عزل وتعريف البكتريا المسببة لمرض جرب البطاطا/البطاطس في سورية

خالد الطويل[1]، تغريد الأعثر[1] ومحبة غنام[2]
(1) مركز البحوث العلمية الزراعية في إدلب، سورية، البريد الإلكتروني: taweel_kh@yahoo.com؛
(2) إدارة بحوث وقاية النبات، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دوما، سورية.

الملخص

الطويل، خالد، تغريد الأعثر ومحبة غنام. 2011. عزل وتعريف البكتريا المسببة لمرض جرب البطاطا/البطاطس في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 149–157.

تم الحصول على 182 عزلة من البكتريا .*Streptomyces* spp لمرض جرب البطاطا/البطاطس بهدف عزل وتعريف البكتيريا المسببة للمرض في سورية، من مناطق مختلفة من محافظات حلب، إدلب، حماة، حمص، درعا والمنطقة الساحلية وذلك خلال عامي 2008 و2009 منها 71 عزلة من من التربة و11 عزلة من الدرنات المصابة بالجرب. عزلت 98 من هذه الأخيرة من درنات تحمل أعراض الجرب العادي (غائر، مرتفع) و13 عزلة من درنات تحمل أعراض الجرب السطحي. تم اختبار القدرة الإمراضية لجميع العزلات باستخدام طريقتي بادرات الفجل والدرينات الصغيرة، فكانت نسبة العزلات الممرضة 45.6%. أظهرت النتائج أن طريقة الدرينات الصغيرة طريقة فعالة ودقيقة لاختبار القدرة الإمراضية لعزلات الـ .*Streptomyces* spp أياً كان مصدر العزلة، أما طريقة بادرات الفجل، فكانت فعالة بالنسبة لتلك المعزولة من الجرب العادي أو من التربة التي كانت مزروعة بدرنات تحمل مثل تلك الأعراض، ولم تكن فعالة لعزلات الجرب السطحي، حيث تبين أن 3 عزلات أعطت نتائج إيجابية على الدرينات الصغيرة ولم تعط أي أعراض على بادرات الفجل. تم توصيف جميع العزلات الممرضة بوساطة الإختبارات الشكلية/المورفولوجية، الفيزيولوجية والبيوكيميائية حيث أظهرت النتائج أن 94% منها تتبع للنوع *S. scabies* و 6% تتبع للنوع *S. acidiscabies* ولم تتبع أي عزلة منها للأنواع الأخرى المعروفة.

الكلمات المفتاحية: جرب البطاطا، .*Streptomyces* spp، عزل البكتريا، توصيف البكتريا، سورية.

المقدمة

تعد البطاطا/البطاطس من محاصيل الخضار الرئيسية في سورية حيث يزرع منها سنوياً في العروات الثلاث (الربيعية والصيفية والخريفية) مساحة إجمالية قدرت بـ 36172 هكتار وأنتجت حوالي 720492 طناً (2).

تصاب البطاطا/البطاطس بالعديد من الأمراض، ويعتبر مرض الجرب أحد أهم هذه الأمراض في معظم مناطق زراعة هذا المحصول في العالم، فهو يأتي في المركز الرابع بين الأمراض التي تصيب البطاطا في شمال أمريكا (14). كما أصبح هذا المرض عقبة أساسية وعاملاً محدداً لدى مزارعي البطاطا في كندا (8) والمغرب (1). لا يؤثر الجرب في كمية الإنتاج، بينما يؤثر بشكل كبير في نوعيته وبالتالي في القدرة التسويقية للدرنات المنتجة المصابة بالجرب، وهذا ينعكس سلباً على المردود الإقتصادي للمحصول (15). كما يؤثر المرض سلباً في تقاوي البطاطا المعدة للزراعة نتيجة وجود العامل الممرض عليها والتي ستصبح مصدراً جديداً للعدوى في حال زراعتها في الحقل في مواسم لاحقة (11). يوجد في الطبيعة أكثر من 500 نوع من الـ *Streptomyces* إلا أن نسبة الأنواع الممرضة لا تتجاوز 1%، ويعتبر النوع *Streptomyces scabies* المسبب الرئيس لجرب البطاطا في معظم دول العالم، كما توجد أنواع أخرى تسبب المرض مثل: *S. acidiscabies*، *S. caviscabies* و *S. turgidiscabies* ولكنها أقل أهمية وأقل انتشاراً من النوع المذكور (11).

يصيب مرض الجرب بالإضافة للبطاطا/البطاطس معظم المحاصيل الدرنية أو ذات الإنتاج تحت الأرضي مثل الجزر (*Daucus carota* L.)، اللفت (*Brassica rapa* L.)، الفجل (*Raphanus sativus* L.)، الجزر الأبيض (*Pastinaca sativa* L.) والشوندر السكري/البنجر (*Beta vulgaris* L.) (4، 5، 11). كما تم تسجيله على الفول السوداني (*Arachis hypogaea* L.) حيث يسبب بثرات على القشرة الخارجية للقرون قبل تصلبها تؤدي إلى تشوّه مظهرها الخارجي وبالتالي تدني نوعية الإنتاج (3).

لا يعطي هذا المرض أية أعراض مميزة على المجموع الخضري لنبات البطاطا بينما تظهر الأعراض على الدرنات. تبدأ الأعراض على شكل بقع دائرية صغيرة قطرها 5–8 مم خلال الأسابيع الأولى من تشكل الدرنات، ثم تتوسع البقع مع مرور الوقت لتشكل لطخاً أو بثرات غير منتظمة الشكل، وتكون عادة بنية إلى سمراء اللون وذات ملمس خشن. يعطي مرض الجرب أشكال (أعراض) عديدة على الدرنات تختلف حسب الظروف البيئية السائدة، شراسة النوع الممرض وقابلية

صنف البطاطا المزروع للإصابة (10). وهذه الأعراض هي: الجرب العادي (غائر ومرتفع) والجرب السطحي.

يوجد هذا المرض بدرجات متفاوتة في جميع مناطق زراعة البطاطا في سورية، وفي السنوات الأخيرة بدأ يظهر بشكل مثير للقلق في الكثير من الحقول وفي معظم المحافظات. ونظراً لندرة الدراسات حول هذا المرض وأهميته، وأنواع البكتريا المسببة له فقد هدفت هذه الدراسة إلى توصيف وتحديد الأنواع الممرضة من *Streptomyces* spp. المسببة لجرب البطاطا في سورية وذلك من خلال عزل العامل الممرض واختبار قدرته الإمراضية ومن ثم تحديد النوع من خلال الاختبارات الشكلية/المورفولوجية، الفيزيولوجية والبيوكيميائية.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات

جمعت عينات من درنات البطاطا المصابة بالجرب بكافة أعراضه (غائر، مرتفع وسطحي) ومن تربة بعض الحقول المصابة من محافظات حلب، إدلب، حماه، حمص، درعا والمنطقة الساحلية وذلك خلال عامي 2008 و 2009 وفي العروتين الربيعية والخريفية.

الحصول على عزلات *Streptomyces* spp.

العزل من الدرنات

تختلف طريقة العزل من الدرنات المصابة حسب نوع الجرب الموجود عليها. حيث استخدمت ثلاثة طرائق في ذلك وهي: طريقة الشرائح، الطريقة المباشرة وطريقة التخفيف.

طريقة الشرائح – استخدمت هذه الطريقة مع بعض التعديلات لعزل البكتيريا من الدرنات التي تحمل أعراض الجرب العادي (مرتفع– غائر) (4). غسلت الدرنات المراد العزل منها بالماء العادي لعدة مرات لإزالة آثار التربة. أخذ من نسيج كل درنة ثلاثة أجزاء تحمل أعراض الجرب وبطول 1–1.5 سم وعرض 5–7 مم وبسماكة 4–5 مم لكل منها. تم التطهير السطحي لكل جزء على حدا بغمسه لمدة دقيقتين في محلول 1% (ح /ح) من ماء جافيل الحاوي على 5% هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl). غسل كل جزء بعد ذلك مرتين بالماء المقطر والمعقم لإزالة آثار المادة المعقمة، ثم قطع كل جزء إلى شرائح رقيقة بسماكة 1–2 مم وبشكل متعامد مع القشرة الخارجية للدرنة باستخدام شفرة حادة ومعقمة. وبوساطة ملقط معقم وضعت 5 شرائح في كل طبق من أطباق بتري تحتوي على وسط الآغار المائي (30 غ/ل)، بحيث تلامس حافة الشريحة الموجود عليها الجرب سطح الآغار. تسحب كل شريحة حوالي 1 سم إلى الخلف وذلك لمساعدة أبواغ الـ *Streptomyces* على الإنتقال إلى سطح الآغار. حضّنت الأطباق عند 28° س لمدة 5–7 أيام حيث يبدأ نمو مستعمرات البكتريا على سطح الأغار وعلى شرائح البطاطا.

الطريقة المباشرة – بالنسبة للدرنات المأخوذة حديثاً من التربة (مباشرة بعد الجني)، يمكن أن يظهر نمو البكتريا بلون أبيض أو رمادي فاتح على الجزء المصاب بالجرب وبخاصة بالنسبة للجرب العادي (بثرة غائرة أو مرتفعة). في هذه الحالة تؤخذ الأبواغ والميسيليوم مباشرة بوساطة إبرة تلقيح معقمة، وتمزج بقطرة من الماء المقطر والمعقم لتشكيل معلق. ينقل جزء بسيط من المعلق الناتج ويوزع بشكل خطوط متتالية على وسط الشوفان المغذي ((OMA) :Oatmeal Agar) المضاف له مجموعة المضادات الحيوية المسماة (NPPC) (12) وهي: نيستاتين (Nystatin) (50 مغ/ل)، بولي مكسين سلفيت (Polymyxin B sulfate) (5 مغ/ل)، بينيسيلين (Penicillin) (1 مغ/ل)، سايكلوهكساميد (Cycloheximide) (50 مغ/ل). ثم تحضن الأطباق لمدة 5–7 أيام عند 28° س.

يحضر وسط OMA بإضافة 20 غ من حبوب الشوفان الجافة إلى نصف ليتر من الماء المقطر، ثم تغلى لمدة 20 دقيقة في جهاز الميكروويف أو على الموقد العادي، يصفى المزيج الناتج من خلال مصفاة ناعمة، يضاف الماء المقطر إلى الرشاحة لإتمام الحجم الناتج إلى 1 ليتر، يضاف إليها 1 غ من Casamino acid و 15 غ من الآغار (12).

طريقة التخفيف – تستخدم هذه الطريقة لعزل العامل الممرض من الدرنات الحاملة لأعراض الجرب السطحي أو الشبكي (12)، وأيضاً لعزله من تربة الحقول الملوثة بالبكتريا (6).

بالنسبة للجرب السطحي أو الشبكي، غسلت الدرنات المصابة والمأخوذة حديثاً من الحقل بالماء العادي عدة مرات لإزالة آثار التربة عنها. وبوساطة شفرة حادة ومعقمة أخذت ثلاثة أجزاء رقيقة من قشرة الدرنة تحمل أعراض الجرب وبشكل موازي لسطح الدرنة. وضعت تلك الأجزاء في هاون (مهراس) معقم وأضيف إليها حوالي 3 مل من الماء المقطر والمعقم. هرست بشكل جيد حتى أصبحت على شكل مزيج أو معلق. تركت لمدة 20 دقيقة داخل غرفة العزل بعد تغطيتها بطبق معقم. بوساطة إبرة تلقيح معقمة أخذت قطرة صغيرة من السائل المفصول عن المعلق ووضعت على طرف طبق بتري يحتوي على وسط OMA المضاف لها التيروسين 5 غ/ل (OMA-T)، ثم وزعت على شكل خطوط متتالية وغير متقاطعة فوق كامل الطبق. حضنت الأطباق بعد ذلك عند 28° س لمدة 5–7 أيام.

العزل من التربة

وضع 100 غ من كل عينة من عينات التربة المجموعة من الحقول المصابة كلاً على حدا في أطباق بلاستيكية وغطيت بمناديل ورقية رقيقة وتركت لمدة 12 ساعة لتجف في الظروف العادية للغرفة. أخذ 10 غ من كل عينة من عينات التربة المجففة، وأضيفت كل عينة على حدا إلى قارورة حجمها 250 مل تحتوي 100 مل من الماء المقطر والمعقم. حرك المزيج باستخدام جهاز رجاج بسرعة 100 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق وذلك في الظروف العادية للغرفة. أجريت خمسة تخفيفات عُشرية متتالية باستخدام الماء المقطر والمعقم وذلك انطلاقاً من العينة الأساسية المحتوية على معلق التربة. أخذت ثلاثة مكررات بحجم0.1 مل لكل منها وذلك من التخفيفات الثلاثة الأخيرة 10^{-3}، 10^{-4} و 10^{-5}، ووضعت في أطباق تحتوي على وسط (OMA-T) المضاف لها المضادات الحيوية السابقة، وزع كل منها فوق كامل الطبق بوساطة ماسحة زجاجية على شكل حرف L معقمة على لهب النار، حضنت الأطباق عند 28° س لمدة 5–7 أيام.

بعد إجراء عملية التنقية والحصول على العزلات بصورة نقية سواء من الدرنات أو من التربة تم اختبار قدرتها الإمراضية.

اختبار القدرة الإمراضية للعزلات المعزولة (Pathogenicity test)

اتبعت طريقتان لاختبار القدرة الإمراضية للعزلات ولتمييز العزلات الممرضة عن العزلات غير الممرضة وهما:

طريقة بادرات الفجل – وهي الطريقة الموصوفة من قبل Leiner وآخرون (9) كطريقة سريعة لاختبار القدرة الإمراضية لعزلات الـ *Streptomyces*. حيث طهرت بذور الفجل سطحياً بغمسها مع التحريك لمدة 3 دقائق في محلول معقم مكون من 5% (ح /ح) من ماء جافيل. ثم غسلت البذور مرتين بالماء المقطر والمعقم ووضعت في طبق بتري يحتوي على وسط WA (1.5%). تركت البذور في الظروف العادية للغرفة حيث تبدأ بالإنبات بعد 24 ساعة. نقلت البادرات وبمعدل بادرة واحدة إلى أنابيب اختبار زجاجية (قطر 25 مم) يحتوي كل منها على 10 مل من وسط WA بتركيز 1% ومعقمة سابقاً في (المعقم) الأوتوكلاف عند 120 °س وضغط 1 بار لمدة 25 دقيقة.

تحضير اللقاح وإجراء العدوى على البادرات – نميت العزلة المراد اختبارها في أطباق بتري تحتوي على وسط OMA لمدة 7 أيام عند 28° س. أضيف إلى كل طبق 5 مل من الماء المقطر والمعقم. كشط الميسيليوم والأبواغ باستخدام إبرة تلقيح معقمة لتشكيل معلق بكتيري مركز. تم ضبط تركيز المعلق الناتج ليكون بكثافة حوالي 10^8 خلية/ مل. تم إعداء كل بادرة من بادرات الفجل بإضافة 0.3 مل من المعلق الناتج بشكل مباشر فوق البادرة وذلك باستخدام ماصة معقمة. عومل الشاهد بالطريقة ذاتها ولكن باستخدام الماء المقطر والمعقم. تركت البادرات في الظروف العادية للغرفة لمدة 6–10 أيام لأخذ النتائج مقارنة مع الشاهد. أعيد الإختبار ثلاث مرات باستخدام ستة مكررات لكل عزلة مختبرة.

طريقة الدرينات الصغيرة – اتبعت طريقة Lauer (7) لإنتاج الدرينات الصغيرة، حيث تم اختيار حقل بطاطا نمت فيه النباتات في ظروف مثالية من ري وتسميد. في بداية مرحلة الإزهار قطعت الساق الرئيس من كل نبات وقسمت بوساطة شفرة حادة إلى عدة أجزاء بحيث ضم كل جزء ورقة وقطعة صغيرة من الساق (2–3 سم) بالإضافة إلى برعم جانبي ما بين الساق وحامل الورقة. تم أخذ الأجزاء الأربعة السفلية من كل نبات، أزيل البرعم الجانبي لكل منها وغرست في أصص بلاستيكية (قطرها 15 سم) تحتوي على رمل مشبع بالماء ومعقم مرتين متتاليتين في الأوتوكلاف وبفاصل 24 ساعة بينهما. تم تغطية البرعم الجانبي وجزء الساق بشكل كامل بالرمل، وضعت الأصص في البيت المغطى عند درجة حرارة 20° س ورطوبة 80%. بعد مرور حوالي أسبوعين تبدأ الدرينات الصغيرة بالتشكل في مكان البرعم الجانبي. وهذه الدرينات لها مواصفات الدرنات العادية نفسها من حيث قابليتها للإصابة بمرض الجرب (7). تم تحضير اللقاح المعدي لكل عزلة من العزلات المختبرة كما ورد أعلاه. تم إعداء كل درينة صغيرة بعد إزالة الرمل عنها بـ 1 مل من المعلق البكتيري للعزلة المختبرة، بينما أضيف لدرينات الشاهد الحجم نفسه من الماء المقطر والمعقم. غطيت الدرينات بالرمل مباشرة بعد الإعداء. استخدمت 10 مكررات (درينات صغيرة) لكل عزلة وأيضاً للشاهد. بعد أسبوعين من الإعداء تم الكشف عن الدرينات الصغيرة لكل عزلة على حدا للتأكد من ظهور أو عدم ظهور أعراض الجرب عليها.

توصيف عزلات الـ*Streptomyces* spp. الممرضة

التوصيف المورفولوجي – تم ذلك اعتماداً على لون الميسيليوم (أبيض أو رمادي) وعلى شكل حوامل الأبواغ (مستقيم، ملتوي أو حلزوني) فالعزلات التابعة للنوعين *S. turgidscabies* و *S. scabies* تعطي ميسيليوم بلون رمادي غامق وحوامل أبواغ حلزونية الشكل، بينما العزلات التابعة للنوعين *S. caviscabies* و *S. acidiscabies* فإنها تعطي مسيليوم بلون رمادي فاتح وحوامل أبواغ مستقيمة بنهاية ملتفة (12). تم تنمية جميع العزلات الممرضة على وسط WA لمدة 7 أيام عند 28 ° س، حددت المواصفات الشكلية/المورفولوجية الخاصة بكل عزلة من خلال فحصها بوساطة المجهر على تكبير 100 و400.

التوصيف الفيزيولوجي – حددت الصفات الفيزيولوجية لكل عزلة ممرضة اعتماداً على إفرازها للصبغات المميزة لأنواع الـ *Streptomyces* spp.، حيث تفرز العزلات التابعة للنوع *S. scabies* صبغة الميلانين السوداء على وسط OMA-T (15)، وتفرز العزلات التابعة للنوع *S. acidiscabies* صبغات حمراء اللون (في الوسط القلوي) أو صفراء (في الوسط الحامضي) وذلك على وسط (Modified salts starch agar) (MSSA)، بينما العزلات التابعة لأحد النوعين *S. caviscabies* و *S. turgidiscabies* فإنها لا تفرز أية صبغات على أوساط النمو المذكورة. حضر وسط MSSA بإضافة 10 غ من النشاء القابل للذوبان، 1غ $NaNO_3$، 1غ $MgCO_3$، 0.3 غ K_2HPO_4، 0.5 غ NaCl و15 غ آغار إلى 1 ليتر من الماء المقطر والمعقم (12).

التوصيف البيوكيميائي – اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Shirling و Gottlieb (13) لاختبار قدرة العزلات الممرضة على استخدام السكريات المعروفة بـ (International Streptomyces Project (ISP)) كمصدر للكربون وهذه السكريات هي: د– غلوكوز (شاهد إيجابي)، ل–أرابينوز، سكروز، د–كزايلوز، إ–إينوزيتول، د–مانيتول، د– فركتوز، رامنوز، رافينوز، سيليلوز، بالإضافة إلى وسط بدون سكر (شاهد سلبي).

تم تعقيم السكريات بطريقة الفلترة (عدا إ–إينوزيتول والسيليلوز فهما غير قابلين للذوبان بالماء فعقما بالإيثر ($(C_2H_5)_2O$)). أضيف كل منها على حدا إلى وسط الآغار الأساسي (Basal agar medium) المعقم في الأوتوكلاف والمبرد إلى 50°س، بحيث يكون تركيز السكر في الوسط 1%. بعد تحريك المزيج بشكل جيد تم توزيعه على أطباق بتري بمعدل 25 مل في كل طبق.

حضر اللقاح من كل عزلة كما وصف سابقاً، أضيفت قطرة صغيرة من اللقاح (50 ميكروليتر) بوساطة ماصة معقمة على طرف سطح البيئة، باستخدام إبرة تلقيح معقمة وزعت القطرة على شكل خط مستقيم إلى الطرف الآخر من سطح الوسط. أعيدت العملية نفسها لقطرة ثانية في الطبق نفسه، واستخدم طبقان من كل سكر بالنسبة لكل عزلة. حضنت الأطباق عند 28° س. تم أخذ النتائج بعد 10 أيام حيث تم مقارنة نمو العزلة المختبرة لكل سكر مع الشاهد السلبي (بدون سكر) والشاهد الإيجابي (الغلوكوز). وسجلت النتائج كالتالي:

– استخدام إيجابي قوي (++): عندما يكون نمو العزلة المختبرة على الوسط الحاوي على السكر أكثر أو تعادل نمو العزلة نفسها على وسط الشاهد الإيجابي.
– استخدام إيجابي (+): عندما يكون نمو العزلة المختبرة على الوسط الحاوي على السكر أفضل من النمو على الشاهد السلبي، وأقل شيئاً ما منه على الشاهد الإيجابي.
– استخدام غير مؤكد (±): عندما يكون نمو العزلة المختبرة على الوسط الحاوي على السكر أفضل بقليل منه على الشاهد السلبي، وأقل بشكل واضح من النمو على الشاهد الإيجابي.
– استخدام سلبي (–): عندما يكون نمو العزلة المختبرة على الوسط الحاوي على السكر مشابه أو أقل من النمو على الشاهد السلبي. ويعتبر استخدام العزلة للسكر سلبي إذا لم يكن نموها على السكر أفضل منه على الشاهد السلبي.

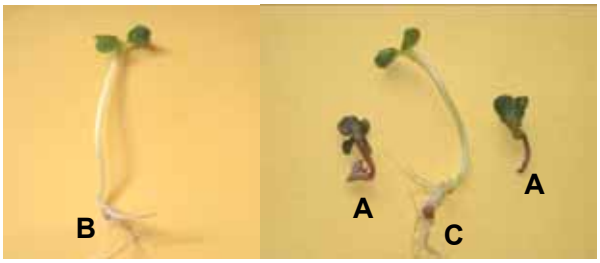
النتائج والمناقشة

الحصول على العزلات الممرضة

العزل واختبار القدرة الإمراضية – تم الحصول على 182 عزلة من *Streptomyces* spp. باستخدام الطرائق المختلفة للعزل وذلك من عينات التربة الملوثة بالعامل الممرض والدرنات المصابة بالجرب التي تم جمعها أثناء الجولات الحقلية. عُزلت 71 عزلة من التربة و 111 عزلة من الدرنات المصابة (98 عزلة من درنات تحمل أعراض الجرب العادي (غائر أو مرتفع) و13 عزلة من درنات تحمل أعراض الجرب السطحي). اختلفت نتائج القدرة الإمراضية للعزلات حسب مصدر العزل (درنات مصابة أو تربة ملوثة) وطبيعة أعراض الجرب الموجودة على الدرنات.

باستخدام طريقة بادرات الفجل، أدت 80 عزلة إلى وقف نمو البادرات، انتفاخ وتضخم خلاياها، منعت تشكل الجذور ونمت المستعمرات البكتيرية عليها (شكل 1). لوحظ أن جميع العزلات التي أعطت نتيجة إيجابية في هذا الاختبار كانت قد عُزلت من درنات تحمل أعراض الجرب العادي أو من التربة التي كانت مزروعة فيها مثل تلك الدرنات. أما البكتريا المعزولة من درنات تحمل أعراض الجرب السطحي فلم تعط أي عزلة نتيجة إيجابية في هذا الاختبار.

يبين إختبار العزلات باستخدام طريقة الدرينات الصغيرة أن جميع العزلات التي عزلت من التربة أو من درنات تحمل أعراض الجرب العادي، والتي أعطت نتيجة إيجابية على بادرات الفجل أدت إلى ظهور أعراض الجرب على الدرينات. أما العزلات التي أعطت نتيجة سلبية على بادرات الفجل فإنها لم تعط أي أعراض للجرب على الدرينات (شكل 2). أما بالنسبة للعزلات التي تم عزلها من أعراض الجرب السطحي والتي لم تعط أي نتيجة على بادرات الفجل فإن 3 عزلات منها أدّت إلى ظهور أعراض الجرب السطحي على الدرينات الصغيرة (جدول 1).



شكل 1. تأثير العزلات الممرضة (A) وغير الممرضة (B) من الفطر *Streptomyces* في نمو بادرات الفجل مقارنة مع الشاهد (C) المعامل بالماء المقطر والمعقم.

Figure 1. Effect of pathogenic (A) and nonpathogenic *Streptomyces* isolates (B) on growth of radish seedlings compared with control (C) treated with sterile distilled water.

لوحظ في هذه الدراسة أن الحصول على العزلات الممرضة من الجرب العادي (غائر أو مرتفع) أسهل من الحصول عليها من أعراض الجرب السطحي أو من التربة، حيث وصلت نسبة العزلات الممرضة إلى 38.5، 1.6 و 5.5% بالنسبة للجرب العادي، السطحي والتربة على التوالي كما هو مبين في الجدول 2. وهذه النتائج تتوافق مع نتائج دراسات سابقة (12) حيث بينت أن أعداد البكتريا تتضاعف في بثرات الجرب العادي وتكون أكثر نشاطاً مقارنة مع الجرب السطحي وذلك نتيجة توافر بعض الرطوبة وأحياناً بعض حبيبات التربة ضمن شقوق البثرة وهذا يسهل عملية العزل.

تشير المراجع إلى وجود أكثر من 500 نوع من الـ *Streptomyces* spp. في الطبيعة إلا أن نسبة الأنواع الممرضة لايتجاوز 1%، وبالتالي تنمو مستعمرات كثيرة من هذه البكتيريا أثناء العزل من التربة وتتشابه مستعمرات الأنواع الممرضة مع غير الممرضة بالشكل واللون ويصعب تمييزها (13). في دراستنا هذه أخذت عينات التربة من حقول مصابة بالجرب حيث عزل منها 71 عزلة كانت 10 منها ممرضة وبالتالي فإن نسبة العزلات الممرضة كانت عالية ووصلت إلى 14.1% (جدول 2).

شكل 2. تأثيرعزلة ممرضة (A) وعزلة غير ممرضة (B) في ظهور الجرب على الدرينات الصغيرة مقارنة مع الشاهد (C) المعامل بالماء المقطر والمعقم.

Figure 2. Effect of pathogenic (A) and nonpathogenic *Streptomyces* isolates (B) on appearance of scab on minitubers as compared with control (C) treated with sterile distilled water.

جدول 1. العزلات الممرضة ونتائج اختبار القدرة الإمراضية.

Table 1. Pathogenic isolates and results of pathogenicity test.

إختبار القدرة الإمراضية Pathogenicity test							
الدرينات الصغيرة Minitubers	بادرات الفجل Radish seedlings	عدد العزلات No. of isolates	Scab type	نوع الجرب	مصدر العزل Isolation source		Region / المنطقة
+	+	10	Common	عادي	Tubers	الدرنات	Aleppo حلب
+	+	16	Common	عادي	Tubers	الدرنات	Idleb إدلب
+	-	1	Superficial	سطحي	Tubers	الدرنات	Idleb إدلب
+	+	4		-	Soil	التربة	Idleb إدلب
+	+	16	Common	عادي	Tubers	الدرنات	Hama حماه
+	+	3		-	Soil	التربة	Hama حماه
+	+	15	Common	عادي	Tubers	الدرنات	Homs حمص
+	+	3		-	Soil	التربة	Homs حمص
+	+	7	Common	عادي	Tubers	الدرنات	Daraa درعا
+	-	2	Superficial	سطحي	Tubers	الدرنات	Daraa درعا
+	+	6	Common	عادي	Tubers	الدرنات	المنطقة الساحلية Coastal region

جدول 2. نسبة العزلات الممرضة للفطر *Streptomyces* حسب مصدر العزل.

Table 2. Percentage of *Streptomyces* pathogenic isolates according to isolation source.

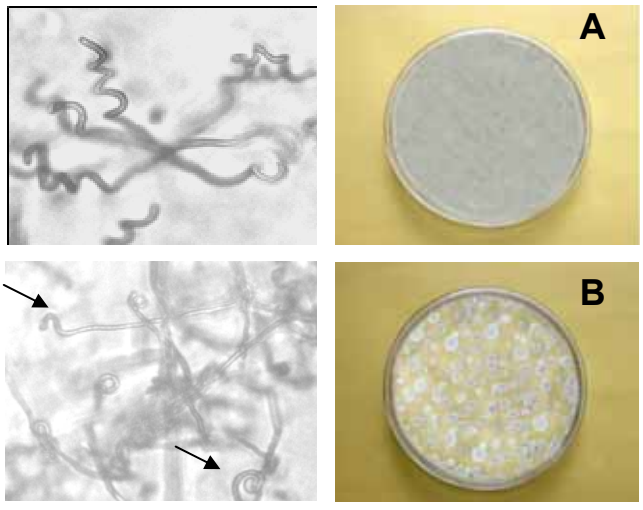
نسبة العزلات الممرضة حسب مصدر عزل % of pathogenic isolates according to isolation source	نسبة العزلات الممرضة/المجموع الكلي للعزلات % of pathogenic isolates / Total number of isolates	عدد العزلات الممرضة No of pathogenic isolates	عدد العزلات Number of isolates	Isolation source	مصدر العزل
71.4	38.5	70	98	Common scab symptoms (pitted and raised)	أعراض الجرب العادي (غائر ومرتفع)
23.1	1.6	3	13	Superficial scab symptoms	أعراض الجرب السطحي
14.1	5.5	10	71	Soil	التربة
	45.6	83	182	Total	المجموع

تعتبر طريقة بادرات الفجل طريقة سريعة لاختبار القدرة الإمراضية، حيث يمكن الحصول على النتيجة خلال أسبوع وذلك بالنسبة للعزلات المعزولة من الجرب العادي أو من التربة. ولكن لوحظ أن هذه الطريقة لم تكن دقيقة بالنسبة للعزلات المعزولة من الجرب السطحي، وربما يعود السبب إلى كمية ونوعية التاكستومين (التوكسين الذي تفرزه العزلات الممرضة من *Streptomyces* spp. وهذا يتفق مع نتائج أبحاث أجريت في المغرب (1). أما طريقة الدرينات الصغيرة فهي طريقة دقيقة حيث أعطت العزلات الممرضة أعراض الجرب بشكل واضح على الدرينات وذلك بالنسبة للجرب العادي والسطحي.

توصيف العزلات الممرضة

التوصيف الشكلي/المورفولوجي – أظهرت نتائج فحص العزلات الممرضة بوساطة المجهر على تكبير 100 و 400 بهدف تحديد مواصفاتها الشكلية/المورفولوجية أن لون الميسيليوم لـ 78 عزلة كان رمادياً فاتحاً في بداية النمو ثم تحول إلى رمادي غامق بعد 7–10 أيام، أما شكل حوامل الأبواغ فكانت حلزونية الشكل (شكل 3–A). هذه الصفات مشابهة لصفات كل من النوعين *S. turgidiscabies* و *S. scabies*. بينما لوحظ أن لون الميسيليوم لـ 5 عزلات كان رمادياً مائلاً إلى البياض، وأما شكل حوامل الأبواغ فكان مستقيماً وبنهاية ملتفة (شكل 3–B)، وهذه الصفات تتشابه مع صفات العزلات التابعة للنوعين *S.caviscabies* و *S. acidiscabies*.

التوصيف الفيزيولوجي – تبيّن من اختبار إفراز الصبغات على البيئات الغذائية أن الـ 78 عزلة السابقة التي لها ميسيليوم رمادي داكن وحوامل أبواغ حلزونية قد أفرزت صبغة الميلانين السوداء على وسط (OMA-T)، وبهذه الصفات فإن هذه العزلات تتشابه مع النوع *S. scabies* و يستبعد النوع *S. turgidiscabies*. بينما العزلات الخمس الأخرى التي كان لها مسيليوم فاتح اللون وحوامل أبواغ مستقيمة وبنهاية ملتفة لم تفرز صبغة الميلانين بينما أفرزت صبغة صفراء أو حمراء – حسب حموضة الوسط – على الوسط الغذائي (MSSA) وبذلك فهي تتشابه مع النوع *S. acidiscabies* ويستبعد النوع *S. caviscabies*.



شكل 3. لون المستعمرات وشكل حوامل الأبواغ للعزلات الممرضة المعزولة للفطر *Streptomyces* من أعراض الجرب الغائر والمرتفع (A) ومن أعراض الجرب السطحي (B).

Figure 3. Arial color of mature colony and spore chain type of *Streptomyces* pathogenic isolates isolated from common scab symptoms (A) and superficial scab symptoms (B).

التوصيف البيوكيميائي – في هذا الإختبار تم اختيار 30 عزلة، تمثل 25 منها العزلات الـ 78 السابقة المشابهة للنوع *S. scabies*، إضافة للعزلات الخمس المشابهة للنوع *S. acidiscabies*. نتائج هذا الاختبار مبيّنة في الجدول 3. حيث استطاعت العزلات التي لها ميسيليوم رمادي داكن وحوامل أبواغ حلزونية والتي أفرزت صبغة الميلانين استخدام جميع السكريات المعروفة بـ ISP وهذا يؤكد أنها تابعة للنوع *S. scabies*. أما العزلات التي لها ميسيليوم أبيض أو رمادي فاتح وحوامل أبواغ مستقيمة بنهاية ملتفة، ولم تفرز الميلانين ولكنها أفرزت صبغات صفراء أو حمراء على الوسط الغذائي (MSSA) فقد استهلكت جميع السكريات السابقة الذكر عدا الرافينوز وبذلك يمكن اتباع هذه العزلات بهذه الميزات إلى النوع *S. acidiscabies* (جدول 3).

جدول 3. تمييز العزلات الممرضة من *Streptomyces* spp. بواسطة اختبار إستخدام السكريات المعروفة بـ International Streptomyces Project.

Table 2. Identification of pathogenic *Streptomyces* spp. isolates using International Streptomyces Project sugars utilisation assay.

	استخدام السكريات ISP من قبل العزلات الممرضة من *Streptomyces* spp. **ISP sugar utilization by pathogenic isolates of *Streptomyces* spp.**										
النوع* Species*	**أرابينوز Arabinose**	**اينوزيتول Inositol**	**كسيلوز Xylose**	**سكروز Sucrose**	**رامنوز Rhamnose**	**مانيتول Mannitol**	**فركتوز Fructose**	**رافينوز Raffinose**	**غلوكوز Glucose**	**بدون سكر Without sugar**	**العزلة Isolate**
1	++	++	++	++	++	++	+	++	+	-**	SP1
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	SP2
1	+	++	++	++	+	++	++	+	+	-	AG1
1	+	+	++	+	++	+	+	++	+	-	AB1
1	++	+	+	+	+	++	++	++	+	-	SP6
2	+	+	++	++	+	+	++	-	+	-	SP8
2	+	++	+	+	++	++	+	-	+	-	SP9
2	++	+	++	+	+	++	++	-	+	-	AG4
1	+	++	+	+	++	++	+	++	+	-	BU3
1	+	+	++	++	+	+	++	++	+	-	BU5
1	+	+	+	+	++	++	+	++	+	-	BA4
1	++	+	+	+	+	+	++	+	+	-	AB2
1	+	+	++	+	+	+	+	+	+	-	BA6
1	+	+	+	++	++	++	+	++	+	-	BA10
1	+	+	+	+	+	++	+	++	+	-	AG7
1	++	+	++	+	++	++	++	+	+	-	BU7
1	+	+	+	++	+	++	+	++	+	-	SP16
1	++	+	++	+	++	+	+	++	+	-	SP19
1	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	SP23
1	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	SP25
2	+	++	+	+	++	++	+	-	+	-	SP28
1	++	+	++	++	+	++	+	++	+	-	SP29
2	+	+	+	+	++	+	++	-	+	-	SP31
1	+	+	+	+	+	++	++	+	+	-	BA13
1	++	++	++	++	+	++	++	++	+	-	BA14
1	++	+	+	+	++	+	++	++	+	-	SP34
1	++	++	+	+	++	++	++	+	+	-	BA15
1	+	++	+	++	+	++	+	++	+	-	SL5
1	++	++	+	++	++	+	++	+	+	-	SL7
1	+	+	++	+	+	++	++	+	+	-	SL9

* 1= *S. scabies*, 2= *S.acidiscabies*

** + إستهلاك إيجابي، ++ إستهلاك إيجابي قوي، ± إستهلاك غير مؤكد، - إستهلاك سلبي

** + Positive utilization, ++ Strongly positive utilization, ± Doubtful utilization, - Negative utilization

أظهرت نتائج التوصيف أن 94% من العزلات الممرضة المختبرة تتبع النوع *S. scabies* و 6% منها تتبع النوع *S. acidiscabies*، ولم تتبع أي عزلة منها للأنواع الأخرى المعروفة.

إن التوصيف المورفولوجي (اللون الميسيليوم وشكل حوامل الأبواغ) مع التوصيف الفيزيولوجي (إفراز الصبغات على اوساط غذائية معينة) يمكن أن يحدد النوع الذي تتبع له العزلة الممرضة بالنسبة لهذا الجنس من البكتريا، ثم تأتي الإختبارات البيوكيميائية لتأكيد النتائج. ولتأكيد النتائج بشكل قطعي لابد من اختبار البصمة الوراثية.

يعد هذا البحث الأول من نوعه الذي يهتم بعزل واختبار القدرة الإمراضية وتوصيف البكتيريا المسببة لمرض الجرب في سورية. حيث أن اختيار طريقة العزل المناسبة تساعد في الحصول على العزلات الممرضة، كما أن اختبار القدرة الإمراضية باستخدام طريقة بادرات الفجل أو الدرينات الورقية سيوفر الوقت والجهد في انتقاء العزلات الممرضة من غير الممرضة.

إن معرفة وتحديد العامل المسبب يعتبر الخطوة الأساسية في مكافحة أي مرض، وبالتالي فإن تحديد نوع الـ *Streptomyces* المسبب لجرب البطاطا سيساعد في مراحل لاحقة في إيجاد الطريقة المناسبة للتغلب على المرض إذ أن برنامج مكافحة الجرب الناتج بفعل النوع *S. scabies* يختلف عن ذلك الناتج عن النوع *S. acidiscabies*. فهذا الأخير تناسبه التربة الحامضية بعكس النوع الأول والتحكم بحموضة التربة خطوة أساسية في برنامج مكافحة جرب البطاطا. إذاً فلابد من معرفة النوع المسبب والظروف المناسبة لانتشاره كي يتم اختيار الطريقة المناسبة للمكافحة.

Abstract

Al Taweel, Kh., T. Aasar and M. Ghanam. 2011. Isolation and Identification of Bacteria Causing Potato Scab in Syria. Arab Journal of Plant Protection, 29: 149-157.

A total of 182 isolates of *Streptomyces* spp., the causal organism of potato scab, were isolated from different potato producing regions from Aleppo, Idleb, Hama, Homs and Daraa during 2008-2009 (spring and autumn). A total of 71 and 111 isolates were obtained from soil and scabbed potato tubers, respectively. All the isolates were tested for their pathogenicity using a radish seedling assay and the mini-tuber method. 45.6% of the isolates were found to be pathogenic. Results showed that mini-tuber method was fit to test pathogenicity of all Streptomyces isolates, whereas the radish seedling assay was not appropriate to test for superficial scab isolates. Only 3 isolates showed positive reaction on mini-tubers and negative reaction on radish seedlings. All pathogenic isolates were identified using morphological, physiological and biochemical tests. Results indicated that 94% were *S. scabies* and 6% were *S. acidiscabies*. No isolates of other known species were identified.

Key words: Potato scab, *Streptomyces* spp., Isolation, Identification, Syria.

Corresponding author: Al-Taweel Khaled, General Commission for Agricultural Scientific Research, Idlib, Syria, Email: taweel_kh@yahoo.com

المراجع

1. **الطويل، خالد**. 2005. المكافحة المتكاملة لمرض جرب البطاطا، أطروحة دكتوراه، معهد الحسن الثاني للزراعة والبيطرة، المغرب.
2. **المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية**. 2008. مديرية الإحصاء والتخطيط، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، الجمهورية العربية السورية.
3. **De klerk, A., A. McLeod, R. Faurie, W.J. Swart and F.D.N. Denner.** 1996. Identification and toxin production of *Streptomyces* isolates responsible for common scab in the northern Cape province of South Africa. Proceedings of 13th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, Veldhoven, The Netherlands, 14-19 July, 1996.
4. **Hooker, W.J.** 1990. Common scab. Pages 33-34. In: Compendium of potato diseases. W. J. Hooker (ed.). The American Phytopathology Society, St. Paul, MN.
5. **Janse, J.D.** 1988. A *Streptomyces* species identified as the cause of carrot scab. Netherlands Journal of Plant Pathology, 94: 303-306.
6. **Keinath, A.P. and R. Loria.** 1989. Population dynamics of *Streptomyces scabies* and other *actinomycetes* as related to common scab of potato. Phytopathology, 79: 681-687.

References

7. **Lauer, F.I.** 1977. Tubers from leaf-bud cuttings: A tool for potato seed certification and breeding programs. American Potato Journal, 54: 457-464.
8. **Lazarovits, G.** 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. Canadian Journal of Plant Pathology, 23: 1-7.
9. **Leiner, R.H., B.A. Fry, D.E. Carling and R. loria.** 1996. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. Phytopathology, 86: 709-713.
10. **Lorang, J.M., D. Liu, A. Andreson and J.L. Schottel.** 1995. Identification of potato scab inducing and suppressive species of *Streptomyces*. Phytopathology, 85: 261-268.
11. **Loria, R., R.A. Bukhalid, B.A. Fry and R.R. King.** 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. Plant Disease, 81: 836-846
12. **Loria, R., C.A. Clark, R.A. Bukhalid and B.A. Fry.** 2001. *Streptomyces*. Pages 236-248. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. N.W. Schaad, J.B. Jones and W. Chun (eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

13. **Shirling, E.B. and D. Gottlieb.** 1966. Methods of characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology, 16: 313-340.
14. **Slack, S.A.** 1991. A look at potato leaf roll virus and potato virus Y: Past, present and future. Badger Common' Tater, 43:16-21.
15. **Waterer, D.R.** 2002. Impact of high soil pH on potato yields and grade losses to common scab. Canadian Journal of Plant Science, 82: 583-586.

Received: August 11, 2010; Accepted: January 23, 2011

تاريخ الاستلام: 2010/8/11؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2011/1/23