جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پژوهش در علوم کشاورزی، سال سوم،
شماره دوم ، زمستان ۱۳۸٦ (صفحه ۲۲۸-۲۲۰)

بررسی بذرزاد بودن و تعیین علف‌های هرز میزبان باکتری عامل سوختگی برگ گندم

کاووس کشاورز[1] *و کرم اله گودرزی[2]

۱- مربی، عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کهکیلویه و بویراحمد

۲- محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کهکیلویه و بویراحمد

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۸ تاریخ پذیرش:۲۲ /۸٦/٦

چکیده

این پژوهش به منظور تعیین بذرزادبودن باکتری عامل سوختگی برگ گندم و شناسایی علف‌های هرز میزبان این باکتری انجام گرفت. طی دو فصل زراعی ۱۳۷٦ و ۱۳۷۷ از مزارع مختلف گندم آبی و دیم دو استان فارس و کهکیلویه و بویراحمد نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها روی محیط کشت KB کشت داده شد. عامل بیماری سوختگی برگ گندم بر اساس آزمون‌های LOPAT و سایر آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv *syringae*(*Pss*) تشخیص داده شد. جهت تعیین بذرزاد بودن باکتری *Pss* از سه روش شستشوی سطحی، کشت مستقیم بذور و آرد بذور استفاده شد. در روش شستشوی سطحی، باکتری *Pss* روی هیچ کدام از دو محیط کشت KBC و KB جداسازی نگردید. بیشترین آلودگی بذری روی محیط کشت KBC در روش مستقیم و کمترین آلودگی بذری روی رقم قدس که از مزارع کشاورزان جمع آوری شده بود، روی محیط کشت KB بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده باکتری*Pss* (عامل سوختگی برگ گندم) قادر است به صورت بذرزاد روی بذور گندم زندگی کند و به احتمال زیاد به صورت اندوفیت در بذر بسر می برد. از بین روش‌های مورد بررسی جهت تعیین بذرزاد بودن باکتری استفاده از محیط نیمه انتخابی KBC قابل استفاده است و به اسانی می‌توان بر پایه مرفولوژی، رنگ کلنی و آزمون اکسیداز باکتری *Pss* را شناسایی نمود. باکتری *Pss* از علف‌های هرز یک‌ساله نظیر دم‌روباهی، ماشک، یولاف وحشی، جو موشی و مرغ در چند منطقه از جمله یاسوج، مرودشت وسپیدان جداسازی و بیماری‌زایی آن به اثبات رسید.

واژه‌های کلیدی: سوختگی برگ گندم، باکتری*Pseudomonas syringae* pv *syringae(Pss)* ، اپی‌فیت، بذرزاد، علف‌های هرز

* نویسنده مسئول: Email: Keshavarz42@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

بیماری سوختگی برگ گندم ناشی از باکتری *Pseudomonas syringae* pv *syringae*(*Pss*) انتشار جهانی دارد و هر ساله خسارت زیادی به مزارع گندم وارد می‌کند (۱۸،۱۷). این باکتری علاوه بر بیماری‌زا بودن می‌تواند به عنوان هسته یخ (INA) عمل کند و در مناطق سردسیری جلوگیری از سرمازدگی و خسارت زیاد می‌شود (۱٤،۲). در ایران تاکنون این بیماری از مزارع گندم استان‌های کرمان، چهار محال و بختیاری و فارس گزارش شده است (٤،۳،۱).

میزان آلودگی بذری ناشی از باکتری *Pss* روی ۲۱ نمونه گندم زمستانه جمع‌آوری شده از نبراسکا و داکوتای جنوبی بین ۵-۲ درصد برآورد شده است (۱۸). همچنین این باکتری قادر است به صورت اپی‌فیت روی بذور گندم زندگی خود را سپری نماید (۹). اوتا (۱۸) و اسمیت و هاتینگ (۲۰) بیان کردند که باکتری *Pss* می‌تواند در بذرهای گندم به عنوان یک اپی‌فیت باقی بماند و به عنوان یک منبع مهم اینوکولوم برای توسعه بیماری در مزرعه حفظ شود. برای جداسازی عامل بیماری سوختگی برگ از بذور گواهی شده واریته گندم *Sonalica* که در نواحی مختلف بنگلادش کشت شده بوداستفاده کرد و برای این منظور از روش‌های استخراج مستقیم از بذرهای کامل بوسیله روش Liquid assay، استخراج از بذرهای رشد کرده، کشت مستقیم بذرها بر روی محیط‌های کشت نیمه انتخابی KBC و آزمون رشد (Seedling symptom test)، استفاده کرد (٦).

تعداد زیادی میکروارگانیسم بیماری‌زا ممکن است از علف‌های هرز به عنوان میزبان استفاده کنند و سپس به میزبان اصلی منتقل شوند (۱۱). در صورتی‌که کشت‌های ۲٤ ساعته باکتری *Pss* جدا شده از دم روباهی که به صورت اپی‌فیت به سر می‌برد روی گیاهچه‌های اولیه گندم پاشیده شود، تولید سوختگی می‌نماید، هرچند که این علائم شدت آلودگی طبیعی را نداشت (۱۸،۹). این باکتری قادر است که روی علف‌های هرز حاشیه و درون مزارع از جمله دم روباهی، ماشک (*Vicia villosa*) و فرفیون *Euphorbia pulcherrima* به صورت اپی‌فیت زندگی کند (۱۰،۹،۷،۵).

پژوهش حاضر به منظور روش‌های تعیین بذرزاد بودن باکتری عامل سوختگی برگ گندم و معرفی علف‌های هرز میزبان این باکتری صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری و جداسازی

طی دو فصل زراعی ۱۳۷٦ و ۱۳۷۷نمونه‌هایی از برگهای گندم و علف‌های هرز حاشیه و داخل مزارع استان‌های فارس و کهکیلویه و بویراحمد که دارای علائمی شبیه به سوختگی بودند جمع‌آوری و جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های مشکوک پس از شستشو با آب به قطعات ۲-۱ سانتی‌متری تقسیم و در لوله حاوی آب مقطر سترون قرار داده و نیم ساعت با شیکر دورانی بهم زده شدند. از سوسپانسیون بدست آمده یک قطره بوسیله لوپ برداشته و به محیط کشت KB انتقال داده (۱۹،۱۳) و به کمک لوله شیشه‌ای خمیده (ال شکل) به طور کاملاً یکنواخت در سطح محیط پخش و جهت رشد در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت نگهداری شد. پس از رشد کلنی‌ها و با استفاده از نور ماوراء بنفش کلنی‌هایی که تولید رنگ فلوروسنت نموده بودند، جداسازی و روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) کشت گردیدند. پس از خالص‌سازی، آزمونهای LOPAT شامل لوان، اکسیداز، لهانیدن سیب زمینی، آرجی نین دی هیدرولاز و فوق حساسیت روی جدایه‌هایی (گندم و علف‌های هرز) که

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

توانایی رنگ فلورسنت روی محیط KB داشتند بـه روش للیوت و همکاران صورت گرفت (۱۳).

پس از انجام آزمون‌هـای LOPAT، سـایر آزمـون‌هـای بیوشیمیایی و فیزیولـوژیکی روی جدایـه‌هـایی کـه از روی علفهای هرز جداسازی شده بودند انجـام و در نهایـت روی گندم مایه‌زنی شدند. محیط کشت نیمه انتخابی مورد استفاده برای شناسایی باکتری *Pss*، K.B.C می‌باشـد کـه از طریـق اضافه کردن اسید بوریک، سفالکسین و سـیکلوهگزامایـد بـه محیط کشت King(B) بدست می‌آید (۱٦).

-اثبات بیماریزایی

بذور گندم رقـم تجـن در هیپوکلریـد سـدیم ۲٪ ضـد عفونی، و در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشـته شـدند. سوسپانسیونی با غلظـت CFU ۱۰٦ (تهیـه شـده بـه روش اسپکتروفتومتری) از کشت ٤۸ ساعته باکتری تهیه و مایه‌زنی به روش تزریق داخل بافت بـرگ و پاشـیدن سوسپانـسیون باکتری به هر دو طرف برگ در مرحلـه بـه سـاقه رفـتن در گلخانه با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پیش از مایه زنی سطح برگ خراش داده شد. بـرای شـاهد از آب مقطـر سترون استفاده گردید (۲۱).

علائم بیماری به صورت لکه‌های آب سوخته، نکـروز و کلروز، یک هفته بعد ظاهر شد. پس از اثبـات بیمـاری‌زایـی سـایر آزمـون‌هـای بیوشـیمیایی و فیزیولـوژیکی روی جدایه‌هایی که از روی علف‌های هرز جداسازی شده بودند انجام گرفت.

- تعیین بذرزاد بودن باکتری

بـذور رقـم گنـدم تجـن و کـراس آزادی کـه بـه طـور مصنوعی به وسیله سوسپانسیون باکتری تلقیح شده بودنـد و همچنین بذور رقم قدس که از مـزارع کـشاورزان بـه طـور تـصادفی جمـع‌آوری شـده بـود، بـا اسـتفاده از روش‌هـای شستشوی سطحی بذور، کشت مستقیم و عصاره آرد بذور، با کاربرد دو محیط کشت KB و KBC، بررسـی گردیدنـد (٦).

- روش شستشوی سطحی

هفتصد عدد بذر از هر کدام از بذور تجن، کراس آزادی و قـدس در ارلـن مایرهـای ۲۵۰ میلـی‌لیتـری ریختـه و ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون یک صدم درصـد Tween20 بـه آن اضافه گردید. نمونه‌ها مدت پنج دقیقه بهم زده شد. یـک میلی‌لیتر از سوسپانـسیون مـذکور بـا رقـت‌هـا $۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$و $۱۰^{-٤}$ و با اضافه کردن ۸۵٪ نمک طعام سترون تهیـه شد. نیم میلی‌لیتر از هر رقت روی محیط کشت‌هـای KB و KBC به صورت میله‌ای شکل پخش شد.

- روش کاشت مستقیم

در این روش دویست عدد بـذر از ارقـام تجـن، کـراس آزادی و قدس که در روش اول درون فلاسک ریختـه شـده بود، خارج و داخل یک کیسه ململ ریخته و سپس به مدت یک ساعت زیر آب معمولی نگه داشـته شـد. سـپس بـذور روی کاغذ صافی سترون زیر یک هود ماوراء بنفش خـشک روی محیط کشت KBC و KB درون تشتک قرار داده شد، نحوه قرار گرفتن بذرها به گونـه ای بـود کـه در هرتـشتک پتری به قطر ۹، ۲۵ سانتی متر عدد بذر قرار می‌گرفت.

- عصاره آرد بذور

پانـصد عـدد بـذر بـاقی‌مانـده در یـک خرمنکـوب (blender) به آرد تبدیل شد. آرد حاصـله در ۲۵ میلـی‌لیتـر آب حاوی نمک طعام سترون (۸۵٪) در یک فلاسک حل و برای پنج دقیقه در دمـای اطـاق نگهـداری شـد. پـس از آن رقت‌های مختلف $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-٤}$ تهیه و روی پلیـت‌هـا روی محیط‌های KB و KBC کشت شدند.

نتایج

۱- تعیین علف‌های هرز میزبان باکتری

از علف‌های هرز یک‌ساله نظیر دم‌روباهی، ماشک، جوموشی(*Hordeum murinum*) ، یولاف وحشی و همچنین علف هرز دائمی مرغ(*Cynodon dactylon*) ، یک باکتری میله‌ای شکل گرم منفی اکسیداز منفی و هوازی اجباری جداسازی و با استفاده از آزمون‌های LOPAT و دیگر ویژگی‌های بیوشیمیایی به عنوان *Pss* شناسایی و بیماریزایی آن روی گندم با ایجاد لکه های نکروتیک به اثبات رسید.

۲- تعیین بذرزاد بودن باکتری عامل سوختگی برگ گندم

۲۰۰ بذر ضد عفونی شده از ارقام تجن، کراس آزادی و قدس در روش مستقیم به ترتیب در محیط نیمه انتخابی KBC، ۸، ۵ و ۲ درصد کلنی‌های فلورسنت را تشکیل دادند (جدول۱).ولی در روش شستشوی سطحی روی هیچ کدام از دو محیط کشت KB و KBC باکتری فلورسنت کننده جداسازی نگردید. در روش عصاره‌گیری بذور از ۵۰۰ بذر آزمایش شده، باکتری فلورسنت، در رقت $۱۰^{-۱}$، حداکثر CFU $۵/٤\times۱۰^{۳}$ عدد در رقم تجن و CFU $۲/٦\times۱۰^{۳}$ به ترتیب درا رقام تجن و کراس آزادی روی محیط کشت KBC پیدا شد و کمترین کلنی مربوط به رقم قدس که از مزارع کشاورزان به صورت تصادفی جمع آوری شده بود روی محیط کشت KB بدست آمد (جدول۲).

از بذور مذکور دو گروه باکتری فلورسنت کننده روی محیط‌های کشت مذکور جداسازی و شناسائی گردید که یک گروه آن باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل هوازی اجباری از لحاظ ایجاد واکنش فوق حساسیت تولید لوان و لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی منفی و اکسیداز و آرجی نین مثبت و روی گندم بیماری‌زا نبودند.در حالی‌که در گروه دوم شامل باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل با چند تاژک قطبی، هوازی اجباری، اکسیداز و آرجی نین لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، منفی، از لحاظ ایجاد واکنش فوق حساسیت تولید لوان مثبت و روی گندم بیماری‌زا بودند. ویژگی‌های دیگر این دو گروه در جدول ٤ آمده است.بر پایه این نتایج گروه B *Pseudomonas fluorescens*(pf) و گروه A Pss شناسایی شد.

جدول۱- درصد باکتری‌های فلورسنت کننده (*Pss*) جدا شده از ۲۰۰بذر به روش کشت مستقیم در دو محیط KBC و KB

رقم	درصد باکتری‌های فلورسنت کننده	
	KBC	KB
کراس آزادی	٥	۳
تجن	۸	٤
قدس	2	٥

جدول۲- تعداد باکتری‌های فلورسنت کننده (*Pss*) جدا شده از روش آرد بذور (seed flour) در رقت 10^{-1}

محیط کشت / رقم	تعداد واحد های تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر	
	KBC	KB
کراس آزادی	$2/6\times10^{3}$	$2/2\times10^{3}$
تجن	$5/4\times10^{3}$	$2/7\times10^{3}$
قدس	$1/6\times10^{3}$	$1/1\times10^{3}$

جدول۳- شمارش جدایه های رشد کرده روی محیط کشت KB و KBC

نوع رقم	نوع جدایه[3]	شمارش جدایه ها[1]		آرد بذر[2]	
محیط کشت		KB	KBC	KB	KBC
کراس ازادی	A	۲	۱۰	۱۰	۱۲
	B	٤	۰	۳	۳
تجن	A	۳	۱۳	۱٤	۳۰
	B	۵	۲	۲	۱
قدس	A	۱	۳	۷	۱۵
	B	۲	۱	۰	۰

۱) ۲۰۰ بذر در روش مستقیم،۲) غلظت ۰/۰۵ میلی‌لیتر در رقت 10^{-1}، ۳) A (*Pss*) وB (*Pf*) ترتیب جدایه‌های فلورسنت کننده بیماری‌زاو غیر بیماری‌زای جدا شده از بذور گندم

جدول٤- خصوصیات جدایه‌های جدا شده از بذور گندم

ویژگی‌ها	واکنش جدایه ها[1]	
	A	B
واکنش گرم	−	−
تشکیل هسته یخ	+	+
تولید رنگ فلورسنت	+	+
ایجاد واکنش فوق حساسیت	+	−
ارژنین دی هیدرولاز	−	+
له کردن ورقه های سیب زمینی	−	−
اکسیداز	−	+
لوان	+	−
هیدرولیز ژلاتین	+	+

ادامه جدول ٤ –

ویژگی‌ها	واکنش جدایه ها[1]	
	A	B
هیدرولیز نشاسته	–	–
هیدرولیز توین ۸۰	+	+
هیرولیز کازیین	+	–
احیای نیترات	–	+
سیترات	+	+
لسیتیناز	–	+
تحمل نمک ۵٪	+	+
تحمل نمک ٦٪	+	+
اوره از	+	–
کاتالاز	+	+
فسفاتاز	+	+
هیدرولیز اسکولین	–	+
تایروزیناز	+	–
رشد بی هوازی	–	–
H2S تولید	+	–
متیل رد	–	متغیر
اکسیداسیون گلوکونات	–	+
اربوتین	+	–
بیماریزایی روی گندم	لکه های نکروزه	–
استفاده از گلوکز	+	+
استفاده از ارابینوز	+	+
استفاده تری هالوز	+	+
استفاده سوربیتول	–	+
استفاده اریتریتول	+	+
استفاده مانیتول	–	+

ادامه جدول ٤ –

استفاده زایلوز	+	+
استفاده ساکاروز	+	+
استفاده فروکتوز	+	+
استفاده دالسیتول	+	–
استفاده مانوز	+	+
استفاده اینوزیتول	+	+
استفاده ریبوز	+	+
استفاده مالتوز	–	+
استفاده لاکتوز	–	+

۱) A(*Pss*)و B(*Pf*) به ترتیب جدایه‌های فلورسنت کننده بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای جدا شده از بذور گندم

بحث و نتیجه‌گیری

Pss قادر است که روی علف‌های هرز یک‌ساله شامل دم‌روباهی، ماشک، یولاف وحشی و جوموشی به حالت اپی‌فیت زندگی کند که در تحقیقات دیگر اثبات شده است (۷). علاوه بر این از علف هرز فرفیون (*Euphorbia pulcherrima*) به عنوان دیگر میزبان اپی‌فیت این باکتری یاد شده است (۷،۹،۱۰،۱۷). ولی در این تحقیق این علف هرز چندین بار از داخل و حاشیه مزارع گندم جمع‌آوری ولی *Pss* از آن جدا نگردید. این باکتری همچنین قادر است روی علف هرز دائمی مرغ (*Cynodon dactylon*) به صورت اپی‌فیت زندگی نماید که در چندین منطقه از جمله سعادت‌شهر، مرودشت، یاسوج و اردکان جداسازی و بیماری‌زایی آن به اثبات رسید. این اولین گزارش در مورد مرغ به عنوان میزبان این باکتری می‌باشد که بایستی در مدیریت کنترل این باکتری مبارزه با این علف هرز مدنظر قرار داد. از بذور ارقام تجن، کراس آزادی و قدس دو باکتری مختلف روی محیط کشت‌های KBC و KB جداسازی و شناسایی گردید و بر اساس آزمون‌های LOPAT و سایر تست‌های بیوشیمیایی و بیماری‌زایی که روی آنها انجام گرفت نهایتاً جدایه B به عنوان یک باکتری *pf* وساپروفیت شناسایی شد. در حالیکه جدایه A بیماریزا روی گندم به عنوان *Pss* شناسایی گردید. بدین ترتیب باکتری اخیر در گندم ممکن است بذرزاد باشد.*Pss* در روش شستشوی سطحی روی هیچکدام از دو محیط کشت KBC و KB جداسازی نگردید. این نتیجه می‌تواند مؤید این موضوع باشد که باکتری *Pss* به صورت اندوفیت درون بذور گندم بسر می‌برد و این نتایج با یافته‌های رشید (٦) که اعلام نمود به احتمال زیاد این باکتری در بذر به صورت اندوفیت زندگی می‌کند مطابقت دارد. در روش‌های مورد بررسی جهت تعیین میزان بذرزاد بودن باکتری، از بوته‌های مایه‌زنی شده ارقام تجن، کراس آزادی در گلخانه و رقم قدس که از مزارع کشاورزان جمع‌آوری شده بود استفاده شد. بیشترین آلودگی بذری روی محیط کشت KBC در روش مستقیم و کمترین آلودگی بذری روی رقم قدس که از مزارع کشاورزان جمع‌آوری شده بود، روی محیط کشت KB بدست آمد. دامنه بذرزاد بودن این باکتری ٦/٥-٠/٥ درصد برآورد گردید. در حالی‌که در سایر منابع میزان بذرزاد بودن این باکتری را تا ١٤ درصد نیز ذکر کرده‌اند و این می‌تواند به دلیل حساسیت ارقام، شرایط آب و هوایی و

محدوده جغرافیایی باشد (۱۶،۱۵). استفاده از بذور عاری از *Pss*، منوط به شناسایی باکتری بیماری‌زا در بذرهای خالص شده است. ارزیابی نمونه‌ها نشان می‌دهد که هیچگونه علائم ظاهری ناشی از باکتری فوق روی بذور گندم مشاهده نمی‌شود و جهت تعیین بذرزاد بودن باکتری بایستی از محیط کشت نیمه انتخابی KBC استفاده نمود. تعداد کمی از باکتریهای ساپروفیت در این محیط نیمه انتخابی قادر به رشد می‌باشند و به آسانی می‌توان باکتری *Pss* را بر پایه مرفولوژی، رنگ کلنی و آزمون اکسیداز در این محیط کشت شناسایی نمود. تشخیص این باکتری روی محیط کشت KBC نسبتاً ارزان و اجرای آن آسان و قابل تعمیم به سایر میزبان‌های این باکتری از جمله جو، ذرت، لوبیا، گوجه‌فرنگی و سویا می‌باشد. این روش برای کشورهایی مانند ایران که منابع اقتصادی محدودی برای کنترل بذور دارند، قابل توصیه است.

منابع

۱. **افیونیان م. و. صحراگرد ن. ۱۳۷٤.** بروز بلایت برگی گندم در شهرکرد. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج، ص ۲۸.

۲. **حسن زاده ن. ۱۳۷٤.** اصول و روش های باکتری شناسی گیاهی. مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی، ٦٤١ صفحه.

۳. **رحیمیان ح. ۱۳٦۸.** وقوع بیماری بلایت باکتریائی گندم در کرمان. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ص ١٤٦.

٤. **صحراگرد ن.، ض. بنی‌هاشمی، و س. م. تقوی. ۱۳۷۷.** گزارش بلایت باکتریائی گندم در استان فارس. مجله بیماری های گیاهی، جلد ۳٤ ص ۱۲۱.

5. **Arsenijevic M. 1986.** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall as a parasite of wheat. Rev. Plant Pathology, 65: 655 (Abstr.).
6. **Bazlur Rashid A.Q.M. 1995.** Detection of seed-borne *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in wheat. Pla.Var.Seed. 8: 47-54.
7. EL-**Sadek S.M.A., M.R. Abdel-Latif, T.I. Abdel-Gawad and N.A. Hussein. 1992.** Bacterial leaf blight disease of wheat in Egypt. Journal of Microbiology, 27: 177-196.
8. **Fahy P.C. and A.C. Hayward. 1983.** Media and methods for isolation and diagnostic test. pp. 337-378. In: Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide. Fahy P.C. and Persley G.J. (eds.). Academic Press, Sydney.
9. **Freda S.J. and J.D. Otta. 1978.** Epiphytic movement and survival of *Pseudomonas syringae* on spring wheat. Phytopathology, 68: 1064-1067.
10. **Gardan L., S. Cottin, C. Bollet and G. Hunault. 1991.** Phenotypic hetergeneity of *Pseudomonas syringae* Van Hall. Research Microbiology, 142: 995-1003.
11. **Glenn C. and F.A. Klingman. 1993.** Weed Science Principles and Practices. John Wiley and Sons, Inc. Washington.
12. **Leben C. 1965.** Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. Annual Review of Phytopathology, 3: 209-230.
13. **Lelliott R.A., E. Billing and A.C. Hayward. 1966.** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. Journal of Applied Bacteriology, 29: 470-489.
14. **Lindow S.E. 1983.** The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Annu. Rev. Phytopathology, 21: 363-384.

15. **Mohan S.K. and N.W. Schaad. 1985.** Semi-selective agar media for isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pathogenic to beans. Phytopathology, 75: 1351. (Abstr.).
16. **Mohan S.K. and N.W. Schaad. 1987.** An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. Phytopathology, 77: 1390-1395.
17. **Otta J.D. 1974.** *Pseudomonas syringae* incites a leaf necrosis on spring and winter wheats in South Dakota. Plant Disease Report, 58: 1061-1064.
18. **Otta J.D. 1977.** Occurrence and characteristics of isolate of *Pseudomonas syringae* on winter wheat. Phytopathology, 67: 22-26.
19. **Schaad N.W. 1988.** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathology Society, St. Paul, MN, U.S.A. 164 p.
20. **Smith J. and M.J. Hattingh. 1991.** Fluorescent *Pseudomonas* associated with disease of wheat in South Africa. Journal of Phytopathology, 133: 36-48.
21. **Vassilev V., K. Kolev, M. Zahaleva and V. Serov. 1995.** Resistance of aegilops, maized and wheat genotypes to pseudomonas syringae pathovars atrofaciens and syringae. Agronomie, 15: 25-29.