

INDICADORES DE AGRESIVIDAD Y MÉTODOS DE INOCULACIÓN CON BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN PLÁNTULAS Y SEMILLAS DE TRIGO ‘SERI M82’

AGGRESSIVENESS ESTIMATES AND INOCULATION METHODS OF PATHOGENIC BACTERIA ON SEEDS AND SEEDS LINGS OF WHEAT ‘SERI M82’

Alberto J. Valencia-Botín^{1*}, Leopoldo E. Mendoza-Onofre¹, Hilda V. Silva-Rojas¹, Leobigildo Córdova-Téllez¹, David Espinosa-Victoria², Ernestina Valadez-Moctezuma³ y Héctor E. Villaseñor-Mir⁴

¹ Orientación en Producción de Semillas y ² Orientación en Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Edo. de México. ³ Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Chapingo, Edo. de México. ⁴ Programa de Trigo de Temporal, Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Apartado Postal 10. 56230, Chapingo, Edo. de México.

*Autor para correspondencia (valencia@colpos.mx)

RESUMEN

En México, la agresividad de fitobacterias que atacan al trigo (*Triticum aestivum* L.) no se ha evaluado por su efecto en el crecimiento inicial de las plántulas. En Montecillo, Edo. de México, durante la Primavera 2004, en camas de arena se evaluó el efecto de tres métodos de inoculación de bacterias en la var. ‘Seri M82’ de trigo: 1) Inoculación de plántulas por aspersión; 2) Infiltración a semillas por vacío; y 3) Punción de plántulas. Se emplearon dos cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (150-3, 151-3), dos de *P. fuscovaginae* (21-5, 169-2) y tres de *Stenotrophomonas maltophilia* (150-2, 150-4 y 200-8). Los indicadores de la agresividad bacteriana fueron la longitud de plántula, el número de plántulas enfermas y la producción de materia seca de la parte aérea a los 17 y 34 d después de la emergencia (dde). Se empleó un diseño de bloques completos al azar, en arreglo de parcelas divididas con cuatro repeticiones. A los 17 dde el número de plántulas enfermas no presentó diferencias ($P \leq 0.05$) entre cepas ni entre métodos de inoculación. En cambio, a los 34 dde sólo la producción de materia seca en la parte aérea permitió detectar diferencias ($P \leq 0.05$) entre cepas, métodos de inoculación y la interacción entre ambos factores. Se concluye que la producción de biomasa, como criterio de agresividad bacteriana, fue mejor indicadora que el número de plántulas enfermas y la longitud de la plántula. La aspersión fue el mejor método de inoculación, porque redujo más la producción de materia seca aérea de la plántula. La cepa más agresiva varió según el método de inoculación; i. e., *S. maltophilia* (cepa 150-4) cuando el inóculo se asperjó, y *P. fuscovaginae* (cepa 169-2) al infiltrarla en semillas por vacío.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. fuscovaginae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, materia seca de plántula, métodos de inoculación.

SUMMARY

In México, the aggressiveness of plant pathogenic bacteria on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling initial growth has not been evaluated. During the Spring-Summer growing season of 2004 an experiment was conducted in sand beds at Montecillo, State of México, to evaluate three methods of bacterial inoculation on cv. ‘Seri M82’: 1) Inoculation on seedlings by spraying; 2) Seed vacuum-infiltration; and

3) Seedling puncture. Two strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (150-3, 151-3), two of *P. fuscovaginae* (21-5, 169-2), and three of *Stenotrophomonas maltophilia* (150-2, 150-4, and 200-8) were used. Seedling length, number of diseased seedlings, and aerial biomass dry weight production at 17 and 34 d after emergence (dae) were used as aggressiveness bacterial indicators. A complete randomized block design in a split plot arrangement of treatments with four replications was used. At 17 dae, the number of diseased seedlings did not have significant differences ($P \leq 0.05$) among bacterial strains or inoculation methods. At 34 dae the only aggressiveness indicator that produced differences ($P \leq 0.05$) among bacterial strains, inoculation methods and their interaction was the production of aerial biomass dry weight. It is concluded that the aerial production of biomass is the best indicator to evaluate the aggressiveness of bacteria. The spraying inoculation method caused the lowest production of seedling dry matter weight. *S. maltophilia* (150-4 strain) was the most aggressive strain when it was sprayed, while *P. fuscovaginae* (169-2 strain) when it was seed vacuum-infiltrated.

Index words: *Triticum aestivum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. fuscovaginae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, seedling dry matter, inoculation methods.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cuatro alimentos más importantes para la humanidad (Ávila *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2004) y es el cereal que ocupa el primer lugar mundial por superficie sembrada y volumen de cosecha (Wayne, 1995; Villaseñor, 2000). La producción de materia seca, desde la etapa de plántula hasta la cosecha, y el rendimiento pueden disminuir por la presencia de enfermedades foliares causadas por hongos, virus y bacterias, que además pueden afectar la viabilidad y la calidad de la semilla (Duveiller *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1998; Espitia y Villaseñor, 2000). En cereales, la semilla es la principal vía de transmisión de enfermedades y de

introducción de patógenos en las áreas de cultivo (Schaad y Forster, 1985; Mehta, 1990; Maude, 1996).

En condiciones naturales, las pérdidas en el rendimiento de grano de cereales causadas por bacterias dependen de la incidencia o severidad de la enfermedad, y agresividad del patógeno, las condiciones ambientales (especialmente humedad relativa y temperatura), el hospedante y la etapa fenológica en la que se encuentra el cultivo al ocurrir la infección. En el mundo, estas pérdidas varían de 5 a 50 % (Forster y Schaad, 1988; Mehta, 1990; Toben *et al.*, 1991; Duveiller *et al.*, 1997); y entre 5 y 20 % en México (Duveiller y Maraite, 1993).

Generalmente la densidad del inóculo no se puede controlar en condiciones naturales por lo que se ha optado por efectuar inoculaciones artificiales, la mayoría de las veces en condiciones de invernadero. La aspersión y la inyección son los principales métodos de inoculación de suspensiones bacterianas (Vassilev y Karok, 1986; Milus y Chalkley, 1994; Duveiller *et al.*, 1997). En los Estados Unidos se ha recurrido a la infiltración mediante vacío para asegurar la penetración de las bacterias en la semilla (Fryda y Otta, 1978); en este método, como la concentración de bacterias que se aplica de manera externa puede diferir de la que realmente penetra a los tejidos, es necesario determinar el número de colonias (población bacteriana efectiva, PBE) que se usa como inóculo o penetra a la semilla. En México aún no existen reportes de estudios en trigo en los que se haya evaluado este método.

En México, la primera enfermedad causada por bacterias en trigo, reportada en 1931, fue la “espiga negra” o “estriado bacteriano” [*Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Smith, Jones y Reddy 1919) Vauterin, Hoste, Kersters y Swings 1995]. En 1973 se reportó a *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye y Wilkie 1978, y a *Pseudomonas fuscovaginae* (ex Tanii, Miyajima y Akita 1976) Miyajima, Tanii y Akita 1983 (Duveiller y Maraite, 1993).

En trigo, la principal estrategia para enfrentar el problema de las enfermedades ha sido la resistencia genética (Mehta y Bassoi, 1993); sin embargo, en México las fuentes de resistencia para bacterias aún no se han incorporado a programas de mejoramiento genético. Tampoco se conocen estudios en los que la longitud de plántula o la producción de biomasa en esta etapa de desarrollo se empleen como indicadores de agresividad bacteriana ni su relación con el número de plántulas enfermas.

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar el efecto de tres métodos de inoculación de bacterias fitopatógenas en la longitud de plántula, producción de peso seco en la parte aérea de la plántula y número de plántulas enfermas de trigo de la var. ‘Seri M82’, en camas de germinación en

arena, así como analizar el uso de tales variables como indicadores de agresividad bacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron siete cepas bacterianas patógenas aisladas de plantas de trigo, pertenecientes a la colección de bacterias del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Dos cepas (claves 150-3 y 151-3) de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; dos (21-5 y 169-2) de *P. fuscovaginae*, y tres (150-2, 150-4 y 200-8) de *Stenotrophomonas maltophilia*. Las cepas se conservaron en medio GCYA (5 g extracto de levadura, 5 g glucosa, 40 g carbonato de calcio, 15 g agar en 1 L de agua destilada) (Schaad, 1988) a 4 °C. Para la reactivación, las cepas de *Pseudomonas* se cultivaron en medio B de King (1.5 g Mg SO₄, 1.5 g K₂ HPO₄, 15 mL glicerol, 20 g peptona, 18 g agar, en 1 L de agua destilada) (Schaad *et al.*, 2001). En *S. maltophilia* la reactivación se efectuó en medio Wilbrink-ácido bórico-cefalexina (5 g peptona, 10 g sacarosa, 0.5 g K₂HPO₄, 0.25 g MgSO₄·7H₂O, 0.05 g Na₂SO₃ (anhidro), 15 g agar, 0.75 g ácido bórico, 75 mg ciclohexamida (disuelta en 2 mL de etanol 75 %), 10 mg cefalexina (1 mL de una solución base de 10 mg mL⁻¹ en etanol 75 %) en 1 L de agua destilada (Duveiller, 1990).

Una vez reactivadas, las cepas se sembraron en cajas Petri con medio B de King, y se incubaron a 28 °C por 24 h; después se resuspendieron en 250 mL de agua destilada estéril. La suspensión resultante se ajustó con la escala de McFarland basada en turbidez, a una concentración de 10⁸ CFU mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro).

El 6 de junio de 2004, en Montecillo, Edo. de México se estableció un experimento en camas de germinación en arena para evaluar la agresividad de las siete cepas bacterianas y su interacción con tres métodos de inoculación: aspersión y punción de plántulas e infiltración por vacío de semilla de trigo (var. ‘Seri M82’). En todos los casos se aplicó la dosis 10⁸ CFU mL⁻¹.

Las inoculaciones por aspersión y punción se hicieron cuando las plántulas presentaron la primera hoja ligulada. En el primer caso se utilizó un aspersor manual (Swissmex®, México, 1 L) y la inoculación se dirigió a las plántulas. En el método de punción el inóculo se impregnó en agujas estériles de jeringas de insulina y se introdujo manualmente en tres sitios de la lámina foliar (basal, medio y distal), de manera semejante a la aplicada por Duveiller *et al.* (1997). En ambos métodos, las plántulas inoculadas se cubrieron con bolsas de plástico por 24 h para asegurar un ambiente propicio a la infección.

Para inocular al vacío, se colocaron 350 semillas (previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de

sodio 1 % y etanol 25 % por 2 min), en matraces independientes que contenían una suspensión de 10^8 CFU mL⁻¹ de cada cepa. Se aplicó vacío al matraz por 5 min (Fryda y Ota, 1978), para luego retirar las semillas de la suspensión bacteriana y colocarlas en una caja Petri para su secado, después de lo cual se procedió a la siembra. La PBE se calculó en una muestra de 10 semillas inoculadas por cepa, que se colocaron en un matraz que contenía 90 mL de suspensión bacteriana a una concentración de 10^8 CFU mL⁻¹; se agitó por 2 min y luego se hicieron diluciones seriadas de 10^{-2} hasta 10^{-5} , con tres repeticiones por cada dilución. Una alícuota de 0.1 mL de cada dilución se colocó y dispersó en una caja Petri con medio B de King. Veinticuatro horas después se contó visualmente el número de colonias en la suspensión 10^{-5} (pues fue la única en la que se pudo efectuar el conteo) y se dividió entre el número de semillas.

Los testigos respectivos consistieron de aspersiones con agua destilada estéril, punción sin inóculo y aplicación de vacío a semillas desinfestadas. Al final de la siembra, la cama de germinación se cubrió con una estructura plástica tipo túnel, misma que se mantuvo durante todo el experimento.

Se empleó un diseño de bloques completos al azar, con arreglo de tratamientos en parcelas divididas y cuatro repeticiones. Se consideró a los métodos de inoculación como las parcelas grandes y a las cepas como las parcelas chicas. La arena se esterilizó previamente con calor húmedo (70 °C) por 2.5 h. En la cama de siembra se hicieron surcos separados a 5 cm, de 1.1 m de longitud. Para cada repetición se utilizaron 25 semillas por surco, las que se sembraron a 4.4 cm de distancia.

En cada surco se contó el número de plántulas con síntomas bacterianos (estrías o manchas foliares) (Duveiller *et al.*, 1997). Además, en cuatro plántulas seleccionadas al azar de cada repetición se determinó la producción de materia seca en la parte aérea (después de permanecer en una estufa a 70 °C por 72 h) y su longitud desde la superficie del suelo hasta el ápice de la hoja ligulada más joven, a los 17 y 34 días después de la emergencia (dde). Los datos se anali-

zaron mediante SAS Institute (1999), y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas iniciales en las plántulas inoculadas mediante aspersión y vacío con las cepas 150-3 (*P. syringae* pv. *syringae*), 21-5 y 169-2 (*P. fuscovaginae*) y 150-2 y 150-4 (*S. maltophilia*) fueron estrías cloróticas que se iniciaron en la parte distal de las láminas foliares, las que posteriormente aumentaron de longitud y se tornaron de color café con apariencia húmeda, semejantes a las descritas por Duveiller *et al.* (1997). Las cepas 200-8 (*S. maltophilia*) y 151-3 (*P. syringae* pv. *syringae*) causaron estrías translúcidas en la parte distal de las láminas y generalmente no avanzaron en longitud. Esto significa que no hubo asociación específica entre los síntomas y las especies bacterianas, quizás debido a la evaluación conjunta de las siete cepas, que propicio una estrecha convivencia o cercanía de las cepas en la cama de arena, en el ambiente específico de evaluación, a diferencia de los estudios de Wilkie (1973), Duveiller y Maraite (1993) y Tillman *et al.* (1996) en donde cada cepa se investigó de manera independiente. En el método de punción, los mismos síntomas se iniciaron alrededor de las heridas, conforme lo reportado por Toben *et al.* (1991). Este es el primer caso en el que se reporta la actividad patogénica de *Stenotrophomonas maltophilia* en trigo. La publicación de su identificación, basada en secuenciación del gene 16S rDNA está en proceso.

En el caso de la aplicación de vacío a las semillas, los datos de PBE por semilla (CFU mL⁻¹ x 10) fueron: 6.7 para la cepa 200-8, 6.3 para 169-2, 1.77 para 151-3, 0.4 para 150-4, y 0.15 para 150-2, 150-3 y 21-5.

En el muestreo efectuado a los 17 dde no hubo diferencias significativas entre métodos de inoculación ni entre cepas para longitud de plúmula y producción de biomasa en la parte aérea; además, el número de plántulas enfermas en ese muestreo no fue estadísticamente diferente entre los tratamientos inoculados (datos no presentados). En cambio, en el muestreo a los 34 dde (Cuadro 1), hubo efecto significativo

Cuadro 1. Fuentes de variación, cuadrados medios y significancia estadística para las variables de longitud de plántula (LP), número de plántulas enfermas (NPE) y biomasa de parte aérea (BA), 34 días después de la emergencia del trigo var. 'Seri M82', en Montecillo, Edo. de México, durante la Primavera 2004.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios		
		LP	NPE	BA
Métodos de inoculación	2	43.36**	4.54	1.82**
Repeticiones	3	19.31*	10.03	0.00005
Error A	6	9.95	17.90	0.00004
Cepas	7	5.05	151.35**	0.23**
Métodos x Cepas	14	4.70	3.24	0.21**
Error B	63	4.73	4.86	0.00005
C V (%)		18	25	1

*, ** Significativo ($P \leq 0.05$ y 0.01 , respectivamente); C V = Coeficiente de variación.

($P \leq 0.05$) para al menos una de las tres variables vinculadas con la agresividad, lo que significa que es necesario esperar al menos 30 d para que los síntomas inducidos se expresen de manera significativa. En este muestreo la producción de biomasa fue el único criterio de agresividad en el que se detectó significancia ($P \leq 0.05$) para los métodos de inoculación, las cepas y la interacción respectiva; es decir, en comparación con longitud de plántula y número de plántulas enfermas, la producción de biomasa es un mejor indicador de agresividad bacteriana, ya que detecta con mayor frecuencia las diferencias entre fuentes de variación.

En promedio de las siete cepas bacterianas y el testigo, las plántulas de trigo acumularon menos biomasa cuando se asperjaron, seguidas por las plantas tratadas con el método de vacío o a las que se aplicaron punciones (Cuadro 2), lo que confirma que la inoculación de plántulas por aspersión es un método eficiente para evaluar la agresividad de las bacterias en plántulas de trigo. En promedio de los tres métodos de inoculación, las cepas 150-3 (*P. syringae* pv. *syringae*), 169-2 (*P. fuscovaginae*) y 150-4 (*S. maltophilia*) fueron las tres más agresivas, al reducir la acumulación de biomasa aérea de las plántulas en 18 % respecto al promedio del testigo. Sin embargo, cuando se inocularon semillas mediante infiltración al vacío con la bacteria *P. fuscovaginae* (cepa 169-2), su agresividad redujo la producción de la biomasa en 39 % del testigo, mientras que la cepa 150-4 (*S. maltophilia*) ocasionó una reducción de 26 % al inocularla mediante aspersión. Esta interacción indica que la cepa más agresiva depende del método de inoculación (Figura 1).

Llama la atención el hecho de que ninguna cepa y ningún método de inoculación hayan disminuido la longitud de

la plántula de manera significativa ($P \leq 0.05$), lo que podría atribuirse a que en este caso las mediciones se hicieron a temprana edad de las plántulas (34 dde) y no después de los 50 dde como se realizó en experimentos previos con las mismas cepas (datos no publicados). Además, de manera semejante a lo que ocurrió en el primer muestreo (17 dde) para el caso del número de plántulas enfermas como criterio de agresividad, la significancia detectada para cepas (Cuadro 2) fue ocasionada por la ausencia de plántulas enfermas del testigo, pues las siete cepas presentaron entre 9 y 10 plántulas enfermas, sin diferencias significativas entre ellas; esto indica que es un criterio menos confiable que la acumulación de materia seca, criterio que sí permitió diferenciar la agresividad entre cepas.

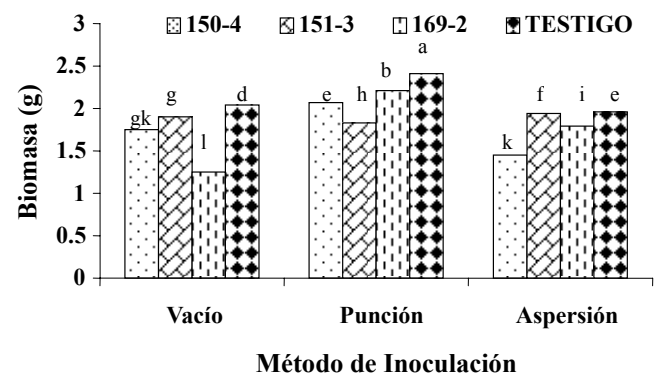


Figura 1. Biomasa (g/plántula) de la parte aérea de plántulas de trigo para tres cepas bacterianas, un testigo y tres métodos de inoculación. Barras con letras diferentes en cada método de inoculación son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Cuadro 2. Promedios de la interacción de siete cepas y tres métodos de inoculación en la producción de biomasa aérea (g) de plántulas de trigo var. 'Seri M82', 34 días después de la emergencia, en Montecillo, Edo. de México, durante la Primavera 2004.

Cepa	Métodos de inoculación			Media
	Vacío	Punción	Aspersión	
150-4	1.75 lm [†]	2.07 e	1.45 p	1.76 F
151-3	1.90 i	1.83 j	1.94 h	1.89 E
169-2	1.25 q	2.21 d	1.79 k	1.75 FG
150-2	1.62 o	2.52 a	1.78 k	1.97 C
150-3	1.74 m	1.89 i	1.61 o	1.75 FG
21-5	1.83 j	2.47 b	1.68 n	1.99 B
200-8	2.03 f	1.97 g	1.76 l	1.92 D
Testigo	2.04 f	2.41 c	1.96 g	2.14 A
Media	1.77 B	2.17 A	1.75 C	1.90

[†] Medias con diferente letra mayúscula entre métodos de inoculación o entre cepas, o con diferente letra minúscula para la interacción, son diferentes (Tukey, 0.05)

CONCLUSIONES

Al inocular siete bacterias fitopatógenas en semillas o plántulas de la variedad ‘Seri M82’, la producción de biomasa, como criterio de agresividad bacteriana, fue mejor indicadora que el número de plántulas enfermas y la longitud de la plántula. Al comparar métodos de inoculación, el mejor fue la aspersión, seguido por la infiltración de bacterias en semillas por vacío. La cepa más agresiva varió según el método de inoculación; *i. e.*, *Stenotrophomonas maltophilia* (cepa 150-4) cuando el inóculo se asperjó, y *Pseudomonas fuscovaginae* (cepa 169-2) al infiltrarla en semillas por vacío.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica Mezzalama y a la Ing. Nérída Lozano Ramírez del CIMMYT, por la donación de las bacterias utilizadas en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson P K, A A Cunningham, N G Patel, F J Morales, P R Epstein, P Daszak (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19:535-544.
- Ávila D J D, V H Santoyo C, R Schwentesius R, V H Palacio M (2001) El Mercado del Trigo en México ante el TLCAN. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM-PIAI), Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 132 p.
- Duveiller E (1990) A seed detection method of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa*, using a modification of Wilbrink's agar medium. *Parasitica* 46:3-17.
- Duveiller E, H Maraite (1993) Study of yield loss due to *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in wheat under high rainfall temperate conditions. *J. Plant Dis. Prot.* 100:453-459.
- Duveiller E, C Bragard, K Rudolph, L Fucikovsky Z (1997) General concepts and methods for the identification of pathogenic bacteria of wheat. *In: The Bacterial Diseases of Wheat. Concepts and Methods of Disease Management.* E Duveiller, L Fucikovsky, K Rudolph (eds). CIMMYT. México. pp:5-23.
- Espitia R E, H E Villaseñor M (2000) El rendimiento de grano en relación a la morfología, desarrollo y fisiología en trigo. *In: El Trigo de Temporal en México.* H E Villaseñor M, E Rangel E (eds). INIFAP, CIR-CENTRO, México. pp:53-83.
- Forster R L, N W Schaad (1988) Control of black chaff of wheat with seed treatment and a foundation seed health program. *Plant Dis.* 72:935-938.
- Fryda S J, J D Otta (1978) Epiphytic movement and survival of *Pseudomonas syringae* on spring wheat. *Phytopathology* 68:1064-1067.
- Hernández L A, H E Villaseñor M, G Barrera E, M Rosas R (1998) Efecto de las enfermedades foliares sobre la calidad y micoflora en la semilla de trigo. *Rev. Fitotec. Mex.* 21:25-35.
- Maude R B (1996) *Seedborne Diseases and Their Control: Principles and Practice.* CAB Int. Wallingford, UK. 280 p.
- Mehta Y R (1990) Management of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and *hordei* through cereal seed testing. *Seed Sci. Technol.* 18:467-476.
- Mehta Y R, M C Bassoi (1993) Guazatine Plus as a seed treatment bactericide to eradicate *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. *Seed Sci. Technol.* 21:9-24.
- Milus E A, D B Chalkley (1994) Virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* on selected wheat cultivars. *Plant Dis.* 78:612-615.
- SAS Institute (1999) SAS/STAT Introductory Guide, Version 8.0. SAS Institute. Cary, NC. USA. 1028 p.
- Schaad, N W (1988) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.* 2nd ed. Moscow, ID. 164 p.
- Schaad N W, R L Forster (1985) A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. *Phytopathology* 75:260-263.
- Schaad N W, J B Jones, W Chun (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.* APS Press. Minneapolis, MN. USA. 398 p.
- Tillman B L, Harrison S A, Russin J S, C Clark A (1996) Relationship between bacterial streak and black chaff symptoms in winter wheat. *Crop Sci.* 36:74-78.
- Toben H, A Mavridis, K W E Rudolph (1991) On the occurrence of basal glume root wheat and barley caused by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* in west Germany. *J. Plant Dis. Prot.* 98:225-235.
- Vassilev V I, S Karok (1986) Methods for artificial inoculation and evaluation of wheat resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCull.) Young, Dye, Wilkie, in various stages of development. *Plovdiv* 1:205-213.
- Villaseñor M E H (2000) Importancia del trigo. *In: El Trigo de Temporal en México.* H E Villaseñor M, E Rangel E (eds). INIFAP, CIR-CENTRO, México. pp:7-24.
- Wayne S C (1995) *Crop Production. Evolution, History and Technology.* John Wiley & Sons, Inc. USA. pp:57-127.
- Wilkie J P (1973) Basal glume rot of wheat in New Zealand. *New Zealand J. Agric. Res.* 16:155-160.