آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۸، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۹

شناسایی و بیماری‌زایی گونه‌های جنس *Pythium* روی گردو در نهالستان‌های استان فارس

Identification and pathogenicity of *Pythium* spp. isolated from walnut seedlings in Fars province nurseres

فریبا قادری[۱]* و ضیاءالدین بنی‌هاشمی[۲]
۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۸؛ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸۹)

چکیده

به منظور شناسایی و بررسی اهمیت گونه‌های *Pythium* در پوسیدگی ریشه و طوقه گردو از نهالستان‌های استان فارس نمونه‌برداری شد. از بافت پوسیده طوقه و ریشه، قطعات پنج میلی‌متر جدا شده و بعد از شستشو با آب لوله و خشک کردن با حوله کاغذی بدون ضدعفونی سطحی روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP کشت گردید. از بیست و سه جدایه بدست آمده هشت جدایه به *P. vexans* تعلق داشت. گونه مذکور از طوقه و ریشه گردو در نهالستان‌های رودبال، زرقان، لپویی و آب باریک جدا گردید. پنج جدایه *P. deliense* از طوقه گردو در نهالستان‌های بیست و دو بهمن، صد و ده، رودبال و آب باریک جداسازی گردید. ده جدایه از گونه *P. aphanidermatium*، از طوقه و ریشه گردو در نهالستان‌های بهرغان، زرقان، لپویی، صد و ده و بیست و دو بهمن جداسازی گردید. عکس‌العمل طوقه و ریشه نهال‌های دو ماهه ریز گردو به سه گونه *P. vexans*، *P. deliense* و *P. aphanidermatium* با مایه آلوده کننده آنها (در محیط ورمی‌کولیت – عصاره دانه شاهدانه) در شرایط گلخانه مطالعه شد. مقایسه درصد

* **Corresponding author: fghaderi2003@yahoo.com**

کلونیزاسیون طوقه، ریشه و درصد مرگ و میر نشان داد نهال‌های دو ماهه گردو ریز یاسوج بـه هر سه گونه حساس بودند، اما ریسه‌های گونه *P. aphaidermatium* بیماری‌زاتر و مهـاجم‌تـر از دو گونه *P. vexans* و *P. deliense* بوده و با سرعت زیـادی قـادر بـه پیـشروی و آلـوده نمـودن نهال‌های دو ماهه گردو ریز گردو در گلخانه بود.

واژه‌های کلیـدی: *Pythium aphanidermatium*، *Pythium deliense*، *Pythium vexans*، نهالـستان گردو، استان فارس.

Abstract

To study the role of *Pythiym* species associated with walnut root and crown rot, diseased sampled were collected from Fars province's nurseries. Pieces of infected root and crown of walnut were washed with tap water blotted dry and plated on CMA supplemented with delvocid (10ppm pimarcin), ampicillin (250ppm), rifampicin (10ppm) and PCNB (150ppm). 23 isolates recoverd from various parts of the Fars province, 8 isolates were identified as *P. vexans* that were isolated from crown and root in Roodbal, Zarghan, Lapoee and Abbarik and Bohrghan. 5 isolates were identified as *P. deliense which* were isolated from walnut crown nurseries of Bisto due bahman, Roodbal, Sado ou dah and Abbarik. 10 isolates were identified as *P. aphanidermatium* that were isolated from walnut crown and root in Bohrghan, Zarghan, Lapoee, Sado ou dah and Bisto due bahman. Pathogenicity test of the isolates was carried out on detached branches. In all cases *P. aphanidermatium* was more pathogenic and aggressive than *P. deliense* and *P. vexans*. The reaction of crown and root of 2-month-old Reez Yasouj cultivars to virulent isolates of *P. aphanidermatium*, *P. deliense* and *P. vexans* were evaluated under greenhouse conditions. The inocula were produced for several weeks on vermiculite supplemented with hemp seed extract and applied around each two month-old walnut seedling. Comparative percent dead seedlings and crown and root colonization showed that Reez Yasouj cultivar was infected with these pathogens but in all cases *P. aphanidermatium* was more pathogenic and aggressive than *P. deliense* and *P. vexans*.

Key words: Fars province, walnut nurseres, *Pythium aphanidermatium*, *Pythium vexans*, *Pythium deliense.*

مقدمه

گردو درختی چند منظوره است که قسمت‌های مختلف آن از میوه تا چوب کاربردهای گوناگونی دارد. این درخت خزان‌دار و از جنس *Juglans* متعلق به خانوادهٔ Juglandaceae است. مهم‌ترین گردوی موجود در دنیا گردوی ایرانی (*Juglans regia*) است و تنها گونه‌ای است که مغز آن از نظر خوراکی مصرف اقتصادی دارد (Wilson and Ogawa, 1979). در حال حاضر بسیاری از نهاستان‌های درختان گردو در استان فارس دچار پوسیدگی ریشه گردیده، و در حال نابود شدن می‌باشند. گیاهچه‌های آلوده اغلب نسبت به خشکی حساس‌تر بوده و زودتر پژمرده می‌شوند زیرا بخشی از ریشه فعالیت خود را از دست می‌دهد. علائم بیماری روی ریشه به صورت پوسیدگی قهوه‌ای رنگ می‌باشد که همواره از قسمت پایین ریشه به سمت بالا پیشروی می‌کند و معمولاً هنگام بیرون آوردن ریشه از زمین، بخشی از قسمت‌های پوسیده جدا می‌شود. اولین بار پوسیدگی طوقه و ریشه گردو توسط دی و اسمیت در سال ۱۹۱۲ در کالیفرنیا مشاهده گردید (Day and Smith, 1912 رجوع شود به Ogawa and English, 1991) سپس اسمیت و بارت نشان دادند که *P. cactorum* باعث تولید علائم روی *J. nigra*، *J. mandschurica*، *J. major*، *J. pyriformis* و *J. sieboldiana* می‌شود (Smith and Barret, 1931 رجوع شود به Ogawa and English, 1991).

گونه *Pythium vexans* از درختان گردوی آمریکایی جدا شده است (Hendrix and Powell 1968)، این گونه همراه با *Phytophthora cinnamomi* از درختان هسته‌دار جدا و به عنوان یک عامل ثانویه مطرح شد (Mircetich and Fogle ,1969). سپس گونه‌های *Pythium irregulare*، *P. edochilum*، *P. vexans*، *P. paroecandrum* و *P. torulosum* از گردوهایی که دچار پوسیدگی ریشه شده بودند جدا و اثبات بیماریزایی شدند (Green and Pratt ,1975).

عامل اصلی پوسیدگی طوقه *J. nigra* در کالیفرنیا *P. citricola* معرفی شد (Green, 1980). جدایه‌های *P. cactorum*، *P. citrophthora*، *P. citricola*، *P. cinnamomi* و *P. cryptogea* از بافت‌های بیمار گردو با علائم پوسیدگی و سیاه شدن طوقه و ریشه جدا گردیده است (Mircetich and Matheron ,1983).

در ایران بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گردو اولین بار در سال ۱۳۷۰ در چند منطقه

استان فارس دیده شد و عامل آن *P. cactorum* تشخیص داده شد (Banihashemi, 1991). متعاقب گزارش اولیه‌ی بیماری، در سال ۱۳۷۷ زوال و مرگ درختان گردو در استان کرمان بیشتر مورد توجه قرار گرفت و عامل آن *P. cactorum* (Kiumarsi *et al*., 1998) و *P. citrophthora* (Abusaidi *et al*., 1998) تشخیص داده شد.

در ایران تا کنون بررسی و تحقیقی جامعی در زمینه پوسیدگی طوقه و ریشه در نهالستان‌های گردو انجام نشده است. بنابراین هدف از این پژوهش شناسایی و تشخیص علت پوسیدگی طوقه و ریشه گردو در نهالستان‌های استان فارس و اثبات بیماریزایی می‌باشد.

روش بررسی

نمونه‌برداری: از اردیبهشت تا شهریور ماه سال ۱۳۸۲ از طوقه و ریشه گیاهچه‌های مرده و یا در حال زوال نهالستان‌های گردو استان فارس از جمله: آب باریک، بهرغان، بیست و دو بهمن، رودبال، زرقان، لپویی و صد و ده نمونه‌بردای شد. در نهالستان‌هایی که علایم بیماری در آنها مشاهده می‌شد، اطراف طوقه نهال‌های بیمار گودالی به عمق ۵۰ تا ۷۰ سانتی‌متر حفر گردید، سپس از مرز بافت سالم و آلوده قسمت طوقه و ریشه (پوست و قسمت سطحی چوب)، به صورت مجزا نمونه‌برداری صورت گرفت. همچنین از مجاور طوقه این نهال‌ها نیز حدود یک کیلوگرم خاک برداشته شد و نمونه‌ها درون کیسه‌های نایلونی در صندوق حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جداسازی عامل بیماری: در آزمایشگاه بافت‌های آلوده به مدت ۲-۱ ساعت زیر آب لوله به ملایمت شسته شدند، تا قارچ‌های سطحی پوده‌زی و مواد اضافی در سطح بافت شسته شود. سپس بافت به قطعات ۵-۲ میلی‌متر مربعی تقسیم شده با حوله کاغذی خشک گردید و بدون ضدعفونی سطحی روی محیط‌های کشت نیمه انتخابی CMA-PARP (عصاره ٤٠ گرم دانه ذرت خرد شده، ۲۰ میلی‌گرم دلواسید (حاوی ۵۰ درصد پیمارسین)، ۲۵۰ میلی‌گرم آمپی‌سیلین، ۱۰ میلی‌گرم ریفامپیسین، ۱۰۰ میلی‌گرم پنتا کلرو نیترو بنزن، ۱۵ گرم آگار، یک لیترآب مقطر) کشت داده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت مشاهده رشد قارچ، تشتک‌های پتری روزانه مورد بررسی قرار گرفتند (Kannwischer and Mitchell, 1981).

برای مشاهده مقدماتی قارچ‌هایی که روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP رشد کرده بودند تعدادی دانه شاهدانه که قبلاً به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده و بعد کاملاً خشک شده بودند، روی پرگنه‌های جوان مورد نظر قرار داده و بعد از ۲٤ ساعت در ۲۰ درجه سانتی‌گراد، به تشتک‌های پتری حاوی آب مقطر سترون و عصاره خاک ۱٪ منتقل و در زیر نور دائم مهتابی (دو لامپ مهتابی ٤۰ واتی به فاصله ۳۰ سانتی‌متری) قرار داده شدند. بذور کلونیزه شده بعد از ۲٤ ساعت تا مدت ٥-٤ روز جهت تشکیل اسپورانجیوم و رهاسازی زئوسپور مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت خالص‌سازی پرگنه‌ها به روش نوک ریسه، بلوک‌های میسیلیومی ٦-٥ میلی‌متر مربعی از حاشیه پرگنه‌های جوان در حال رشد روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP به محیط آب آگار ۲ درصد انتقال داده شد. بعد از ۲٤ تا ٤۸ ساعت با استفاده از روش کشت نوک ریسه، قطعات جدا شده به محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP انتقال یافتند. بعد از رشد ریسه‌ها و ایجاد پرگنه‌ها به منظور تشخیص قطعی جنس، مجدداً با استفاده از بذور شاهدانه طعمه‌گذاری شدند (Ribeiro, 1978).

تشخیص گونه: برای تشخیص گونه‌های بعد از خالص‌سازی، بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی اندام‌های رویشی، تولیدمثلی و دماهای رشد و با استفاده از کلیدهای موجود اقدام شد (Vander Plaasts-Niterink, 1981).

اثبات بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده: برای اثبات بیماریزایی از شاخه‌های بهاره به طول۳۰-۲۰ سانتی‌متر استفاده گردید. بعد از حذف شاخه‌های فرعی و برگ‌های اضافی و ضدعفونی سطحی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد، شکاف‌هایی به صورت T در پوست آنها ایجاد گردید. بعد از آن پرگنه‌های جدایه‌های مورد نظر (برخی از جدایه‌ها از هر گونه)، که روی محیط HSA[1] رشد کرده بودند، بلوک‌هایی میسلیومی به قطر ٦ میلی‌متر مربع داخل هر زخم قرار داده شد. سپس پوست بریده شده در محل خود قرار داده شد و محل زخم با نوار پارافیلم مسدود گردید (Bostock and Doster, 1985; Mircetich, 1982). و به منظور جلوگیری از تبخیر

۱- Hemp-seed Agar

شدید آب، دو سر بریده شده قطعات در پارافین مذاب فرو برده شد. در مورد شاهد از محیط کشت HSA بدون مایه استفاده گردید. شاخه‌ها بعد از مایه‌زنی در لایه‌های کاغذ کاهی مرطوب پیچیده شده و به مدت ١٤ روز در ۲۵ °C قرار داده شدند. نتایج با برداشتن پوست از بالا و پایین قسمت مایه‌زنی شده و اندازه‌گیری مساحت کل قسمت‌های تغییر رنگ یافته با کمک دستگاه leaf area meter و کشت قطعات آلوده روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP ارزیابی گردید.

تعیین واکنش رقم ریز گردو به سه گونه *Pythium*:

– **تولید نهال گردو:** بذور در آب معمولی شسته شده، با مقدار کافی پودر وتابل بنومیل ۵۰٪ آغشته گردید، سپس به مدت دو ماه در سینی‌های ماسه سترون مرطوب در ۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، تا نیاز سرمایی آنها برطرف شود. در طول این مدت سینی‌ها چند بار بازدید و از لحاظ رطوبت مورد بررسی قرار گرفتند. دو ماه بعد بذور در گلدان‌های حاوی خاک بکر سترون در عمق حدود پنج سانتی‌متری کشت شده و سپس گلدان‌ها آبیاری و در گلخانه نگهداری شدند.

– **تهیه مایه قارچ:** در کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به اتوکلاو، ۲۰۰ میلی‌لیتر ورمی‌کولیت ریخته شد و به آن ۱۲۰ میلی‌لیتر عصاره شاهدانه (عصاره ٦٠ گرم دانه شاهدانه در لیتر) اضافه شد و به مدت یک ساعت در اتوکلاو سترون گردید. دو تا سه روز بعد از آن، از پرگنه جدایه‌های مورد نظر، که قبلاً روی محیط کشت CMA رشد کرده بودند، هشت بلوک میسلیومی به قطر شش میلی‌متر به کیسه‌های پلاستیکی اضافه گردید. سپس کیسه‌های پلاستیکی به مدت چهار هفته در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند.

– **مایه‌زنی نهال‌های دو ماهه:** از نهال‌های دو ماهه گردو برای مایه‌زنی استفاده گردید. خاک اطراف هر نهال تا عمق سه سانتی‌متری کنار زده شد و ۱۰ میلی‌لیتر از مایه تهیه شده در اطراف طوقه و ریشه اصلی هر نهال قرار داده شد.

برای تعیین حضور فعال قارچ در خاک بلافاصله سوراخ زه آب گلدان‌ها با پارافین جامد بسته شده، خاک گلدان‌ها با آب اشباع گردید. بعد از ٢٤ ساعت سوراخ زه آب باز گردید و آب گلدان‌ها در لیوان‌هایی پلاستیکی استفاده نشده جمع‌آوری شد و از برگ لیموشیرین

دایره‌هایی به قطر پنج میلی‌متر جدا و ۵۰ عدد از آنها در هر نمونه قرار داده شد. بعد از ۲٤ ساعت نگهداری در محیط آزمایشگاه، قطعات برگ به مدت یک دقیقه با جریان آب معمولی شستشو داده شد و بعد از خشک شدن آنها روی دستمال کاغذی، به محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP منتقل گردید. تشتک‌های پتری در ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت مشاهده رشد قارچ، تشتک‌های پتری روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از ظهور پرگنه‌ها و مشاهدات اولیه میکروسکوپی از بذور شاهدانه استفاده گردید. این عمل هر دو هفته یکبار انجام شد (Afeck *et al*., 1990; Bielenin and Jones, 1988a; 1988b; Browne *et al*., 1995). نهال‌ها در فواصل بین غرقاب و در موقع لزوم با آب لوله، آبیاری شدند. دمای گلخانه در طول آزمایش بین۲۵ تا ۳۲ و دمای خاک بین ۲۲ تا۳۰ درجه سانتی‌گراد متغیر بود.

گیاهان شاهد نیز با همین روش، ولی ورمی‌کولیت حاوی عصاره شاهدانه مایه‌زنی شدند. برای هر تیمار پنج گلدان (هر گلدان حاوی دو نهال) در نظر گرفته شد. بعد از دو ماه، نهال‌ها از خاک خارج شده، و بعد از شستشو در زیر شیرآب، درصد مرگ و میر ،کلونیزاسیون طوقه و ریشه تعیین گردید. برای محاسبه درصد کلونیزاسیون هر کدام از بافت‌ها، از هر بافت ۳۰ قطعه چند میلی‌متری بریده شده و بعد از حذف آب اضافی با کمک حوله کاغذی، این قطعات بر روی محیط نیمه انتخابی CMA-PARP کشت و در دمای ۲۵°C قرار داده شدند. از روز دوم به بعد، نمونه‌ها جهت مشاهده ظهور پرگنه‌های مورد بررسی قرار گرفتند و نهایتاً برای محاسبه میزان پیشروی قارچ روی طوقه نتایج با برداشتن پوست از بالا و پایین قسمت طوقه و اندازه‌گیری مساحت کل قسمت‌های تغییر رنگ یافته با کمک دستگاه leaf area meter و کشت قطعات آلوده بر روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP ارزیابی گردید. آزمایش در قالب بلوک کاملاً تصادفی انجام گرفت. و بعد از اتمام آزمایش داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد صورت پذیرفت.

نتیجه و بحث

بررسی‌های انجام شده نشان داد که بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه در نهالستان‌های گردو در استان فارس وجود دارد. ولی فراوانی آن در مناطق مختلف متفاوت می‌باشد. گیاهچه‌های آلوده اغلب نسبت به خشکی حساس‌تر بودند و زودتر پژمرده می‌شدند زیرا بخشی از ریشه

فعالیت خود را از دست داده بود. البته باید ذکر شود که در مناطق مورد بازدید بیماری به صورت تک گیاهچه آلوده و پراکنده وجود داشت.

علائم بیماری روی ریشه به صورت پوسیدگی قهوه‌ای رنگ بود که همواره از قسمت پایین ریشه به سمت بالا پیشروی می‌کرد و معمولاً هنگام بیرون آوردن ریشه از زمین، بخشی از قسمت‌های پوسیده جدا می‌شد. در برش عرضی ریشه نیز قسمت‌های پوسیده به سمت بالا تیره‌تر می‌شد (شکل ۱).

بر اساس نمونه‌برداری‌هایی که انجام گرفت، ۲۳ جدایه از بافت‌های طوقه و ریشه‌ی گردو به دست آمد (جدول ۱) جدایه‌ها بر اساس خصوصیات مختلف ریخت‌شناسی (جدول۲) و میزان رشد در دماهای مختلف در سه گروه مجزا قرار گرفتند.

در گروه اول (جدایه‌های ۱ تا ۸)، پرگنه‌ها روی محیط‌های کشت CMA و PDA تولید ریسه‌های هوایی نمودند اسپورانجیوم معمولاً کروی، در اسپورانجیوفورها حالت تورم مشاهده گردید. اُاُگونیوم به شکل کروی و با دیواره صاف بوده و به صورت انتهایی تشکیل می‌شود و در برخی موارد به صورت جانبی یا بین ریسه‌ای ایجاد گردید. آنتریدیوم غالباً به تعداد یک عدد، پایه‌دار و یا بدون پایه، پاراجینوس، مونوکلاین و بندرت دی‌کلاین می‌باشد. اُاُسپور کروی، دارای دیواره صاف و حجم اُاُگونیوم را پر نمی‌نمود (شکل ۲ (A-B)). میزان متوسط رشد روزانه ۱۹ میلی‌متر در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دماهای ویژه شامل کمینه ۵ درجه سانتی‌گراد، بهینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بیشینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود.

در گروه دوم (جدایه‌های ۹ تا ۱۳)، پرگنه‌ها روی محیط کشت CMA و HAS تولید ریسه‌های هوایی نموده، اسپورانجیوم‌ها به شکل انگشتی متورم با ابعاد مختلف در محیط‌های کشت جامد و مایع به تعداد زیاد تشکیل گردید. اُاُگونیوم‌ها دارای دیواره صاف و به شکل کروی، به صورت انتهایی یا بین ریسه‌ای که به سمت آنتریدیوم خم شده تشکیل شد. آنتریدیوم بیشتر یک عدد، پایه‌دار و یا بدون پایه، پاراجینوس و دی‌کلاین بوده و به صورت انتهایی یا بین ریسه‌ای تشکیل شدند، اُاُسپور نیز کروی بوده و دارای دیواره صاف و بدون تزئینات و حجم اُاُگونیوم را پر نمی‌نمود (شکل ۲ (C-D)). میزان متوسط رشد روزانه ۲۵ میلی‌متر در ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. دماهای ویژه شامل کمینه ۵ درجه سانتی‌گراد، بهینه ۳۵

درجه سانتی‌گراد و بیشینه ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود.

در گروه سوم (جدایه‌های ۱۴ تا ۲۳) پرگنه‌ها روی محیط کشت HSA فاقد ریسه‌های هوایی بوده، ولی در محیط کشت CMA تولید ریسه‌های هوایی پنبه‌ای شکل نمود. اسپورانجیوم انگشتی متورم با ابعاد مختلف، روی محیط‌های کشت جامد و مایع به تعداد زیاد تشکیل گردید. اُاُگونیوم کروی شکل، با دیواره صاف و به صورت انتهایی تشکیل شد. آنتریدیوم پاراجینوس، مونوکلاین یا دی‌کلاین و اغلب بین ریسه بود. اُاُسپور کروی، دارای دیواره صاف و بدون تزئینات و حجم اُاُگونیوم را پُر نمی‌نمود (شکل ۲ (E-F)). میزان متوسط رشد روزانه ۳۰ میلی‌متر در ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود دماهای ویژه شامل کمینه ۱۰ درجه سانتی‌گراد، بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد و بیشینه ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود.

جدایه‌های گروه اول، دوم و سوم به ترتیب *P. vexans*، *P. deliense* و *P. aphanidermatium* تشخیص داده شدند.

شکل ۱- پوسیدگی ریشه و طوقه گردو در نهالستان‌های استان فارس

Fig. 1.walnut root and crown rot in nurseries at Fars province

نتایج حاصل از مایه‌زنی شاخه‌های بریده (شکل ۳) نشان داد از لحاظ میزان پیشروی سطح لکه بافت مرده(مساحت لکه) بین گونه‌های *P. vexans*، *P. deliense* و *P. aphanidermatium* اختلاف معنی‌داری وجود داشت. ریسه‌های گونه *P. aphanidermatium* با سرعت بیشتری نسبت به گونه‌های دیگر قادر به پیشروی در شاخه‌های بریده بودند. گونه *P. aphanidermatium*، گونه *P. deliense* و گونه *P. vexans* به ترتیب از قدرت بیماری‌زایی بالایی برخوردار هستند. و گونه *P. aphanidermatium* به عنوان مخرب‌ترین گونه در ایجاد بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده گردو تشخیص داده شد.

جدول ۱- منابع و مناطق جداسازی جدایه‌های *P. vexans*، *P. deliense* و *P. aphanidermatium*

Table 1. Sources of isolates of *P. vexans*, *P. deliense* and *P. aphanidermatium*

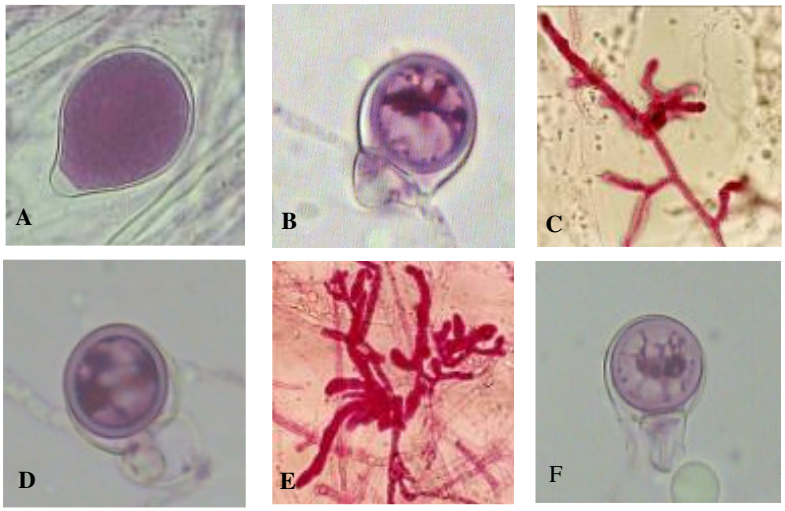
گونه **Species**	تعداد ایزوله **No. of isolate**	منطقه **Location**	منبع **Source**
P. vexans	2	رودبال Roodbal	طوقه Crown
P. vexans	1	زرقان Zarghan	طوقه و ریشه Crown and Root
P. vexans	2	لپویی Lapoee	طوقه Crown
P. vexans	3	آب باریک Ab-barik	طوقه و ریشه Crown and Root
P. deliense	2	بیست و دو بهمن Bisto due bahman	طوقه و ریشه Crown and Root
P. deliense	1	صد و ده Sado ou dah	طوقه و ریشه Crown and Root
P. deliense	1	رودبال Roodbal	طوقه و ریشه Crown and Root
P. deliense	1	آب باریک Abbarik	طوقه و ریشه Crown and Root
P. aphanidermatium	2	بهرغان Bohrghan	طوقه Crown
P. aphanidermatium	3	صد و ده Sado ou dah	طوقه و ریشه Crown and Root
P. aphanidermatium	2	زرقان Zarghan	طوقه و ریشه Crown and Root
P. aphanidermatium	2	لپویی Lapoee	طوقه و ریشه Crown and Root
P. aphanidermatium	1	بیست و دو بهمن Bisto due bahman	طوقه و ریشه Crown and Root

جدول ۲- فهرست جدایه‌ها و خصوصیات مرفولوژیکی جدایه‌های *P. vexans*، *P. deliense* و *P. aphanidermatium*

Table 2. Characterization of isolates of *P. vexans*, *P. deliense* and *P. aphanidermatium*

Isolates	Oospore-wall	Oospore	Oogonia	Sporangia	hypha	*Date of Isolation
P.vexans,1	1/5	17/7	20	19/5×15/3	4/8	1382/3/15
P.vexans,2	1/7	19/8	20/2	22/2×17/5	4/6	1382/3/15
P.vexans,3	1/5	18/5	22	21/9×18/7	5	1382/4/2
P.vexans,4	1/9	18/9	21/5	20/9×16/3	5/2	1382/4/23
P.vexans,5	1/5	19/5	20/9	21/5×18/5	4/9	1382/4/23
P.vexans,6	1/9	19	22/1	22×18/1	5	1382/5/6
P.vexans,7	1/8	18/8	21/6	20/8×18/5	5/1	1382/5/6
P.vexans,8	1/9	19/2	22	21/9×17/9	5/2	1382/5/6
P.deliense,9	3/1	16	20	20.5×17.3	7/5	1382/6/8
P.deliense,10	2/5	18/7	19/5	21.3×18.5	7/9	1382/6/8
P.deliense,11	2	17/3	21/5	21.9×19.7	8	1382/5/27
P.deliense,12	2/2	19/1	20	22.9×18.3	7/7	1382/3/15
P.deliense,13	2/4	18/2	21/5	22.5×19.5	7/3	1382/5/6
P.aphanidermatium,14	1	17/5	22/9	23.5×19.2	7/9	1382/3/5
P.aphanidermatium,15	2	18	24/3	21.8×19.5	8	1382/3/5
P.aphanidermatium,16	1	23	24	22.9×18.9	8/2	1382/5/27
P.aphanidermatium,17	2/2	24/5	25	22.5×18.3	8/6	1382/5/27
P.aphanidermatium,18	1	16	29/1	20.2×19.5	8/5	1382/5/27
P.aphanidermatium,19	3	21	28/6	22.9×19.7	9	1382/4/2
P.aphanidermatium,20	1/5	18	24/4	22.9×18.3	9/1	1382/4/2
P.aphanidermatium,21	3	17/5	25/7	22.5×18.5	8/8	1382/4/23
P.aphanidermatium,22	2	22/7	23	23×19.1	8/7	1382/4/23
P.aphanidermatium,23	1	21/8	25/4	21.8×19.5	8/9	1382/6/8

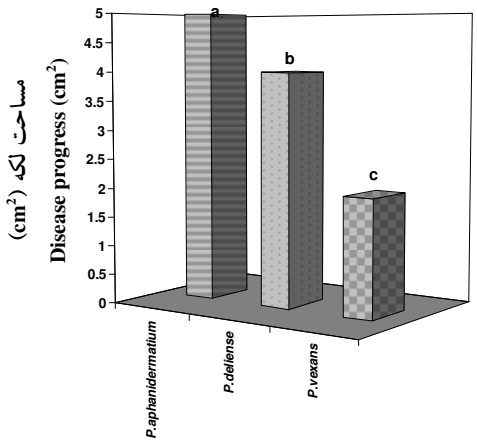
× نمونه‌برداری از اردیبهشت تا شهریور ماه سال ۱۳۸۲ انجام شد. اما جدایه‌ها از اوایل خرداد تا اوایل شهریور ماه جداسازی شدند.



شکل ۲- A : *Pythium vexans* اسپورانجیوم کروی دارای پاپیل (۶۳۰x)، B) اُاُگونیوم با دیواره صاف و آنتریدیوم (۶۳۰x)، C : *Pythium deliense* اسپورانجیوم رشته‌ای متورم (۴۰۰x)، D) اُاُگونیوم که به سمت آنتریدیوم خم شده است (۴۰۰x)، E : *Pythium aphanidermatium* اسپورانجیوم رشته ای متورم (۴۰۰x)، F) اُاُگونیوم با دیواره صاف و آنتریدیوم (۴۰۰x)

Fig. 2. *P. vexans*: A) Sporangia are spherical with one papilla (630x), B) Oogonia with smooth wall and Antheridia (630x), *P.deliense*: C) Sporangia are filamentous and swelling (400x), D) Oogonia bended to Antheridia (400x), *P.aphanidermatium*: E) Sporangia are filamentous and swelling (400x), F) Oogonia with smooth-wall and Antheridia (400x).

اولین علائم بیماری سه هفته بعد از مایه‌زنی توسط گونه *Pythium aphanidermatium* روی رقم ریز گردو مشاهده شد. سنجش بیماریزایی رقم ریز گردو با جدایه‌های *P. vexans*، *P. deliense* و *P. aphanidermatium* در قالب بلوک کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه روی نهال‌های دو ماهه ریز گردو انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به درصد مرگ و میر، پوسیدگی ریشه و طوقه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد (شکل ۳) رقم ریز گردو به هر سه گونه قارچ حساس می‌باشد و به ترتیب ریسه‌های گونه *P. aphanidermatium* بیماری‌زاتر و مهاجمی‌تر از دو گونه *P. deliense* و *P. vexans* بوده و با سرعت زیادی قادر به پیشروی و آلوده نمودن ریشه و طوقه نهال‌های دو ماهه گردو ریز گردو در گلخانه بود.

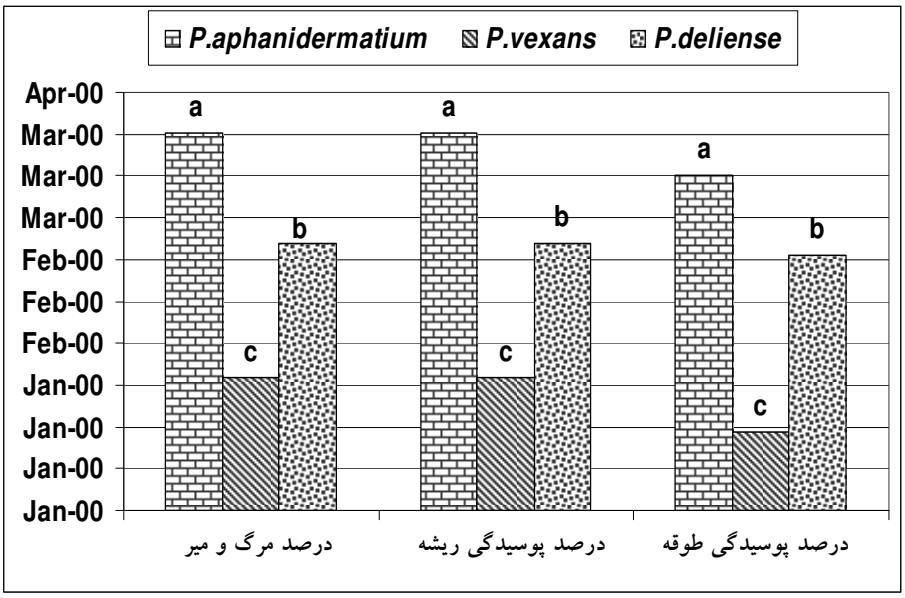


شکل ۳- میزان پیشروی (مساحت لکه) جدایه‌های *P. vexans*، *P. deliense* و *P. aphanidermatium* روی شاخه‌های بریده گردو

Fig. 3. Disease progress. *P. vexans*, *P. deliense* and *P. aphanidermatium* on juglans detached branches

با توجه به نتایج این تحقیق گونه *P. aphanidermatium* را می‌توان به عنوان یک بیمارگر مخرب و غالب در ناحیه طوقه و ریشه رقم ریز گردو و روی شاخه‌های بریده گردو نسبت به دو گونه *P. vexans* و *P. deliense* در نظر گرفت. در این تحقیق فقط این سه گونه جدا گردید در حالی که به غیر از این گونه‌ها ممکن است گونه‌های دیگری نیز وجود داشته باشند، که جدا نگردیده‌اند. زیرا Green (1980) گونه *Phytophthora citricola*، Mircetich and Matheron (1983) گونه‌های *P. cactorum*، *P. citrophthora*، *P. citricola*، *P. cinnamomi* و *P. cryptogea*، Banihashemi (1991) و Kiumarsi *et al*. (1998) گونه *Phytophthora cactorum* و Abusaidi *et al*. (1998) گونه *Phytophthora citrophthora* را از عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه معرفی نمودند.

این عدم جداسازی عامل بیماری نشانگر عدم وجود قارچ در خاک نیست عدم موفقیت در جداسازی عامل بیماری احتمالاً به علت کاهش زادمایه‌ی قارچ در رابطه با تغییر عوامل ناشناخته محیطی خاک تصور می‌شود. بنابراین استفاده از محیط‌های انتخابی و روش‌های جداسازی متفاوت باید در آینده به کار گرفته شود.



شکل ۴- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر، پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از جدایه‌های *P. vexans*، *P. deliense* و *P. aphanidermatium* روی رقم ریز گردو با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد

Fig. 4. Comparative percent dead seedlings and crown and root colonization Reez Yasouj cultivar in reaction to *Pythium aphanidermatium*, *P. vexans* and *P. deliense* using Duncan s multiple range test ($P \leq 0.01$)

در این بررسی اکثر جدایه‌های بدست آمده از هر دو بافت طوقه و ریشه جداسازی شدند (جدول شماره ۱). سوابق نشان داد که آب نقش بسیار مهمی در پراکندگی عامل بیماری در گونه‌های *Pythium* دارد زیرا جمعیت اسپورانجیوم در قسمت سطح آب بیشتر بوده و شرایط مناسب‌تری برای پژمردگی و پوسیدگی طوقه و ریشه فراهم می‌نماید (Zentmayer and Erwin, 1970).

خسروفر و بنی‌هاشمی (2004) در تحقیقات خود نشان دادن که در ابتدای شروع بیماری طوقه حساس‌ترین قسمت گیاه می‌باشد اما اگر روش آبیاری به نحوی باشد که آب در تماس

مستقیم با طوقه نباشد، پوسیدگی ریشه اصلی و محل انشعاب ریشه‌های فرعی موجب سبز خشکی بوته‌ها در مراحل پیشرفته رشد خواهند شد. بر این اساس در این تحقیق در برخی نهالستان‌ها قارچ پی‌تیوم فقط از قسمت طوقه جداسازی گردید و این با یافته آنها مطابقت دارد.

استفاده از روش تنش آبی بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری، کارایی بیماریزایی را افزایش داد. زیرا تنش آب می‌تواند به غشای گیاهی صدمه بزند و باعث افزایش آزادسازی اسیدهای آمینه از ریشه گردد. افزایش ترشحات ریشه نیز منجر به افزایش جذب زئوسپورهای متحرک به سمت ریشه می‌گردد. از طرفی تنظیم فشار اسمزی در بافت ریشه و یا افزایش در جابجایی کربن به ریشه‌های تحت تنش آب، ممکن است محرکی جهت افزایش رشد و کلونیزه کردن ریشه‌ها باشد (Ristaino and Duniway, 1989). همچنین تنش آب باعث کاهش تولید فیتوالکسین‌ها شده، مقاومت گیاه را در برابر بیمارگر کاهش می‌دهد در نتیجه گیاه را نسبت به بیمارگرهای مختلف حساس‌تر می‌کند (Erwin and Robeiro, 1996).

در این تحقیق مشخص شد جداسازی گونه‌ها از بافت پوست که ریسه‌های زنده در آن‌ها وجود دارد به راحتی صورت می‌گیرد، ولی چنانچه بافت پوسیده و خشک باشد جداسازی قارچ مشکل می‌باشد. همچنین برای جداسازی قارچ انتخاب فصل و ماه جداسازی اهمیت زیادی دارد. همچنین استفاده از محیط کشت نیمه انتخابی و روش مورد استفاده نیز در امر جداسازی حائز اهمیت می‌باشد که با نظر برخی محقیقن مطابقت دارد (Mircetich and Matheron, 1983).

ریشه‌های گردو در مرحله گیاهچه نسبت به بیمارگر پی‌تیوم حساس می‌باشد، این گیاهچه‌ها به علت حساسیت زیاد، ضعف و فقدان قدرت مقابله کافی در مقابل بیمارگر، به شدت مورد حمله قرار گرفته و به سرعت از پای در می‌آیند. در این مطالعه گونه‌های پی‌تیوم از ریشه‌های پوسیده در نهالستان‌های گردو جداسازی گردید و این نتایج تا حدودی با نتایج Green and Pratt (1975) مطابقت دارد و آن‌ها گونه‌های *Pythium irregulare*، *P. edochilum*، *P. vexans*، *P. paroecandrum* و *P. torulosum* را از گردوهایی که دچار پوسیدگی ریشه شده بودند جدا نمودند.

جدایه‌های *P. deliense* با توصیف Vander Plaasts-Niterink (1981) مطابقت دارد. ابتدا به

علت شباهت زیاد به گونه *P. aphanidermatium* به همین نام خوانده شد. مطالعات Meurs (1929) نشان داد که گونه فوق در برخی از صفات ریخت‌شناسی با گونه *P. aphanidermatium* تفاوت دارد و آن را *P. deliense* نامگذاری کرد. این گونه شباهت‌های بسیاری با دو گونه *P. aphanidermatium* و *P. indigofera* دارد اما از لحاظ داشتن پایه اُاُگونیومی که به سمت آنتریدیوم خمیده شده، آنتریدیومی کشیده‌تر که بندرت به حالت مونوکلاین دیده می‌شود و اسپورانجیوم‌هایی که بهم پیچیدگی و فشردگی کمتری دارند، از گونه *P. aphanidermatum* قابل تشخیص است. در گونه *P. indigofera* لوله تخلیه زئوسپور کوتاه است و معمولاً به صورت جانبی تشکیل می‌شود. دو گونه *P. aphanidermatum* و *P. deliense* در محیط کشت‌های غنی دارای رشد سریع‌تری نسبت به گونه *P. indigofera* هستند (Vander Plaasts-Niterink, 1981).

دو گونه *P. vexans* و *P. complectens* بسیار شبیه هم می‌باشند اما آنچه که باعث متمایز شدن آن‌ها می‌گردد وجود اسپورانجیوم‌های کروی می‌باشد. در واقع نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که این گونه (*P. vexans*) دارای دو صفت خاص است، یکی وجود اسپورانجیوم‌های کروی که گاهی دارای پاپیل می‌باشند. و دیگری وجود اُاُسپورهایی است، که فضای داخلی اُاُگونیوم را پر نمی‌کند. در واقع این دو صفت خاص باعث متمایز شدن این گونه از بقیه گونه‌ها می‌گردد. خصوصیات ذکر شده با توصیف‌های Vander Plaasts-Niterink (1981) مطابقت داشت. جدایه‌های *P. aphanidermatum* با توصیف‌های Vander Plaasts-Niterink (1981) تطبیق داشت. این گونه از لحاظ داشتن اسپورانجیوم‌های انگشتی متورم با ابعاد مختلف، آنتریدیوم‌هایی که معمولاً بین سلولی هستند و اُاُسپورهایی که فضای داخلی اُاُگونیوم را پُر نمی‌کنند، شباهت‌های بسیاری با دو گونه *P.deliense* و *P.indigofera* دارد. اما در این دو گونه در محل پایه خود به سمت آنتریدیوم خمیده شده و قطر کمتری دارد.

در این تحقیق جدایه‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه در اوایل خرداد تا اوایل شهریور ماه از نهالستان‌های گردو جداسازی شدند (جدول ۲). این نتایج تا حدود زیادی با نتایج Matheron and Mircetich (1985b) مطابقت دارد. آنها بیشترین شدت پوسیدگی طوقه و ریشه پایه‌های *J. hindsii* و Paradox را در خرداد ماه و کمترین شدت پوسیدگی پایه *J. hindsii* را در

دیماه و پایه Paradox را در مهر- آبان، کل زمستان و اوایل بهار بیان نمودند و با توجه به این نتایج، آنها پایه Paradox را به عنوان یک پایه مقاوم‌تر از *J. hindsii* در طول فصل سال معرفی نمودند.

سعی شد دمای گلخانه بین ۲۵ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد و دمای خاک گلدان‌ها ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد متغییر باشد. این نتایج با نتایج McCarter and Littrell (1967) تا حدودی مطابقت دارد. آن‌ها تأثیر دما را در آزاد شدن، تحرک و جوانه‌زنی زئوسپورهای جدایه *P. aphanidermatium* مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که در این جدایه، حداکثر آزادسازی زئوسپور پس از ۶ ساعت و در دماهای ۲۸ تا ۳۱ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد. همچنین نشان دادند که حداکثر شدت بیماریزایی جدایه *P. aphanidermatium* هنگامی است که دمای خاک بین ۲۹ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد باشد. آنها نتیجه گرفتند که در دمای کمتر از ۲۳ درجه سانتی‌گراد میزان بیماری و شدت پوسیدگی ریشه و طوقه به شدت کاهش می‌یابد و در دماهای پایین‌تر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گونه آلودگی در گیاه میزبان ایجاد نمی‌شود. بطور کلی زئوسپورها دارای بار منفی بوده و مولکول‌هایی با بار مثبت و یا خنثی در جذب آنها نقش موثری دارند. در مراحل تشکیل سیست ابتدا زئوسپور چسبناک شده و چنانچه با سطحی در تماس باشد، به آن می‌چسبد. خاصیت چسبندگی در حالت طبیعی شرایط حمله به گیاه را آسان‌تر می‌سازد. خاصیت چسبندگی به سرعت از بین رفته و سیست تشکیل می‌شود. چنانچه تحت شرایطی تشکیل سیست دور از ریشه باشد، باعث از بین رفتن آن‌ها می‌شود. فراوانی موانع که همراه با تراکم بسیار زیاد سوسپانسیون زئوسپور و یا محیط کم عمق جهت سوسپانسیون باشد، تحرک را کم می‌کند. pH پایین و متمایل به اسیدی نیز باعث کاهش تحرک زئوسپور می‌گردد (Carlile, 1983)*.

* **نشانی نگارندگان:** مهندس فریبا قادری، مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران؛ ضیاءالدین بنی‌هاشمی، استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران.

منابع

ABUSAIDI, D., Z. BANIHASHEMI and H. ALAVI, 1998. Crown rot of walnut in Kerman Province. 13th Iranian Plant Protection Congress. Karaj.Iran. 214 pp.

AFECK, U., A. SZTEJNBERG and Z. SOLEL, 1990. A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. Plant Dis., 74: 66-68.

BANIHASHEMI, Z. 1991. Root and crown rot of walnut in Fars Province. 10th Iranian Plant Protection Congress. Karaj.Iran. 114 pp.

BIELENIN, A. and A. L. JONES, 1988a.Prevalence and pathogenicity of *Phytophthora* spp. from sour cherry trees in Michigan. Plant Dis. 72: 473 -474.

BIELENIN, A. and A. L. JONES, 1988b. Efficacy of sprays of fosetyl-Al and drench of metalaxyl for the control of *Phytophthora* root and crown rot of cherry. Plant Dis. 72: 477-480.

BOSTOCK, R. M. and M. A. DOSTER, 1985. Association of *Phytophthora syringae* with pruning wound cankers of almond trees. Plant Dis. 69: 568-589.

BROWNE, G. T., S. M. MIRCETICH and J. N. CUMMINS, 1995. Relative resistance of eighteen selection of *Malus* spp. to three species of *Phytophthora.* Phytophthology 85: 72-76.

CARLILE, M. J. 1983. Mortality, taxis and tropism in *Phytophthora.* pp: 95-107. *In*: *Phytophthora*: Its Biology,Taxonomy, Ecology and Pathology. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. S. Tsao. (eds.). APS Press. St. Paul, Minn. 392p.

ERWIN, D.C. and O. K. RIBEIRO, 1996. *Phyophthora*: Diseases World Wide. APS Press. St. Paul, Minn. 562p.

GREEN, R. J. 1980. *Phytophthora* root rot of black walnut seedlings. Pages 19-22 in: Forest Nursery Diseases in the United States. U.S. Dep. Agric. Handb. 47. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C. 125 p.

GREEN, R. J. and R. G. PRATT, 1975. Root rot of black walnut seedlings caused by *Phytophthora citricola.* Plant Disease. 54: 583-585.

HAYGOOD, R. A., C. H. GRAVES and W. H. RIDING, 1986.*Phytophthora* root rot and stem canker of peach trees in Missisippi. Plant Dis.70: 866-868.

HENDRIX, F. F. J. and W. M. POWELL, 1968. Nematode and *Pythium* species associated with feeder root necrosis of pecan tree in Georgia. Pl. Dis. Reptr, 52: 334-335.

KANNWISCHER, M. E. and D. J. MITCHELL, 1981. Relationships of numbers of spores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. Phytophthology 71:69-73.

KHOSROWFAR, F. and Z. BANIHASHEMI, 2004. Role of weeds on the survival of verticillium dahliae the causal agent of cotton vascular wilt in Fars province. Iranian Journal of Plant Pathology. 40(1-2): 105-126.

KIUMARSI, SH., Z. ZAKII and M. M. AMINAEE, 1998. Root and crown rot of walnut in Kerman Province. 13th Iranian Plant Protection Congress. Karaj.Iran. 237 pp.

MATHERON, M. E. and S. M. MIRCETICH, 1985b. Seasonal variation in susceptibility of *Juglans hindsii* and Paradox rootstocks of English walnut trees to *Phytophthora citricola*. Phytophthology 75: 970-972.

MCCARTER, S. M. and R. H. LITTRELL, 1967. Infiuence of temperature on the liberation, motility and germination of zoospores of Pythium aphanidermatium and Pythium myriotylum.Phytopathology 57: 821.

MEURS, A. 1929. Ein never Wurzelbranderreger der Zucker and Futterruben. Phytopathology Z.1:111-126.

MIRCETICH, S. M. 1982. *Phytophthora* root and crown rot of orchard trees.Calif. Plant Pathol.24: 1-2.

MIRCETICH, S. M. and H. W. FOGLE, 1969. Role of Pythium in damping off of peach. Phytopathology. 59: 356-358.

MIRCETICH, S. M. and M. E. MATHERON, 1983. Phytophthora root and crown rot of walnut trees. Phytopathology 73: 1481-1488.

OGAWA, J. and M. H. ENGLISH, 1991. Disease of Temperate Zone Tree Fruit and Nut Crops. University of California. 461p.

RIBEIRO, O. A. 1978. Source Book of the Genus *Phytophthora*. J. Cramer, Vanuz, Liechtenstein. 417p.

RISTAINO, J. B. and J. M. DUNIWAY, 1989. Effect of pre-inoculation and post-inoculation water stress on the severity of Phytophthora root rot in processing tomato. Plant Dis.73: 349-352.

VANDER PLAASTS-NITERINK, A. J. 1981. Monograph of the Genus Pythium Studies in Mycology, No.21. Gentraalbureau voor Schimmelcultur. Netheland.

WILSON, E. E. and J. M. OGAWA, 1979. Fungal, Bacterial and Certain Nonparasitic

Diseases of Fruit and Nut Crops in California. The Regents of the University of California. 190 p.

ZENTMAYER, G. A. and D. C. ERWIN, 1970. Development and reproduction of *Phytophthora* spp. Phytopathology 60: 1120-1127.

Address of the authors: Eng. F. GHADERI, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Yasouj, Iran; Dr. Z. BANIHASHEMI, Professor, Faculty of Agriculture, University of Shiraz, Iran.