

مقاله پژوهشی

ارزیابی فنوتیپی، بیماری‌زایی و مولکولی جدایه‌های استرپتومایسس بیمارگر سیب‌زمینی در خراسان رضوی

فریده بی‌سیار، ساره بقایی راوری[✉]، عصمت مهدی‌خانی مقدم

به‌ترتیب دانشجوی فارغ‌التحصیل، دانشیار و استاد گروه گیاه‌پزشکی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۹)

چکیده

اسکب معمولی یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی سیب‌زمینی است که تولید بهینه این محصول اقتصادی را به‌طورفراگیر محدود می‌سازد. متعاقب نمونه برداری سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، پرگنه‌های پودری با شکل‌شناسی جنس استرپتومایسس خالص‌سازی و از نظر ویژگی‌های فنوتیپی، بیماری‌زایی و ردیابی زندهای مستقر روی جزیره بیماری‌زایی شامل *txtAB*، *nec1* و *tomA* ارزیابی شدند. شکل‌شناسی پرگنه جدایه‌ها روی محیط عصاره مخمر-مالت-آگار متنوع و جدایه‌های بیمارگر علائم عدم‌جوانه‌زنی، نکروز و کتونولگی را روی گیاهچه‌های تربچه نشان داده و از نظر فنوتیپی به شش گروه تفکیک شدند. از ۲۰ جدایه بیمارگر روی تربچه، ۱۱ جدایه قادر به ایجاد نکروز و یا فرورفتگی در ورقه‌های سیب‌زمینی و هشت جدایه علائم کلروز و یا نکروز را روی برگ‌های توتون پس‌ازگذشت ۱۰ روز ایجاد نمودند. نتایج بیماری‌زایی در شرایط گلخانه، به‌صورت زخم‌های سطحی و یا برجسته با شاخص شدت لکه بین یک تا چهار مشخص شد. قطعه ۷۰۰ جفت‌بازی *nec1* در شش جدایه از مجموع هشت جدایه منتخب ردیابی شد. درحالی‌که ژن‌های *tom A* و *txt AB* به‌ترتیب در جدایه‌های JR-12 و TM-29 تکثیر شدند. براساس نتایج توالی‌یابی 16SrRNA، جدایه TM-29 به‌عنوان *Streptomyces bottropensis* و جدایه JR-12 به‌عنوان *Streptomyces* sp. مشخص شد. به‌نظر می‌رسد جدایه‌های خراسان رضوی، دارای فاکتور بیماری‌زایی به‌غیر از تاکستومین A هستند که برای تأیید آن، انجام آزمایشات تکمیلی ضرورت دارد. واژه‌های کلیدی: استرپتومایسس؛ بیماری‌زایی؛ پرآزاری؛ شناسایی مولکولی

Phenotypic, pathogenicity and molecular evaluation of potato pathogenic *Streptomyces* strains in Razavi-Khorasan

F. BISAYAR, S. BAGHAE-RAVARI[✉], E. MAHDIKHANI-MOGHADDAM

Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Common scab is one of the most important bacterial diseases of potato which restricts the optimal production of this economical crop. Following sampling in 2018-2019, the powdery colonies with *Streptomyces* morphology were purified and evaluated based on phenotypic features, pathogenicity and detecting the genes on Pathogenicity Island including *txtAB*, *nec1* and *tomA*. The colony morphology of the strains on malt yeast extract agar was variable and pathogenic strains showed symptoms such as no germination, dwarfing and necrosis on radish seedlings which were divided into six phenotypic groups. 11 out of 20 pathogenic strains on radish, were capable of causing necrosis or pitting on potato slices and eight of them showed chlorosis or necrosis on tobacco leaves after 10 days. The results of pathogenicity including superficial or raised lesions with the lesion severity index of 1-4 were recorded in greenhouse conditions. The 700 bp fragment was detected in six out of eight selected strains. While, *txtAB* and *tomA* were amplified in JR-12 and TM-29, respectively. Based on 16rSRNA sequencing results, JR-12 and TM-29 strains were characterized as *Streptomyces bottropensis* and *Streptomyces* sp. Respectively. It seems that the Razavi-Khorasan strains have a virulence factor other than Thaxtomin A, which needs further experiments to confirm.

Keywords: Molecular characterization, pathogenicity, *Streptomyces*, virulence

مقدمه

رشد گیاهیچه (Scheible et al., 2003) و مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Tegg et al., 2005; Errakhi et al., 2008) می‌شود. البته گزارشاتی از وجود جدایه‌های بیمارگر عامل اسکب، فاقد توان تولید تاکستومین وجود دارد (Wanner, 2004; Cao et al., 2012; Fyans et al., 2016; Pankova et al., 2012) و به‌نظر می‌رسد سایر متابولیت‌های ثانویه دارای قدرت کشندگی در توسعه علائم اسکب تاثیر داشته باشند (Bignell et al., 2014). ژن *nec1* یک پروتئین القاکننده نکروز در بافت گیاه را تولید کرده که در پرآزاری مؤثر است (Bukhalid and Loria, 1997). این پروتئین قبل از سنتز تاکستومین تولید شده و به‌نظر می‌رسد که در سرکوب نمودن دفاع گیاه در مواجهه با تاکستومین نقش داشته باشد (Joshi et al., 2007). درصد پایین G+C این ژن نسبت به بقیه ژنوم استرپتومایسس همراه با حضور توالی‌های شبه ترانسپوزون در دو طرف آن، دلالت بر این دارد که این ژن از منبع متفاوتی به گونه‌های استرپتومایسس انتقال یافته است (Bukhalid and Loria, 1997). ژن *nec1* برای بیماری‌زایی ضرورت ندارد چرا که جدایه‌های استرپتومایسس بیماری‌زای زیادی هستند که فاقد این ژن می‌باشند (Wanner 2006; 2009; Bukhalid et al., 2002). همچنین ژن *tomA* کدکننده توماتیناز، گلیکوالکالوئید ضد میکروبی توماتین را در گیاه به‌منظور غیرفعال نمودن پاسخ میزبان به آلودگی، مورد هدف قرار می‌دهد (Kres et al., 2005). نقش پروتئین TomA در بیماری‌زایی استرپتومایسس نامشخص است. این آنزیم از *S. scabiei* 87-22 در مقابل آلفا-توماتین فعالیت نشان داده اما علیه آلفا سولانین سیب‌زمینی عملکردی ندارد (Seipke and Loria, 2008).

در ایران بیماری اسکب معمولی سیب‌زمینی از استان‌های مختلف کشور از جنبه فنوتیپی، الگوی پروتئین و بیماری‌زایی (Eini et al., 2003; Khodakaramian et al., 2003; Taghavi and Faghihi 2006; Fadaee-tehrani et al., 2015) و نیز مولکولی (Hasani and Taghavi 2014) مورد بررسی قرار گرفته است. با وجود بررسی‌های انجام گرفته در سطح کشور روی بیماری

اسکب معمولی یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی سیب‌زمینی است که تولید بهینه این محصول اقتصادی را به‌طور فراگیر محدود می‌سازد (Loria et al., 1997). این بیماری توسط گونه‌های مختلف جنس ساپروفیت، رشته‌ای، گرم مثبت و خاکزی استرپتومایسس ایجاد می‌شود (Loria 1997; Wanner, 2009). گونه‌های بیمارگر این جنس منجر به کوتولگی در دامنه وسیعی از گیاهان تک لپه و دولپه شامل گندم، ذرت، چغندر، هویج، شلغم و تربچه (Wanner, 2004) و در سیب‌زمینی می‌توانند زخمهای سطحی، برجسته و عمیق را به‌صورت مجزا و یا پیوسته ایجاد نمایند (Loria et al., 2006). بروز علائم با توجه به‌سطح زادمایه اولیه در خاک، مقاومت ارقام، شرایط محیطی و شدت بیمارگری جدایه استرپتومایسس متفاوت است (Leiminger et al., 2013). مشخص‌ترین و غالب‌ترین گونه عامل اسکب معمولی در دنیا *S. scabiei* می‌باشد (Wanner 2009). سایر گونه‌های مرتبط نزدیک شامل *S. europaeiscabiei* (Bouchek-Mechiche et al., 2000)، *S. turgidiscabiei* (Miyajima et al., 1998)، *S. acidiscabiei* (Lambert and Loria, 1989) از نقاط مختلف دنیا گزارش شده‌اند. در بررسی‌های دیگر گونه‌های *S. stelliscabiei* (Bouchek-Mechiche et al., 2000)، *S. niveiscabiei* و *S. puniscabiei* (Park et al., 2003)، *Streptomyces* sp. IdahoX (Wanner 2007)، *Streptomyces* sp. DS3024 (Hao et al., 2009) و *Streptomyces* sp. GK18 (Cao et al., 2012) نیز مشخص شده‌اند.

مجموعه ژن جزیره بیماری‌زایی در *S. scabiei* به دو بخش کشندگی حامل کلاستر ژنی بیوستز تاکستومین (دخیل در بیماری‌زایی) و کلونیزاسیون حامل ژن‌های *nec1* و *tomA* (دخیل در پرآزاری) تفکیک شده است (Seipke and Loria, 2008). شاخص بیماری‌زایی مهم در گونه‌های بیمارگر گیاهی این جنس تولید تاکستومین می‌باشد که منجر به عدم سنتز سلولز (Healy et al., 2000)، القای‌های پرترونی سلولی و کاهش

بیماری‌زایی روی گیاهچه تربچه

بذور تربچه رقم Cherry در هیپوکلیت سدیم ۰,۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی و چندین بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور ضدعفونی شده تربچه روی محیط کشت آرد یولاف آگار^۱ (OMA) هشت روزه استریتومایسس در چهار تکرار کشت شد (Loria et al., 1995). عدم جوانه زنی، رشد غیر طبیعی جوانه‌ها و نکروز در بذور تیمار شده بررسی گردید (Flores-Gonzalez et al., 2008; Fyans et al., 2016). محیط OMA فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی برخی ویژگی‌های فوتوتیپی کلیدی

جدایه‌های استریتومایسس در محیط عصاره مالت، مخمر، آگار به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شدند. واکنش گرم برای همه جدایه‌ها طبق روش ساسلو و همکاران (۱۹۸۲) انجام گرفت. تک پرگنه‌ای از هر جدایه در لوله آزمایش حاوی محیط مایع تیوگلیکولیت^۳ مایه زنی و فعالیت‌های هوازی یا بی‌هوازی بودن باکتری ثبت شد. در ارزیابی شکل‌شناسی پرگنه‌های باکتری ویژگی‌هایی از جمله رنگ کلنی، رنگ زنجیره اسپوری و نیز شکل زنجیره اسپوری بررسی شد (Shirling and Gottlieb, 1966). تولید رنگدانه قهوه‌ای ملانین در محیط کشت تریپتیک سوی برات^۴ (TSB) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و حساسیت جدایه‌ها به دیسک-های آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین G در محیط کشت نوترینت آگار^۵ (NA) بررسی شد (Fyans et al., 2016). رشد در pH های مختلف نیز در محیط کشت YMEA طبق روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) انجام پذیرفت.

بیماری‌زایی روی ورقه سیب‌زمینی

سیب‌زمینی‌های رقم آگریا عاری از علائم بیماری به مدت یک دقیقه در هیپوکلیت سدیم یک درصد ضدعفونی، ورقه‌هایی با ضخامت هفت میلی‌متر برش و روی کاغذ صافی

اسکب معمولی سیب‌زمینی، کار چندانی در رابطه با بررسی این بیماری و گونه‌های عامل آن در استان خراسان رضوی انجام نگرفته است. تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی فوتوتیپی و مولکولی عامل اسکب معمولی در مزارع انبارهای سیب‌زمینی خراسان رضوی، ردیابی ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی و پرآزاری و نیز ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انجام شده است.

روش بررسی

نمونه برداری و جدایه‌های باکتریایی

طی فصول زراعی سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ از مزارع مختلف و سردخانه‌های سیب‌زمینی در شهرهای استان خراسان رضوی شامل مشهد، چناران، قوچان، رادکان، تربت جام، جلگه رخ بازدید و غده‌های دارای علائم مختلف جرب، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی پس از شستشوی غده‌های سیب‌زمینی آلوده، ضدعفونی سطحی با وایتکس ۱۰ درصد به مدت یک دقیقه انجام گرفت. قطعاتی از مرز بین بافت سالم و آلوده جدا و در اب مقطر سترون خرد گردید. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت YMEA بعلاوه آنتی‌بیوتیک (۴ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم عصاره مالت، ۴ گرم دکستروز، ۲۰ گرم آگار، ۵۰ میلی‌گرم نیستاتین، ۵ میلی‌گرم پلی‌میکسین سولفات، ۱۰ میلی‌گرم سدیم پنیسیلین جی و ۵۰ میلی‌گرم سیکلوهمگزامید در لیتر) کشت گردید (Schaad et al., 2001). پتری‌ها در دمای ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و پس از ۱۰-۷ روز پرگنه‌هایی با شکل‌شناسی جنس استریتومایسس انتخاب و برای تهیه کشت خالص، مجدداً به‌صورت مخطط کشت شدند. یک جدایه *Streptomyces* sp. (SH) از بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز به‌عنوان شاهد مثبت در کلیه آزمون‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

^۱ Oat Meal Agar

سترون و مرطوب و در سه تکرار در ظرف پتری قرار گرفتند. روی هر ورقه سیب‌زمینی، یک دیسک وارونه از محیط کشت ۱۰ روزه جدایه‌های استریپتومایسس در محیط کشت OMA نهاده و ظروف پتری در دمای ۲۴-۲۲ درجه سلسیوس و در تاریکی نگهداری شدند (Hao *et al.*, 2009). پس از گذشت پنج روز، ظهور لکه‌های نکروز و یا فرورفتگی روی برش‌ها بررسی شد.

بیماری‌زایی روی برگ توتون

مایه‌زنی برگ‌های توتون شش هفته‌ای رقم زانتی، در سه تکرار با استفاده از سوسپانسیون اسپور باکتری جدایه‌های استریپتومایسس انتخابی با استفاده از سرنگ بدون سوزن انجام گرفت. گیاهان در دمای ۲۴-۲۲ درجه سلسیوس و تحت دوره نوری ۱۶ ساعته به مدت ۱۰ روز قرار گرفتند. سپس از برگ‌های جداشده عکس برداری شد (Fyans *et al.*, 2016). از آب مقطرسترون به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بیماری‌زایی روی سیب‌زمینی در گلخانه

تعداد ۲۰ جدایه منتخب در محیط کشت YME کشت داده شد و به مدت سه هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Wanner *et al.*, 2013; Hao *et al.*, 2009). سوسپانسیون اسپوری جدایه‌های باکتری با غلظت $10^6 \times 4$ (Wanner, 2007) تهیه و مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از آن در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع YME در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری کشت، به مدت ۳ روز و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس شیک شدند (Wanner, 2004). ته نشین حاوی سلول‌های باکتریایی با ساتریفیوژ جدا و در یک سوم حجم اولیه آب مقطرسترون سوسپانسیون شد. سپس ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون مرحله قبل به همراه ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت شامل: ۴۰ گرم سوکروز، ۲/۴ گرم اسپارژین، ۱/۲ گرم K_2HPO_4 ، ۲۰ گرم عصاره مخمر در ۱ لیتر آب مقطر استرون، به کیسه‌های حاوی cm^3 ۳۰۰ ورمیکولیت استرون، اضافه گردید (Wanner, 2004). ورمیکولیت‌های تیمار شده به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و هر دو روز شیک شدند. درگلدان‌هایی

با عمق ۱۵ سانتی‌متر، ۶۰۰ گرم خاک سترون به نسبت ۱:۱ از شن و خاک گلدان اضافه شد. از مخلوط ترکیبی خاک گلدان و ورمیکولیت تیمار شده، به میزان ۱۲۰۰ گرم به صورت لایه‌ای روی گلدان‌ها پر شد و غده‌های بذری ضد عفونی شده رقم آگریا در لایه مذکور کاشته و گلدان‌ها در دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ هفته نگهداری شدند. برای هر جدایه، چهار تکرار در نظر گرفته شد. گلدان‌های فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی و گلدان‌های تیمار شده با *Streptomyces sp.* (SH) شیراز به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. امتیازدهی شدت زخم‌های ایجاد شده روی سیب‌زمینی بر اساس مقیاس ۰-۵ (=۰ بدون علائم، ۱= زخم سطحی >۱۰ میلی متر، ۲= زخم سطحی <۱۰ میلی متر، ۳= زخم برجسته >۱۰ میلی متر، ۴= پوشیده شده با زخم برجسته <۱۰ میلی متر، ۵= پوشیده شده با زخم‌های حفره دار) انجام گرفت (Wanner, 2006).

ردیابی ژن‌های نشانگر جزیره بیماری‌زایی

بدین منظور، DNA ژنومی جدایه‌های استریپتومایسس منتخب براساس روش آزوبیل و همکاران (۱۹۹۲) استخراج شد (Ausuble *et al.*, 1992). ردیابی سه ژن *toma*، *txtAB* و *nec1* (Wanner, 2006) و (Bukhalid *et al.*, 1998) در جدایه‌های منتخب بررسی شدند. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط آماده Red Amplicon PCR mix شرکت Amplicon، دو میکرولیتر DNA به همراه ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها در دستگاه ترمو سایکلر Biometra (آلمان) طبق برنامه حرارتی ارائه شده در منابع انجام گرفت (Wanner, 2006; Bukhalid *et al.*, 1998). یک واکنش بدون اضافه کردن DNA ژنومی به‌عنوان شاهد منفی برای کنترل آلودگی در کنار نمونه‌ها در نظر گرفته شد. جدایه *Streptomyces sp.* (SH) شیراز به‌عنوان کنترل مثبت در کلیه واکنش‌ها استفاده شد. فرآورده‌های حاصل به همراه نشانگر وزنی 3000 bp DNA ladder (SMOBiO، تایوان) در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شدند.

تکثیر، توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنتیک

قطعه 16S rRNA تکثیری با استفاده از آغازگرهای fD1 و rD1 (Weisburg et al., 1991) در دو جدایه منتخب، جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal X 1.81 (Thompson et al., 1997) انجام شد. از توالی‌های ثبت شده در بانک ژن مربوط به جدایه‌های مرجع برای مقایسات فیلوژنیک استفاده شد. درخت حاصله با روش اتصال مجاور^۲ و به‌وسیله نرم‌افزار MEGA 6 با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ ترسیم شد (Tamura et al., 2011).

نتایج و بحث

جدایه‌های عامل اسکب معمولی

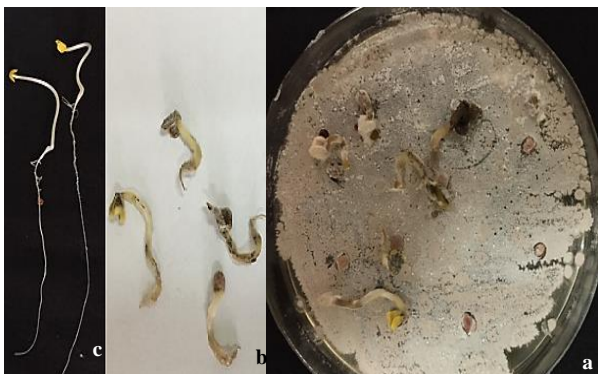
تعداد ۳۳ جدایه از غده‌های آلوده خراسان رضوی دارای علائم، کشت شده روی محیط کشت YMEA با مشخصات شکل‌شناسی جنس استرپتومایسس، جداسازی شد. جدایه‌های به‌دست آمده گرم مثبت و در محیط تایوگلیکولیت مایع در محدوده بالایی لوله آزمایش (بیشترین میزان اکسیژن) رشد نمودند، که نشان دهنده هوازی بودن جدایه‌ها است. پرگنه‌ها روی محیط کشت به‌صورت مجزا و گرد و یا خطی با ظاهری پودری یا منشعب به رنگ‌های متنوع مشاهده شدند که با منابع مطابقت دارد (Loria et al., 1997; Schaad et al., 2001).

بیماری‌زایی روی تربچه

از مجموع ۳۳ جدایه استرپتومایسس به‌دست آمده از سیب‌زمینی‌های خراسان رضوی، تعداد ۲۰ جدایه (جدول ۱) روی تربچه بیماری‌زا بوده و علائم متنوع نظیر عدم جوانه‌زنی، نکروز، کوتولگی و هایپرتروفی را ایجاد کردند (شکل ۱) که با بررسی‌های سایر محققان همخوانی دارد (Flores-Gonzalez et al., 2008; Fyans et al., 2016). جدایه‌های TM-32، TM-29، CHE-9 و JR-12 دامنه بیشتری از علائم را نشان دادند (جدول ۱).

خصوصیات فنوتیپی

از کل جدایه‌های استرپتومایسس بررسی شده در مرحله قبل، ۶۰ درصد آن‌ها در سنجش بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های تربچه مثبت ارزیابی شدند و از نظر شکل‌شناسی و برخی ویژگی‌های فنوتیپی مهم مطالعه و به شش گروه فنوتیپی تفکیک شدند (جدول ۲). جدایه شیراز با شکل‌شناسی پرگنه متفاوت، در هیچ‌کدام از گروه‌های فنوتیپی تفکیک شده، قرار نگرفت. هفت جدایه (۲۵ درصد) از جدایه‌های مورد مطالعه در حضور آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین G حساسیت نشان دادند. براساس منابع، *S. scabiei* به این آنتی‌بیوتیک حساس ولی *S. europaeiscabiei* در حضور آن رشد می‌کند (Boucheck-Mechiche et al., 2000). تولید رنگدانه قهوه‌ای ملانین به‌عنوان یک ویژگی فنوتیپی مشخص مربوط به گونه‌های *S. europaeiscabiei* و *S. scabiei* (Boucheck-Mechiche et al., 2000; Lambert and Loria, 1989) گزارش شده است. در تحقیق حاضر از مجموع جدایه‌های بیماری‌زای مورد مطالعه، ۱۶ جدایه به‌همراه جدایه شیراز، قادر به تولید ملانین در محیط کشت مایع TSB بودند. رشد در اسیدپته چهار، که از ویژگی‌های *S. scabiei* است در هیچ‌کدام از جدایه‌های بررسی شده، مشاهده نشد.



شکل ۱- بیماری‌زایی جدایه استرپتومایسس (JR14) خراسان رضوی روی گیاهچه‌های تربچه در محیط کشت آرد یولاف، آگار (OMA) بعد از هشت روز. (A) عدم جوانه‌زنی؛ (b) کوتولگی و نکروز؛ (c) گیاهچه‌های شاهد در محیط OMA فاقد باکتری.

Fig. 1. Pathogenicity of Razavi-Khorasan *Streptomyces* strain (JR-14) on radish seedlings on oat meal agar medium after 8 days. a) No germination; b) Dwarfing and necrosis; c) Control seedlings on OMA medium without bacterium

^۲ Neighbour Joining

جدول ۱- جدایه‌های استرپتومایسس به‌دست آمده از سیب‌زمینی دارای

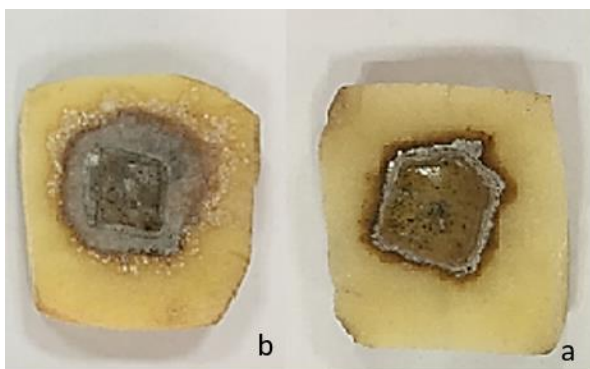
علائم اسکب معمولی از نقاط مختلف استان خراسان رضوی.

Table 1. Streptomyces strains obtained from potato showing common scab symptoms from different regions of Razavi-Khorasan province.

Phenotypic group	Pathogenicity on radish seedlings	Cultivar	Sampling place	Strain
1	N•D•NG	Fantana	Chochan	CHE-11
1	N•H•NG•D	Agria	Jolge-rokh	JR-12
1	D•NG•H	Fantana	Chochan	CHE-26
1	NG•D•N	Agria	Torbatejam	TM1-18
1	D•NG	Fantana	Chochan	CHE-20
1	N•NG•H	Fantana	Chochan	CHE-13
2	D•N•NG	Fantana	Chochan	CHE-10
2	D•NG	Marfana	Mashhad	MASH-28
2	NG•D	Agria	Jolge-rokh	JR-33
2	D•NG•N	Fantana	Chochan	CHE-21
2	D•NG	Fantana	Chochan	CHE-25
2	N•H•NG	Agria	Jolge-rokh	JR-14
3	N•D•NG•H	Fantana	Chochan	CHE-9
3	D	Agria	Mashhad	MASH-27
4	D•H•N•NG	Bambo	Torbatejam	TM-29
4	D•N•H•NG	Agria	Torbatejam	TM-32
4	N•D	Fantana	Chochan	CHE-15
5	D•NG•N	Agria	Radkan	CHB-22
6	NG•D	Fantana	Chenaran	CHE-24
6	D•NG	Fantana	Chochan	CHE-31
-	D•NG•N	-	Shiraz	SH+

NG: عدم جوانه زنی؛ D: کوتولگی؛ H: هایپرتروفی؛ N: نکروز

NG: No Germination, D: Dwarfing, H: Hyperthrophy, N: Necrosis



شکل ۲- علائم نکروز روی ورقه‌های سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با جدایه‌های استرپتومایسس (a) TM-29 و (b) TM-32 خراسان رضوی.

Fig 1. Necrosis symptoms on potato slices inoculated by streptomyces strains a) TM-29, b) TM-32 from Razavi-Khorasan.

بیماری‌زایی روی ورقه سیب‌زمینی و برگ توتون

بیست جدایه استرپتومایسس مرحله قبل که علائم

بیماری‌زایی را روی گیاهچه‌های تربچه نشان داده بودند جهت

بررسی بیشتر روی ورقه سیب‌زمینی و برگ توتون رقم زانسی

ارزیابی شدند. بر اساس نتایج، جدایه‌های CHE-9، JR-12،

CHE-13، JR-14، CHE-15، CHE-22، CHB-22، MASH-27، TM-29، CHE-31،

TM-32 و JR-33 قادر به ایجاد نکروز و یا فرورفتگی در

ورقه‌های سیب‌زمینی در مقایسه با سایر جدایه‌ها بودند

(جدول ۳) و بالاترین میزان نکروز در جدایه‌های TM-32 و

TM-29 برآورد شد (شکل ۲). از بین ۱۱ جدایه مذکور،

جدایه‌های TM-29، CHE-9، JR-12 با عث نکروز و

جدایه‌های CHB-22، CHE-31، CHE-15، TM-32 و JR-33

منجر به کلروز روی برگ توتون پس از گذشت ۱۰ روز شدند

(جدول ۳). جدایه شاهد شیراز، نیز فنوتیپ نکروز روی ورقه

سیب‌زمینی و کلروز روی برگ توتون ایجاد نمود. سنجش

بیماری‌زایی جدایه‌های استرپتومایسس روی ورقه‌های

سیب‌زمینی (Loria et al., 1995) به‌عنوان روشی برای تفکیک

جدایه‌های استرپتومایسس دارای توان نکروز کنندگی بافت،

استفاده می‌شود (Bukhalid et al., 1997; Hao et al., 2009;)

(Lapaz et al., 2017). در مایه‌زنی سوسپانسیون باکتری جدایه-

های 87-22 *S. scabiei* و *S. turgidiscabies* Car 8 با سرنگ

بدون سوزن به برگ‌های توتون به ترتیب علائم نکروز و کلروز

گزارش شده است (Fyans et al., 2016).

بیماری‌زایی روی غده سیب‌زمینی در شرایط گلخانه

براساس سه آزمون بیماری‌زایی روی تربچه، ورقه

سیب‌زمینی و برگ توتون، بیماری‌زایی هشت جدایه منتخب

شامل CHE-9، JR-12، CHE-15، CHE-22، CHB-22، TM-29، CHE-31،

TM-32 و JR-33 روی سیب‌زمینی رقم آگریا در گلخانه

بررسی شد. پس از گذشت ۴ ماه، غده‌ها از خاک خارج

شدند. زخم‌های اسکب روی تمام غده‌های قابل امتیازدهی

(قطر بیشتر از ۰/۵ سانتی‌متر) (Wanner, 2007) ارزیابی شدند.

علائم اسکب به‌صورت سطحی و یا برجسته و در موارد

جدول ۲- گروه بندی فنوتیپی جدایه‌های بیمارگر استرپتومایسس خراسان رضوی.

Table 2. Phenotypic groups of pathogenic *Streptomyces* strains from Razavi-Khorasan.

Test	Phenotypic group						
	1(6)*	2(6)	3 (2)	4 (3)	5 (1)	6 (2)	SH+**
Spore color on YMEA	Light gray	Light gray	Dark gray	Dark gray	Cream	Greenish white	white
Colony color on YMEA	gray	Pale gray-pink	Dark gray with red border	Grayish white	Creamy white	White with green border	Grayish white
Melanin production in TSB medium	5	5	2	2	0	2	+
Straight spore chain	0	0	0	0	0	2	-
Regular screw spore chain	3	1	2	3	1	0	-
Irregular screw spore chain	3	5	0	0	0	0	+
Growth at pH:4	0	0	0	0	0	0	-
Growth at pH:6	6	6	2	3	1	2	+
Sensitivity to penicillin G	3	1	1	2	0	0	-

*: تعداد جدایه‌های استرپتومایسس در هر گروه فنوتیپی

** : جدایه شیراز به عنوان شاهد مثبت

جدول ۳- بیماری‌زایی جدایه‌های استرپتومایسس منتخب به دست آمده از سیب‌زمینی‌های آلوده خراسان رضوی روی گیاهچه تربچه، ورقه سیب‌زمینی، برگ توتون و ارزیابی شدت زخم‌های اسکب روی غده در گلخانه.

Table 3. Pathogenicity of representative *Streptomyces* strains obtained from infected potatoes from Razavi-Khorasan on radish seedling, potato slice, tobacco leaf and evaluation of scab lesion index on tuber under greenhouse conditions.

Strain	Pathogenicity on radish seedling ^a	Pathogenicity on potato slice ^b	Pathogenicity on tobacco leaf ^c	Scab lesion index on potato ^d
CHE-11	N•D•NG	NOS	NOS	
JR-12	N•H•NG•D	P	N	4
CHE-26	D•NG•H	NOS	NOS	
TM-18	NG•D•N	NOS	NOS	
CHE-20	D•NG	NOS	NOS	
CHE-13	N•NG•H	N	NOS	
CHE-10	D•N•NG	NOS	NOS	
MASH-28	D•NG	NOS	NOS	
JR-33	NG•D	P	CH	1
CHE-21	D•NG•N	NOS	NOS	
CHE-25	D•NG	NOS	NOS	
JR-14	N•H•NG	P	NOS	
CHE-9	N•D•NG•H	P	N	3
MASH-27	D	N	NOS	
TM-29	D•H•N•NG	N	N	4
TM-32	D•N•H•NG	N, P	CH	3
CHE-15	N•D	P	CH	4
CHE-24	NG•D	NOS	NOS	
CHE-31	D•NG	N	CH	1
SH+	D•NG•N	N	CH	3

a: NG: No Germination, D: Dwarfing, H: Hypertrophy, N: Necrosis

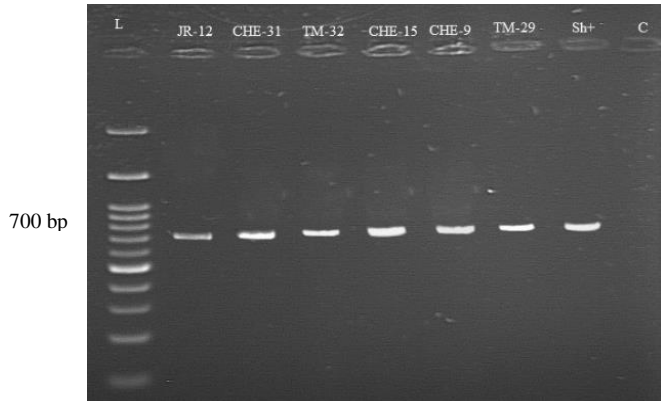
b: N: Necrosis, P: Pitted, NOS: No symptom

c: CH: Chlorosis, N: Necrosis, NOS: No symptom

d: 0 = no lesions; 1 = superficial lesions <10 mm in diameter; 2 = superficial lesions >10 mm in diameter; 3 = raised lesions <10 mm in diameter; 4 = raised lesions >10 mm in diameter; and 5 = pitted lesions

ردیابی ژن شاخص بیماری‌زایی تاکستومین AB در ۸۷/۵ درصد جدایه‌های استرپتومایسس منتخب خراسان رضوی، منفی بود. در بررسی‌های قبل نیز استرپتومایسس‌های بیمارگر فاقد ژن *txt* AB معرفی شده‌اند (Wanner, 2004; Cao *et al.*, 2012; Fyans *et al.*, 2016; Pankova *et al.*, 2012). در بررسی

اندکی، کمی فرورفته وجود داشت (شکل ۳). با توجه به نتایج، شدت زخم‌های اسکب در جدایه‌های JR-12، CHE-15 و TM-29 در محدوده ۴ برآورد گردید (زخم‌های با قطر بیشتر از ۱۰ میلی‌متر) و در جدایه‌های CHE-9 و TM-32 با قطر کمتر از ۱۰ میلی‌متر و شاخص شدت زخم ۳، ثبت شد. علائم اسکب روی غده تریچه و سیب‌زمینی در شدت و نوع علائم، تفاوت نشان می‌دهد که فاکتورهایی چون میزان زاد مایه در خاک، حساسیت رقم و پرازایی گونه باکتری، تعیین کننده می‌باشند (لوریا و همکاران، ۱۹۹۷؛ سولن و لیز، ۲۰۰۷).



شکل ۴- محصول PCR تکثیر شده از ژن *nec1* در جدایه‌های منتخب استرپتومایسس خراسان رضوی، C: آب مقطر سترون، SH+: شاهد مثبت (جدایه شیراز)، L: نشانگر وزن مولکولی ۳kb.

Fig. 4. Amplified PCR product of *nec1* gene in selected *Streptomyces* strains of Razavi-Khorasan. C: sterile distilled water; SH+: positive control (Shiraz strain); L: 3 kb Marker.

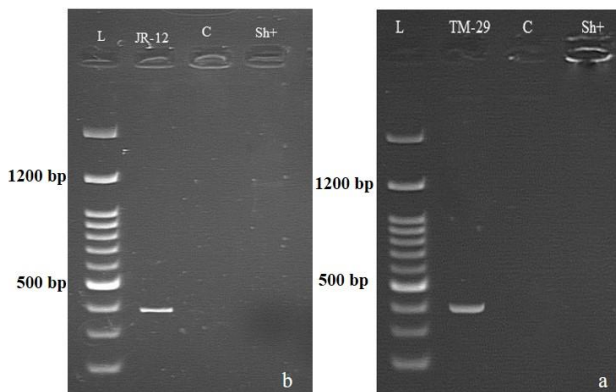


شکل ۳- علائم اسکب روی غده‌های سیب‌زمینی آگریا مایه‌زنی شده با جدایه‌های استرپتومایسس خراسان رضوی (a) شاهد مثبت (جدایه SH)؛ (b) جدایه CHE-15؛ (c) جدایه TM-29؛ (d) جدایه JR-12؛ (e) شاهد منفی (آب مقطر سترون)

Fig 3. Scab symptoms on Agria potato tubers inoculated with Razavi-Khorasan *Streptomyces* strains. a) SH; b) CHE-15; c) TM-29; d) JR-12; e) negative control (Sterile distilled water).

ردیابی ژن‌های نشانگر جزیره بیماری‌زایی

جهت ردیابی ژن‌های *tom A* و *txt AB* در جدایه‌های منتخب از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن، استفاده گردید. قطعه ۷۰۰ جفت‌بازی *nec 1* در شش جدایه JR-12، CHE-31، TM-32، CHE-15، CHE-9، TM-29 و CHE-31 از مجموع هشت جدایه منتخب ردیابی شد (شکل ۴). جدایه *Streptomyces* sp. شیراز نیز دارای این ژن بود. ژن *txt AB* به طول ۳۸۵ جفت‌باز در جدایه JR-12 و ژن *tom A* با اندازه ۳۹۰ جفت‌باز در جدایه TM-29 تکثیر شد (شکل ۵). دو ژن اخیر در جدایه شیراز ردیابی نگردید. برای صحت انجام آزمایش، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جدایه‌ها، چهار بار تکرار شد و در هر بار جدایه‌ها دارای باند، به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردیدند.



شکل ۵- محصول PCR تکثیر شده از ژن *tomA* (a) و *txtAB* (b) در جدایه‌های منتخب استرپتومایسس خراسان رضوی، C: آب مقطر سترون، SH+: شاهد مثبت (جدایه شیراز)، L: نشانگر وزن مولکولی ۳kb.

Fig. 5. Amplified PCR product of *tomA* (a) and *txtAB* (b) genes in selected *Streptomyces* strains of Razavi-Khorasan. C: sterile distilled water; SH+: positive control (Shiraz strain); L: 3 kb Marker.

منشا دارد، بدین معنی که یک جزیره بیماری‌زایی مشخص، می‌تواند در برگیرنده چندین ناحیه مختلف باشد که مسیر تکاملی مستقل دارند (Aittamaa et al., 2010). بنابراین احتمال انتقال برخی‌های ژن‌های نشانگر جزیره بیماری‌زایی استرپتومایسس از جدایه‌های بیمارگر به‌غیر بیمارگر است. در صورت ثبات ژن در زمینه ژنتیکی باکتری گیرنده، امکان ظهور گونه‌های جدید بیماری‌زای استرپتومایسس در طول زمان وجود دارد (Loria et al., 2006).

تکثیر بخشی از ناحیه 16S rRNA و توالی‌یابی

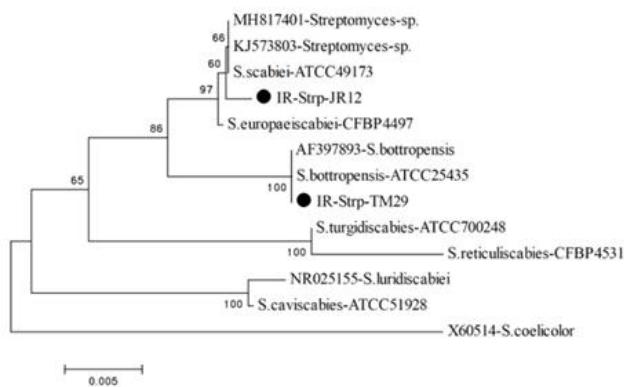
در بررسی حاضر، جدایه JR-12 (دارای ژن AB txt و nec1) و جدایه TM-29 (دارای tom A و nec1) جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. با استفاده از آغازگرهای عمومی مربوط به باکتری‌های گرم مثبت تکثیر ناحیه 16SrRNA صورت گرفت و قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی برای توالی‌یابی به تکاپوزیست ارسال گردید. توالی ارسالی با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و درخت فیلوژنتیک بر اساس روش اتصال مجاور رسم گردید. بر اساس نتایج توالی‌یابی، جدایه TM-29 به‌عنوان *S. bottropensis* و جدایه JR-12 به‌عنوان *Streptomyces* sp. مشخص گردید (شکل ۶). در ارتباط با جدایه JR-12، به‌نظر می‌رسد توالی‌یابی چندین ژن خانه‌داری در کنار ژن ریوزومی 16S بتواند در تشخیص قطعی گونه استرپتومایسس متمر ثمر باشد (Lapaz et al., 2017). گونه *S. bottropensis* از خاک به‌دست آمده است، تولید کننده آنتی بیوتیک بوترومایسین می‌باشد و ژنوم جدایه استاندارد آن (ATCC25435) توالی‌یابی شده است (Zhang et al., 2013). جداسازی این گونه از علایم اسکب معمولی سیب‌زمینی و بیماری‌زایی آن روی سیب‌زمینی از چین (Zhou et al., 2016) و اسپانیا (Sarwar et al., 2018) انجام و گزارش شده است.

در مجموع، جدایه‌های استرپتومایسس به‌دست آمده از سیب‌زمینی‌های خراسان رضوی، از نظر شکل شناسی و ویژگی‌های فنوتیپی متفاوت هستند و ضرورتاً ارتباطی بین

لیمینگر و همکاران (۲۰۱۳) تمام جدایه‌های گونه *S. acidiscabiei*، ۴۰ درصد جدایه‌های *S. stelliscabiei* و ۳۶ درصد جدایه‌های *S. bottropensis*، در ردیابی کلاستر ژنی AB نیز منفی بودند (Leiminger et al., 2013). در بررسی جدایه‌های استرپتومایسس همدان نیز، دو توکسین تاکستومین A و کانکانامایسین خالص سازی شده، با کروماتوگرافی لایه نازک ردیابی نشدند ولی یک ترکیب ناشناخته به‌دست آمد که به‌نظر در تولید علائم اسکب می‌تواند نقش داشته باشد (Khodakaramian et al., 2003).

ژن nec 1 که در بروز شدت نکروز نقش دارد و برای بیماری‌زایی ضرورت ندارد، در ۷۵ درصد جدایه‌های انتخابی وجود داشت. در ۹۰ درصد جدایه‌های مورد بررسی ردیابی ژن tom A نیز منفی ارزیابی شد. در بررسی حسنی و همکاران (۲۰۱۴)، ژن nec 1 در جدایه‌های استرپتومایسس به‌دست آمده از استان‌های فارس و همدان ردیابی و مشخص گردید وجود این ژن، برای بیماری‌زایی لازم نمی‌باشد. هر چند بر اساس نتایج بررسی حاضر، برخی از جدایه‌های منتخب آزمون شده، فاقد سه ژن نشانگر جزیره بیماری‌زایی هستند ولی توانایی القاء علائم مختلف بیماری‌زایی را روی گیاهچه‌های تربچه، ورقه‌های سیب‌زمینی و گیاه توتون را دارند. این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین (Fyans et al., 2016; Lapaz et al., 2017) مطابقت دارد و به‌نظر می‌رسد چنین جدایه‌هایی، در برگیرنده فاکتورهای بیماری‌زایی جدیدی باشد که نیازمند بررسی‌های تکمیلی بیشتری است.

تنوع ژنتیکی مرتبط با حضور و یا عدم حضور ژن‌های نشانگر جزیره بیماری‌زایی استرپتومایسس می‌تواند به‌دلیل پدیده انتقال افقی بخش‌های مذکور به‌صورت یک واحد و یا بخشی از آن، به‌واسطه نوترکیبی اختصاصی سایت باشد (Zhang et al., 2016). از طرفی مشخص شده است که کلاستر ژنی درگیر در بیماری‌زایی و پرآزاری در برخی گونه‌های استرپتومایسس و از جمله، گونه *S. turgidiscabies* چندین



شکل ۶- درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی ناحیه 16S rRNA جدایه‌های JR-12 و TM-29 عامل اسکب معمولی سیب‌زمینی به دست آمده از استان خراسان رضوی (دایره توپر) با سایر جدایه‌های استاندارد ثبت شده در ژن بانک (شماره کلکسیون) با استفاده از روش اتصال مجاور. اعداد ثبت شده در محل انشعاب‌ها، نشانگر درصد تایید خوشه‌بندی با ۱۰۰۰ تکرار نمونه‌برداری (bootstrap) است.

Fig 6. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of JR-12 and TM-29 strains, the causal agent of potato common scab obtained from Razavi-Khorasan province (Bold circle) with other reference strains assigned to the gene bank (collection number) using Neighbor-joining method. Percentage bootstrap is indicated on the internal branches.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه فردوسی مشهد به‌خاطر حمایت مالی این پروژه با کد ۳/۴۵۳۷۶ قدردانی می‌نمایند.

References

- AITTAMAA, M., SOMERVUO, P., LAAKSO, I., AUVINEN, P. and J. VALKONEN. 2010. Microarray-based comparison of genetic differences between strains of *Streptomyces turgidiscabiei* with focus on the pathogenicity island. *Molecular Plant Pathology*, 11: 733-746
- AUSUBLE, F., BRENT, F.M., KINGESTON, R.E., MOOR, D.D., SMITH, J.A., SEIDEMAN, J.G., and K. STRUH. 1992. *Current Protocol in Molecular Biology*. Greene. Wiley Interscience. New York, USA.
- BIGNELL, D. R. D., FYANS, J. K., and CHENG, Z. 2014. Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 223-235.
- BOUCHEK-MECHICHE, K., GARDAN, L., NORMAND, P. and B. JOUAN. 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* spp. nov. and *S. stelliscabiei* spp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* spp. nov. associated with netted scab.

ویژگی‌های ذکر شده و بیماری‌زایی جدایه باکتری وجود ندارد. بررسی لیمینگر و همکاران (۲۰۱۳) نیز بیان می‌دارد که مشخصات شکل شناسی و وجود رنگدانه، معیار قابل قبولی در تفکیک جدایه‌های بیمارگر استرپتومایسس نمی‌باشد. بیشتر علائم به‌صورت لکه‌های سطحی و برجسته مجزا، روی غده‌های حساس رقم آگریا ایجاد نمودند. بررسی حاضر و مطالعات پیشین دلالت بر این دارد که نوع علائم، نمی‌تواند ویژگی مناسبی برای شناسایی گونه‌های استرپتومایسس باشد (Dees *et al.*, 2012; Leiminger *et al.*, 2013). نتایج بیماری‌زایی در برخی موارد در آزمون‌های به‌کارگیری گیاهچه تربچه، استفاده از ورقه سیب‌زمینی، برگ توتون و غده کامل سیب‌زمینی در شرایط گلخانه، از یک الگوی خاص پیروی نمی‌کرد که با نتایج سایر محققان همخوانی دارد (Fyans *et al.*, 2016; Lapaz *et al.*, 2017). به‌نظر می‌رسد جدایه‌های خراسان رضوی دارای فاکتور بیماری‌زایی به‌غیر از تاکستومین A هستند که برای تایید آن، انجام آزمایشات تکمیلی ضرورت دارد. وجود ژن‌های *tom A* و *nec 1* نیز می‌تواند در پرآزاری جدایه باکتری بیمارگر مؤثر باشد.

- International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 50: 91-99.
- BUKHALID, R. A., CHUNG, S. Y. 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: 960-967.
- BULHALID, R. A., TAKEUCHI, T., LABEDA, D. and R. LORIA. 2002. Horizontal transfer of the plant virulence gene, *nec1*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the diastatochromogenes cluster. Applied and Environmental Microbiology, 68: 738-744.
- BULHALID, R. A. and R. LORIA. 1997. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. Journal of Bacteriology, 179: 7776-7783.
- CAO, Z., KHODAKARAMIAN, G.H., ARAKAWA, K. and H. KISHANI. 2012. Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 76: 353-357.
- CULLEN, D.W. and A.K. LEES. 2007. Detection of the *nec1* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. Journal of Applied Microbiology 102, 1082-94
- DEES, M., SOMERVUO, P., LYSOE, E., AITTAMAA, M. and J. Valkonen. 2012. Species identification and microarray-based comparative genome analysis of *Streptomyces* species isolated from potato scab lesions in Norway. Molecular Plant Pathology, 13: 174-186.
- EINI, O., KHODAKARAMIAN, G.H. and H. RAHIMIAN. 2003. Phenotypic features and host range of the strains of *Streptomyces* inducing potato scab in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 39: 85-101.
- ERRAKHI, R., DAUPHIN, A., MEIMOUN, P., LEHNER, A., REBOUTIER, D., VATSA, P., BRIAND, J., MADIONA, K., RONA, J. P., BARAKATE, M., WENDEHENNE, D., BEAULIEU, C. and F. BOUTEAU. 2008. An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. Journal of Experimental Botany, 59: 4259-4270.
- FADAEI-TEHRANI, A.A. and A. JAFARI. 2016. Phenotypic diversity of potato common scab strains from Chaharmahal-Bakhtiari province. Journal of Plant Protection. 30:31-41.
- FLORES-GONZALES, R., VELASCO, I. and F. MONTES. 2008. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. Plant Pathology, 57: 162-169.
- FYANS, J. k., BOWN, L. and D. R. D. BIGNELL. 2016. Isolation and Characterization of Plant-Pathogenic *Streptomyces* species Associated with Common Scab-Infected Potato Tubers in Newfoundland. Phytopathology, 106: 123-131.
- HAO, J., MENG, Q., YIN, J. and W. KIRK. 2009. Characterization of new *Streptomyces* strain, SD3024, that causes potato common scab. Plant Disease, 93: 1329-1334.
- HASSANI, S. and S. M. TAGHAVI. 2014. Phenotype and genotype diversity of Iranian *streptomyces* isolates that cause potato common scab. Journal of Plant Pathology, 96: 467-476.
- HEALY, F.G., WACH, M., KRASNOFF, S. B., GIBSON, D. M. 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.
- JOSHI, M., RONG, X., MOLL, S., KERS, J., FRANCO, C. and R. LORIA. 2007. *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, *Nec1*, which facilitates infection. Molecular Plant Microbe Interact, 20: 599-608.
- KHODAKARAMIAN, G.H., EINI, O. AND H. RAHIMIAN. 2003. Protein electrophoretic and fatty acid patterns of the strains of *Streptomyces* causing potato scab in Iran. Iranian Journal of Agricultural Science 34: 837-845.

- KRES, J.A., CAMERON, K.D., JOSHI, M.V., BUKHALID, R.A., MORELLO, J.E., WACH, M.J., GIBSON D.M. and R. LORIA. 2005. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* 55: 1025–1033.
- LAMBERT, D. and R. Loria. 1989. *Streptomyces scabies* SP-Nov, nomrev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39: 387-392.
- LAPAZ, M. I., HUGUET-TAPIA, J. C., VERDIER, E., LORIA, R. and M.J. PIANZZOLA. 2017. Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant Disease*, 101: 1362-1372.
- LEIMINGER, J., FRANK, M., WENK, C., POSCHENRIEDER, G., KELLERMANN, A. and A. SCHWARZFISCHER. 2013. Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. *Plant Pathology*, 62: 611-623.
- LORIA, R., BUKHAID, R.A., CREATH, R.A., LEINER, R.H., OLIVIER, M. and J.C. STEFFENS. 1995. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species in vitro. *Phytopathology* 85:537–41
- LORIA, R., BUKHAID, R.A., FRY, B. A. and R. R. King. 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, 81: 836-846.
- LORIA, R., COOMBS, J., YOSHIDA, M., KERS, J. A. and R. A. BUKHAID. 2003. A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 65-72.
- LORIA, R., KERS, J. and M. JOSHI. 2006. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 469-487.
- MIYAJOMA, K., TANAKA, F., TAKEUCHI, T. and S. KUNINAGA. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 495-502.
- PANKOVA, L., SEDLAKOVA, V. and V. KREJZAR. 2012. The occurrence of plant pathogenic *Streptomyces* spp. in potato-growing regions in central Europe. *American Journal of Potato Research*, 89: 207-215.
- PARK, D., KIM, J., KWON, S., WILSON, C., YU, Y., HUR, J. and C. LIM. 2003. *Streptomyces luridiscabies* sp. nov., *Streptomyces puniscabies* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabies* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 2049-2054.
- SARWAR, A., LATIF, Z. and C. CABALEIRO. 2018. First report of *Streptomyces bottropensis* causing potato common scab in Galicia, Spain. *Plant Disease*. doi:10.1094/PDIS-11-17-1803-PDN
- SCHAAD, N.W., JONES, J.B. and W. CHUN. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. APS Press. USA.
- SCHEIBLE, W.W., FRY, B., KOCHVENKO, A., SCHINDELASH, D., ZIMMERLI, L., SOMRVILLE, S., LORIA, R. and C. R. SOMERVILLE. 2003. An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin a, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *The Plant Cell*, 15: 1781-1794.
- SEIPKE, R. F. and R. LORIA. 2008. *Streptomyces scabies* 87-22 possesses a functional tomatinase. *Journal of Bacteriology*, 190: 7684-7692.
- SHIRLING, E.B. and D. GOTTLIEB. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16, 313–40.
- SUSLOW, T.V., SCHROTH, M. and M. ISAKA. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917-918.
- TAGHAVI, S.M. and M.M. FAGHIHI. 2006. Distribution and identification of *Streptomyces* species, the causal agent of potato common scab in Fars province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 42: 85-116.
- TAMURA, K., PETERSON, D., STECHER, G., NEI, M. and S. KUMAR. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony

- methods. *Molecular Biological Evolutionary*, 28: 2731–2739.
- Tegg, R. S., Melian, L., Wilson, C. R. 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.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F. and D.G. HIGGINS. 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876–4882.
- WANNER, L. 2004. Field isolates of *Streptomyces* differ in pathogenicity and virulence on radish. *Plant Disease*, 88: 1363-1371.
- WANNER, L. 2007. High proportions of nonpathogenic *Streptomyces* are associated with common scab-resistant potato lines and less severe disease. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 1062-1075.
- WANNER, L. 2009. A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. *American Journal of Potato Research*, 86: 247-264.
- WANNER, L. A. 2006. A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopathology*, 96: 1363-1371.
- WANNER, L. A., KIRK, W. W. and X. S. QU. 2013. Field efficacy of nonpathogenic *Streptomyces* species against potato common scab. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 123-133.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. and D. LANE. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.
- ZHANG, H., ZHOU, W., ZHUANG, Y., LIANG, X. and T. LIU. 2013. Draft genome sequence of *Streptomyces bottropensis* ATCC 25435, a bottromycin-producing actinomycete. *Genome Announcement*, 1(2):e00019-13. doi:10.1128/genomeA.00019-13.
- ZHOU, B., ZHANG, M.S. and X.K. MA. 2016. First Report of *Streptomyces bottropensis* causing potato common Scab in Hebei province, China. *Plant Disease*. doi:10.1094/PDIS-05-16-0671-PDN.