

## شناسایی و بررسی مقایسه‌ای عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات در استان ایلام

فاطمه شرافتی<sup>۱</sup>، پژمان خدایگان<sup>۲\*</sup>، مهدی آزادوار<sup>۲</sup>، ابراهیم صداقتی<sup>۴</sup>، روح الله صابری ریسه<sup>۵</sup> و خشنود نوراللهی<sup>۶</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

\*۲- نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

(Pezhman\_khodaygan@yahoo.com)

۳- استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی جیرفت و کهنوج

۴ و ۵- استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

۶- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۱۳

### چکیده

نمونه‌هایی از برگ و سرشاخه‌های لیموترش، با علائم بیماری شانکر باکتریایی مرکبات در بهار و تابستان ۱۳۹۱، از استان ایلام جمع‌آوری گردید. باکتری عامل بیماری با روش‌های متداول از بافت آلوده جداسازی و براساس ویژگی‌های فنوتیپی و طیف‌سنجی رنگدانه زرد مورد شناسایی ابتدایی قرار گرفت. بیماری‌زایی جدایه‌ها روی برگ‌های لیموترش و گریپ‌فورت در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای اثبات گردید. نتایج شناسایی بیماری‌گر براساس بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی با کاربرد چهار جفت آغازگر اختصاصی نشان داد که جدایه‌های مذکور متعلق به زیرگونه *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می‌باشند. نتایج شناسایی اولیه، با توالی‌یابی ژن نیمه حفاظت شده *gyrB* در نماینده جدایه‌ها تأیید گردید. انگشت‌نگاری ژنتیکی و مقایسه الگوی اثر انگشتی DNA استرین‌های جدا شده از استان ایلام با سه جدایه تیپ مرجع و نماینده‌هایی از جدایه‌های بیماری‌گر بدست آمده از استان‌های کرمان، سیستان و بلوچستان، هرمزگان و فارس نشان دهنده تشابه بین باکتری‌های عامل شانکر مرکبات در ایران است.

کلید واژه ها: شانکر باکتریایی مرکبات، ایلام، زانتوموناس، شناسایی

### مقدمه

آلودگی شدید به این بیماری سبب برگ‌ریزی درخت، کاهش کیفیت و کمیّت محصول، ریزش زودهنگام میوه و خشک شدن ناگهانی درخت و کاهش بازارپسندی محصول آن می‌شود. علائم این بیماری به صورت زخم‌های برجسته روی برگ، شاخه و میوه بروز می‌کند. زخم‌های تازه، برجسته و جوش‌مانند هستند و با گذشت زمان چوب پنبه‌ای و شبیه قله‌ی آتشفشان می‌شوند. زخم‌ها دارای هاله‌ی زرد رنگ هستند که با افزایش سن اندام‌ها محو می‌شود (داس<sup>۲</sup>، ۲۰۰۳). باکتری‌های عامل این بیماری، سه گونه‌ی متمایز از جنس

مرکبات با تولید سالانه ۶۰ میلیون تن محصول و با پوشش ۱/۶ میلیون هکتار از گیاهان باغی بسیار ارزشمند بوده و سهم بالایی در تولید ثروت و افزایش مبادلات تجاری دارند. شانکر باکتریایی مرکبات که در فصول گرم و مرطوب خسارت زیادی به محصول وارد می‌کند، یکی از بیماری‌های مهم مرکبات می‌باشد. در ایران نخستین بار این بیماری در سال ۱۳۶۸ توسط علیزاده و رحیمیان از منطقه‌ی کهنوج استان کرمان و روی لیموترش گزارش شد (خداکرامیان و سوئیگنز<sup>۱</sup>، ۲۰۱۱).

بسیاری از کشورها از جمله در تمامی قاره‌ی اروپا به عنوان ارگانسیم قرنطینه محسوب می شود (گتوالد و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۰۱؛ پرووست و همکاران<sup>۳</sup>، ۲۰۰۲). این بیماری در استان‌های مختلف جنوبی ایران نظیر هرمزگان، سیستان و بلوچستان، فارس و هرمزگان گزارش شده است (خداکریمیان و رحیمیان ۱۳۸۷: مستوفی زاده قلمفرسا و رحیمیان ۱۳۷۵). بررسی‌های بعمل آمده روی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استرین‌های جدا شده از مرکبات ایران، وجود استرین‌های ناهمگنی که همگی متعلق به گروه A بودند را نشان داده است (محمدی و همکاران<sup>۴</sup>، ۲۰۰۱). نتایج تحقیقات دیگر محققین پس از پژوهش بر روی باکتری‌های عامل شانکر در ایران نیز، نشان داده است که تیپ آسیایی فراوان‌ترین فرم بیماری در ایران می‌باشد و فرم غیر تیپ دیگری نیز وجود دارد که شباهتی به فرم‌های دیگر ندارد (خداکریمیان و سوئینگر، ۲۰۱۱). تنوع ژنتیکی میان استرین‌های *X. c. subsp. ctri* متعلق به چند استان مختلف در ایران نیز مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج بررسی بیانگر این بود که استرین‌های استان سیستان و بلوچستان، یک گروه متفاوت می‌باشند. بنابراین احتمالاً خاستگاه جغرافیایی آن‌ها از استرین‌های موجود در استان‌های دیگر متمایز است (رضایی و همکاران<sup>۵</sup>، ۲۰۱۲). از آنجائیکه اخیراً یک بیماری مشابه در استان ایلام نیز گزارش شده است (بیگی و همکاران، ۱۳۹۱)، هدف این پژوهش بررسی دقیق بیماری و مقایسه ژنوتیپی عامل یا عوامل آن در استان ایلام با سایر باکتری‌های گزارش شده در ایران بود.

### مواد و روش‌ها

#### جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری عامل

**بیماری:** برگ و سرشاخه‌های آلوده‌ی درختان

*Xanthomonas* می‌باشند. مخرب‌ترین و شایع‌ترین فرم عامل بیماری، فرم A (شانکر آسیایی، کانکروزیز *X. citri* subsp. *citri* یا شانکر حقیقی) ناشی از *X. citri* subsp. *citri* است که بومی آسیا می‌باشد، اما در بسیاری از نواحی دنیا وجود دارد و در بیش از ۳۰ کشور مرکبات‌خیز جهان گزارش شده است. این باکتری با دامنه‌ی میزبانی گسترده، روی پرتقال، گریپ‌فروت، لیمو، لیمومکزیکویی و با شدت کم‌تر روی دیگر گیاهان خانواده‌ی روتاسه مثل نارنج سه‌برگ، نیز بیماری‌زا می‌باشد. فرم B (کانکروزیز B یا شانکر دروغی) توسط *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* ایجاد می‌شود و زخم‌هایی مشابه اما کوچک‌تر از زخم‌های فرم A ایجاد می‌کند و نسبت به آن رشد کندتری دارد. خاستگاه این فرم آرژانتین است اما در اوروگوئه و پاراگوئه نیز دیده شده است. حساس‌ترین میزبان‌ها نسبت به آن لیمو و لیمومکزیکویی می‌باشد. شکل دیگری از بیماری که توسط *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* ایجاد می‌شود، فرم C (کانکروزیز لیمومکزیکویی) بوده که در برزیل یافت شده و دامنه‌ی میزبانی آن محدود به لیمومکزیکویی می‌باشد. فرم D شانکر مرکبات (باکتریوزیز مکزیکویی) که تنها در مکزیک و روی لیمومکزیکویی مشاهده شده است نیز به وسیله‌ی باکتری مذکور ایجاد می‌شود. در سال ۱۹۸۴ یک بیماری جدید ناشی از باکتری *Xanthomonas* sp. از نهالستان‌های مرکبات در فلوریدا گزارش شد و به عنوان لکه باکتریایی مرکبات نام گرفت. در حال حاضر، این شکل بیماری فقط در فلوریدا شناخته شده است. عامل این بیماری *X. alfalfa* subsp. *citrumelonis* بوده و بیماری ناشی از آن تحت عنوان شانکر گروه E یا شانکر E نام‌گذاری شد (شاد و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۰۵؛ شاد و همکاران، ۲۰۰۶). ارقام بسیار حساس شامل گریپ‌فروت، لیمومکزیکویی و لمون‌ها هستند. این باکتری‌ها به دلیل اهمیت ناشی از خسارت اقتصادی در

2- Gottwald *et al.*

3 - Pruvost *et al.*

4- Mohammadi *et al.*

5- Rezaei *et al.*

1- Schaad *et al.*

(ساسلو و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۸۲)، آزمون رشد هوازی/بی‌هوازی به روش هیو و لایف سن (شاد و همکاران، ۲۰۰۱)، تولید لوان به روش للیوت و استد (للیوت و استد<sup>۲</sup>، ۱۹۸۷)، تولید رنگدانه فلورسنت در محیط کینگ ب (KB) به روش شاد (شاد و همکاران، ۲۰۰۱) و اکسیداز به روش کواکس (کواکس<sup>۳</sup>، ۱۹۵۶) انجام شد. آزمون‌های کاتالاز، پکتیناز (لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی)، هیدولیز ژلاتین، تحمل نمک طعام، هیدرولیز نشاسته، توین ۸۰ و تولید اندول به روش للیوت و استد (للیوت و استد، ۱۹۸۷)، انجام گردید. آزمون الفا واکنش فوق حساسیت در گوجه‌فرنگی به روش کلمنت (کلمنت و همکاران<sup>۴</sup>، ۱۹۶۴)، تعیین رنگ کلنی روی محیط YDC و اثر روی شیر لیموس‌دار به روش شاد انجام و نتایج تا ۳۰ روز بعد بررسی گردید (شاد و همکاران، ۲۰۰۱). آزمون آرژین دی‌هیدرولاز به روش تورنلی، انجام گرفت (تورنلی<sup>۵</sup>، ۱۹۶۰). آزمون تولید ۳-کتولاکتوز و طیف منابع کربن قابل استفاده جدایه‌ها با استفاده از محیط معدنی پایه آیر و همکاران (برگرفته از شاد و همکاران، ۲۰۰۱) بررسی شد. قندها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه با روش تندال استریل و به غلظت نهائی ۰/۲ تا یک درصد به محیط پایه اضافه شد. نتایج استفاده یا عدم استفاده از منابع کربنی براساس مقایسه میزان رشد و تغییر اسیدیته محیط کشت نسبت به شاهد (محیط آیر فاقد منبع کربنی) تا سه هفته پس از کشت و نگهداری تشکک‌ها در دمای ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس ارزیابی گردید.

### تعیین طیف جذبی رنگدانه‌ی زرد:

سوسپانسیون با غلظت  $10^7$  cfu/ml از کشت جوان

لیمومکزیکی (*Citrus aurantifolia*) که دارای علائم مشکوک به بیماری شانکر بودند، از مرکبات کاری‌های روستای دره‌شهر، بخش ماژین استان ایلام تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از ضدعفونی سطحی بافت‌ها با اتانول ۷۰٪ و شستشو، بخش‌های دارای علائم بوسیله اسکالپل جداسازی و در مقدار کمی آب مقطر استریل خرد گردید. بعد از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، یک قطره از سوسپانسیون حاصله روی محیط کشت آگار غذایی (NA) حاوی ۰/۵٪ گلوکز و ۰/۵٪ عصاره مخمر (GYNA) کشت داده شد. پتری‌ها در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت ۲ تا ۳ روز کلنی‌های زرد رنگ رشد یافته، انتخاب و به منظور خالص‌سازی، دو بار دیگر روی محیط مذکور مخطط گردید. جدایه‌های خالص برای استفاده روزانه بصورت نقطه‌ای روی محیط YDC (شامل ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ دکستروز و ۲٪ درصد کربنات کلسیم در یک لیتر آب) کشت و پس از رشد مناسب در یخچال نگهداری شدند. به منظور نگهداری طولانی، سوسپانسیون غلیظ از سلول‌های باکتری در محیط غذایی فاقد آگار (NB) به همراه ۴۰ درصد گلیسرین، تهیه و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (شاد و همکاران، ۲۰۰۱). جدایه‌های تیپ مرجع شامل *X. c.* *X. f. subsp. aurantifolii*, *subsp. citri* و *X. a. subsp. citrumelonis* به ترتیب با کدهای ICMP15806، ICMP17123 و ICMP15808 از مرکز نگهداری جدایه‌ها در نیوزیلند (International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand) تهیه و به منظور مقایسه با سایر جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

### بررسی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها:

آزمون گرم در پتاس سه درصد به روش ساسلو

- 1- Suslow *et al.*
- 2- Lelliott & Stead
- 3- Kovacs *et al.*
- 4- Klement
- 5- Thornley

به عنوان شاهد از جدایه مرجع *X. c. citri* ICMP17123 و بعنوان کنترل منفی از بافر نمکی فاقد باکتری استفاده شد.

**بررسی های ژنوتیپی:** اسیدنوکلیتیک جدایه ها به روش معمول فنل-کلروفرم، با اندکی تغییر استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر (science2000 NanodropThermo) ارزیابی شد. نسبت جذب در دو طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ به عنوان نشانگر میزان خلوص نوکلئیک اسید استخراج شده بود (آسویل و همکاران<sup>۳</sup>، ۱۹۹۲).

**ردیابی جدایه ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و مقایسه الگوی اثر انگشت ژنتیکی:** به منظور تایید نهایی نتایج، از جفت آغازگرهای اختصاصی Xac01/Xac02 (کولتا-فیلهو و همکاران<sup>۴</sup>، ۲۰۰۶)، XacF/XacR (پارک و همکاران<sup>۵</sup>، ۲۰۰۶)، J-RXg/J-RXc2 و J-pth1/J-pth2 (کوپرو و گراهام<sup>۶</sup>، ۲۰۰۲) استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر و مخلوط واکنش متشکل از ۲ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ میلی مولار dNTPs، ۱۰ پیکومولار از هر آغازگر و ۲ واحد آنزیم پلی مرز به همراه ۵۰-۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو بود. الگوی اثر انگشتی DNA ژنومی جدایه ها با استفاده از آغازگرهای ERIC-PCR و BOX-PCR (ورسالوویچ و همکاران<sup>۷</sup>، ۱۹۹۱) تهیه و با الگوی جدایه های تیپ مرجع و نمایندگانی از استان های فارس، هرمزگان، کرمان و سیستان و بلوچستان مورد مقایسه قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلی مرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و مخلوط واکنش متشکل

باکتری در متانول خالص تهیه گردید. لوله حاوی باکتری تا زمان حل شدن رنگدانه در متانول در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. به هر لوله مقداری متانول اضافه شد تا حجم به یک میلی لیتر برسد و سپس برای ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید. بخش روشنین برداشته شده و طیف سنجی با استفاده از اسپکتروفوتومتر (SPECORD 250) در دامنه نوری ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر انجام گرفت. به عنوان شاهد از جدایه مرجع *X. c. citri* ICMP17123 استفاده شد (آری و استال<sup>۱</sup>، ۱۹۸۱).

**آزمون بیماری زایی:** بیماری زایی جدایه ها بر روی برگ های لیموترش و گریپ فروت در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیونی از کشت خالص و تازه باکتری با غلظت ۱۰<sup>۸</sup>cfu/ml در بافر فسفات نمکی (۴۰ میلی مولار Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> و ۲۵ میلی مولار KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)، تهیه گردید. برگ های جوان و تازه لیموترش و گریپ فروت از نهال جداسازی و بوسيله اتانول ۷۰٪ و متعاقباً هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ضد عفونی گردید. پس از سه بار آبشویی با آب مقطر استریل، برگ ها درون تشتک های پتری حاوی آب-آگار ۱ درصد قرار گرفت. حدود ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به نقاطی از برگ تزریق شد. بخشی از سوسپانسیون باکتری بر روی برگ های دانهال های سه ماهه لیموترش و گریپ فروت پاشیده شده و بوسيله سوزن در برگ ها زخم ایجاد گردید. تشتک های پتری و گلدان ها در اتاقک رشد با دمای ۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت ۸۰ درصد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شده و بصورت روزانه مورد بررسی قرار گرفتند (فرانسیس و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۱۰).

3- Ausubel

4- Coletta-Filho *et al.*5- Park *et al.*

6- Cubero &amp; Graham

7- Versalovic *et al.*

1- Irej &amp; Stall

2- Fransis *et al.*

**تکثیر و توالی‌یابی ژن *gyrB*: بخشی از ژن**  
*gyrB* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *gyrB1/2* (نگوک و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۱۰) در نماینده جدایه‌ها تکثیر گردید. محصول واکنش در ژل آگاروزی ۱/۵ درصدی بارگذاری گردید. قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت تخلیص (Accuprep gel purification Kit, Cat No. K-3035-1) محصول شرکت بایونر کره جنوبی، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی و برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد.

**آنالیز رایانه‌ای توالی:** توالی بدست آمده، ابتدا با استفاده از برنامه DNASTAR Seqman (Inc., Madison, Wis., اصلاح شده و سپس با استفاده از برنامه BLAST(NCBI) با توالی‌های دیگر موجود در بانک ژن همردیف گردید (آلتشول<sup>۳</sup>، ۱۹۹۰). بررسی مقایسه‌ای با همردیف سازی چندگانه (multiple sequence alignment) با استفاده از برنامه ClustalW انجام شد (تامسون و همکاران<sup>۴</sup>، ۱۹۹۷). درخت فیلوژنتیکی، با استفاده از برنامه MEGA4 و الگوریتم Neighbor joining و با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ ترسیم گردید (کومار و همکاران<sup>۵</sup>، ۲۰۰۴).

### نتایج و بحث

تمامی جدایه‌های در آزمون حلالیت با پتاس ۳/، گرم منفی ارزیابی شدند، واکنش اکسیداز در آن‌ها منفی بوده و کلنی‌های زرد برجسته با حاشیه‌ی منظم، محدب و لعاب‌دار آن‌ها روی محیط کشت GYNA از نظر فنوتیپی مشابه با *X. citri* بود. نتایج آزمون رشد هوازی/بی‌هوازی نشان داد که این باکتری‌ها هوازی

از ۱/۵ میلی‌مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۵ میلی‌مولار dNTPs، ۱۰ پیکومولار از هر آغازگر، ۰/۲۵ درصد توئین ۲۰ و ۲ واحد آنزیم پلی‌مراز به همراه ۵۰-۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو انجام شد. اطلاعات آغازگرها در جدول ۱ درج گردیده است. محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲٪ یا اکریلامیدی ۱۵ درصد، بارگذاری و در اختلاف پتانسیل ۸۰ ولت برای ۲ ساعت الکتروفورز گردید. ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت (Ms. Major Science) مشاهده و عکس‌برداری شد. شباهت جدایه‌ها با مقایسه‌ی نقوش قطعات DNA در ژل، وجود و عدم وجود قطعات همسان در دو جدایه و تعیین ضریب تشابه جاکارد (Jaccords coefficient) صورت گرفت. ماتریس تشابه تشکیل شده و دندروگرام با روش مقایسه جفت‌ها از طریق میانگین‌های بی‌وزن (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages, UPGMA) نرم‌افزار NTSYS محاسبه و ترسیم گردید (استنستروم و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۰).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده و اندازه قطعات مورد انتظار

آغازگر	اندازه قطعه	دمای اتصال (سانتی‌گراد)
ERIC	-	۴۸/۵°
BOX	-	۵۰°
Xac01/Xac02	۵۸۱bp	۶۰°
XacF/XacR	۵۶۱bp	۶۵°
J-RXg/J-Xc2	۱۷۹bp	۵۵°
J-pth1/J-pth2	۱۹۷bp	۶۰°
<i>gyrB1/2</i>	۱۰۰۰bp	۶۶°

2- Negoc *et al.*

3- Altschul *et al.*

4- Thompson *et al.*

5- Kumar *et al.*

1- Stenstrom *et al.*

اساس رنگدانه‌ی زرد جدایه‌ها، زانتومونادین ارزیابی گردید. زانتومونادین ترکیبی خاص از رنگدانه‌های شبه کارتنوئیدی است که ساختاری آریل پلی‌نی همراه با مولکول‌های برم دارد. این رنگدانه در غشا خارجی باکتری‌های جنس زانتوموناس قرار داشته و بعنوان یک نشانگر شیمیایی در تفکیک برخی گونه‌ها کاربرد فراوان دارد. بسته به امکانات موجود می‌توان این رنگدانه را از نظر تعداد اتم‌های برم، متیلاسیون و ماکزیمم جذب، بررسی و مورد مقایسه قرار داد. بررسی این رنگدانه ویژگی نسبتاً سریع و قابل اعتمادی برای تفکیک باکتری زانتوموناس از سایر باکتری‌های زردرنگ است (آری و استال، ۱۹۸۱). هیچ یک از جدایه‌ها در محیط حاوی لاکتوز (لاکتوز-آگار) قادر به تولید تری-کتولاکتوز نبوده و به این ترتیب از باکتری‌های زرد رنگ متعلق به جنس *Sphingomonas* که قادر به تولید تری-کتولاکتوز هستند (کیم و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۸)، تفکیک شدند. در آزمون بیماری‌زایی باکتری‌ها روی میزبان‌های حساس شامل لیموترش (*Citrus aurantifolia*) و گریپ‌فروت (*C. paradise*) مایه‌زنی شدند. در روش استفاده از برگ‌های جداشده، باکتری‌ها پس از تزریق به پشت برگ سبب ایجاد نقاط آبرسخته و هایپر تروفیک در محل مایه‌زنی شدند. پس از گذشت ۴ روز از زمان مایه‌زنی، این نقاط توسعه یافته و جوش‌های کوچک، جوان و سفیدرنگی در پشت محل تزریق پدیدار شد (شکل ۱).

این جوش‌ها با گذشت زمان تبدیل به زخم‌های بزرگ‌تر و تیره‌تر شد. در نمونه‌ی شاهد به جز آبرسختگی خفیف اولیه که در محل تزریق ایجاد شده بود و پس از یک روز محو شد، هیچ علامت دیگری مشاهده نشد. به نظر می‌رسد این روش می‌تواند سختی‌ها و کاستی‌های انجام آزمون بیماری‌زایی در گلخانه را کاهش داده و بدون نیاز به شرایط ویژه‌ی گلخانه‌ای (دما

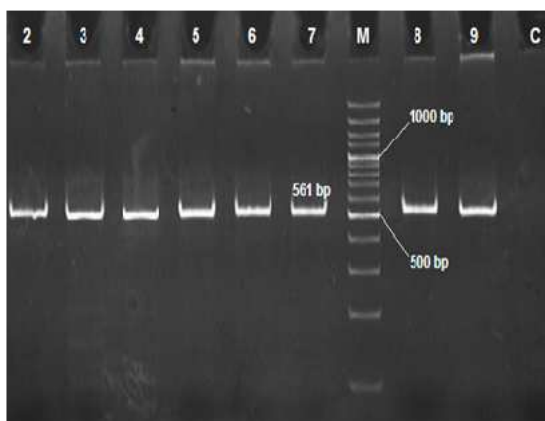
اجباری بوده و قادر به تولید رنگدانه فلورسنت نمی‌باشند. واکنش کاتالاز در آن‌ها مثبت ارزیابی شد. هیچ یک از جدایه‌ها قادر به تولید اندول و نیز لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی نبودند. تمام جدایه‌ها توانایی هیدرولیز نشاسته، ژلاتین و توین ۸۰، همچنین رشد در محیط کشت حاوی نمک‌طعام ۲ و ۳٪ را دارا بودند. این جدایه‌ها سبب القاء واکنش فوق‌حساسیت در گوجه‌فرنگی شدند. باکتری‌های مذکور شیر لیتموس‌دار را بصورت قلیایی هضم نمودند و قادر به استفاده از آلانین، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، گلیسرول، لاکتوز، مانیتول، ریبوز، مانوز، ملی‌بیوز، سوکروز و ترهالوز بودند، اما از آدونیتول، آرابینوز، دولسیتول، اتانول، گلايسين، مایواینوزیتول، رامنوز، ریبوز، سوربیتول و د-تارتارات استفاده نکردند. ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها مشابه با جدایه مرجع *X. c. citri* بود. استفاده از روش‌های فنوتیپی در شناسایی باکتری‌های مختلف بسیار پرکاربرد و موثر می‌باشد. این روش‌ها همواره در تحقیقات مختلفی که به منظور شناسایی و تعیین هویت باکتری‌های مختلف انجام شده، مورد استفاده قرار گرفته‌است. برای استفاده از این آزمون‌ها، معمولاً نیاز به امکانات آزمایشگاهی زیاد و تخصص بالایی برای قرائت نتایج است که گاهی به زمان نسبتاً طولانی نیاز دارد. در خصوص گونه‌های مختلف جنس زانتوموناس شناسایی مبتنی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی اهمیت زیادی نداشته و غالباً استفاده از روش‌های مکمل توصیه شده‌است (واترین و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۵). رنگدانه‌ی زرد رنگ باکتری در متانول داغ حل شده و توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های بین ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر طیف‌سنجی و با رنگدانه باکتری استاندارد مورد مقایسه قرار گرفت. نمودار به‌دست‌آمده در جدایه‌ها، مشابه با استرین استاندارد، دارای بیشترین جذب در ۴۴۲ نانومتر و همچنین دارای دو شانه در ۴۶۹ و ۴۲۱ نانومتر بود. شانه‌ی راست کمی پایین‌تر از شانه‌ی چپ قرار داشت. بر این

شانکر می‌باشند (گل‌محمدی و همکاران، ۲۰۰۷)، گزینه‌ی مناسبی برای گریز از مشکلات موجود در روش‌های سنتی محسوب می‌شوند. در صورتی که روش‌های ژنوتیپی مورد استفاده حساسیت و اختصاصیت مناسب داشته باشند، برای تأیید نهایی اطلاعات حاصل از شناسایی به روش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، موثر هستند. در این پژوهش از چهار جفت آغازگر اختصاصی برای تأیید نهایی نتایج استفاده شد. کاربرد هر کدام از جفت آغازگرهای اختصاصی شامل XacR/XacF، J-pth1/J-pth2، J-RXg/J-RXc2 و Xac01/Xac02 به ترتیب منجر به تکثیر قطعاتی ۵۶۱، ۱۹۷، ۱۷۹ و ۵۸۱ جفت بازی گردید (شکل ۲). در هر واکنش، از DNA ژنومی استرین مرجع *X. c. citri* ICMP17123 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تک‌نوارهای تکثیرشده در تمامی جدایه‌های استان ایلام در محدوده‌ی موردنظر و مشابه استرین استاندارد (تیپ A) بود. استفاده از جفت‌آغازگرهای XacF/XacR و



شکل ۱- نقاط آبسوخته و هایپر تروفیک ایجاد شده در پشت برگ لیموترش ۴ روز پس از مایه‌زنی با جدایه ۳۵۸

و رطوبت بالا) که لازمه‌ی رشد و فعالیت باکتری مایه‌زنی شده و بروز زخم‌های شانکر می‌باشد، قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها را به خوبی نمایش دهد. علاوه بر آن می‌توان به راحتی میزان رطوبت، دما، نور و سایر فاکتورهای لازم را برای برگ‌های درون تشتک پتری، کنترل نمود. استفاده از این روش در شرایط خارج فصل و بخصوص برای ارگانسیم‌های قرنطینه‌ای توصیه شده است (فرانسیس و همکاران، ۲۰۱۰). در روش دوم نیز نتایج مشابهی به دست آمد با این تفاوت که علائم مشخص شانکر کمی دیرتر روی برگ‌ها نمایان شد. جدایه‌های مذکور پس از ۳ تا ۴ روز قادر به تولید نقاط روشن و آبسوخته در محل تزریق شدند این نقاط در هفتمین روز از بعد مایه‌زنی تبدیل به لکه‌های جوش‌مانند کوچک، سفید و برجسته با هاله‌ی آبسوخته و زردرنگ در سطح زیرین برگ لیمو و گریپ‌فروت شدند. آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی اگرچه از ملزومات اولیه‌ی شناسایی باکتری‌ها محسوب می‌شوند، اما به‌تنهایی برای تشخیص و شناسایی آن‌ها کافی به نظر نمی‌رسند. انجام آزمون بیماری‌زایی با دشواری‌ها و حساسیت‌های مخصوص به خود همراه است که فراهم کردن شرایط بهینه‌ی رشد باکتری در گیاه مایه‌زنی شده برای بروز علائم بیماری، یکی از آن‌ها است. روش‌های ژنوتیپی و مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که قادر به تشخیص و ردیابی کمترین میزان سلول باکتری در گیاه بیمار مبتلا به



شکل ۲- قطعه‌ی ۵۶۱ جفت‌بازی تکثیر شده با استفاده از جفت‌آغازگر XacF/R بارگذاری شده در ژل اکرلامیدی ۱۵ درصد. چاهک ۲: استرین استاندارد به عنوان کنترل مثبت، چاهک ۳ تا ۷: جدایه‌هایی از استان ایلام. چاهک ۸ و ۹ به ترتیب جدایه‌هایی از استان کرمان و فارس. M: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی، C: کنترل منفی.

باکتریایی، مشخص شده که پراکنش عناصر تکراری ERIC, REP و BOX در جدایه‌های خاص بازتابی از ساختار ژنومی آنها می‌باشد (لووس و همکاران<sup>۴</sup>، ۱۹۹۴). بدین ترتیب الگوی ژنتیکی حاصل از روش‌های rep-PCR بعنوان یک توالی امضایی برای هر جدایه خاص و یک ابزار تشخیصی در تعیین خطوط تکاملی اختصاصی عمل می‌نماید (دبروین و همکاران، ۱۹۹۶). توزیع گسترده این عناصر تکراری در ژنوم میکروارگانسیم‌های مختلف، شناسائی سریع گونه و استرین‌های باکتریایی را ممکن ساخته است (ورسالوویچ و همکاران، ۱۹۹۱). الگوی اثر انگشتی DNA جدایه‌ها بر اساس rep-PCR آنها را در گروه‌های مختلفی تقسیم‌بندی نمود و نشان داد که جدایه‌های استان ایلام تفاوت زیادی با جدایه‌های سایر استان‌ها ندارند. در این میان گروهی از جدایه‌های استان کرمان الگوی متفاوتی داشته و احتمالاً جدایه‌های غیر تپیک می‌باشند. الگوی کلی جدایه‌های ایرانی مشابه با الگوی حاصل از *X. c. subsp. citri* بوده و تنها در دو نوار با یکدیگر مطابقت نداشتند. این الگوها، متفاوت از دو گونه دیگری بودند که عامل شانکر مرکبات می‌باشند (شکل ۳). به نظر می‌رسد با توجه به تعداد نوارهای تکثیرشده، آغازگرهای ERIC-PCR در مقایسه با BOX-PCR توانایی بهتری در نمایش تنوع موجود میان جدایه‌ها داشتند. نتایج توالی‌یابی بر اساس توالی ژن *gyrB* نشان داد که جدایه ایلام با سطح تشابه ۹۹ درصد در کنار استرین‌های *Xcc* تیپ A در یک گروه قرار می‌گیرند و از این نظر تأیید کننده تشخیص صحیح جدایه‌های عامل شانکر در استان ایلام بود. قرار گرفتن استرین *X. citri* pv. *bilvae* در کنار گروه *Xcc* نشان‌دهنده ارتباط ژنتیکی نزدیک آن‌ها با یکدیگر است. درخت ترسیم شده همچنین نشان می‌دهد که مقایسه‌ی ژن *gyrB* توانایی تفکیک مناسب گونه‌های *Xanthomonas* را دارد (شکل ۴). در تحقیقات به توان تفکیک مناسب این ژن حتی برای

در باکتری‌های دیگری مانند *Xac01/Xac02 Pantoea agglomerans* نیز سبب تکثیر قطعه‌ای در محدوده‌ی موردنظر گردید که به صورت یک باند ضعیف در ژل اکرلامیدی قابل مشاهده بود (نتایج منتشر نشده). لذا استفاده از چند آغازگر اختصاصی دیگر برای تأیید انتساب باکتری‌های استان ایلام به زیر گونه‌ی *X. citri* ضروری بود. بر اساس مجموع نتایج فوتیپی و ژنوتیپی، تعلق جدایه‌های استان ایلام به زیر گونه *X. c. citri* محرز گردید. به منظور مقایسه جدایه‌های استان ایلام با سایر باکتری‌های بیماری‌گر جداسازی شده از دیگر استان‌ها، از روش بررسی الگوی اثر انگشتی استفاده گردید. انگشت‌نگاری ژنتیکی با rep-PCR یکی از روش‌های ساده، ارزان و تکرارپذیر است که در آن از آغازگرهای ویژه‌ای استفاده می‌شود. این آغازگرها مکمل توالی‌های تکراری، حفاظت شده و طبیعی است که در نسخه‌های متعدد، در ژنوم بسیاری از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت پراکنده شده‌اند (رادمیکر و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۸). عناصر تکراری DNA که بطور طبیعی در ژنوم گونه‌های مختلف باکتریایی پراکنده شده‌اند، می‌توانند بعنوان جایگاه‌هایی برای تکثیر DNA ژنومی بکار روند. سه گروه از این توالی‌های حفاظت شده تکراری که با بیشترین جزئیات مطالعه شده‌اند، توالی‌های ERIC, REP و عناصر BOX هستند. هر کدام از این توالی‌ها بطور مجزا در موقعیت‌های بین ژنی در ژنوم باکتریایی قرار گرفته‌اند (مارتین و همکاران<sup>۲</sup>، ۱۹۹۲؛ دبروین و همکاران<sup>۳</sup>، ۱۹۹۶). از آنجائیکه سازمان ژنوم به دلیل فشار ناشی از انتخاب تغییر می‌کند، پراکندگی و انتشار توالی‌های ERIC, REP و BOX می‌تواند انعکاسی از ساختار و تکامل ژنوم باکتریایی باشد. با توجه به الگوی اثر انگشت ژنتیکی بدست آمده از جدایه‌های خاص

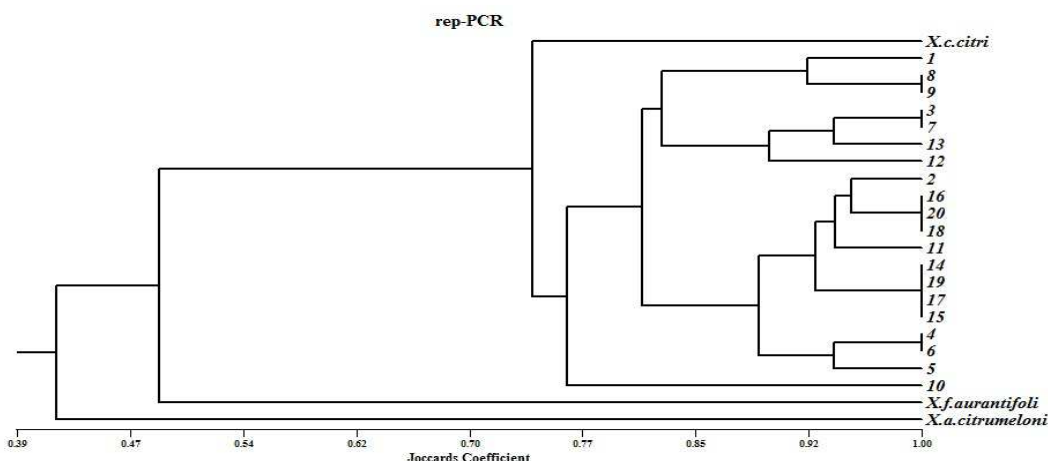
1- Rademaker et al.

2- Martin et al.

3- de Bruijn et al.

4- Louws et al.





شکل ۳- دندروگرام ترکیبی الگوی اثر انگشتی نماینده‌هایی از جدایه‌های بدست آمده از مرکبات در آزمون rep-PCR. شماره‌های ۱ تا ۴ جدایه‌های ایلام، شماره‌های ۵ تا ۸ جدایه‌های فارس، شماره‌های ۹ تا ۱۲ جدایه‌های کرمان، شماره‌های ۱۳ تا ۱۶ جدایه‌های سیستان و بلوچستان و شماره‌های ۱۷ تا ۲۰ جدایه‌های هرمزگان می‌باشد



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش NJ، نشان دهنده‌ی ارتباط ژنتیکی نماینده جدایه‌های ایلام (KF137652.358) در مقایسه با تعدادی از استرین‌های موجود در بانک ژن براساس تشابه توالی ژن gyrB استرین HQ434522 Stenotrophomonas maltophilia به عنوان Outgroup مورد استفاده قرار گرفته است

این بیماری که انتقال مکانیکی میوه‌های آلوده از جمله‌ی آن‌ها می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً عامل بیماری از مناطق و استان‌های مجاور و یا حتی از برخی کشورهای همسایه، وارد این استان شده باشد. استان ایلام از جنوب با استان خوزستان و از غرب با کشور عراق همجوار است. با توجه به کشت مرکبات در این مناطق و

گونه‌هایی که از نظر ژنتیکی بسیار به یکدیگر نزدیک هستند، اشاره شده است (پارکینسون و همکاران، ۲۰۰۷). با توجه به عدم مشاهده بیماری شانکر در استان‌های غربی ایران و نیز توجه به راه‌های انتقال و شیوع

شرافتی و همکاران: شناسایی و بررسی مقایسه ای عامل بیماری شانکر باکتریایی...

شرایط نسبتاً مساعد شیوع بیماری، احتمال وجود باکتری عامل شانکر آسیایی در درختان مرکبات مناطق غربی کشور وجود دارد. به نظر می‌رسد، لازم است محل احتمالی ورود بیماری به این استان مرزی مورد بررسی دقیق‌تر قرار گیرد تا خاستگاه جغرافیایی دقیق عامل بیماری مشخص شده و با شناسایی صحیح آن، راهکارهای مناسبی برای مقابله با بیماری در این منطقه اتخاذ شود.

### منابع

۱. بیگی، س.، اشرفی، ج.، بهمنی، ز. و غلامی، م. ۱۳۹۱. شناسایی بیماری شانکر مرکبات در ایلام. بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۴ تا ۷ شهریور، دانشگاه شیراز، ص ۵۳۲.
۲. خداکرمیان، غ. و رحیمیان، ح.، ۱۳۸۷. خصوصیات فنوتیپی، دامنه میزبانی و چگونگی پراکنش استرین‌های باکتری *Xanthomonas axonopodis* عامل شانکر مرکبات جنوب ایران. بیماری‌های گیاهی، ۳۵: ۱۰۹.
۳. مستوفی زاده قلمفزسا، ر. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۵. وقوع آلودگی نوع آسیایی شانکر باکتریایی مرکبات در ایران. بیماری‌های گیاهی، ۳۲: ۲۹۰.
4. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
5. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1992. *Current protocols in molecular biology*. Green publishing Associates & Wiley Interscience, New York.
6. Coletta-Filho, H., Takita, M., Souza, A., Neto, J., Destefano, S., Hartung, J., and Machado, M. 2006. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 279-285.
7. Cubero, J., and Graham, J. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1257-1264.
8. Das, A. 2003. Citrus canker-A review. *Journal of Applied Horticulture*, 5: 52-60.
9. de Bruijn, F.J., Rademaker, J., and Schneider, M. 1996. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analysis. In: *Biology of plant microbe interaction*; Proceeding of 8<sup>th</sup> International Congress of Molecular Plant Microbe Interactions, APS Press, 497-502.
10. Francis, M.L., Pena, A., and Graham, J.H. 2010. Detached leaf inoculation of germplasm for rapid screening of resistance to citrus canker and citrus bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 571-578.

11. Golmohammadi, M., Cubero, J., Peñalver, J., Quesada, J., López, M., and Llop, P. 2007. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2309-2315.
12. Gottwald, T.R., Hughes, G., Graham, J.H., and Sun, X. 2001. The citrus canker epidemic in florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. *Phytopathology*, 91: 30-34.
13. Irey, M.S., and Stall, R.E. 1981. Value of Xanthomonadin for identification of pigmented *Xanthomonas campestris* pathovars. In Lozano, J.C. (ed), *Proceedings of the 5th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Columbia, pp: 85-95.
14. Khodakaramian, G., and Swings, J. 2011. Genetic diversity and pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* strains inducing citrus canker disease in Iran and South Korea. *Indian Journal of Microbiology*, 51: 194-199
15. Kim, H., Nishiyama, T., Kunito, T., Senoo, K., Kawahara, K., Murakami, K., and Oyaizu, H. 1998. High population of *Sphingomonas* species on plant surface. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 731-738.
16. Klement, Z., Farkas, C.L., and Lovrekorich, L. 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. *Phytopathology*, 54:474-477.
17. Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 2004 MEGA4: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatic*, 5: 150–163.
18. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. *Nature*, 178: 703.
19. Lelliott, R., and Stead, D. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial plant disease*. *Methods for the diagnosis of bacterial plant diseases*. Blackwell Scientific Publication.
20. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., and de Bruijn, F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2286-2295.
21. Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Aloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D.A., Boulnois, G.J., and Claverys, P. 1999. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumonia*. *Nucleic Acid Research*, 20: 3479-3483.
22. Mohammadi, M., Mirzaee, M.R., and Rahimian, H. 2001. Physiological and biochemical characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Phytopathology*, 149: 65-75.

23. Negoc, L.B.T., Verniere, C., and Jouen, E. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60: 515–525.
24. Park, D.S., Hyun, J.W., Park, Y.J., Kim, J.S., Kang, H.W., Hahn, J.H., and Go, S.J. 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpw* gene sequences. Microbiology Research, 161: 145-149.
25. Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J., and Stead, D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial *gyrase B* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 2881-2887.
26. Pruvost, O., Boher, B., Brocherieux, C., Nicole, M., and Chiroleu, F. 2002. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesion under tropical environmental condition and simulate splash dispersal of inoculums. Phytopathology, 92: 336-346.
27. Rademaker, J.L.W., Louws, J.F., and de Bruijn, J.F. 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: de Bruijn, F. J. (eds), Molecular Microbial Ecology Manual. 3.4.3. pp: 1–27. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
28. Rezaei, M.K., Shams-bakhsh, M., and Alizadeh, A. 2012. Genetic diversity among *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain in Iran. Journal of Plant Protection Research, 52: 1-9.
29. Schaad, N., Jones, J., and Chun, W. 2001. Plant Pathogenic Bacteria 3rd ed. The Bacteriology Committee of the American Phytopathological Society. APS Press, St. Paul, MN, USA.
30. Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I.V., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K., and Vidaver, A.M. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Systematic and Applied Microbiology, 29: 690-695.
31. Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K., and Vidaver, A.K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 28: 494-518.

32. Stenstrom, I.M., Zakaria, A. Ternstrem, A., and Molin, G. 1990. Numerical taxonomy of fluorescent *Pseudomonas* associated with tomato roots. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57: 223-236.
33. Suslow, T.V., Schorth, M.N., and Saka, M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without Staining. *Phytopathology*, 72: 917- 918.
34. Thampson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*, 25: 4876-4882.
35. Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Applied Bacteriology*, 13: 37-52.
36. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472-489
37. Versalovic, J., Koeth, T., and Lupsk, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19: 6823-6831.