

تاکسونومی مولکولی و ریخت‌شناختی گونه‌های *Pythium* جدا شده از خاک در آذربایجان غربی*

دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۸ / پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۹

فرزانه بدلی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
مسعود ابرین‌بنا: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی ۱۶۵، ارومیه، ایران
جعفر عبداله‌زاده✉: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، صندوق پستی ۴۱۶، سنندج، ایران
 (j.abdollahzadeh@uok.ac.ir)
اسماعیل خالدی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

چکیده

هدف از انجام این تحقیق، شناسایی مولکولی و ریخت‌شناختی تعداد ۲۰۰ جدایه *Pythium* جمع‌آوری شده از خاک‌های زراعی و باغی در استان آذربایجان غربی طی سال‌های ۹۱ و ۹۲ بود. براساس داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی (توالی ITS و coxI)، ۱۴ گونه از این جنس متعلق به شش تبار A, D, E, F, I و J شناسایی شدند. از این میان گونه *P. ornamentatum* از تبار D, *P. nodosum* از تبار J و *P. stipitatum* از تبار E برای فلور قارچی ایران جدید هستند. داده‌های مولکولی قادر به تفکیک گونه‌های *P. glomeratum*, *P. ornamentatum* و *P. viniferum* از گونه‌های نزدیک نبود و شناسایی آن‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی انجام شد. توصیف مفصل برای گونه‌های *P. minus*, *P. ornamentatum*, *P. nodosum* و *P. stipitatum* نیز ارائه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آمیکوتا، ایران، کپک آبی، فیلوژنی، *Pythium*

Molecular and morphological taxonomy of *Pythium* species isolated from soil in West Azarbaijan province (N.W. Iran)

Received: 07.06.2016 / Accepted: 29.06.2016

Farzaneh Badali: Graduated MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, P.O. Box 165, Urmia, Iran

Masoud Abrinbana: Assistant Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, P.O. Box 165, Urmia, Iran

Jafar Abdollahzadeh✉: Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, P.O. Box 416, Sanandaj, Iran (j.abdollahzadeh@uok.ac.ir)

Esmail Khaleidi: Graduated MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, P.O. Box 416, Sanandaj, Iran

Summary

Pythium is a fungus-like genus with worldwide distribution that is found in most terrestrial and aquatic ecosystems. It is a species-rich genus contains important plant pathogenic species. Little is known on the systematics of *Pythium* in West Azarbaijan province (N.W. Iran). Thus, the aim of this study was to identify 200 isolates collected from different cultivated soils of West Azarbaijan province during 2012–13. Based on morphological and molecular (ITS and coxI sequences) data, 14 *Pythium* species from six clades, A, D, E, F, I and J, were identified. Of these, *P. ornamentatum* from clade D, *P. nodosum* from clade J and *P. stipitatum* from clade E are new records for Iran mycobiota. Molecular data failed to separate *P. glomeratum*, *P. ornamentatum* and *P. viniferum* from closely related species and they were identified based on morphological features. Detailed description is presented here for *P. minus*, *P. ornamentatum*, *P. nodosum* and *P. stipitatum*.

Keywords: Oomycota, phylogeny, *Pythium*, water mold

* بخشی از پایان‌نامه نگارنده اول به راهنمایی دکتر مسعود ابرین‌بنا و جعفر عبداله‌زاده ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

مقدمه

جنس *Pythium* Pringsheim از نظر تاکسونومیک، به تیره *Pythiaceae*، راسسته *Peronosporales*، رده *Peronosporomycetes*، شاخه *Oomycota* و سلسله *Straminipila* تعلق دارد (Beakes et al. 2014). اغلب گونه‌های جنس *Pythium* دارای زندگی پوده‌رستی در خاک هستند، اما تعدادی از آن‌ها بیمارگرهای مهم گیاهان می‌باشند و در شرایط محیطی مناسب خسارات قابل توجهی را به محصولات زراعی و گلخانه‌ای وارد می‌کنند (Martin & Loper 1999). همچنین، برخی از گونه‌ها می‌توانند در تعدادی از موجودات مانند ماهی‌ها، جلبک‌ها، خرچنگ‌ها و لارو پشه‌ها بیماری ایجاد کنند (Su 2006, Miura et al. 2010, Kawamura et al. 2005). گونه *P. insidiosum* نیز به عنوان بیمارگر پستانداران شناخته شده است که عامل بیماری پیتوزیس در اسب، سگ و گربه می‌باشد (de Cock et al. 1987). علی‌رغم وجود گونه‌های بیمارگر گیاهی و جانوری، تعدادی از گونه‌های این جنس انگل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و محرک رشد گیاهان میزبان هستند و در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند (Ali-Shtayah & Saleh 1999, Jones & Deacon 1994, Lifshitz et al. 1984, McLeod et al. 2009, Ribeiro & Butler 1995).

شناسایی و تاکسونومی گونه‌های جنس *Pythium* به طور سنتی، براساس ریخت‌شناسی اندام‌های جنسی و غیرجنسی انجام گرفته است. بدین منظور، از صفاتی مانند شکل و اندازه اسپورانژیوم و آگونیوم، وسعت آسپور درون آگونیوم، تعداد و موقعیت آنتریدیوم‌های مرتبط با آگونیوم استفاده شده است (Dick 1990, van der Plaats-Niterink 1981). تنوع اندازه و شکل اندام‌ها در جدایه‌های مربوط به یک گونه، هم‌پوشانی صفات ریخت‌شناختی در بین گونه‌ها، دگرتمال بودن برخی از گونه‌ها و وجود جدایه‌های عقیم از نظر جنسی، شناسایی ریخت‌شناختی و تعیین مرز گونه‌ای در این جنس بسیار مشکل است (Levesque & de Cock 2004, Matsumoto et al. 1999). از طرفی، نتایج مطالعات مولکولی نیز نشان داده که بعضی از گونه‌های شناسایی شده براساس صفات ریخت‌شناختی، کمپلکس گونه‌ای هستند (Robideau et al. 2011). بنابراین، امروزه برای شناسایی گونه‌های *Pythium* توالی‌های DNA به همراه خصوصیات ریخت‌شناختی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعات مولکولی اولیه در زمینه تاکسونومی گونه‌های جنس مذکور از توالی ناحیه

در نخستین مطالعه جامع روابط فیلوژنتیکی گونه‌های *Pythium* با استفاده از توالی‌های ITS و DNA زیرواحد بزرگ ریبوزومی (28S rDNA)، این جنس به ۱۱ تبار (Clade) A تا K تقسیم شد (Levesque & de Cock 2004). مطالعات بعدی نیز مشخص نمود که گونه‌های تبار K از لحاظ فیلوژنتیکی و ریخت‌شناختی حدواسط بین *Pythium* و *Phytophthora* هستند و به همین دلیل به جنس جدید *Phytopythium* منتقل شدند (Bala et al. 2010, de Cock et al. 2015).

با توجه به اهمیت گونه‌های جنس *Pythium*، در ایران نیز مطالعاتی در زمینه شناسایی گونه‌های *Pythium* در برخی استان‌ها انجام گرفته و تاکنون ۴۴ گونه، دو وارسته و پنج گروه (غیرجنسی) معرفی شده است (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Ershad 2009, Ershad 2015). از استان آذربایجان غربی گونه‌ها و گروه‌های *P. oligandrum*، *P. deliense*، *P. aphanidermatum*، *Pythium*، *P. ultimum*، *P. paroecandrum*، *P. ostracodes* و group HS و *Pythium* group T گزارش شده است (Afshari, Azad et al. 2008, Babai-Ahari et al. 2004, Badali et al. 2014, Gholi Toloui et al. 2008, Iran & Ershad 1995, Ravanlou 2000). اما علی‌رغم اهمیت کشاورزی در این استان، مطالعه جامعی در زمینه شناسایی و تاکسونومی گونه‌های این جنس در خاک‌های مزارع و باغ‌های استان انجام نشده است. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف تاکسونومی و شناسایی گونه‌های این جنس در خاک‌های استان آذربایجان غربی انجام گرفت.

روش بررسی

- نمونه‌برداری

نمونه‌برداری طی بهار و تابستان سال‌های ۹۱ و ۹۲ به صورت تصادفی از خاک مزارع و باغ‌های شهرستان‌های ارومیه، اشنویه، مهاباد، میاندوآب، خوی، سردشت، نقده و ماکو در استان آذربایجان غربی توسط نگارنده‌گان اول و دوم صورت گرفت.

- جداسازی

جداسازی جدایه‌های *Pythium* از طریق روش طعمه‌گذاری با شاه‌دانه‌های دونیم شده جوشیده (van der Plaats-Niterink 1981) و با استفاده از محیط کشت CMA (Cornmeal agar) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیستاتین،

- بررسی الگو و سرعت رشد روی محیط‌های کشت به منظور بررسی الگوی رشد، جدایه‌های *Pythium* روی محیط‌های کشت CMA، PCA (Potato carrot agar) و PDA (Potato dextrose agar) کشت شدند و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی نگهداری شدند. سرعت رشد روزانه جدایه‌ها نیز در همین شرایط و در محیط کشت CMA تعیین شد (van der Plaats-Nitermik 1981, Ali-Shtayeh 1986).

- استخراج DNA، تکثیر و توالی‌یابی

براساس مطالعات و داده‌های ریخت‌شناختی تعدادی از جدایه‌ها به عنوان نماینده، برای مطالعات مولکولی و شناسایی مولکولی جدایه‌ها انتخاب شدند (جدول ۱). استخراج DNA ژنومی از میسلیم‌های رشد یافته در محیط کشت PDB (Potato dextrose broth) و طبق روش ریدر و برودا (Raeder & Broda 1985) با اندکی تغییر، تهیه و مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مطابق آنچه توسط عبداله‌زاده و همکاران (Abdollahzadeh et al. 2009) شرح داده شده انجام گرفت. ناحیه ITS (ITS1-5.8S-ITS2) جدایه‌های منتخب طی واکنش PCR و با استفاده از دو آغازگر ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990) تکثیر شدند. شرایط PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه که در هر کدام ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه دمای ۵۴ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. علاوه‌براین، در تعدادی از جدایه‌ها، بخشی از ژن *coxI* میتوکندریایی با استفاده از آغازگرهای *OomCOXILevup* و *Fm85mod* طبق روش روبی‌دو و همکاران (Robideau et al. 2011) تکثیر شد. خالص‌سازی و تعیین توالی محصولات PCR توسط شرکت *MacroGene* (کره جنوبی) انجام گرفت.

۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بنومیل، ۴۱۵ هزار واحد در لیتر پنی‌سیلین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین انجام گرفت. پرگنه‌های رشد کرده در اطراف شاهدانه‌ها و داخل محیط کشت، به تشتک‌های پتری جدید حاوی (Water agar) WA دو درصد انتقال یافتند و خالص‌سازی جدایه‌ها با برداشتن نوک ریشه‌ها و انتقال به CMA انجام گرفت. جدایه‌های خالص در لوله‌های حاوی آب مقطر سترون و قطعات برگ گندمیان اتوکلاو شده در چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

- شناسایی ریخت‌شناختی

به منظور بررسی مشخصات ریخت‌شناختی، جدایه‌های رشد کرده روی محیط کشت CMA به تشتک‌های پتری حاوی آب مقطر سترون و قطعات برگ گندمیان اتوکلاو شده، انتقال یافتند (van der Plaats-Nitermik 1981). تشتک‌ها در دو دمای ۱۵ و ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از گذشت دو روز به طور روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعه ریخت‌شناختی اندام‌های تولید مثل جنسی با بررسی صفاتی مانند موقعیت آگونیوم در ریشه (میانی یا انتهایی)، اندازه آگونیوم، اندازه آسپور، ضخامت دیواره آسپور، تعداد یاخته آنتریدیوم متصل به هر آگونیوم، محل انشعاب آنتریدیوم [تک‌بُن (Monoclinous)، دو‌بُن (Diclinous) و زیرماده‌ای (Hypogynous)] و نحوه اتصال یاخته‌های آنتریدیوم به آگونیوم (انتهایی باریک، انتهایی پهن، انتهایی زنگی شکل و اتصال جانبی) انجام گرفت. برای مطالعه ریخت‌شناختی اندام‌های تولید مثل غیرجنسی نیز تولید یا عدم تولید زئوسپور، شکل و اندازه اسپورانژیوم یا تورم ریشه‌ای و موقعیت آن‌ها در ریشه بررسی گردید (van der Plaats-Nitermik 1981). برای بررسی ریخت‌شناختی گونه‌ها از تک‌نگاشت (van der Plaats-Nitermik 1981)، کلید (Dick 1990) و در صورت نیاز از مقاله‌های مربوط به توصیف اصلی گونه‌ها استفاده شد.

جدول ۱- جدایه‌های *Pythium* توالی‌یابی شده در این تحقیق

کد جدایه*	گونه	محل	بستر (خاک)	کد توالی (ITS)
CUU 17	<i>P. aphanidermatum</i>	خوی (گوهران)	ذرت	KX788823
CUU 21	<i>P. aphanidermatum</i>	ماکو	زردآلو	KX788821
CUU 29	<i>P. aphanidermatum</i>	میان‌دوآب	خرزبه	KX788822
IRAN 2406C	<i>P. attrantheridium</i>	ارومیه (گل تپه)	هلو	KX788833
IRAN 2392C	<i>P. carolinianum</i>	ارومیه (امامزاده)	گوجه‌فرنگی	KX788827
IRAN 2422C	<i>P. carolinianum</i>	ارومیه (نازلو)	شلیل	KX788828
IRAN 2423C	<i>P. carolinianum</i>	خوی (گوهران)	چغندر قند	KX788826
IRAN 2398C	<i>P. glomeratum</i>	اشنویه	بادام	KX788842
IRAN 2591C	<i>P. middletonii</i>	خوی (گوهران)	چغندر قند	KX788832
IRAN 2592C	<i>P. minus</i>	ارومیه (امامزاده)	لفل	KX788831
CUU 46	<i>P. nodosum</i>	ماکو	زردآلو	KX788852
IRAN 2384C	<i>P. nunn</i>	ارومیه (نازلو)	شلیل	KX788849
IRAN 2385C	<i>P. nunn</i>	ارومیه (نازلو)	شلیل	KX788851
IRAN 2399C	<i>P. nunn</i>	خوی	گوجه‌فرنگی	KX788843
IRAN 2400C	<i>P. nunn</i>	خوی	چغندر قند	KX788844
IRAN 2401C	<i>P. nunn</i>	سردشت	انگور	KX788845
IRAN 2402C	<i>P. nunn</i>	ارومیه (نازلو)	شلیل	KX788850
CUU 31	<i>P. nunn</i>	خوی	آفتابگردان	KX788846
CUU 35	<i>P. nunn</i>	نقده	چغندر قند	KX788847
CUU 37	<i>P. nunn</i>	نقده	چغندر قند	KX788848
IRAN 2589C	<i>P. ornamentatum</i>	اشنویه	بادام	KX788824
IRAN 2407C	<i>P. paroecandrum</i>	سلماس (میناس)	چغندر قند	KX788834
IRAN 2590C	<i>P. periplocum</i>	ارومیه	چغندر قند	KX788825
IRAN 2391C	<i>P. stipitatum</i>	خوی	گوجه‌فرنگی	KX788830
CUU 23	<i>P. stipitatum</i>	خوی	گوجه‌فرنگی	KX788829
IRAN 2395C	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	خوی	گوجه‌فرنگی	KX788837
IRAN 2403C	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	خوی	گوجه‌فرنگی	KX788836
IRAN 2424C	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	ارومیه (امامزاده)	لفل	KX788838
IRAN 2396C	<i>P. ultimum</i> var. <i>sporangiferum</i>	سردشت	یونجه	KX788839
IRAN 2397C	<i>P. ultimum</i> var. <i>sporangiferum</i>	سردشت	یونجه	KX788840
CUU 42	<i>P. ultimum</i> var. <i>sporangiferum</i>	خوی	گوجه‌فرنگی	KX788841
IRAN 2404C	<i>P. viniferum</i>	ارومیه (امامزاده)	لفل	KX788835

* Collection of Urmia University; IRAN: Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

- آنالیزهای فیلوژنتیکی

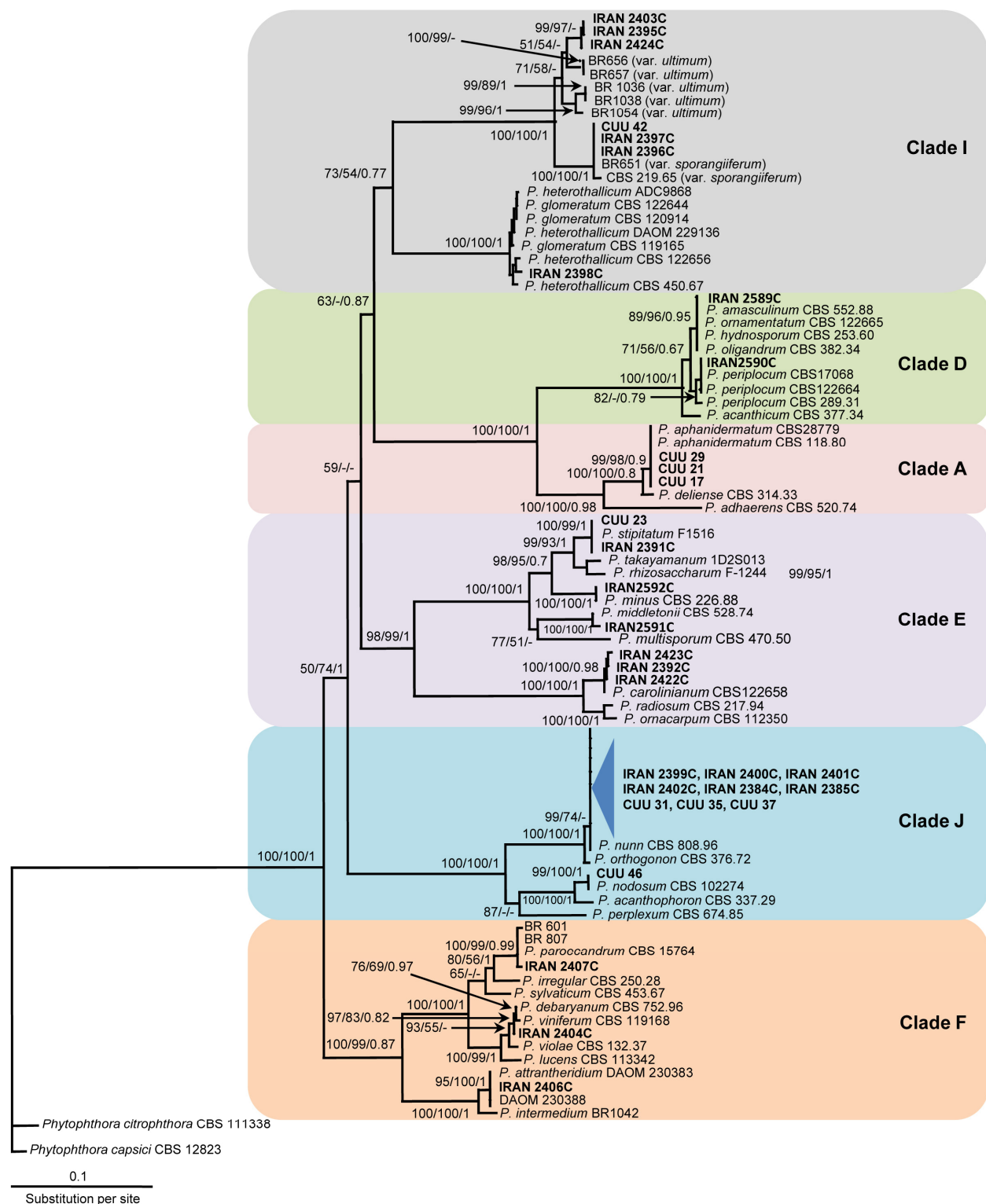
نتیجه و بحث

- فیلوژنی

از مجموع حدود ۲۰۰ جدایه *Pythium* که در بررسی‌های ریخت‌شناختی مورد بررسی قرار گرفتند، تعداد ۳۲ جدایه به عنوان نماینده برای مطالعات مولکولی انتخاب شدند (جدول ۱). توالی‌های مربوط به ناحیه ITS تعداد ۵۲ جدایه نماینده ۳۴ گونه *Pythium* از بانک ژن استخراج و به توالی‌های ۳۲ جدایه مطالعه شده در این تحقیق اضافه و هم‌ردیف شدند. دو گونه از جنس فیتوفتورا به اسامی *Ph. capsici* و *Phytophthora citrophthora* CBS 111338 (CBS 12823) نیز به عنوان Outgroup انتخاب شدند. تعداد کل کاراکترهای استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی به علاوه Gap ها و ماتریکس استاندارد GapCoder، ۱۱۸۹ عدد بود. آنالیزهای فیلوژنتیکی با روش‌های NJ، MP و BI انجام شدند. روش NJ با مدل جایگزینی نوکلئوتیدی K2P انجام شد و تمامی کاراکترها به صورت unordered و با وزن یکسان در نظر گرفته شدند. در روش MP تمامی کاراکترها به صورت unordered و با وزن یکسان و همچنین Gap ها به عنوان missing در نظر گرفته شدند. از تعداد کل کاراکترها ۳۸۰ کاراکتر ثابت، ۶۷ کاراکتر متغیر و فاقد اطلاعات و ۶۶۴ کاراکتر متغیر و دارای اطلاعات و ۷۸ کاراکتر حذف شدند که منجر به ایجاد ۱۰۰۰ درخت پارسیمونی (RI=0.93, CI=0.58, TL=2034) شد. درخت‌های پارسیمونی حاصل دارای ساختار مشابه بودند و تغییرات بین آن‌ها مربوط به گروه‌بندی جدایه‌ها درون گونه‌های کمپلکس بود. روش‌های NJ، BI و MP درخت‌هایی مشابه تولید کردند. درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز NJ توالی ITS با Bootstrap support های حاصل از روش‌های NJ و MP و Posterior probability های روش BI در محل گره‌ها و روی شاخه‌ها نشان داده شده است (شکل ۱). به منظور تایید نتایج حاصل از آنالیز توالی ناحیه ITS، توالی بخشی از ژن coxI در تعدادی از جدایه‌ها تعیین و مورد بررسی قرار گرفت. درخت‌های حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی ژن coxI نتایج آنالیز توالی ناحیه ITS را تایید کرد (نتایج نشان داده نشده است). براساس نتایج آنالیزهای فیلوژنتیکی و ویژگی‌های ریخت‌شناختی، جدایه‌های مورد بررسی به ۱۴ گونه از شش تبار معرفی شده توسط لوسک و دکوک (Levesque & de Cock 2004) تعلق داشتند. گونه *P. aphanidermatum* از تبار A، گونه‌های *P. ornamentatum* و *P. periplocum* از تبار D، گونه‌های *P. carolinianum*، *P. minus* و *P. stipitatum* از تبار E، گونه‌های *P. atrantheridium*، *P. paroeandrum* و *P. viniferum* از تبار F، گونه‌های *P. glomeratum* و *P. ultimum* از تبار I و گونه‌های *P. nodosum* و *P. nunn* از تبار J شناسایی شدند.

توالی‌های نواحی ITS با استفاده از نرم‌افزار BioEdit v.7.2.0 (Hall 1999) اصلاح و استخراج شدند. به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ها، ابتدا جستجوی BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI و با استفاده از توالی‌های نواحی ITS جدایه‌های مورد بررسی، انجام گرفت. سپس براساس میزان تشابه توالی‌های به دست آمده در این تحقیق، با توالی‌های موجود در NCBI و نیز توالی جدایه‌های تیپ و معتبر موجود در منابع (از جمله Levesque & de Cock 2004, Robideau et al. 2011) مقاله‌های مربوط به توصیف و معرفی گونه‌های جدید، آرایه‌ها انتخاب و توالی‌های مربوطه از پایگاه اطلاعاتی استخراج و به همراه توالی‌های جدایه‌های این تحقیق در آنالیزهای فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v.7.043b (Katoh & Standley 2013) هم‌ردیف شدند. اطلاعات فیلوژنتیکی موجود در Gap ها با استفاده از نرم‌افزار GapCoder (Young & Healy 2003) کد شده و به صورت یک ماتریکس داده استاندارد به انتهای داده‌ها اضافه و در آنالیزها استفاده شدند.

آنالیزهای فیلوژنتیکی با سه روش Neighbor-Joining (NJ)، Bayesian Inference (MP) Maximum Parsimony و (BI) انجام شد. روش NJ با مدل جایگزینی دو پارامتری کیمورا (Kimura 1980) و با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap به وسیله نرم‌افزار PAUP v. 4.0b10 (Swofford 2003) انجام گرفت. روش MP با استفاده از روش Heuristic search با شاخص‌های stepwise addition، random addition sequence با ۱۰۰۰ تکرار، maxtrees مساوی ۱۰۰۰۰ و الگوریتم TBR به وسیله نرم‌افزار PAUP v. 4.0b10 (Swofford 2003) انجام شد. پایداری پارسیمونی‌ترین درخت‌ها با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap ارزیابی شد (Hillis & Bull 1993). شاخص‌هایی نظیر طول درخت، CI، RI و HI نیز اندازه‌گیری شدند. روش BI در نرم‌افزار MrBayes v3.0B4 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) با استفاده از الگوریتم Markov Chain Monte Carlo (MCMC) مطابق آنچه توسط عبدالله‌زاده و همکاران (Abdollahzadeh et al. 2014) شرح داده شده انجام گرفت با این تفاوت که در این بررسی ۲۵ درصد درخت‌های اولیه حذف (Burn-in=25%) و درخت توافقی نهایی براساس ۷۵ درصد باقی مانده به دست آمد. درخت‌های حاصل از بررسی‌های فیلوژنتیکی به وسیله نرم‌افزار TreeView (Page 1996) مشاهده شدند. توالی‌های ITS به دست آمده در این تحقیق در بانک ژن با شماره‌های دسترسی KX788821 تا KX788852 ثبت شدند (جدول ۱).



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز NJ توالی ناحیه ITS گونه‌های *Pythium* شناسایی شده در این تحقیق. مقادیر bootstrap support (درصد) مربوط به آنالیز NJ و MP و احتمال پسین (PP) مربوط به آنالیز Bayesian به ترتیب NJ/MP/BI روی گره‌ها نشان داده شده است. دو گونه *Phytophthora citrophthora* (CBS 111338) و *Phytophthora capsici* (CBS 12823) به عنوان outgroup استفاده شدند.

Fig. 1. Phylogenetic tree obtained using NJ analysis on the ITS sequence data of *Pythium* species identified in this study. NJ/MP/BI bootstrap support and posterior probability values are given at the nodes. The tree is rooted to *Phytophthora citrophthora* (CBS 111338) and *Phytophthora capsici* (CBS 12823).

توصیف گونه‌ها

Pythium minus Ali-Shtayeh, J. Linn. Soc. Bot. 91: 299 (1985)

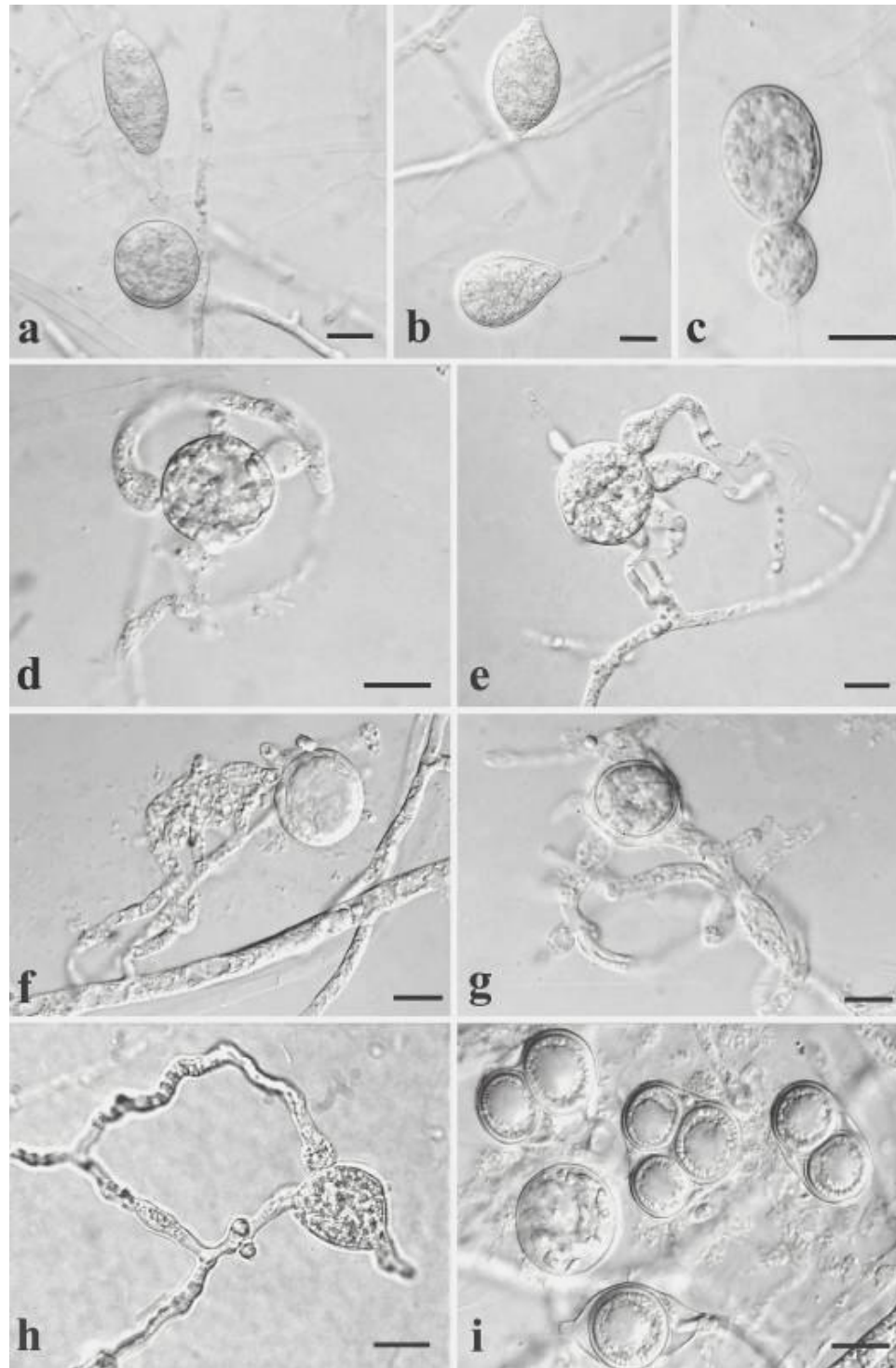
پرگنه در محیط کشت CMA فرورفته و دارای الگوی رشدی شعاعی، روی PCA گل به شکل داوودی و روی PDA تقریباً شبیه گل سرخ. قطر ریشه اصلی ۶-۷ میکرومتر. اسپورانژیوم و زئوسپور مشاهده نشد. تورم‌های ریشه‌ای کروی، نسبتاً کروی، تخم‌مرغی تا کشیده، اغلب میانی گاهی انتهایی، به قطر ۲۰-۴۲ میکرومتر. اُگونیوم‌ها دارای دیواره صاف، کروی تا نسبتاً کروی و به صورت میانی و انتهایی، به قطر ۱۳-۲۳ میکرومتر. آنتریدیوم‌ها به تعداد ۴-۱ عدد، گاهی مرجانی شکل، اغلب پایه‌دار و تک‌بُن و گاهی دو‌بُن، یاخته آنتریدیوم گریزی شکل. اُسپورها کروی، پُرساز (Plerotic)، ۳-۱ عدد درون یک اُگونیوم، به قطر ۱۱-۲۵ میکرومتر، ضخامت دیواره اُسپور نازک و حداکثر تا یک میکرومتر (شکل ۲).

میزان رشد روی محیط کشت CMA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ۱۶ میلی‌متر در روز.

گزارش‌های نادری از وجود این گونه در جهان وجود دارد، به طوری که تاکنون فقط از انگلستان (Ali-Shtayeh & Dick 1985) و آفریقای جنوبی (McLeod et al. 2009) جداسازی و گزارش شده است. خصوصیات ریخت‌شناختی این جدایه با توصیف گونه *P. minus* (Ali-Shtayeh & Dick 1985) مطابقت داشت. از این گونه، تعداد شش جدایه به دست آمد که یک جدایه (IRAN 2592C) برای بررسی‌های مولکولی انتخاب شد. جدایه‌های این گونه از مزارع فلفل (ارومیه)، آفتابگردان (خوی) و چغندر قند (نقده) جداسازی شدند.

گونه‌های *P. ornamentatum*، *P. glomeratum* و *P. viniferum* با استفاده از توالی ناحیه ITS (شکل ۱) و *coxI* از گونه‌های مجاور تفکیک نشدند. آنالیزهای فیلوژنتیکی گونه‌های *Pythium* با استفاده از توالی ناحیه ITS و *coxI* نشان داده است که *P. glomeratum* از *P. ornamentatum*، *P. heterothallicum*، *P. amasculinum*، *P. oligandrum* و *P. hydnosporum* و گونه *P. viniferum* از *P. debaryanum* قابل تفکیک نیستند (Robideau et al. 2011). بنابراین، شناسایی و تفکیک این سه گونه از گونه‌های مجاور با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی انجام گرفت. همچنین در این تحقیق، جدایه‌های *P. ultimum* در یک گروه فیلوژنتیکی، اما در زیرگروه‌های مختلف قرار گرفتند که حاکی از تایید معرفی این گونه به عنوان یک گونه کمپلکس (Robideau et al. 2011) و ضرورت انجام یک مطالعه دقیق و منسجم روی این گونه مهم بیماری‌زای گیاهی می‌باشد.

در میان گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق، سه گونه *P. ornamentatum*، *P. nodosum* و *P. stipitatum* برای ایران جدید بوده و برای نخستین بار در این تحقیق گزارش و توصیف می‌شوند. البته، *P. minus* که طی این تحقیق جداسازی شده و قبلاً بدون رایه هیچ شرح جامع و کاملی از ایران گزارش شده (بدلی و همکاران ۱۳۹۳)، نیز توصیف می‌شود. همچنین، به جز *P. aphanidermatum*، *P. paroeandrum* و *P. ultimum* که قبلاً از آذربایجان غربی گزارش شده‌اند (Afshari-Azad et al. 2008, Babai-Ahari et al. 2004, Badali et al. 2014, Gholi Toloui et al. 2008, Iran & Ershad 1995, Ravanlou 2000)، سایر گونه‌های این تحقیق برای نخستین بار از این استان گزارش می‌شوند.



شکل ۲- *Pythium minus* (IRAN 2592C): a-c. تورم‌های ریشه‌ای، d-e. آنترییدیوم‌های متصل به آگونیوم‌ها، f-g. آنترییدیوم‌های مرجانی شکل و آگونیوم‌ها، h. آنترییدیوم تک‌بُنی و آگونیوم، i. تعداد ۱-۳ اُوسپور درون آگونیوم‌ها و یک تورم ریشه‌ای کروی (مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2. *Pythium minus* (IRAN 2592C): a-c. Hyphal swellings, d-e. Antheridia attached to oogonia, f-g. Coralloid antheridia and oogonia, h. Monoclinal antheridium and oogonium, i. 1-3 Oospores inside oogonia and a globose hyphal swelling (Bars = 10 μ m).

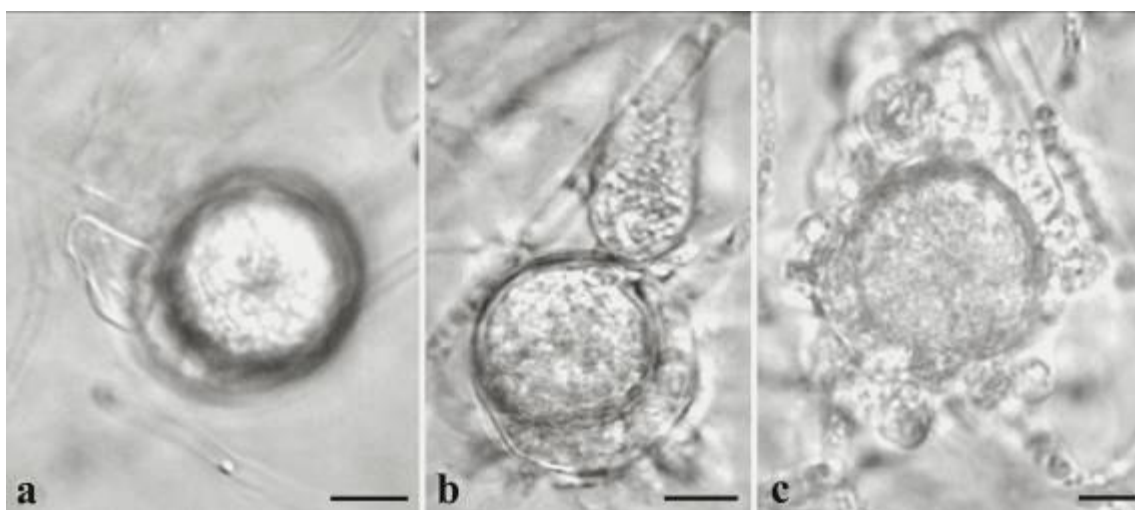
102274) در یک خوشه قرار می‌گیرند و دو گونه *P. perplexum* و *P. acanthophoron* از لحاظ فیلوژنتیکی به گونه *P. nodosum* نزدیک هستند (شکل ۱). گونه *P. nodosum* به دلیل تولید آگونیوم‌هایی با دیواره صاف، به راحتی از *P. acanthophoron* که دارای آگونیوم‌هایی با دیواره خاردار و مزین است (van der Plaats-Niterink 1981)، تفکیک می‌شود. همچنین، اجتماع آنتریدیوم‌ها و تشکیل گره آنتریدیومی در اطراف آگونیوم‌ها در گونه *P. nodosum*، این گونه را از *P. perplexum* که فاقد این نوع تجمع آنتریدیومی است (Galland & Paul 2001)، متمایز می‌کند.

از این گونه تنها یک جدایه (CUU 46) از خاک یک باغ زردآلو در ماکو جداسازی گردید و در بررسی‌های مولکولی و ریخت‌شناختی مورد استفاده قرار گرفت. جدایه مذکور در کشت‌های بعدی جهت اندام‌زایی و تهیه تصاویر میکروسکوپی هیچ اندام غیرجنسی و جنسی تولید نکرد و به همین دلیل تهیه تصاویر با کیفیت از آن امکان‌پذیر نبود.

Pythium nodosum B. Paul, D. Galland, T. Bhatn. & Dulieu, FEMS Microbiol. Lett. 158: 207 (1998)

پرگنه روی محیط‌های کشت CMA، PCA و PDA دارای الگوی رشدی شعاعی. قطر ریشه اصلی حدود ۷-۵ میکرومتر. اسپورانژیوم و زئوسپور مشاهده شد. اسپورانژیوم‌ها کروی، تقریباً کروی، گلابی تا تخم‌مرغی شکل، اغلب به صورت میانی و گاهی انتهایی، در مواردی دارای پرولیفراسیون داخلی. آگونیوم‌ها دارای دیواره صاف، کروی تا تقریباً کروی، به قطر ۲۵-۱۰ میکرومتر. آنتریدیوم‌ها به تعداد یک تا تعداد زیاد که این آنتریدیوم‌ها آگونیوم را احاطه کرده و تشکیل گره در اطراف آگونیوم می‌دهند و وجود این گره تشخیص تعداد و نوع اتصال آنتریدیوم را مشکل می‌سازد، یاخته آنتریدیومی زنگی شکل. آسپور کروی، منفرد، ناپرساز (Aplerotic)، به قطر ۲۳-۹ میکرومتر، ضخامت دیواره آسپور حدود ۱ میکرومتر (شکل ۳).

این گونه در سال ۱۹۹۸ از فرانسه جداسازی و معرفی گردید (Paul et al. 1998) و به نظر می‌رسد تاکنون از سایر نقاط دنیا گزارش نشده است. آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه مورد بررسی، با جدایه تیپ این گونه (*P. nodosum* CBS)



شکل ۳- *Pythium nodosum* (CUU 46): a-b. یک آنتریدیوم متصل به هر آگونیوم، c. آگونیوم احاطه شده با آنتریدیوم‌ها (مقیاس‌ها = ۵ میکرومتر).

Fig. 3. *Pythium nodosum* (CUU 46): a-b. An antheridium attached to each oogonium, c. Oogonium surrounded by antheridia (Bars = 5 μ m).

تا کشیده، گاهی این اندام‌ها به همدیگر متصل شده و تشکیل تورم‌های ریشه‌ای مرکب را می‌دهند، قطر تورم‌های ریشه‌ای کروی، ۲۸-۱۳ میکرومتر و طول تورم‌های ریشه‌ای کشیده تا ۱۱۰ میکرومتر. آگونیوم‌ها کروی، گاهی تقریباً کروی تا کشیده، انتهایی و میانی، به قطر ۳۰-۲۰ میکرومتر، دیواره آگونیوم‌ها

Pythium ornamentatum B. Paul, Mycologia 79: 801 (1987)

پرگنه روی محیط کشت CMA فاقد الگوی رشدی خاص و تا حدودی دارای دارای ریشه‌های هوایی، روی PDA گل سرخی و روی PCA فاقد الگوی رشدی خاص و فرورفته در محیط کشت. قطر ریشه اصلی ۷-۶ میکرومتر. اسپورانژیوم و زئوسپور مشاهده نشد. تورم‌های ریشه‌ای کروی، تخم‌مرغی

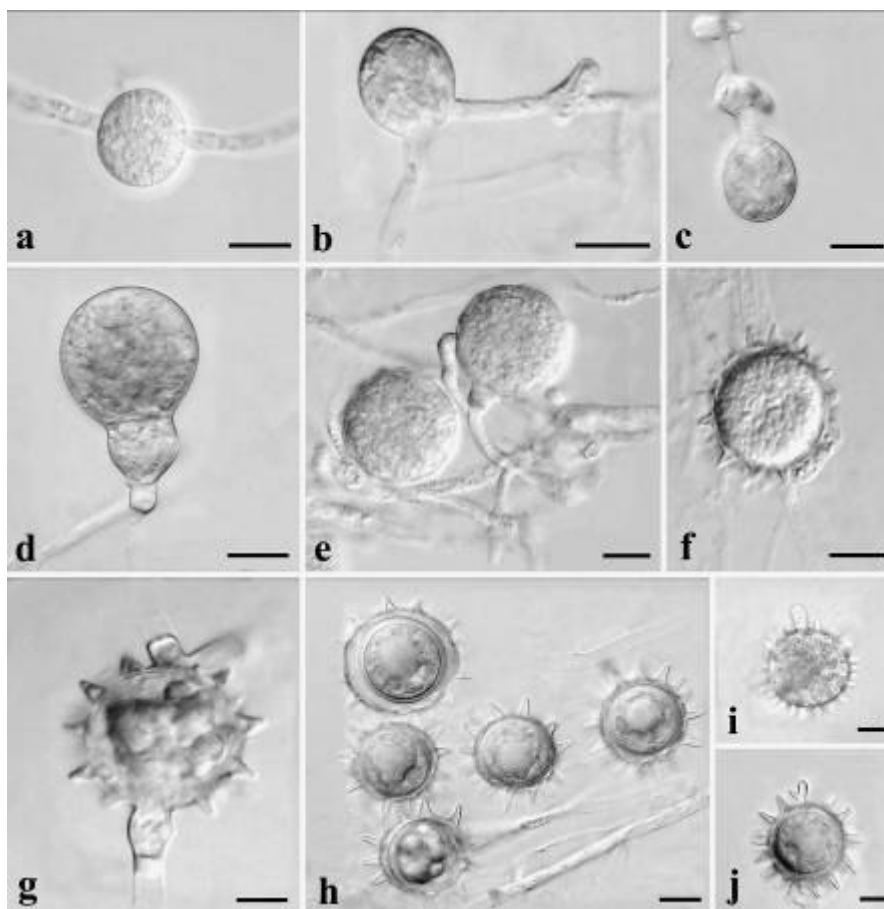
توالی ناحیه ITS و حتی *coxI* قابل تفکیک نبودند. در بررسی جامعی که توسط روبیدو و همکاران (Robideau *et al.* 2011) انجام گرفت، این گونه‌ها با استفاده از این توالی نواحی ITS و *coxI* قابل تفکیک و شناسایی نبودند. بنابراین، برای شناسایی این گونه مشخصات ریخت‌شناختی مورد استفاده قرار گرفت. این جدایه از نظر تشکیل تورم ریشه‌ای مرکب به سه گونه *P. oligandrum*، *P. amasculinum* و *P. acanthicum* شباهت داشت، ولی به دلیل وجود آسپور پُرساز از گونه *P. oligandrum* تفکیک شد (van der Plaats-Niterink 1981). همچنین، وجود آنتریدیوم تک‌بُ و زیرماده‌ای و نیز شکل و اندازه خارها این جدایه را از دو گونه *P. acanthicum* و *P. amasculinum* متمایز کرد (Paul 1987, van der Plaats-Niterink 1981). همه مشخصات ریخت‌شناختی این جدایه با توصیف گونه *P. ornamentatum* (Paul 1987) مطابقت داشت. از این گونه یک جدایه (IRAN 2589C) از خاک یک باغ بادام در جاده ارومیه- اشنویه به دست آمد.

خاردار، خارها به صورت انگشتی، مخروطی، پستانک مانند و گاهی دو شاخه، طول خارها ۱۱-۴ میکرومتر. آنتریدیوم‌ها اغلب تک‌بُ و گاهی زیرماده‌ای، یاخته آنتریدیوم اغلب دراز و دارای اتصال جانبی و پهن به آگونیوم. آسپورها کروی، به تعداد یک و به ندرت دو عدد در هر آگونیوم، پُرساز یا ناپُرساز، ضخامت دیواره آسپور ۲-۱ میکرومتر (شکل ۴).

میزان رشد روی محیط کشت CMA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ۳۵ میلی‌متر در روز.

این گونه از خاک مزارع غلات در الجزایر جداسازی و معرفی شده است (Paul 1987) و هیچ گزارش منتشر شده‌ای از وجود این گونه در سایر نقاط دنیا وجود ندارد. بنابراین، در این تحقیق، *P. ornamentatum* برای دومین بار در دنیا گزارش می‌شود.

در آنالیزهای فیلوژنتیکی، جدایه مورد بررسی در این تحقیق با *P. ornamentatum* CBS 12266 و *P. amasculinum* CBS 55288 و *P. oligandrum* CBS 382.34 در یک گروه فیلوژنتیکی قرار گرفتند (شکل ۱) و با



شکل ۴- *Pythium ornamentatum* (IRAN 2589C): a-d. تورم‌های ریشه‌ای، e-f. آنتریدیوم‌های متصل به آگونیوم‌ها، g. آنتریدیوم زیرماده‌ای و آگونیوم، h. آسپورهای پُرساز و ناپُرساز، i. آگونیوم با یک پستانک، j. آگونیوم با خار دو شاخه (مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر).
Fig. 4. *Pythium ornamentatum* (IRAN 2589C): a-d. Hyphal swellings, e-f. Antheridia attached to oogonia, g. Hypogynous antheridium and oogonium, h. Plerotic and aplerotic oospores, i. Oogonium with a papilla, j. Oogonium with bifurcated spine (Bars = 10 μ m).

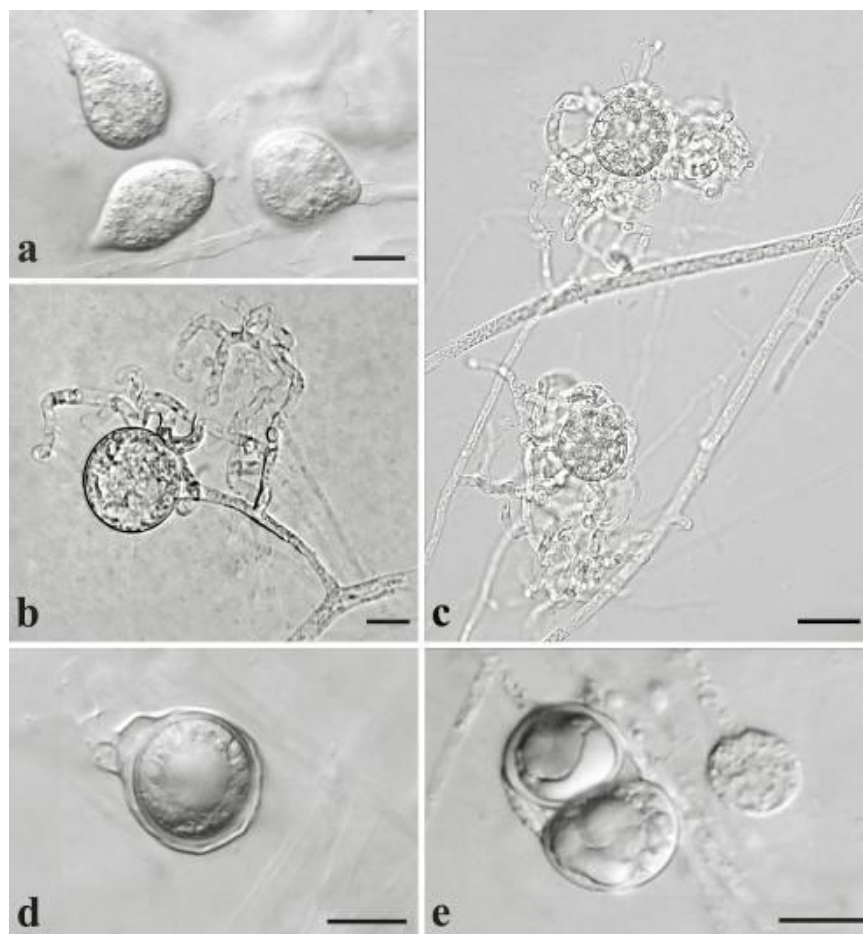
پُرساز و ناپُرساز، معمولا منفرد و گاهی دو اُسپور درون یک اُگونیوم، به قطر ۱۱-۲۳ میکرومتر، ضخامت دیواره اُسپورها کمتر از یک و حداکثر تا یک میکرومتر (شکل ۵).

میزان رشد روی محیط کشت CMA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ۱۷ میلی‌متر در روز.

این گونه از نظر دارا بودن آنتریدیوم‌های تک‌بُن و مرجانی شکل شباهت بسیاری به گونه *P. minus* (Ali-Shtayeh & Dick 1985) دارد، اما دارای تفاوت‌های ریخت‌شناختی مشخصی است. تورم‌های ریشه‌ای در گونه *P. stipitatum* اغلب کروی و انتهایی هستند، در حالی که در گونه *P. minus* اغلب کشیده و میانی می‌باشند. همچنین، اندازه تورم‌های ریشه‌ای، اُگونیوم‌ها و اُسپورها در گونه *P. stipitatum* بزرگ‌تر از *P. minus* می‌باشند (Ali-Shtayeh & Dick 1985).

Pythium stipitatum G. Karaca & B. Paul, FEMS Microbiol. Lett. 295: 164 (2009)

پرگنه در محیط کشت CMA فرورفته و دارای الگوی رشد شعاعی، روی PCA شعاعی، روی PDA گل داوودی. قطر ریشه اصلی ۵-۷ میکرومتر. اسپورانژیوم و زئوسپور مشاهده نشد. تورم‌های ریشه‌ای اغلب کروی و نسبتا روی و گاهی کشیده تا استوانه‌ای و در مواردی دمبلی شکل، اغلب انتهایی در مواردی میانی، به قطر ۱۱-۲۵ میکرومتر. اُگونیوم‌ها دارای دیواره صاف، در مواردی دارای پستانک (Papilla)، کروی، اغلب انتهایی و گاهی میانی، به قطر ۲۰-۲۲ میکرومتر. آنتریدیوم‌ها اغلب منشعب و مرجانی شکل، اتصال آنتریدیوم‌ها اغلب به صورت تک‌بُن که در فواصل مختلفی از اُگونیوم منشأ می‌گیرند، انشعابات پایه آنتریدیوم در مقابل اُگونیوم به یک تا تعداد زیادی یاخته آنتریدیوم ختم می‌شود. اُسپورها به صورت پُرساز، نسبتا



شکل ۵- *Pythium stipitatum* (IRAN 2391C): a. تورم‌های ریشه‌ای، b-c. آنتریدیوم‌های مرجانی شکل و اُگونیوم‌ها، d. اُسپور درون اُگونیوم، e. دو اُسپور درون یک اُگونیوم (مقیاس‌ها: a، b، d، e = ۱۰ میکرومتر، c = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 5. *Pythium stipitatum* (IRAN 2391C): a. Hyphal swellings, b-c. Corolloid antheridia and oogonia, d. Oospore inside oogonium, e. Two oospores inside an oogonium (Bars: a, b, d and e = 10 μ m, c = 20 μ m).

در این تحقیق، مجموعاً حدود ۲۰۰ جدایه متعلق به ۱۴ گونه *Pythium* شناخته شده و تعدادی گونه جدید احتمالی نیز جمع‌آوری و مطالعه گردید. نتایج نشان داد که در خاک مناطق نمونه‌برداری شده تعداد قابل توجهی گونه مربوط به جنس *Pythium* وجود دارد که با بررسی‌های بیشتر، می‌توان اطلاعات دقیق‌تری در زمینه فلور پیتیومی خاک‌های استان آذربایجان غربی به دست آورد. تعدادی از این گونه‌ها از جمله *P. ultimum* و *P. aphanidermatum* به عنوان بیمارگرهای گیاهی شناخته شده هستند. از گونه‌های جدید معرفی شده برای فلور ایران گونه‌هایی مانند *P. nunn* و *P. ornamentatum* انگل قارچ‌ها هستند، در حالی که بایستی رفتار انگلی احتمالی برخی گونه‌ها مانند گونه *P. minus* و *P. stipitatum* روی گیاهان یا قارچ‌های بیمارگر گیاهی، مورد بررسی قرار گیرد.

از نظر فیلوژنتیکی نیز این دو گونه کاملاً جدا از هم بوده و قابل تفکیک هستند (شکل ۱). این گونه برای نخستین بار در سال ۲۰۰۹ و به عنوان یک گونه پوده‌رُست از کشورهای فرانسه، تونس، هند و ترکیه گزارش شده است (Karaca *et al.* 2009) و این دومین گزارش از این گونه در دنیا است. اگرچه در توصیف اصلی، تشکیل پستانک در آگونیوم‌ها به فراوانی مشاهده و گزارش شده است، اما در جدایه مورد بررسی در این تحقیق، تعداد کمی از آگونیوم‌ها دارای پستانک بودند. از این گونه تعداد سه جدایه به دست آمد که دو جدایه (IRAN 2391C و CUU 23) برای بررسی‌های مولکولی انتخاب شدند. هر سه جدایه مربوط به این گونه از خاک یک مزرعه گوجه‌فرنگی در شهرستان خوی به دست آمد.

References

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Zare, R. & Phillips A.J.L. 2014. A phylogenetic study of *Dothiorella* and *Spencermartinsia* species associated with woody plants in Iran, New Zealand, Portugal and Spain. *Persoonia* 32: 1–12.
- Abdollahzadeh, J., Mohammadi Goltapeh, E., Javadi, A., Shams-bakhsh, M., Zare, R. & Phillips, A.J.L. 2009. *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the *Botryosphaeriaceae* from trees in Iran. *Persoonia* 23: 1–8.
- Afshari-Azad, H., Mirabolfathi, M., Sharifi, K., Dalili, S.A.R. & Azadbakht, N. 2008. Determination of damping-off, root and crown rot causal agents of rapeseed throughout important cultivation areas of Iran. *Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress, Vol. II, 24–27 Aug., Hamedan, Iran*: 14.
- Ali-Shtayeh, M.S. 1986. The genus *Pythium* in West Bank and Ghaza Strip. *Research and Documentation Centre, An-Najah National University*.
- Ali-Shtayeh, M.S. & Dick, M.W. 1985. Five new species of *Pythium* (*Peronosporomycetidae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 91: 297–317.
- Ali-Shtayeh, M.S. & Saleh, A.S. 1999. Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum* and *P. periplocum* from soil and evaluation of their mycoparasitic activity and biocontrol efficacy against selected phytopathogenic *Pythium* species. *Mycopathologia* 145: 143–153.
- Babai-Ahari, A.D., Abrinnia, M. & Heravan, M. 2004. Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off in sugar beet in northwest Iran. *Australasian Plant Pathology* 33: 343–347.
- Badali, F., Abrinbana, M. & Abdollahzadeh, J. 2014. New record of *Pythium* for flora of Iran. *Proceedings of the 21st Iranian Plant Protection Congress, 23–26 Aug., Urmia, Iran*: 247.
- Bala, K., Robideau, G.P., Désaulniers, N., de Cock, A.W.A.M. & Lévesque, C.A. 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* 25: 22–31.
- Beakes, G.W., Honda, D. & Thines, M. 2014. Systematics of the *Straminipila*: *Labyrinthulomycota*, *Hyphochytriomycota* and *Oomycota*. Pp. 39–97. *In: The Mycota VII, Systematics and Evolution, Part A, 2nd Edition*

- (McLaughlin, D.J. & Spatafora, J.W. eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- de Cock, A.W.A.M., Mendoza, L., Padhye, A.A., Ajello, L. & Kaufman, L. 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 344–349.
- de Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.R., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S. & Lévesque, C.A. 2015. *Phytophythium*: molecular phylogeny and systematic. *Persoonia* 34: 25–39.
- Dick, M.W. 1990. Key to *Pythium*. University of Reading Press, 64 pp., Reading, UK.
- Ershad, D. 2009. Fungi of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection, 531 pp, Tehran, Iran.
- Galland, D. & Paul, B. 2001. *Pythium perplexum* isolated from soil in France: morphology, molecular characterisation and biological control. *Microbiological Research* 156: 185–189.
- Gholi Toloui, S., Babaye-Ahari, A., Ghosta, Y. & Sedghi, M. 2008. Identification of fungi and pseudofungi responsible for pepper root and crown rot in West Azarbaijan province. *Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress*, Vol. II, 24–27 Aug., Hamedan, Iran: 71.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95–98.
- Irani, H. & Ershad, D. 1995. Identification of fungi associated with sugar beet root rot in West Azarbaijan. *Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress*, 2–7 Sept., Karaj, Iran: 126.
- Jones, E. & Deacon, J. 1995. Comparative physiology and behaviour of the mycoparasites *Pythium acanthophoron*, *P. oligandrum* and *P. mycoparasiticum*. *Biocontrol Science and Technology* 5: 27–40.
- Karaca, G., Jonathan, R & Paul, B. 2009. *Pythium stipitatum* sp. nov. isolated from soil and plant debris taken in France, Tunisia, Turkey and India. *FEMS Microbiology Letters* 295: 164–169.
- Katoh, K. & Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software. Version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kawamura, Y., Yokoo, K., Tojo, M. & Hishiike, M. 2005. Distribution of *Pythium porphyrae*, the causal agent of red rot disease of *Porphyra* spp. in the Ariake Sea, Japan. *Plant Disease* 89: 1041–1047.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Levesque, C.A. & de Cock, A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108: 1363–1383.
- Lifshitz, R., Dupler, M., Elad, Y. & Baker, R. 1984. Hyphal interactions between a mycoparasite, *Pythium nunn* and several soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 30: 1482–1487.
- Martin, F.N. & Loper, J.E. 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospect for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 111–181.
- Matsumoto, C., Kageyama, K., Suga, H. & Hyakumachi, M. 1999. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience* 40: 321–331.
- McLeod, A., Botha, W.J., Meitz, J.C., Spies, C.F.J., Tewoldemedhin, Y.T. & Mostert, L. 2009. Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research* 113: 933–951.
- Miura, M., Hatai, K., Tojo, M., Wada, S., Kobayashi, S. & Okazaki, T. 2010. Visceral mycosis in Ayu *Plecoglossus altivelis* larvae caused by *Pythium flevoense*. *Fish Pathology* 45: 24–30.

- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. 2015. The current status of *Pythium* species in Iran: challenges in taxonomy. *Mycologia Iranica* 2: 79–87.
- Page, R.D.M. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees in personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357–358.
- Paul, B. 1987. A new species of *Pythium* with ornamented oogonia from Algeria. *Mycologia* 79: 797–802.
- Paul, B., Galland, D., Bhatnagar, T. & Dulieu, H. 1998. A new species of *Pythium* isolated from the Burgundy region in France. *FEMS Microbiology Letters* 158: 207–213.
- Raeder, U. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17–20.
- Ravanlou, A. 2000. Etiology of root and foot rot of wheat in West Azarbaijan. *Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress*, Vol. II, 5–8 Sept., Esfahan, Iran: 219.
- Ribeiro, W.R. & Butler, E. 1995. Comparison of the mycoparasites *Pythium periplocum*, *P. acanthicum* and *P. oligandrum*. *Mycological Research* 99: 963–968.
- Robideau, G.P., de Cock, W.A.M.A., Coffey, M.D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M., Hu, C-H., Küpper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C.P., Gzhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B. & Lvésqe, C.A. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11: 1002–1011.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. 2011. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Su, X. 2006. A new species of *Pythium* isolated from mosquito larvae and its ITS region of rDNA. *Mycosystema* 25: 523–528.
- Swofford, D.J. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- van der Plaats-Niterink, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 21: 1–239.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. *In: PCR Protocol: A Guide of Methods and Application* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J., eds). Academic Press, San Diego.