آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۹، شماره ۲، اسفند ۱۴۰۰
DOI: 10.22092/jaep.2021.353583.1390

مقاله‌ی کوتاه علمی

تولید آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی برای پاتوارهای *Xanthomonas translucens* عامل بیماری باکتریائی نواری غلات

علی علیزاده علی‌آبادی[1]✉، کلود براگارد[2]

۱- دانشیار بخش بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛
۲-استاد دانشکده مهندسی علوم زیستی، دانشگاه کاتولیک لوون، لوون لانوف، بلژیک
(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰)

چکیده

به‌منظور استفاده در فرایند تولید کیت تشخیص عامل بیماری باکتریایی نواری غلات در بذور آلوده گندم و جو، یک لاین سلول هیبریدومای تولیدکنندهٔ پادتن تک‌دودمانی در مقابل *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* (به نام L-B7) تولید شد. این لاین از الحاق سلول‌های میلومای SP2/0 با سلول‌های لنفوسیت طحال موش‌های BALB/c، مایه‌کوبی‌شده با یک جدایه از این پاتووار (UPB684 جداسازی‌شده ازجو در ایران)، تهیه شد. آنتی‌بادی مونوکلونال تولید شده با ۱۵ جدایه از پاتووار *X. t.* pv. *undulosa* و ۱۵ جدایه از پاتووار *X. t.* pv. *translucens* واکنش مثبت و با جدایه‌های دو پاتووار *X. t.* pv. *graminis* و *X. t.* pv. *poae* واکنش منفی نشان داد. سلول‌های زنده باکتری، هم به‌عنوان ایمیونوژن و هم به‌عنوان آنتی‌ژن در آزمون‌های الایزا مورد استفاده قرار گرفتند. قدرت آنتی‌بادی براساس آزمون الایزا، مناسب ارزیابی شد. از این آنتی‌بادی می‌توان برای تمایز پاتووارهای *translucens* و *undulosa*، عوامل بیماری باکتریایی نواری غلات، از سایر پاتووارها و همچنین در فرآیند تولید کیت تشخیص، استفاده کرد.
واژه‌های کلیدی: بیماری باکتریایی نواری غلات، پادتن تک‌دودمانی، جو، گندم، *Xanthomonas translucens pv. translucens*

Short comuincation

Production of specific monoclonal antibody to *Xanthomonas translucens* pathovars, the causal agents of bacterial leaf streak of cereals

A. ALIZADEH ALIABADI[1]✉, C. BRAGARD[2]

1. Associate Professor of Plant pathology Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Tehran, Iran; 2. Professor of Faculty of Bioscience Engineering, Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

Abstract

In order to be used in studies related to the production of a kit for detection of the causal agent of bacterial leaf streak of cereals, in contaminated wheat and barley seeds, a hybridoma cell line (named L-B7) secreting monoclonal antibody to *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* by fusing SP2/0 myeloma cells with splenocytes from immunized BALB/c mice with one strain of this bacteria (UPB684 isolated from barley in Iran), were produced. The monoclonal antibody produced, reacted positively with *X. c.* pv. *undulosa* (15 strains) and pv. *translucens* (15 strains). Strains from other pathovars (*X. c.* pv. *graminis* and pv. *poae*) gave a negative reaction. Antibody potency was assessed by testing in ELISA. Whole cells were used both as immunogen and as antigen in ELISA tests. This antibody could be used to differentiate *Xanthomonas translucens* pathovars, causing bacterial leaf streak of cereals, from other pathovars, as well as in the process of producing a detection kit.
Keywords: bacterial leaf streak of cereals, monoclonal antibody, wheat, barley, *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*

✉ **aalizadeh1340@yahoo.com**
©2022, The Author(s). Published by Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

مقدمه

بیماری باکتریایی نواری غلات، نخستین‌بار در آمریکا درسال ۱۹۰۲ از گندم و در ایران طی سال‌های ۱۳٦۱ و۱۳٦۲ از مزارع گندم و جو کرمان گزارش شد (Alizadeh and Rahimian, 1989). با بررسی‌های انجام گرفته توسط علیزاده و رحیمیان در سال ۱۳۸۹دو پاتوار از این باکتری، ابتدا در بعضی از مزارع کرمان و سپس از بیشتر استان‌های کشور گزارش شد، که عبارت‌اند از *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (ex Jones *et al.* 1917) Vauterin *et al.* 1995 و *X. t.* pv. *translucens* (ex Jones *et al.* 1917) Vauterin *et al.* 1995. دامنهٔ میزبانی *X. t.* pv. *translucens* محدود به جو و *X. t.* pv. *undulosa* شامل گندم، جو، چاودار، چچم، بروموس و آگروپیرون بود، اما قادر به ایجاد آلودگی در میزبان یولاف نبود (Alizadeh *et al.*, 1994). این بیماری، در سال ۱۹۹۵ از مناطق مختلف گندم‌کاری بسیاری از استان‌های ایران، گزارش شد (Alizadeh *et al.*, 1995a). ایزوله‌های مختلف جمع‌آوری‌شده از این دو پاتودار در ایران، ازنظر بیماری‌زایی متنوع بوده (Alizadeh *et al.*, 1994; Alizadeh *et al.*, 1995b) و ازلحاظ مولکولی نیز در چند گروه قرار گرفتند (Alizadeh *et al.*, 1996; Alizadeh *et al.*, 1997; Habibian *et al.*, 2021). واکنش ارقام رایج گندم در ایران و برخی از ارقام ایرانی و خارجی جو در برابر این بیماری متفاوت گزارش شده است (Alizadeh *et al.* ,1994 ; Alizadeh *et al.*, 1995c; Beiki *et al.*, 2002). درسال‌های اخیر خسارت این بیماری در مزارع گندم آبی بسیاری از مناطق کشور بالاتراز سطح‌زیان‌اقتصادی و نگران‌کننده ارزیابی شده است. باکتری عامل این بیماری می‌تواند در سطح و یا داخل دانه‌های گندم وجود داشته باشد و از سالی‌به‌سال دیگر منتقل شود (Duveiller *et al.*, 1997). استفاده از بذر سالم و عاری از آلودگی یکی‌از مهم‌ترین روش‌های کنترل این بیماری در سطح مزرعه است. یکی‌از راه‌حل‌های مناسب و ارزان برای تعیین میزان سلامتی بذر، استفاده از کیت تشخیص سریع است که کشاورز، خود، بتواند به‌راحتی و به‌سرعت از سلامت بذر خود مطلع شود. مطالعات سرولوژیکی می‌تواند در تولید کیت‌های تشخیصی مناسب، ارزان، نسبتا ساده و سریع، کمک نماید. پیشرفت‌های اخیر درزمینهٔ تکنولوژی تولید پادتن‌های تک‌دودمانی، امکان تشخیص ساده و سریع باکتری‌ها را درسطح پاتووار فراهم نموده است (Alvarez *et al.*, 1985). براگارد و وروین (۱۹۹۳) پادتن تک‌دودمانه علیه *X. t.* pv. *undulosa* (که روی گندم، جو و تعدادی از گرامینه‌های دیگر ایجاد آلودگی می‌کند)، تولید نمودند، که قادر به تمایز بین سوش‌های عامل بیماری باکتریایی نواری غلات از سایر پاتوارهای *X. translucens* بودند (Bragard and Verhoyen, 1993). در این تحقیق سعی گردید بااستفاده‌از دو جدایه از پاتوار *translucens* (که فقط روی جو بیماری‌زا است)، به‌عنوان آنتی‌ژن اقدام به تولید آنتی‌بادی تک‌دودمانه شود.

روش بررسی

از سلول‌های کامل باکتری *X. t.* pv. *translucens*، دو سوش، یکی جداشده از جو در هند (UPB[1]458 یا NCPPB2389) (Shekhawat and Patel, 1978) و دیگری جدا شده ازجو در ایران، (UPB684) (Alizadeh *et al.*, 1995a.)، به‌عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. برای ایمن‌سازی، شش موش دو تاچهارماهه از نوع BALB/c بااستفاده‌از تکنیک تزریق داخل صفاقی[2] در چهار مرحله و به‌فاصله دوهفته از یکدیگر با ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون‌های باکتری تازه (سه موش با هر سوسپانسیون به غلظت 10^{10} cfu/ml[1] در بافر PBS) مایه‌کوبی شدند (Alvarez *et al.*, 1985). سی‌روز پس‌از آخرین مایه‌کوبی، طحال موش‌های مایه‌کوبی شده، برداشته و سلول‌های طحال (سلول‌های لنفوسیت‌بی[3])، در محیط مایع EMEM[4] (EMEM: ۱۰۰میلی‌لیتر از محیط‌کشت EMEM، یک‌میلی‌لیتر استرپتومایسین و یک‌میلی‌لیتر تامپون Hepes[5])

[1] UPB = Unit of Phytopatbogenic Bacteria, UCL, Louvain-la-Neuve, Belgium
[2] interaperitoneale
[3] B lymphocytes
[4] Eagle's minimum Essential Medium
[5] Hypoxanthine, Aminopterin, thymidine

ازهم جدا و در چهار درجهٔ سلسیوس نگهداری شد (Zhang 2012). برای تهیه لایهٔ سلولی مغذی سلول‌های پریتونیال (Peritoneal) از فضای پریتونیال یک موش BALB/c غیرمایه‌کوبی شده برداشته و در پلیت‌های ۹۶ چاهکی، پخش شدند (Zhang 2012). پس‌از مخلوط و سانتریفوژ سلول‌های طحال و میلومای موشی (SP2/0) در محیط‌کشت RPMI کامل، به‌نسبت پنج به یک، بااستفاده از محلول پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG1450, Sigma) در محیط EMEM الحاق سلولی انجام و سوسپانسیون هیبریدوماهای تولیدشده در پلیت‌های ۹۶ چاهکی حاوی لایهٔ سلولی مغذی، پخش و در انکوباتور حاوی گازکربنیک در دمای ۳۷درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. از روز سوم تا حدود دوماه پس‌از آن، کلن‌های هیبریدومای درحال تکثیر و نهایتاً چاهک‌های حاوی کلن‌ها، شناسایی و کدگذاری شدند. محیط‌کشت تغییررنگ‌یافتهٔ داخل چاهک‌های حاوی هیبریدوما، جمع‌آوری و با کمک آزمون الایزا وجود یا عدم آنتی‌بادی در آن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. هیبریدوماهای تولیدکنندهٔ آنتی‌بادی موردنظر در ازت مایع منجمد و در دمای منهای ۱۹۶درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند (Hutsghemagkers *et al.*,1988).

بااستفاده از آزمون الایزا، توانائی پادتن‌های حاصله، علیه ۱۰۰میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۱۵سوش از پاتوار *translucens* و ۱۵سوش از پاتوار *undulosa* و یک‌سوش از هریک از پاتوارهای *poae* و *graminis* که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است، به‌غلظت 10^8سلول از هر سوش در میلی‌لیتر بافر BSA، ارزیابی گردید (Bragard and Verhoyen, 1993).

جدول ۱- مشخصات استرین‌های چهار پاتووار از *Xanthomonas translucens* که کارایی پادتن‌های تولیدی علیه آن‌ها مورد سنجش قرار گرفتند.

Table 1. Strains of four *Xanthomonas translucens* pathovars, against which the efficacy of the antibodies was evaluated.

Pathovar names of *X. translucens*	Collection number[1]	Country	Isolation year	Plant host	Isolated by:[2]
graminis	NCPPB2700	Switzerland	1973	*D. glomerata*[3]	NI
poae	UPB 952	Switzerland	NI	*P. trivialis*[4]	NI
translucens	UPB 907	Iran, Arak	1990	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB929	Iran, Kahnooj	1990	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB 940	Iran, Boroujerd	1990	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB 880	Libya	1990	Barley	NI
translucens	UPB 684	Iran	1984	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB 814	Iran, Abadeh	1990	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB 820	Iran, Arak	1990	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB 833	Iran, Kerman	1988	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB 852	Iran, Saveh	1989	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB 867	Iran, Darab	1990	Barley	Alizadeh *et al.*, 1995a
translucens	UPB 448	USA	1933	Barley	Reddy et al., 1924
translucens	UPB 545	Mexico	1987	Barley	Duveiller *et al.*, 1997
translucens	UPB 675	South Africa	NI	rye	Smith, *et al.*,1919
translucens	UPB 681	South Africa	NI	Wheat	Smith, *et al.*,1919
translucens	UPB 458	India	1978	Barley	Shekhawat and Patel, 1978
undulosa	UPB 903	Iran, Kerman	1989	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB 922	Iran, Kerman	1988	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB931	Iran, Malayer	1990	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB 933	Iran, Fars	1990	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB 935	Iran, Isfahan	1990	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB941	Iran, Sirjan	1989	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB 804	Iran, Dorood	1990	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB 854	Iran, Azna	1990	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB 410	Argentina	1988	Wheat	Colin *et al.*, 1990
undulosa	UPB 426	Argentina	1988	Wheat	Colin *et al.*, 1990
undulosa	UPB 443	Canada	1966	*T. turgidum*[5]	Hagborg, 1968
undulosa	UPB 513	Mexico	1987	Triticale	Duveiller *et al.*, 1997
undulosa	UPB 522	Mexico	1987	Wheat	Duveiller *et al.*, 1997
undulosa	UPB 728	Iran	1984	Wheat	Alizadeh *et al.*, 1995a
undulosa	UPB956	Canada	1966	*T. turgidum*	Hagborg, 1968

1: NCPPB, National Collection of Phytopathogenic Bacteria, Harpenden, UK;UPB, UPB = Unit of Phytopathogenic Bacteria, UCL, Louvain-la-Neuve, Belgium. 2: NI, non identified, Smith, 1917, Colin et al. 1990, Shekhawat, and Patel, 1978. 3: *Dactylis glomerata*, 4: *Poa trivialis*, 5: *Triticum turgidum*

آزمون تعیین قدرت آنتی‌بادی تولیدشده در رقت‌های سریالی از غلظت 10^{-1} تا 10^{-3} بااستفاده از تست الیزا برای استرین UPB 684 مورد بررسی قرار گرفت (Bragard and Verhoyen, 1993): به‌منظور بررسی اولیهٔ کارایی این آنتی‌بادی تک‌دودمانه در تشخیص عامل بیماری باکتریایی نواری غلات در بذرهای آلوده، آزمون ایمیونوفلورسنس (Immunofluorescence- IF) انجام شد. در این آزمون از باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*، به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد (Duveiller and Bragard, 1992).

نتیجه و بحث

از شش موش ایمن‌سازی شده تنها دو عدد تا پایان مراحل، باقی ماندند. هریک از این موش‌ها بایکی‌از آنتی‌ژن‌های UPB684 و UPB458 ایمن‌سازی شده بودند. چهارده و شش کلن سلول هیبریدوما به ترتیب از الحاق سلول‌های میلوما با سلول‌های طحال موش مایه‌کوبی‌شده با استرین‌های UPB458 و UPB 684 حاصل شد (جدول ۲). براساس آزمایشات الایزا، تنها یک‌کلن (L-B7) از الحاق سلول‌های میلوما با سلول‌های طحال موش مایه‌کوبی‌شده با استرین UPB 684 به‌دست آمد، که نسبت‌به کلیهٔ باکتری‌های عامل بیماری نواری غلات، از خود واکنش مثبت نشان داد. آنتی‌بادی تولیدشده در برابر پاتووارهای *graminis* و *poae* واکنش منفی نشان داد (جدول ۲).

میزان جذب نوری محلول آنتی‌بادی برای رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} بین یک‌ونیم تا دو بود، بنابراین توانایی آنتی‌بادی موجود در مایع روی هیبریدومای (L-B7) قابل‌قبول تلقی شد. آزمون ایمیونوفلورسنس، تنها برای باکتری‌های حاصل‌از شستشوی بذور آلوده، مثبت بود.

جدول ۲- واکنش پادتن تولیدی کلن‌های هیبریدوما با استرین‌های چهار پاتووار از *Xanthomonas translucens*.

Table 2. Clones produced from hybridoma cells and their antibody reaction with strains of four *Xanthomonas translucens* pathovars.

Antigens	Developed clones	Alived clones after melting (+)	15 strains of *X. t.* pv. *undulosa* reaction with clones supernatant	15 strains of *X. t.* pv. *translucens* reaction with clones supernatant	*X. t.* pvs. *graminis* and *poae* strains reaction with clones supernatant
UPB 458	B-F10	+	-	-	-
UPB 458	B-G10	+	-	-	-
UPB 458	E-C11	-	N	N	N
UPB 458	B-D4	+	-	-	-
UPB 458	B-D1	+	-	-	-
UPB 458	B-G12	+	-	-	-
UPB 458	B-G10	+	-	-	-
UPB 458	A-B10	+	-	-	-
UPB 458	C-A2	-	N	N	N
UPB 458	H-C2	+	-	-	-
UPB 458	H-C2	+	-	-	-
UPB 458	B-G11	-	N	N	N
UPB 458	B-D10	-	N	N	N
UPB 458	C-A2	-	N	N	N
UPB 684	I-G6	+	-	-	-
UPB 684	I-E11	+	-	-	-
UPB 684	I-F11	+	-	-	-
UPB 684	I-H7	+	-	-	-
UPB 684	**L-B7**	**+**	**+**	**+**	**-**
UPB 684	L-D8	+	-	-	-

در سال‌های اخیر، روش‌های سرولوژیک برای شناسایی سویه‌های مختلف عامل بیماری نواری غلات در کشت‌های خالص و تشخیص پاتوژن در بذر آلوده توسعه یافته است (Claflin and Ramundo, 1987; Azad and Schaad, 1988). پادتن‌های تک‌دودمانی که فقط به‌یک تعیین‌کنندهٔ آنتی‌ژنیک (epitope)واکنش نشان می‌دهند، برای تعداد زیادی از پاتووارهای گونه‌های مختلف زانتوموناس‌ها تولید شده است. براگارد و وروین چهار پادتن تک‌دودمانه علیه *X. t.* pv. *undulosa* تولید کردند (Bragard, and Verhoyen, 1993). این پادتن‌ها قادر به متمایز ساختن سوش‌های عامل بیماری باکتریایی نواری غلات از سوش‌های مربوط به سایر پاتوارهای *X. translucens* و سایر گونه‌های زانتوموناس و نیز جنس‌های دیگر هستند.

ما در این تحقیق موفق به تولید آنتی‌بادی تک‌دودمانه متمایزکننده پاتوارهای عامل بیماری نواری غلات از سایر پاتوارهای *X. translucens* شدیم که آنتی‌ژن آن (برخلاف مطالعات قبلی) پاتووار *translucens* است. این تحقیق توانست نتایج حاصل از مطالعات قبلی را تکمیل کند. استفاده از پادتن‌های تک‌دودمانه، که در این مطالعه و مطالعات قبلی، علیه پاتووارهای *undulosa* و *translucens* تولید شده‌اند، می‌توانند در ردیابی باکتری عامل این بیماری در بذور گندم و جو آلوده، کاربرد موثری داشته باشند. باانجام تحقیقات قبلی و این مطالعه، تعداد پنج آنتی‌بادی تک‌دودمانه علیه دو آنتی‌ژن *X. t.* pv. *translucens* و *X. t.* pv. *undulosa* فراهم شده است. از این آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانه می‌توان در شناسایی، تشخیص و تولید کیت‌های کاربردی "تشخیص سریع" استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین و کارکنان دانشکده مهندسی علوم زیستی دانشگاه کاتولیک لوون (واقع در لوون لانوف در بلژیک) به‌خاطر فراهم کردن امکانات و تجهیزات لازم برای انجام این تحقیق، سپاسگزاری می‌شود.

References

ALIZADEH, A. and H. RAHIMIAN, 1989. Bacterial leaf streak of Gramineae in Iran Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 19: 113-117.

ALIZADEH, A., A. SARRAFI and G. BARRAULT, 1994. Genetic variability for partial resistance to *Xanthomonas campestris* pv *hordei* and pathogenicity variation of 13 pathovar's strains in barley. Proccidings d'ANPP - 4. Conférence internationale sur les maladies des plantes, (1994/12/06-08; Palais des congrès, Bordeaux, FRA), Tome I: 193-200.

ALIZADEH, A., A. SARRAFI and G. BARRAULT, 1995b. Genetic variability for partial resistance to *Xanthomonas campestris* pv *cerealis* and pathogenicity variation of 13 pathovar's strains in wheat. Journal of Genetic and Breeding, 49: 309-312.

ALIZADEH, A., G. BARRAULT, A. SARRAFI, H. RAHIMIAN and L. ALBERTINI, 1995a. Identification of bacterial leaf streak of cereals by their phenotypic characteristics and host range in Iran. European Journal of Plant Pathology, 101: 225-229.

ALIZADEH, A., G. DECHAMP-GUILLAUME, A. SARRAFI, H. RAHIMIAN and G. BARRAULT, 1996. Electrophoretic analysis of total and membrane protein of *Xanthomonas campestris* pathovars causing leaf streak of cereals and grasses in Iran. Journal of Phytopathology, 144: 97-101.

ALIZADEH, A., M. ARLAT, C. A. BOUCHER, G. BARRAULT and A. SARRAFI, 1997. RFLP Analysis of Iranian strains of *Xanthomonas* campestris from Cereals and Grasses. Plant Disease, 81: 31-35.

ALIZADEH, A., V. BENETTI, A. SARRAFI, G. BARRAULT and L. ALBERTINI, 1995c. Genetic analysis for partial resistance to an Iranian strain of bacterial leaf streak *X campestris* pv *hordei* in barley. Plant Breeding, 113: 323-326.

ALVAREZ, A. M., A. A. BENEDICT and C.Y. MIZUMOTO. 1985. Identification of xanthomonads and grouping of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with monoclonal antibodies. Phytopathology, 75:722-728.

AZAD, H. and N.W. SCHAAD, 1988. Serological relationships among membrane proteins of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. Phytopathology, 78: 272-277.

BEIKI, F., A. ALIZADEH and G. KHODAKARAMIAN, 2002. Reaction of Xanthomonas translucens pvs. cereali and translucens in wheat and barley cultivars. *Journal of Agricultural Science*, Vol. 61: 1-11 pp.

BRAGARD, C. and M. VERHOYEN, 1993. Monoclonal antibodies specific for *Xanthomonas campestris* bacteria pathogenic on wheat and other small grains, in comparison with polyclonal antisera. Journal of Phytopathology, 139(3): 217-228.

CLAFLIN, L.E. and B.A. RAMUNDO, 1987. Evaluation of the dot-immunobinding assay for detecting phytopathogenic bacteria in wheat seeds. Journal of *Seed Technology*, 11: 52-61.

COLIN J., C. BRAGARD and H. MARAITE, 1990. A detached leaf inoculation technique for pathogenicity testing of *Xanthomonas campestris* on cereals. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent, 55(3a):1125-1131.

DUVEILLER, E. and C. BRAGARD, 1992. Comparison of immunofluorescence and two assays for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in seeds of small grains. Plant Disease Journal, 76: 999-1003.

DUVEILLER, E., C. BRAGARD and H. MARAITE, 1997. Bacterial leaf streak and black chaff caused by *Xanthomonas translucens*. In: E. Duveiller, L. Fucikovskil and K. Rudolph (Eds.), *The Bacterial Disease of Wheat: Concept and Methods of Disease Management*. Mexico, D.F: CIMMYT, pp. 25- 32.

HABIBIAN, M., A. ALIZADEH ALIABADI, J. HAYATI and H. RAHIMIAN. 2021. Investigation of the phenotypic 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(2): 33-50.

HAGBORG, W.A.F., 1968. *Xanthomonas translucens* on wheat in Manitoba in 1968. Canadian Plant Disease Survey, 48: 112.

HUTSCHEMACKERS, J., H. BAZIN and M. VERHOYEN, 1990. Rat monoclonal antibodies to plant pathogens. In: Bazin, H. (ed.). Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies. pp. 433-444. CRC press, Boca Raton, Florida.

REDDY, C.S., J. GODKIN, and A.G. JOHNSON, 1924. Bacterial blight of rye. Journal of Agricultural Research, 28: 1039-1040.

SHEKHAWAT, GS, PN. PATEL, 1978. Histology of barley plant and rice leaf infected with Xanthomonas translucens f.sp. hordei. Phytopathologische Zeitschrift, 93(2): 105-112.

SMITH, E.F., L.R. JONES and C.S. REDDY, 1919. The black chaff of wheat. Science, 50: 48.

ZHANG, C., 2012. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 901: 117-135.