آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۳، شماره ۱، شهریور ۱۳۹٤

تعیین ویژگی‌های جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، عامل بیماری بلایت باکتریایی گندم در استان کرمان و ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های ایرانی گندم نسبت به آن

نرگس فلاحی چرخابی[۱]، مسعود شمس‌بخش[۱]✉، حشمت اله رحیمیان[۲]، پژمان خدایگان[۳] و محمدحسن رستگار[۱]
۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس؛ ۲- گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ ۳- گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان
(تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۳؛ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹٤)

چکیده

گندم نان مهم‌ترین گیاه زراعی دنیاست و عملکرد آن تحت تأثیر بیماری‌های متعددی از جمله بلایت برگی باکتریایی (Bacterial leaf blight, BLB) ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) قرار می‌گیرد. مناسب‌ترین روش مدیریت این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های گندم مقاوم به این بیماری، از بوته‌های گندم و جو دارای علائم مشخص بیماری بلایت در استان کرمان نمونه‌برداری و سویه‌های باکتری جداسازی شد. ویژگی‌های فنوتیپی و بیماری‌زایی جدایه‌ها تعیین و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *syrB* عامل تولید سیرینگومایسین و تعیین توالی ناحیه 16S rDNA، ITS و ژن‌های *gyrB*، *rpoD* و *hrpL* ویژگی‌های ژنوتیپی جدایه‌ها بررسی شد. بر این اساس دو جدایه *Pss* انتخاب و واکنش ۹۹ ژنوتیپ بومی بهاره و پاییزه گندم نان و دوروم (*Triticum durum*) نسبت به این جدایه‌ها بررسی شدند. واکنش برگ‌های مایه‌زنی‌شده با سوسپانسیون باکتری هفت تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی یادداشت‌برداری شد. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی و در سه تکرار آزمایش و هر تکرار شامل پنج بوته انجام شد. نتایج این پژوهش نشان‌داد که از میان ژنوتیپ‌های بررسی‌شده، رقم امید به بیمارگر *Pss* مقاوم است. از این ژنوتیپ گندم می‌توان برای اصلاح ارقام مقاوم گندم به بیماری بلایت برگی باکتریایی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ایران، بلایت برگ گندم، مقاومت.

Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of bacterial blight of wheat in Kerman province and evaluation of the reaction of Iranian wheat genotypes to it

N. FALAHI CHARKHABI[1], M. SHAMS-BAKHSH[1]✉, H. RAHIMIAN[2], P. KHODAYGAN[3] and M. H. RASTEGAR[1]
1- Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; 2- Department of Plant Protection, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran; 3- Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr university of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

Abstract

Wheat (*Triticum aestivum*) is the most important food crop in the world, but its yield is adversely affected due to plant pathogens particularly bacterial leaf blight (BLB) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). The management method presently in practice is insufficient to meet current safety and/or efficacy standards. Therefore, use of resistant genotypes is the best approach to manage BLB. The present study was undertaken to identify possible sources of resistance to *Pss* in cultivars and germplasms of wheat available. Two strains of *Pss* were isolated from symptomatic leaves of wheat and barley in Kerman province. The isolates were identified as *Pss* on the basis of physiological and biochemical characters, using specific primers and sequencing of 16S rRNA, ITS, and *gyrB, rpoD, hrpL* genes. *Pss* strains produced necrotic streaks on the susceptible wheat cv. Golestan. These strains were used for inoculation of 99 winter and spring wheat and durum (*Triticum durum*) genotypes to identify possible sources of resistance to BLB. The reaction of infiltrated seedlings fourth leaves infiltrated with bacterial suspension was scored seven to ten days after inoculation. Accessions were arranged in a randomized complete block design and three replications and five plants in each replicate were used. Among all the genotypes evaluated, only cv. Omid was found to be resistant to BLB. This wheat genotype can potentially be used in breeding wheat cultivars for resistance to BLB.

Key words: Iran, leaf blight, Resistance.

✉ **Corresponding author:shamsbakhsh@modares.ac.ir**

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین گیاه زراعی دنیاست که غذای بیش از یک سوم مردم جهان را تشکیل می‌دهد. عملکرد گندم تحت تأثیر بیمارگرهای متعددی از جمله *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) قرار می‌گیرد (Young *et al*., 1978; Kietzell and Rudolph, 1977). گونه *P. syringae* یک باکتری گرم منفی از رده گاماپروتئوباکتری‌ها و خانواده Pseudomonadaceae و شامل بیش از ۵۰ پاتووار است که بر اساس دامنه میزبانی و بیماری‌زایی متمایز می‌شوند (Dye *et al*., 1980; Hirano and Upper, 2000). یکی از پاتوارهای مهم این گونه *Pss* است که می‌تواند ۱۸۰ گونه گیاهی را بیماری کند. این پاتووار عامل بسیاری از بیماری‌های مهم گیاهی شامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، نوار قرمز نیشکر، بلایت گندم و جو، لکه قهوه‌ای لوبیا، بلاست مرکبات و لکه باکتریایی سورگوم است (Gonzalez *et al*., 2003). علائم ایجادشده به وسیله *Pss* روی گندم و جو معمولاً شامل بلایت برگ (Sellam and Wilcoxson, 1976) یا بافت‌مردگی برگ (Otta, 1974) است. بیماری بلایت برگ یکی از بیماری‌های گندم است که در مواردی سبب خسارت شدید شده است، برای نمونه، در ایالت داکوتای جنوبی، اپیدمی بافت مردگی برگ در یک دوره هفت ساله مشاهده شد. در این اپیدمی مزارع با ۷۵ درصد یا بیشتر برگ‌های بافت مردگی معمول بود (Otta, 1974) و در آلمان سبب کاهش بیش از ۵۰ درصد محصول شده است (Toben *et al*., 1991). مایه‌زنی یک رقم حساس گندم با غلظت بالای سوسپانسیون باکتری در شرایط مطلوب برای گسترش بیماری سبب کاهش معنی‌دار ارتفاع بوته، بذر تولیدشده و توده گیاه در بیشتر اندام‌های اصلی، ساقه‌های ثانویه و کل بوته در رقم‌های Seri M82 و Rebaca F2000 شده است (Valencia-Botin, 2011). بیماری بلایت برگ گندم از کشورهای مختلفی از جمله آمریکا (Otta, 1977; Scharen *et al*., 1976; Sellam and Wilcoxson, 1976)، کانادا (Otta, 1977)، آرژانتین (Teyssandier and Sands, 1977)، آفریقای جنوبی (Smith and Hattingh, 1991)، ایتالیا (Varvaro, 1983) و آلمان (Toben *et al*., 1991) گزارش شده است. این بیماری در ایران نخستین بار در ۱۳۶۰ در استان کرمان مشاهده شد (Rahimian, 1989) و تا کنون از مزارع گندم استان‌های کهگیلویه و بویراحمد، فارس (Taghavi and Keshavarz, 2003)، سیستان و بلوچستان و گیلان (Niknejad Kazempour *et al*., 2010) نیز گزارش شده است. مؤثرترین روش مدیریت بیماری شناسایی و کشت ارقام مقاوم است. در بررسی مقاومت ارقام تجاری گندم به *Pss*، ارقام فلات، TR80، C 73-5 و اروند موتانت مصون و ارقام اروند، اترک، سرخ تخم، نیک‌نژاد، M-73-18 و Fr319 به عنوان رقم مقاوم گزارش شده‌اند (Taghavi and Keshavarz, 2003). در بررسی Sahragard (2000) مقاومت چند رقم گندم به *Pss* در مرحله سه برگی ارزیابی و مشخص شد که پس از چهل روز (مرحله به ساقه رفتن) در ارقام گندم روشن، امید، قدس و گاسپارت و ارقام جو علائم بیماری کاهش یافت و فقط لکه‌های بافت مرده کوچک باقی ماند. هدف از انجام پژوهش حاضر تشخیص عامل بیماری بلایت برگی باکتریایی گندم و جو در استان کرمان و ارزیابی واکنش ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی گندم نان و دوروم در برابر باکتری عامل بلایت برگی بود.

روش بررسی

جدایه‌های باکتری: در اسفند ماه سال ۱۳۹۰ از گیاهان گندم و جو با علائم لکه‌برگی و آبسوختگی که از مزارع اطراف شهرستان کرمان، ماهان و جوپار واقع در استان کرمان نمونه‌هایی تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. به منظور جداسازی باکتری عامل بیماری، بخشی از بافت آلوده در جریان ملایم آب شستشو و در یک میلی لیتر آب مقطر استریل خرد و برای ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. یک قطره از سوسپانسیون حاصل بر روی محیط کشت NAS (آبگوشت غذایی حاوی نیم درصد ساکارز) مخطط و برای سه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای خالص سازی،

تک‌پرگنه‌ها دوباره روی محیط کشت King's B مخطط شد (Schaad *et al*., 2001).

به منظور نگهداری کوتاه مدت، سوسپانسیون کدری از باکتری در آب مقطر سترون تهیه و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد (Lelliot and Stead, 1987) و برای نگهداری دراز مدت سوسپانسیون کدری از باکتری در ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون تهیه و به آن ۴۰۰ میکرولیتر گلیسرول اضافه شد و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. یک جدایه مرجع *Pss* به شماره IBSEF451 از کلکسیون کشت‌های برزیل IBSBF (Biological Institute Culture Collection of Phytopathogenic Bacteria) تهیه و برای مقایسه در آزمون‌ها استفاده‌شد.

تعیین ویژگی‌های جدایه‌ها:

آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها با آزمون‌های رایج مطابق روش‌های توصیه شده (Fahy and Hayward, 1983; Lelliott and Stead, 1987; Schaad *et al*., 2001) انجام شد. جدایه مرجع *Pss* (IBSEF451) به عنوان شاهد استفاده شد.

آنالیز اسیدهای چرب: چهار جدایه از باکتری‌های جداسازی شده ازگندم و جو که علائم واضح بیماری را نشان دادند، به همراه جدایه مرجع *P. s.* pv. *syringae*، انتخاب و روی محیط Trypticase Soy Agar، در دمای ۲۸ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت کشت شدند. برای تعیین نوع و میزان اسید چرب پنجاه میلی گرم از سلول‌های باکتری در یک میلی‌لیتر از محلول یک (۴۵ گرم NaOH، ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول و ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) سوسپانسیون شد. پس از یک ورتکس کوتاه برای پنج دقیقه در آب جوش قرار گرفت، سپس نمونه‌ها برای ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شد و برای ۳۰ دقیقه دیگر در آب جوش قرار گرفت. نمونه‌ها تا خنک شدن کامل در دمای اتاق نگهداری شد و سپس دو میلی‌لیتر از محلول دو (۳۲۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ نرمال، ۲۷۵ میلی‌لیتر متانول) به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰°C نگهداری شد. پس از خنک شدن کامل، به هر نمونه ۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول سه (۲۰۰ میلی‌لیترهگزان، ۲۰۰ میلی‌لیتر تترا متیل اتر) اضافه شد و پس از چند بار تکان ملایم ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. فاز روئی حذف و به فاز زیرین سه میلی‌لیتر از محلول چهار (۱۰۸ گرم NaOH، یک لیترآب مقطر) اضافه شد. پس از چند تکان ملایم، برای پنج دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و ۲۰ میکرولیتر از فاز روئی به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد. نیم میکرولیتر از اسیدهای چرب محلول شده به دستگاه Gas Chromatography (GC) مدل Hewlett-Packard 5890، مجهز به ستون ۲۵ متری fused silicacapillary و ردیاب flame ionization تزریق شد. دمای انژکتور ۲۵۰°C بود و دمای ستون روی ۱۷۰°C تنظیم شد و با افزایش پنج درجه‌ای در هر دقیقه به ۲۷۰°C رسید. اطلاعات به دست آمده به وسیله نرم‌افزار Microbial Identification System Software (MIDI lab, USA) تجزیه و تحلیل شد (Stead, 1992).

بررسی‌های ژنوتیپی:

بررسی وجود ژن مولد زهرابه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): به منظور ردیابی بخشی از ژن *syrB* که در تولید نقش دارد، ابتدا DNA به روش لیز قلیایی (Sambrook *et al*., 1989) از جدایه‌ها استخراج شد. وجود ژن مولد سیرینگومایسین در جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای B1 و B2 و به روش سورنسن و همکاران (Sorensen *et al*., 1998) بررسی شد. واکنش پی سی آر در حجم ۲۰ میکرولیتر و غلظت نهایی ۱۵ پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۲/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۵۰ میلی‌مولار بافر واکنش ۱۰x (500 mM KCl, Tris-HCl (اسیدیته ۸/۴))، ۰/۱۶ میلی‌مولار دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (dNTPs)، دو میکرولیتر از DNA ژنومی و ۱/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز (*Taq* Polymerase) (سیناژن، ایران) انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf, Germany) انجام

شد. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت ۱/۵ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، به مدت ۱/۵ دقیقه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه انجام شد و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

تعیین توالی برخی ژن‌ها و مناطق نیمه حفظ شده: یک جدایه از گندم و جو با قدرت بیماری‌زایی بالا به عنوان نماینده برای شناسایی دقیق ژنوتیپی انتخاب شدند و ژن *16s rDNA* با استفاده از آغازگرهای A1 و B6، ناحیه بین ژنی اسیدهای نوکلئیک ریبوزومی 16s–rRNA23s (Intergenic Transcribed Spacer, ITS) با استفاده از آغازگرهای D21 و D22 (Manceau and Horvais, 1997)، ژن *gyrB* با استفاده از آغازگرهای UP-1 و UP-2r (Yamamoto and Harayama, 1995)، ژن*rpoD* با استفاده از آغازگرهای PsEG30F و PsE790R (Mulet *et al*., 2009) و ژن *hrpL* با استفاده از آغازگرهای RL7 و RL8 (Kerkoud *et al*., 2002) تکثیر شدند.

الکتروفورز محصولات پی سی آر: الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد به‌همراه یک نشانگر وزنی (یک کیلو باز، ساخت شرکت Fermentas آلمان) و در بافر تریس- استیک اسید، EDTA (TAE، ۸۹ میلی مولار تریس، ۸۹ میلی مولار اسید بوریک، دو میلی مولار EDTA، اسیدیته ۸/۲) انجام شد. قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت Nucleospin Extract II ساخت شرکت Macherey-Nagel از ژل جدا و خالص‌سازی شدند.

همسانه سازی قطعات دی ان ای: به منظور تعیین توالی قطعات تکثیر شده و به دست آوردن اندازه مناسب از هر ژن که برای آنالیز دقیق چند ژنی مناسب باشد، قطعات تکثیر شده در ناقل pGEM easy vector مطابق توصیه شرکت سازنده (Promega, USA) همسانه سازی شد. قطعات خالص‌شده پس از الحاق در ناقل، به باکتری *Escherichia coli* DH5α، منتقل شد. پلاسمید پرگنه‌های نوترکیب، با استفاده از کیت Nucleospin Extract II استخراج و برای تعیین توالی به شرکت MWG آلمان ارسال شد. تعیین توالی با روش Di-deoxy با دستگاه‌های ABI و در دو جهت و با استفاده از آغازگرهای استاندارد Sp6 و T7 انجام‌گرفت. توالی‌ها ابتدا با استفاده از برنامه Seqman (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) اصلاح و سپس با استفاده از برنامه Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) با توالی‌های دیگر موجود در بانک ژن همردیف‌سازی شد (Altschul *et al*., 1990). بررسی مقایسه‌ای با همردیف‌سازی چندگانه (Multiple sequence alignment, MLSA) با استفاده از برنامه ClustalW انجام شد (Thompson *et al*., 1994). فاصله ژنتیکی توالی جدایه‌های مختلف و ارتباط فیلوژنتیکی آن‌ها با یکدیگر و همچنین با تعدادی از جدایه‌های موجود در بانک ژن، با استفاده از برنامه MEGA 4 بررسی شد (Tamura *et al*., 2007).

آزمون بیماری‌زایی: به منظور اثبات بیماری‌زایی، جدایه‌های *Pss*18 و *Pss*17 روی رقم حساس گلستان مایه‌زنی‌شدند. بذرها در دمای ۲۴ درجه سلسیوس در روز و ۱۸ درجه سلسیوس در شب، ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند.

ارزیابی واکنش: بیش از ۶۰ رقم تجاری گندم و ۴۰ ژنوتیپ بومی از "مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر" و نیز "مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان" دریافت شد. از سوسپانسیون باکتری با دانسیته نوری (Optical Density, OD) ۰/۰۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، تقریباً معادل ۱×۱۰^{۵} cfu/ml، برای مایه‌زنی استفاده شد. مایه‌زنی در مرحله ۴-۳ برگی، ۲۱ روز پس از کاشت و با استفاده از یک سرنگ بدون سوزن انجام شد (Milus and Mirlohi, 1994). حدود ۱۰ تا ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به قسمت میانی برگ چهارم گیاهچه مایه زنی شد. در هر برگ یک تزریق انجام و توزیع باکتری در ناحیه تزریق

شده، یکنواخت بود. دو انتهای ناحیه مایه‌زنی‌شده با استفاده از یک ماژیک غیرسمی مشخص شد. از آب مقطر سترون برای مایه‌زنی شاهد استفاده شد. واکنش گیاه برحسب نسبتی از سطح ناحیه تزریق‌شده که علائم بیماری را نشان داد. هفت، نه و ده روز پس از مایه‌زنی، از صفر تا شش رده‌بندی شد (Milus and Chalkley, 1994). صفر: فاقد هر گونه علامت قابل مشاهده؛ یک: کلروز بدون بافت‌مردگی؛ دو: بافت‌مردگی کمتر از ۱۰ درصد؛ سه: بافت مردگی بین ۱۱ تا ۳۰ درصد؛ چهار: بافت مردگی بین ۳۱ تا ۷۰ درصد؛ پنج: بافت مردگی بین ۷۱ تا ۱۰۰ درصد و شش: گسترش بافت مردگی به ناحیه فراتر از ناحیه مایه‌زنی‌شده. نتایج بین صفر تا دو (کمتر از ۱۰ درصد بافت‌مردگی در ناحیه مایه‌زنی شده) به عنوان واکنش مقاومت و بین ۲/۱ تا ۶ (بیشتر از ۱۰ درصد بافت مردگی در ناحیه مایه‌زنی‌شده) به عنوان واکنش حساسیت در نظرگرفته شد. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی، در سه تکرار و هر تکرار شامل پنج بوته انجام شد.

ارزیابی مجدد مقاومت برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های گندم: مقاومت مجموعه‌ای از ارقام و ژنوتیپ‌های گندم که در غربال اولیه، کلروز بدون بافت‌مردگی، بافت‌مردگی کمتر از ۱۰ درصد یا بافت‌مردگی بین ۱۱ تا ۳۰ درصد نشان دادند و در مجموع شاخص بیماری کمتر از سه داشتند، مجدداً بررسی شد. این ارقام و ژنوتیپ‌های بومی با جدایه‌های *Pss*18 و *Pss*17 مایه‌زنی‌شدند. این آزمایش سه بار تکرار شد.

آنالیزهای آماری: میانگین واکنش نواحی مایه‌زنی شده برگ چهارم گیاهچه‌های گندم محاسبه و آنالیز مقایسه میانگین با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 11 و با استفاده از آزمون مقایسه میانگین دانکن انجام شد.

نتیجه و بحث

نمونه‌برداری و جداسازی: از کشت نمونه‌های که دارای علائم لکه‌برگی بودند، جدایه‌هائی با پرگنه‌های محدب سفید رنگ تا بژ و لعابدار روی محیط NAS به دست آمد. قطر پرگنه‌ها بعد از دو روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حدود دو میلی‌متر و بعد از سه روز حدود سه میلی‌متر و با حاشیه صاف بود. چهل جدایه از گندم و جو و مزارع اطراف شهرستان کرمان، ماهان و جوپار به دست آمد. از میان جدایه‌های مذکور پنج جدایه که توانایی تولید علائم مشخص بیماری روی برگ‌های گندم و پنج جدایه که قادر به ایجاد بیماری در جو بودند، انتخاب شد. جدایه‌ها گرم منفی، میله‌ای شکل، متحرک، هوازی، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند و قادر به تولید آرژنین دی‌هیدرولاز و استفاده از ال-تارتارات نبودند. در برگ‌های توتون واکنش فوق‌حساسیت ایجاد کردند. بر مبنای ویژگی‌های فهرست شده در جدول ۱، بیماری‌زایی جدایه‌ها روی گندم و جو جدایه‌ها به‌عنوان *Pss* شناسایی شدند.

با توجه به اینکه ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها یکسان بود، دو جدایه از گندم و جو که در کوتاه‌ترین زمان بعد از پاشیدن سوسپانسیون و یا تزریق به برگ، توانایی تولید علائم مشخص روی هر دو میزبان گندم و جو را داشتند، برای شناسایی ژنوتیپی و استفاده در سایر آزمون‌ها انتخاب شدند. کشت خالص این دو نماینده در مجموعه آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه ولیعصر رفسنجان باشناسه‌های VRU18 و VRU19 نگهداری شد. جدایه VRU18 برای نگهداری به مرکز نگهداری کشت میکروارگانیسم‌ها در کشور نیوزیلند (International Collection of Microorganisms from Plants, ICMP) ارسال و با شماره ICMP19246 ثبت شد.

آنالیز اسیدهای چرب: نوع و میزان نسبی اسیدهای چرب جدایه مرجع *Pss* (IBSEF451) و جدایه نماینده با کروماتوگرافی گازی و به روش FAME analysis تعیین شد. بر اساس نتایج آمده در جدول ۲، نوع اسیدهای چرب غالب در جدایه‌های گندم و جو در مقایسه با جدایه مرجع *Pss* یکسان بود. علاوه بر آن درصد اسیدهای چرب غالب نیز تقریباً برابر و اسیدهای چرب ۱۶ کربنه غالب بودند. بر اساس این نتایج شباهت زیادی میان جدایه‌های بیماری‌زا در گندم و جو با جدایه مرجع پاتووار *Pss* مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱- ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های گندم و جو *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) جمع‌آوری شده از استان کرمان در مقایسه با جدایه استاندارد *Pss* (IBSEF451).

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of wheat and barley isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) collected from Kerman province compared to *Pss* reference isolate (IBSEF451).

واکنش جدایه مرجع **Reaction of a reference strain of *Pss* (IBSEF451)**	واکنش جدایه‌های بیمارگر گندم و جو **Reaction of wheat and barley bacterial strains**	**Characteristic**	**ویژگی**
		Hydrolysis of:	هیدرولیز:
+	+	Esculin, Casein, Gelatin, Arbutin	اسکولین، کازئین، ژلاتین، آربوتین
+	+ (80%)	Tween-80	توئین ۸۰
+	+ (45%)	Tyrosin	تایروزین
+	+	Gelatin	ژلاتین
+	+	Arabutin	آربوتین
-	-	Starch	نشاسته
-	-	Lecithinase, Oxidase, Arginine dihydrolase	لستیناز، اکسیداز، هیدرولیز آرژنین
+	+	Catalase	کاتالاز
+	+	Growth on 5% NaCl	رشد در محیط حاوی ۵ درصد نمک طعام
-	-	Growth on 7% NaCl	رشد در محیط حاوی ۷ ٪ نمک طعام
-	-	Nitrate reduction, Urease, Production of Indole	احیا نیترات، اورآز، تولید اندول،
+	+	Levan formation	تولید لوان
+	+	H2S production from cyctein	تولید H2S از سیستئین
+	+	Tobacco hypersensitivity, Phosphatase activity	فوق حساسیت در توتون، فسفاتاز
-	-	Production of indole	تولید اندول
-	-	Potato rot	لهانیدن سیب زمینی
+	+	Reducing substances from sucrose	تولید مواد احیا کننده از سوکروز
+	+	Production of syringomycin	تولید سیرینگومایسین
		Acid production from	تولید اسید از:
+	+	Galactose, Sucrose	گالاکتوز، سوکروز
−	−	Ethanol	اتانول
+	+	D-Arabitol	د- آرابیتول
+	+	L-Alanin	ال- آلانین
+	+	D-Mannitol	د- مانیتول

ردیابی ژن مولد سیرینگومایسین در جدایه‌ها: ژن *syrB* کد کننده زیر واحد ۱۲۰۰ دالتونی از زهرابه سیرینگومایسین است. با استفاده از آغازگرهای B1 و B2 (Sorensen *et al.*, 1998)، در جدایه‌های *Pss*17 و *Pss*18 و نیز جدایه *Pss* مرجع قطعه دی ان ای مورد انتظار ۷۵۲ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۱).

بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها بر اساس توالی نواحی نیمه حفظ شده ژنوم: بر اساس نتایج حاصل از

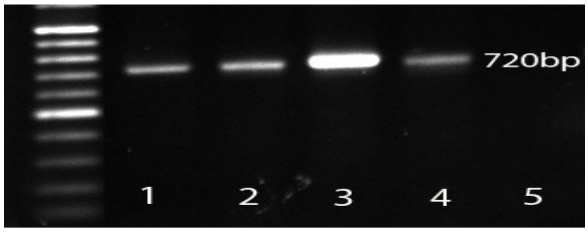
توالی‌یابی و بررسی چند ژنی و مقایسه با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن، جدایه‌ها بیشترین شباهت را به *Pss* داشتند (شکل ۲). پاسخ توالی‌یابی تأیید کننده نتایج شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی بود.

جدول ۲- نوع و درصد اسیدهای چرب موجود در جدایه‌های به دست آمده از گندم و جدایه مرجع

Table 2. Fatty acid profiles of wheat isolates and reference strain

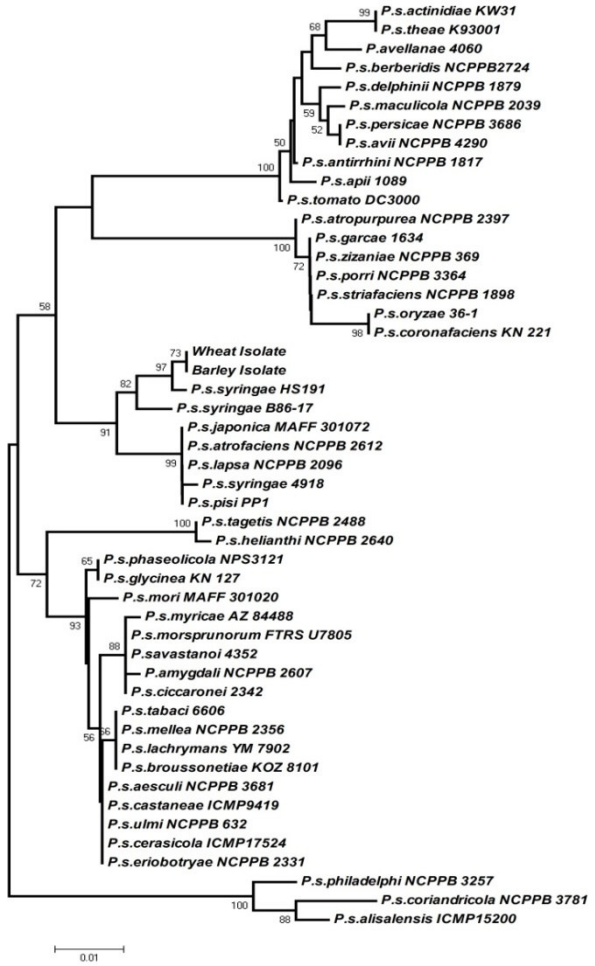
نوع اسید چرب **Fatty acid profiles**	درصد اسیدهای چرب جدایه‌ها **Fatty acid of wheat isolate and reference strain(٪)**	
	Pss **reference strain**	**گندم** **wheat isolate**
10:0 3-OH	2.6	2.5
12:0	4.5	4.8
12:0 2-OH	2.8	2.5
12:0 3-OH	4.4	4
14:0	0.2	0.21
14:0 iso	0.21	0.19
15:0	0.7	-
16:0	27.1	28.6
17:0 iso	0.2	0.11
17:0 cyclo	0.28	0.19
18:0	1.4	1
18:1 w6c	1	1.3

Pss: *Pseudominas syringae* pv. *syringae* (IBSEF 451)



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *syrB* با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی B1 و B2 روی ژل آگارز. اولین راهک سمت چپ: نشانگر اندازه؛ راهک ۱-۴ نمونه‌ها؛ راهک ۵ کنترل منفی.

Fig. 1. Electrophoresis analysis of polymerase chain reaction product of *syrB* gene using B1 and B2 specific primers on agarose gel. First line from left: molecular marker; line 1-4: samples; line 5: negative control.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترکیبی ترسیم شده با روش Neighbor joining، نشان دهنده ارتباط ژنتیکی جدایه‌های بیماری‌زا در گندم و جو در مقایسه با تعدادی از پاتووارهای مهم *Pseudomonas syringae*. درخت بر اساس توالی ناحیه ITS ،16S rDNA و ژن‌های *gyrB*، *rpoD* و *hrpL* با اعتبارسنجی ۱۰۰۰ ترسیم شده‌اند.

Fig. 2. Neighbor-joining tree based on sequences of representatives of the isolates from wheat and barley and some type strains of *Pseudomonas syringae* pathovars. Tree was drawn based on sequences of ITS and 16s rDNA regions and *gyrB*, *rpoD* and *hrpL* genes with 1000 bootstrap.

در این آزمون چهار ژن *gyrB*، rDNA *16S*، *hrpL*، *rpoD* و ناحیه ITS در دو نماینده جدایه‌ها تکثیر شد. این قطعات به ترتیب دارای ۱۲۰۰، ۱۱۲۰، ۹۶۰، ۷۵۰ و ۶۹۰ نوکلئوتید طول بودند. نتایج توالی‌یابی، پس از همردیف‌سازی با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن نشان دهنده تشابه کافی برای

منتسب دانستن جدایه‌ها به پاتووار *Pss* بود. میزان شباهت جدایه‌ها با مقایسه امتیاز همردیفی (bite score) نشان از میزان شباهت ۹۸/۵ درصد در تمامی قطعات مورد مقایسه بود. شاخص ارزش مورد انتظار (e-value) نیز در تمامی مقایسه‌های نزدیک به صفر بود. با توجه به میزان شباهت ناحیه 16S rDNA تعلق این جدایه ها به گونه *P. syringae* تأیید شد. دندروگرام ترکیبی حاصل از قطعات توالی‌یابی شده نتایج آزمون‌های فنوتیپی را تأیید و جدایه‌های نماینده به عنوان پاتووار *Pss* شناسایی شدند.

جدول ۳- واکنش برخی از ارقام گندم به جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* استرین‌های (*Pss*18 و *Pss*17) جمع‌آوری‌شده از کرمان، ایران. ارزیابی نه روز پس از مایه‌زنی انجام شده است. واکنش گیاه برحسب نسبتی از سطح ناحیه تزریق شده که علائم بیماری را نشان داد، رده‌بندی شده است.

Table 3. Disease reactions of some wheat cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains (*Pss*17 and *Pss*18) isolated from wheat in Kerman, Iran. The reactions were scored nine days post inoculation.

رقم	*Pss*18	*Pss*17
گلستان (Golestan)	4.5^{a}	4^{a}
چمران (Chamran)	4.1^{a}	4^{a}
فلات (Falat)	4.1^{a}	5^{a}
میهن (Mihan)	5^{a}	5^{a}
اروند (Arvand)	2.6^{a}	3.1^{a}
اترک (Atrak)	4.3^{a}	4.8^{a}
نیک‌نژاد (NikNejhad)	2.4^{a}	3.4^{a}
مهدوی (Mahdavi)	2.9^{a}	3.2^{a}
امید (Omid)	1.16^{b}	1.3^{b}

میانگین‌های با حروف مشابه بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار نداشتند.

Means with the same letters are not significantly different ($P \leq 0.05$) based on Duncan multiple range test.

آزمون بیماری‌زایی و انتخاب جدایه: سه تا چهار روز پس از تزریق سوسپانسیون جدایه‌های *Pss*18 و *Pss*17 روی رقم حساس گلستان، علائم بیماری شامل کلروز در ناحیه مایه‌زنی شده مشخص شد. علائم بیماری هفت، نه و ده روز پس از مایه‌زنی یادداشت برداری شد. علائم مشاهده شده روی رقم حساس شامل بافت‌مردگی بین ۷۱ تا ۱۰۰ درصد ناحیه مایه‌زنی‌شده بود. پس از اثبات بیماری‌زایی، جدایه *Pss*18 که توانای ایجاد بیماری در هر دو گیاه گندم و جو را داشتند. برای ارزیابی واکنش ارقام تجاری و ژنوتیپ‌های بومی گندم انتخاب شد. در بوته‌های شاهد هیچ گونه علائمی مشاهده نشد.

ارزیابی واکنش: نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت ۹۹ رقم و ژنوتیپ بومی گندم نسبت به *Pss* نشان داد که علائم بیماری در ارقام امید، کویر و ژنوتیپ‌های بومی EDYT1، EDYT3، EDYT10 و EDYT19 ظاهر شد. در غربال اولیه، کلروز بدون بافت‌مردگی، بافت‌مردگی کمتر از ۱۰ درصد یا بافت‌مردگی بین ۱۱ تا ۳۰ درصد بروز نمود و در مجموع شاخص بیماری آن‌ها کمتر از سه بود. پس از تکرار آزمایش مشخص شد که تنها در رقم امید شاخص ارزیابی‌شده کمتر از دو و در نتیجه به بیماری بلایت باکتریایی برگ گندم مقاوم بود. در نتیجه تکرار آزمایش با استفاده از جدایه *Pss*17 نتایج مشابهی حاصل شد (جدول ۳).

جمعیت *Pss* اغلب به صورت اپی‌فیت بر سطح بوته گندم و میزبان‌های دیگر رشد می‌کند که نشان می‌دهد شرایط آب و هوایی نسبت به وجود زادمایه در گسترش بیماری مهم‌تر است (Niknejad Kazempour *et al*., 2010). در صورت مناسب بودن شرایط محیطی، بیماری بلایت گندم می‌تواند سبب کاهش قابل ملاحظه محصول شود (Toben *et al*., 1991; Valencia-Botin, 2007; Valencia-Botin, 2011). بیشترین خسارت در دمای پایین و رطوبت بالا و در شرایط بسیار مرطوب در بهار یا تابستان اتفاق می‌افتد (Kietzell and Rudolph, 1977). باکتری بر سطح بقایای گیاهی میزبان، خاک یا بذر باقی می‌ماند (Taghavi and Keshavarz, 2003) و آلودگی سطحی بذر در اپیدمیولوژی بیماری بسیار مهم است (Kietzell and Rudolph, 1977; Valencia-Botin, 2007). برای نمونه، پس از کشت

بذرهای آلوده به *Pss* و *P. syringae* pv. *atrofaciens*، باکتری در پهنک برگ گیاهچه‌های حاصل مشاهده شد که نشان دهنده بذربرد بودن بیماری است (Zavaleta-Mancera *et al*., 2007). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در مدیریت بیماری به‌سبب هزینه بالا و ایجاد جمعیت‌های مقاوم باکتری توصیه نمی‌شود (Levy, 1998). به‌نظر می‌رسد بهترین روش برای مدیریت بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. مطالعات معدودی برای ارزیابی مقاومت گندم به *Pss* انجام شده است. در این بررسی مقاومت ۹۹ رقم و ژنوتیپ بومی گندم نان و دوروم به *Pss* با استفاده از غلظت بالای زادمایه، جدایه‌های با بیماری‌زایی بالا و شرایط مناسب ایجاد و گسترش بیماری در گلخانه ارزیابی و مشخص شد که رقم امید به جدایه‌های *Pss*18 و *Pss*17 مقاوم است و به عنوان ژنوتیپ مقاوم به این بیماری معرفی می‌شود. در بررسی Taghavi and Keshavarz (2003) ارقام فلات، اروند، اترک، سرخ‌تخم و نیک‌نژاد به عنوان رقم مقاوم معرفی شده‌اند، در حالی که در این پژوهش مشخص‌شد این ارقام به بیمارگر *Pss* حساس‌اند. احتمالاً تفاوت در شدت بیماری‌زایی جدایه‌های استفاده شده در ارزیابی مقاومت باعث تفاوت در نتایج حاصل شده است. زیرا روش مایه‌زنی و نحوه ارزیابی مقاومت تا حدودی یکسان انجام شده است.

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های گندم در شرایط مزرعه به سبب شرایط محیط خاص و تغییر در حساسیت در طول رشد دشوار است (Maraite *et al*., 2007). مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف گندم و جو هرز (*Aegilops*) به (*Psa*) *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* در مرحله ظهور سنبله در گلخانه با تزریق سوسپانسیون باکتری به سنبله (Zaharieva and Vassilev, 1995) یا تزریق سوسپانسیون به گیاهچه در مرحله سه برگی (Vassilev *et al*., 1995) انجام شده است. در این پژوهش مایه‌زنی با تزریق سوسپانسیون به برگ چهارم گیاهچه‌های گندم انجام شد. علائم مشاهده شده در ارقام حساس شامل نوارهای بافت مرده بود که اغلب تا ۱۰۰–۷۵ درصد ناحیه مایه‌زنی‌شده گسترده می‌شد. این علائم با علائم مشاهده شده در پژوهش‌های دیگر تطابق داشت (Otta, 1974; Vassilev *et al*., 1995; Taghavi and Keshavarz, 2003). از شاخص صفر تا شش (توصیف شده) برای ارزیابی میزان حساسیت ناحیه مایه‌زنی برگ چهارم گیاهچه‌های گندم برای ارزیابی مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌های بومی گندم استفاده شد. این نخستین مطالعه‌ای است که در آن برای ارزیابی مقاومت گندم به عامل بلایت از این روش استفاده می‌شود. واکنش ارقام گندم به باکتری *Pss*، هفت، ۹ و ۱۰ روز پس از مایه‌زنی ارزیابی‌شد. نتایج نشان داد روز نهم پس از مایه‌زنی، بهترین زمان برای یادداشت‌برداری است.

در این مطالعه از یک جدایه با بیماری‌زایی بالا به منظور یافتن رقم مقاوم به بیماری بلایت برگ گندم استفاده شد و آزمایش در گلخانه و شرایط مطلوب ایجاد و گسترش بیماری انجام شد. از میان ژنوتیپ‌های بررسی‌شده، رقم امید به بیمارگر *Pss* مقاوم بود.

References

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS and D. J. LIPMAN, 1990. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Journal of Molecular Biology, No. 215: 403-410.

DYE, D. W., J. F. BRADBURY, M. GOTO, A. C. HAYWARD, R. A. LELLIOTT and M. N. SCHROTH, 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Annual Review of Plant Pathology, No. 59: 153-168.

FAHY, P. C. and A. C. HAYWARD, 1983. Media and methods, p. 337-378. In: P.C. Fahy and G. J. Persley (eds.). Plant bacterial diseases: A diagnostic guide. Academic Press, New York.

GONZÁLEZ, A. I., M. PÉREZ DE LA VEGA, M. L. RUIZ, and C. POLANCO, 2003. Analysis of the argK-tox gene cluster in nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Applied and Environmental Microbiology, No. 69: 4979-4982.

HIRANO, S. S. and C. D. UPPER, 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*a pathogen, ice nucleus and epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Review, No. 64: 624-653.

KERKOUD, M., C. MANCEAU and J. P. PAULIN, 2002. Rapid diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, the causal agent of blister spot of apple, by polymerase chain reaction using specifically designed *hrpL* gene primers. Phytopathology, No. 92: 1077-1083.

KIETZELL, J. and K. RUDOLPH, 1997. "Epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* pv.*atrofaciens*," in *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens, K. Rudolph, T. J. BURR, J. MANSFIELD, D. STEAD, A. VIVIAN, and J. VON KIETZELL, Eds. pp. 29–34, Kluwer Academic, Dodrecht, The Netherlands, 1997.

LELLIOT, R. A. and D. E. STEAD, 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications. U. K. 215pp.

LEVY, S. B. 1998. The challenge of antibiotic resistance. Scientific American, No. 278:46-53.

MANCEAU, C. and A. HORVAIS, 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. Applied and Environmental Microbiology, No. 63: 2498-505.

MARAITE, H., C. BRAGARD and E. DUVEILLER, 2007. The Status of Resistance to Bacterial Diseases of Wheat. Pp. 37-49. In: Wheat Production in Stressed Environments. Buck, H. T., Nisi, J. E. and Salomón, N. eds. Springer, New York.

MILUS, E. A. and A. F. MIRLOHI, 1994. Use of disease reactions to identify resistance in wheat to bacterial streak. Plant Disease, No. 78: 157-161.

MILUS, E. A. and D. B. CHALKLEY, 1994.Virulence of *Xanthomonascampestris* pv. *translucens* on selected wheat genotypes. Plant Disease, 78: 612-615.

MULET, M., M. GOMILA, C. GRUFFAZ, J. M. MEYER, N. J. PALLERONI, J. LALUCAT, AND E. GARCÍA-VALDÉS, 2008. Phylogenetic analysis and siderotyping as useful tools in the taxonomy of*Pseudomonas stutzeri*: description of a novel genomovar. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, No. 58:2309-2315.

NIKNEJAD KAZEMPOUR, M., M. KHEYRGOO, H. PEDRAMFAR, and H. RAHIMIAN, 2010. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. African Journal of Biotechnology, No. 9: 2860-2865.

OTTA, J. D. 1974. *Pseudomonas syringae* incites a leaf necrosis n spring and winter wheat in South Dakota. Plant Disease Report, No. 58:1061-1064.

OTTA, J. D. 1977. Occurrence and characteristics of isolates of *Pseudomonas syringae* on winter wheat. Phytopathology, 67:22-26.

RAHIMIAN, H. 1989. The occurrence of bacterial leaf blight in wheat. 9th Iranian Plant Protection Congress, Mashhad, Iran, P. 146. (in Persian with English summary).

SAHRAGARD, N. 2000. Wheat resistance to bacterial leaf blight. Proc. 14th Plant Protection Cong. Iran, Isfahan, P. 243 (in Persian with English summary).

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual., 2nd ed. Cold Spring Harbor Labo ratory Cold Spring Harbor, NY.

SCHAAD, N. W., J. B. JONES and W. CHUN, 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society. American Phytopathological Society. St. Paul, Minn, USA, APS.

SCHAREN, A. L., J. W. BERGMAN and E. E. BURNS, 1976. Leaf diseases of winter wheat in Montana and losses from them in 1975. Plant Disease Report, No. 60: 686-690.

SELLAM, M. A. and R. D. WILCOXSON, 1976. Bacterial leaf blight of wheat in Minnesota. Plant Disease Report, No. 60: 242-245.

SMITH, J. and M. J. HATTINGH, 1991. Fluorescent pseudomonads associated with diseases of wheat in South Africa. Journal of Phytopathology, No. 133:36-48.

SORENSEN, K. N., K. H. KIM and J. Y. TAKEMOTO,

1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae pv. syringae* and similarity of strains. Applied and Environmental Microbiology, No. 64: 226-230.

STEAD, D. E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, No. 42: 281-295.

TAGHAVI, S. M. and K. KESHAVARZ, 2003. Identification of the causal agent of bacterial wheat leaf blight in Fars and Kohgiluyeh & Boyrahmad provinces and the reaction of certain wheat cultivars to them. JWSS - Isfahan University of Technology. No. 6 :171-179. (In Persian with English summary).

TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI and S. KUMAR, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, No. 24: 1596-1599.

TEYSSANDIER, E. and D. C. SANDS, 1977. Wheat leaf blight caused by *Pseudomonas syringae* in Argentina. Phytopathology. No. 87:1766.

THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS and T. J. GIBSON, 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. No. 22, 4673-4680.

TOBEN, H., A. MAVRIDIS and K. RUDOLPH, 1991. Zum Vorkommen der basalen Spelzenfäule an Weizen und Gerste, hervorgerufen durch *Pseudomonas syringae* pv. atrofaciens, in West-Deutschland. Zeitschrift für P flanzenkrankheiten und P flanzenschutz. No. 98:225–235.

VALENCIA-BOTIN, A. J., L. E. MENDOZA-ONOFRE, H. V. SILVA-ROJAS, E. VALADEZ-MOCTEZUMA, L. CORDOVA-TELLEZ and H. E. VILLASE NOR-MIR, 2011. Effect of *Pseudomonas syringae* subsp. *syringaeon* yield and biomass distribution in wheat. Spanish Journal of Agricultural Research, No. 9: 1287–1297.

VALENCIA-BOTÍN, A. J., L. E. MENDOZA-ONOFRE, H. V. SILVA-ROJAS, L. CÓRDOVA, D. ESPINOSA-VICTORIA, E. VALADEZ-MOCTEZUMA, H. E. VILLASEÑOR-MIR, 2007. Aggressiveness estimates and inoculation methods of pathogenic bacteria on seeds and seedlings of wheat 'Seri M82'. Revista Fitotecnia Mexicana, 30 (3), pp. 255–259.

VARVARO, L. 1983. Una batteriosi del Frumento duro (*Triticum durum* Desf.) causata da *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch) Young *et al.* in Italia. Informatore Fitopatologico. No. 33:49-51.

VASSILEV, V., K. KOLEV, M. ZAHARIEVA and V. SEVOV, 1995. Resistance of Aegilops, maize and wheat genotypes to *Pseudomonas syringae* pathovars atrofaciens and *syringae*. Agronomie, No. 15: 25–29.

YAMAMOTO, S. and S. HARAYAMA, 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Applied and Environmental Microbiology, No. 61: 1104–1109.

YOUNG, J. M., D. W. DYE, J. F. BRADBURY, C. G. PANAGOPOULUS and C. F. ROBBS, 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research, No. 21:153–177.

ZAHARIEVA, M. and V. VASSILEV, 1995. Study of adult wheat and Aegilops resistance to *Pseudomonas syringae* pathovar *atrofaciens*. Agronomie. No. 15:21–24.

ZAVALETA-MANCERA, H. A., A. J.VALENCIA-BOTÍN, L. E. MENDOZA-ONOFRE, H. V. SILVA-ROJAS, and E. VALADEZ-MOCTEZUMA, 2007. Use of green fluorescent protein to monitor the colonization of *Pseudomonas syringae* subsp. *Syringae* on wheat seeds. Microscopy and Microanalysis, No. 13: 298–299.