DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijcr.2016.106776

مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد سوم، شماره دوم، ۱۳۹۴
۱-۱۴
www.jcri.ir

بازیابی و بیماریزایی باکتری *Xanthamonas citri* subsp. *malvacearum* از برگ‌های آلوده نه ساله پنبه و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها

محمدرضی نتاج [۱] و *غلام خداکرمیان [۲]
[۱]عضو هیات‌علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان
[۲]استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۱۰

چکیده

بیماری بلایت باکتریایی پنبه با عامل *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* از بیماری‌های مهم و قرنطینه‌ای پنبه در ایران است که در سال ۱۳۸۴ در مزارع پنبه استان گلستان بروز کرد. نمونه‌هائی از برگ‌های آلوده در این سال جمع آوری و در دمای اتاق نگهداری شد. در سال ۱۳۹۳ قسمت‌هائی از برگ‌های آلوده پس از شستشو با آب لوله شهری، در چند قطره آب مقطر استریل قرار داده و به مدت چند ساعت در شرایط اتاق نگهداری شد. سوسپانسیون فوق در روی محیط آگار غذائی مخطط گردید. پس از ۴۸-۷۲ ساعت کلنی باکتری‌های زرد رنگ، مدور و ۱ میلی‌متر جداسازی گردید که در آزمون‌های گرم، اکسیداز و رشد در محیط بی هوازی منفی بودند. کلیه جدایه‌ها هوازی اجباری و قادر به هیدرولیز نشاسته بودند. جدایه‌ها از گلوکز، اینولین، اورات، مالونات، لاکتات و تریپتون استفاده کرده ولی قادر به استفاده از ترهالوز، ال-رامنوز، دی-رافینوز، فوکوز، مالتوز، ال-تارتارات، دی-گالاکتورونات، استات، نیکوتینات، گلایسین، کازئین، دالسیتول، ال- ترئونین و آدونیتول نبودند. در استفاده از آرابینوز، دی-فروکتوز، دی-زایلوز، ملزیتوز، ملی بیوز، گوانین، ال- سیستئین، ال- تریپتوفان، ال- هیستیدین، بتائین، بتا-آلانین، ال-والین، دی- سوربیتول، سیترات و ال-مالئات متغیر بودند. با تزریق باکتری به اپیدرم برگ رقم گلستان پس از ۳ روز علائم آبسوختگی مشاهده شد که در ادامه گسترش یافته و بلایت رگبرگ‌های اصلی و فرعی نیز مشاهده گردید. بنابراین لزوم توجه به نقش بقایای گیاهی آلوده در بروز و گسترش این بیماری از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

*نویسنده مسئول: khodakaramian@yahoo.com

واژه‌های کلیدی: پنبه، بلایت باکتریایی، بقا و *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

مقدمه

بلایت باکتریایی پنبه یکی از مهم ترین عوامل خسارت زای پنبه می‌باشد که تقریباً در اکثر مناطق پنبه خیز دنیا از جمله در کشورهای هند، پاکستان، چین، استرالیا، مصر، سودان، تاجیکستان، ترکمنستان، آذربایجان و ازبکستانوجود دارد و در فصولی که شرایط محیطی برای گسترش این بیماری مناسب باشد کاهش عملکرد شدیدی را سبب می‌شود (Hilocks, 1992وBrinkerhof, 1970). این بیماری از بیماری‌های قرنطینه‌ای ایران بوده که هر از چند گاهی در نقطه‌ای از کشور بروز می‌کند.

عامل بیماری باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*، یک باکتری بذرزاد است (Bradbury, 1986).منبع آلودگی به بیماری معمولاً از بذر و بقایای گیاهی تأمین می‌شود و گیاهان آلوده به‌عنوان کانون‌های ثانویه بیماری بشمار می‌روند(Hirano and Upper, 1983).عامل بیماری قادر است در تمام مراحل رشد گیاه و به همه قسمت‌های هوائی بوته حمله نماید و علائم متفاوتی شامل بلایت گیاهچه، سیاه شدن ساقه، لکه زاویه ای برگ و پوسیدگی قوزه را ایجاد می نماید (Srinivasan, 1994).

در غیاب پنبه آلوده عامل بیماری در خاک، توان بقا کمی دارد. اصلی‌ترین مایه اولیه آلودگی از بذرهای آلوده و بقایای گیاهی تامین می‌شود. مایه آلودگی توسط باد، باران، آبیاری بارانی و آب آبیاری از گیاه آلوده به گیاهان سالم دیگر انتقال می یابد. بیمارگر، قادر است در بذر و بقایای خشک شده گیاه زمستان گذرانی کرده و با کاشت پنبه و در صورت مساعد بودن شرایط بیماری، آلودگی ایجاد می‌شود (Srinivasan, 1994).

میزبان‌های اصلی بیمارگر گیاهان متعلق به جنس *Gossypium* هستند. دیپلوئیدهای حساس گونه‌های زراعی *G.arboreum*و *G. herbaceum*و گونه‌های وحشی *G. thurberi*، *G.harknessii*و *G. stocksii*گزارش شده‌اند. ارقام تتراپلوئید زراعی *G. hirsutum*و*G. barbadense*و رقم وحشی *G. tomentosum* از میزبان‌های باکتری گزراش شده‌اند.

درآزیزونا و مکزیک گیاه *Thurberia thespeioides*، در مکزیک گیاه *Eriodendron anfractusum*(*Ceiba pentandra*)، در هند *Lochnera pusilla*و گیاهان دیگر از خانواده پنیرکیان مانند *Thespesia populnea*و*T. lambas*، *Hibiscus vitifolius*به عنوان میزبان‌های جانبی عامل بیماری سوختگی باکتریایی پنبه گزارش شده اند (Holt *et al.,* 1994; Srinivasan, 1994; Bradbury, 1986). همچنین در هند توانستند با موفقیت گیاه *Jatropha curcas*را تلقیح کنند و باکتری قادر به آلوده سازی لوبیا *Phaseolus vulgaris*بود (Srinivasan, 1994).

عامل بیماری در خاک در غیاب پنبه آلوده توان بقا کمی دارد. اصلی ترین مایه اولیه آلودگی از بذرهای آلوده و بقایای گیاهی تامین می‌شود.در طول رشد بذر در خاک باکتری‌های موجود در بذر سبب آلوده کردن کوتیلدون‌ها شده و سبب ایجاد لکه‌های سبز روشن تا قهوه‌ای مایل به سیاه در کوتیلدون‌ها و برگ‌های اولیه و همچنین در صورت مساعد بوده شرایط محیطی برای شیوع بیماری سبب سوختگی گیاهچه پنبه می‌شود (Srinivasan, 1994).

اگرگیاهچه آلوده دوام بیاورد آلودگی ثانویه در دیگر گیاهان و در مراحل مختلف ایجاد خواهد شد. مایه آلودگی توسط باد و باران و آب از گیاه آلوده به گیاهان سالم دیگر انتقال می‌یابد و سبب ایجاد آلودگی‌های بعدی می‌شود.پاتوژن در برگ‌ها از راه روزنه‌ها وارد برگ شده بنابراین آلودگی زمانی اتفاق می افتد که روزنه‌ها باز باشند. شواهدی هم وجود دارد که نشان می‌دهد باکتری توانائی رخنه مستقیم به داخل برگ را دارد و این زمانی اتفاق می افتد که میزان مایه آلودگی زیاد و فعالیت آنزیمی زیاد باشد. باکتری در بافت پارنشیم بین برگ فعالیت کرده و با تولید پکتیناز سبب تخریب بافت میزبان می شوند. عامل بیماری بندرت وارد بافت آوندی می شود و سبب ایجاد لکه‌های گوشه دار می شود. باکتری عامل بیماری توسط قطرات آب، باد و باران به تمام قسمت‌های هوائی گیاه پخش شده و سبب آلودگی اندام‌ها می شود. آلوده شدن قوزه در اکثر موارد سبب آلوده شدن کرک‌های روی بذر، الیاف و سطح بذر شده و گاهی آلودگی داخلی بذر (Internal infection) اتفاق می افتد که در نتیجه باکتری توسط بذر به مناطق دیگر انتقال یافته و به عنوان کانون آلودگی در آینده بروز خواهد کرد. پاتوژن قادر است در بذر و بقایای خشک شده گیاه زمستان گذرانی کرده و با کاشت پنبه و در صورت مساعد بودن شرایط بیماری، آلودگی ایجاد خواهد شد (Srinivasan, 1994).

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی باکتری: نمونه‌ها، ابتدا با آب لوله شهری شسته و سپس با هیپوکلریت سدیم (محلول ۱ درصد تجاری) به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی شدند. با چاقوی سترون از حد فاصل بافت آلوده و سالم، قطعاتی به ابعاد چند میلی‌متر برداشته و درون چند میلی‌لیتر آب مقطر سترون انتقال داده شدند. بعد از له نمودن قطعات گیاهی درون آب مقطر سترون، این سوسپانسیون در دمای اطاق نگهداری شد. یک لوپ از سوسپانسیون فوق در محیط آگار غذائی (Nutrient Agar) مخطط گردید (Fahy and Persley, 1983). تشتک‌ها ۲-۴ روز در دمای ۲۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تک پرگنه‌های ظاهر شده روی محیط آگار غذائی به‌صورت نقطه‌ای کشت شده و پس از اطمینان از خلوص پرگنه‌ها، آزمایشات استاندارد جهت تشخیص باکتری و آزمون‌های بیماری‌زائی انجام شدند (Schaad*et al.*, 2001).

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها: تولید رنگدانه فلورسنت روی محیطKing-B(King *et al.,* 1954)،آزمون گرم بر اساس روش ساسلو و همکاران (۱۹۸۲) و شاد (۲۰۰۱)، آزمون‌های تولید لوان، اکسیداز، لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، آرژنین دهیدرولاز و تولید فوق حساسیت در توتون مطابق روش لیلیوت و همکاران (۱۹۶۶) و کلمنت و همکاران (۱۹۶۴)، کاتالاز، هیدرولیز نشاسته، رشد هوازی و بی هوازی، رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد و هیدرولیز ژلاتین بر اساس روش فهی و پرسلی (۱۹۸۳) انجام شد. آزمون‌های احیای نیترات، هیدرولیز توئین ۸۰، تحمل به نمک طعام و استفاده از قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه و الکل‌ها بر اساس روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. سایر آزمون‌ها نیز بر اساس روش‌های استاندارد باکتری شناسی به روش فهی و پرسلی (۱۹۸۳) و شاد و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد.

اثبات بیماریزائی: برای انجام آزمون اثبات بیماریزائی با تهیه سوسپانسیونی به رقت تقریبی10^6cfuاز باکتری، به اپیدرم گیاه میزبان تزریق شد. گیاهان فوق در داخل گلخانه و در شرایط مطلوب دمائی و رطوبتی قرار گرفتند (Srinivasan, 1994).

نتایج و بحث

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها: جدایه‌های باکتری عامل بیماری به رنگ زرد تا نارنجی، اندازه آنها ۱-۲ میلی‌متر، گردو صاف بودند. همگیگرم و اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و قادر به رشد در محیط هوازی بوده در حالی که در محیط بی هوازی قادر به رشد نبودند.

بیماری زائی: به منظور اثبات بیماریزائی جدایه‌های باکتری، سوسپانسیون جدایه‌های فوق به کوتیلدون و اپیدرم برگ پنبه تزریق شد. ۴ روز پس از تزریق، علائم اولیه بیماری به صورت لکه‌های آب سوخته ظاهر شده و در ادامه به صورت لکه‌های زاویه ای شکل و بلایت رگبرگهای اصلی و فرعی نمایان گردید.

شکل ۱- بروز آبسوختگی پس از تلقیح سوسپانسیون باکتری در اپیدرم برگ

شکل ۲- پیدایش لکه‌های زاویه ای با گسترش علائم بیماری

جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* جدا شده از برگ آلوده پنبه

آزمونها / شماره ایزوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
واکنش گرم (Gram reaction)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
فلورسنت روی KingB (Flourescent on KB medium)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
رشد هوازی (Oxidative metabolism)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد بی هوازی (Fermentative metabolism)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
تولید لوان (Levan production)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
اکسیداز (Oxidase)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی (Soft rot on potato)	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	+	+
فوق حساسیت (Hypersensitive reaction)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
کاتالاز (Catalase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته (Starch hydrolysis)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز توئین ۸۰ (Tween 80 hydrolisis)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین (Gelatin hydrolysis)	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–
رشد در نمک طعام ۵٪ (Growth in 5% NaCl)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
احیای نیترات (Nitrate reduction)	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در ۳۷ درجه سانتی گراد (Growth in 37ºC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

جدول ۲- خصوصیات بیوشیمیائی باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* جدا شده از برگ آلوده پنبه

آزمونها / شماره ایزوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
استفاده از (Carbohydrate source utilization):												
سوکروز (Sucrose)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
دی- گالاکتوز (D-Galactose)	–	–	–	–	–	–	-	–	–	–	–	–
دی- گلوکز (D-Glucose)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مالتوز (Maltose)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
دی- مانوز (D-Mannose)	–	–	–	–	–	–	-	–	–	–	–	–
سلوبیوز (Cellobiose)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ال- ترئونین (L-Thereonin)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ارابینوز (Arabinose)	+	+	+	–	–	–	+	+	+	–	–	+
دی-فروکتوز (D-Fructose)	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ترهالوز (Trehalose)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
دی-زایلوز (D-Xylose)	–	–	–	+	–	–	+	+	–	+	–	–

ال-رامنوز (L-Rhamnose)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
دی-رافینوز (D-Raffinose)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
فوکوز (Fucose)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ملزیتوز (Melezitose)	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
ملی بیوز (Melibiose)	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
کازئین (Casein)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
اینولین (Inulin)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تریپتون (Tripton)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
بتائین (Betaine)	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ال- سیستئین (L-Cycteine)	–	+	–	+	+	+	–	–	+	–	–	+
گلیسین (Glysine)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ال- تریپتوفان (L-Tryptophan)	+	+	+	–	–	–	+	+	+	–	–	+
ال- هیستیدین (L-Histidine)	–	–	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–
ال-ترئونین (L-Threonine)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ال-والین (L-Valine)	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–
بتا-آلانین (β-Alanine)	–	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–
گوانین (Guanine)	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
دی- سوربیتول (D-Sorbitol)	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
مزو-اینوزیتول(Meso-Inositol)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
آدونیتول (Adonitol)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
دالسیتول (Dulcitol)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
لاکتات (Lactate)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استات (Acetate)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
اورات (Urate)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مالونات (Malonate)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ال-تارتارات (L-Tartrate)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
سیترات (Citrate)	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
دی- گالاکتورونات (D-Galactoronate)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ال- مالات (L-Maleate)	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+
نیکوتینات (Nicotinate)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
مالونات (Malonate)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

به‌طور طبیعی درصد بذور آلوده به این باکتری بسیار کم است، اما همین درصد کم بذور آلوده برای بروز اپیدمی شدید بیماری در شرایط مطلوب کافی است (Brinkerhoff and Hunter, 1963).این باکتری مانند دیگر زانتوموناده‌ها نسبت به خشکی و حرارت بالا حساس بوده و به سرعت از بین می رود (Mehta, 1990).

باکتری‌ها داری ساز وکارهایی هستند که به واسطه آنها می توانند به سطوح و به یکدیگر متصل شوند. بیوفیلم می تواند از یک یا چند گونه میکروبی تشکیل شود. قادرند روی بسیاری از سطوح جاندار و بی جان مانند مواد معدنی، فلزات، سطوح جانوری و گیاهی، ریه روده و انواع ایمپلنت‌های پزشکی تشکیل گردند (O'Toole *et al.*, 2000). تشکیل بیوفیلم راهی برای حفظ توده زنده سلولی در محلی خاص و برای دوره معین برای آغاز تعاملات بهتر با محیط است. زندگی در بیوفیلم مزایای متعددی دارد. بیوفیلم‌ها برای بقای باکتری در روی گیاه و کلنیزاسیون قسمت‌های مختلف گیاه و نیز بقای بیمارگر در خارج از میزبان نقش دارند. همچنین بیوفیلم موجب افزایش مقاومت در برابر برخی تنش‌های محیطی و تحمل مواد ضد میکربی، حفاظت از شکار شدن در برابر آغازیان تک سلولی یا دستیابی به انتقال ژن افقی می‌شوند. افزایش مقاومت در برابر اشعه ماورا بنفش، قابلیت تجیه کنندگی زیستی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه را نیز گسترش می دهند. تراکم زیاد جمعیت باکتری، فرصتی را برای انجام برخی فرآیندها فراهم می کند که سلولهای منفرد نمی توانند به طور موثر انجام دهند (Jahid and Ha, 2012).

کنترل بلایت باکتریائی به مشکل بحث برانگیزی به علت آلودگی سیستمیک آن تبدیل شده است و اصلاح و تولید ارقام مقاوم نیز نتوانسته رضایت بخش باشد (Islam *et al.*, 2003). بیمارگر قادر است در اندام‌های تازه گیاه به‌مدت ۵-۶ ماه دوام آورد. گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد بیمارگر قادر بوده به‌مدت ۱۷ سال در اندام‌های خشک گیاه دوام بیاورد. ولی اگر اندام‌های گیاه آلوده در خاک مرطوب دفن شوند، حداکثر به مدت یک ماه دوام خواهد آورد. گیاهان آلوده‌ای نیز که بصورت خودرو و از بذرهای سال قبل مزرعه زودتر از گیاهان اصلی سبز می‌شوند، منبع آلودگی در مزرعه هستند (Srinivasan, 1994). در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بیمارگر از بین می رود ولی اگر بیمارگر همراه بذر یا بقایای گیاهی باشد، در هوای گرم و مرطوب، دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت یک ساعت و در هوای خشک تا ۵ ساعت دوام می‌آورد (Srinivasan, 1994). با توجه به جداسازی و بیماریزائی جدایه‌های باکتری از بافت‌های آلوده پس از ۹ سال، توجه به قرنطینه گیاهی و دقت در جابجائی نمونه‌های گیاهی از اهمیت بسزائی برخوردار می‌شود.

منابع

1. Bradbury, J.F. 1986. Guide to Plant Pathpgenic Bateria. C.A.B. International Mycologocal Institue, Ferrylane, Kew, Surrey, England. 332 pp.
2. Brinkerhoff, L. A. 1970. Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its relation to control. Ann. Rev. Phytopathol. 8:85-110.
3. Brinkerhoff, L. A. and Hunter, R. E. 1963. Internally infected seed as a source of inoculum for the primary cucle of bacterial blight of cotton. Phytopathlogy, 53: 1397-1401.
4. Fahy, P.C. and Persley, G.J. 1983. Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide. Academic Press. Sydney. 393 pp.
5. Hilocks, R.J. 1992. Cotton Diseases. C.A.B. International. 415pp.
6. Hirano, S.S. and Upper, C.D. 1983. Ecology and Epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Annual Review of phytopathology, 21.243-69.
7. Holts, J.H., Krieg, N.R. Sneath, P. H.A., Stley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. The Williams & Wikins Co., Baltimore, MD. USA. 1: 787 pp.
8. Islam, Z., Khalequzzaman, K.M., Rahman, G.M.M., Tahasinul, M.I. and hossain, M. 2003. Effect of chemicals in controlling bacterial blight of cotton. Asian J. Plant Sci. 2:569-543.
9. Jahid, I.K. and Ha, S.D. A review of microbial biofilms of produce: Future challenge to food safety. Food Science and Biotech. 21:299-316.
10. King, E.D., Ward, M.K. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clinic. Medic. 44:301-307.
11. Klement, Z., Farkas, G.L. and Loverkovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogeic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54:474-477.
12. Lelliot, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas. J. Appl. Bacteriol. 29:470-489.
13. Mehta, Y.R. 1990. Management of *Xanthomonas campestris*pv. *undulosa* through cereal seed testing. Seed Science and Technol. 18: 467-476.
14. O,Too;e, G. Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54:49-79.
15. Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (eds). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3nd edition. Aps Press. St. Minnesots, USA. 373pp.
16. Srinivasan, K.V. 1994. Cotton Diseases. CIRCOT Press. 314pp.
17. Suslow, T.V., Schroth, M.N. and Isaka, M. 1982. Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917-918.

Iranian Journal of Cotton Researches
Vol. 3, No. 2, 2015
www.jcri.ir

Relief and Pathogenicity of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* from infected cotton leaves after 9 years and investigation of biochemical characteristics of isolates

***M. Razinataj[1] and G.Khodakaramian[2]**
[1]Cotton Research Institute, Gorgan, Iran.
[2]College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Abstract

Cotton bacterial blight is a important and quarantine diseases of cotton in Iran that appeared in cotton fields of Golestan province in 2005. Samples of infected leaves collected and served in room temperature. In 2014, sections from infected leaves washd with tap water, then were placed in a few drop sterile distilled water in room temperature for five hours. The suspension streaked on NA medium. After 48-72 hours isolated bacteria colonies yellow, circle and 1 mm diameter. The bacteria were negative in gram, oxidase and fermentative growth tests. All of isolates were positive oxidative growth and starch hydrolysis. The isolates used from glucose, inulin, urate, malonate, lactate and tripton but did not used from trehalose, L-rhamnose, D-raffinose, fucose, maltose, L.tartrate, D-galacturonate, acetate, nicotinate, glycine, casein, dulcitol, L-threonine, and adonitol. Isolates were variable in utilization of arabinose, D-fructose, D-xylose, melezitose, melibiose, guanine, L-cysteine, L-tryptophan, L-histidine, betaine, β-alanine, L-valine, D-sorbitol, citrate and L-maleate. In Pathogenicity test, bacterial suspension injected with sterile syringe into epidermis leaf of Golestan cotton cultivar. The water-soaked spots observed after 3 days that extended and revealed vein blight. The importance oftherole ofinfectedplant debrisin theincidence andspread of the diseaseisofparticular importance.

Keywords:

*Corresponding author; mrazinataj@yahoo.com