دراسات فسيولوجية على نمو وتكاثر فطر *Pythium oligandrum*

أمنة عقيلة المبروك، نوارة علي محمد و زهرة إبراهيم الجالي
قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا
Email: noboshakoa38@yahoo.com

الملخص

تشير نتائج الدراسة إلى أن نوع الوسط الغذائي يلعب دور في نمو فطر ***P.oligandrum*** ، فعند تنمية الفطر على سبع أوساط غذائية مختلفة (طبيعية وتركيبية) وهى بيئة بطاطس جزر اجار (potato carrot agar PCA)، بيئة جلوكوز اسبارجين اجار (Glucose Asparagin agar GAM)، وبيئة عصير ثمان خضروات (V8) V8 juici agar، بيئة دقيق الذرة أجار Corne meal agar , (CMA) ، بيئة Melin –Norktans agar (MMN)، بيئة Malt extract (MA) وبيئة زابكس دوكس اجار .Czapeck–Dox agar، فقد كانت بيئتى PCA و GAM وهى أفضل الأوساط الغذائية للفطر حيث أعطت أعلى نمو طولى (89 و86.9 مم) على التوالي، وبأخذ الوزن الجاف وصل الى (6.8 و7.5 مليجم) على التوالي، وسجل اعلى انتاج للاوجونيا على بيئة CMA 6.36 x 10^5 اوجونيا/مل وPCA 3.76 x 10^5 اوجونيا/مل و GAM 2.39 x 10^5 اوجونيا/مل، ولم يسجل انتاج الجراثيم البيضية الا على بيئة GAM 1 x10^7 جرثومة/مل. ويتبين من النتائج ان السكروز أفضل مصدر كربوني لنمو هذا الفطر بينما أعطى الارجينين كمصدر نتروجيني اعلى نمو ميسيليومى في جميع التراكيز المختبرة.

أما الدراسات الفسيولوجية فقد أوضحت نتائج تنمية الفطر على درجات حرارة مختلفة (5، 10، 15، 20، 25 و 30) °م ، ان درجة النمو المثلى للنمو ميسيليومى والوزن الجاف هي درجة 25 °م ، وعند مستوى الرطوبة النسبية العالية 100% اعطى اعلى نمو ميسليومى بينما 75.5% اعلى وزن جاف للفطر المختبر، كما أشارت النتائج إلى ان رقم الحموضة 7 كانت مثلى لنمو الفطر، ولم يسجل اى تأثير لظروف الإضاءة المختبرة (24 ساعة ظلام، 24ساعة أضاءه، 12ساعة ظلام/12 ساعة ضوء)، كما أكدت هذه الدراسة الى ان تعريض الفطر بالأشعة الفوق بنفسجية فى أزمنة مختلفة

تتراوح بين 30 – 360 ثانية، أدت الى انخفض فى النمو الميسيليومى عند 360 ثانية بينما باقى الأزمنة لم تؤثر على نمو الفطر الميسيليومى.

الكلمات المفتاحية: دراسات فسيولوجية ، عوامل بيئية ، اوساط غذائية، نمو الفطر ، *P*ythium *oligandrum*

المقدمة

تشير العديد من الدراسات الى ان أن لنوعية البيئات تأثير على النمو وتكاثر بعض الفطريات مثل *Pythium*، *Phytophthora* و وانواع من *Fusarium* (25)، فقد وجد أن التكاثر الجنسي لفطر *P.oligandrum* يزداد معنويا بزيادة العديد من العناصر المعدنية الغذائية مثل : الحديد، الزنك، النحاس و المنجنيز فى النبات (9) . عنداختبار تأثير أنواع من البيئات على نمو جنس *Pythium* spp وانتاجه التراكيب التكاثرية، كذلك درست الدور الذى تلعبه مصادر كل من الكربون والنتروجين على تطور الفطر، وجدKhalil ، (2002) أن الفطر *Pythium* spp اعلى نمو له على بيئة دقيق الذرة المغذية Corn meal agar (CMA) و بيئة بطاطس دكستروز اجار potato dextrose agar (PDA)، حيث اعطت أفضل نمو خطى واعلى إنتاج للجراثيم الاسبورانجية، الا ان التجرثم و انتاج لاسبورنجيا كان افضل *على بيئة* و بيئة بطاطس دكستروز اجار potato dextrose agar (PDA) أو بيئة الاجار المائي water agar (WA) المحتوية على قطع من اوراق القرنفل وتم ضبطها على تراكيز مائية مختلفة (24). أما مستعمرات لفطر *P. oligandrum* نمت على بيئة بكتو – بيئة دقيق الذرة المغذية Bacto – CMA حيث كون الفطر مستعمرات مغمورة فى البيئة ، بينما على بيئة بطاطس جزر اجار PCA كانت المستعمرات ليس لها شكل محدد مع ظهور نمو ميسيليوم هوائي ، اعطت المستعمرات نمو يشبه لزهرة الاقحوان مع نمو ميسيليومى هوائي. على بيئة بكتو – بطاطس دكستروز اجار (1). من جهة اخرى فقد بينت الدراسات الفسيولوجية أن النشا Starch افضل مصدر كربوني لفطر *Pythium* حيث أعطى اعلى وزن ميسيليومى جاف مقارنة بمصادر الكربون الاخرى، بينما كان

إنتاج الاسبورنجيا أعلى في البيئة المحتوية على جلوكوز كمصدر كربوني(46)، في حين كانت اليوريا urea [C $(NH_2)_2$] أفضل مصدر نتروجيني مقارنة كلوريد الامونيوم ammonium chloride (NH_4Cl)، نترات الكالسيوم calcium nitrate [Ca $(NO_3)_2$] ونترات الصوديوم sodium nitrate ($NaNO_3$) حيث اعطت اعلى متوسط وزن ميسيليومى جاف واعلى انتاج اسبورنجبا مقارنة بالشاهد، بينما كلوريد الامونيوم انتجت كمية وفيرة من الاسبورنجيا، اما نترات الكالسيوم ونترات الصوديوم فقد كانت فقيرة كمصادر نتروجينية وقل عليها النمو الميسيليومى، كذلك انتاج الاسبورنجيا sporangia لفطر *Pythium* (17).

العوامل البيئية مثل درجة الحرارة، رقم الحموضة، الرطوبة النسبية، تأثير الملوحة وبالإضافة الى الضوء كدراسات فسيولوجية لجنس *Pythium* ، حيث نشاطات الفطر تتأثر الظروف البيئية المحيطة به (28) و (5) ، حيث تلعب دور فى النمو الخضري ونشاط الفطر والإنتاج التكاثرى لفطر *Pythium aphanidermatum* (3)، وأن الفطريات البيضية تحتاج الى درجات حرارة مثلى خاصة وهى نسبيا تقع بين (اقل من 20ºم و لا تزيد عن 35ºم) (46) كما ان لدرجة الحرارة تأثير معنوي على فطريات جنس *Pythium*، عند اختبر خمس مستويات حرارية مختلفة وهى (10، 15، 20، 25 و 30ºم) (38)، وتعد الدرجة المثلى للنمو الميسيليومى لفطر *P. oligandrum* هي 30ºم، بينما الدرجة المثلى لتطوره كانت 25ºم (1).

بشكل عام توجد علاقة بين النمو الخطى للفطريات و الرطوبة النسبية (RH%) فى البيئة المحيطة بها، فقد استعمل Benda و Pospisil (1999) محاليل ملحية ذات تراكيز مرتبطة مع الرطوبة النسبية، وكانت على التوالى : كلوريد الكالسيوم CaCl، وفوسفات البوتاسيوم الأحادي KH_2PO_4، كلوريد الصوديوم NaCl والماء المقطر، وقد سجلت الدراسة ان الفطر *Tilletia tritici* يحتاج الى رطوبة نسبية متوسطة اكثر من 60%.

كما تعتبر الملوحة عامل هام فى نمو الفطريات، فقد بينت العديد من الدراسات وجود تتباين فى نمو الفطر وتطورها ونشاطها حسب درجة تحملها للوسط الملحي الذى تعيش فيه، فالمحتوى العالى من ايونات الكالسيوم تحت الظروف المعملية يؤدى الى تثبيط انتاج الجراثيم الاسبورنجيا، والجراثيم الكلاميدية، وايضا انتاج الجراثيم السابحة *Phytophthora cinnamomi* وذلك عند تركيزات بالملي مولر، في حين لم يحدث

أي تغيير في النمو الميسيليومى (37)، أما المستويات المنخفضة من ملح كلوريد الصوديوم ليس لها تأثيرا على نمو الفطر *Pythium* وانتاجه للجراثيم (47)، الا ان التركيزات بين (0.1–0.5% من كلوريد الصوديوم) كافي لنمو ثلاث انواع من فطر *Pythium* الميسيلومى وانتاج الجراثيم السابحة(1).

هذا وقد سجل وجود علاقة ايجابية بين النمو الميسيليومى لفطر *Pythium ultimum* و رقم الحموضة Griffin pH(1958) الا النمو الميسيليومى و سلوك انتاج الجرايم البيضية تحت الظروف المعملية *in vitro*، مبنى على رقم حموضة الوسط المتواجد به الفطر، وان الرقم الهيدروجيني pH الامثل حوالى 7 (35). وتتباين فطريات هذا الجنس فى قم الحموضة الملائم لها، أما فطر *P. ultimum* له مدى كبير من رقم الحموضة pH من 4.5– 7 الا ان رقم الحموضة الامثل للنمو الميسيليومى وانتاج الجراثيم الفطر السابحة هو pH7 (23)، بينما تمكن Martin (1999) من استعادة نمو انواع الفطر *Pythium* spp في الترب التي يتراوح رقم الحموضة ما بين 3.2 – 7.2 . وجد Panova وآخرون (2004) ان افضل نمو لفطر *P. aphanidermatum* النامي على بيئة جزر اجار عند رقم حموضة 5 pH، وعند حقن منطقة الجذور بفطر *P. aphanidermatum* واختبر تأثير 4.5، 5.5 رقم الحموضة فى منطقة الجذور هو 7.0 ، لم يظهر تأثير واضح لكثافة النمو اليسيليومى، مع احتمال وجود اختلافات فى استجابة الميسيليوم، انتاج الجراثيم السابحة والبيضية لهذا الفطر حسب الرقم الهيدروجيني المختبر(14)، ان النمو الميسيليومى غير ثابت وان الرقم الهيدروجيني pH الملائمة للنمو جنس *Pythium* ما بين 6–7 (2)، حيث تفضل فطريات جنس *Pythium* النمو على رقم حموضة اعلى من 7 (37).

اما تأثير الضوء على نمو الفطريات فقد اشار Lauter وآخرون (1998) الى ان الضوء الازرق يلعب دور كمؤشر بيئى تحت ظروف النمو والتطور الطبيعي في الفطريات، ولاحظ ان هيفات الفطر *Neurospora crassa* تتشعب اكثر في مزارع النمو المضاءة، اشار الى وجود جين cot–1 يتحكم فى طول خلايا الهيفات، وبين وجود علاقة بين تأثيرات الضوء والتشعب وظهور هذا الجين، الذى يعتقد ان وظيفته انتاج الجينات wc–1وwc–2 ، واكد Corrochano (2011) استجابة الفطريات والتأقلم مع العديد من الإشارات البيئية ومن بينها الضوء، حيث اشارت الابحاث فى

السنوات الحديثة الى تعريف للفطريات الاسكية، الفطريات البازيدية والفطريات الزيجوتية على اساس الاستجابة الضوئية، لأنها تحتوى على صفات جينية للاستجابة الضوئية،

عند دراسة تأثير الاشعة فوق البنفسجية (UV) على نمو الفطريات كان لها دور فى استحثاث المقاومة ضد الفطر الممرض فى النبات اكثر من التأثير الابادى للجراثيم الفطر (10) ، الا ان لهذه الاشعه فعل ابادى على جراثيم فطر *Alternaria alternate* (42)، حيث تؤدى التراكيز المنخفضة أو معدلات الجرعات المنخفضة للأشعة فوق البنفسجية الى التأثير الابادى لجراثيم الفطريات الممرضة المختبرة (11)، حيث فسر التأثير الناجم على ان المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية تودى الى خفض في نشاطات الانزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية (41).

المواد وطرق البحث

تأثير عوامل التغذية على نمو الفطر *P. oligandrum*

تأثير بيئات مختلفة على نمو الفطر وانتاجه للتراكيب التكاثرية:

حيث استخدمت فى هذه الدراسة 10 اوساط غذائية مختلفه منها: بيئات طبيعية هى : بيئة بطاطس دكستروز اجار(Potato dextrose agar(PDA ، بيئة malt extract agar (MA) ، بيئة دقيق الذرة اجار ، بيئة بطاطس جزر اجار و بيئة عصير الثمان خضروات اجار ، أما البيئات غذائية تركيبية لمختبرة فهى على التوالي: بيئة زابكس ، بيئة جلوكوز اسبارجين اجار (32)و بيئة modified Melin –Norktans agar، (44) بالإضافة الى الاجار المائي، بعد تحضير البيئات عقمت في جهاز الاتوكليف على درجة حرارة 121 °م، وضغط جوى 15 رطل/ بوصة 2 لمدة 20 دقيقة. لقياس كمية النمو بواسطة:

تقنية النمو الطولي: تم صب كل بيئة عل حدا في أطباق بترى المعقمة ذات قطر 90 مم ، ثم حقنت بقرص ميسيليومى لفطر *P. oligandrum* قطره 5 مم وعمره 3 ايام بواسطة الثاقب الفليني المعقم ليوضع فى مركز الأوساط الغذائية الحديثة الصلبة، تم قفل الأطباق باستخدام شمع البرافيلم parafilm وحضنت عند 25م في الظلام لمدة 3 ايام، تم قياس النمو الطولي بأخذ متوسط القطرين المتعامدين (مم).

وزن الميسيليوم الجاف: نمى الفطر المختبر على نفس البيئات السابقة ، بعد تعقيم هذه البيئات السائلة حقن كل طبق بقرص ميسليومى واحد قطره 5مم مأخوذ من اطراف مستعمرة بواسطة الثاقب الفليني، حضنت المزارع على فترات مختلفة وهى 3، 5، 7،

10 و15 يوم عند 25 م، وفى كل فترة يتم ترشيح النمو الميسيليومى واخذ الوزن الرطب له، ووزن ورقة الترشيح ليجفف في فرن الهواء الساخن (70م لمدة 24 ساعة) ثم يعاد وزنه، يؤخذ متوسط 3 مكررات لكل بيئة خلال الايام المختلفة، هذه القراءات بواسطة طريقة Fasidi و Olorunmaiye ، 1994.

تأثير البيئات على انتاج الاوجونيا: لحساب عدد الاوجونيا باستخدام المجهر الضوئي تم قراءة عدد الاوجونيا لكل بيئة بواسطة وضع 0.1 مل من معلق الاوجونيا (هرس 1 مليجرام نمو الميسيليومى طازج فى 10 مل ماء مقطر) على شريحة العد ، اما قطر الاوجونيا فتم قياسها باستخدام المجهر الموصول بكاميرا الرقمية microscope with digital camera (Olympus cX21fs1)

تأثير مصادر مختلفة من الكربون على نمو الفطر: تم اختبار مركبات كمصدر للكربون مثل السكروز، المالتوز والمانيتول كبديل للجلكوز فى بيئة جلكوز اسبارجين اجار، وتم قياس تأثير هذه المواد على النمو الطولي للفطر بعد 3 ايام. وفق لطريقة (25)، وتحت المجهر تم تسجيل وجود الاوجونيا في الاطباق للمعاملات المختلفة.

تأثير مصادر مختلفة من النتروجين على نمو الفطر: لدراسة تأثير مصادر مختلفة من النتروجين على النمو الميسيليومى للفطر، باستبدال مصدر النتروجين فى بيئة جلوكوز اسبارجين اجار بمصدر نتروجينى مثل الارجنين صورة اليسارية، او نترات الصوديوم (16)، بتراكيز مختلفة (0.05، 0.1، 0.15، 0.2، 0.25، 0.3، 0.4)% والشاهد هو بيئة المحتوية على الاسبارجين، وحضنت الاطباق عند درجة حرارة الغرفة (25م) ، وكررت التجربة مرتين.

تأثير العوامل البيئية على نمو الفطر:

تأثير درجة الحرارة على نمو فطر *P. oligandrum*:

درس تأثير درجة الحرارة على النمو الطولي والوزن الجاف، بأخذ قرص ميسليومى من فطر *P. oligandrum* قطره 5 مم من مزرعة عمرها 3 ايام وحقن على بيئات بطاطس الجزر الاجار وبطاطس اجار السائلة الموزعة فى اطباق وحضنت هذه الاطباق في حضانات على درجات حرارة مختلفة (5، 10، 15، 20، 25 و 30 م) وتم قياس النمو الطولي فى الاطباق الصلبة(مم) وذلك بعد 3 ايام ، في الأطباق السائلة، اخذ الوزن الجاف (بمليجم) للميسيليوم وقيس رقم الحموضة للمترشح الفطري بعد 5، 10 و15 يوم، بمعدل 4 اطباق/درجة حرارة.

تأثير الرطوبة النسبية على نمو فطر *P oligandrum*:

لتحديد تأثير الرطوبة النسبية على النمو الطولي والوزن الجاف، بأخذ قرص ميسليومى من فطر ***P. oligandrum*** قطره 5 مم من مزرعة عمرها 3 ايام وحقن على بيئات بطاطس الجزر الاجار وبطاطس اجار السائلة الموزعة فى اطباق ، لتوضع فى 5 desiccators تحتوى على التوالي محاليل مشبعة بالأملاح التالية: (كلوريد الكالسيوم CaCl 29.5%, نترات الامونيوم مع نترات الصوديوم 50% $NaNO_3$ +NH4NO3، كلوريد الصوديوم 75.5 NaCl، فوسفات البوتاسيوم 96% KH_2PO_4 ، اما الماء المقطر فأعطى رطوبة نسبية بنسبة 100%) في وجود اطباق خارج desiccators كشاهد، وحضنت هذه desiccators واطباق الشاهد عند درجة حرارة 25 م وتم قياس النمو الطولي في الاطباق الصلبة (مم) وذلك بعد 3 ايام ، في الأطباق السائلة، اخذ الوزن الجاف (بمليجم) للميسيليوم وقيس رقم الحموضة للمترشح الفطري بعد 5، 10 و15 يوم، بمعدل 4 اطباق/درجة حرارة.

تأثير الملوحة على نمو فطر *P oligandrum*:

تم اختبار تأثير تراكيز من ملح كلوريد على النمو الطولي والوزن الجاف، بأخذ قرص ميسليومى من فطر ***P oligandrum*** قطره 5 مم من مزرعة عمرها 3 ايام وحقن في مركز الاطباق الحاوية على بيئات بطاطس الجزر الاجار وبطاطس اجار السائلة و على نسب مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم (0، 0.5، 1 و 2%) ، وحضنت الاطباق لمدة 3 ايام عند درجة حرارة 25 م وتم قياس النمو الطولى فى الاطباق الصلبة (مم) ، فى الأطباق السائلة، اخذ الوزن الجاف (بمليجم) للميسيليوم بعد 15 يوم، وقدر نسبة الفقد مقارنة بالشاهد (وزن الشاهد– وزن المعاملة/ وزن الشاهد)*100 ، كما قيس رقم الحموضة للمترشح الفطري، بمعدل 3 اطباق/معاملة، واعيد التجربة مرتين (4) .

تأثير رقم الحموضة (pH) على نمو فطر *P oligandrum*:

تم ضبط رقم حموضة بيئة بطاطس جزر السائلة (3، 5، 7، 9 و12) بواسطة جهاز pH meter، باضافة هيدروكسيد الصوديوم NaOH (0.1 N) وحمض الهيدركلوريك HCl (1N) ، في وجود البيئة بدون أي معاملة (الشاهد)، وعقمت البيئة

المعاملة وغير المعاملة عند درجة حرارة 121م لمدة 20 دقيقة، وصبت في الاطباق بترى (90 مم)، منتصف الطبق، حقنت بقرص الفطر 5 مم /طبق، وحضنت عند 25 م ، اخذ الوزن الجاف (بمليجم) للميسيليوم بعد 7 أيام.

تأثير الضوء على نمو فطر *P. oligandrum*:

لاختبار تأثير الضوء على النمو الفطر تحت الظروف المعملية *in vitro* ، الفطر حقن على اطباق بترى تحوى 15 مل من بيئة بطاطس الجزر الصلبة والسائلة بقرص قطره 5مم مأخوذ من مزارع نامية نشطة نامية على بيئة دقيق الذرة اجار حضنت على 25م في الظلام. كل الاطباق حضنت تحت ظروف ضوئية مختلفة (24 ساعة ظلام، 12 ساعة ضوء/12 ساعة ظلام، 24 ساعة ظلام) بالاستعانة ب Lighting BulB) ,(200W، 4 مكررات لكل معاملة، اخذ قطر نمو الفطر على الاطباق الصلبة بعد 3 أيام، اما الوزن الجاف تم قياسه بعد 7 ايام.

تأثير الاشعة فوق البنفسجية UV radiation على نمو فطر *P. oligandrum*:

وضعت اطباق المحتوية على بطاطس جزر اجار المحقونة بالفطر على مسافة 30 سم على اطباق وعرضت للاشعة فوق البنفسجية بواسطة لامبة UV lamp–Mineralight) multiband UVSL–58 220 V. 50 Hz 12 A.)، على فترات على النحو التالى: 30 ثانية، 1.5 دقيقة، 3 دقائق، و6دقائق ، قياس قطر المستعمرة بعد 3 ايام من التحضين.

التحليل الإحصائي:

تجارب هذه الدراسة تمت باستخدام التصميم الكامل العشوائية completely randomized desigm (CRD)، أما تحليل الاختلاف باستعمال برنامج minitab 13، المقارنة بين المتوسطات بواسطة اقل فرق معنوي least significant difference (LSD 5%.

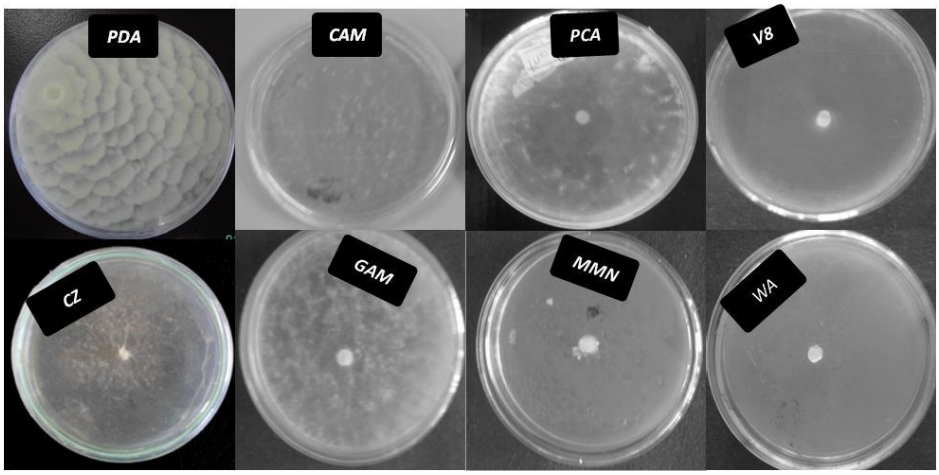
النتائج

تأثير عوامل التغذية على نمو الفطر *P. oligandrum*

تأثير بيئات مختلفة على نمو الفطر *P. oligandrum*:

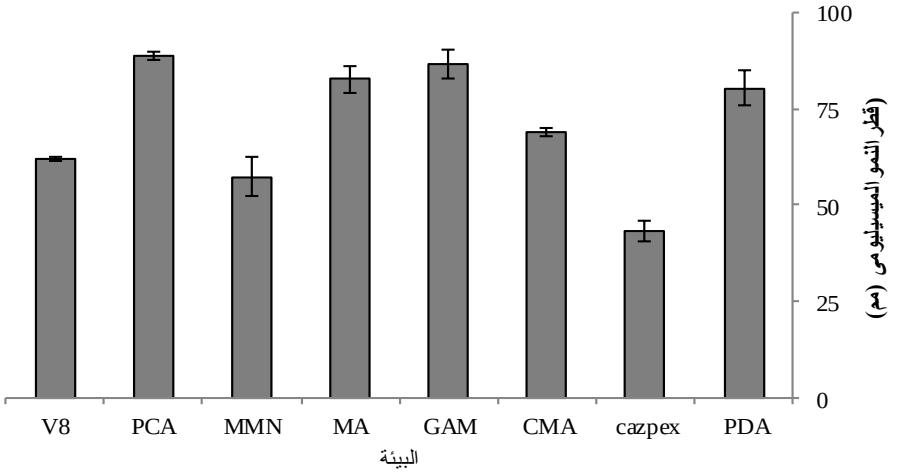
الشكل (1) يظهر تأثير البيئات المختلفة على النمو الميسيليومى لفطر *P. oligandrum* ، من خلال التباين في كثافة النمو الميسيليومى على كل البيئات

المختبرة حيث اعطت بيئتى بطاطس دكستروز اجار potato dextrose agar(PDA) وبيئة جلوكوز اسبارجين اجار(GAM) glucose aspargin agar, اعلى كثافة نمو ميسيليومى، حيث اخذ شكل زهرة الاقحوان على اطباق بطاطس دكستروز اجار، بينما كانت الكثافة متوسطة على بيئة بطاطس جزر اجار Potato carrot Agar (PCA)، ودقيق الذرة اجار وبيئة زابكس Czapeck–dox agar (Cz)، فى حين لم يظهر على سطح البيئة اى النمو الميسيليومى على بيئة modified Melin –Norktans agar (MMN) وبيئة ثمان خضروات اجار V8 juici agar وبيئة المالت اجار malt agar.



شكل (1) كثافة النمو الميسيليومى لفطر على بيئات مختلفة عند 25 م لمدة 3 أيام.

من نتائج هذه التجربة المبينة فى شكل (2) يتضح ان ميسيليوم فطر *P. oligandrum* ينمو بشكل مرضى على البيئات الصلبة المستعملة، حيث تغطى سطح البيئات بالكامل بعد 3 ايام، أما اسرع نمو سجل على بيئة بطاطس جزر اجار PCA وبيئة جلوكوز اسبارجين اجار GAM (89 مم و 86.9 مم) على التوالى، بينما على البيئتين المالت اجار malt agar وبيئة بطاطس دكستروز اجار potato dextrose agar (PDA) سجل (82.9 مم و 80.5مم) على التوالى، فى حين كانت البيئات زابكس دوكس اجار Czapeck–dox agar ، وبيئة MMN اقل نمو ميسيليومى بمتوسط (57.3 مم و 43.1 مم) على التوالى، كما سجل نمو ميسيليومى غير مرئي على بيئة ثمان خضروات اجار V.8 juici agar قطر النمو بمتوسط 62.0 مم، (LSD 5% 4.73).



الشكل (2) النمو الميسيليومى (مم) لفطر *P.oligandrum* على بيئات مختلفة عند 25 م فى الظلام لمدة 3 أيام.

تأثير البيئات السائلة على الوزن الميسيليومى الجاف:

نتائج تأثير البيئات المختلفة على الوزن الميسيليومى الجاف بعد3، 5، 7 ، 10 و 15 يوم تم تدوينها فى جدول (1)، اعطت بيئتى GAM و PCA أفضل نمو وأعلى نمو ميسيليومى جاف (7.5 مليجم و 6.8 مليجم) على التوالي، وتشير النتائج إلى وجود فروق معنوية مقارنة بالبيئات الأخرى المختبرة . يلاحظ من قياس الوزن الميسيليومى الجاف بعد 15 يوم من التحضين ان اعلى وزن على بيئة جلوكوز اسبارجين اجار وبيئة بطاطس جزر اجار وبيئة دقيق الذرة اجار (7.5، 6.8 و6.0 مليجم) على التوالي، و5.2 مليجم على بيئة ثمان خضروات السائلة، بينما اقل وزن على البيئات السائلة كان على بيئة زابكس دوكس السائلة، وبيئة بطاطس دكستروز السائلة (4.3 و 3.8 مليجم) على التوالى، فى حين بلغ وزن النمو الميسيليومى على بيئة MMN 2.8 مليجم،(LSD 5% =0.72). الشكل (3) يبين ان مزارع الفطر النامية على CAM و PCA اعطت اعلى انتاج اوجونيا مقارنة بالبيئات الاخرى، بينما كان اقل عدد سجل

للاوجونيا على بيئة مستخلص مالت اجارو بيئة جلوكوز اسبارجين اجار مقارنة ببيئتي دقيق الذرة اجار و بطاطس جزر اجار انتاج الاوجونيا كان اقل على زابكس دوكس اجار و بطاطس دكستروز اجار، فى حين سجل غياب كلى للاوجونيا على بيئة MMN medium ، وقد سجلت وجود فروق معنوية فى عدد الاوجونيا على البيئات المختلفة. كما أظهرت النتائج ان قطر الاوجونيا لا يتأثر بنوع البيئة النامي عليها الفطر.

جدول (1) الوزن الجاف الميسيليومى (مليجم) وانتاج الاوجونيا لفطر *P.oligandrum* لى بيئات سائلة مختلفة عند 25 °م

	الوزن الجاف الميسيليومى (مليجم)*					انتاج الاوجونيا	
البيئات	3 ايام	5 أيام	7 ايام	10 ايام	15 يوم	عدد الاوجونيا***	قطر الاوجونيا
MB	2±0.1**	2.5±0.1	3.5±0.4	3.7±0.4	3.8±0.1	2.57±1.4	24±3.8
CMB	2.3±0.1	3.5±0.3	3.1±0.3	3±0.4	6±0.6	6.36±3.62	25.4±3.7
PDB	1.7±	1.9±0	3±0.2	3.6±0.1	3.9±0.3	0.96±0.76	23±3.3
cazpex	1.9±0.2	2.3±0.1	3.3±0.1	3.6±0.1	4±0.3	0.533±0.34	25±4.8
PCB	1.9±0.1	2.3±0.2	3.1±0.2	3.7±0.3	6.8±0.3	3.76±0.54	23.5±3.4
GAM	1.8±0.1	2.2±0.2	3.4±0.3	4.3±0.2	7.5±1.35	2.39±0.74	23±2.7
MMN	1.5±0.1	2.1±0.1	2.6±0.1	2.7±0.1	3±0.1	0±0	–
V8	1.5±0.2	2±0.1	2.1±0.1	2.9±0.5	5.2±0.6	1.2±0	25.23±3.5

*means± SD ** 4redplicates *** number oogonia $*10^5/cm^2$

تأثير مصادر مختلفة من الكربون على نمو الفطر:

تشير النتائج المبينة بالجدول (2) الى تأثير مصادر مختلفة من الكربون على النمو الطولي، وانتاج الاوجونيا. حيث سجل اعلى قطر ميسليومى (9 سم) على البيئة الحاوية على سكروز، بينما انخفض النمو (3 سم) على الاطباق التى تحتوى مالتوز ومانيتول. و سجل فقد فى وزن الجاف للفطر النامي على بيئة جلوكوز اسبارجين اجار والتى تحوى مالتوز ومانيتول، بينما كانت نسبة الفقد في الوزن على الاطباق التي استبدل فيها الجلوكوز بالسكروز 0.0% . عند تقدير تواجد الاوجونيا على الاطباق ذات مصادر كربون مختلفة، سجل اعلى انتاج على الجلكوز والمانيتول بينما قل عدد

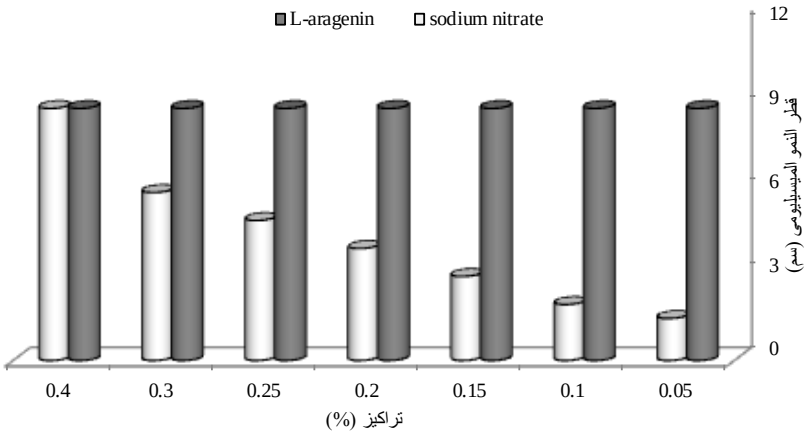
الاوجونيا على البيئة الحاوية سكروز، ولم يسجل وجود اوجونيا على الوسط الذى يحتوى مالتوز كمصدر كربوني.

الجدول (2) النمو الميسيليومى لفطر النامي على بيئة جلوكوز اسبارجين اجار محتوية مصادر مختلفة من الكربون

	النمو الميسيليومى لفطر ***Pythium oligandrum***		
مصادر الكربون	القطر (سم)	نسبة الفقد فى الوزن الجاف	وجود الاوجونيا
جلوكوز (الشاهد)	9±0		+++
مانيتول	3±0.46	66.7±5.07	+++
المالتوز	3±0.58	66.7±6.42	−
السكروز	9±0	0±0	+

تأثير مصادر مختلفة من النتروجين على نمو الفطر:

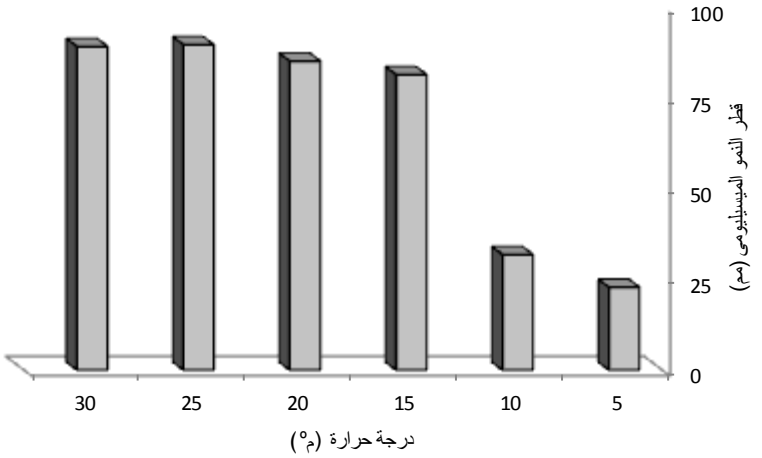
توضح النتائج المبينة بشكل (3) تأثير استخدام مصادر مختلفة الارجينين من النتروجين على نمو الفطر، هو أفضل مصدر نتروجيني مقارنة بنترات الصوديوم. حيث أعطت جميع التراكيز المختبرة نفس تأثير الشاهد اى انه التركيز 0.05 كان كافيا لنمو الفطر، ، في حين ازداد نمو الفطر بزيادة تركيز نترات الصوديوم، فقد أعطى 9 سم عند أعلى تركيز (0.4%). بينما لم يظهر تركيز 4% لكلا المركبين اى أعراض سمية على الفطر



الشكل (3) النمو الميسيليومى لفطر النامى على بيئة جلوكوز اسبارجين اجار محتوية مصادر مختلفة من النتروجين

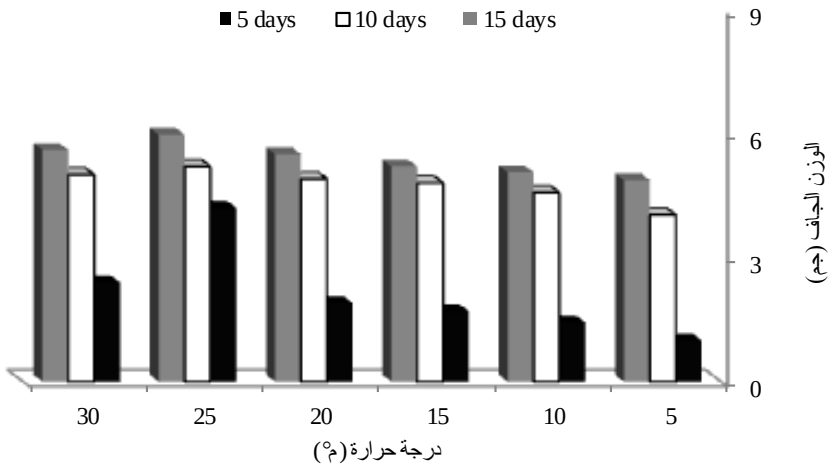
تأثير العوامل البيئية على نمو الفطر:

تأثير درجة الحرارة: تم تقييم تأثير درجات الحرارة المختلفة (5، 10، 15، 20، 25 و 30 م) على نمو الطولي لفطر *P. oligandrum*، نتائج هذه الدراسة أظهرت أن أفضل نمو طولي في المدى الحراري بين 15 الى 30م ، وان الدرجة المثلى للنمو هي درجة 25 م حيث وصل قطر نمو الفطر إلى 89.5 مم على بيئة بطاطس جزر اجار، إلا أن درجة 30 م كانت ملائمة لنمو هذا الفطر(الشكل 4).



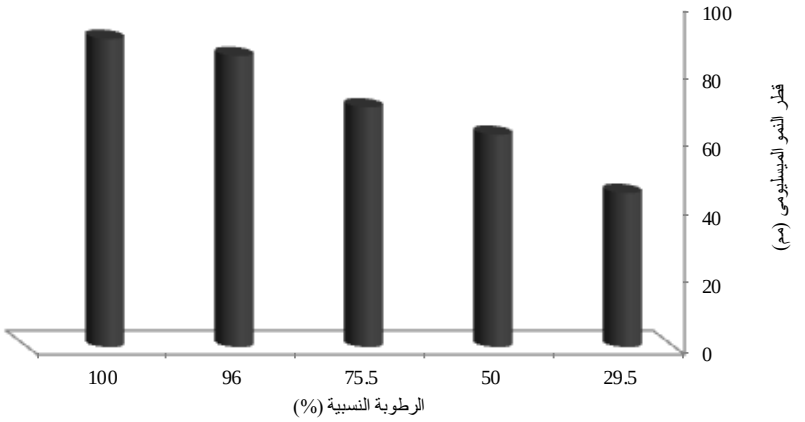
شكل (4) تأثير درجة الحرارة على نمو (قطر المستعمرة) لفطر *P. oligandrum* النامي على بيئة بطاطس جزر اجار PCA medium (3 مكررات لكل معاملة).

وعند قياس الوزن الجاف بين الشكل (5) وان أعلى وزن جاف سجل عند درجة حرارة 25م بعد 5، 10 و15 يوم على بيئة بطاطس جزر اجار (4.2، 5.2 و6) مليجم على التوالي.



شكل (5) تأثير درجة الحرارة على الوزن الميسيليوم الجاف لفطر *P. oligandrum* النامى على *بيئة بطاطس دكستروز السائلة* PCB

تأثير الرطوبة النسبية على نمو فطر *P. oligandrum*: عند قياس مدى واسع من مستويات الرطوبة(29.5%, 50.0%, 75.5% 96 and 100%) لتحديد تأثيرها على النمو الطولي للفطر أشارت النتائج المبينة بالشكل (6) إلى أنه كلما زادت الرطوبة النسبية ازداد معها النمو الطولي ، وان الرطوبة النسبية 100% هي المثلى والتي ازداد معها الميسيليوم على بيئة بطاطس جزر اجار تحت الظروف المعملية.



شكل (6) تأثير الرطوبة النسبية على نمو الميسيليومى لفطر *P. oligandrum* النامى على بيئة بطاطس جزر اجار PCA

تأثير الملوحة على نمو فطر *P. oligandrum*: النتائج فى جدول (3) أشارت إلى انه لا توجد فروق معنوية بين التراكيز ملح كلوريد الصوديوم المختبرة فى المدى 0-1%، حيث اعطى نمو ميسيليومى غطى سطح الطبق بيئة بطاطس جزر اجار بعد 3 ايام تحضين، الا انه عند زيادة تركيز الملح الى الى 2% ينخفض النمو الميسيليومى الى 22.67 مم. تأثير التركيز المختلفة من كلوريد الصوديوم على نسبة الفقد فى الوزن الجاف للميسيليوم، حيث أشارت النتائج الى ان الفقد فى الوزن الجاف ازداد بزيادة التركيز من 0.5 الى 1% ، حيث سجل 2.7 و 2.4 مليجم على التوالي، بينما انخفض الى 1.97 عند تركيز 2%، مقارنة بالشاهد (بدون كلوريد الصوديوم) 4.3 مليجم، على بيئة بطاطس جزر ، وقد بلغ نسبة الفقد فى الوزن الجاف للميسيليوم الفطر عند هذا التركيز 54.26%. نتائج أشارت أيضا إلى أن رقم حموضة البيئة PCA السائلة المحقونة بالفطر *P. oligandrum* بدون ملح كلوريد الصوديوم (pH 7.18)، بينما البيئة المعاملة بإضافة تركيز من ملح NaCl ، سجل انخفض فى رقم الحموضة بزيادة تركيز الملح.

جدول (3) تأثير تراكيز مختلفة من ملح NaCl على pH بيئة PCA لفطر *P.oligandrum* عند 25 م فى الظلام.

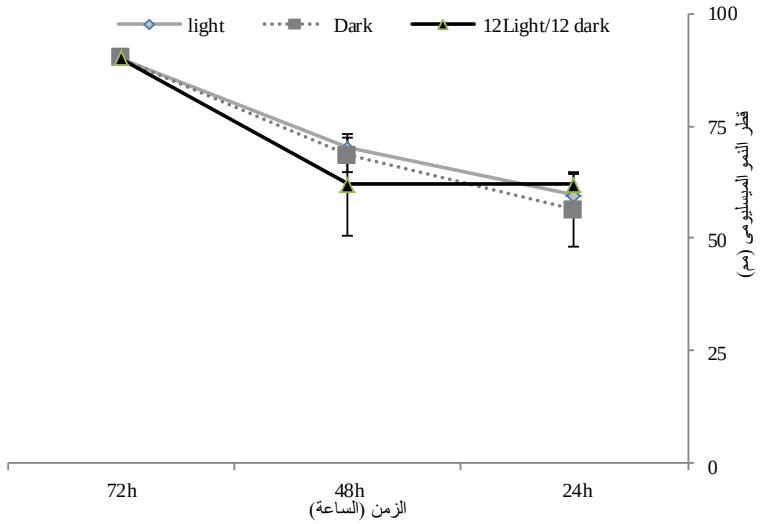
تركيز الملح (%)	قطر النمو (مم)	الفقد فى الوزن (%)	pH
0	09		7.18
0.5	87.5	36.4	7.07
1	85.5	43.4	6.16
2	22.7	54.2	5.6

تأثير رقم الحموضة (pH) على نمو فطر *P oligandrum*: تشير النتائج فى جدول (4) الى تأثير اضافة تراكيز من حمض الهيدروكلوريك او الصودا كاوية الى بيئة بطاطس جزر السائلة للحصول على (مستويات من رقم الحموضة من 3 الى 12)، اوضحت النتائج وجود اختلافات معنوية فى الوزن الجاف للفطر، وقد سجل تثبيط معنوي عند زيادة التراكيز، وأن رقم ال حموضة **pH** 7 هي التي اعطت اعلى وزن جاف 3.04 مليجم.

جدول (4) تأثير مستويات مختلفة من pH على النمو الميسيليومى وpH البيئة بعد 7 ايام و الوزن الجاف (مليجم) لفطر *P. oligandrum النامى على بيئة* PCA (التحضين فى الظلام عند 25 م، 3 مكررات)

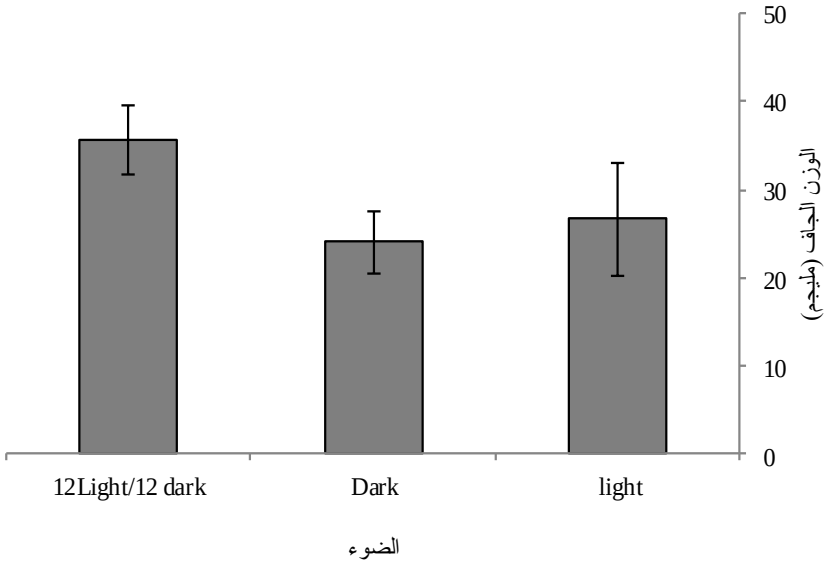
المعاملات	الوزن الجاف (مليجم)	pH
Cont	2.2 ± 0.0.12	7.18 ± 0.04
pH 3	2.1 ± 0.1	3.22 ±0.08
pH 5	1.92 ± 0.16	6 ±0.07
pH 7	3.04 ± 0.74	7.76 ±0.2
pH 9	2.27 ±0.32	8.39 ±0.1
pH 12	1.73 ± 0.15	8.9 ±0.14

تأثير الضوء على نمو فطر *P. oligandrum*: البيانات المبينة في شكل (7) اشارت الى ان الفطر النامي على بيئة بطاطس جزر اجار تحت ظروف ضوئية مختلفة ، لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين هذه الظروف بعد 24، 48 و 72 ساعة تحضين، و اى ان هذا الفطر لم يتأثر بوجود او غياب الضوء



شكل (7) تأثير ظروف ضوئية مختلفة على قطر النمو الميسيليومى (مم) لفطر *P.oligandrum* *على بيئة* PCA عند درجة حرارة 25م فى فترات تحضين مختلفة.

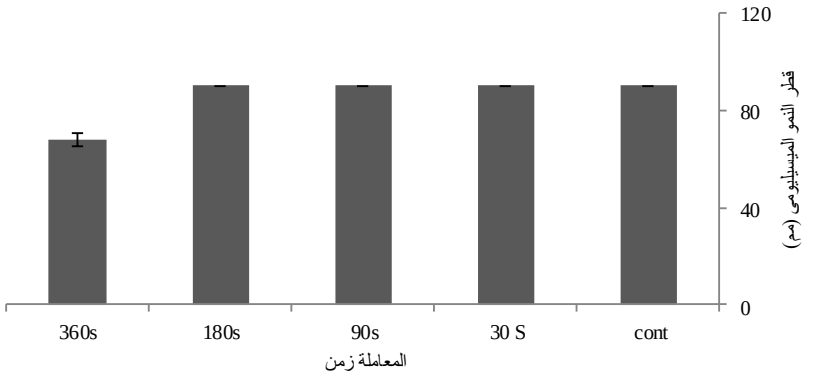
اما نتائج شكل (8) اشارت الى زيادة في الوزن الجاف لفطر النامي على بيئة بطاطس جزر السائلة عند 25 م تحت ظروف 12 ساعة ضوء/ 12 ساعة ظلام، حيث سجل 36.4 مليجم، بينما انخفض الى 24.0 مليجم في الظلام الطلق.



شكل (8) تأثير أثير ظروف ضوئية مختلفة على الوزن الجاف (مليجم) لفطر *P. oligandrum* على بيئة PCA عند درجة حرارة 25ºم في فترات تحضين مختلفة.

تأثير الاشعة فوق البنفسجية UV radiationعلى نمو فطر *P oligandrum*

اشارت نتائج هذه التجربة الموضحة في الشكل (9) الى عدم وجود تأثير معنوي للأشعة فوق البنفسجية على عوامل نمو الفطر عند تعرضه 30 ثانيه الى 180 ثانية، بينما عند تعرض الفطر لفترة تصل الى 360 ثانية ادى الى خفض النمو الميسيليوم لفطر *P. oligandrum*



شكل (8) تأثير الاشعة الفوق البنفسجية على النمو الميسيليومى لفطر *P.oligandrum*

المناقشة

من النتائج ايضا نجد ان تنقية فطر يتم بإضافة مضاد الحيوي الى البيئة ويرجع ذلك الى عدم مقدرة الفطر على انتاج الاسترولات المسئولة على تثبيط الفطريات بواسطة المضادات الحيوية، حيث دخول الاسترولات الى داخل انواع *Pythium* يودى الى فرط الحساسية ضد المضادات الحيوية، والنتيجة تثبيط النمو، (18) ، (20)، (21).

بينت النتائج وجود زيادة معنوية فى نمو الفطر وانتاج الاوجونيا والجراثيم البيضية على بيئة جلوكوز اسبارجين اجار ويعزى ذلك الى مكونات البيئة التي تحوى مصادر كربون، ومصادر نتروجين، الفيتامينات، (32) و (34) وفى هذه الدراسة لم يتم انتاج الجراثيم البيضية الا على بيئة جلوكوز اسبارجين اجار عند تحضينها على 25م لمدة 3 اسابيع في الظلام، يرجع ذلك لاحتواء البيئة على الكلسترول (6) وقد وجد ان التراكيب الجنسية لأنواع *Pythium* لا تتكون الا عند اضافة الاسترولات الى البيئة(43)، وذلك لان انواع *Pythium* غير قادرة على انتاج الاسترولات،

الفطريات تحتاج مصادر مختلفة من الكربون والنتروجين لأجل تطورها الفسيولوجي (40) ، وفى هذه الدراسة تأثير التغذية مثل مصادر الكربون ومصادر

النتروجين على نمو الفطر وانتاج التراكيب التكاثرية، أكدت النتائج على ان لمصادر الكربون تأثير على النمو الطولي، وان اعلى نمو ميسيليومى سجل على بيئة المحتوية للسكروز (9 سم)، بينما اقل نمو (3 سم) كان على البيئة الحاوية للمالتوز و المانيتول كمصدر كربوني، وكأفضل داعم للنمو وهذه النتيجة تتفق مع (45). عند تحليل مصادر الكربون المستعملة فانه يوفر دليل على مقدرة العشيرة الى التأقلم مع عملياتها الايضية، وبالتالي يدخل فى المركبات التخليقية للفطريات البيضية (25) ، في هذه الدراسة اتضح عدم مقدرة فطر على انتاج الاوجونيا oogoina على الاطباق التي تحوى سكر المالتوز كمصدر كربوني.

كما بينت النتائج ان الارجنين في صورته اليسارية افضل مصدر نتروجيني مقارنة بنترات الصوديوم وهذه النتيجة توصل لها (46)، ويرجع ذلك الى ان نترات الصوديوم فقيرة بالنتروجين اللازم لنمو فطر *Pythium* مقارنة بالاسبارجين كشاهد فى بيئة جلوكوز اسبارجين اجار، كما وجد ان فطر *P. aphanidermatum* لم يستخدم النترات بسبب انها تؤثر على رقم حموضة البيئة النهائي، وقد لوحظ في وجود النترات يزداد رقم الحموضة pH (16),، ويرجع التأثير السام للنترات الى حامضية البيئة (29).

كما أوضحت نتائج هذه الدراسة ان للعوامل البيئة تأثير على نمو الفطر *P. oligandrum* (3) ، فقد كانت الدرجة المثلى لنمو الفطر 25م ، وقد سجل عند هذه الدرجة اعلى وزن جاف للفطر(6) .

كما بينت النتائج ان زيادة الرطوبة النسبية يؤدى الى زيادة نمو الفطر، وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره (1) (30) (48) و (36) ويفضل هذا الفطر *Pythium* الرطوبة العالية (46).

لم تسجل وجود فروق معنوية بين التراكيز المنخفضة لملح كلوريد الصوديوم المضاف الى البيئة فى المدى من 0.5 – 1%، وذلك لان هذا الملح يلعب دور في نمو الفطر وانتاج الجراثيم البيضية لبعض انواع فطر *Pythium* لذا ليس للتركيزات الملوحة المنخفضة اى تأثير على نمو الفطر (47)، وقد وجد ان التركيزات 0.1 – 0.5% لها تأثير على النمو الميسيليومى وانتاج الجراثيم السابحة لثلاث انواع من *Pythium* (1)، فى حين وجد ان التركيزات العالية 2% تؤدى الى خفض النمو الميسيليومى، ويرجع ذلك الى تأثير ايون الصوديوم الذى ادى الى التثبيط المعنوي لإنتاج الاسبورانجيا في الفطريات البيضية (37)

كما سجل في هذه الدراسة تثبيط في الوزن الميسيليومى الجاف لفطر عند زيادة تركيز حمض الهيدروكلوريك او الصودا الكاوية في البيئة، وقد اعطى رقم حموضة 7 اعلى وزن جاف، و وجد ان بعض الكائنات الدقيقة ينخفض نموها الميسيليومى اعتماد على رقم حموضة البيئة (19) ولذا فان الحموضة لها تأثير على الوبائية الناتجة عن الفطر الممرضة لنبات وتزداد معنويا في المدىpH 4.0 -5.5 (7).

Physiological studies on growth and production of *Pythium oligandrum*

N. A. Mohamed , Z. I. El-Gali, and A. A. Akila

Dept. of Plant Protection, Fac. Of Agriculture, Omer Al-Mukhtar Univ. El-Beida, P.O. 919

. Email: Z_Elgali@yahoo.com

Different media (potato carrot agar (PCA) and Glucose Asparagin agar (GAM) compared to V8 juici agar (V8), Corne meal agar (CMA), Malt extract (MA), Melin –Norktans agar (MMN) and Czapeck-Dox agar), carbon sources(, glucose, mannitol, and sucrose), and nitrogen sources (L-aragenin and sodium nitrate), temperature (5, 10, 15, 20 25 and 30C°), RH% (29.5%, 50%, 75.5, 96%, 100% relative humidity), different concentrations of sodium chloride NaCl (0.5, 1 and 2%), pH (3, 6, 9 and 12),different condition light (24 h dark, 24 h light,12dark and 12 h light), and UV irradiation exposure (30S, 90S, 180S and 360S), were tested for best mycelium growth, dry weight and oogoina production. The best mycelium growth measured diameter by colony diameter (89 mm), oogonia production (6.36oogonia /ml) was obtained in CMA medium enriched, with

sucrose at (9mm), araginine (9mm) adjusted to pH 7 (3.04 ± 0.74 mg dry weight) and incubated at constant temperature (25ºC) and 100% RH%. However, the best resulte for oospores (1 x10^7 oospora/ml) was obtained in GAM medium, and high dry weight (7.5 mg) was obtained at low RH (75.5%).Effect of different concentrations of sodium chloride, mean dry weight at 0.5 and 1% was 2.7mg and 2.4mg respectively mm reducing to 1.97 at 2%

On the other hand light did not induce any significant different in growth while the increasing UV irradiation exposure from 30 S-180S and increasing the UV to 360 S stopped the mycelium growth.

Key word: *P*ythium *oligandrum,* fungal growth, enverimental factors, Physiological studies

References

1-Abdelzaher H. M. A, Elnaghy, M. A., Fadl-Allah, E. M., and Zohri, S. S. (1997). Some physical and chemical factors affecting asexual reproduction of three *Pythium* spp. Cryptogamie, Mycology. 18(3):267-277.

2-Alhussaen, K. M. (2012). Effect of soil acidity on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Fusarium oxysporum* on tomato plants. J. biolo. Sci. :1727-3048.

3-Allison, L. and Hornor, Jack. (2012). Vermicompost suppression of *Pythium aphanidermatum* seedlingdisease: practical applications and an exploration of the mechanisms of

disease suppression Degree of Doctor of Philosophy Faculty of the Graduate School Cornell University 143pp

4-Al-Sadi, A., Al-Habsi, N. A., Al-Kiyumi, K. S. and Alsaid, F. A. (2010). Effect of Salinity on growth, reproduction and pectolytic enzyme production by *Pythium aphanidermatum* :A Serious Soil Borne Pathogen of Vegetable Crops in Oman A Monograph on Management of Salt-Affected Soils and Water for Sustainable Agriculture, 95-98.

5-Al-sadi, A. M., deadman, M. L., Asaid, F. A., and Khan, (2008). First report of P. splendens associated with sever wilt of muskmelon (Cucumis melo) in Oman. Plant Pathol. 92:31

6-Al-Sheik, H. and Abdelazher, H. M. A. (2010). Differentiation between two isolates of *P.ultimum* Var : *ultimum* isolated from disease plants in two different continents, J. biolo. Sci. 10 (4) :306 -3145.

7-Bar-Yosef, B., Kritzman, G., Levkovich, I. and Kläring H. P. (2008). Effect of nitrogen source and concentration in recirculated nutrient solution on incidence of cucumber mortality by *Pythium* and *Fusarium* crown rot. Acta Hort. 801, 1499-1505.

8-Benada, J., and Pospisil, A. (1999). Antagonistic microorganisms & medium moisture as Possible sources of varation in common bunt (Tilletia tritici) incidence. Plant Pro. Sci., 35 (4) 121 :123.

9-Bres, W. and Sztuka, A. (2004). Influence of Polyversum on micro nutritional status of selected species of grass. Folia Universitatis Agriculture Stetinensis, Agriculture, 94:9-13.

10-**Chalutz, E., Droby, S., Wilson, C. L. and wisniewski, M. E. (1992).** UV – induced resistance to post harvest disease of citrus fruit. J. Photochem. & Photobiol. 15 : 367 -374

11-**Cia, P., pascholati, S. f., Benato, E. A., camili, E. C. and Santos, C. A. (2007).** effect of gamma &uv c irradiation of the postharvest control of papay anthracnose. postharvest. Biol. & Technol. 43 :366 -373.

12-**Corrochano, L. M. S. (2011).** Fungal photobiology: a synopsis.IMA fungus.2:25-28.

13-Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. (1985). *Basic Plant Pathology Methods*. USA, CRC Press.

14-**Dimova, M. A., Buttner, C., Gabler, J., Grosch, R., Bar-Yosef, B. and Klring,H. P. (2010).** Control of root zone pH is not effective in preventing *Pythium aphanidermatum* disease in cucumber. J.. Plant Dis..Pro. 117: 244–247.

15-**Griffin, D. M. (1958).** Influence of pH on the incidence of damping- off. T Brit. Mycol. Soc. 41: 483-490.

16-**Grover, R. and Sidhu, J. (1966).** effect of nitrogen sources on the growth of *Pythium aphanidermatum (*Edson). Fitz. 231-237.

17-**Gunda, M. and Singara-Charya, M. (2013).** physiological factors influencing the production of antibacterial substance by fresh water Actinobacteria. J. Recent adv.. Appl. Sci. 28:55-62.

18-**Haskins, R. H., Tulloch,A. P., Wu, L. C. and Micetich, R. G. (1946).** Steroides and the stimulation of sexual reproduction of species of *Pythium* . Can. J. M icrobiol. 10 : 187 -195.

19-Heflich, G. and Ruppel, S., (1994). Growth stimulation of pea after inoculation with associative bacteria. Microbiol. Res. 149: 99-104.

20-Hendrix, J. W. (1964). Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. Sci. 144 :1028.

21-Hendrix, J. W. (1965). Influence of sterol on growth andreproduction of *Pythium* and *phytophthora*. Phytopathology. 55 :790 -797.

22-Hendrix, J. and Lauder, K. (1966). Effects of polyene Antibiotics on growth and sterol-induction of Oospore formation by *Pythium periplocum*. J. Gen. Microbio.l44:115-120.

23-Holmes, K. A., Nayaga, S. D. and Craig, G. D. (1998). Factors affecting the control of *Pythium ultimum* damping-off of sugar beet by *Pythium oligandrum*. Plant Pathol. 47:516-522.

24-Khalil, S., Alsanius, B. W.(2006). Biochemical characterization of biocontrol agents used for control of root pathogens. Commun Agric. Appl. Biol. Sci. 71 (3 Pt B): 979-84.

25-Khalil, S. and Alsanius, B. W. (2009). Utilisation of Carbon Sources by *Pythium, Phytophthora* and *Fusarium* Species as Determined by Biolog Microplate Assay. The Open Microbiol. J. 3: 9-14

26-Khalil, S. (2002). Microflora in the root environment of hydroponically grown tomato: Methods for assessment and effects of introduced bacteria and *Pythium ultimu*. Thesis, Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, ; ISBN 91-576-5787-4.

27-Lauter, F. R., Marchfelder, U., Russo, V. E. A., Yamashiro, C. T., Yatzkan, E. and Yarden, O. (1998). Photoregulation of cot-1, a Kinase-Encoding Gene Involved in Hyphal Growth in *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology 23, 300-310.

28-Lévesque, C. A. and De Cock, A. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycol. Res 108 : 1363 -1383.

29-Lilly, V. G. and Branett, H. L. (1951). Physiology of fungi. McGraw Hill, N. Y.

30-Lodhi, A., Shahzad, S. and Ghaffar. A. (2005). A new report of *Pythium oligandrum* from Pakistan Pak. J. Bot., 37: 487-491.

31-Martin, F. N. (1995). *Pythium*. In : Kohmoto K, Singh US, Singh RP (Ed.), Pathogenesis and Host Specificity in plant Diseases ; Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases, Elsevier, Oxford, 17 – 36.

32-McQuilken, M. P., Whipps, J. M. and Cooke, R. C. (1992). Nutritional and environmental factors affecting biomass and oospore production of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. Enzyme and Microbial Technol. 14: 106-111.

33-Miller, P. M. (1955). V8juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. Phytopathology 45:461-462.

34-Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M., Fromentin, J., Béno, N., Houot, V., Milat, M. L. and Blein, J. P. (2007). Defense responses in grapevine eaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* train or its elicitin, oligandrin, to roots. Phytopathology 97:611-620.

35-Monjdal, S. N. and Hyakumachi, M. (2000). Soil factors affecting carbon loss and pathogenecity of oospores of *Pythium aphanidermatum*. Soil Biol. Biochem. 32:111-118.

36-Mukundi, N. D. S., Okoth, A. and Mibey, R. K. (2009). Influence of land use on the distribution and diversity of *Pythium* spp. Tropical and Subtropical Agro ecosystems, 11: 347 – 352.

37-Nzungize, J. R., Ugabe, F. L., Busogoro, J. P. Baudoin, J. P. (2012). *Pythium* root rot of common bean:biology and control methods. Areview. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 16:4.5-4.13.

38-Pahlavani, M. H., Razavi, S. E., Kavusi, F. and Hasanpoor, M. (2009). Influence of temperature and genotype on *Pythium* damping-off in safflower.Journal of Plant Breeding and Crop Science 1:001-007.

39-Panova, G. G., Grote, D. and Kläring, H. P. (2004). Population dynamics of *Pythium aphanidermatum* and response of tomato plants as affected by root-zone temperature. J Pl Dis Protec 111, 52-63.

40-Pearson, R. C. and Hall, D. H. (1975). *Phytopathology,, 65,* 2, 1352-1359.

41-Pombo, M. A., Dotto, M. C., Martinez, G. A. and Civello, P. M. (2009). UV – cirradation delays strawberry fruit softening & Modifies the experession of genes involved in cell wall degradation. Postharvest Biol. &Technol. 51 : 141 : 148

42-Prusky, D., Kobiler, I., Akerman, M. and Miyar, I. (2006). Efect of acidic soulation & acidic prochlorot on the control of

posthaverst decay by Alternaria alternate in mango &persimmon fruit postharvest Biol. &Technol. 42 :134 -141.

43-Schlosser, E. and Gottlieb, D.(1966). Sterols and the sensitivity of Pythium species to filipin. J. Bacteriloogy 91.

44-Sharma, R., Rajak, R. C. and Pandey A. K. ,(2010). Evidence of antagonistic interaction between rhizospher &mycorrhizal fungi associated with Dendro calamus stricus (Bamboo), Journal of Yeast & fungal Research 17: 112 -117.

45-Suleiman , M .N . , Emua , and Ayodele , S . M , (2011). Growth and physiological studies on root rots fungus of cowpea , European J. Experimental Biol. ,1: 181 – 188 .

46-Suleiman , M.N., Emua, and Ayodele, S. M, (2011). Growth and physiological studies on root rots fungus of cowpea, European J. Experimental Biol.,1: 181 – 188.

47-Triky-Dotan, S., U. Yermiyahu, J. Katan and A. Gamliel. (2005). Development of crown and root rot disease of tomato under irrigation with saline water. Phytopathology.95: 1438-1444.

48-Yudiarti, T., D.F. Jensen, and J. Hockenhull, (2006). Isolation and identification of *Pythium* from soil J. Indon. Trop. Anim. Agric. 31:141-146