نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و دوم، شماره دوم، ۱۳۹٤
http://jopp.gau.ac.ir

تغییر سطح بیماریزایی *Phytium ultimum* در گلرنگ تحت شرایط متفاوت آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه

***محمدهادی پهلوانی[۱]، سیداسماعیل رضوی[۲]، آزاد احمدی[۳] و الهام پالوج[۳]**

[۱]دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲] استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/٤/۱٤

چکیده

سابقه و هدف: یافتن منابع ژنتیکی و اصلاح ارقام مقاوم به پوسیدگی بذر ناشی *Pythium ultimum* که یکی از عوامل مهم بیماری‌زای گلرنگ در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد از اهداف مهم اصلاح‌گران این گیاه محسوب می‌گردد. این بیماری زمانی‌که رطوبت هوا پایین و رطوبت درعمق خاک به حد کافی مهیا باشد شیوع پیدا می‌کند و این شرایط دقیقا در زمان کشت گلرنگ حادث می‌شود. تاکنون خسارت ناشی از گونه‌های مختلف *Pythium* روی بذر و گیاهچه‌های گلرنگ، سورگوم، گندم، یونجه و چغندرقند گزارش شده است. هدف این مطالعه بررسی میزان پوسیدگی بذر ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ ناشی از این عامل بیماری‌زا در ۳ شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه بود.

مواد و روش‌ها: آزمایش‌ها در قالب طرح کرت‌های خردشده که در آن دو بستر کشت استریل و آلوده به‌عنوان عامل اصلی و ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ به‌عنوان عامل فرعی بودند، در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شدند. مایه‌زنی مصنوعی در آزمایشگاه با استفاده از سوسپانسیون زئوسپور با غلظت 10^5 در هر میلی‌لیتر و در شرایط گلخانه و مزرعه از خاک تلقیح شده با عامل بیماری‌زا انجام گردید.

*مسؤل مکاتبه: hpahlavani@yahoo.com

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ مورد بررسی از نظر درصد پوسیدگی بذر در هر سه شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه وجود داشت. در بستر استریل روند تغییرات ژنوتیپ‌ها در آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه تقریبا مشابه بود. بیشرین عدم جوانه‌زنی بذور به‌ترتیب در گلخانه، آزمایشگاه و مزرعه مشاهده شد. کمترین درصد جوانه‌نزدن در گلخانه، آزمایشگاه و مزرعه به‌ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های Syrian، Aceteria و LRV-۵۱۵۱ بود، اما در شرایط بستر آلوده نتایج تا حد زیادی متفاوت از این بود. مشاهده تنوع ژنوتیپی معنی‌دار برای درصد بذور جوانه‌نزده در شرایط بستر آلوده به‌این قارچ بیانگر وجود شانس در یافتن ژنوتیپ‌هایی با درصد پوسیدگی پایین در این شرایط است. همچنین تفاوت بین دو بستر کشت استریل و آلوده در شرایط آزمایشگاه و گلخانه معنی‌دار بود، که نشان داد که دلیل اصلی افزایش بذور جوانه‌نزده در بسترهای آلوده نسبت به بستر استریل، پوسیدگی بذر ناشی از عامل قارچی بوده است. سه ژنوتیپ PI-۲۵۰۵۳۷، Hartman و اراک ۲۸۱۱ کمترین درصد پوسیدگی و عدم جوانه‌زنی بذر به‌ترتیب در شرایط گلخانه، آزمایشگاه و مزرعه نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که کمترین میزان اثر متقابل ژنوتیپ × بستر کشت در شرایط آزمایشگاه رخ داده که با توجه به نامتغیر بودن عوامل محیطی در چنین شرایط کاملاً منطقی به‌نظر می‌رسد. به‌طورکلی تأثیر عامل بیماری‌زا *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه نسبت به مزرعه بیشتر بود و بیشترین درصد پوسیدگی و عدم جوانه‌زنی بذور گلرنگ در شرایط گلخانه مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: گلرنگ ژنوتیپ، جوانه‌زنی، گیاهچه، سوسپانسیون، زئوسپور

مقدمه

گلرنگ زراعی (*Carthamus tinctorius* L.) گیاهی از خانواده مرکبان، دیپلویید و دارای ۲٤ عـدد کرموزوم می‌باشد. گلرنگ عموماً جهت استحصال روغن، تهیه رنگدانه و یا به‌عنـوان غـذای پرنـدگان کشت می‌شود. منشاء این گیاه مناطق آسیای جنوب غربی، نواحی مدیترانه و ایـران اسـت. سـازگاری گلرنگ با شرایط ایران موجب گردیده تا بتوان آن را در مناطقی کـه کشـت سـایر گیاهـان روغنـی بـا دشواری همراه است مورد بهره‌برداری قرار داد. کشت گلرنگ با هدف استحصال روغن قدمت چندانی ندارد و اغلب ارقام روغنی آن طی نیم قرن اخیر آزاد شده‌اند. پایین بودن تولید گلرنگ در ایران بیشـتر ناشی از عواملی مانند ناکافی بودن پتانسیل تولید ارقام، بیماری‌ها و آفات، و علف‌های هرز اسـت. بـه همین دلیل ایجاد ارقام مقاوم به بیماری‌ها از اهداف مهم اصلاح گلرنگ در محسوب می‌گردد. تـاکنون عوامل بیماریزای متعددی در گلرنگ شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفته است کـه برخـی از آن‌هـا در سراسر مناطق کشت گلرنگ در دنیا شایع هستند و برخی به‌صورت منطقه‌ای مشاهده می‌شـوند (۱۹ و ۲۵). از مهم‌ترین بیماری‌های گلرنگ می‌تـوان بـه پوسـیدگی بـذر و مـرگ گیاهچـه ناشـی از عوامـل بیماریزای پیتیوم و فیتوفتورا، زنگ، پژمردگی ورتیسلیومی، سوختگی آلترناریایی بـرگ، لکـه قهـوه‌ای، سفیدک سطحی، سفیدک داخلی، پوسیدگی ذغالی، پژمردگی فوزاریومی، فیلودی و بیمارهای ویروسی و باکتریایی اشاره نمود (۵ و ۹). برخی از این عوامل بیماریزا با کاهش جوانه‌زنی و سبزشدن در مزرعه به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم موجب کاهش میزان محصول گلرنگ می‌گردند.

بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه ناشـی از *P. ultimum* در سراسـر دنیـا گسـترش دارد و در مزارعی که گلرنگ کشت شود جمعیت عامل بیماری و میزان بیماری به‌شدت افـزایش می‌یابـد (۱۷). این بیماری زمانی‌که رطوبت هوا پایین و رطوبت درعمق خاک به حد کـافی مهیـا باشـد شـیوع پیـدا می‌کند و این شرایط دقیقا در زمان کشت گلرنگ حادث می‌شود. تاکنون خسارت ناشـی از گونـه‌های مختلف *Pythium* روی بذر و گیاهچه‌های گلرنگ، سورگوم، گندم، یونجه و چغندرقند گـزارش شـده است (۸، ۱۰، ۱۳ و ۱۵). خسارت عمـده ایـن عامـل بیمـاری‌زا روی بـذرها و گیاهچـه‌های در حـال جوانه‌زدن مشاهده می‌شود (۹). اولین گزارش از پوسیدگی بذر و ریشـه گلرنـگ بـا عامـل پیتیـوم در جنوب آلبرتا در سال ۱۹٤۹ ارائه شده است (٦). در ایران این بیماری اولین بار در سال ۱۹٦۹ توسـط آل‌آقا در مزارع آزمایشی دانشکده کشاورزی کرج به‌طور پراکنده روی گلرنگ رقم فریو مشاهده گردید (۳). از بین گونه‌های پیتیومی که از بذرها و گیاهچه‌های بیمار گلرنـگ جداسـازی شـده اسـت، گونـه

P. ultimum از مهم‌ترین آن‌ها بشمار می‌رود (۲۲). هیونگ و همکاران (۱۹۹۲) تشخیص دادند که *Pythium sp. "group G"*، عامل ایجاد کننده بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه در گلرنگ است (۱۵). گویندا‌پا و همکاران (۲۰۰۵) نیز گزارش نمودند که بوته‌های گلرنگ مبتلا به پوسیدگی ریشه در مقایسه با گیاهان سالم عملکرد بذر ضعیف‌تری دارند و گلدهی در آن‌ها یک هفته دیرتر شروع می‌گردد (۱۲). پوسیدگی بذر و عدم جوانه‌زنی بذرها اولین علائم این بیماری قارچی است. البته عدم خروج گیاهچه از خاک همیشه ناشی از عدم جوانه‌زنی بذر نیست بلکه می‌تواند به‌دلیل از بین رفتن گیاهچه جوان در اثر تهاجم عامل بیماری‌زا در خاک ایجاد شده باشد (۸). به‌طور کلی فعالیت قارچ *P. ultimum* موجب می‌گردد تا ابتدا بذر نرم و پوره‌ای شده، سپس قهوه‌ای، پلاسیده و در نهایت تجزیه شود. گاهی اوقات نقطه آلودگی اولیه به‌صورت لکه‌ای کوچک، آبکی، تقریباً سیاه و آب سوخته است که به رنگ قهوه‌ای روشن بر روی هیپوکوتیل و اولین میان‌گره گیاهچه پدید می‌آید. این لکه‌ها به سرعت گسترش می‌یابند و موجب از بین رفتن سلول‌های مورد تهاجم می‌گردند و در نهایت قارچ تمام جوانه داخل بذر را فرا می‌گیرد و پس از مدت کوتاهی گیاهچه می‌میرد. به هر دو حالت فوق که آلودگی قبل از خروج گیاهچه از خاک صورت می‌گیرد، مرگ گیاهچه قبل از سبزشدن می‌نامند (۱).

با توجه به نوع آسیب‌های این عامل بیماریزا به بذرها و یا گیاهچه‌های جوان، نتایج حاصل از بررسی ژنوتیپ‌های مختلف گلرنگ در شرایط آزمایشگاهی (بستر حوله کاغذی)، گلخانه‌ای (بستر خاک با شرایط کنترل شده) و یا مزرعه‌ای (بستر خاک با شرایط واقعی) متفاوت خواهد بود. ارزیابی ژنوتیپ‌ها در شرایط حوله کاغذی آلوده به عامل بیماریزای *P. ultimum* به‌دلیل توانایی تفکیک پوسیدگی بذر از مرگ گیاهچه جوان و همچنین بررسی ژنوتیپ‌ها در شرایط واقعی خاک مزرعه آلوده به‌این عامل بیماریزا به نتیجه‌گیری دقیق، جامع و با درجه اطمینان بالا خواهد انجامید. تغییر میزان خسارت قارچ *P. ultimum* تحت شرایط محیطی متفاوت توسط محققین متعددی گزارش شده است (۱۱). لذا اندازه‌گیری پتانسیل جوانه‌زنی بذرها و سبزشدن گیاهچه، شناسایی نوع خسارت و تعیین حساس‌ترین مرحله رشدی گیاه به‌ویژه در محیط‌های آلوده به قارچ *P. ultimum* اهمیت زیادی دارد. به‌همین دلیل سبزشدن سریع و استقرار مناسب گیاهچه در شرایط مزرعه‌ای که در آن بذرها و گیاهچه‌ها با عوامل زنده و غیرزنده موجود در خاک مواجه می‌شوند، به یکی از اهداف مهم برنامه‌های اصلاح گلرنگ تبدیل شده است. این تحقیق به‌منظور بررسی کاهش میزان درصد جوانه‌زنی و سبزشدن

ژنوتیپ‌های مختلف گلرنگ در سه شرایط آلودگی به عامل بیماریزای *P. ultimum* روی بستر حوله کاغذی در آزمایشگاه، بستر خاک در گلخانه و مزرعه انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق درصد بذرهای جوانه‌نزده پانزده ژنوتیپ گلرنگ در شرایط بستر کشت متفاوت (از نظر آلودگی به قارچ *P. ultimum*) و محیط آزمایش (آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه) طی سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مورد مقایسه قرار گرفت.

تهیه ماده تلقیح: برای تهیه جدایه‌های *Pythium sp.*، در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۵، قطعات ۳ الی ۵ میلی‌متری از بافت‌های آلوده بذرهای آلوده جدا گردید. به‌منظور ضدعفونی سطحی، قطعات برشی آلوده به‌مدت یک دقیقه در داخل محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد قرار گرفتند. آنگاه این قطعات بر روی محیط کشت عمومی سیب‌زمینی- دکستروز- آگار[1] کشت داده شدند. برای ممانعت از رشد باکتری‌ها، از دو نوع آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و سولفات استرپتومایسین استفاده شد (۲۳). همچنین برای جلوگیری از رشد سایر قارچ‌ها، پیماریسین و بنومیل به محیط کشت افزوده شد تا محیط کشت کاملاً انتخابی تهیه شود. پس از کشت، محیط‌های کشت محتوی قارچ به‌مدت ٤ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بعد از رشد قارچ قطعاتی از پرگنه‌های تولید شده در شرایط کاملاً استریل به ظروف پتری حاوی آب آگار ۲ درصد انتقال یافتند. این ظروف به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق نگهداری شده و پس از آن با روش نوک ریسه خالص شدند (۲۳). تشخیص جدایه‌های قارچ *P. ultimum* بر اساس مونوگراف واندرپلاتس (۱۹۸۱) صورت گرفت (٢٤). همچنین در مواردی برای اطمینان بیشتر از کلید دیک (۱۹۹۰) استفاده شد (۷). برای تهیه سوسپانسیون زئوسپور، قطعات مربعی محیط‌های کشت محتوی پرگنه‌های خالص ٤ روزه *P. ultimum* با ابعاد مساوی داخل بشرهای ۵۰۰ میلی‌لیتر محتوی آب مقطر ریخته شد و در شرایط روشنایی با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری گردید. سپس بشرها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا زئوسپورها هم‌زمان آزاد گردند. پس از تهیه اسلاید و مشاهده زئوسپورها، غلظت زئوسپورها با اسلاید گلبول شمار (هموسایتومتر) اندازه‌گیری و سوسپانسیون زئوسپور (مایه تلقیح) با غلظت 10^5 زئوسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد (۲۱).

1- PDA

کشت و ارزیابی ژنوتیپ‌ها در آزمایشگاه: ارزیابی واکنش بذر و گیاهچه ژنوتیپ‌های گلرنگ به قارچ *P. ultimum* در آزمایشگاه تحقیقات بذر به‌صورت طرح کرت‌های خرد شده با چهار تکرار در سال ۱۳۸۷ صورت گرفت. عامل اصلی شامل بستر کشت با دو سطح استریل و آلوده به قارچ *P. ultimum* و عامل فرعی نیز شامل ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ از ژنوتیپ‌های داخلی و خارجی بود (جدول ۲). ارزیابی ژنوتیپ‌ها در شرایط آزمایشگاهی بر اساس روش حوله کاغذی با ماده تلقیحی سوسپانسیون زئوسپور به غلظت 10^5 در هر میلی‌لیتر صورت گرفت.

برای اجرای آزمایش جوانه‌زنی بذرها در محیط استریل، ۵۰ عدد بذر ضد عفونی شده با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد از هر ژنوتیپ گلرنگ در پنج خط طولی ۱۰ تایی با فواصل معین بر روی حوله‌های کاغذی مرطوب شده با آب مقطر قرار داده شدند. سپس حوله کاغذی دیگری با همان ابعاد (۵۰ سانتی‌متر در ۵۰ سانتی‌متر) روی بذرها قرار داده شد. حوله‌های کاغذی محتوی بذرهای کشت شده پیچانیده شدند و جهت جلوگیری از تبخیر در داخل پوشش پلاستیکی نگهداری شدند. حوله‌های محتوی بذر به‌طور عمودی در اتاقک رشد با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. ٤۸ ساعت پس از مرطوب نمودن، شمارش بذرهای جوانه‌زده به‌صورت روزانه یک‌بار با معیار خروج ریشه‌چه به اندازه ۳ میلی‌متر برای هفت روز متوالی آغاز شد (١٦). با استفاده از تعداد بذرهای جوانه نزده در روز آخر شمارش، درصد بذرهای جوانه نزده برای هر واحد آزمایشی تعیین گردید. مراحل کار برای بستر آلوده نیز به‌همین صورت بود. فقط برای محیط آلوده ۵۰ عدد بذر پس از ضدعفونی شده با هیپوکلریت سدیم از هر ژنوتیپ به‌مدت یک دقیقه در سوسپانسیون زئوسپور قارچ *P. ultimum* با غلظت 10^5 خیسانیده شدند. در نهایت نیز درصد بذرهای جوانه‌نزده در بستر آلوده تعیین گردید.

کشت و ارزیابی ژنوتیپ‌ها در گلخانه: ارزیابی گلخانه‌ای به‌صورت طرح کرت‌های خرد شده با دو نوع بستر کشت استریل و آلوده به‌عنوان عامل اصلی و پانزده ژنوتیپ گلرنگ به‌عنوان عامل فرعی در ٤ تکرار در سال ۱۳۸۷ اجرا شد. برای تهیه مایه تلقیح از عصاره شاهدانه استفاده شد (۲۱). تعداد ۸۰ کیسه پلاستیکی (فلاسک) محتوی ۰/۵ کیلوگرم ماسه تهیه و پس از اضافه نمودن ۳۰۰ میلی‌لیتر عصاره جوشانده شاهدانه به هر کیسه ماسه، ۳ بار به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع مورد اتوکلاو قرار گرفتند. کیسه‌های ماسه سه بار استریل شده همراه با عصاره شاهدانه توسط دو قرص ۵ میلی‌متری از قارچ پیتیوم تلقیح شدند. سپس برای تولید زئوسپور تمام کیسه‌ها در داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی به‌مدت یک ماه نگهداری شدند تا به‌این ترتیب ماده تلقیحی تهیه شود. هر واحد آزمایش یک پلات دایره‌ای شکل از

نوع پلاستیک با قطر ٤٠ سانتی‌متر و ارتفاع ١٠ سانتی‌متر (سطح مقطع ٠/٠٧١ مترمربع یا ٧٠٦/٥ سانتی‌متر مربع) بود. برای هر واحد آزمایشی حدود ٥ کیلوگرم خاک در نظر گرفته شد و ١٣٦ کیسه نایلونی محتوی خاک تهیه و ٢ بار به‌مدت یک ساعت در دمای ١٢١ درجه سانتی‌گراد با فشار ١/٢ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع استریل شدند. ماده تلقیحی با خاک ٢ بار استریل شده به نسبت ١ به ٨ مخلوط شد. پس از اضافه کردن مخلوط ماسه و ماده تلقیحی و خاک در هر یک از پلات‌ها، جهت تأمین شرایط رشد عامل بیماری به هر پلات ٥٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پلات‌ها ٧٢ ساعت در زیر روپوش پلاستیکی در دمای ٢٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

٥٠ عدد بذر از هر ژنوتیپ برای ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم ١٠ درصد به‌مدت یک دقیقه قرار گرفته و سپس سه بار با آب مقطر شستشو شده و در سطح دایره‌ای هر پلات به‌صورت دوایر متحدالمرکز کشت شد و برای پوشش بذور از یک لایه خاک ٢ بار استریل به ارتفاع ٣ سانتی‌متر استفاده شد. در پلات‌های مربوط به محیط استریل برای کل پلات از خاک ٢ بار استریل استفاده شد. کشت بذرها در فروردین ١٣٨٧ و آبیاری در طول دوره آزمایش با دور ٣ روز و هر بار به مقدار ٥٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر در هر پلات صورت گرفت. تعداد گیاهچه‌های سبز شده از ابتدا تا ٣ هفته پس از کشت ثبت گردید و به‌این ترتیب درصد بذور جوانه‌نزده در هر دو شرایط آلوده و استریل حاصل شد.

کشت و ارزیابی ژنوتیپ‌ها در مزرعه: ارزیابی مزرعه‌ای نیز مشابه با مطالعه گلخانه‌ای به‌صورت طرح کرت‌های خرد شده با دو نوع بستر کشت آلوده و استریل به‌عنوان عامل اصلی و پانزده ژنوتیپ گلرنگ به‌عنوان عامل فرعی در ٤ تکرار در فروردین ماه سال ١٣٨٨ انجام گردید. هر واحد آزمایشی قطعه زمینی به ابعاد ٤٠ × ٨٠ سانتی‌متر بود که تا عمق ٢٠ سانتی‌متری سطح آن‌ها خاک ٢ بار استریل قرار گرفته بود. جهت جلوگیری از انتشار آلودگی و حفظ شرایط استریل و همچنین ایجاد مرز بین واحدهای مجاور از بلوک‌های سیمانی به قطر ٣ سانتی‌متر استفاده شد. ١٠٠ عدد بذر از هر ژنوتیپ برای ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم ١٠ درصد به مدت یک دقیقه قرار گرفته (ابرین‌نیا، ٢٠٠١) و سپس سه بار با آب مقطر شستشو شده و در سطح هر پلات روی خطوط موازی کشت شد و برای پوشش بذرها از یک لایه خاک ٢ بار استریل به ارتفاع ٣ سانتی‌متر استفاده شد (٨). تمام حجم پلات‌های مربوط به محیط استریل تنها با خاک ٢ بار استریل پر گردید (٨). برای جلوگیری از خشک شدن خاک سطحی و حفظ رطوبت بستر کشت در طی دوره آزمایش از سیستم آبیاری بارانی به‌صورت روزانه استفاده گردید و تعداد گیاهچه‌های سبز شده از ابتدا تا ٣ هفته پس از کشت ثبت گردید و به‌این ترتیب درصد بذرهای جوانه نزده محاسبه گردید. برای بستر آلوده از خاک استریل که

به نسبت ۱ به ۸ با ماده تلقیحی مخلوط شده بود استفاده گردید. نحوه تهیه ماده تلقیحی و خاک استریل همانند آزمایش گلخانه بود.

در هر سه آزمایش فوق برای اثبات وجود قارچ عامل بیماری بر روی ماده آزمایشی، کشت مجدد بذور جوانه‌نزده و بخشی از بستر کشت در محیط کشت عمومی ذرت- آرد- آگار[1] انجام شد و قارچ عامل بیماری جدا گردید.

تجزیه و تحلیل آماری درصد بذور جوانه‌نزده: نرمال‌بودن داده‌های به‌دست آمده در آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه با استفاده از بررسی Q-Q پلات و آزمون کولموگروف- اسمیرنوف ارزیابی شد. از تبدیل داده‌های رادیکالی برای درصد بذرهای جوانه‌نزده یا سبزنشده در شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه استفاده شد و سپس اعداد به‌دست آمده در محاسبات آماری مورد استفاده قرار گرفتند. برای نمایش داده‌های جدول مقایسه میانگین و شکل‌ها نیز از داده‌های تبدیل شده (ریشه دوم داده‌های خام) استفاده گردید (جدول ۲ و شکل های ۱ و ۲). همچنین با توجه به ناچیزبودن خطای اول در طرح کرت‌های خرد شده در هر سه آزمایش داده‌ها با آزمایش فاکتوریل تجزیه شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها در محیط نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار SIQMA-PLOT استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ مورد بررسی از نظر درصد بذور جوانه‌نزده در هر سه محیط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه تفاوت معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱). وجود تفاوت ژنوتیپی برای درصد جوانه‌زنی بذرهای گلرنگ در شرایط معمول و یا شرایط آلوده به قارچ *P. ultimum* توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۱۷). تفاوت بین دو بستر کشت استریل و آلوده به قارچ *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای معنی‌دار بود، که بیانگر تأثیر تیمار آلودگی در کاهش جوانه‌زنی بذر و یا افزایش پوسیدگی آن‌ها بود. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است متوسط ریشه دوم درصد بذرهای جوانه‌نزده در محیط آلوده نسبت به محیط استریل در شرایط آزمایشگاه از ٤/۸۲ به ۵/۸۳ و در محیط گلخانه از ۵/۸۱ به ۹/٤۲ افزایش یافت. این افزایش معنی‌دار همچنین نشان می‌دهد که دلیل اصلی افزایش بذرهای جوانه‌نزده در بسترهای آلوده نسبت به بستر استریل، پوسیدگی یا مرگ بذر ناشی از عامل قارچی بوده است. وقوع پوسیدگی بذر یا عدم

1- CMA

جوانه‌زنی آن در محیط‌های آلوده به قارچ *P. ultimum* در گلرنگ (۲) و سایر گیاهان زراعی (۱٤) پیش از این نیز گزارش شده است (۲، ۱٦ و ۱۸). اما در شرایط مزرعه تفاوت معنی‌داری بین دو سطح بستر کشت استریل و آلوده به *P. ultimum* مشاهده نشد (جدول ۱). عدم تأثیر ماده آلودگی بر پوسیدگی بذر و جوانه نزدن بذرهای گلرنگ در شرایط مزرعه نسبت به شرایط آزمایشگاه و گلخانه را می‌توان فاکتورهای متفاوتی ربط داد. فراهم بودن شرایط مناسب و بدون نوسان دما و رطوبت در هر دو محیط آزمایشگاه و گلخانه نسبت به شرایط مزرعه موجب بهینه شدن شرایط رشد و توسعه قارچ می‌گردد (٤). در حالی‌که در شرایط مزرعه‌ای دمای گرم طی ساعات نزدیک ظهر و پایین بودن دما در خلال ساعات شب موجب وارد شدن خلل به رشد و توسعه سریع قارچ می‌گردد (۱۱). نتایج سایر مطالعات نیز همگی حاکی از وجود حساسیت زیاد رشد و توسعه قارچ *P. ultimum* به دما و رطوبت است (٤). بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که شرایط مزرعه‌ای محیطی مناسب برای بررسی میزان خسارت و بیماریزایی قارچ *P. ultimum* بر روی بذر نمی‌باشد و در مراحل بعد ممکن است قارچ توسعه یافته و مرگ گیاهچه را باعث شود. در این مطالعه نیز با گذشت زمان، افزایش آلودگی موجب مرگ گیاهچه پس از سبزشدن گردید و این موضوع اعمال صحیح تیمار آلودگی و وجود قارچ *P. ultimum* را در بستر کشت تأیید نمود (نتایج نشان داده نشده‌است).

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد پوسیدگی بذر ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ زراعی در بستر کشت استریل و آلوده به قارچ *Pythium ultimum* در سه شرایط محیطی آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه.

Table 1. Analysis of variance for seed rot (%) in 15 safflower genotypes at sterile and infected media with *Pythium ultimum* under lab, greenhouse and field conditions.

میانگین مربعات درصد پوسیدگی بذر Mean squares of seed rot (%)			درجه آزادی	منابع تغییرات
مزرعه Field	گلخانه Greenhouse	آزمایشگاه Lab	DF	S.O.V
0.035**	0.038**	0.141**	14	ژنوتیپ Genotype
0.002	3.890**	0.304**	1	بستر کشت Media
0.010	0.040**	0.014*	14	ژنوتیپ × بستر کشت Media×Genotype
0.874	0.697	0.008	90	خطا Error
24.9	11.6	16.8	—	CV (درصد)

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

* and **: Significant at 5 and 1 %, respectively.

†: از ریشه دوم داده‌ها در تجزیه واریانس استفاده شده‌است.

†: Square root of data were used in the analysis.

جدول ۲- مقایسه میانگین پوسیدگی بذر ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ زراعی در بستر کشت استریل و آلوده به قارچ *Pythium ultimum* در سه شرایط محیطی آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه با استفاده از آزمون LSD.

Table 2. LSD comparison of means for seed rot (%) in 15 safflower genotypes at sterile and infected media with *Pythium ultimum* under lab, greenhouse and field conditions.

درصد پوسیدگی بذر (درصد) † Seed rot (%)							
مزرعه Field		گلخانه Greenhouse		آزمایشگاه Lab		منشاء Origin	ژنوتیپ Genotype
آلوده Infected	استریل Sterile	آلوده Infected	استریل Sterile	آلوده Infected	استریل Sterile		
4.23^{abcd}	3.84^{cde}	9.50^{a}	8.64^{a}	9.32^{a}	7.50^{a}	Iran	IL-111
3.19^{dc}	3.10^{e}	9.42^{a}	4.77^{fg}	4.89^{cde}	4.28^{bc}	Iran	LRV-25295
3.02^{dc}	2.98^{e}	9.23^{a}	5.56^{cdefg}	5.47^{bcde}	4.58^{bc}	Iran	LRV-5151
2.83^{d}	3.55d^{e}	9.56^{a}	6.74^{bcd}	6.44^{b}	5.23^{b}	Iran	Arak-2811
3.06^{dc}	3.94^{bcde}	9.42^{a}	5.78^{cdef}	5.44^{bcde}	4.24^{bc}	Iran	Isfahan
4.36^{abc}	5.15^{ab}	9.69^{a}	6.85^{bc}	6.22^{bc}	3.73^{c}	Iran	Zarghan-259
5.11^{ab}	4.07^{bcde}	9.48^{a}	4.18^{g}	5.44^{bcde}	4.55^{bc}	Syria	Syrian
3.55^{dc}	3.51^{de}	9.42^{a}	4.99^{fg}	4.76^{de}	2.32^{d}	Canada	Aceteria
5.52^{a}	5.38^{a}	9.56^{a}	4.65^{fg}	4.27^{e}	4.35^{bc}	America	CW-74
4.32^{abcd}	3.41^{de}	9.77^{a}	5.12^{efg}	4.19^{e}	4.66^{bc}	America	Hartman
4.23^{abcd}	4.20^{abcde}	9.61^{a}	4.78^{fg}	4.36^{e}	4.30^{bc}	Unknown	Dinger
4.06^{abcd}	3.47^{de}	9.36^{a}	6.61^{cde}	5.86^{bcd}	4.55^{bc}	Unknown	34074
3.66^{bcd}	4.56^{abcd}	9.13^{a}	8.26^{ab}	8.45^{a}	7.71^{b}	Unknown	324040
3.61bcd	5.04^{abc}	9.74^{a}	5.13^{efg}	6.20^{bc}	5.36^{b}	Unknown	5-541
4.07^{abcd}	3.89^{bcde}	8.04^{b}	5.17^{defg}	6.14^{bcd}	4.95^{b}	Unknown	PI-250537
1.510	1.289	0.796	1.584	1.398	1.148	—	LSD $_{(0.05)}$
3.92	4.00	9.42	5.81	5.83	4.82	—	Mean میانگین

†: از ریشه دوم داده‌ها در مقایسه میانگین‌ها استفاده شده است.

†: Square root of data were used in the analysis.

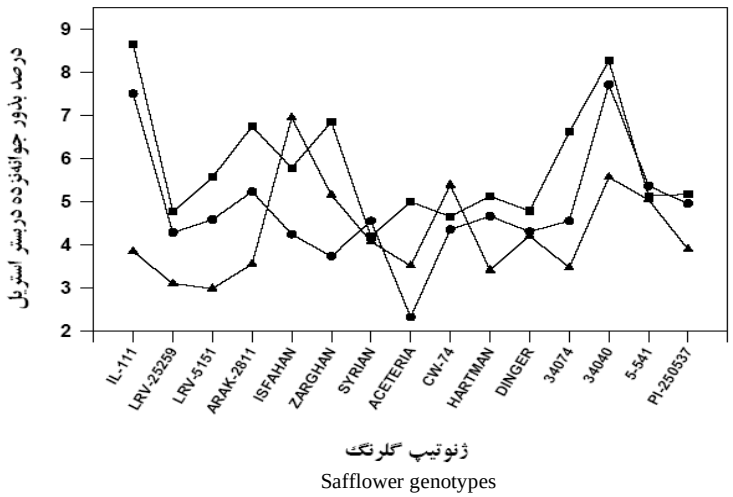
وجود اثر متقابل معنی‌دار بین سطوح دو عامل ژنوتیپ و بستر کشت در آزمایشگاه و گلخانه بیانگر تغییر رتبه ژنوتیپ‌ها از نظر میزان بذرهای جوانه‌نزده در بستر استریل نسبت به بستر آلوده به قارچ *P. ultimum* بود (جدول ۱). به طوری‌که در آزمایشگاه و شرایط استفاده از بستر حوله کاغذی استریل ژنوتیپ Aceteria با ۲/۳۲ درصد کمترین و گروه ژنوتیپ‌های ۳٤۰٤۰ و IL-111 به‌ترتیب با ۷/۷۱ و ۷/۵۰ بیشترین درصد بذور جوانه‌نزده را دارا بودند (جدول ۲). از طرفی در آزمایشگاه با بستر آلوده به قارچ *P. ultimum* گروه ژنوتیپ‌های Dinger، Hartman و CW-74 به‌ترتیب با ٤/۳٦، ٤/۱۹ و ٤/۲۷ کمترین و گروه ژنوتیپ‌های IL-111 و ۳٤۰٤۰ به‌ترتیب با ۹/۳۲ و ۸/٤۵ بیشترین درصد بذرهای جوانه‌نزده را دارا بودند (جدول ۲). در حالی‌که در شرایط استریل گلخانه ژنوتیپ Syrian با ٤/۱۸

کمترین و ژنوتیپ IL-111 با ۸/٦٤ بیشترین درصد بذرهای جوانه‌نزده را نشان داد (جدول ۲). در شرایط بستر آلوده به قارچ *P. ultimum* در گلخانه نیز تمام ژنوتیپ‌ها به استثنای PI-۲۵۰۵۳۷، درصد بذرهای جوانه‌نزده بالایی داشتند (جدول ۲). در شرایط خاک استریل مزرعه ژنوتیپ CW-74 با ۵/۳۸ بیشترین و دو ژنوتیپ LRV-۵۱۵۱ و LRV-۲۵۲۹۵ به‌همراه ۸ ژنوتیپ دیگر کمترین درصد بذر جوانه‌نزده را داشتند (جدول ۲). در مقابل در شرایط خاک مزرعه آلوده به عامل بیماری‌زا، ژنوتیپ اراک ۲۸۱۱ با ۲/۸۳ کمترین و ژنوتیپ CW-74 (با ۵/۵۲ درصد) به‌همراه ۱۰ ژنوتیپ دیگر بیشترین مقادیر درصد بذرهای جوانه‌نزده را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارا بودند (جدول ۲).

اثر متقابل معنی‌دار بین ژنوتیپ و بستر کشت در این مطالعه نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی معنی‌داری برای درصد بذرهای جوانه‌نزده در شرایط بستر استریل و یا آلوده به قارچ *P. ultimum* وجود داشت (جدول ۱). تنوع ژنوتیپی برای درصد بذرهای جوانه‌نزده در شرایط بستر آلوده به قارچ بیانگر وجود شانس در یافتن ژنوتیپ‌هایی با درصد پایین بذور جوانه‌نزده در این شرایط است. از نظر عددی کمترین درصد بذرهای جوانه‌نزده در شرایط آلوده در آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه به‌ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های Dinger، PI-۲۵۰۵۳۷ و اراک ۲۸۱۱ بود (جدول ۲). به‌عبارت دیگر بهترین ژنوتیپ گلرنگ از نظر میزان پوسیدگی بذر ناشی از قارچ *P. ultimum* در شرایط محیطی آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه تغییر نموده بود. تغییر واکنش ژنوتیپ‌ها نسبت به عوامل بیماریزای قارچی در شرایط محیطی متفاوت که به اثر متقابل ژنوتیپ × محیط نیز تعبیر می‌گردد پیش از این نیز توسط محققین متعددی گزارش شده است (۲، ٤ و ۱۸). وجود این نوع اثر متقابل‌ها تصمیم‌گیری در مورد معرفی بهترین ژنوتیپ را دشوار می‌سازد و متخصصین اصلاح نباتات را وادار می‌سازد تا برای هر شرایط محیطی خاص یک ژنوتیپ را انتخاب و معرفی نمایند. اما گاهی اوقات هدف یافتن یک یا تعداد معدودی ژنوتیپ برای کشت در دامنه‌ای از شرایط محیطی است. در چنین شرایطی بهترین راه شناسایی ژنوتیپ(های) برتر تجزیه و تحلیل گرافیکی روند تغییرات سطوح دو عامل ژنوتیپ و محیط است.

روند تغییرات ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ از نظر درصد بذرهای جوانه‌نزده در بستر استریل و آلوده به قارچ *P. ultimum* در آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه در تصاویر ۱ و ۲ نمایش داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در بستر کشت استریل روند تغییرات ژنوتیپ‌ها در آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه تقریبا مشابه است (شکل ۱). بیشرین عدم جوانه‌زنی بذور به‌ترتیب در گلخانه، آزمایشگاه و مزرعه مشاهده شد. کمترین درصد جوانه‌نزدن در گلخانه، آزمایشگاه و مزرعه به‌ترتیب به ژنوتیپ‌های

Syrian، Aceteria و LRV-۵۱۵۱ مربوط بود (شکل ۱، جدول ۲). اما در شرایط بستر آلوده نتایج تا حد زیادی متفاوت از این بود (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ نیز مشاهده می‌شود روند تغییرات ژنوتیپ‌ها در سه محیط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه متفاوت بود. به‌عبارتی رتبه ژنوتیپ‌ها از نظر درصد پوسیدگی بذر در آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه تفاوت داشت. بیشترین تفاوت بین واکنش ژنوتیپ‌ها به‌ترتیب در آزمایشگاه، مزرعه و گلخانه وجود داشت (شکل ۲). اگرچه بیشترین عدم جوانه‌زنی بذرها، باز هم به‌ترتیب در گلخانه، آزمایشگاه و مزرعه مشاهده شد ولی کمترین درصد پوسیدگی بذر در گلخانه، آزمایشگاه و مزرعه به‌ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های PI-۲۵۰۵۳۷، Hartman و اراک ۲۸۱۱ بود (شکل ۲، جدول ۲). تغییر میزان خسارت قارچ بر جوانه‌زنی و رشد گیاهان و یا واکنش ژنوتیپ‌ها به آلودگی‌های قارچ پیتیوم در شرایط متفاوت محیطی پیش از این نیز گزارش شده‌است (۱۱ و ۲۰).

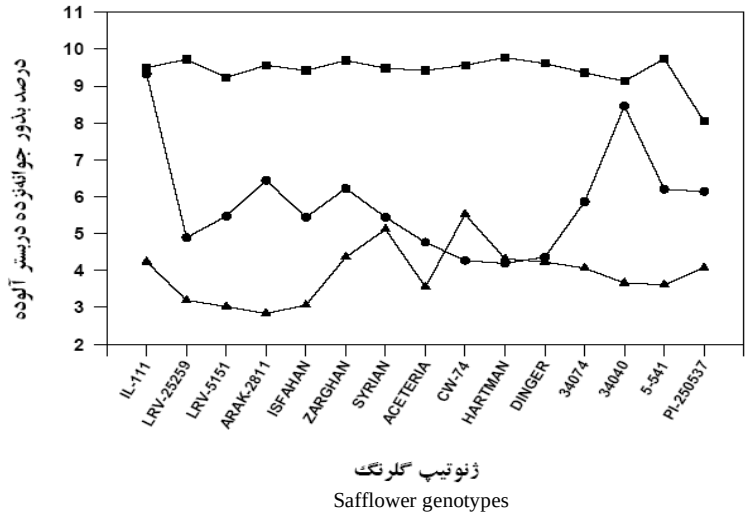


شکل ۱- درصد بذور جوانه‌نزده ژنوتیپ‌های مختلف گلرنگ در بستر کشت استریل در آزمایشگاه (●—●)، گلخانه (◆—◆) و مزرعه (◆↔◆).

Figure 1. Percent of ungerminated seeds of various safflower genotypes at sterile media under lab (●—●), greenhouse (◆—◆) and field (◆↔◆) conditions.

†: از ریشه دوم داده‌ها در رسم شکل استفاده شده است.

†: Square root of data were used in drawing the graph.



شکل ۲- درصد بذور جوانه‌نزده ژنوتیپ‌های مختلف گلرنگ در بستر کشت آلوده به قارچ *Pythium ultimum* در آزمایشگاه (●—●)، گلخانه (◆—◆) و مزرعه (◀—▶).

Figure 2. Percent of ungerminated seeds of various safflower genotypes at infected media under lab (●—●), greenhouse (◆—◆) and field (◀—▶) conditions.

†: از ریشه دوم داده‌ها در رسم شکل استفاده شده است.

†: Square root of data were used in drawing the graph.

به‌منظور درک صحیح‌تر از مشابهت نتایج حاصل در شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه ضرایب همبستگی بین درصد بذرهای جوانه‌نزده در بستر استریل و آلوده به قارچ *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه محاسبه شد (جدول ۳). همان‌طوری که مشاهده می‌شود هیچ‌گونه همبستگی بزرگ و قابل توجهی بین آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه از نظر درصد بذور جوانه‌نزده در بستر آلوده وجود نداشت (جدول ۳). تنها ضریب همبستگی منطقی و معنی‌دار بین درصد بذرهای جوانه‌نزده در بستر استریل و بستر آلوده در آزمایشگاه مشاهده گردید (r=۰/۸۲**)، که بیانگر این واقعیت است که کمترین میزان اثر متقابل ژنوتیپ × بستر کشت در شرایط آزمایشگاه رخ داده است که با توجه به نامتغیر بودن عامل‌های محیطی در چنین شرایط کاملاً منطقی به‌نظر می‌رسد. ضریب همبستگی نشان داد که رابطه قابل توجه و معنی‌داری بین درصد پوسیدگی بذر در شرایط استریل و آلوده خاک مزرعه وجود نداشت (r=۰/۱۲). از طرفی تفاوت معنی‌داری بین دو سطح بستر کشت در شرایط مزرعه از نظر همین صفت مشاهده نشد (جدول ۱). این دو نتیجه نشان می‌دهد که دلیل از

بین‌رفتن بذرها در دو بستر کشت استریل و آلوده به قارچ *P. ultimum* در شرایط مزرعه کاملا متفاوت بوده است و این وجود اثر متقابل بین ژنوتیپ‌ها و بستر کشت را در این شرایط تأیید می‌کند.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که تأثیر قارچ *P. ultimum* در شرایط محیطی آزمایشگاه و گلخانه نسبت به محیط مزرعه به‌طور معنی‌داری بیشتر بود و بالاترین درصد پوسیدگی و عدم جوانه‌زنی بذرهای گلرنگ در شرایط گلخانه مشاهده شد. هیچ ژنوتیپی یافت نگردید که در هر سه شرایط محیطی آلوده به قارچ *P. ultimum* برتری خویش را نسبت به سایرین از نظر پوسیدگی بذر حفظ نماید. بنابراین امکان معرفی یک ژنوتیپ گلرنگ به‌عنوان بهترین در همه شرایط محیطی وجود نداشت. به‌طور کلی سه ژنوتیپ PI-۲۵۰۵۳۷، Hartman و اراک ۲۸۱۱ از نظر کمترین درصد پوسیدگی و عدم جوانه‌زنی بذر به‌ترتیب برای شرایط گلخانه، آزمایشگاه و مزرعه مناسب‌تر از سایرین بودند. همچنین با توجه به احتمال وجود اثر متقابل شدید ژنوتیپ × بستر کشت در شرایط مزرعه پیشنهاد می‌گردد، این موضوع در مطالعات آتی مورد بررسی دقیق‌تر قرار گیرد.

جدول ۳- ضرایب همبستگی درصد پوسیدگی بذر ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ زراعی در بستر کشت استریل و آلوده به قارچ *Pythium ultimum* در سه شرایط محیطی آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه.

Table 2. Coefficient of correlation for seed rot (%) in 15 safflower genotypes at sterile and infected media with *Pythium ultimum* under lab, greenhouse and field conditions.

ضرایب همبستگی† Coefficient of correlation		آزمایشگاه Lab		گلخانه Greenhouse		مزرعه Field	
		استریل Sterile	آلوده Infected	استریل Sterile	آلوده Infected	استریل Sterile	آلوده Infected
آزمایشگاه Lab	استریل Sterile	1					
	آلوده Infected	0.82**	1				
گلخانه Greenhouse	استریل Sterile	0.71**	0.88**	1			
	آلوده Infected	-0.15	-0.22	-0.05	1		
مزرعه Field	استریل Sterile	0.14	0.14	0.15	0.04	1	
	آلوده Infected	-0.02	-0.16	-0.22	-0.04	0.12	1

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**: Significant at 1 %, respectively.

†: از ریشه دوم داده‌ها در محاسبه ضرایب همبستگی استفاده شده است.

†: Square root of data were used in the correlation analysis.

منابع

1.Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology.* 4th. ed. Academic Press. Pp: 266-270.

2.Ahmadi, A., Pahlevani, M., Razavi, S., and Maghsoudlo, R. 2008. Evaluation of safflower genotypes to find genetic sources of resistance to damping-off (*Pythium ultimum*), Elec. J. Crop. Prod. 1-16.

3.Alagha, N. 1970. Damping-off in safflower. 3rd conference plant pathology of Iran. Shiraz. (In Persian)

4.Allen, T.W., Han, D.Y., and Bowen, K.L. 2005. Effect of environmental characteristics on *Pythium* and *Mesocriconema* spp. in golf course greens in Alabama, Can. J. Microbiol. 51: 287–293.

5.Behdad, E. 1999. Plant diseases, Urmia University Press, 426p. (In Persian)

6.Cormack, M.W., and Harper, F.R. 1952. Resistance in safflower to root rot and rust in Alberta. Phytopathol. 42: 5.

7.Dick, M.W. 1990. Keys to *Pythium*. Reading, England. 64p.

8.Ebrinnia, M. 2001. Evaluation of resistance seedling lines of beet to *Pythium ultimum* Trow in greenhouse conditions. Thesis of M.Sc. University of Tabriz, 151p. (In Persian)

9.Elahinia, S. 2005. Mycology and plant pathology, Guilan University Press, 520p.

10.Forbes, G.A., ZIV, O., and Frederiksen, R.A. 1987. Resistance in sorghum to seedling disease caused by *Pythium arrhenomanes*. Plant Dis. 71: 145-148.

11.Fortnum, B.A., Rideout, J., Martin, S.B. and Gooden, D. 2000. Nutrient solution temperature affects pythium root rot of tobacco in greenhouse float systems, Plant Dis. 84: 289-294.

12.Govindappa, M., Lokesh, S., and Ravishankar Rai, V. 2005. A New stem-splitting symptom in safflower caused by *Macrophomina phaseolina*. Phytopathol. 153: 560–561.

13.Hancock, J.G. 1991. Seedling and rootlet disease of forage alfalfa caused by *Pythium irregular*. Plant Dis. 75: 691-694.

14.Hendrix, F.F., and Campbell, W.A. 1973. Pythiums as plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 11: 77-99.

15.Huang, H.C., Morrison, R.J., Muendel, H.H., and Barr, D.J.S. 1992. *Pythium* sp. "group G", a form of *Pythium ultimum* causing damping-off of safflower. Can. J. Plant Pathol. 14: 229-232.

16.ISTA. 1996. International rules for seed testing. Seed Sci. Technol. 24:1-335. Supplement.

17.Mundel, H.H., Huang, H.C., Kozub, G.C. and Barr, D.J.S. 1995. Effect of soil moisture and temperature on seedling emergence and incidence of pythium damping-off in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Can. J. Plant Sci. 75: 505-509.

18. Osburn, R.M., Schroth, M.N., Hancock, J.G., and Hendson, M. 1989. Dynamics of sugar beet seed colonization by *Pythium ultimum* and *Pseudomonas* species: effect on seed rot and damping-off. Phytopathol., 79: 709-716.
19. Pahlevani, M., and Razavi, S. 2007. Isolation of *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot disease and determination of reaction mode in some safflower genotypes, J. Agric. Sci. Nat. Res. 157-164. (In Persian)
20. Quitugua, R.J., and Trujillo, E.E. 1998. Survival of *Phytophthora colocasiae* in field soil at various temperatures and water matric potentials, Plant Dis. 82: 203-207.
21. Rezaii, S. and Alizadeh, A. 1998. Soybean damping-off causing by *Phytophthora sojae* in Lorestan province. J. Plant diseases, 34: 122-143.
22. Sadravi, M. 2005. Diseases of oilseed plants. Jehad Daneshgahi Mashad Press, 103p. (In Persian)
23. Singelton, L.L., Mihall, J.D. and Rush, C.M. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi, Aps Press. 265p.
24. Van der Plaats-Niterink, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. No. 21, Studies in Mycology. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands.
25. Zeinali, E. 1999. Safflower (characteristics, production and utilization). Gorgan Univ. Agri. Sci. Nat. Res. Press, 137p. (In Persian)