Archive of SID

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۸، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۹
DOI: 10.22092/jaep.2020.128576.1318

مقاله‌ی کوتاه علمی

جداسازی و شناسایی باکتری عامل شانکر مرکبات در استان کهگیلویه و بویراحمد

ساره حیدرپناه[۱]، رسول رضائی[۱]✉، سید محسن تقوی[۲]، فریبا قادری[۱]
۱- به ترتیب دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران؛
۲- استاد بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران
(تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۹)

چکیده

شانکر باکتریایی مرکبات یک بیماری مهم اقتصادی در بسیاری از کشورهای نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری به شمار می‌آید که توسط باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ایجاد می‌شود.. چندین پاتوتیپ از بیمارگر توصیف شده است که براساس منشأ جغرافیایی، دامنه میزبانی و همچنین برخی ویژگی‌های ژنوتیپی متمایز شده‌اند. در سال زراعی ۱۳۹۵، نمونه‌هایی از برگ، میوه و سرشاخه‌های درختان لیموترش با علائم شانکر باکتریایی مرکبات از استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری گردید. باکتری عامل بیماری با روش‌های رایج از بافت‌های آلوده جداسازی و براساس آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی ابتدایی و بیماری‌زایی سویه‌ها نیز روی برگ‌های لیموترش اثبات شد. با توجه به علائم بیماری، خصوصیات فنوتیپی، آزمون بیماری‌زایی، آزمون پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و توالی‌یابی قسمتی از ژن هیستیدین کیناز باکتری مذکور به‌عنوان *Xanthomonas citri* subsp. *citri* تشخیص داده شد. این نخستین گزارش از وجود این بیماری در استان کهگیلویه و بویراحمد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیمارگر باکتریایی، بیماری‌زایی، ردیابی

Short comuincation

Isolation and identification of citrus canker bacteria in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province

S. HEYDARPANAH[1], R. REZAEI✉[1], S.M. TAGHAVI[2], F. GHADERI[1]
1. MSc. Graduated and Assistant Professor, Respectively; Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Iran
2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Iran

Abstract

Citrus bacterial canker is an economically important disease in many tropical and subtropical countries and caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Several pathotypes of this pathogen have been described that primarily distinguished by their geographical origin, host range and certain genotypic characteristics Leaves, fruits and twinges samples of 'Mexican 'lime, with bacterial canker symptoms were collected from Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province in 2012. The bacterial strains were isolated from infected tissues using classic methods and primary identification of bacterial isolates was performed based on phenotypic characterization. Pathogenicity of isolates was approved on leaves of Mexican lime. Based on the disease symptoms, phenotypic and pathogenicity tests, PCR test by using specific primers and sequencing data of histidine kinase gene, the isolates were identified as *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. This is the first report of the disease and the causal bacterium in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province.

Keywords: Bacterial pathogen, Pathogenicity, Detection

✉ rrezaei@yu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مرکبات سطح زیر کشت وسیعی را به خود اختصاص داده است. مرکبات نیز مانند بسیاری از محصولات دیگر دارای چندین بیماری مخرب قرنطینه‌ای مانند شانکر باکتریایی می‌باشند که شناسایی سریع و دقیق علائم این بیماری‌ها در کنترل و مدیریت آن‌ها بسیار حائز اهمیت است (Pruvost *et al*., 2015). در ایران عامل شانکر باکتریایی مرکبات *Xanthomonas citri* subsp. *citri* نخستین‌بار، در سال ۱۳٦۸ از درختان لیموترش در کهنوج استان کرمان گزارش شد (Alizadeh and Rahimian, 1990) و در سال‌های ۱۳۷٤ و ۱۳۷۵ در مناطق جنوبی ایران همه‌گیر شد و خسارت زیادی به باغ‌های لیموترش وارد ساخت. این بیماری در مناطق وسیعی از استان کرمان، هرمزگان، فارس و مناطقی از سیستان و بلوچستان گسترش دارد (Mohammadi *et al*., 2001). باکتری عامل بیماری به تمام اندام‌های جوان اعم از برگ، شاخه‌های نرم و میوه‌ها حمله می کند و زخم های برجسته‌ای روی آن به وجود می‌آورد. عامل شانکر مرکبات دارای پاتوتیپ‌های مختلفی است که بر اساس دامنه میزبانی، انتشار جغرافیایی و برخی صفات ژنتیکی از یکدیگر تفکیک می‌شوند. مخرب‌ترین و شایع‌ترین فرم عامل بیماری، فرم A (شانکر آسیایی یا شانکر حقیقی) ناشی از *X. citri* subsp. *citri* است که بومی آسیا می‌باشد، اما در بسیاری از نواحی دنیا وجود دارد و از بیش ۳۰ کشور مرکبات‌خیز جهان گزارش‌شده است. این فرم شانکر به لحاظ داشتن دامنه‌ی میزبانی وسیع و حساس بودن تمام ارقام مرکبات و گیاهان مرتبط به آن و نیز به جهت داشتن بیش‌ترین میزان طغیان در مناطق مرکبات‌خیز دنیا از خطرناک‌ترین بیماری‌های مرکبات به شمار می‌آید. دو سویه با دامنه میزبانی محدود در گروه پاتوتیپ A وجود دارد که از جنوب غربی آسیا و فلوریدا به نام‌های A^* و A^w گزارش‌شده است (Schubert *et al*., 2004). سویه A^* با پاتوتیپ A ارتباط نزدیکی دارد ولی فقط بر روی لیموترش (*Citrus aurantifolia*) و سویه A^w بر روی لیموترش و *Citrus machrophylla* بیماری ایجاد می‌کند (Sun *et al*., 2004).

تاکنون روش‌های مختلفی برای کنترل یا ریشه‌کنی بیماری به‌کار گرفته‌شده است. ازجمله این روش‌ها می‌توان به حذف درختان و نهال‌های آلوده، جلوگیری از ورود و پخش اندام‌های گیاهی بیمار، مبارزه شیمیایی و بیولوژیکی، کاشت ارقام مقاوم و ایجاد بادشکن در اطراف و بین ردیف‌های باغ اشاره نمود. از راهکارهای مناسب برای جلوگیری از شانکر مرکبات قرنطینه است که در ایالات‌متحده آمریکا این راهکار هنوز اجرا می شود. در فلوریدا، در سال‌های ۱۹۸٤ و ۱۹۹۵ ریشه‌کنی و سوزاندن همه‌ی درختان آلوده و مشکوک به بیماری شانکر مرکبات انجام‌گرفته است. در ایالات‌متحده حذف و نابودی درختان مرکبات بیمار و تمام درختان سالم در شعاع ۱۹۰۰ فوت از یک درخت بیمار انجام می‌پذیرد (*et* Gottwald *al*., 2001). با توجه به مشاهده علائمی شبیه به بیماری شانکر مرکبات در منطقه باشت استان کهگیلویه و بویراحمد و همچنین عدم گزارش این بیماری از استان، هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی عامل شانکر مرکبات در استان کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی و تعیین پاتوتیپ غالب در استان است.

روش بررسی

نمونه‌برداری در ماه‌های اردیبهشت، شهریور و مهر سال ۱۳۹۵ از باغ‌های مرکبات استان کهگیلویه و بویراحمد انجام شد. از بافت‌های دارای علائم مشکوک شانکر باکتریایی نظیر برگ، ساقه و میوه ٦۰ نمونه برداشته شد. جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها روی محیط کشت Nutrient Agar (NA) انجام شد. به‌منظور تشخیص جدایه‌های به‌دست‌آمده از درختان آلوده، آزمون‌های لازم بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی انجام شد (Schaad *et al*., 2001). سوسپانسیونی با غلظت 10^9 – 10^7 cfu در آب مقطر تهیه و با سرنگ به زیر بشره برگ توتون تزریق شد. پیدایش لکه‌های بافت مرده در قسمت‌های تزریق‌شده، بعد از ۲٤ تا ٤۸ ساعت،

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان واکنش مثبت ثبت شد. بیماری‌زایی جدایه‌ها روی برگ‌های لیموترش (*Citrus aurantifolia*) انجام شد. برگ‌ها با آب معمولی شستشو و مایه‌زنی در شرایط سترون با سوزن و قطره گذاری سوسپانسیون کشت تازه باکتری با غلظت 10^7 CFU/ml انجام شد (Graham *et al.*, 1989). به‌منظور تشخیص گونه *Xanthamonas citri* از جفت آغازگر Xac01/ Xac02، ردیابی پاتوتیپ A از جفت آغازگر M^+/M^- و ردیابی پاتوتیپ A^* از جفت آغازگر Ms^+/Ms^- (Yousefi-koupaei *et al.*, 2014) استفاده گردید. اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BIO-RAD انجام گرفت. به‌منظور بررسی قطعات تکثیر یافته در PCR تشخیصی، الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۱۰۰–۹۰ به‌مدت ۵۰ دقیقه انجام، ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه Gel documentation مشاهده وعکس‌برداری شد.

در شش جدایه، قطعه ۸۲٤ جفت بازی تکثیرشده توسط جفت آغازگر Ms^+/Ms^- تعیین ترادف گردید. برای این منظور محصول PCR این ژن‌ها به همراه آغازگر اختصاصی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. برای اطمینان از صحت توالی‌های به‌دست‌آمده از هر نمونه، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی Blast با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. برای مقایسه فیلوژنتیکی جدایه‌های توالی‌یابی شده، هشت جدایه از *X. citri* subsp. *citri*، توالی جدایه‌هایی از *X. citri* pv. *vignicola*، *X. fuscans subsp. fuscans*، *X. campestris* pv. *vesicatoria*، *campestris* pv. *campestris*، *X. axonopodis* pv. *phaseoli*، *hortorum*، *X. oryzae* pv. *oryzae*، *X. oryzae* pv. *oryzicola*، *X. fragariae* از بانک ژن اخذ و گونه *Xylella fastidiosa* نیز به‌عنوان تاکسون خارج از گروه انتخاب گردید. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v.7.043b هم‌ردیف گردیدند. آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از Distance Method انجام گردید.

جدول ۱– آغازگرهای مورداستفاده در این مطالعه.

Table 1. Primers used in this study.

Primer name	Sequence	Fragment length	Annealing temperature	Reference
Xac01	CGCCATCCCCACCACCACCACGAC	581	60	Coletta-Filho *et al.*, 2006
Xac02	AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA			
M^+	GCTAGGTAGCGGGTCTTTCC	391	68	Yousefi-koupaei *et al.*, 2014
M^-	TCGAGCTCGATGACACCTTC			
Ms^+	CCGGGAACGGCAATTCCTCA	824	64	Yousefi-koupaei *et al.*, 2014
Ms^-	CAGCAGGCGATTGCCTGTCT			

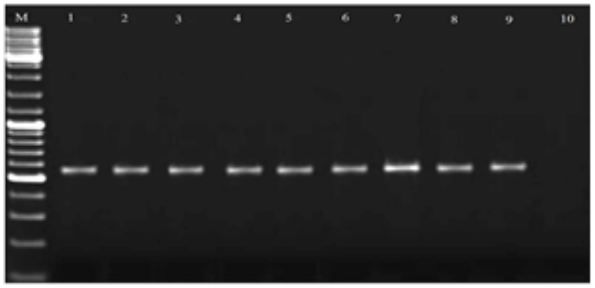
نتایج و بحث

از درختان مرکبات آلوده ۲۹ جدایه با پرگنه‌های زرد، گرد و لعاب‌دار روی محیط کشت NA جداسازی شد. همه‌ی این سویه‌ها گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، هوازی اجباری، لوان مثبت، تویین ۸۰ مثبت، هیدرولیز نشاسته مثبت، لستیناز منفی، هیدرولیز ژلاتین مثبت، آرژنین دهیدرولاز منفی، اوره‌آز منفی و اسکولین مثبت بودند. هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی نبودند. این سویه‌ها روی محیط کشت حاوی نمک طعام یک، دو و سه درصد رشد کردند، هم‌چنین روی محیط کشت YDC رنگ‌دانه‌ای زرد تولید کردند (Schaad *et al.*, 2001). هیچ رنگ‌دانه فلورسنتی توسط جدایه‌ها روی محیط کشت KB ایجاد نگردید. تمام جدایه‌ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت روی برگ‌های توتون بودند. این سویه‌های جداسازی شده و خالص‌سازی

www.SID.ir

Archive of SID

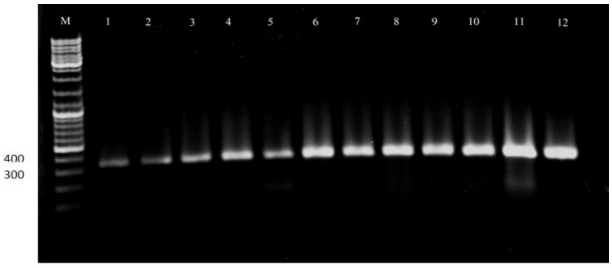
شده براساس خصوصیات فنوتیپی با گونه *Xanthomonas citri* subsp. *citri* مطابقت داشتند. در واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Xac01 و Xac02 قطعه‌ی قابل‌انتظار ۵۸۱ جفت بازی در تمام سویه‌های موردمطالعه تکثیر شد (شکل ۱). همچنین در ۲۹ جدایه شناسایی‌شده *X. citri* subsp. *citri* در PCR با جفت آغازگر M^+ و M^- قطعه ۳۹۱ جفت بازی تکثیر شد(شکل ۲). اکثر سویه‌های جداشده از مرکبات در استان کهگیلویه و بویراحمد تحت عنوان پاتوتیپ A شناسایی شدند. هم‌چنین در واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Ms^+ و Ms^- قطعه‌ی قابل‌انتظار ۸۲٤ جفت بازی فقط در ۹ جدایه S14 ، S6، M12، M15، A8، M16، S24، M18 و B8 تکثیر شد (شکل ۳) که این جدایه‌ها به‌عنوان پاتوتیپ A^* شناسایی شدند. این جفت آغازگر برای تمایز پاتوتیپ A^* از پاتوتیپ A طراحی‌شده بود (Yousefi-koupaei *et al.*, 2014). تمامی جدایه‌های اخیرعلائم بیماری در لیموترش ایجاد کردند. درخت فیلوژنی ترسیم‌شده با روش Neighbour-Joining (NJ) به‌دست‌آمده براساس توالی‌یابی قطعه تکثیری با آغازگر Ms^+/Ms^- نشان داد که شش سویه جداشده از استان کهگیلویه و بویراحمد به همراه سویه‌های پاتوتیپ A^w با میزان شباهت بالای ۹۹ درصد در یک گروه مجزا قرار می‌گیرند.



شکل ۱– الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های *Xanthomonas citri* subsp. *citr1i* تکثیر شده با آغازگرهای Xac01 و Xac02.

M: مارکر مولکولی، ۱: M11، ۲: A7، ۳: S4، ٤: B23، ٥: C20، ٦: M17، ۷: B17، ۸: S14، ۹: S6، ۱۰: کنترل منفی.

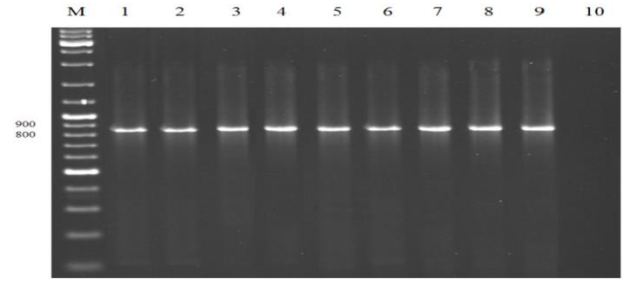
Fig. 1. Electrophoresis of PCR-products from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolates with primers Xac01 and Xac02.
M: Molecular marker; 1, M11; 2, A7; 3, S4; 4, B23; 5, C20; 6, M17; 7, B17; 8, S14; 9, S6; 10, Negative control.



شکل ۲– الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های *Xanthomonas citri* subsp. *citri* تکثیر شده با آغازگرهای M^+ / M

M: مارکر مولکولی، ۱: S14، ۲: A7، ۳: S4، ٤: B23، ٥: A8، ٦: C20، ۷، LMG9322، ۱۲: B2، ۱۱: S6، ۱۰: M11، ۹: M17، ۸: B17

Fig 2. Electrophoresis of PCR-products from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolates with primers M^+ / M.
M: Molecular marker; 1, S14; 2, A7; 3, S4; 4, B23; 5, A8; 6, C20; 7, B17; 8, M 17; 9, M1; 10, S6; 11, B2; 12, LMG9322.



شکل ۳– الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های *Xanthomonas citri* subsp. *citri* تکثیر شده با آغازگرهای Ms^- / Ms^+

M: مارکر مولکولی، ۱: S14، ۲: S6، ۳: M12، ٤: M15، ٥: A8، ٦: M16، ۷: S24، ۸: M18، ۹: B8، ۱۰: LMG9322

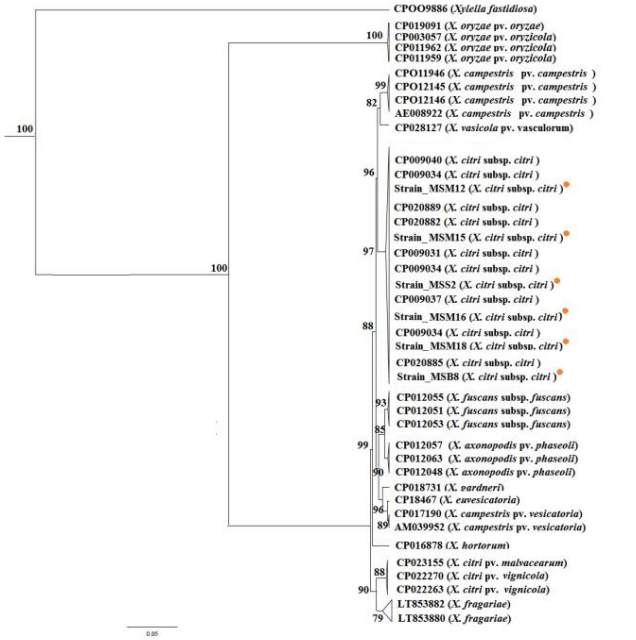
Fig. 3. Electrophoresis of PCR-products from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolates with primers Ms^+ / Ms^-.
M: Molecular marker; 1, S14; 2, S6; 3, M12; 4, M15; 5, A8; 6, M16; 7, S24; 8, M18; 9, B8; 10, LMG9322.

براساس نتایج به‌دست‌آمده هیچ پاتوتیپ A^* موجود در بانک ژن تشابه ترادفی با سویه‌های موردبررسی در این تحقیق را نشان ندادند. براساس نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف جنس *Xanthomonas* از قبیل *X. campestris*، *X. axonopodis* و *X. oryzae* در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند. سویه باکتری *X. citri* pv. *vignicola* که عامل ایجاد سوختگی در گندم می‌باشد، در گروه مجزایی نسبت به سویه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

X. citri subsp. *citri* عامل شانکر مرکبات قرار گرفت (شکل ٤). نتایج حاصل از این پژوهش وجود بیماری شانکر مرکبات در باغ‌های مرکبات بررسی‌شده در استان کهگیلویه و بویراحمد را تأیید کرد. برای حصول اطمینان از تشخیص صحیح پاتوتیپ و همچنین مقایسه سویه‌های جداشده از مرکبات استان کهگیلویه و بویراحمد با سویه‌های دنیا، توالی‌یابی ژن تکثیرشده با آغازگر Ms^{+}/Ms^{-} انجام گرفت. پس از توالی‌یابی ژنی قطعه تکثیرشده و رسم درخت فیلوژنی، سویه‌های استان کهگیلویه و بویراحمد با سویه‌های پاتوتیپ A^{w} در یک گروه قرار گرفتند. طی پژوهشی که توسط یوسفی کوپایی و همکارن (Yousefi-koupaei *et al*., 2014) انجام شد از این آغازگر و قطعه تکثیرشده به‌منظور تفکیک پاتوتیپ A و A^{*} استفاده شده است. به نظر می‌رسد که این آغازگر اختصاصی نبوده و به‌منظور تفکیک پاتوتیپ A^{w} از A هم می‌توان آن را به‌کار برد. همچنین پاتوتیپ A را می‌توان در گروه جدایی از پاتوتیپ‌های A^{*} و A^{w} در نظر گرفت و ازآنجایی‌که پاتوتیپ A^{*} و A^{w} شباهت ژنی زیادی با یکدیگر دارند (Zhang *et al*., 2015) این احتمال وجود دارد که قطعه ۸۲٤ جفت‌بازی تکثیرشده، نمی‌تواند مختص پاتوتیپ A^{*} باشد و امکان تکثیر آن در پاتوتیپ A^{w} نیز وجود دارد. همچنین این احتمال وجود دارد که به دلیل تشابه بسیار زیاد پاتوتیپ A^{*} و A^{w} سویه‌هایی از پاتوتیپ A^{w} در مناطق دیگر ایران وجود داشته و به‌عنوان پاتوتیپ A^{*} معرفی‌شده باشند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از توالی‌یابی ژنی و علائم ایجادشده در آزمون بیماری‌زایی، سویه‌های جداسازی شده از استان کهگیلویه و بویراحمد همراه با سویه‌های پاتوتیپ A^{w} در یک گروه دسته‌بندی شدند. در رابطه با ردیابی و تنوع ژنتیکی باکتری *X. citri* subsp. *citri* در ایران، بررسی دقیق پاتوتیپ این بیمارگر بسیار کم انجام‌شده و عامل شانکر مرکبات در ایران تاکنون به‌عنوان سویه A و A^{*} معرفی‌شده است (Rezaei *et al*., 2012). به نظر می‌رسد شناسایی دقیق پاتوتیپ‌های موجود در ایران نیازمند بررسی گسترده‌تری است. حضور پاتوتیپ A در استان قطعی است. تاکنون پاتوتیپ A^{w} از ایران گزارش نشده است ولی با توجه به مطالعات فیلوژنی اعلام‌شده است که احتمال حضور این پاتوتیپ در ایران وجود دارد (Pruvost *et al*., 2015).



شکل ٤- شجره فیلوزنی ترسیم شده براساس ژن هیستیدین کینیاز از شش سویه *Xanthomonas citri* subsp. *citri* جدا شده از استان کهگیلویه و بویراحمد (ستاره‌های نارنجی رنگ) و سایر جدایه‌ها به روش اتصال مجاور (Neighbour-Joining). محاسبه bootstrap با تعداد ۱۰۰۰ تکرار انجام و گونه *Xylella fastidiosa* به عنوان مدل خارج گروه(Outgroup) در نظر گرفته شده است.

Fig. 4. Neighbor-Joining phylogenetic tree using Histidine kinase gene sequence of six *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains isolated from Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province (orange stars) and other GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and *Xylella fastidiosa* was used as outgroup.

در مطالعه حاضر نیز برخی از سویه‌های استان کهگیلویه و بویراحمد تشابه بسیار بالایی با سویه‌های پاتوتیپ A^{w} نشان دادند. بااین‌وجود تشخیص دقیق پاتوتیپ نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. با توجه به راه‌های انتقال و شیوع این بیماری که انتقال نهال آلوده ازجمله آن‌ها می‌باشد، احتمالاً بیماری از

www.SID.ir

Archive of SID

مناطق و استان‌های مجاور وارد این استان شده و پاتوتیپ‌های مختلف بیمارگر در استان خسارت وارد می‌کنند. از اینرو لازم است چگونگی ورود بیماری به این استان به‌صورت دقیق بررسی شود تا خاستگاه جغرافیایی دقیق عامل بیماری مشخص شده و با شناسایی صحیح آن، راهکارهای مناسبی برای مقابله با این بیماری در این منطقه صورت گیرد.

References

ALIZADEH, A. and H. RAHIMIAN, 1990. Citrus canker in Kerman province. Iranian Journal of Plant Pathology, 26: 42. (in Persian with English summary).

GOTTWALD, T. R., G. HUGHES, J. H. GRAHAM, X. SUN and T. RILEY, 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. Phytopathology, 91: 30-34.

GRAHAM, J. H., T. R. GOTTWALD, E. L. CIVEROLO and R. G. MCGUIRE, 1989. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. Plant Disease 73: 423-427.

LIN, H. C., H. CHANG and K. C. TZENG, 2008. Characterization of novel strains of citrus canker Bacterium from citrus in Taiwan. Journal of Taiwan Agriculture Research, 57(4): 265-278.

MOHAMMADI, M., M. R. MIRZAEE and H. RAHIMIAN, 2001. Physiological and biochemical characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the casual agent of citrus bacterial canker disease. Journal of Phytopathology, 149(2): 65–75.

PRUVOST, O., T. GOODARZI, I. K. BOYER, H. SOLTANINEJAD, A. ESCALON, S. M. ALAVI, S. JAVEGNY, C. BOYER, B. COTTYN, L. GAGNEVIN and C. VERNIERE, 2015. Genetic structure analysis of strains causing citrus canker in Iran reveals the presence of two different lineages of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A*. Plant Pathology, 64(4): 776-784.

REZAEI, M. K., M. SHAMS-BAKHSH and A. ALIZADEH, 2012. Genetic diversity among *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in Iran. Journal of Plant Protection Research, 52: 1-9.

SCHAAD, N. W., J. B. JONES and W. CHUN, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phtopathological Society, Minnesota. 373 p.

SUN, X., R. E. STALL, J. B. JONES, J. CUBERO, T. R. GOTTWALD, J. H. GRAHAM, W. N. DIXON, T. S. SCHUBERT, P. H. CHALOUX, V. K. STROMBERG, Lacy G. H. and B. D. SUTTON, 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/ Mexican lime and ale mow in South Florida. Plant Diseases, 88(11): 1179-1188.

YOUSEFI-KOUPAEI, F., S. M. TAGHAVI, H. SHIOTANI and S. TSUYUMU, 2014. A PCR-based assay for differentiating A- and A*-type strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the causal agent of Asiatic citrus canker. Journal General Plant Pathology, 80: 85-89.

ZHANG, Y., N. JALAN, X. ZHOU, E. GOSS, J. B. JONES and J. C. SETUBAL, 2015. Positive selection is the main driving force for evolution of citrus canker-causing *Xanthomonas*. Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 9(10): 2128-2138.

www.SID.ir