ARPP

پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۳ (۲): ۲۰۳–۱۹۳ (۱۴۰۳)- مقاله پژوهشی

Journal of Applied Research in Plant Protection 13 (2): 193–203 (2024)-*Research Article*

https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2024.17967

رفتار زیستی متفاوت در تعامل دو باکتری بذرزاد گندم، *Erwinia persicina* و *Xanthomonas translucens*، در شرایط درون‌شیشه و درون‌زیوه

آی‌سن افخمی‌فر[۱]، کبری مسلم‌خانی[✉۲]، نادر حسن‌زاده[۱]، جواد رزمی[۱]، نیما خالدی[۲]

[۱]*گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران،* [۲]*مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.* ✉Moslemkhany@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۳

چکیده

باکتری *Erwinia persicina* (*Ep*) به عنوان عامل بیماری‌زا در دامنه وسیعی از میزبان‌ها شناخته شده که از طریق بذر نیز انتقال می‌یابد. تحقیق حاضر به بررسی وجود باکتری *Ep* در توده‌های بذری گندم برداشت شده از مزارع آلوده به باکتری *Xanthomonas* (*Xt*) *translucens* و اثرات آلودگی بذرزاد *Ep* بر بیماری نواری باکتریایی گندم پرداخته است. از ده نمونه بذر گندم رقم میهن آلوده به باکتری *Xt*، یک جدایه *Ep* از استان مرکزی و دو جدایه از استان لرستان براساس برخی صفات بیوشیمیایی و توالی 16Sr RNA جداسازی و شناسایی شد. هر سه جدایه Ais155، Ais238 و Ais255 بازدارنده رشد باکتری *Xt* در شرایط آزمایشگاهی بودند. کشت بذرهای تیمار شده با جدایه‌های *Ep*، در خاک آلوده به *Xt*، شروع بیماری نواری باکتریایی گندم را همراه با تاخیر و با شدت کمتری (حدود ۱۸/۳ تا ۳۹/۶ درصد) در مقایسه با بذور فاقد تیمار مواجه نمود، اما به نظر می‌رسد وجود بیوفیلم و آنزیم‌های متعدد در جدایه Ais155 و وجود آنزیم سلولاز در جدایه‌های Ais238 به تدریج باعث توسعه و تشدید بیماری نواری باکتریایی نسبت به شاهد شده است. در ارزیابی اثر غیر مستقیم تیمار بذر بر شدت بیماری (حاصل از اسپری زادمایه به گیاه)، تیمار بذر با جدایه Ais255 به طور غیر مستقیم مقاومت نسبی گیاه را در مقابل حمله باکتری بیماریزای *Xt* افزایش داد که امکان دارد باکتری *Ep* با فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه تا حدی باعث کاهش شدت و سرعت رشد بیماری شود و لازم است در تحقیقات آتی، تغییرات سیستم دفاعی گیاه در اثر تیمار این جدایه به صورت دقیق‌تر مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: تعامل، بیماری نواری باکتریایی گندم، شدت بیماری، تیمار بذر

Different biological behavior in the interaction of *Erwinia persicina* and *Xanthomonas translucens*, two wheat seed-borne bacteria, *in vitro* and *in vivo*

Aisan Afkhamifar[1], Cobra Moslemkhani[✉2], Nader Hasanzadeh[1], Javad Razmi[1], Nima Khaledi[2]

[1]*Department of Plant Protection, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.*[2]*Seed and Plant Certification and Registration Institute. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Tehran, Iran.*✉Moslemkhany@yahoo.com

Received: 4 November 2023 Revised: 21 January 2024 Accepted: 23 January 2024

Abstract

Erwinia persicina (*Ep*) is a plant pathogenic bacterium with a wide range of host's, spread through infected seeds. Seeds carry a variety of surface microbes with complex interactions with each other and the host plant. The bacterium *Ep* was isolated during surveys from wheat fields infected with *Xanthomonas translucens* (*Xt*), the cause of bacterial leaf streak disease. From the ten samples of Mihan cultivar collected from different regions of Iran, just one *Ep* isolate was isolated from Markazi province and two isolates from Lorestan province. The isolated bacteria were identified based on some key biochemical traits and 16Sr RNA sequence analysis. The pathogenic or antagonistic activities of these three isolates were different. All isolates (Ais155, Ais238 and Ais255) produced an effective inhibitory zone against *Xt* under *in vitro* conditions. At the early stage after sowing the *Ep* treated seeds in artificially contaminated soil with *Xt*, the typical disease symptoms appeared weak with delay but it seems that the production of biofilm and enzyme activities of *E. persicina* (Ais155 isolate) and particularly high cellulase activity (in Ais238 isolate) cause more severe incidence of bacterial leaf streak disease (18.3 to 39.6%) in comparison with untreated seeds in infected soil. Indirect effect of seed treatment on disease severity were assayed through inoculum spraying plantlets that obtained from treated seeds. The Ais255 isolate indirectly increased plant relative resistance to *Xt*. It was concluded that *Ep* can reduce the severity of the disease via activating the plant's defense system. Further research is needed to prove the different dimensions of this effect.

Keywords: Interaction, Bacterial leaf streak disease, Seed microbiome, Disease severity and Seed treatment

How to cite:
Afkhamifar A, Moslemkhani C, Hasanzadeh N, Razmi J, Khaledi N, 2024. Different biological behavior in the interaction of *Erwinia persicina* and *Xanthomonas translucens*, two wheat seed-borne bacteria, *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 13 (2): 193–203.

مقدمه

بذرها حامل جمعیت‌های متنوعی از باکتری‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا هستند که استقرار این عوامل روی سطح یا درون بذر با اثرات مثبت یا منفی می‌تواند به صورت مستقیم یا غیر مستقیم نقش مهمی در سلامت، بنیه و رشد گیاه و نیز تشدید یا کنترل بیماری‌های بذرزاد ایفا نماید (Chee-sanford *et al.* 2006; Lamichhane & Venturi 2015; Robinson *et al.* 2016). در سال‌های اخیر، شیوع بیماری نواری باکتریایی غلات (Bacterial leaf strip, BLS) به عنوان یک بیماری بسیار مهم باکتریایی بذرزاد ناشی از *Xanthomonas translucens* (*Xt*)، در برخی مناطق ایران گزارش و باعث ایجاد خساراتی شده است (Fallahzadeh-Mameghani & Moslemkhani *et al.* 2016; Habibian *et al.* 2021).

نتایج تحقیقات Tambong *et al.* (2021) نشان داد در برگ-های آلوده گندم به بیماری نواری باکتریایی غلات علاوه بر باکتری *Xt* گونه‌های دیگری از باکتری‌ها نظیر *Erwinia persicina* (*Ep*) حضور دارند که ممکن است این گونه‌های باکتریایی اثرات مشخصی در ظهور یا شدت بروز بیماری نواری باکتریایی غلات داشته باشند. تاکنون بیشتر محققان برای تشخیص بیماری، روی یک بیمارگر هدف متمرکز می‌شدند؛ اما در دهه اخیر بسیاری از مطالعات نشان داده است که میزان قابل توجهی از باکتری‌های موجود در محیط قادرند رشد عوامل بیماری‌زا و پیشرفت بیماری ناشی از آنها را تحت تأثیر قرار دهند (Lamichhane & Venturi 2015; Aiello *et al.* 2017; Dandve *et al.* 2019; Tambong *et al.* 2021). برخی از باکتری‌های بیماری‌زا، در فعل و انفعالات هم افزایی، با سرکوب ایمنی میزبان و از طریق افزایش استقرار و ترغیب رشد یکدیگر، شدت بیماری را افزایش می‌دهند (Lamichhane & Venturi 2015; Afkhamifar *et al.* 2023).

باکتری *Ep* برای اولین بار در دنیا از گیاهان گوجه فرنگی، موز و خیار جدا شد (Hao *et al.* 1990) و سپس طی سال‌های متمادی از کاهو، تربچه، پیاز، جو و شلغم نیز گزارش گردید (Tsuji *et al.* 2020). بیماری پوسیدگی صورتی ریشه جعفری ناشی از فعالیت باکتری *Ep* از کشور آلمان گزارش شده است که دلیل اصلی توسعه بروز این بیماری ناشی از اثر هم‌افزایی دو باکتری *Ep* و *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* بوده است (Nechwatal & Theil 2019). در تحقیقاتی مشخص شد برخی جدایه‌های *Ep* از طریق آلودگی مصنوعی قادر به ایجاد عارضه بذرصورتی در گندم نان شده‌اند (Kawaguchi *et al.* 2021). همچنین این باکتری برای اولین بار از جنوب غربی ایران به عنوان عامل بیماری‌زا در کاهو گزارش شده است (Keshavarz-Tohid & Ebrahimi 2023).

در گذشته گونه *Ep* به دلیل تشابه در بسیاری از صفات به عنوان گونه *E. rhaportici* معرفی می‌شد اما با شناخت دقیق‌تر، این دو گونه از یکدیگر متمایز شدند (Kawaguchi *et al.* 2018). عامل عارضه صورتی رنگی بذر گندم نان و گندم دوروم در اروپا، آمریکای شمالی و روسیه، باکتری *E. rhapontici* گزارش شده است (Huang *et al.* 2003; Bockus *et al.* 2010). امروزه محققان باکتری *Ep* را یک بیمارگر مستقل بذرزاد معرفی می نمایند، که از طریق استقرار جمعیت‌های باکتری به صورت توده‌های چسبناک و صورتی رنگ در آندوسپرم به ویژه در شرایط مرطوب می‌تواند کیفیت بذر را کاهش دهد (Kawaguchi *et al.* 2018; Orel, 2020). توانایی تولید رنگدانه صورتی محلول در آب یکی از ویژگی‌های مهم این دو گونه باکتریایی است (Adeolu *et al.* 2016). توانایی بقای جدایه‌های *Ep* موجب سازگاری بالای این باکتری در شرایط مختلف نظیر محیط‌های بسیار خشک و دمای پایین شده که نتیجه آن گستردگی پراکنش این باکتری است (Kiessling *et al.* 2005; Baruzzi *et al.* 2012).

به دلیل تبادلات بین‌المللی بذر و امکان گسترش و انتشار بیماری‌های خسارت‌زا در سطح جهان و تهدید منابع غذایی بشر از طریق تجارت بذر آلوده، کسب دانش در زمینه میکروبیوم بذر می‌تواند باعث اتخاذ استراتژی‌های مؤثر برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های بذرزاد شود، لذا با توجه به وجود گزارشات متعدد در دنیا با اشاره به ماهیت بذرزادی باکتری *Ep*، تحقیق حاضر ضمن بررسی وجود این باکتری در بذور گندم در ایران برای اولین بار به مطالعه تعامل باکتری‌های *E. persicina* و *X. translucens* به عنوان دو بیمارگر بذرزاد در گیاه گندم و بررسی اثرات فعالیت باکتری *Ep* بر شدت بیماری نواری باکتریایی گندم پرداخته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه‌های باکتری

در سال ۱۳۹۹ شمسی با بروز اپیدمی بیماری نواری باکتریایی غلات در مزارع گندم مناطق غربی و مرکزی ایران، تعداد ۱۰ نمونه بذر گندم با حجم یک کیلوگرم (هر نمونه حاصل از ترکیب ۳۰ زیر نمونه) از رقم میهن از مزارع آلوده استان‌های فارس (دو نمونه از شهرستان اقلید)، همدان (دو نمونه از شهرستان اسدآباد و نهاوند)، لرستان (دو نمونه از شهرستان پل دختر و ازنا)، مرکزی (دو نمونه از شهرستان شازند) و دو نمونه

از کردستان طبق دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر (International Seed Testing Association, ISTA)، نمونه-برداری و به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی باکتری های اندوفیت و اپیفیت از بذر گندم

برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت ابتدا ده گرم از بذرها با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس پنج بار با آب دوبار تقطیر سترون شستشو شدند. برای اطمینان از ضدعفونی موثر، ۱۰۰ میکرولیتر از آب شستشوی آخرین مرحله نیز کشت شد. ده گرم بذر ضدعفونی شده در ۵۰ میلی‌لیتر بافر نمکی (حاوی NaCl ۰/۸۵ درصد) در هاون چینی کاملا خرد و سپس صد میکرولیتر از سری رقت‌های سوسپانسیون حاصله (از $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۷}$) روی دو محیط کشت NAS (Nutrient agar sucrose) و YDC (Yeast Dextrose Carbonate) با پخش‌کن شیشه‌ای پخش و به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. کلنی‌های زرد لعابدار روی محیط NAS و کلنی‌های زرد و صورتی رنگ روی محیط YDC انتخاب و پس از خالص سازی، در آب مقطر سترون و محیط کشت YDC در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت، ۵۰ گرم بذر با ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر نمکی توئین‌دار (حاوی NaCl ۰/۸۵ درصد و ۰/۰۲ درصد حجمی/حجمی توئین ۲۰) به مدت چهار ساعت روی شیکر در ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری و سپس سری رقت‌ها همانند آنچه در جداسازی باکتری‌های اندوفیت ذکر گردید، کشت شدند. شناسایی باکتری‌های *X. translucens* و *E. persicina* به ترتیب با استفاده از محیط کشت انتخابی WBC (Wilbrink's Boric Acid-Cephalexin) (Duveiller *et al.* 1997) و YDC (Yeast Dextrose Carbonate) و برخی از آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی‌های مولکولی طبق روش‌های ذیل انجام شد (Schaad *et al.* 2001).

آزمون‌های بیوشیمیایی اولیه

برای شناسایی اولیه باکتری‌های متعلق به دو جنس *Xanthomonas* و *Erwinia* آزمـون‌هـای گرم، اکسیداز، کاتالاز، واکنش فوق حساسیت، مورفولوژی رشد کلنی در ۳۰ درجه سلسیوس و همچنین رنگ کلنی در محیط کشت YDC، آزمـون رشد هوازی/ بی هوازی و نیز تولید و یا عدم تولید رنگ فلورسانت در محیط کشت King's B انجام شد (Leifson & Hugh 1953; Schaad *et al.* 2001).

واکنش PCR اختصاصی برای ردیابی Xanthomonas translucens

برای شناسایی دقیق‌تر جدایه‌های مشکوک به *Xt* که در محیط کشت WBC به رنگ زرد لعابدار دیده می‌شد، از پرایمرهای T1 و T2 با توالی (5'-CCGCCATAGGGCGGAGCACCCCGAT-3') و (5'-GCAGGTGCGACGTTTGCAGAGGGATCTTCTGCAAA-3') استفاده شد (Maes *et al.* 1996). استخراج DNA جدایه‌ها با روش تغییر یافته (Rademaker & De Bruijn 1997) انجام شد. ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون از کشت تازه باکتری‌ها در آب مقطر استریل تهیه و پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر KOH ۱۰ درصد، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس حرارت داده شد، پس از شفاف شدن محلول، میکروتیوب‌ها به مدت دو دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رونشین پس از تعیین کیفیت و کمیت با استفاده از نانودراپ به عنوان DNA الگو استفاده شد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با ترکیب ۱۲/۵ میکرولیتر Taq 2x Master Mix Red (آمپلیکون، دانمارک)، ۰/۱ میکرومولار از هر پرایمر، دو میکرولیتر DNA و تکمیل حجم با آب در سیکل دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۵۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه انجام شد (Fatmi *et al.* 2017).

توالی‌یابی و همردیفی

برای شناسایی دقیق‌تر جدایه‌های *Erwinia*، تکثیر و تعیین توالی ناحیه ژن حفاظت شده 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای:

1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) و 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) انجام شد (Lane1991). واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از بافر Taq 2x Master Mix Red با چرخه‌های دمایی واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام شد. محصول تکثیر شده جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت Bio Magic gene (کشور چین) ارسال

شد. شباهت توالی‌های دریافت شده با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی NCBI و EzTaxon-e بررسی شد. سپس توالی‌ها در بانک اطلاعاتی ژنومی NCBI ثبت شدند.

تعیین میزان هاله بازدارندگی

برای تعیین هاله بازدارندگی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *X. translucens* با غلظت ۱۰^۷×۱ CFU/ml روی محیط کشت NAS به‌طور یکنواخت پخش شد. پس از خشک شدن سطح محیـط کشت، جدایه‌های *Ep* بصورت لکه‌ای کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، قطر هاله بازدارنده بر مبنای میلی‌متر با یک خط‌کش اندازه‌گیری شد.

تعیین فعالیت هسته یخ

جدایه‌های باکتری روی محیط کشت آگار مغذی با ۱/۵ درصد گلیسرین کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند؛ سپس ازجدایه‌ها در آب مقطر استریل، سوسپانسیون تهیه شد و غلظت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر به ۱۰^۸ CFU/ml در OD_{600} تنظیم گردید. از هر سوسپانسیون ۱۰ قطره ۱۰ میکرولیتری بر روی ورقه‌های نازک آلومینیمی قایق شکل آغشته به پارافین ریخته شد. سپس این قایق‌های آلومینیومی روی حمام یخ شناور شد و پس از ۳۰ ثانیه تعداد قطرات یخ زده یادداشت شدند (Schaad *et al.* 2001).

بررسی تولید مواد فرار

فعالیت ضد باکتریایی مواد فرار تولید شده توسط باکتری‌های *Ep* در برابر *Xt* بر روی محیط کشت آگار مغذی با استفاده از روش کشت دوگانه ارزیابی شد. در این روش تشتک پتری حاوی کشت ۲۴ ساعته باکتری *Ep* و پتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون پخش شده باکتری *Xt* (OD_{600} =۱) با پارافیلم متصل و سپس در دمای ۲۸-۲۶ درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری شدند. تعداد کلنی‌های رشد یافته در تشتک پتری حاوی بیمارگر برای بررسی اثر مواد فرار شمارش شدند (Etminani *et al.* 2022).

تولید ایندول استیک اسید، فسفاتاز، لیپاز، پروتئاز و سلولاز

در جدایه‌های *Ep* میزان تولید ایندول استیک اسید با استفاده از معرف Salkowski's (Bent *et al.* 2001)، قابلیت حل کنندگی فسفات (Castagno *et al.* 2011)، توانایی تولید آنزیم سلولاز با استفاده از محیط کشت Czapek Mineral Salt Agar Medium (Borkar, 2017)، تولید پروتئاز (Majumdar & Chakraborty 2017) و لیپاز (Egorov, 1965) ارزیابی شد.

بررسی خود تجمعی (Autoaggregation)، کمک تجمعی (Coaggregation) و بیوفیلم در جدایه‌های E. persicina

برای بررسی توانایی جدایه‌های *Ep* در خود تجمعی یا درجه گردآمدگی باکتری‌های همگون (Autoaggregation) و نیز میزان کمک تجمعی(Coaggregation) دو باکتری *Ep* و *Xt* به ترتیب سوسپانسیون باکتری *Ep* و ترکیب حجم‌های مساوی از سوسپانسیون دو باکتری *Ep* و *Xt*، هر کدام با چگالی نوری ۰/۳ در دمای اتاق به مدت دو ساعت در حالت سکون نگهداری و سپس با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شدند (López *et al.* 2018). جذب نوری مایع رونشین حاصله برای تعیین درجه انباشتگی تعیین و طبق روش Nyenje *et al.* (2012) توانایی خود تجمعی و کمک تجمعی باکتری *Ep* محاسبه شد.

تشکیل بیوفیلم از طریق سنجش کمی با استفاده از پلیت‌های الایزا (ELISA Plates) با رنگ‌آمیزی کریستال ویوله (Sorroche *et al.* 2012) مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان جذب نوری کریستال ویوله حل شده در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Micro ELISA Auto Reader ثبت و سپس امتیاز دهی و تحلیل نتایج با استفاده از روش بیسون انجام شد (Basson *et al.* 2008).

بررسی اثر سینرژیستی یا آنتاگونیستی جدایه‌های منتخب Ep بر باکتری Xt در شرایط گلخانه

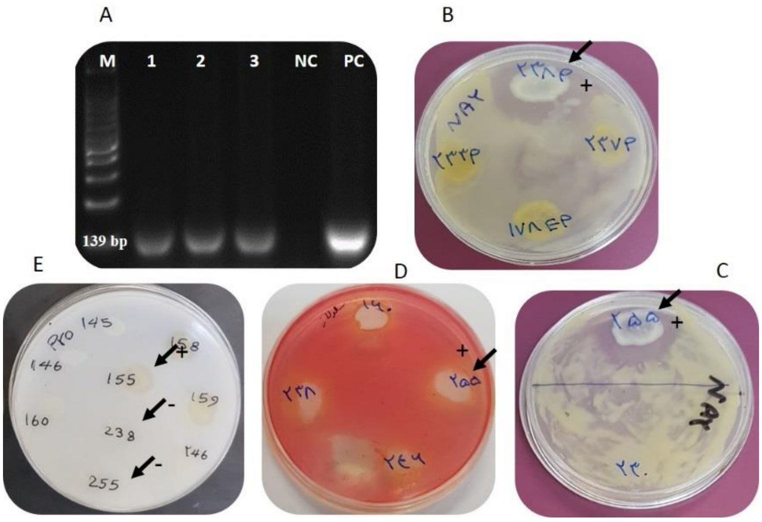
اثر مستقیم و غیر مستقیم سینرژیستی یا آنتاگونیستی جدایه‌های منتخب *Ep* روی باکتری *Xt*، با دو روش آلوده‌سازی خاک و اسپری زادمایه بیمارگر روی گیاه بررسی شد. در روش آلوده سازی خاک، ابتدا خاک گلدان‌ها با سوسپانسیون باکتری *Xt* به نسبت۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱۰^۷ ×۱ CFU/ml در ده گرم خاک، آلوده شدند. سپس بذور تیمار شده با جدایه‌های *Ep* در گلدانهای مذکور کشت شدند. در روش اسپری زادمایه بیمارگر، بذور تیمار شده با جدایه های *Ep* در خاک فاقد آلودگی کشت و ده روز بعد گیاهچه ها با اسپری سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱۰^۷ ×۱ CFU/ml آلوده و در شرایط مرطوب (رطوبت بیش از ۹۰ درصد) و در دمای ۳۰-۲۸

درجه سلسیوس نگهداری شدند. کشت بذور بدون تیمار در خاک آلوده و نیز گیاهچه‌های حاصل از بذور بدون تیمار که از طریق اسپری سوسپانسیون باکتری آلوده شدند به عنوان شاهدهای آلوده و کشت بذور تیمار شده و نشده در خاک سالم به عنوان شاهدهای منفی در نظر گرفته شدند. یک هفته تا ۳۰ روز پس از کشت، ظهور علائم به صورت روزانه بررسی شد. در روش آلوده سازی خاک، شدت بیماری در روز بیستم و سی‌ام پس از آلوده سازی و در روش اسپری سوسپانسیون، ۱۰ روز پس از آلوده سازی مبنای محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) قرار گرفت. شدت علایم بیماری ده، بیست و سی روز بعد از آلودگی اندازه گیری شد. برای ارزیابی شدت بیماری از مقیاس ۶-۰ با اندکی تغییر به شرح ذیل استفاده شد (Milus & Mirlohi 1994; Duveiller 1994). ۰= بدون علایم مشهود، ۱= کلروز بدون آبسوختگی در نوک و حاشیه ۲۰٪ برگ‌ها، ۲= قهوه ای شدن حاشیه و خطوط نواری ۴۰٪ برگ‌ها، ۳= قهوه ای شدن و آبسوختگی ۶۰٪ برگ‌ها، ۴= قهوه ای شدن و آب سوختگی ۸۰٪ برگ‌ها، ۵= قهوه ای شدن و آب سوختگی ۱۰۰٪ برگ‌ها و ۶= مرگ کامل یا خشکیدگی کامل.

آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد و نتایج در سطح احتمال ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago) تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

از نمونه‌های بذری گندم برداشت‌شده از مناطق آلوده به بیماری نواری باکتریایی گندم، تنها در سه نمونه بذری از دو استان مرکزی (شهرستان شازند) و لرستان (شهرستان پل دختر) ضمن ردیابی مولکولی آلودگی باکتری *Xt* (شکل ۱)، سه جدایه از جنس *Erwinia* نیز جدا شد. بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA، هر سه جدایه منتخب بیش از ۹۵ درصد شباهت با گونه *E. persicina* نشان دادند. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی هر سه جدایه گرم منفی، دارای رشد هوازی و غیر هوازی و اکسیداز منفی تشخیص داده شدند.



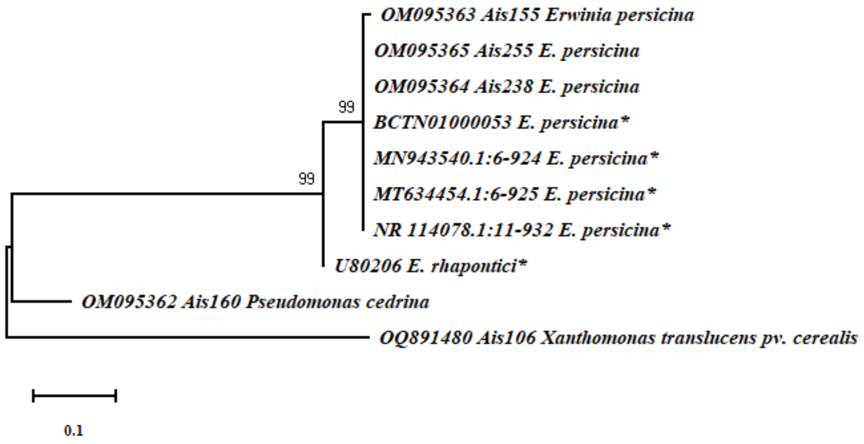
شکل۱. A: ردیابی باکتری *Xanthomonas translucens* از توده‌های بذری با استفاده از آزمون PCR و پرایمر اختصاصی با محصول ۱۳۹ جفت باز، **B** و **C**: به ترتیب هاله بازدارندگی ناشی از فعالیت جدایه Ais238 و Ais255 در برابر باکتری *X. translucens*، **E** و **D**: به ترتیب تولید آنزیم سلولاز توسط دو جدایه Ais255 و Ais238 و نیز تولید آنزیم پروتئاز توسط جدایه Ais155.

Figure 1. A: Detection of *Xanthomonas translucens* from seed lots using PCR and specific primer with 139 bp product, **B** and **C**: Respectively, the inhibition zone caused by the activity of isolates Ais238 and Ais255 against *X. translucens*, **E** and **D**: Respectively cellulase enzyme activity by Ais255 and Ais238 and production of protease enzyme by Ais155 isolate.

هم‌ردیفی توالی‌های به دست آمده در تحقیق حاضر با توالی-های موجود در پایگاه‌های داده NCBI و EzTaxon، مشابهت جدایه‌ها با جدایه‌های رفرنس *E. persicina* را مشخص نمود (شکل ۲).

هر سه جدایه *Ep* بصورت اپیفیت در سطح بذر گندم مستقر بودند و هیچ جمعیت اندوفیتی از این باکتری در بذر گندم ردیابی نشد (جدول ۱). پیش از این نیز مطالعات متاآنالیز میکروبیوم بذر (اپیفیت و اندوفیت) ۵۰ گونه گیاهی، باکتری *Ep* را به عنوان

یکی از اجزای اصلی هسته میکروبیوم بذر در برخی گونه های گیاهی معرفی نموده است (Simonin *et al*. 2022). باکتری *Ep* می‌تواند از بذر وارد جوانه‌ها شده و حتی در برخی میزبان‌ها باعث ایجاد بیماری شود (Zhang & Nan 2014b).



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Erwinia persicina* مربوط به تحقیق حاضر با جدایه رفرانس BCTN000053 بر اساس توالی 16S rRNA؛ از *Xanthomonas translucens* و *Pseudomonas cedrina* بعنوان جدایه های برون گروهی استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbour-joining با برنامه MEGA6 ترسیم و تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد. توالی‌های فاقد علامت ستاره جدایه‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر است.

Figure 1. Phylogenetic tree of *Erwinia persicina* isolates in this study with reference isolate BCTN000053 based on 16S rRNA sequence. *Xanthomonas translucens* and *Pseudomonas cedrina* were used as outgroup isolates. Phylogenetic tree was constructed using Neighbour-joining method using MEGA6 software with bootstrap values calculated from 1000 replicates. Sequences didn't mark with an asterisk correspond to the isolates analyzed in the present study.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد *Ep* روی گیاهچه‌های گندم علائم بیماری ایجاد ننمود و واکنش فوق حساسیت آن نیز روی گیاه توتون منفی ارزیابی شد (جدول ۱). هرچند در گزارش‌های متعددی بر بیماری‌زا بودن این باکتری روی حبوبات، خیار، خربزه، کدو سبز، گوجه فرنگی، کاهو، کرفس، جعفری، سیر و جو اشاره شده است (Zhang & Nan 2014a; Yao *et al*. 2022). بیماری‌زایی *Ep* روی کاهو در ایران نیز گزارش شده است (Keshavarz-Tohid & Ebrahimi 2023). همچنین گزارش شده که تلقیح بذر گندم نان در مرحله شیری شدن با باکتری مذکور سبب بروز عارضه بذر صورتی شده است (Kawaguchi *et al*. 2021).

جدول ۱. ویژگی ها، منشا و محل جداسازی جدایه‌های *Erwinia persicina*.

Table 1. Characteristics, origin and location of *Erwinia persicina* isolates.

Isolate	Province	Location in the seed	NCBI accession number of 16S rRNA	Gram	Oxidase	O/F	HR on tobacco leaf	Pathogenicity on wheat seedlings	Colony color and type in YDC medium
Ais155	Markazi	Epiphyte	OM095363	-	-	+	-	-	Pink-mucoid
Ais 238	Lorestan	Epiphyte	OM095364	-	-	+	-	-	Pink-mucoid
Ais 255	Lorestan	Epiphyte	OM095365	-	-	+	-	-	Pink-mucoid

در بررسی آزمایشگاهی اثر *Ep* بر باکتری بیمارگر *Xt*، مشخص شد هر سه جدایه هاله بازدارندگی مؤثری علیه باکتری بیمارگر *Xt* ایجاد کردند. ترشح مواد خارج سلولی توسط جدایه-های *Ep*، بازدارندگی رشد کلنی *Xt* در شرایط آزمایشگاهی را سبب شد. بیشترین میزان هاله بازدارندگی توسط جدایه Ais255 تا حدود ۱۳ میلی‌متر و کمترین هاله بازدارندگی با هفت میلی‌متر توسط جدایه Ais155 در برابر *Xt* ایجاد شد (جدول ۲). بررسی فاکتورهای مختلف دخیل در بیماریزایی یا فعالیت آنتاگونیستی این باکتری نشان داد جدایه استان مرکزی Ais155 در ویژگی-های ارزیابی شده از دو جدایه استان لرستان متفاوت بود (جدول ۲). وجود بیوفیلم و آنزیم‌های لیپاز، فسفاتاز و پروتئاز وجه تمایز جدایه Ais155 از دو جدایه لرستان Ais238 و Ais255 بود.

فعالیت آنزیمی سلولاز که سبب تخریب دیـواره سلول گیاهی می‌شود در دو جدایه لرستان بارز بود. پیش از این پژوهش‌ها نشان دادند که باکتری *Ep* در بذر یونجه مستقر شده و قادر است از بذر به سمت ریشه توسعه یافته و سبب بروز بیماری پژمردگی یونجه شود. آنها وجود فاکتورهای مختلف بیماریزایی نظیر آنزیم‌های پکتنیاز، سلولاز، پروتئـاز، لیپـاز، زایلاناز و نوکلئاز را در این بـاکتری گزارش کردند (Yao *et al.* 2022).

جدول۲. برخی فاکتورهای بیماری‌زایی یا آنتاگونیستی جدایه‌های *Erwinia persicina*.

Table 2. Some pathogenicity or antagonistic factors of *Erwinia persicina* isolates.

Isolate	IAA	Cellulase	Protease	Phosphatase	Lipase	Volatile compounds	Inhibition zone (mm)	Ice nucleation	Coaggregation *Ep-Xt*	Autoaggregation	Biofilm
Ais155	-	-	+	+	+	-	7 ± 0.5^{c}	-	46.39	2.07	+
Ais 238	-	+	-	-	-	-	9 ± 0.5^{b}	-	35.32	1.52	-
Ais 255	-	+	-	-	-	-	13 ± 1^{a}	-	41.17	1.52	-

– Negative; +weak positive; ++intermediate; +++strong positive

در بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص شد تیمار بذر با باکتری *Ep* باعث کندی شروع و توسعه بیماری تا روز بیست و یکم ارزیابی شد. اما بررسی علائم بیماری در روز سی‌ام نشان داد بذور تیمار شده در مقایسه با بذور بدون تیمار در بستر خاک آلوده به *Xt* شدت بیشتری از بیماری را متحمل شده‌اند. در شرایط آلوده‌سازی از طریق اسپری زادمایه بیمارگر روی گیاهچه‌های حاصل از بذر تیمار شده با جدایه Ais255 در خاک فاقد آلودگی، به طور معنی‌داری کمترین میزان بیماری در مقایسه با سایر جدایه‌ها و شاهد بیمار مشاهده شد (جدول ۳) که به نظر می‌رسد این جدایه علی‌الرغم ایجاد هاله بازدارندگی بزرگ در برابر *Xt*، می‌تواند به طور غیر مستقیم مقاومت نسبی گیاه را در مقابل حمله باکتری بیماریزا افزایش دهد. به نظر می‌رسد که اثر غیرمستقیم یعنی فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه می‌تواند باعث کاهش شدت و سرعت رشد بیماری شود که اثبات این پدیده نیازمند مطالعات بیشتری در آینده است. برخی بررسی‌ها نشان داده است باکتری *Ep* به دلیل تولید رنگدانه‌های صورتی که از متابولیت‌های ثانویه این باکتری به شمار می‌رود، می‌تواند در کنترل برخی بیماری‌ها مؤثر عمل نماید (Xu *et al.* 2017). جزء اصلی رنگدانه صورتی ترکیبی با عنوان اوسامبارنسین است که اثر بازدارندگی مناسبی در برابر برخی قارچ‌های بیماریزای گیاهی داشته است (Zhang *et al.* 2022). رنگدانه‌ها از طریق دخالت در انتقال الکترون سلول‌های میزبان (Kaufmann *et al.* 2005)، تنظیم مکانیسم‌های ایمنی، اثرات ضد باکتریایی را نمایان می‌کنند (Ge *et al.* 2020).

جدول۳. مقایسه میانگین شدت و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری نواری باکتریایی در گیاهان گندم حاصل از بذر تیمار شده با *Erwinia persicina*.

Table 3. Mean comparison of BLS disease severity and the AUDPC in wheat plants which obtained from *Erwinia persicina* treated seeds.

Seed treatment with *E. persicina*	Severity of disease 21 DPC in contaminated soil	Severity of disease 30 DPC in contaminated soil	AUDPC in period of 21 – 30 DPC in contaminated soil	Severity of disease 10 days after spraying *Xt* on wheat plantlets in the healthy soil
Ais155	13.46^{ab}	97.5^{a}	542.3^{a}	23.56^{b}
Ais 238	9.95^{b}	100^{a}	549.74^{a}	30.9^{a}
Ais 255	8.995^{bc}	78.64^{b}	438.2^{b}	12.72^{c}
No treatment	16.482^{a}	76.83^{b}	448.07^{b}	22.96^{b}

DPC: Days Post of Cultivation
(Dissimilar letters mean significant difference at the 5% probability level)

شدت بیماری در ارزیابی روز سی‌ام و به ویژه در روش اسپری بیمارگر توسط دو جدایه Ais238 و Ais155 به صورت معنی داری نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۳). جدایه Ais155 با قابلیت تولید آنزیم‌های پروتئاز، فسفاتاز، لیپاز و بیوفیلم و میزان خود تجمعی و کمک تجمعی و جدایه Ais238 با تولید سلولز و احتمالاً سایر متابولیت‌های ثانویه (که در این تحقیق شناسایی نشد) قادر به تشدید بیماری نواری باکتریایی گندم شدند. وجود بیوفیلم باعث حفاظت باکتری در شرایط نامناسب شده و به عنوان یک فاکتور مهم در باکتریهای انسانی و گیاهی شناخته شده است (Bogino *et al.* 2013; Soares *et al.* 2014).

علاوه بر قابلیت خود تجمعی، ویژگی کمک تجمعی با باکتریهای متفاوت از نظر ژنتیکی، اهمیت زیادی در تشکیل بیوفیلم و بیوفیلم مخلوط با عامل بیمارگر دارد که از نظر

اکولوژیکی بسیار حائز اهمیت است و در قدرت بیماری‌زایی بیمارگر یا کنترل کنندگی عوامل بیوکنترل نقش مهمی ایفا می نماید (Bogino *et al*. 2013). به خوبی مشخص شده است که توان تجمعی و توسعه بیوفیلم باکتری‌ها و رابطه این فرایند ها با قدرت کلنیزاسیون گیاه بستگی به عوامل سطحی و خارج سلولی باکتری‌ها دارد (Bogino *et al*. 2013). در تحقیقات پیشین گزارش شده باکتری *Ep* مقادیر زیادی اگزوپلی ساکارید اسیدی تولید می‌کند که در مراحل اولیه توسعه بیوفیلم نقش دارد (Kiessling *et al*. 2005). گزارش شده است که تولید بیوفیلم توسط این باکتری می‌تواند نقش مؤثری در تعامل با سایر عوامل بیمارگر ایفا نماید (Deroo *et al*. 2022) باکتری *Ep* روی لگوم‌ها به عنوان بیمارگری شناخته شده است که قابلیت بقاء در بذور این گیاهان را دارا می‌باشد (Zhang & Nan 2014b). وجود اگزوپلی ساکاریدها فضای مناسبی را برای استقرار میکرو ارگانیسم‌های مختلف در جریان تشکیل بیوفیلم روی بذر ایجاد می‌نماید (Kiessling *et al*. 2005).

هر سه جدایه بررسی شده در تحقیق حاضر فاقد توانایی تولید ایندول استیک اسید (IAA) بودند. IAA نوعی محرک و تنظیم کننده رشد گیاه و ریشه آن است (Scarpella *et al*. 2006). تاکنون تحقیقات متعددی نشان داده بیشتر باکتری‌های همراه گیاهان قادر به تولید هورمون IAA می باشند (Finkel *et al*. 2020). در موارد بسیار محدودی وجود این هورمون در باکتری *Ep* گزارش شده است (Goryluk-Salmonowicz *et al*. 2018). بعلاوه در برخی از گزارش‌ها بر نقش IAA در بیماریزایی نیز تاکید شده است (Goryluk-Salmonowicz *et al*. 2018; Liang *et al*. 2021; Yao *et al*. 2022).

نتایج تحقیقات نشان داده که باکتری بذرزاد *Ep* اثرات منفی در رشد گیاهچه و ریشه گیاه یونجه داشته است همچنین کاهش وزن تر گیاه، کاهش کلروفیل b، کاروتنوئید و نیز کاهش سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای از اثرات منفی تیمار بذر یونجه با این باکتری گزارش شده است (Yao *et al*. 2022). تحقیق حاضر نشان داد باکتری *Ep* قادر به استقرار روی بذر گندم است. این بدین معنی است که بذر آلوده می‌تواند پراکنش وسیع آن را در پی داشته باشد و به عنوان یک خطر بالقوه در میزبان‌های متعدد نظیر لگوم‌ها، یونجه، جو و برخی سبزیجات باعث بروز خسارت گردد (Zhang & Nan 2014b; Yao *et al*. 2022). نتایج مطالعه حاضر نشان داد برخی جدایه‌های باکتری *Ep* با اثرات فزاینده می‌توانند منجر به افزایش خسارت بیماری نواری باکتریایی شود. انجام تحقیقات تکمیلی برای درک جنبه‌های مختلف فعالیت بیماریزایی این باکتری بذرزاد روی سایر محصولات در ایران و تعامل آن با سایر عوامل بیماریزای گیاهی حائز اهمیت است.

References

Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta R, 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the Enterobacteriales: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 66(12): 5575–5599.

Afkhamifar A, Moslemkhani C, Hasanzadeh N, Razmi J, 2023. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* with antagonistic effect on *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis*, plays a dual role in the legumes-wheat rotation system. *European Journal of Plant Pathology* 165(4): 611–621.

Aiello D, Vitale A, La Ruota AD, Polizzi G, Cirvilleri G, 2017. Synergistic interactions between *Pseudomonas spp.* and *Xanthomonas perforans* in enhancing tomato pith necrosis symptoms. *Journal of Plant Pathology* 731–740.

Baruzzi F, Cefola M, Carito A, Vanadia S, Calabrese N, 2012. Changes in bacterial composition of zucchini flowers exposed to refrigeration temperatures. *The Scientific World Journal* 127805.

Basson A, Flemming LA, Chenia HY, 2008. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae* like isolates. *Microbial Ecology* 55: 1–14.

Bent E, Tuzun S, Chanway CP, Enebak S, 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 47(9): 793–800.

Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Murray TD, Smiley RW, 2010. Compendium of Wheat Diseases and Pests. 3th edition, *American Phytopathological Society Press*. 171-pp.

Bogino PC, de las Mercedes Oliva M, Sorroche FG, Giordano W, 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular*

Sciences 14(8): 15838–15859.

Borkar SG, 2017. Laboratory Techniques in Plant Bacteriology. CRC Press. 320-pp.

Castagno LN, Estrella MJ, Sannazzaro AI, Grassano AE, Ruiz OA, 2011. Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from Lotus tenuis rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of Applied Microbiology* 110(5): 1151–1165.

Chee-Sanford JC, Williams MM, Davis AS, Sims GK, 2006. Do microorganisms influence seed-bank dynamics? *Weed Science* 54(3): 575–587.

Dandve MS, Wagh SG, Bhagat PR, Pawar K, Timake, SA, *et al.,* 2019. Bacterial and fungal pathogen synergetics after co-infection in the wheat (Triticum aestivum L.). *Biotechnology Journal International* 23(4): 1–9.

Deroo W, De Troyer L, Dumoulin F, De Saeger S, De Boevre M, *et al.,* 2022. A novel in planta enrichment method employing *Fusarium graminearum*-infected wheat spikes to select for competitive biocontrol bacteria. *Toxins* 14(3): pp. 222.

Duveiller E, 1994. A study of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* populations associated with symptomless wheat leaves. *Parasitica* 50(3/4): 109–117.

Duveiller E, Bragard C, Maraite H, 1997. Bacterial leaf streak and black chaff caused by *Xanthomonas translucens*. *The Bacterial Diseases of Wheat. Concepts & Methods of Disease Management* 25–47.

Egorov NS, 1965. Microbe Antagonists and Biological Methods of 212 pp.

Etminani F, Harighi B, Mozafari AA, 2022. Effect of volatile compounds produced by endophytic bacteria on virulence traits of grapevine crown gall pathogen, *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientific Reports* 12(1): 10510.

Fallahzadeh-Mamaghani V, Alizadeh Aliabadi A, Shirzad A, 2016. Screening of fluorescent pseudomonads based on production of siderophore and induction of plant ethylene production for induction of systemic resistance against wheat bacterial leaf streak. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 47(2): 277–292.

Fatmi M, Walcott RR, Schaad NW, 2017. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material. 2nd ed, 372 pp.

Finkel OM, Salas-González I, Castrillo G, Conway JM, Law TF, *et al.,* 2020. A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome. *Nature* 587(7832): 103–108.

Ge P, Scholl D, Prokhorov NS, Avaylon J, Shneider MM, *et al.,* 2020. Action of a minimal contractile bactericidal nanomachine. *Nature*. 580: 1–5.

Goryluk-Salmonowicz A, Orzeszko-Rywka A, Piórek M, Rekosz-Burlaga H, Otlowska A, *et al.,* 2018. Plant growth promoting bacterial endophytes isolated from Polish herbal plants. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 17(5): 101-110.

Hao MV, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Kosako Y, Komagata K, 1990. *Erwinia persicinus*, a new species isolated from plants. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 40(4): 379–383.

Habibian M, Alizadeh Aliabadi A, Hayati J, Rahimian H, 2021. Investigation of the phenotypic 294 and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pathovars, the causal agents of bacterial leaf streak of wheat and barley in parts of Iran. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 44: 33–50.

Huang HC, Hsieh TF, Erickson RS, Erickson RS, 2003. Biology and epidemiology of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed and crown rot of plants. *Plant Pathology Bulletin* 12: 69–76.

Kaufmann GF, Sartorio R, Lee SH, Rogers CJ, Meijler MM, *et al*., 2005. Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-Oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 309–314.

Kawaguchi A, Abe D, Saito T, Nogata Y, Nomiyama K, *et al.,* 2021. Pink seed of barley caused by *Erwinia persicina*. *Journal of General Plant Pathology* 87: 106–109.

Kawaguchi A, Ishikawa N, Tomioka K, 2018. First report of pink seed of barley caused by *Erwinia rhapontici*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 85: 307.

Keshavarz-Tohid V, Ebrahimi S, 2023. Phylogeny, phenotypic characteristics and pathogenicity of Sphingomonas sp. and *Erwinia persicina* as bacterial causal agents of lettuce diseases in southwest of Iran. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 127: 102124.

Kiessling P, Sof'ya NS, Ramm M, Knirel YA, 2005. Structural studies on the exopolysaccharide from *Erwinia persicina*. *Carbohydrate Research* 340(11): 1761–1765.

Lamichhane JR, Venturi V, 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science* 6: 385.

Lane DJ, 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic acid Techniques in Bacterial Systematics*. 115–176.

Leifson E, Hugh R, 1953. Variation in shape and arrangement of bacterial flagella. *Journal of Bacteriology* 65(3): 263–271.

Liang D, Guo J, Hou F, Bowatte S, 2021. High level of conservation and diversity among the endophytic seed bacteriome in eight alpine grassland species growing at the Qinghai Tibetan Plateau. *FEMS Microbiology Ecology* 97(6): fiab060.

López SMY, Pastorino GN, Franco MEE, Medina R, Lucentini CG, *et al.,* 2018. Microbial endophytes that live within the seeds of two tomato hybrids cultivated in Argentina. *Agronomy* 8(8): 136.

Maes M, Garbeva P, Kamoen O, 1996. Recognition and detection in seed of the Xanthomonas pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 63–69.

Majumdar SUKANTA, Chakraborty USHA, 2017. Optimization of protease production from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* showing antagonistic activity against phytopathogens. *The international Journal of Pharma and Biosciences* 8(2): 635–642.

Milus EA, Mirlohi AF, 1994. Use of disease reactions to identify resistance in wheat to bacterial streak. *Plant Disease* 78(2): 157–161.

Nechwatal J, Theil S, 2019. *Erwinia persicina* associated with a pink rot of parsley root in Germany. *Journal of Plant Diseases & Protection* 126: 161–167.

Orel DC, 2020. *Erwinia persicina* as the new causal agent of lettuce soft rot. *European Journal of Plant Pathology* 158(1): 223–235.

Nyenje ME, Green E, Ndip RN, 2012. Biofilm formation and adherence characteristics of *Listeria ivanovii* strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. *The Scientific World Journal* 873909.

Rademaker JL, De Bruijn FJ, 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. *DNA Markers: Protocols, Applications, & Overviews* 151–171.

Robinson RJ, Fraaije BA, Clark IM, Jackson RW, Hirsch PR, *et al.,* 2016. Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant & Soil* 405: 381–396.

Scarpella E, Marcos D, Friml J, Berleth T, 2006. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes & Development* 20(8): 1015–1027.

Schaad NW, Jones JB, Chun W, 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3th edition, American Phytopathological Society Press.

Simonin M, Briand M, Chesneau G, Rochefort A, Marais C, *et al.,* 2022. Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *New Phytologist* 234(4):1448–1463.

Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caiero J, d'Azevedo PA, 2014. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 5: 634–637.

Sorroche FG, Spesia MB, Zorreguieta Á, Giordano W, 2012. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Applied & Environmental Microbiology* 78(12): 4092–4101.

Tambong JT, Xu R, Gerdis S, Daniels GC, Chabot D, *et al.,* 2021. Molecular analysis of bacterial isolates from necrotic wheat leaf lesions caused by *Xanthomonas translucens*, and description of three putative novel species, *Sphingomonas albertensis* sp. nov., *Pseudomonas triticumensis* sp. nov. and *Pseudomonas foliumensis* sp. nov. *Frontiers in Microbiology* 12: 666689.

Tsuji M, Kadota I, Takikawa Y, 2020. Genetic and phenotypic characterization of bacterial strains isolated in Japan that resemble *Erwinia rhapontici* and *E. persicinus*. *Journal of General Plant Pathology* 86(1): 24–33.

Xu T, Li Y, Zeng X, Yang X, Yang Y, *et al.,* 2017. Isolation and evaluation of endophytic *Streptomyces endus* OsiSh2 with potential application for biocontrol of rice blast disease. *Journal of the Science* *of Food & Agriculture* 97(4): 1149–1157.

Yao B, Huang R, Zhang Z, Shi S, 2022. Seed-Borne *Erwinia persicina* affects the growth and physiology of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Microbiology* 13: 891188.

Zhang Y, Liu X, Li X, Zhao L, Zhang H, *et al.,* 2022. Physicochemical Properties and Antibiosis Activity of the Pink Pigment of *Erwinia persicina* Cp2. *Agriculture* 12(10): 1641.

Zhang Z, Nan Z, 2014a. *Erwinia persicina*, a possible new necrosis and wilt threat to forage or grain legumes production. *European Journal of Plant Pathology* 139: 349–358.

Zhang Z, Nan Z, 2014b. Research progress on alfalfa bacterial diseases. *Acta Prataculturae Sinica* 23(4): 330.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons .org/licenses/by-nc/2.0/)