

بررسی بافت‌مردگی ریشه و طوقه چغندرقدند، گندم و ذرت

با گونه‌های مختلف *Pythium* در شرایط آزمایشگاهیInvestigation of root and crown tissue death of *Beta vulgaris*, *Triticum aestivum* and *Zea mays* by different *Pythium* spp. in laboratory conditions

طیبه کیانی بهرام آبادی^{۱*}، واهه میناسیان^۲، سید علی موسوی جرف^۳، سعیده دهقانپور
فرشاه^۴

Tayebah Kiyani Bahram Abadi¹, Vaheh Minassian², Seyed Ali
Mousavi Jorf³, Saeedeh Dehghanpour Farashah⁴

۱- کارشناس ارشد، بیماری شناسی گیاهی، ۲- استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شهید چمران،
اهواز، ایران. ۳- دانشیار گروه بیماری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ۴- استادیار گروه
کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

1. Master of Science, Plant Pathology, 2. Professor, Department of Plant Pathology, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
3. Associate Professor, Pathology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: Kiyani1386@yahoo.com

Kiyani1386@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۲۳ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۹/۲۸)

(Received: 2024/07/2 | Accepted: 2024/11/13 | Published: 2024/12/18)

Abstract

Pathogenicity status of 20 isolates of *Pythium* pathogen, which included 8 species of *P. aphanidermatum*, *Pythium* Group G, *P. ultimum*, *P. deliense*, *Pythium* Group F, *P. inflatum*, *P. ostracodes* and *P. diclinum* on the tissue-mortality of the collar and root of wheat, corn and sugar beet plants were studied. For this purpose, different pathogenicity tests were conducted in which different culture media were used, such as CMA, WA, millet mixed with the pseudo-fungui and vermiculite mixed with the pseudofungus. In wheat, *P. aphanidermatum* and *P. ostracodes* species caused more dead tissue of root and crown than the other species, and the severity of dead tissue and seedling death caused by *P. aphanidermatum* was more than the other isolates. In corn, *P. aphanidermatum* caused more tissue death of the collar than the other species, and *P. deliense* ranked next to it. And these two species caused corn root dead tissue almost to the same extent and the percentage of dead tissue caused by them was more than the other species. The severity of root and crown tissue death by *P. aphanidermatum* in sugar beet was more than the other isolates and the extent of dead tissue of the root was much more than that of the crown.

Keywords: *Pythium* spp., crown and root necrosis, seedling death, pathogenicity

Citation رفرنس دهی این مقاله

Kiyani T, Minassian V, Mousavi Jorf S A, Dehghanpour Farashah S. (2024). Investigation of root and crown tissue death of *Beta vulgaris*, *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* by different *Pythium* spp. in laboratory conditions. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 13 (2) : 131-153.

URL: <http://gebsj.ir/article-1-498-en.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 13, Number 2, 2024

خلاصه

وضعیت بیماری‌زایی ۲۰ جدایه از بیمارگر پی‌تیوم شامل ۸ گونه *P. deliense*, *P. ultimum*, *Pythium Group G*, *P. aphanidermatum*، *P. diclinum* و *P. ostracodes*، *P. inflatum*، *Pythium Group F* روی بافت‌مردگی طوقه و ریشه گیاهان گندم، ذرت و چغندر قند مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور آزمون‌های بیماری‌زایی متفاوتی انجام شد که در آن‌ها از محیط کشت‌های WA، CMA و ارزن آمیخته با قارچ استفاده شد. در گندم گونه‌های *P. aphanidermatum* (۱۸٪-۲۵٪) و *P. ostracodes* (۱۰٪-۱۸٪) بیش از سایر گونه‌ها باعث بافت‌مردگی ریشه و طوقه گندم شدند و شدت بافت‌مردگی و مرگ گیاهچه توسط *P. aphanidermatum* (۲۴٪-۲۶٪) از سایر جدایه‌ها بیشتر بود. در ذرت *P. aphanidermatum* (۱۷٪-۲۴٪) بیش از سایر گونه‌ها باعث بافت‌مردگی طوقه شد و *P. deliense* (۱۵٪) در مرتبه بعدی قرار داشت. این دو گونه تقریباً به یک نسبت باعث بافت‌مردگی ریشه ذرت شدند و درصد بافت‌مردگی ایجاد شده بوسیله آن‌ها هم بیش از سایر گونه‌ها بود. شدت بافت‌مردگی ریشه و طوقه بوسیله *P. aphanidermatum* (۳۵٪-۳۸/۷۵٪) در چغندر قند بیش از بقیه جدایه‌ها بود. بافت‌مردگی ریشه در چغندر قند بسیار بیشتر از بافت‌مردگی طوقه مشاهده شد.

کلمات کلیدی: پی‌تیوم، بافت‌مردگی طوقه و ریشه، مرگ گیاهچه، بیماری‌زایی.

مقدمه

چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) دومین محصول مهم قندی پس از نیشکر می‌باشد که سالیانه حدود ۴۸٪ از تولید کل شکر را در سراسر جهان تامین می‌کند. این محصول با شرایط آب‌وهوایی مختلفی سازگاری دارد (Thiruvengadam et al. 2024). سطح زیر کشت چغندر قند در کشور، در حدود ۱۰۹۴۴۸ هکتار است. استان‌های خراسان رضوی، فارس، آذربایجان غربی و خوزستان در تولید این محصول در کشور پیش‌تاز می‌باشند. این محصول توانایی کشت در خاک‌های شور، قلیایی و آهکی را داشته و توانایی تولید ریشه و عملکرد بالا در شرایط کم‌آبی از مزیت‌های مهم این محصول نسبت به نیشکر است (Hamedi & Honarvar, 2019; Khodadadi et al., 2023).

ذرت نیز یکی از مهمترین دانه‌های روغنی در ایران و یکی از پر محصول‌ترین غلات در دنیا به شمار می‌آید. این محصول کلیدی در تغذیه بسیاری از مردمان جهان نقش مهمی دارد. با توجه به آمار و ارقام منتشر شده در سال‌های اخیر، نیاز به واردات ذرت در کشور حدود ۲ میلیون تن در سال است. بنابراین برنامه‌ریزی بلندمدت و منسجم با هدف خودکفایی در تولید این محصول مورد نیاز است (Sadeghi et al. 2018; Hehdari et al., 2013).

سومین محصول مهم و استراتژیک مورد مطالعه در این پژوهش گندم می‌باشد. حدود ۶۰٪ سطح مزارع جهان را غلات تشکیل می‌دهد که از این مقدار ۳۳٪ به کشت گندم اختصاص دارد. گندم اصلی‌ترین منبع کالری پروتئین انسان است و ویژگی مهم این گیاه، قابل کشت بودن آن در شرایط متنوع آب و هوایی است (Dehghanpour Farashah & Salehzadeh, 2021). مصرف سرانه گندم در ایران ۱۹۵ کیلوگرم در سال و مصرف سرانه انسانی گندم در جهان ۶۸ کیلوگرم می‌باشد. بنابراین سرانه انسانی گندم در ایران، در حدود ۳/۵ برابر مصارف جهانی است (Golfam et al., 2021).

تاکنون عوامل بیماری‌زای قارچی متعددی در رابطه با پوسیدگی ریشه گندم، ذرت و چغندر قند جداسازی شده است. یکی از این عوامل بیمارگر شبه‌قارچ‌های جنس پی‌تیوم (*Pythium spp.*) می‌باشند. جنس پی‌تیوم یکی از شبه‌قارچ‌های مهم از نظر بیماری‌زایی و بوم‌شناختی و از کپک‌های آبی می‌باشد. گونه‌های این جنس دارای پراکنش وسیعی بوده و در اغلب آشیانه‌های بوم‌شناختی مختلف شامل آب‌های شیرین و مناطق مرطوب که بیشتر شامل گونه‌های بیمارگر گیاهی هستند (برای مثال *P. aphanidermatum*) یافت می‌شوند و برخی گونه‌ها در دریاها

حضور دارند و برخی مانند جنس *P. insidiosum* از بیمارگرهای حیوانی می‌باشند. اغلب گونه‌های بیمارگر این شبه‌قارچ گیاهی مانند *P. ultimum* دارای دامنه میزبانی وسیع هستند که ۷۱۹ میزبان از آن گزارش شده است. برخی از این جدایه‌ها نظیر *P. graminicola* نیز محدود به میزبان‌های گیاهی ویژه‌ای می‌باشند و روی خانواده گندمیان فعالیت می‌کنند (Legrifi et al., 2024). گونه‌های پی‌تیوم به‌عنوان کلونیزه کننده-های نکروتروفیک هستند که به ریشه‌های جوان تغذیه‌کننده و بذور در حال جوانه‌زنی و گیاهچه‌ها حمله می‌کنند و سبب گیاهچه‌میری پیش و پس‌رویشی از طریق حمله به جنین هیپوکوتیل و ریشه می‌شوند. گونه‌های پی‌تیوم می‌توانند سبب کاهش پایایی گیاه در مزرعه و آسیب‌های اصلی و عمده در صنعت گلخانه در تولید نشاها گردند. در گیاهان بالغ کاهش در زیست توده‌ی ریشه‌های اصلی و ریشه‌های موئین سبب کوتولگی و نشانه‌های مشابه با کمبودهای غذایی در بخش‌های فوقانی گیاه می‌شوند و کاهش معنی‌داری را در عملکرد محصول ایجاد می‌کنند (Bickel & Koehler, 2021).

بیمارگر *P. aphanidermatum* به‌عنوان عامل پوسیدگی ریشه چغندر قند از استان‌های اصفهان، تهران، خراسان، فارس و کرمان گزارش شده است (Rahimian & Banihashemi, 1979). افضلی و بنی‌هاشمی *P. deliense* را به‌عنوان عامل پوسیدگی ریشه چغندر قند برای اولین بار از ایران گزارش کردند. زمانی نور در سال ۱۳۸۳، ۸ گونه پی‌تیوم را از مزارع چغندرکاری استان خوزستان جداسازی و شناسایی نمود که شامل *Pythium Group F* بودند و در بین این ۸ گونه بیماری‌زایی *P. aphanidermatum*، *P. okanogannese*، *P. deliense*، *Poligandrum*، *P. salinum*، *P. trachiphilum*، *Pythium Group G* و *Pythium Group F* بودند و در بین این ۸ گونه بیماری‌زایی *P. aphanidermatum*، *P. deliense*، *Pythium Group F* و *P. G.F* اثبات رسید (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2015).

تاکنون گونه‌های مختلفی از شبه‌قارچ پی‌تیوم به‌عنوان عامل بیماری از گیاه ذرت در سراسر جهان جداسازی شده است. گونه‌های *P. arrhenomanses*، *P. irregular*، *P. aphanidermatum* و *P. graminicola* از مهمترین گونه‌های جداسازی شده از روی ریشه‌ی ذرت می‌باشند که سه گونه‌ی اول قدرت بیماری‌زایی متوسط و گونه‌ی چهارم به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل پوسیدگی ساقه ذرت به‌شمار می‌رود. از مهمترین گونه‌های عامل پوسیدگی ساقه‌ی ذرت نیز می‌توان گونه‌های *P. inflatum* و *P. graminicola* را نام برد. *P. myriotylu* نیز به‌عنوان عامل پوسیدگی طوقه و ریشه در ذرت معرفی شده است (Bickel & Koehler, 2021).

گونه‌های زیادی به‌عنوان عامل پوسیدگی پی‌تیومی طوقه و ریشه روی گندم گزارش شده‌اند. عمده‌ترین گونه‌های جدا شده شامل *P. arrhenomonas*، *P. myriotylum*، *P. volutum*، *P. graminicola*، *P. aphanidermatum*، *P. irregular*، *P. aristosporum*، *P. ultimum*، *Var. etimum*، *P. ultimum* Var *sporangiferum*، *P. sylvaticum*، *P. torulosum*، *P. heterotalicum*، *P. echinulatum*، *Pythium group F*، *P. periplocum*، *P. volutum*، *P. aristosporum*، *Pythium group F*، می‌باشد (Reeves et al., 2021). براساس بررسی‌های انجام شده تا کنون هیچ گزارش جامع و شاملی در مورد پی‌تیوم‌های آلوده کننده گندم در استان خوزستان انجام نشده است. آن چه اهمیت بررسی این سه گیاه را مضاعف می‌کند توجه به این نکته است که در اکثر زمین‌های زراعی این محصولات به صورت متناوب به‌دنبال هم کاشته می‌شوند. باتوجه به تحقیقاتی که قبلاً صورت گرفته جمعیت بالایی از این قارچ در خاک‌های خوزستان وجود دارد. گونه‌های پی‌تیوم مولد پوسیدگی ریشه، مرگ گیاهچه، بافت مردگی ریشه در چغندر قند و پوسیدگی ریشه، بلایت گیاهچه، پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه و پوسیدگی طوقه در ذرت و گندم می‌باشد (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi, 2005). علی‌رغم سطح زیرکشت وسیع این سه گیاه در خوزستان اطلاعات دقیقی در مورد اهمیت این قارچ و نقش گونه‌های آن در ایجاد خسارت در گیاهانی که در تناوب با هم کاشته می‌شوند در دست نیست. این امر به‌خصوص در مورد ذرت بسیار حائز اهمیت است زیرا هیچ تحقیقی در مورد رابطه این قارچ و بیماری‌زایی آن روی گیاهان مذکور در ایران در دست نیست. این تحقیق به منظور بررسی وضعیت بیماری‌زایی گونه‌های مختلف پی‌تیوم از نظر بافت‌مردگی روی گیاهان چغندر قند، گندم و ذرت و توان بیماری‌زایی گونه‌ها و جدایه‌های مختلف آن‌ها با روش‌های متعدد و در طی دوره‌های رشدی مختلف انجام گرفته است.

جدایه‌ها و گونه‌ها: به منظور بررسی اهمیت بیماری‌زایی گونه‌های متعدد پی‌تیوم روی گندم، ذرت و چغندر قند ۸ گونه پی‌تیوم که از مناطق مختلف ایران جداسازی شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند (Mostoufizadeh & Banihashemi, 2005). جدایه‌های *P. delinense* (A5)، *P. diclinum* (N143)، *P. inflatum* (K117)، *P. ostracodes* (B11) از *P. ultimum* و *P. aphanidermatum* برای بررسی بیشتر پی‌سی.آر و سپس توالی یابی شدند. ۳ ایزوله از *Pythium* Group F و ۳ ایزوله از *Pythium* Group G از مزارع چغندر قند خوزستان جداسازی شدند.

خالص‌سازی و نگهداری از نمونه‌ها برای اطمینان از خالص بودن جدایه‌های قارچی: برای اطمینان از خالص بودن قارچ، جدایه‌ها روی محیط PARP کشت داده شدند. جدایه‌های خالص شده در پتری‌ها و لوله‌های حاوی محیط کشت CMA و WA و شیشه‌های کوچک حاوی آب مقطر استریل در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

محیط کشت‌های مورد نیاز

محیط کشت آب-آگار (WA): ۲۰ گرم آگار را با یک لیتر آب مقطر کاملاً مخلوط کرده و تحت فشار یک اتمسفر و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون گردید.

محیط کشت ذرت-آگار (CAM): چهل گرم دانه ذرت خرد شده به مدت یک ساعت در آب مقطر جوشانده و پس از عبور از پارچه ململ دو لایه، حجم محلول با اضافه کردن آب مقطر به یک لیتر رسانده شد پس از افزودن ۱۶ گرم آگار به مدت ۲۰ دقیقه تحت فشار یک اتمسفر در اتوکلاو سترون گردید و یا با افزودن ۱۷ گرم پودر CMA آماده در لیتر در فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون گردید.

محیط کشت شاهدانه-آگار (HSA): ۶۰ گرم دانه شاهدانه خرد شده به مدت ۰/۵ ساعت در آب مقطر جوشانده پس از عبور از پارچه ململ دو لایه، حجم محلول با آب مقطر به یک لیتر رسانیده شد. پس از افزودن ۱۶ گرم آگار، تحت فشار یک اتمسفر و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون گردید (Raftoyannis & Dick, 2006).

محیط کشت CAM-PARP: عصاره ۴۰ گرم دانه ذرت خرد شده و ۱۶ گرم آگار پودر شده و پودر CMA آماده به اضافه ۲۰ میلی‌گرم دلواسید حاوی ۵۰٪ پیمارسین، ۲۵۰ میلی‌گرم آمپی‌سیلین، ۱۰ میلی‌گرم ریفامپین، ۱۰۰ میلی‌گرم PCNB و ۱ لیتر آب مقطر که به آن ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بنومیل اضافه شده را به مدت ۲۰ دقیقه در فشار یک اتمسفر در اتوکلاو ضدعفونی شد.

تشکیل اندام غیرجنسی و جنسی: برای تشکیل اندام غیرجنسی پی‌تیوم گونه‌های متعدد این جنس بر روی محیط CMA کشت داده شد. از حاشیه پرگنه ۲ تا ۳ روزه پی‌تیوم بلوکهای نازکی با چوب پنبه سوراخ کن برداشته و به پتری منتقل گردید و حدود ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. تشتک‌های پتری در مقابل نور مداوم فلورسنت (دولامپ ۴۰ وات) در فاصله ۳۰ سانتی متری) و دمای اتاق قرار گرفتند و به صورت روزانه بررسی شدند. (Ribeiro & Butler, 1995). پس از تشکیل اسپورانژیوم، جهت مشاهده و اندازه‌گیری دقیق رنگ‌آمیزی با فاکتوفل انجام گرفت و خصوصیت و اندازه اندام غیرجنسی تعیین گردید. جدایه‌های پی‌تیوم اغلب هموتالیک هستند و برای تشکیل اندام‌های جنسی و بررسی آنها به تنهایی بر روی محیط کشت عصاره شاهدانه کشت شدند و در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شدند و به صورت هفتگی مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

گونه‌های متعدد این جنس بر روی محیط CMA کشت داده شد. از حاشیه پرگنه ۲ تا ۳ روزه پی‌تیوم بلوکهای نازکی با چوب پنبه سوراخ کن برداشته و به پتری منتقل گردید و حدود ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. تشتک‌های پتری در مقابل نور مداوم فلورسنت (دولامپ ۴۰ وات) در فاصله ۳۰ سانتی متری) و دمای اتاق قرار گرفتند و به صورت روزانه بررسی شدند. (Ribeiro & Butler, 1995). پس از تشکیل

اسپورانژیوم، جهت مشاهده و اندازه‌گیری دقیق رنگ‌آمیزی با فاکتوفل انجام گرفت و خصوصیت و اندازه اندام غیرجنسی تعیین گردید. جدایه‌های پی‌تیوم اغلب

شناسایی مولکولی شبه قارچ‌های مورد بررسی با آغازگرهای عمومی جنس پی‌تیوم: استخراج DNA، تکثیر و توالی‌یابی براساس مطالعات و داده‌های ریخت‌شناختی تعدادی از جدایه‌ها که از هر گونه به‌عنوان جدایه نماینده انتخاب شده بودند انجام شد (شکل ۱). استخراج DNA ژنومی از میسلیم‌های رشد یافته در محیط کشت Potato dextrose broth (PDB) و مطابق روش ریدر و برودا (Reder & Broda, 1985) با اندکی تغییرات، تهیه و مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای مطابق روش بدلی و همکاران (Badali et al. 2016) انجام گرفت.

ناحیه ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC) که ناحیه‌ی ITS (ITS1-5.8S) را تشکیل می‌کند. با استفاده از این آغازگرها انتظار می‌رود قطعه‌ای به طول ۲۹۰ جفت باز تکثیر شود (White et al., 1990) جدایه‌های منتخب طی واکنش پی‌سی. آر با برنامه‌ی دمایی شامل: ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه که در هر کدام ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه دمای ۵۴ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. خالص‌سازی و تعیین توالی محصولات PCR توسط شرکت Macrogen کره جنوبی انجام گرفت.

مطالعات بیماری‌زایی روی گندم، ذرت و چغندر قند از مرحله بذر تا یک ماهگی

تهیه مایه پی‌تیوم و شرایط مایه‌زنی: برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها از محیط کشت WA و CMA حاوی پی‌تیوم استفاده گردید. به این منظور بلوک‌های ۵ میلی‌متری از ۲۰ جدایه و گونه ذکر شده پی‌تیوم به پتری‌های حاوی محیط کشت CMA و بار دیگر به پتری‌های حاوی WA منتقل گردید. پتری‌ها به مدت ۳ روز در انکوباتور با دمای اتاق و نور دائم نگهداری شدند. بعد از ۳ روز لایه WA و CMA حاوی قارچ به گلدان‌های کوچک منتقل گردید (Weiland, 2011). برای تهیه مایه قارچ ۹ جدایه از *P. ahanidermatum*، ۳ جدایه از *P.G.G* و ۳ جدایه از *P.G.F* و از *P. P. ostracodes*, *P. inflatum*, *P. deliense*, *diclinum*, *P. ultimum* هر کدام ۱ جدایه استفاده شد. در آزمایش بیماری‌زایی، گلدانها در انکوباتور (۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری شده بودند. نوردی توسط لامپ‌های فلوئورسنت که به فاصله ۵۰ سانتی‌متری بالای گلدان‌ها بودند به‌صورت نور متناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی انجام گرفت. آبیاری به‌صورت روزانه و هر روز به میزان ۳۰ سی سی برای هر گلدان انجام می‌شد. برای اطمینان از حضور فعال پی‌تیوم، گلدانها را در شرایط اشباع به مدت ۱۵-۱۲ ساعت قرار داده شد و آب خارج شده از انتهای گلدان با طعمه‌گذاری بوسیله برگ مرکبات مورد بررسی قرار گرفت تا حضور قارچ پی‌تیوم در خاک تعیین شود. (Schroeder et al., 2013). در مایه‌زنی از لیوان‌های پلاستیکی یکبار مصرف به قطر ۸ cm استفاده شد برای تهیه خاک از مخلوط خاک مزرعه، خاک برگ و ماسه به‌صورت مساوی استفاده شد. خاک‌های مورد نظر به روش cone quartering با هم مخلوط شدند. خاک مرطوب گردید و ۲ روز متوالی هر روز به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو تحت فشار یک اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون شد. یک لایه کاغذ صافی استریل در ته هر گلدان قرار داده شد و روی آن با کمی شن و سنگ ریزه سترون پوشانده شد. ۲۰۰ سانتی‌متر مکعب از خاک مورد نظر در هر گلدان ریخته شد و یک لایه CMA حاوی قارچ مورد نظر روی خاک قرار داده شد و روی آن با ۵۰ سانتی‌متر مکعب خاک پوشانده شد. تعداد ۵ بذر از گیاه مورد نظر (گندم، ذرت و چغندر قند) استریل روی سطح خاک کاشته شدند و با ۵۰ سانتی‌متر مکعب پوشانده شدند. پس از گذشت یک ماه گیاهان برای بررسی علائم ایجاد شده از خاک بیرون آورده شدند. این آزمون در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در نظر گرفته شد. در گیاهان شاهد از لایه CMA بدون قارچ استفاده گردید. گیاهانی که علائم بیماری داشتند از حد فاصل بافت سالم و آلوده قطعاتی بریده شد و بعد از شستشو با آب مقطر استریل به محیط کشت PAPP منتقل گردید (شکل ۱).

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های پی‌تیوم روی گندم، ذرت و چغندر قند

مایه زنی در اطراف ریشه: برای تهیه مایه قارچ مقدار ۵۰ گرم از بذر ارزن دانه ریز در فلاسک ۲۵۰ سی. سی. (برای هر یک از ایزوله‌ها یک ارلن) ریخته شد و به مدت یک شب خیس‌انده شدند. بعد از گرفتن آب اضافی آنها فلاسک‌ها را ۲ روز متوالی و هر روز به مدت یک ساعت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر سترون شدند. فلاسک‌ها به مدت یک هفته در آزمایشگاه نگهداری شدند تا از سترون بودن آنها و عدم وجود آلودگی در آنها اطمینان حاصل شود. به هر ارلن ۵ بلوک قارچ به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت سه روز ایزوله مورد نظر روی محیط CMA افزوده شد دهانه فلاسک‌ها با پنبه و فویل آلومینیومی بسته شد و به مدت یک ماه در انکوباتور با دمای ۲۰ درجه سلسیوس و نور دائم فلورسنت نگهداری شدند. پس از یک ماه دانه‌های ارزن کلونیزه شده بوسیله قارچ برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفت (Nzungize et al. 2011).

شکل ۱- بافت‌مردگی طوقه و ریشه‌ی گندم (A)، بافت‌مردگی طوقه ذرت (B)، بافت‌مردگی ریشه و طوقه‌ی چغندر قند (C)، کشت نواحی آلوده گیاهان در محیط کشت PARP (D)، بافت‌مردگی ریشه‌ی ذرت (E) و تله‌گذاری با بافت برگ مرکبات برای پی‌تیوم (F).

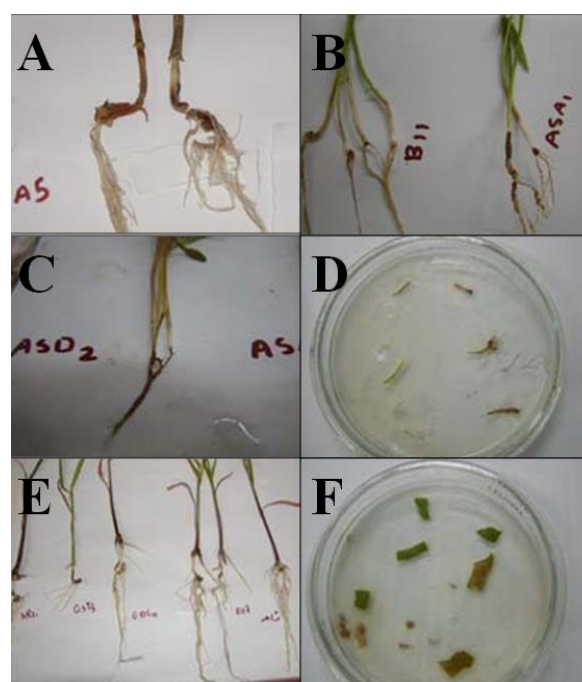


Fig 1. Dead tissue of wheat crown and root (A), dead tissue of corn crown (B), dead tissue of root and crown of sugar beet (C), cultivation of infected areas of plants in PARP culture medium (D), corn root necrosis (E) and trapping with citrus leaf tissue for Pythium (F).

برای مایه‌زنی در اطراف ریشه از گیاهان رشد یافته در مرحله ۲ ماهگی استفاده شد برای این منظور از گلدان‌های بزرگ به قطر تقریبی ۲۵ سانتی‌متر استفاده شد. بذرها ی گندم (رقم چمران)، ذرت (رقم دامغان ۷۰۴) و چغندر قند رقم ۷۲۳۳ عدد که به صورت رایج در منطقه کاشته می‌شوند با وایتکس ۵٪ تجاری به مدت ۴ دقیقه ضدعفونی سطحی گردیدند و تعداد ۱۲ عدد در گلدان‌های حاوی خاک استریل کاشته شدند و در شرایط گلخانه دمای اتاق و نور متناوب نگهداری شدند و بر حسب نیاز گیاه آبیاری شدند. پس از گذشت ۲۰ روز تعداد گیاهچه در هر گلدان به ۸ عدد تنک شدند بعد از اینکه گیاه به مرحله ۲ ماهگی رسید. مایه‌زنی با بذر ارزن انجام شد. سپس یک لایه از بذر ارزن به روی ریشه‌ها ریخته شد و روی آنها با خاک مجدداً پوشانیده شد و گلدان‌ها در شرایط غرقاب قرار گرفتند. برای تیمار شاهد از دانه‌های ارزن فاقد قارچ استفاده گردید این آزمون در طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار از هر جدایه برای هر گیاه انجام شد (شکل ۲).

شکل ۲- بافت‌مردگی ساقه ارزن ۲ ماهه در اثر تلقیح با پی‌تیوم (A)، بافت‌مردگی طوقه چغندر ۲ ماهه در اثر تلقیح با *P. aphanidermatum* (B)، بافت‌مردگی ریشه گندم توسط *P.G.F* (C)، مرگ بوته‌های گندم با تلقیح گیاهان با *P. ostracodes* (D)، بافت‌مردگی ریشه‌ی ذرت در اثر تلقیح *P. diclinum* (E) و بافت‌مردگی ریشه‌ی ذرت در اثر تلقیح *P. aphanidermatum* (F).

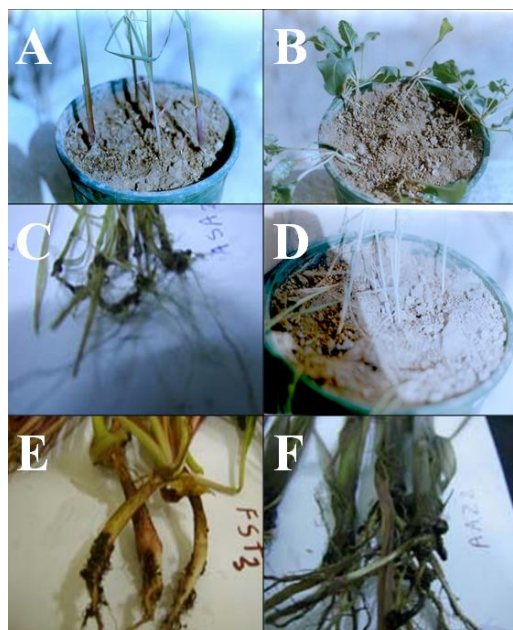
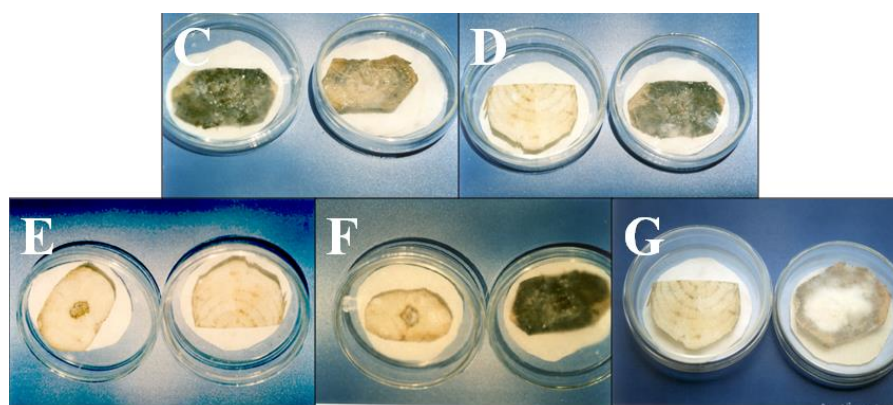


Fig 2. 2-month-old millet stem tissue death due to inoculation with Pythium (A), 2-month-old beet collar tissue death due to *P. aphanidermatum* inoculation (B), wheat root tissue death by P.G.F (C), Death of wheat plants by inoculation of plants with *P. ostracodes* (D), necrosis of corn roots due to *P. ostracodes* inoculation. *diclinum* (E) and corn root necrosis due to inoculation of *P. aphanidermatum* (F).

مایه‌زنی به برش‌های غده‌ی چغندر قند: برای اثبات بیماری‌زایی ۲۰ جدایه ذکر شده بلوک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از هر ایزوله روی محیط CMA کشت داده شد. از حاشیه کشت ۳ روزه قارچ‌ها بلوک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر جدا شد. غده‌های سالم با الکل سفید ۹۵٪ سطح آن ضد عفونی شد و سپس روی شعله به مدت چند ثانیه قرار گرفتند تا سطح آنها کاملاً عاری از آلودگی باشد و قطعاتی از غده‌ها به قطر ۷ سانتی‌متر و ضخامت ۱/۵ سانتی‌متر جداسازی و به درون پتری‌های استریل حاوی کاغذ صافی استریل منتقل شدند. مقدار کمی آب مقطر استریل به هر پتری اضافه شد (Heydari et al., 2010). پتری‌ها به مدت ۴ روز در شرایط اتاق نگهداری شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. روی هر غده یک بلوک قارچ قرار داده شد و قطر لکه ایجاد شده به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. این آزمون در طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد.



شکل ۳- پوسیدگی برش‌های غده چغندر قند: *P.G. G* سمت راست و *P. aphanidermatum* (پتری سمت چپ) (C)، *P. aphanidermatum* (پتری سمت راست) و شاهد (پتری سمت چپ) (D)، شاهد (پتری سمت چپ) و *P. G.F* (پتری سمت راست) (E)، *P. aphanidermatum* (پتری سمت راست) و *P. G.F* (پتری سمت چپ) (F)، *P. ultimum* (پتری سمت راست) و شاهد (پتری سمت چپ) (G).

Fig 3. Decay of sugar beet tuber slices: *G P.G.* (right Petri) and *P. aphanidermatum* (left Petri) (C); *P. aphanidermatum* (right Petri) and control (left Petri) (D); control (left Petri) and *P. G.F* (right Petri) (E); *P. aphanidermatum* (right Petri) and *P. G.F* (left Petri) (F); *P. ultimum* (right Petri) and control (left Petri) (G).

نتایج و بحث

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های پی تیوم

P. aphanidermatum. جدایه‌های اینگونه با توصیف وانلاپلاتس (۱۹۸۱) تطابق داشت، یعنی دارای اسپورانژیومهای انگشتی متورم با ابعاد مختلف، آنتریدیوم‌های بین سلولی و اسپورهایی که فضای داخل آگونیوم را پر نمی‌کنند. آگونیومها کروی با دیواره صاف دارند و هیچ گونه تزئیناتی ندارند و پرگنه‌های قارچ روی محیط CMA تولید ریشه‌های هوایی پنبه‌ای شکل می‌کند (شکل ۴).

P. deliense. با خصوصیات یک جدایه *P. deliense* که از استان فارس جمع‌آوری شده بود بعد با توصیفات و اندرپلاتس (۱۹۸۱) مطابقت دارد. پرگنه‌ها روی محیط CMA رشد هوایی پنبه‌ای دارند. اسپورانژیومها انگشتی و متعدد، آنتریدیومها انتهایی و یک عدد است آگونیومها کروی با دیواره صاف و به صورت انتهایی یا بین ریشه‌ای تشکیل می‌شوند. آسپور کروی با دیواره صاف و فاقد تزئینات بوده و فضای آگونیوم را پر نمی‌کند (Vanderplaat- Niterink 1981, Moor man 2000) (شکل ۴).

P. ostracodes. بر روی محیط کشت CMA تولید ریشه‌های هوایی نمود. اسپورانژیومها انتهایی و کروی است. آگونیوم بینابینی یا انتهایی است و دیواره صاف دارد. آنتریدیومها به تعداد ۲ عدد در هر آگونیوم وجود دارد. آسپورها همگی فضای آگونیوم را پر کرده است (پلوروتیک) خصوصیات آن با توصیفات مونوگراف و اندرپلاتس (۱۹۸۱) تطابق دارد (شکل ۴).

P. ultimum. یک جدایه از این قارچ که از همدان جمع‌آوری شده بود دارای ریشه‌های هوایی کم و خوابیده روی محیط CMA است. دارای اسپورانژیومهای میانی یا انتهایی و گرد یا بشکته‌ای شکل هستند. آگونیومها کروی و با دیواره صاف و انتهایی هستند و یک آنتریدیوم به آن متصل است. آسپور کروی و حجم آگونیوم را پر نمی‌کند و دیواره صاف و بدون تزئینات دارد و با توصیفات و اندرپلاتس (۱۹۸۱) مطابقت دارد (شکل ۴).

P.G.F. ۱۳ جدایه این گروه از پی تیوم که از خوزستان جمع‌آوری شده بود دارای اسپورانژیومهای غیر قابل تمایز با ریشه هستند. ریشه‌ها تخت و بی‌شکل هستند. جدایه‌ها هتروئال هستند و تال منفرد در محیط کشت‌های مختلف تولید اوسپور نمی‌کنند. توصیفات آن مطابق با مونوگراف و اندرپلاتس است (شکل ۴).

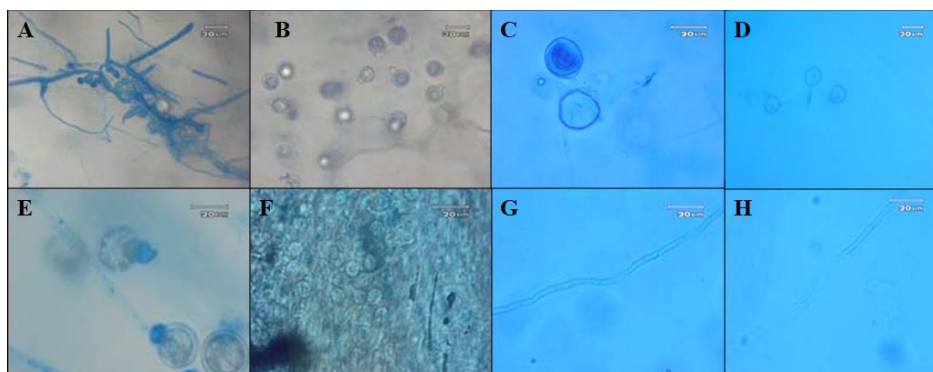
P.G.G. ۱۲ جدایه از این گروه پی تیوم که از خوزستان جداسازی شده بود دارای ریشه‌های تخت و بی‌شکل و اسپورانژیومهای گرد و کروی بودند. این جدایه‌ها تولید آسپور در محیط‌های کشت مختلف نکردند و هتروئال هستند و با توصیفات مونوگراف و اندرپلاتس (۱۹۸۱) مطابقت دارند (شکل ۴).

P. diclinum. این گونه الگوی رشدی منشعب روی محیط CMA دارد. اسپورانژیومها رشته‌ای و متورم به صورت منشعب یا غیرمنشعب هستند. آگونیومها کروی یا تخم‌مرغی با دیواره صاف و اغلب انتهایی هستند و دارای یک اسپور هستند که فضای آگونیوم را پر نمی‌کند. خصوصیات این قارچ با توصیفات و اندرپلاتس (۱۹۸۱) مطابقت داد (شکل ۴).

P. inflatum. این گونه بر روی محیط کشت CMA رشد منشعب دارد. اسپورانژیومهای رشته‌ای متورم دارند. آگونیومها با دیواره صاف و به صورت بینابینی یا انتهایی است. اسپورها فضایی داخل آگونیومها را پر می‌کنند (پلوروتیک) خصوصیات آن با توضیحات و اندرپلاتس مطابقت دارد (شکل ۴).

نتایج حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

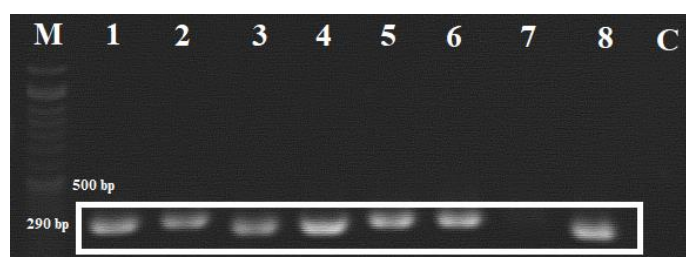
در واکنش پی.سی.آر با آغازگرهای ITS1, ITS2 که ناحیه بین ITS1-5.8S و ITS4 را تکثیر می‌کنند مطابق انتظار قطعه‌ای به اندازه‌ی ۲۹۰ جفت‌باز تکثیر شد و در چاهک کنترل منفی (C) هیچگونه قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۵).



شکل ۴- (A) اووگونیم و آنتریدیوم در *P. aphanidermatum* (B) اسپورانژیوم در *P. aphanidermatum* (C) سیستهای *P. oostrocodes* (D) آنتریدیوم و اووگونیم

در *P. ultimum* (E) اووسپور در *P. inflatum* (F) سیست در *P. diclinum* (G) ریشه در *P. group G* (H) ریشه در *P. group F*

Fig 4. A. Oogonium and antheridium in *P. aphanidermatum* B. sporangium in *P. aphanidermatum* C. Cysts of *P. oostrocodes* D. antheridium and oogonium in; *P. ultimum* E. Oospore in; *P. inflatum* F. Cyst in *P. diclinum*; G. hypha in; *P. group G* H. hypha in *P. Group F*.



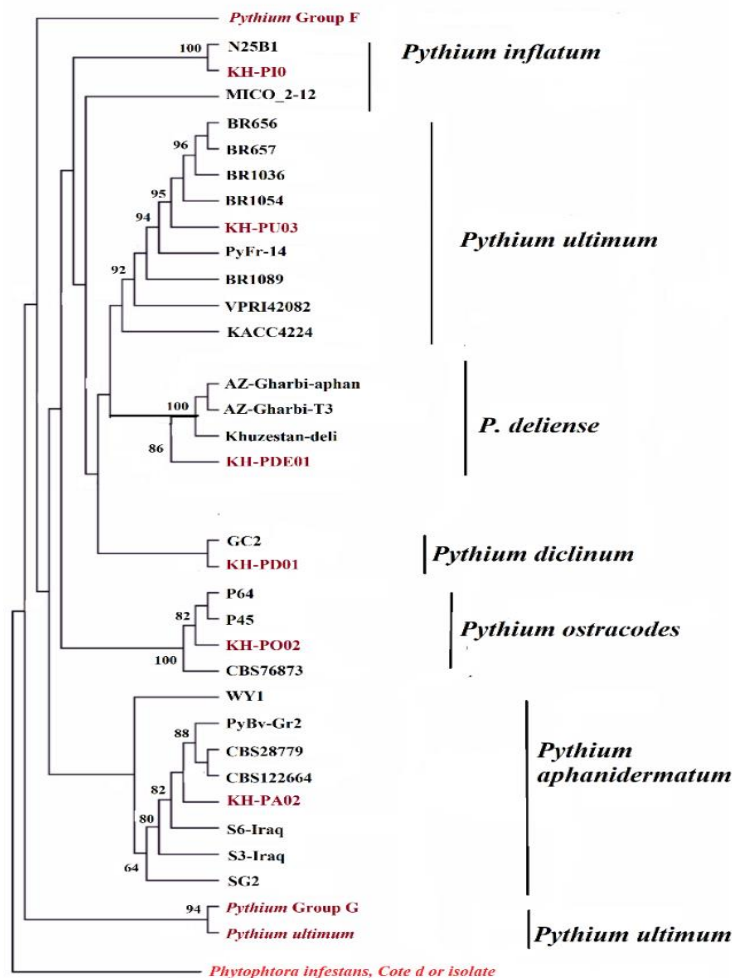
شکل ۵ - قطعات تکثیر شده حاصل از پی.سی.آر ناحیه ITS1-5.8S, ITS4 با آغازگرهای عمومی جنس پی تیوم (ITS1,2) که قطعه‌ای به اندازه‌ی ۲۹۰ جفت‌باز تکثیر شد. چاهک ۱ تا ۸ به ترتیب متعلق به قارچ

P. aphanidermatum *P. ultimum* *P. oostrocodes* *P. inflatum*, *P. diclinum* *P. deliense*, *P.G.G* و *P.G.F*.

Figure 5 . The reproduced parts obtained from PCR reactions of ITS1-5.8S, ITS4 region was amplified with general primers of Pythium genus (ITS1,2) and a fragment of 290 base pairs was amplified. Wells 1 to 8 belong to *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. oostrocodes*, *P. inflatum*, *P. diclinum*, *P. deliense*, *P.G.G* and *P.G.F*.

ترسیم درخت تبارنما برای جدایه‌های نماینده توالی‌یابی شده

درخت تبارزایی ترسیم شده براساس بخشی از توالی بین ITS1-5.8S, ITS2 (۲۹۰ نوکلئوتیدی) مربوط به آغازگرهای ITS1,2 و ۲۵ جدایه موجود در بانک ژن می‌باشد که دارای تشابه توالی در قطعه‌ی تکثیر شده مورد نظر می‌باشند. درخت تبارنما به روش بیشترین تشابه (ML, maximum likelihood) و توسط نرم‌افزار مگا-۸ (MEGA: 8.0.) ترسیم شده است. یک گونه نزدیک به جنس پی تیوم یعنی شبه‌قارچ عامل بادزدگی سیب‌زمینی (*Phytophthora infestans*) با رس شمار AB448694.1 نیز به‌عنوان Out group انتخاب شد. جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه‌های اروپایی در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. گروه‌هایی که فشردگی کمتر از ۶۴٪ مقادیر بوت‌استرپ را پشتیبانی می‌کردند، گزارش نشدند. رس‌شمار و خاستگاه جغرافیایی جدایه‌های مربوطه در درخت تبارنما نشان داده شده است (شکل ۶).



شکل ۶- درخت تبارنمای حاصل از توالی یابی جدایه‌های مورد پژوهش در این تحقیق و تعیین جایگاه آنها بین سایر جدایه‌های پی تیوم گزارش شده از سراسر جهان. جدایه‌هایی که مقادیر بوت‌استرپ کمتر از ۶۴٪ را پشتیبانی نمی‌کردند حذف شدند و یک جدایه از شبه‌قارچ عامل بادزدگی سیب زمینی (*Ph. infestans*) به عنوان گروه خارجی در درخت قرار گرفت.

Fig 6. Phylogenetic tree resulting from the sequencing of isolates studied in this research and determining their position among other *Pythium* isolates reported from around the world. The isolates that did not support bootstrap values less than 64% were removed and one isolate of potato blight pseudofungus (*Ph. infestans*) was placed as an outgroup in the tree.

نتایج حاصل از آزمون مقایسه قطر لکه‌های پوسیده روی چغندر قند:

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS و آزمون دانکن ایزوله‌ها را به چند دسته تقسیم‌بندی کرد و نشان داد که در سطح احتمال ۵٪ بین ایزوله‌ها ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی اختلاف معنی‌دار وجود دارد. ایزوله‌های *P. aphanidermatum* همگی در یک دسته (A) قرار گرفتند و ایزوله‌های *Pythium G.F. inflatum* نیز در یک گروه (D) قرار گرفتند. ایزوله‌های *P. diclinum* و *P. ultimum* در یک گروه (B) مجزا قرار گرفتند و ایزوله‌های *P. ostracodes* و *P. deliense* نیز در یک گروه (C) قرار گرفتند. ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی همه ایزوله‌های *P. aphanidermatum* در گروه A و ایزوله‌های *P. ultimum* و *P. diclinum* در گروه (B) و ایزوله‌های *P. deliense* و *P. ostracodes* در گروه (C) و ایزوله‌های *P. inflatum* و *P.G.F.* در گروه (D) و ایزوله‌های *P.G.G.* در گروه E قرار گرفتند. ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی همه ایزوله‌های *P. aphanidermatum* در گروه A و *P. diclinum* و *P. ultimum* در گروه (B)، ایزوله‌های *P. delienses* و *P. ostracodes* در گروه (C) و ایزوله‌های *P.G.F.* و *P.G.G.* و *P. inflatum* نیز در گروه D قرار گرفتند. در تیمار شاهد که در آن از محیط کشت فاقد قارچ استفاده شد هیچ

گونه علائم پوسیدگی مشاهده نشد. نتایج حاصل از آزمون مقایسه قطر لکه بر روی برش‌های غده‌های چغندر قند که به وسیله بلوک‌های ۵ میلی‌متری از جدایه مورد نظر مایه‌زنی شده بودند در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مقایسه قطر پوسیدگی‌های پی‌تیوم روی برش‌های چغندر قند

Table 1. Comparison of the diameter of pythium rots on sugar beet slices

Isolates	Spot diameter 24 hours after inoculation	Spot diameter 48 hours after inoculation	Spot diameter 72 hours after inoculation
<i>Pythium Group G</i> (GSt5)	1.0000	1.8000	2.2500
<i>Pythium Group G</i> (GDL4)	1.5500	1.8750	2.0000
<i>Pythium Group G</i> (GDL5)	1.0250	1.2000	1.9000
<i>Pythium Group F</i> (FSA ₁)	1.5000	2.5000	2.5000
<i>Pythium Group F</i> (FSt5)	1.5000	2.3500	2.4200
<i>Pythium Group F</i> (FDL5)	1.5000	2.0000	2.0000
<i>P. delienses</i> (A5)	2.1250	3.0000	3.0000
<i>P. ultimum</i>	3.0000	4.0000	4.0000
<i>P. ostracode</i> (Bll)	2.2500	3.3000	3.3000
<i>P. inflatum</i> (Kll7)	1.5750	2.3750	2.3750
<i>P. diclinum</i> (N143)	3.2750	4.2500	4.2500
<i>P. aphanidermatum</i> ASA ₁	4.0000	5.0000	5.0000
<i>P. aphanidermatum</i> ASD ₂	4.1250	5.0000	5.0000
<i>P. aphanidermatum</i> ASR ₁	4.3750	5.3750	5.3750
<i>P. aphanidermatum</i> ASB5	3.8750	5.1250	5.1250
<i>P. aphanidermatum</i> ADL4	4.2500	5.5000	5.5000
AAZ2 <i>P. aphanidermatum</i>	4.0000	5.1250	5.7500
AK11 <i>P. aphanidermatum</i>	4.0000	5.0000	5.0000
<i>P. aphanidermatum</i> ASR10	4.0000	6.0000	6.0000
<i>P. aphanidermatum</i> ADL14	4.2000	6.0000	6.0000
Control	0	0	0

بررسی بافت مردگی طوقه و ریشه در محیط آب-آگار

میانگین شدت بافت مردگی طوقه ایجاد شده در تمام تیمارها در چغندر قند صفر درصد و شدت بافت مردگی طوقه ایجاد شده توسط جدایه-های *P. aphanidermatum* در گندم بین ۲۵-۱۰٪ و در ذرت ۸-۱۸٪ و بیشتر از سایر گونه‌های پی‌تیوم بود. میانگین شدت بافت مردگی ریشه ایجاد شده در گندم در تمام تیمارهای جدایه‌های پی‌تیوم ۰٪ است (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین اندازه بافت مردگی طوقه روی هر گیاهان گندم، ذرت و چغندر قند با ۳ تکرار در سطح احتمال ۵٪، ۱۰ روز پس از مایه زنی با جدایه های پی تیوم. از محیط کشت WA بدون تلقیح با مایه پی- تیوم به عنوان شاهد استفاده شد.

Table 2. The average size of tissue-death collarrot on each wheat, corn and sugar beet plants with 3 replications at 5% probability level 10 days after inoculation with *Pythium* isolates.

<i>Pythium</i> spp.	Average severity of crown tissue death in plants			
	<i>Triticum</i> sp.	<i>Zea mays</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Total plants
<i>P. aphanidermatum</i> 1	25	18	0	14.333 ^A
<i>P. aphanidermatum</i> 7	15	18	0	11.000 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 4	15	13	0	9.333 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 2	15	13	0	9.333 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 5	10	18	0	9.333 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 8	10	13	0	7.667 ^{abc}
<i>P. aphanidermatum</i> 3	15	18	0	7.667 ^{abc}
<i>P. aphanidermatum</i> 6	15	8	0	7.667 ^{abc}
<i>P. aphanidermatum</i> 9	15	8	0	7.667 ^{abc}
<i>P. diclinum</i>	15	6	0	7.000 ^{abc}
<i>P.G.F2</i>	9	6	0	5.000 ^{bc}
<i>P.G.G1</i>	9	6	0	5.000 ^{bc}
<i>P.G.G2</i>	9	6	0	5.000 ^{bc}
<i>P.G.G3</i>	9	6	0	5.000 ^{bc}
<i>P.G.F3</i>	9	6	0	5.000 ^{bc}
<i>P. deliense</i>	3	12	0	5.000 ^{bc}
<i>P.G.F1</i>	9	6	0	5.000 ^{bc}
<i>P. inflatum</i>	6	6	0	4.000 ^{bc}
<i>P. ultimum</i>	6	6	0	4.000 ^{bc}
<i>P. oestracodes</i>	6	3	0	3.000 ^{bc}
Control	0	0	0	0.000 ^c

میانگین شدت بافت مردگی ریشه ایجاد شده توسط جدایه های *P. aphanidermatum* در چغندر قند بین ۲۴-۱۷٪ و در ذرت ۱۵٪ بود که بیشتر از سایر گونه های پی تیوم مورد بررسی در این پژوهش است. در گیاهان شاهد مایه زنی شده فقط با محیط کشت بافت مردگی طوقه و ریشه مشاهده نشد. میانگین درصد شدت بافت مردگی ایجاد شده توسط تمام ایزوله ها در هر گیاه با گیاه دیگر کاملاً متفاوت و در آزمون دانکن چند دامنه ای در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی داری نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین اندازه بافت مردگی ریشه روی هر کدام از گیاهان گندم، ذرت و چغندر قند با ۳ تکرار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪، ۱۰ روز پس از مایه زنی جدایه های پی تیوم. از محیط کشت WA بدون تلقیح با جدایه های پی تیوم به عنوان شاهد استفاده شد.

Table 3. The average size of dead root tissue on each wheat, corn and sugar beet plants with 3 replications at 1% and 5% probability level, 10 days after inoculation with Pytium isolates. WA culture medium without inoculation with Ptium isolates was used as a control.

Pythium spp.	Average severity of root tissue necrosis in plants			
	Triticum sp.	Zea mays	Beta vulgaris	Total plants
<i>P. aphanidematum</i> 4	0	15	24	13.000 ^A
<i>P. aphanidematum</i> 3	0	15	22	12.333 ^A
<i>P. aphanidematum</i> 1	0	15	22	12.333 ^A
<i>P. aphanidematum</i> 2	0	15	22	12.333 ^A
<i>P. aphanidematum</i> 7	0	15	17	10.667 ^A
<i>P. aphanidematum</i> 8	0	15	17	10.667 ^A
<i>P. aphanidematum</i> 5	0	15	17	10.667 ^A
<i>P. aphanidematum</i> 6	0	15	17	10.667 ^A
<i>P. aphanidematum</i> 9	0	15	17	10.667 ^A
<i>P. deliense</i>	0	12	12	8.000 ^{Ab}
<i>P. diclinum</i>	0	8	16	8.000 ^{Ab}
<i>P. inflatum</i>	0	6	14	6.667 ^{Ab}
<i>P. ostracodes</i>	0	3	14	6.667 ^{Ab}
<i>P. ultimum</i>	0	3	12	5.000 ^{Ab}
<i>P.G.F1</i>	0	6	6	4.000 ^{Ab}
<i>P.G.G3</i>	0	6	6	4.000 ^{Ab}
<i>P.G.F3</i>	0	6	6	4.000 ^{Ab}
<i>P.G.F2</i>	0	6	6	4.000 ^{Ab}
<i>P.G.G1</i>	0	6	6	4.000 ^{Ab}
<i>P.G.G2</i>	0	3	6	3.000 ^{Ab}
Control	0	6	0	0.000 ^b

بررسی بافت مردگی طوقه و ریشه در محیط CMA

میانگین شدت بافت مردگی ایجاد شده در طوقه در تمام تیمارهای جدایه های پی تیوم روی گندم و ذرت در سطح احتمال ۵٪ نسبت به شاهد (تیمار شده فقط با محیط کشت WA) معنادار بود. شدت بافت مردگی طوقه حاصل از تیمار *P. aphanidermatum* در گندم (۱۷-۲۴) و ذرت (۱۵٪) بیش از سایر گونه های پی تیوم بود. *P. aphanidermatum* در چغندر قند باعث بافت مردگی طوقه نگردید (جدول ۴).

جدول ۴- میانگین شدت بافت مردگی طوقه حاصل از تیمار ایزوله‌های پی تیوم روی ذرت، چغندر قند و گندم. از محیط کشت WA تلقیح نشده با جدایه‌های پی تیوم به عنوان شاهد استفاده شد.

Table 4. The average intensity of Collar rot resulting from the Inoculation with *Pythium* isolates on corn, sugar beet and wheat. WA culture medium not inoculated with *Ptium* isolates was used as a control.

<i>Pythium</i> spp.	Average percentage of crown tissue necrosis severity in plants.			
	<i>Triticum</i> sp.	<i>Zea mays</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Total plants
<i>P.phanidematum</i> 1	24	15	0	13.000 ^A
<i>P.phanidematum</i> 4	17	15	0	10.667 ^A
<i>P.phanidematum</i> 3	17	15	0	10.667 ^A
<i>P.phanidematum</i> 6	17	15	0	10.667 ^A
<i>P.phanidematum</i> 7	17	15	0	10.667 ^A
<i>P.phanidematum</i> 8	17	15	0	10.667 ^A
<i>P.phanidematum</i> 5	17	15	0	10.667 ^A
<i>P.phanidematum</i> 2	17	15	0	10.667 ^A
<i>P.phanidematum</i> 9	17	15	0	10.667 ^A
<i>P.deliense</i>	9	12	0	7.000 ^{Ab}
<i>P.diclinum</i>	10	9	0	6.333 ^{Ab}
<i>P.G.F2</i>	9	6	0	5.000 ^{Ab}
<i>P.G.G2</i>	9	6	0	5.000 ^{Ab}
<i>P.G.G3</i>	9	6	0	5.000 ^{Ab}
<i>P.G.F3</i>	9	6	0	5.000 ^{Ab}
<i>P.G.F1</i>	9	6	0	5.000 ^{Ab}
<i>P.G.G1</i>	9	3	0	4.000 ^{Ab}
<i>P.inflatum</i>	6	6	0	4.000 ^{Ab}
<i>P.ostracodes</i>	6	6	0	4.000 ^{Ab}
<i>P.ultimum</i>	6	6	0	4.000 ^{Ab}
Control	0	0	0	0.000 ^B

همچنین، میانگین شدت بافت مردگی ریشه در گندم در تمام تیمارهای گونه‌های پی تیوم صفر٪، در چغندر قند شدت بافت مردگی ریشه ایجاد شده بوسیله *P. aphanidermatum* بیشتر از دو گیاه دیگر و بین ۲۶-۲۴٪ و در نهایت شدت بافت مردگی توسط جدایه‌های پی تیوم مورد مطالعه در این تحقیق در ذرت به‌طور میانگین ۱۷٪ بود. بنابراین میانگین شدت بافت مردگی ریشه توسط تیمارهای پی تیوم روی گیاهان ذرت و چغندر قند در سطح احتمال ۵٪ معنادار بود (جدول ۵).

جدول ۵- میانگین شدت بافت مردگی ریشه حاصل از تیمار ایزوله‌های پی تیوم روی ذرت، چغندر قند و گندم. از محیط کشت WA تلقیح نشده با جدایه‌های پی تیوم به عنوان شاهد استفاده شد.

Table 5. Mean intensity of dead root tissue resulting from the treatment of *Pythium* isolates on corn, sugar beet and wheat. WA culture medium not inoculated with *Pythium* isolates was used as a control.

<i>Pythium</i> spp.	Average severity of root tissue necrosis in plants			
	<i>Triticum</i> sp.	<i>Zea mays</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Total plants
<i>P.aphanidematum</i> 7	0	17	26	14.333 ^A
<i>P.aphanidematum</i> 4	0	17	26	14.333 ^A
<i>P.aphanidematum</i> 5	0	17	26	14.333 ^A
<i>P.aphanidematum</i> 6	0	17	26	14.333 ^A
<i>P.aphanidematum</i> 9	0	17	26	14.333 ^A
<i>P.aphanidematum</i> 8	0	17	26	14.333 ^A
<i>P.aphanidematum</i> 3	0	17	24	13.667 ^A
<i>P.aphanidematum</i> 2	0	17	24	13.667 ^A
<i>P.aphanidematum</i> 1	0	17	26	13.667 ^A
<i>P.ultimum</i>	0	5	25	10.000 ^{Ab}
<i>P.ostracodes</i>	0	6	23	9.667 ^{Ab}
<i>P.diclinum</i>	0	8	20	9.337 ^{Ab}
<i>P.inflatum</i>	0	3	23	8.667 ^{Ab}
<i>P.deliense</i>	0	12	12	8.000 ^{Ab}
<i>P.G.G2</i>	0	6	12	6.000 ^{Ab}
<i>P.G.G3</i>	0	6	12	6.000 ^{Ab}
<i>P.G.F1</i>	0	6	12	6.000 ^{Ab}
<i>P.G.F2</i>	0	6	12	6.000 ^{Ab}
<i>P.G.F3</i>	0	6	12	6.000 ^{Ab}
<i>P.G.G1</i>	0	6	12	6.000 ^{Ab}
Shahed	0	5	0	0.000 ^b

بررسی بافت مردگی طوقه و ریشه توسط جدایه های پی تیوم در زادمایه دارای ارزن

میانگین شدت بافت مردگی طوقه در تمام تیمارهای جدایه های پی تیوم روی گیاه چغندر قند صفر % و میانگین شدت بافت مردگی طوقه حاصل از تیمار ایزوله های *P. aphanidermatum* در گیاه ذرت بین ۲۰-۱۳/۷۵ % و در گندم ۲۵-۲۱/۲۵ % و بیش از سایر گونه های پی- تیوم مورد بررسی در این تحقیق بود. بنابراین در تمام جدایه های مورد بررسی میانگین شدت بافت مردگی طوقه نسبت به گیاهان کنترل (تلقیح شده با محیط کشت ارزن) در سطح احتمال ۵ % معنادار بود (جدول ۶).

جدول ۶- بررسی میانگین شدت بافت‌مردگی طوقه توسط جدایه های پی تیوم در زادمایه دارای ارزن در گیاهان چغندر قند، ذرت و گندم

Table 6. Average intensity of crown tissue death by *Pythium* isolates inoula mixed with millet seeds in sugar beet, corn and wheat plants.

<i>Pythium</i> spp.	Average percentage of crown tissue necrosis severity in plants			
	<i>Triticum</i> sp.	<i>Zea mays</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Total plants
<i>P. aphanidermatum</i> 2	25	20	0	15 ^a
<i>P. aphanidermatum</i> 7	21.25	20	0	13.750 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 5	21.25	20	0	13.750 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 8	21.25	20	0	13.750 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 6	27.5	13.75	0	13.750 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 3	25	13.75	0	12.917 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 1	25	13.75	0	12.917 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 4	25	13.75	0	12.917 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 9	21.25	13.75	0	11.667 ^{Ab}
<i>P. diclinum</i>	18.75	11.25	0	10 ^{Abc}
<i>P. ostracodes</i>	15	3.75	0	6.250 ^{Abc}
<i>P. ultimum</i>	10	7.5	0	5.833 ^{Abc}
<i>P. inflatum</i>	7.5	7.5	0	5.000 ^{Abc}
<i>P. deliense</i>	7.5	7.5	0	5.000 ^{Abc}
<i>P.G.G2</i>	7.5	3.75	0	3.750 ^{Bc}
<i>P.G.G3</i>	7.5	3.75	0	3.750 ^{Bc}
<i>P.G.F1</i>	7.5	3.75	0	3.750 ^{Bc}
<i>P.G.F2</i>	7.5	3.75	0	3.750 ^{Bc}
<i>P.G.F3</i>	7.5	3.75	0	3.750 ^{Bc}
<i>P.G.G1</i>	7.5	3.75	0	3.750 ^{Bc}
Control	0	0	0	0 ^c

میانگین شدت بافت‌مردگی ریشه ناشی از جدایه‌های *P. aphanidermatum* بر روی گندم ۲۵-۱۸/۷۵٪، در ذرت ۱۸/۷۵٪ و در چغندر قند بیشترین شدت بافت‌مردگی یعنی ۳۸/۷۵-۳۵٪ مشاهده شد. میانگین شدت بافت‌مردگی ریشه ناشی از جدایه‌های *P. aphanidermatum* بیشتر از سایر گونه‌های پی تیوم مورد بررسی بر روی گیاهان مذکور در این تحقیق بود. ولی در حالت کلی میانگین شدت بافت‌مردگی ریشه ناشی تمامی جدایه‌های پی تیوم نسبت به گیاهان شاهد در سطح احتمال ۵٪ معنادار بود (جدول ۷).

جدول ۷- میانگین شدت بافت مردگی ریشه توسط جدایه‌های پی‌تیوم در زادمایه دارای ارزن در گیاهان چغندر قند، ذرت و گندم

Table 7- Average severity of root tissue death by *Pythium* isolates inocula mixed with millet in sugar beet, corn and wheat plants.

<i>Pythium</i> spp.	Average severity of root tissue necrosis in plants			
	<i>Triticum</i> sp.	<i>Zea mays</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Total plants
<i>P. aphanidermatum</i> 9	25	18.75	38.75	27.500 ^A
<i>P. aphanidermatum</i> 8	25	18.75	38.75	27.500 ^A
<i>P. aphanidermatum</i> 6	25	18.75	38.75	27.500 ^A
<i>P. aphanidermatum</i> 7	25	18.75	38.75	26.667 ^A
<i>P. aphanidermatum</i> 5	18.75	18.75	38.75	25.417 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 4	18.75	18.75	38.75	25.417 ^{Ab}
<i>P. aphanidermatum</i> 3	18.75	18.75	35	24.167 ^{Abc}
<i>P. aphanidermatum</i> 1	18.75	18.75	35	24.167 ^{Abdc}
<i>P. aphanidermatum</i> 2	18.75	18.75	35	23.333 ^{Abc}
<i>P. ostracodes</i>	15	11.25	15	13.750 ^{Bce}
<i>P. deliense</i>	7.5	7.5	22.5	12.500 ^{Cde}
<i>P. diclinum</i>	7.5	10	15	10.833 ^e
<i>P. inflatum</i>	7.5	7.5	15	10.000 ^{De}
<i>P. ultimum</i>	3.75	11.25	15	6.250 ^{De}
<i>P.G.G2</i>	7.5	0	11.25	6.250 ^{De}
<i>P.G.F3</i>	7.5	0	11.25	5.000 ^{De}
<i>P.G.G3</i>	7.5	0	7.5	5.000 ^{De}
<i>P.G.F2</i>	7.5	0	7.5	5.000 ^{De}
<i>P.G.F1</i>	7.5	0	7.5	5.000 ^{De}
<i>P.G.G1</i>	7.5	0	7.5	5.000 ^{De}
Control	0	0	0	0/0000 ^e

بحث

بافت مردگی طوقه و ریشه: در بررسی‌های انجام گرفته بر روی جدایه‌های *P. aphanidermatum* مشاهده شد که خصوصیات جدایه‌ها با توصیفات هو (Ho, 2018) تطابق دارد. جدایه‌های این گونه دارای اسپورانژیوم‌های انگشتی متورم با ابعاد مختلف، آنتریدیوم‌های بین‌سلولی و اسپورهایی که فضای داخل آگونیوم را پر نمی‌کنند. آگونیوم‌ها کروی با دیواره صاف و هیچ‌گونه تزئیناتی ندارند و پرگنه‌های قارچ روی محیط CMA تولید ریشه‌های هوایی پنبه‌ای شکل می‌کند. خصوصیات جدایه از *P. deliense* با توصیفات گرباوی و همکاران (Gherbawy et al., 2005) مطابقت دارد. پرگنه‌ها روی محیط CMA رشد هوایی پنبه‌ای دارند. اسپورانژیوم‌ها انگشتی و متعدد، آنتریدیوم‌ها انتهایی و ۱ عدد است. آگونیوم‌ها کروی با دیواره صاف و به‌صورت انتهایی یا بین ریشه‌ای تشکیل می‌شوند. آسپور کروی با دیواره صاف و فاقد تزئینات بوده و فضای آگونیوم را پر نمی‌کند. جدایه *P. ostracodes* بر روی محیط کشت CMA تولید ریشه‌های هوایی نمود. اسپورانژیوم‌ها انتهایی و کروی است. آگونیوم بینابینی یا انتهایی است و دیواره صاف دارد. آنتریدی‌ها به تعداد ۲ عدد در هر آگونیوم وجود دارند. آسپورها همه فضای آگونیوم را پر کرده است (پلوروتیک) و خصوصیات آن با توصیفات رودریگز و رویز و اندرپلاتس تطابق دارد (Rodriguez-Lazaro & Ruiz-Muñoz, 2012).

جدایه *P. ultimum* دارای ریشه‌های هوایی کم و خوابیده روی محیط CMA است. دارای اسپورانژیوم‌های میانی یا انتهایی و گرد یا بشکله‌ای شکل هستند. آگونیوم‌ها کروی و با دیواره صاف و انتهایی هستند و یک آنتریدی به آن متصل است. آسپور کروی و حجم آگونیوم را پر نمی‌کند و دیواره صاف و بدون تزئینات دارد و با توصیفات کاگیاما مطابقت دارد (Kageyama, 2014). ۱۳ جدایه این گروه *P.G.F* دارای اسپورانژیوم‌های غیرقابل تمایز با ریشه هستند. ریشه‌ها تخت و بی‌شکل بودند. جدایه‌ها هتروتال و تال منفرد در محیط‌های کشت

مختلف تولید اوسپور نمی‌کنند. توصیفات این گونه نیز مطابق با لوسکیو و همکاران (Levesque et al., 2004) است. ۱۲ جدایه *P.G.G* دارای ریشه‌های تخت، بی‌شکل و اسپورانژیوم‌های گرد و کروی بودند. این جدایه‌ها تولید اُسپور در محیط‌های کشت مختلف نکردند، همچنین هتروتال بوده و با توصیفات لوسکیو و همکاران (Levesque et al., 2004) مطابقت دارند. جدایه *P. diclinum* الگوی رشدی منشعب روی محیط CMA دارد. اسپورانژیوم‌ها رشته‌ای و متورم به صورت منشعب یا غیرمنشعب هستند. آگونیوم‌ها کروی یا تخم‌مرغی با دیواره صاف و اغلب انتهایی هستند و دارای یک اسپور هستند که فضای آگونیوم را پر نمی‌کند. خصوصیات این گونه با توصیف لوسکیو و همکاران (Levesque et al., 2004) مطابقت داد. جدایه *P. inflatum* بر روی محیط کشت CMA رشد منشعب نشان داد. اسپورانژیوم‌های رشته‌ای متورم و آگونیوم‌ها با دیواره صاف و به صورت بینابینی یا انتهایی بودند. اسپورها فضایی داخل آگونیوم‌ها را پر کرده (پلوروتیک) و خصوصیات آن با توصیفات لوسکیو و همکاران (Levesque et al., 2004) مطابقت دارد.

الف: چغندر قند

میانگین شدت بافت‌مردگی طوقه ایجاد شده در تمام تیمارهای پی‌تیوم در چغندر قند در محیط کشت WA صفر٪ در حالیکه تمام گونه‌های مورد بررسی پی‌تیوم موجود در محیط کشت WA منجر به بافت‌مردگی ریشه در چغندر شدند که بیشترین میانگین شدت بافت‌مردگی ریشه ایجاد شده توسط جدایه‌های *P. aphanidermatum* (۲۴-۱۷٪) ایجاد شد.

در محیط کشت CMA نیز بافت‌مردگی طوقه توسط هیچ‌کدام از جدایه‌های پی‌تیوم مورد بررسی مشاهده نشد ولی بافت‌مردگی ریشه توسط تمامی جدایه‌های مورد بررسی کشت شده در این محیط کشت روی چغندر قند مشاهده شد که بیشترین بافت‌مردگی مربوط به چغندر قند و تیمار جدایه‌های *P. aphanidermatum* (۲۴-۲۶٪) بود. در محیط کشت دارای ارزن نیز بافت‌مردگی طوقه در چغندر قند مشاهده نشد ولی بافت‌مردگی ریشه توسط تمامی تیمارها مخصوصاً تیمار جدایه‌های *P. aphanidermatum* (۱۸-۲۵٪) مشاهده شد. در محیط کشت ورمی‌کولایت با نسبت ۱/۵ بیشترین شدت بافت‌مردگی طوقه در گیاه چغندر قند توسط جدایه‌های *P.G.G* (۴۹-۴۲٪) و سپس *P.G.F* (۳۵٪) حاصل شد. گونه‌های *P. ostracodes*، *P. diclinum*، *P. ultimum* و بیشتر گونه‌های *P. aphanidermatum* (به جز جدایه‌های ۷ و ۹) هیچ گونه بافت‌مردگی روی طوقه ایجاد نکردند. در محیط کشت ورمی‌کولایت ۱/۱۰ نیز بیشترین شدت بافت‌مردگی طوقه در گیاه چغندر قند، به ترتیب توسط جدایه‌های *P.G.G* (۵۶٪)، *P.G.F* (۴۲٪) و *P. infaltum* (۳۵٪) و *P. aphanidermatum* (۲۱-۷٪) حاصل شد. گونه‌های *P. diclinum* و *ultimum* در چغندر قند بافت‌مردگی در طوقه ایجاد نکردند. میانگین بیشترین شدت بافت‌مردگی ریشه در گیاه چغندر قند توسط جدایه‌های *P. aphanidermatum* (۱۲-۲۱٪) همچنین، میزان شدت بافت‌مردگی توسط سایر گونه‌ها بین ۹-۶٪ بود. و در نهایت گونه‌های *P. diclinum* و *P. ultimum* روی ریشه‌ی چغندر قند بافت‌مردگی ایجاد نکردند.

در تحقیقات انجام شده توسط آرورا و همکاران نیز درصد ظهور گیاهچه ۲ هفته بعد از کاشت در خاک آلوده با پی‌تیوم در بذرهای چغندر قند ۸٪ و در خاکهای عاری از آلودگی ۷۷٪ بود. به طور کلی کاهش محصول در نتیجه از پا افتادگی محصول و پوسیدگی ریشه و طوقه چغندر قند می‌تواند تا حدود ۱۰۰٪ باشد و در بیشتر مراحل نابالغ مانند مرحله بذری و گیاهچه جوان قارچ قادر است که راحت‌تر به درون بافت گیاه نفوذ کند (Arora et al., 2021).

ریشه‌های جوان می‌توانند در هر مرحله‌ای از زندگی و رشد گیاه مورد حمله پی‌تیوم قرار گیرند و گاه تا ۶۰٪ از گیاهان چغندر قند در مزرعه در اثر پوسیدگی بذر از بین می‌روند (Rai et al., 2019). گونه‌های *P. aphanidermatum*، *P. ultimum* بخصوص باعث پوسیدگی بذر می‌شوند، چنانچه در خاک آلوده به *P. aphanidermatum* درصد پوسیدگی بذر در بذرهای ضد عفونی شده با قارچ‌کش ۹ و ۱۷٪ با کربوکسین تیرام و در بذرهای ضد عفونی نشده ۹۳٪ بود در خاک آلوده با *P. ultimum* نیز درصد پوسیدگی ریشه چغندر قند در بذرهای ضد عفونی شده ۲۳ و ۲٪ و در بذرهای ضد عفونی نشده ۷۸٪ بود (Mahendra et al., 2018).

ب) گندم

شدت بافت مردگی طوقه ایجاد شده توسط جدایه‌های *P. aphanidermatum* در محیط کشت WA در گندم بین ۲۵-۱۰٪ و بیشتر از سایر گونه‌های پی تیوم بود. میانگین شدت بافت مردگی ریشه گندم در تمام تیمارهای جدایه‌های پی تیوم صفر٪ بود.

شدت بافت مردگی طوقه حاصل از تیمار *P. aphanidermatum* در محیط کشت CAM و در گندم (۱۷-۲۴٪) بیش از سایر گونه‌های پی تیوم بود. همچنین، میانگین شدت بافت مردگی ریشه در گندم در تمام تیمارهای گونه‌های پی تیوم در محیط کشت CAM صفر٪ بود.

میانگین شدت بافت مردگی طوقه حاصل از تیمار ایزوله‌های *P. aphanidermatum* در محیط کشت دارای اینوکولوم ارزن در گیاه گندم ۲۵-۲۱/۲۵٪ و بیش از سایر گونه‌های پی تیوم مورد بررسی در این تحقیق بود. میانگین شدت بافت مردگی ریشه ناشی از جدایه‌های *P. aphanidermatum* بر روی گندم در محیط کشت ارزن توسط تمام جدایه‌های مورد بررسی مشاهده گردید و در این بین جدایه‌های گونه‌ی *P. aphanidermatum* دارای بیشترین میانگین شدت بافت مردگی ریشه (۷۵-۱۸/۲۵٪) بودند.

در محیط کشت ورمی کولایت ۱/۵ تمامی جدایه‌های مربوط به همه‌ی گونه‌های پی تیوم به جز گونه‌های *P. inflatum* و *P. ostracodes* منجر به بافت مردگی طوقه گیاه در گندم نسبت به گیاهان شاهد در سطح احتمال ۵٪ شدند. در گندم بیشترین میانگین شدت بافت مردگی طوقه توسط *P. aphanidermatum* ایجاد شد (۱۷-۲۳٪).

در محیط کشت ورمی کولایت ۱/۱۰ نیز تمامی جدایه‌های مربوط به همه‌ی گونه‌های پی تیوم منجر به بافت مردگی طوقه گیاه نسبت به گیاهان شاهد در سطح احتمال ۵٪ شدند. بیشترین میانگین شدت بافت مردگی طوقه توسط *P. aphanidermatum* در گندم ایجاد شد (۳۳٪-). بعد از *P. aphanidermatum* بیشترین میانگین شدت بافت مردگی طوقه مربوط به گونه *P. diclinum* (۳۰٪) و در نهایت میانگین شدت بافت مردگی طوقه مربوط به بقیه گونه‌های پی تیوم روی گندم نیز بین ۲۲٪-۶٪ بود. بافت مردگی ریشه گندم در محیط ۱/۱۰ ورمی کولایت نیز تمامی جدایه‌های مربوط به همه‌ی گونه‌های پی تیوم منجر به بافت مردگی طوقه گیاه نسبت به گیاهان شاهد در سطح احتمال ۵٪ شدند. بیشترین میانگین شدت بافت مردگی طوقه توسط *P. aphanidermatum* و *P. diclinum* ایجاد شد (۹٪). در نهایت میانگین شدت بافت مردگی ریشه مربوط به بقیه گونه‌های پی تیوم روی گندم نیز بین ۶-۳٪ بود.

در آزمونی که هرینگ و همکاران انجام دادند بعد از سه هفته که از کاشت گندم گذشته بود ۳۵٪-۳۰٪ از گیاهان به پی تیوم آلوده بودند و ارتفاع گیاهان حاصل از بذره‌های رشد یافته در خاک آلوده کوتاه‌تر از گیاه رشد یافته در خاک سالم بود (Hering et al., 1987). روانلو نیز در تحقیقاتی که انجام داد درصد پوسیدگی بذر را در ایزوله‌های *P. ultimum* ۸/۴٪-۱/۶٪ و در *P.G.F* به میزان ۸/۲۸٪-۹/۶٪ گزارش داد و میزان پوسیدگی طوقه و ریشه را در *P. ultimum* به ترتیب ۱۱/۲٪-۶/۴٪ و ۶/۴٪ و در *P. G. F* نیز درصد پوسیدگی طوقه ریشه به ترتیب ۲۲/۴-۱۷/۱۶٪ و ۲۲/۴-۴/۸٪ گزارش داد (Ravanlou & Banihashemi, 1989). میزان اینوکولوم بکار رفته در میزان بیماری‌زایی و آلودگی گیاه تأثیر مستقیم دارد چنانچه در *P. ultimum* درصد مرگ گیاهچه در غلظت اینوکولوم ۵۰۰ اووسپور ۵۰٪ و در غلظت اینوکولوم ۱۰۰ اووسپور صفر٪ بود (Daly et al., 2021). مایه‌زنی گونه‌های مختلف پی تیوم به گیاهان رشد یافته ۲ ماهه که در آن از بذر ارزن برای تهیه مایه قارچ استفاده شده بود در شرایط مزرعه‌ای نشان داد که *P. aphanidermatum* و *P. ostracodes* بیش از سایر گونه‌ها باعث بافت مردگی طوقه و ریشه می‌شوند (Subila & Suseela Bhai, 2020). اگر چه گیاهان بزرگ شده و رشد یافته نسبت به اکثر قارچ‌ها مقاوم هستند و لیکن، بروز علائم بیماری و بافت مردگی طوقه و ریشه به نظر می‌رسد که مربوط به حضور فعال قارچ در خاک و مناسب بودن شرایط مخصوص رطوبت و دما برای فعالیت قارچ است (Alarjani & Elshikh, 2024).

ج) ذرت

میانگین شدت بافت مردگی طوقه ایجاد شده در تمام تیمارهای جدایه‌های پی تیوم محیط کشت WA در ذرت ۸٪-۱۸٪ و بیشتر از سایر گونه‌های پی تیوم بود. میانگین شدت بافت مردگی ریشه در محیط کشت WA ایجاد شده توسط جدایه‌های *P. aphanidermatum* در ذرت ۱۵٪ بود که بیشتر از سایر گونه‌های پی تیوم مورد بررسی در این پژوهش است.

در محیط کشت CMA میانگین شدت بافت مردگی ایجاد شده در طوقه در تمام تیمارهای جدایه‌های پی‌تیوم روی ذرت در سطح احتمال ۵٪ نسبت به شاهد (تیمار شده فقط با محیط کشت WA) معنادار بود. شدت بافت مردگی طوقه حاصل از تیمار *P. aphanidermatum* ذرت (۱۵٪) بود. شدت بافت مردگی توسط جدایه‌های پی‌تیوم مورد مطالعه در این تحقیق در ذرت به‌طور میانگین ۱۷٪ بود. بنابراین میانگین شدت بافت مردگی ریشه توسط تیمارهای پی‌تیوم روی گیاهان ذرت در سطح احتمال ۵٪ معنادار بود.

در محیط کشت دارای اینوکولوم ارزن میانگین شدت بافت مردگی طوقه در تمام تیمارهای جدایه‌های پی‌تیوم در گیاه ذرت بین ۲۰٪- ۱۳/۷۵٪ بود. میانگین شدت بافت مردگی ریشه ناشی از جدایه‌های *P. aphanidermatum* بر روی ذرت ۱۸/۷۵٪ بود. میانگین شدت بافت مردگی ریشه ناشی از جدایه‌های *P. aphanidermatum* بیشتر از سایر گونه‌های پی‌تیوم مورد بررسی بر روی ذرت بود. ولی در حالت کلی میانگین شدت بافت مردگی ریشه ناشی تمامی جدایه‌های پی‌تیوم نسبت به گیاهان شاهد در سطح احتمال ۵٪ معنادار بود.

در شرایط آزمایشگاهی در رطوبت بالا در دمای مناسب برای رشد و فعالیت قارچ مشاهده شد که گونه‌های یاد شده دارای قدرت بیماریزایی بر روی گیاه ذرت می‌باشند و سبب پوسیدگی طوقه و ریشه می‌شوند. اما مشخص شده است در شرایط مزرعه خسارات ایجاد شده بوسیله این قارچ چشمگیر نیست (Hyder et al., 2021). این امر شاید بدلیل این است که شرایط برای آلودگی گیاه در گلخانه توسط قارچهای یاد شده بدون حضور سایر قارچ‌های مفید و یا شکارگر پی‌تیوم موجود در خاک مزارع مساعدتر است و گیاهان موجود در مزرعه به واسطه وجود ریزموجودات مفید در خاک در برابر پی‌تیوم مقاومت می‌کنند (Ao et al., 2024). تحقیقات انجام شده نیز بیانگر پوسیدگی طوقه ذرت به میزان ۴۰٪ و نکروز ریشه به میزان ۱۵٪ در خاکهای حاوی پی‌تیوم مخصوصا جدایه‌های *P. diclimum* و *P. aphanidermatum* است (Ao et al., 2024). حتی در خاکهایی که با عوامل بیولوژیکی نظیر *Burkholderia cepacia* تیمار شده بودند پوسیدگی بذر ۲۵٪ و نکروز ریشه به میزان ۱۵٪ مشاهده شد (Thomas et al., 2016). بررسی‌ها همچنین نشان داد که درصد مرگ گیاهچه در خاک آلوده به پی‌تیوم ۷۵٪ و خاک غیر آلوده ۲۵٪ بود است و شدت پوسیدگی ریشه نیز ۴۵٪ در خاک آلوده و ۱۵٪ در خاک غیر آلوده بوده است (Liu et al., 2023). همچنین در بین گونه‌های پی‌تیوم که بر روی ذرت بهاره تست شده بودند *P. aphanidermatum* از همه بیماریزاتر بوده است (Barboza et al., 2022). در خاکهای حاوی *P. ultimum* نیز درصد مرگ گیاهچه بر اثر پوسیدگی طوقه و ریشه ۵۲٪ بوده است (Gleń-Karolczyk et al., 2022). در مایه‌زنی گیاهان ۲ ماهه ذرت با دانه‌های ارزان آغشته با پی‌تیوم نیز درصد قابل‌توجهی از گیاهان دچار بافت مردگی طوقه و ریشه شدند که درصد بیماری‌زایی در گونه‌های *P. diclimum* و *P. aphanidermatum* بیش از سایر گونه‌ها گزارش شده است (Liu et al., 2023).

منابع

- Afzali, H., & Banihashemi, Z. (2000). A new record of a species of *Pythium* as a causal agent of sugar beet root rot in Iran. In 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran.
- Alarjani, K. M., & Elshikh, M. S. (2024). Plant growth- promoting and biocontrol traits of endophytic *Bacillus licheniformis* against soft rot causing *Pythium myriotylum* in ginger plant. *Journal of Basic Microbiology*, e202300643. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300643>.
- Ao, N., Zou, H., Li, J., Shao, H., Kageyama, K., & Feng, W. (2024). First report of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum* causing root rot on chili pepper (*Capsicum annuum* L.) in Guizhou, China. *Crop Protection*, 181, 106704. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106704>.
- Arora, H., Sharma, A., Sharma, S., Haron, F. F., Gafur, A., Sayyed, R. Z., & Datta, R. (2021). *Pythium* damping-off and root rot of *Capsicum annuum* L.: impacts, diagnosis, and management. *Microorganisms*, 9(4), 823. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040823>.
- Babai-Ahary, A., Abrinnia, M., & Heravan, I. M. (2004). Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off in sugarbeet in northwest Iran. *Australasian Plant Pathology*, 33, 343-347. <https://doi.org/10.1071/AP04038>.
- Badali, F., Abrinbana, M., Abdollahzadeh, J., & Khaledi, E. (2016). Molecular and morphological taxonomy of *Pythium* species isolated from soil in West Azarbaijan province (NW Iran). *Rostaniha*, 17(1), 78-91. <https://doi.org/10.22092/botany.2016.107005>

- Barboza, E. A., Cabral, C. S., Rossato, M., Martins, F. H. S. R., & Reis, A. (2022). Pythium and Phytophthora species associated with weeds collected in vegetable production fields in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 74(5), 796-808. <https://doi.org/10.1111/lam.13666>.
- Bickel, J. T., & Koehler, A. M. (2021). Review of Pythium species causing damping-off in corn. *Plant Health Progress*, 22(3), 219-225. <https://doi.org/10.1094/PHP-02-21-0046-FI>
- Brantner, J. R., & Windels, C. E. (1998). Variability in sensitivity to metalaxyl in vitro, pathogenicity, and control of *Pythium* spp. on sugar beet. *Plant Disease*, 82(8), 896-899. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.8.896>.
- Callan, N. W., Mathre, D. E., & Miller, J. B. (1990). Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* preemergence damping-off in sh2 sweet corn. *Plant Disease*, 74 (5), 368-372. <https://doi.org/10.1094/PD-74-0368>.
- Chamswarn, C., & Cook, R. J. (1985). Identification and Comparative Pathogenicity of Pythium Species. *Pacific Northwest*, 75, 821-827. <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-821>
- Cook, R. J., Sitton, J. W., & Haglund, W. A. (1987). Influence of soil treatments on growth and yield of wheat and implications for control of Pythium root rot. *Phytopathology*, 77(8), 1192-1198. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1192>.
- Daly, P., Chen, S., Xue, T., Li, J., Sheikh, T. M. M., Zhang, Q., ... & Wei, L. (2021). Dual-transcriptomic, microscopic, and biocontrol analyses of the interaction between the bioeffector *Pythium oligandrum* and the Pythium soft-rot of ginger pathogen *Pythium myriotylum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 765872. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.765872>.
- Dehghanpour Farashah, S., & Salehzadeh, M. (2021). Situation of Fusarium root and crown rot disease of wheat in Iran. *University of Yasouj Plant Pathology Science*, 10(1), 97-106. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.22519270.1399.10.1.7.8>. <https://doi.org/10.52547/paps.10.1.97>
- Dorrance, A. E., Berry, S. A., & Lipps, P. E. (2004). Characterization of *Pythium* spp. from three Ohio fields for pathogenicity on corn and soybean and metalaxyl sensitivity. *Plant Health Progress*, 5(1), 10. <https://doi.org/10.1094/PHP-2004-0202-01-RS>.
- Eslahi, M. R. (2012). Fungi associated with root and crown rot of wheat in Khuzestan province, Iran. *Journal of Crop Protection*, 1(2), 107-113. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.22519041.2012.1.2.9.2>.
- Gleń-Karolczyk, K., Bolligłowa, E., & Luty, L. (2022). Health parameters of potato tubers under the influence of soil applied bio-preparations and bio-stimulants. *Applied Sciences*, 12(22), 11593. <https://doi.org/10.3390/app122211593>.
- Harvey, P. R., Australia, V., & Wales, N. S. (2004). Crop rotation could reduce Pythium root rot. *Farming Ahead*, 154, 38-40. <https://ir.bsu.ac.ug/handle/20.500.12284/346>.
- Hebbar, K. P., Martel, M. H., & Heulin, T. (1998). Suppression of pre-and postemergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. *European journal of plant pathology*, 104, 29-36. <https://doi.org/10.1023/A:1008625511924>.
- Heidari, D., & Salehi, Z. (2013). PCR detection of transgenic maize in Iran on the basis of P35S. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 2(2), 111-118. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1392.2.2.3.9>.
- Hering, T. F., Cook, R. J., & Tang, W. H. (1987). Infection of wheat embryos by Pythium species during seed germination and the influence of seed age and soil matric potential. *Phytopathology*, 77(7), 1104-1108. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1104>
- Higginbotham, R. W., Paulitz, T. C., & Kidwell, K. K. (2004). Virulence of Pythium species isolated from wheat fields in eastern Washington. *Plant disease*, 88(9), 1021-1026. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.9.1021>.
- Hyder, S., Gondal, A. S., Rizvi, Z. F., Atiq, R., Haider, M. I. S., Fatima, N., & Inam-ul-Haq, M. (2021). Biological control of chili damping-off disease, caused by *Pythium myriotylum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 587431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.587431>.
- Ingram, D. M., & Cook, R. J. (1990). Pathogenicity of four Pythium species to wheat, barley, peas and lentils. *Plant Pathology*, 39(1), 110-117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02481.x>.
- Jie, S. (1995). Studies on pathogenic species of Pythium from spring maize seedlings in Zhejiang Province [China]. *Acta Phytophylacica Sinica (China)*, 22(3).
- Khodadadi, R., Amirbakhtiar, N., Sorkhilalehloo, B., & Soltani Najafabadi, M. (2023). Identification of conserved salt-responsive genes from bread wheat, barley crops with Arabidopsis based on microarray data. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 12(1), 0-0. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.3.7>.
- Kreutzer, W. A., & Durrell, L. W. (1938). Rot of mature tap root of Sugar Beet caused by *Pythium butleri*. *Phytopathology*, 28 (7), 512-515. CABI Record Number: 19391100014. <https://doi.org/10.1017/S0007485322000128>

- Liu Y, Vaghefi N, Ades PK, Idnurm A, Ahmed A, Taylor PW. 2023. Globisporangium and Pythium Species Associated with Yield Decline of Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) in Australia. *Plants* 12(6): 1361. <https://doi.org/10.3390/plants12061361>.
- Mahendra Rai, M. R., Ingle, A. P., Priti Paralikar, P. P., Netravati Anasane, N. A., Rajendra Gade, R. G., & Pramod Ingle, P. I. (2018). Effective management of soft rot of ginger caused by *Pythium* spp. and *Fusarium* spp.: emerging role of nanotechnology. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9145-8>.
- Mao, W., Lewis, J. A., Hebbar, P. K., & Lumsden, R. D. (1997). Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Disease*, 81(5), 450-454. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.450>.
- McCarter, S. M., & Littrell, R. H. (1970). Comparative pathogenicity of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum* to twelve plant species and intraspecific variation in virulence. *Phytopathology*, 60 (2), 264-268. <https://doi.org/10.1094/phyto-60-264>
- Middleton, J. T. (1943). The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 20(1), 1-171.
- Mostoufizadeh, G. R., & Banihashemi, Z. A. D. (2005). Identification of soil *Pythium* species in Fars province of Iran. *Phytopathology*, 28 (7), 512-515. CABI Record Number: 19391100014. <https://doi.org/10.22099/IJSTS.2005.2786>
- Mostowfizadeh-Ghahamfarsa, R. (2015). The current status of *Pythium* species in Iran: challenges in taxonomy. *Mycologia Iranica*, 2(2), 79-87. <https://doi.org/10.22043/mi.2015.19901>.
- Nzungize, J., Geps, P., Buruchara, R., Buah, S., Ragama, P., Busogoro, J. P., & Baudoin, J. P. (2011). Pathogenic and molecular characterization of *Pythium* species inducing root rot symptoms of common bean in Rwanda. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (10), 1169-1181. ISSN 1996-0808. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.747>
- O'sullivan, E., & Kavanagh, J. A. (1992). Characteristics and pathogenicity of *Pythium* spp. associated with damping-off of sugar beet in Ireland. *Plant pathology*, 41(5), 582-590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02457.x>.
- Pankhurst, C. E., McDonald, H. J., & Hawke, B. G. (1995). Influence of tillage and crop rotation on the epidemiology of *Pythium* infections of wheat in a red-brown earth of South Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(8), 1065-1073. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00009-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00009-4).
- Pearson, R., & Parkinson, D. (1960). The sites of excretion of ninhydrin-positive substances by broad bean seedlings. *Plant and Soil*, 13, 391-396. <https://doi.org/10.1007/BF01394650>.
- Raftoyannis, Y., & Dick, M. W. (2006). Zoospore encystment and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species on plant roots. *Microbiological Research*, 161(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.04.003>.
- Rahimian, M. K., & Banihashemi, Z. (1979). A method for obtaining zoospores of *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucurbit seedling resistance to damping-off. *Plant Disease Reporter*, 63(8), 658-661. <https://doi.org/10.1094/Phytopath.1979.63.8.658>.
- Rai, M., Golińska, P., Shende, S., Paralikar, P., Ingle, P., & Ingle, A. P. (2019). Biological control of soft-rot of ginger: Current trends and future prospects. *Plant Microbe Interface*, 347-367. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19831-2_16.
- Reeves, E. R., Henson, M. S., Sharpe, S. R., & Meadows, I. M. (2022). Evaluation of annual and herbaceous perennial plants for susceptibility to *Phytophthora* root and crown rot in the Southeastern United States. *Journal of Environmental Horticulture*, 40(4), 154-163. <https://doi.org/10.24266/2573-5586-40.4.154>.
- Sañudo S, B., & Jurado D, J. (1990). The presence of the fungus *Pythium* on maize cultivars in the Sibundoy valley, Putumayo. CABI Record Number: 19922323140.
- Shahzad, S., Coe, R., & Dick, M. W. (1992). Biometry of oospores and oogonia of *Pythium* (Oomycetes): the independent taxonomic value of calculated ratios. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 108(2), 143-165. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1992.tb01638.x>.
- Shen, J., & Zhang, B. (1995). Studies on pathogenic species of *Pythium* from spring cropping maize seedlings in Zhejiang province. CABI Record Number: 19961002741.
- Shurtleff, M. C. (1992). Compendium of Corn Diseases. APS. University of Illinois. Urbana, USA.
- Stanghellini, M. E., Bretzel, P. V., Olsen, M. W., & Kronland, W. C. (1982). Root rot of sugar beets caused by *Pythium deliense*. *Plant Disease*, 66 (9), 857-858. <https://doi.org/10.1094/pd-66-857>.

- Subila, K. P., & Suseela Bhai, R. (2020). *Pythium deliense*, a pathogen causing yellowing and wilt of black pepper in India. *New disease reports*, 42, 6-6. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.042.006>.
- Thomas, G. E., Geetha, K. A., Augustine, L., Mamiyil, S., & Thomas, G. (2016). Analyses between reproductive behavior, genetic diversity and *Pythium* responsiveness in *Zingiber* spp. reveal an adaptive significance for hemiclinality. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1913. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01913>.
- Van der Plaats-Niterink, A. J. (1981). *Monograph of the genus Pythium* (Vol. 21, p. 242). Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures. *Studies in Mycology*, 21 (1), 242-248. CABI Record Number: 19821379677.
- Virginia, G., & Robin, B. (2004). Pathogenicity of *Pythium* species on hosts associated with bean-based cropping system in south western Uganda. <http://hdl.handle.net/11071/3424>.
- Wu, Q. N., Liang, K. G., Zhu, X. Y., Wang, X. M., Jin, J. T., & Wang, G. Y. (1989). Isolation and identification of the pathogen of maize stalk rot in Beijing and Zhejiang. CABI Record Number: 19922320687.
- Yanar, Y., Lipps, P. E., & Deep, I. W. (1997). Effect of soil saturation duration and soil water content on root rot of maize caused by *Pythium arrhenomanes*. *Plant disease*, 81(5), 475-480. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.475>
- Zidack, N. K., Jacobsen, B. J., Stinson, A. M., & Strobel, G. A. (2001). Mycofumigation: A novel alternative to methyl bromide. In *Proc. 2001 Annu. Int. Conf. Methyl Bromide Alternatives Emissions Reductions. USEPA/USDA, Washington, DC* (pp. 36-1).