروماتوگرافی ایجاد کردند. لکه وسط کمی ضعیف‌تراز دو لکه دیگر بود (شکل ۲). تعداد و محل قرار گیری لکه‌ها با استرینهای استاندارد *S. scabies* Mss-DD4 و *S. scabies* MSh2 شباهت بالایی داشتند. میزان جداشدگی چربیهای سلولی در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول۱- میزان جداشدگی (R_f) اسیدهای چرب سلولی استرینهای *Streptomyces scabies* عامل جرب سیب‌زمینی در نواحی مورد مطالعه با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک سیلیکاژل

لکه‌ها	استرینها					
	H80	H73	ChA84	SK87	Mss-DD4**	MSh2**
A	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۹۰	۰/۹۰	۰/۹۰	۰/۹۰
B	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۲	۰/۸۳	۰/۸۳	۰/۸۳
C	۰/۷۰	۰/۶۸	۰/۷	۰/۷۷	۰/۷۷	۰/۷۷

** استرینهای استاندارد *Streptomyces scabies*

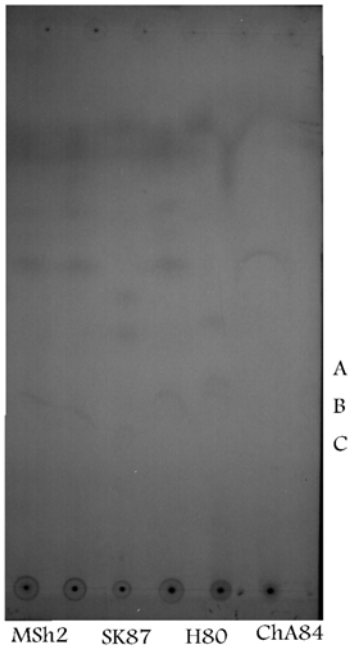
1. Heterogen



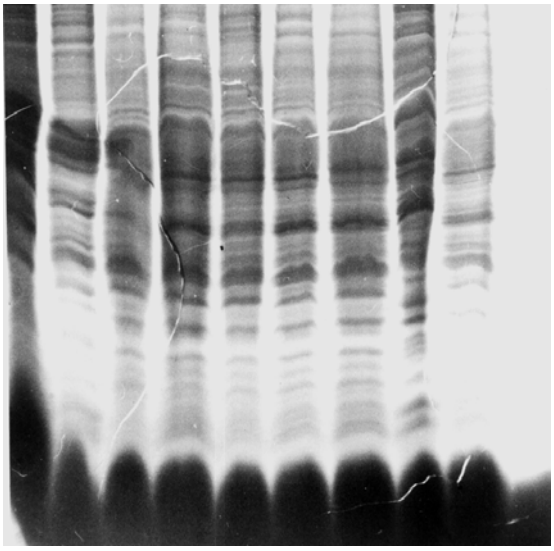
** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	1.488	1018071	903975	S		89.5475	
	2	2.425	28	25	T		0.0025	
	3	2.724	79	48	T		0.0069	
	4	3.035	85959	29275	T		7.5608	
	5	3.262	671	236	TV		0.0591	
	6	3.636	172	103	TV		0.0151	
	7	4.388	94	55			0.0083	
	8	4.964	35	19			0.0031	
	9	5.83	37	21			0.0033	
	10	8.749	19	9			0.0016	
	11	9.239	31610	12430			2.7804	
	12	10.389	37	16			0.0032	
	13	11.536	20	7			0.0018	
	14	16.986	74	9			0.0065	
		TOTAL	1136907	946226			100	

شکل ۱- کروماتوگرافی گاز (GC) اسید چرب استرین 39 *Streptomyces scabies* با استفاده از ستون سیلیکا و گازحامل نیتروژن



شکل ۲- کروماتوگرافی اسیدهای چرب سلولی استرینهای *Streptomyces scabies* عامل جرب سیب زمینی در نواحی مورد مطالعه در ایران



شکل ۳- باندهای الکتروفورزی پرتئین استرینهای *Streptomyces* عامل جرب سیب زمینی در نواحی مورد مطالعه، در ایران. استرینهای 14 و 15 به ترتیب استرینهای استاندارد *S. scabies* و *S. acidiscabies* می‌باشند.

با مطالعات انجام شده روی استرینهای بیماریزای *S. scabies*، *S. acidiscabies* و گونه‌های عامل جرب زنگاری (Russet scab) مشخص شد که اسیدهای چرب 15:0 anteiso و 16:iso هر کدام با داشتن حداقل یک درصد کل اسیدهای چرب دیواره سلولی بیشترین مقدار اسیدهای چرب را در بین حدودا ۲۰ نوع اسید چررب دیواره دارند (۲۵).

استرینهای *Streptomyces* مورد مطالعه با استفاده از کروماتوگرافی گاز (GC) همگی دارای ۱۸-۱۲ اسید چرب و دو اسید چرب عمده بودند که زمان استخراج این دو اسید چرب در استرینهای مختلف با استرینهای استاندارد *S. scabies* و *S. acidiscabies* بسیار نزدیک به هم بود (شکل ۱).

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. بی‌نام. ۱۳۷۸. بررسی آماری سیب‌زمینی. انتشارات معاونت برنامه‌ریزی و بودجه، اداره کل آمار وزارت کشاورزی. ویرایش دوم. ۸۵ صفحه.

2. Anderson, A. S. & M. H. Wellington. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *In. J. Sys. Evolu. Microbiol*., 51: 797-814
3. Archuleta, J. G. & G. D. Easton. 1981. The cause of deep-pitted scab of potatoes. *Am. Potato J.*, 58: 385-392
4. Bouzar, H., J. B. Joens, & N. C. Hodge. 1993. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-soruce utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology*, 83: 733-739
5. Conn, K. L., E. Leici, G. Kritzman, & G. Lazarovits. 1998. A quantitative method for determining soil population of *Streptomyces* and differentiation potential potato scab-inducing strains. *Plant Dis.,* 82: 631-638
6. De Boer, S. H. & M. Sasser. 1986. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on the basis of fatty acid composition. *Can. J. Microbiol*., 32: 796-800
7. Doering- Saad, C., P. Kampfer, S. Manulis, G. Kurtzman, & I. Barash. 1992. Diversity among *Streptomyces* strains causung Potato scab. *Appl. Environ. Microbiol*. 58:3932- 3940

8. Elesawy, A. A. & I. M. Szabo. 1979. Isolation and characterization of *Streptomyces scabies* strains from scab lesion of potato tubers. Designation of the neotype strain of *Streptomyces scabies*. *Acta Microbiol.*, 26: 311-320
9. Faucher, E., B. Otrysco, E. Paradis, & C. Beaulia. 1993. Characterization of *Streptomyces* causing russet scab in Quebec. *Plant Dis.*, 77: 1217-1220
10. Faucher, E., T. Savard, & C. Beaulieu. 1992. Characterization of *Actinomycet* isolated from common scab lesions on Potato tubers. *Can. J. Plant Pathol*., 14: 197- 202
11. Gitaitis, R. D. & R. W. Beaver. 1990. Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 80: 318-321
12. Gordon, R. E. & A. C. Horan. 1968. A piecemeal description of *Streptomyces griceus* (Kranisky) Waksman and Henrici. *J. Gen. Microbiol*. 50: 223- 233
13. Harrison, M. D. 1962. Potato russet scab, its cause and factor affecting its development. *Amer. Potato J*. 39: 368-387
14. Healy, F. G. & D. H. Lambert. 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. *Int. J. Syst. Bacteriol*., 41: 479-482
15. Hooker, W. J. 1990. Common scab. In: Compendium of Potato Diseases. Hooker, W. J. (ed). The American Phytopathology Society, St. Paul, MN. PP. 33-34
16. King, R. R. & C. H. Lawrence. 1996. Characterization of new thaxtomin A analogus generated invitro by *Streptomyces scabis*. *J. Agr. Food. Chem*., 44: 1108-1110
17. Klement, Z., C. L. Farkas, & L. Lovrekorich. 1964. Hypersensivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobaco leaf. *Phytopathology*, 54: 474-477
18. Korn-Wendisch, F. & H. J. Kutzner. 1992. The family *Streptomycetaceae*. In: The Prokaryote. Balow, A., Truper, H. G., Dworkin, M & Harder, W. New York, Springer
19. Kutzner, H. J. 1981. The family of *Streptomycetacea. I*n: The Procaryotes: A Handbook of Habitats, Isolation and Idenyification of Bacteria. Vol. II, Starr, S., Balows, T. & Legal, S. (eds). Springer- Verlag. Berlin. PP. 2028-2090
20. Labeda, D. P. 1992. DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces. Gene,* 115: 249-253
21. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature.* 227: 680- 685
22. Lambert, D. & R. Loria. 1989. *Streptomyces scabies* sp. Nov. *Rev. Int. J. Syst. Bacteriol*., 39: 393-396
23. Loria, R., R. Bukhalid, & A. Barbara. 1997. Plant pathogenicity in the genus of *Streptomyces*. *Plant Dis.*, 81: 836-846
24. Millard, W. A. & S. Burr. 1926. A study of twenty-four strains of *Actinomyces* and their relation to type of common scab of Potato. *Ann. Appl. Biol*., 13: 580-644
25. Ndowora, T. C. R., L. L. Kinkel, R. K. Jones, & N. A. Anderson. 1996. Fatty acid anaysis of pathogenic and suppressive strains of *Streptomyces species* isolated in Minnesota. *Phytopathology*, 86: 138- 143
26. Paradis, E., C. Goyer, N. C. Hodge, R. Houge, E. S. Robert, & C. Beaulieu. 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern canada. *Int. J. Sys. Bacteriol*., 44: 561- 564
27. Schaad, N. W., J. B. Joens, & W. Chun. 2000. Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third edit. Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul. Minnesota. USA. pp. 236-249
28. Stackebrandt, E., F. A. Rainey, & N. L. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierachic classification system; *Actinobacteria* classis Nov. *Int. J. Sys. Bacteriol*., 47: 479-491s
29. Takeuchi, T., H. Sawada, F. Tanaka, & A. I. Matsuda. 1996. Phytopathogenic analysis of *Streptomyces* spp. causing Potato scab based on 16s rRNA sequences. *Int. j. Syst. Bacteriol.*, 46: 476-179
30. Waksman, S. A. & A. T. Henrici. 1948. Familly II *Actinomycetaceae* Buchanan and family *Streptomycetaceae* Waksman and Henrici. pp. 143-164 In; Bergay′s Manual of Determinative Microbiology, 6th. Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Hitchens, A. P. (eds). The Williams and Wilkin Co., Baltimore

Iranian. J. Agric. Sci. Vol. 34, No. 4, 2003

Protein Electrophoretic and Fatty Acid Patterns of the Strains of *Streptomyces* Causing Potato Scab in Iran

GH. KHODAKARAMIAN[1], O. EINI[2] AND H. RAHIMIAN[3]
1, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University,
2, Scientific Member, University of Zanjan 3, Professor, Faculty of Agriculture,
University of Mazandaran, Sary, Iran.
Accepted Feb. 19, 2003

SUMMARY

In order to characterize *Streptomyces* strains that induce potato scab disease, samples were collected from fields in Hamedan, Esfahan, Khorasan and Chahar Mahal-e Bakhtiary provinces during 2000. Forty six pathogenic strains were selected and grouped in three groups through protein electrophoresis. Protein electrophoretic patterns in the first group were similar to those in standard strains of *S. scabies* Mss94-DD4, *S. scabies* P-SH-2 and *S.scabies* Msh2 but different from those in standard strains of *S. acidiscabies* and *S. stelliscabies*, in the fifth phenon being similar to those of *S. acidiscabies*. These strains possessed 12-18 fatty acids with two dominant fatty acids that had similar R_f with standard strains according to GC and TLC analysis. Due to considerable varietion among strains and phena, there would be new species or subspecies probable among these strains.

Key words: Streptomyces, Fatty acid, Potato scab, Electerophoresis