

فیلوژنی گونه‌های *Phytophthora* و *Phytophthora* در شالیزارهای برنج در استان فارس*

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۳ / پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۷

فاطمه سلمانی‌نژاد: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶، ایران

رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶، ایران (rmostofi@shirazu.ac.ir)

چکیده

به منظور بررسی گونه‌های آمیست شالیزارهای برنج استان فارس طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۲ از خاک، آب آبیاری، ریشه و طوقه گیاهان بیمار نمونه برداری انجام گرفت. براساس مطالعات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی، فیزیولوژیکی جدایه‌ها و همچنین بررسی‌های فیلوژنتیکی فاصله ترانویسی شده داخلی (آی‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریبوزومی با روش پیوست همسایه‌ها، دو گونه *Phytophthora* از تبارهای ۶ و ۸ درخت آی‌تی‌اس شامل *P. inundata* و *P. pseudocryptogea* و سه گونه *Phytophthora* در یک تبار مجزا شامل *Phpy. litorale*، *Phpy. ostracodes* و *Phpy. sterile* شناسایی شد. تفکیک دو گونه *Phpy. litorale* و *Phpy. sterile* از طریق مطالعات ریخت‌شناختی به همراه واکوی‌های فیلوژنتیکی صورت گرفت. گونه *Phpy. sterile* برای فلور آمیستی ایران جدید است. همچنین، تمامی گونه‌ها برای نخستین بار در دنیا از فراریشه برنج گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آمی کوتا، تبار، ریخت‌شناختی، فیلوژنی، *Pythiaceae*

Phylogeny of *Phytophthora* and *Phytophthora* species associated with rice in Fars province (Iran)

Received: 02.01.2017 / Accepted: 16.04.2017

Fatemeh Salmaninezhad: MSc Graduate, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz 7144165186, Iran

Reza Mostowfizadeh-Ghalmfarsa: Prof., Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz 7144165186, Iran (rmostofi@shirazu.ac.ir)

Summary

In order to investigate the Oomyceteous species of the rice paddy fields of Fars province (Iran), during 2013–15, infected roots and crowns together with soil around seedlings and irrigation water were sampled. Based on the morphological, morphometric and physiological studies along with phylogenetic analyses of internal transcribed spacer sequences based on neighbor joining method, two *Phytophthora* species from Clades 6 and 8, including *P. inundata*, and *P. pseudocryptogea* and three *Phytophthora* species from a distinct clade, including *Phpy. litorale*, *Phpy. ostracodes*, and *Phpy. sterile* were identified. *Phytophthora litorale*, and *Phpy. sterile* were distinguished through morphological studies along with phylogenetic analysis. *Phytophthora sterile* was also new to the Oomyceteous mycobiota of Iran. All species were reported for the first time in the world from rice rhizosphere.

Keywords: Clade, morphology, *Oomycota*, phylogeny, *Pythiaceae*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده نخست به راهنمایی دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

مقدمه

در سال‌های اخیر در مزارع برنج استان فارس، علایمی نظیر پوسیدگی ریشه و طوقه برنج و نیز کوتولگی گیاهچه دیده شده است. گزارش‌های بسیار اندکی در مورد گونه‌های آمیستی مزارع برنج ایران منتشر شده است که از آن جمله می‌توان به پژوهش بلبلی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Bolboli & Mostowfzadeh-Ghahamfarsa 2015) تنها در مورد جنس *Pythium* اشاره نمود که در آن گونه‌های *Py. aphanidermatum* (Edson) Fitzp *Py. adhaerens* Sparrow و *Py. marsipium* Drechsler *Py. dissotocum* Drechsler جنس *Pythiogeton* sp. Minden از مزارع برنج جداسازی شده، ولی هیچیک از این گونه‌ها در شرایط آزمایشگاهی روی برنج بیماری‌زا نبودند (Bolboli 2013).

در این پژوهش، گونه‌های آمیستی همراه با برنج در شالیزارهای استان فارس با بررسی‌های ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی، فیزیولوژیکی و واکاوی‌های فیلوژنتیکی شناسایی و توصیف شدند. همچنین، امکان بیماری‌زایی آن‌ها روی برنج بررسی شد.

روش بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و نگهداری جدایه‌ها - نمونه‌برداری از خاک، آب آبیاری و گیاهان خزانه‌ها و شالیزارهای استان فارس (ارسنجان، اسماعیل‌آباد، بکیان، تخت‌جمشید، جهان‌آباد، حاجی‌آباد، حسین‌آباد، دشت‌برم، ده‌کهنه، رامجرد، زرقان، زرین‌دشت، زین‌آباد، سرمیدان، سیدان، سیوند، فتوح‌آباد، فیروزآباد، قلعه‌نو، کامفیروز، کوشک، مرودشت، نقش‌رجب و هشتی‌جان) به طور تصادفی انجام گرفت. نمونه‌های به دست آمده، برای بررسی‌های بعدی به بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز منتقل شدند. جدایه‌ها به روش طعمه‌گذاری با برگ مرکبات (Tan et al. 1992) و برگ چمن (Banihashemi et al. 1996) از خاک و به روش توصیه شده توسط گانل و وبستر (Gunnell & Webster 1988) از گیاه با استفاده از محیط کشت CMA-PARP (Jeffers & Martin 1968) جداسازی شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک‌ریسه انجام شد (Tuit 1969). جدایه‌های خالص شده به لوله‌های حاوی محیط کشت عصاره ذرت-آگار منتقل و در ۱۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برنج (*Oryza sativa* L.) از قدیمی‌ترین محصولات کشت شده در دنیاست که نقش بارزی در تغذیه، درآمد و اشتغال مردم جهان و ایران دارد (Normile 2004). این گیاه به بیماری‌های گوناگونی به خصوص بیمارگرهای طوقه و ریشه حساس است. آمیست‌ها به علت شرایط ویژه زیستی در محیط‌های مرطوب از عوامل عمده بیماری‌زای برنج در سطح جهانی هستند. تاکنون، چندین گونه از جنس‌های مختلف آمیستی از فراریشه برنج گزارش شده است که برخی از آن‌ها بیمارگر برنج محسوب می‌شوند (Erwin & Ribeiro 1996).

گونه *Phytophthora erythroseptica* Pethybr به عنوان عامل تصادفی بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه برنج وحشی کشت شده (*Ziziana palustris* L.) در کالیفرنیا یافت شده است (Gunnell & Webster 1988). این شبه‌قارچ معمولا در آوند چوبی بافت‌های آلوده قرار دارد و آسپورها در محل اتصال طوقه به ریشه، دیده می‌شوند (Gunnell & Webster 1988). در برخی مطالعات گونه *P. macrospora* (SACC) S. Ito & I. Tanaka عامل سفیدک کرکی گیاهان برنج نیز مورد بررسی قرار گرفته است که ساختار آنتریدیوم و آگونیوم ظریفی دارد (Fukutomi et al. 1971).

جنس *Phytophythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lèvesque یک جنس جدید است که سابقا گونه‌های آن در *Pythium* Pringshem جای داشت (Bala et al. 2010). طبق واکاوی‌های فیلوژنتیکی لوسکو و دکاک (Lèvesque & de Cock 2004)، گونه‌های *Phytophythium* تبار کوچکی (K) را درون جنس *Pythium* تشکیل می‌داد که شامل برخی گونه‌های توصیف شده جنس *Pythium* بود. اعضای این تبار دارای خصوصیات مابین جنس‌های *Pythium* و *Phytophthora* یعنی داشتن اسپورانژیوم‌های گرد، گلابی تا تخم‌مرغی شکل، دارای افزولش داخلی شبیه جنس *Phytophthora* و افتراق زئوسپور درون ریزکیسه شبیه جنس *Pythium* هستند (de Cock et al. 2015). بررسی‌های عبدالباطن و همکاران (Abdul Baten et al. 2014) گونه‌های این جنس را در سه تبار مجزا قرار داد که تبار ۱ و ۲ با داشتن اسپورانژیوم‌های کروی و دارای پستانک از نظر ریخت‌شناختی از یکدیگر غیرقابل تفکیک و از تبار ۳ کاملا مجزا هستند. اعضای تبار ۳ اسپورانژیوم‌های کروی ولی بدون پستانک دارند (Abdul Baten et al. 2014, de Cock et al. 2015).

با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS6 (Cooke & Duncan 1997) و ITS4 (White *et al.* 1990) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2013) انجام شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با الکتروفورز در ژل یک درصد آگارز حاوی ۰/۰۰۵ درصد اتیدیوم بروماید در بافر تی‌بی‌بی (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم بی‌دی‌تی‌ای، ۵/۵ گرم اسید بوریک، آب مقطر تا حجم یک لیتر) به مدت یک ساعت و در ۹۰ ولت تایید شد. قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتوی فرابنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داکیومنتر (سین‌ژن، ایالات متحد آمریکا) عکس‌برداری و اندازه‌نوارهای به دست آمده در مقیاسه با یک نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی (Gene Ruler، فرمنتاز، بریتانیا) برآورد شد.

خالص‌سازی قطعات فزون‌سازی شده با استفاده از یک ستون خالص‌سازی (GeneJet™ PCR Purification Kit، فرمنتاز، بریتانیا) با استفاده از شیوه‌نامه شرکت سازنده انجام و خلوص محصول به دست آمده توسط الکتروفورز تایید شد. توالی‌سنجی ژن‌های فزون‌سازی شده توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی از دو جهت مستقیم و معکوس با استفاده از آغازگرهای مرتبط انجام شد. توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نرم‌افزار Bioedit (Hall 1999) با مقیاسه نسخه مستقیم و معکوس ویرایش شده، رشته‌برایند به دست آمد. رشته‌های برایند پس از ارایه به بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank> BankIt) جهانی با استفاده از نرم‌افزار (GenBank, NCBI, USA;) BankIt و اخذ رس‌شمار برای مطالعات بعدی استفاده شد.

به منظور یافتن روابط بین گونه‌های هدف با سایر گونه‌ها و همچنین آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای ارزیابی سطح تنوع ژنتیکی انجام شد. ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش شده به همراه توالی‌های به دست آمده از بانک ژن مربوط به گونه‌های معتبر (Robideau *et al.* 2011, Hyde *et al.* 2014, Martin *et al.* 2014, de Cock *et al.* 2015) با نرم‌افزار ClustalX (Thompson *et al.* 1997) انجام شده، متعاقباً به صورت دستی تنظیماتی روی آن صورت گرفت. از توالی گونه *Pythium aphanidermatum* رس‌شمار HQ643439 به عنوان گروه خارجی برای درخت فیلوژنتیکی گونه‌های *Phytophthora* و از توالی گونه *Phytophthora infestans* رس‌شمار AF266779

- شناسایی جدایه‌ها

شناسایی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود (van der Plaats-Niternick 1981, Gallegly & Hong 2015, Abdul Baten *et al.* 2014, de Cock *et al.* 2008) و سایر مقاله‌های معتبر براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و فیزیولوژیکی انجام گرفت. شناسایی گونه‌ها براساس ویژگی‌های اندام‌های جنسی و غیرجنسی (نوع اسپورانژیوم، شکل و تزیینات سطح آگونیوم، نوع اتصال آنتریدیوم به آگونیوم و نوع آسپور)، سرعت رشد در دماهای مختلف (از پنج تا ۴۰ درجه سلسیوس به فواصل دمایی پنج درجه سلسیوس) و ریخت‌شناسی پرگنه روی محیط کشت‌های مختلف شامل عصاره ذرت-آگار (CMA)، عصاره هویج-آگار (CA)، عصاره مخمر-آگار (MEA)، عصاره شاهدانه-آگار (HSA) و عصاره سیب‌زمینی دکستروز-آگار (PDA) (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi 2005) انجام شد.

- آزمون پوسیدگی صورتی غدد سیب‌زمینی در گونه‌های *Phytophthora*
این آزمون به عنوان شاخصی برای شناسایی گونه‌های *Phytophthora* مربوط به تبار ۸ (Cooke *et al.* 2000) انجام گرفت. پس از ضدعفونی سطحی غده‌ها با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد و شست‌وشوی مجدد آن‌ها به وسیله آب مقطر سترون، قطعات شش میلی‌متری از بافت غده جدا و قطعاتی به همین اندازه از حاشیه جوان پرگنه‌های بیمارگر در زخم‌های ایجاد شده قرار گرفت. سپس قطعات بریده شده غده‌ها به محل اولیه خود برگردانده شد و محل زخم با استفاده از نوارچسب و پارافیلیم بسته شد. غده‌ها به مدت پنج تا ۱۰ روز در ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. نتایج پس از مایه‌زنی با مشاهده علائم و کشت بافت‌های آلوده روی محیط کشت CMA-PARP بررسی گردید (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2007).

- مطالعات فیلوژنتیکی

استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2013) و با استفاده از کیت DNG™-PLUS (سین‌ژن، ایران) و به روش توصیه شده توسط تولیدکننده انجام گرفت. کیفیت و کمیت دی‌ان‌ای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ام-دی (نانودراپ تکنولوژی، ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد. دی‌ان‌ای مربوط به فاصله ترانویسی شده داخلی (آی‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریبوزومی

CA به صورت گل‌سرخ و روی CMA بدون الگوی رشد بود (جدول ۲، شکل ۱). قطر ریشه اصلی ۵ میکرومتر، اسپورانژیوم کروی تا گلابی شکل، انتهایی یا بین‌ریشه‌ای، دارای پستانک و افزولش و دارای قطری معادل ۱۷ تا ۳۲ میکرومتر (میانگین ۲۶ میکرومتر) بود (شکل ۲). متوسط رشد شعاعی این گونه در ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی-آگار، ۱۲ میلی‌متر در روز بود. تمام جدایه‌های این گونه عقیم و دارای دمای رشد کمینه ۱۰، بهینه ۲۵ و بیشینه ۴۰ درجه سلسیوس بودند. این گونه در تبار ۱ از درخت فیلوژنتیکی گونه‌های جنس *Phytophythium* قرار گرفت (شکل ۳).

از میان سه گونه *Phytophythium* جدا شده در این پژوهش شامل *Phy. ostracodes*، *Phy. litorale* و *Phy. sterile* دو گونه *Phy. litorale* و *Phy. sterile* از نظر فیلوژنتیکی بسیار به هم نزدیک هستند. هر دو گونه طبق نظر عبدالباطن و همکاران (Abdul Baten et al. 2014) در تبار ۱ از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس گونه‌های *Phytophythium* قرار می‌گیرند. این دو گونه از نظر ریخت‌شناختی نیز به هم شباهت بسیار زیادی داشتند و هر دو اسپورانژیوم گرد تا تخم‌مرغی پستانک‌دار تولید کردند. در گونه *Phy. litorale* ساختارهای غیرجنسی به فراوانی در محیط مایع (شاهدانه سترون و آب‌مقطر سترون) دیده شدند، اما در گونه *Phy. sterile* ساختارهای غیرجنسی در محیط مایع به سختی بعد از حدود یک هفته تا ۱۰ روز تشکیل شدند. هیچیک از دو گونه قادر به تولید ساختارهای جنسی نبودند. با این حال، این دو گونه از نظر الگوی رشد پرگنه و دمای رشدی با هم تفاوت داشتند.

پرگنه *Phy. litorale* روی محیط کشت‌های MEA و HSA دارای الگوی رشد حدواسط الگوهای گل‌سرخ و یکنواخت و روی محیط کشت‌های PDA، عصاره CA دارای الگوی رشد گل‌سرخ و روی محیط کشت CMA فاقد الگوی رشد مشخص بود. اما پرگنه *Phy. sterile* روی محیط کشت PDA دارای الگوی حدواسط الگوهای گل‌سرخ و گل‌داوودی؛ روی MEA دارای الگوی رشد حدواسط الگوهای شعاعی و یکنواخت و روی محیط کشت‌های CA، HSA و CMA به ترتیب دارای الگوی رشد گل‌سرخ، شعاعی و بدون الگوی رشد بود (جدول ۲).

دمای رشد برای *Phy. litorale* کمینه ۱۰، بهینه ۳۰ و بیشینه ۳۵ درجه سلسیوس بود، ولی برای *Phy. sterile* کمینه ۱۰ بهینه ۲۵ و بیشینه ۴۰ درجه سلسیوس بود. همچنین،

به عنوان گروه خارجی در رسم درخت فیلوژنتیکی گونه‌های *Phytophythium* استفاده شد. پارامترهای مدل شامل پارامترهای میزان ناهمگونی (rate heterogeneity) و جایگزینی (substitution) مانند: نسبت مورد انتظارگذار به تراگشت (transition/transversion ratios)، پراکنش گامای پارامتر آلفا و لگاریتم طبیعی احتمال با استفاده از نرم‌افزار PUZZLE (Strimmer & von Haeseler 1996) تخمین زده شد. واکاوی فیلوژنتیکی پیوست همسایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار PHYMLIP (Felsenstein & Churchill 1996) به روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfzadeh-Ghalamfarsa 2013) انجام و ثبات تبارهای حاصل با ۵۰۰ دور آزمون بوت‌استرپ سنجیده شد. کلیه درخت‌های فیلوژنتیکی در پایگاه اطلاعاتی TreeBASE (<https://treebase.org>) وارد و شماره دسترسی اخذ شد.

نتیجه و بحث

حاصل نمونه‌برداری طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۲ از خاک خزانه و مزارع برنج نقاط مختلف استان فارس ۲۴ جدایه مربوط به جنس‌های *Phytophthora* و *Phytophythium* بود (جدول ۱). ویژگی‌های ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و فیزیولوژیک جدایه‌ها در جدول‌های ۲ و ۳ آمده است. با توجه به داده‌های به دست آمده، دو گونه *Phytophthora* شامل *P. inundata* Brasier، *P. pseudocryptogea* Sanch. Hern. & S.A. Kirk و Safaiefarahani، Mostowfzadeh، Hardy & T.I. Burgess سه گونه *Phytophythium* شامل *Phy. litorale* (Nechw.)، Abad، de Cock، Bala، Robideau، Lodhi & Lévesque، *Phy. ostracodes* (Drechsler) Abad، de Cock، Bala، *Phy. sterile* Belbahri & Robideau، Lodhi & Lévesque Lefort شناسایی شدند. تمامی گونه‌های ذکر شده برای نخستین بار از فراریشه برنج در دنیا گزارش می‌شوند. گونه *Phy. sterile* برای گونه‌های آلمیست در ایران جدید است. در ادامه توصیف گونه *P. sterile* آورده شده است:

Phytophythium sterile Belbahri & Lefort 2006

جدایه‌های این گونه از خزانه و شالیزارهای برنج شمال‌غربی استان فارس جداسازی شدند (جدول ۱). الگوی رشد پرگنه روی محیط کشت‌های PDA به صورت حدواسط الگوهای گل‌سرخ و گل‌داوودی؛ روی MEA به صورت حدواسط الگوهای شعاعی و یکنواخت؛ روی HSA به صورت شعاعی، روی

نیز هم‌پایه و دارای افزولش داخلی بود. مطالعات بریزر و همکاران (Braisier et al. 2003) نشان داد که جدایه‌های *P. inundata* یا کاملاً دگرگتال هستند یا نیمه‌دگرگتال. طبق نظر صفایی‌فراهانی و همکاران (Safaeifarhani et al. 2013)، این امر یک افتراق جزئی از سازوکار جنسی در این گونه را نشان می‌دهد. واکاوی فیلوژنتیکی جدایه‌های این گونه موقعیت آن‌ها را در تبار ۶ درخت آی‌تی‌اس گونه‌های فیتوفتورا تایید کرد (شکل ۵). جدایه‌هایی از این گونه از چغندرگند (*Beta vulgaris* L.)، بادمجان (*Solanum melogena* L.) و باقلا (*Vicia fabae* L.) از کشور گزارش شده است (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi 2005, Taheri et al. 2013). این نخستین گزارش از وجود گونه‌های این جنس در شالیزارهای برنج استان فارس است.

گونه *P. pseudocryptogea* از شالیزارهای نواحی شمالی و شمال‌غربی استان فارس جدا شد. تمامی جدایه‌های این گونه تولید اسپورانژیوم انتهایی، بدون پستانک، تخم‌مرغی شکل تا بیضوی و دارای افزولش داخلی و خارجی به همراه آگونیوم‌های صاف و کروی، آسپورهای ناپرساز و نیز آنتریدیوم منفرد پیراماده کردند (شکل ۴). جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش از نظر ریخت‌شناختی با توصیفات صفایی‌فراهانی و همکاران (Safaeifarhani et al. 2015b) بسیار نزدیک بودند. مارتین و همکاران (Martin et al. 2014) با استفاده از چهار ناحیه نوکلئوتیدی، تبار ۸ فیتوفتورا را به چهار زیرتبار (8a, 8b, 8c, 8d) تقسیم کردند. در واکاوی‌های فیلوژنتیکی درخت آی‌تی‌اس، گونه به تازگی توصیف شده *P. pseudocryptogea* در تبار ۸ و زیرتبار 8a قرار گرفت (Safaeifarhani et al. 2015b). این گونه به گونه *P. erythroseptica* Pethybr & Laff و *P. cryptogea* از نظر ریخت‌شناختی و هم از نظر فیلوژنتیکی شباهت زیادی دارد. رفتار هم‌تالی گونه *P. erythroseptica*، آن را از گونه *P. pseudocryptogea* تفکیک می‌کند. همچنین، داشتن تمامی ویژگی‌های گفته شده به همراه آسپورهای ناپرساز یا پرساز گونه *P. pseudocryptogea* را از گونه *P. cryptogea* که تنها تولید آسپورهای ناپرساز می‌کند، تفکیک می‌نماید. مستوفی‌زاده قلمفرسا و همکاران (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al. 2010) با استفاده از واکاوی‌های دودمان‌های چندژنی نشان دادند که گونه *P. cryptogea* دارای تنوع درون‌گونه‌ای است و سه دودمان مجزا در آن قابل مشاهده است که به صورت *P. cryptogea* GI، *P. cryptogea* GII و *P. cryptogea* GIII

با واکاوی توالی‌های جدایه‌های *Phy. litorale* مشخص شد که این گونه در ناحیه ۱۵۹ تا ۱۸۶ فاصله ترانویسی شده داخلی دارای چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism= SNP) است. این ویژگی با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن نیز مقایسه شد. تمام جدایه‌هایی که با این نام جداسازی شدند، دارای این ویژگی بودند. وجود چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در *Phy. sterile* دیده نشد. گونه *Phy. litorale* پیش از این در ایران، تنها یک‌بار از گیاه علفی (*Juncus* sp.) از منطقه میانه و مشکین‌شهر گزارش شده است (Chenari Bouket et al. 2016). این دومین گزارش از وجود این گونه در ایران و نخستین گزارش از بیماری‌زایی آن روی گیاهچه‌های برنج در دنیا است. همچنین، وجود گونه *Phy. sterile* در ایران برای نخستین‌بار در این پژوهش گزارش می‌شود.

گونه *Phy. ostracodes* هم از نظر ریخت‌شناختی و هم از نظر فیلوژنتیکی با دو گونه دیگر *Phytophythium* کاملاً تفاوت داشت. این گونه در محیط کشت‌های جامد و مایع ساختارهای جنسی و غیرجنسی را به فراوانی تولید کرد. تمام جدایه‌های این گونه تولید اسپورانژیوم‌های پستانک‌دار و با افزولش داخلی به همراه آسپورهای پرساز، صاف و یک تا دو عدد آنتریدیوم پیراماده کردند. اندازه‌گیری‌های انجام شده در این پژوهش، با مطالعات واندرپلاتس-نیتزیک (۱۹۸۱) بسیار نزدیک بود (جدول ۳). این گونه در تبار ۱ از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس (*Phytophythium* Abdul Baten et al. 2014) قرار می‌گیرد (شکل ۳). یافته‌های پژوهش حاضر نیز با یافته‌های این محققان مطابقت داشت. این گونه قبلاً از خاک مناطق مختلف استان آذربایجان غربی توسط بابایی اهری و همکاران (Babai-Ahary et al. 2004) و از استان فارس توسط مستوفی‌زاده قلمفرسا و بنی‌هاشمی (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi 2005) به عنوان یکی از گونه‌های جنس *Pythium* گزارش شد. این سومین گزارش از وجود این گونه در ایران است.

گونه *P. inundata* از دیگر آمیست‌های جدا شده از خزانه و شالیزارهای برنج نواحی شمال و شمال‌غربی استان فارس بود. تمامی بررسی‌های ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی انجام شده در مورد این گونه با نتایج حاصل از بررسی‌های صفایی‌فراهانی و همکاران (Safaeifarhani et al. 2013) مطابقت داشت (جدول ۳، شکل‌های ۴ و ۵). اسپورانژیوم و تورم ریشه در محیط مایع (آب مقطر سترون و شاهدانه سترون یا شاهدانه سترون و عصاره خاک غیرسترون) تولید شدند (شکل ۴). اسپورانژیوسپور

دومین گزارش از وجود این گونه در کشور است. تمام جدایه‌های گونه *P. pseudocryptogea* قادر به ایجاد پوسیدگی صورتی روی غده سیب‌زمینی بودند.

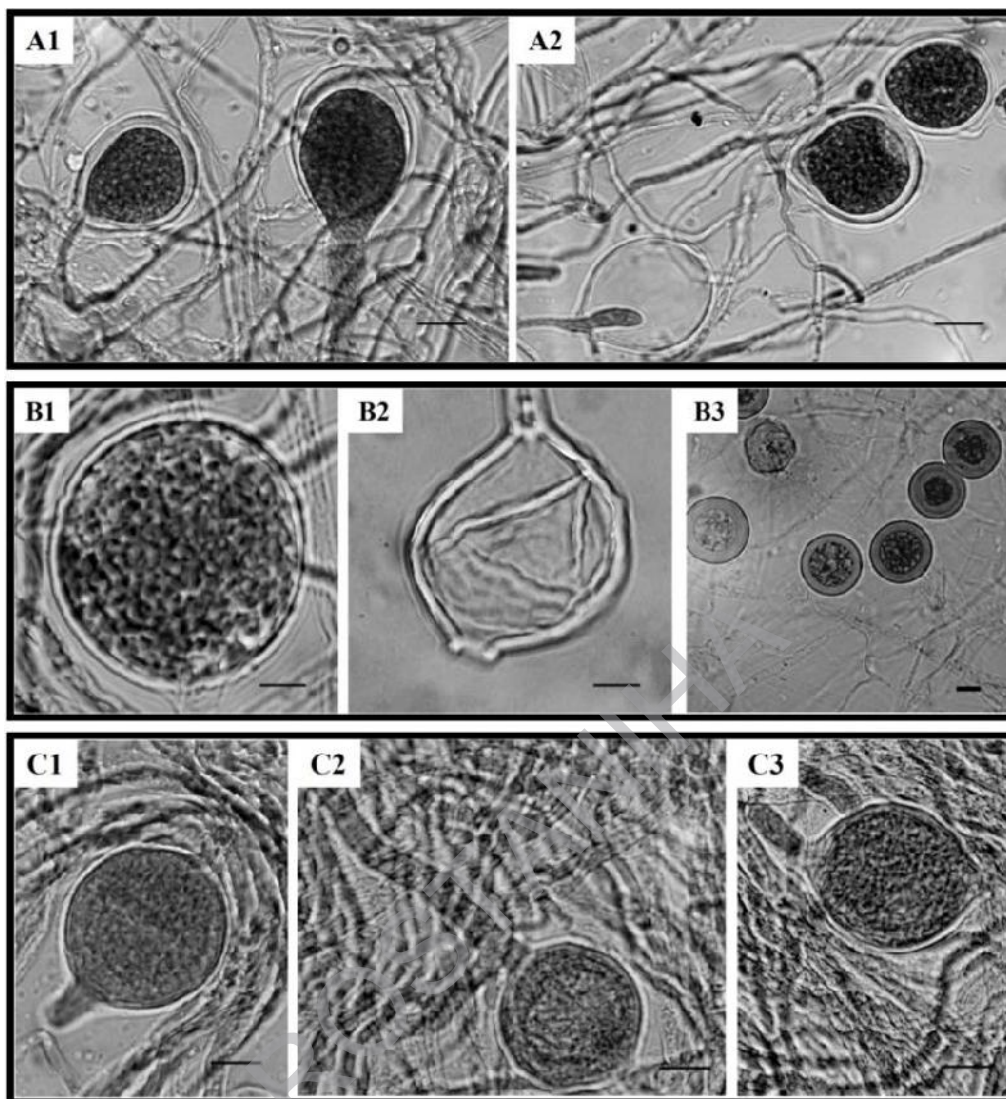
تمام گونه‌های *Phytophthium* به دست آمده از این پژوهش، متعلق به تبار ۱ از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس فیتوپیتیوم بودند. غالب گونه‌های این جنس از منطقه کامفیروز جداسازی شدند (جدول ۱). گونه‌های *Phytophthora* نیز متعلق به تبارهای ۶ و ۸ و دارای اسپورانژیوم‌های فاقد پستانک بودند که غالب گونه‌های آن از منطقه رامجرد جداسازی شدند (جدول ۱).

نامگذاری شدند. هیچ صفت متمایزکننده ریخت‌شناختی یا فیزیولوژیکی بین دودمان‌های *P. cryptogea* وجود ندارد و جداسازی این دودمان‌ها تنها با استفاده از واکاو‌های مولکولی امکان‌پذیر است که گروه سوم به گونه *P. pseudocryptogea* تغییر نام پیدا کرد (Safaeifarhani et al. 2015b). یافته‌های حاصل از مطالعات ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی جدایه‌های مربوط به گونه *P. pseudocryptogea* با یافته‌های صفایی فراهانی و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت (جدول ۳، شکل‌های ۴ و ۵). این گونه به تازگی از ایران از بادمجان (*Solanum melongena*) گزارش شده (Safaeifarhani et al. 2015a) و



شکل ۱- ریخت‌شناسی پرگنه *Phytophthium sterile*: جدایه KH1-2 پس از ۷۲ ساعت در ۲۵ درجه سلسیوس. ردیف بالا به ترتیب از چپ به راست: روی محیط کشت‌های عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA)، عصاره مخمر-آگار (MEA) و عصاره هویج-آگار (CA). ردیف پایین به ترتیب از چپ به راست: عصاره شاهدانه-آگار (HSA) و عصاره ذرت-آگار (CMA).

Fig. 1. Colony morphology of *Phytophthium sterile*: Isolate KH1-2 after 72 hours at 25° C. Top (from left to right): potato-dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA) and carrot agar (CA). Bottom (from left to right): hempseed agar (HSA) and cornmeal agar (CMA).



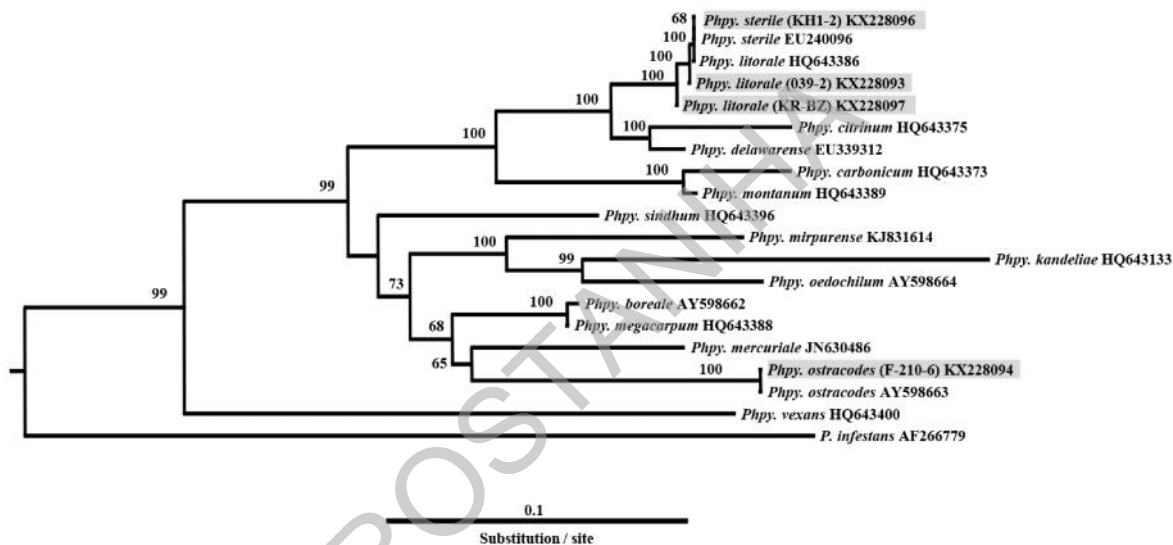
شکل ۲- ریخت‌شناسی گونه‌های *Phytophthium* جدا شده از شالیزارهای برنج در استان فارس: A. ریخت‌شناسی *Phytophthium sterile*، جدایه KH1-2. A1. اسپورانژیوم‌های تخم‌مرغی شکل، A2. اسپورانژیوم‌های بیضوی تا تخم‌مرغی شکل به همراه اسپورانژیوم تخلیه شده (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)؛ B. ریخت‌شناسی *Phytophthium ostracodes*، جدایه F-210-6. B1. اسپورانژیوم کاملاً گرد، B2. اسپورانژیوم تخلیه شده با افزولش داخلی، B3. آاسپوره‌های کاملاً پرساز (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)؛ C. ریخت‌شناسی *Phytophthium litorale*، جدایه Kr-Bz. C1. اسپورانژیوم کاملاً گرد با لوله تخلیه کوتاه، C2. اسپورانژیوم کاملاً گرد با لوله تخلیه بسیار بلند، C3. اسپورانژیوم تخم‌مرغی با لوله تخلیه کوتاه (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2. Morphology of *Phytophthium* species isolated from rice paddy fields in Fars province (Iran): A. Morphology of *Phytophthium sterile*, Isolate KH1-2. A1. Ovoid sporangia, A2. Ellipsoid to ovoid sporangia with discharged sporangium (Bar = 10 μ m); B. Morphology of *Phytophthium ostracodes*, Isolate F-210-6. B1. Spherical sporangium, B2. Discharged sporangium with internal proliferation, B3. Plerotic oospores (Bar = 10 μ m); C. Morphology of *Phytophthium litorale*, Isolate Kr-Bz. C1. Spherical sporangium with short discharged tube, C2. Globose sporangium with long discharged tube, C3. Ovoid sporangium with short discharged tube (Bar = 10 μ m).

پژوهش بلبللی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (۲۰۱۵) گزارش شده است. بنابراین، امکان وجود جنس‌های جدید آمیستی برای فلور ایران وجود دارد. بیماری‌زایی گونه‌های حاصل از این پژوهش روی سایر میزبان‌های مهم اقتصادی به خصوص سایر غلات از موارد مهمی است که می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد. بررسی روابط متقابل این گونه‌ها با یکدیگر در محیط فراریشه برنج نیز حایز اهمیت است.

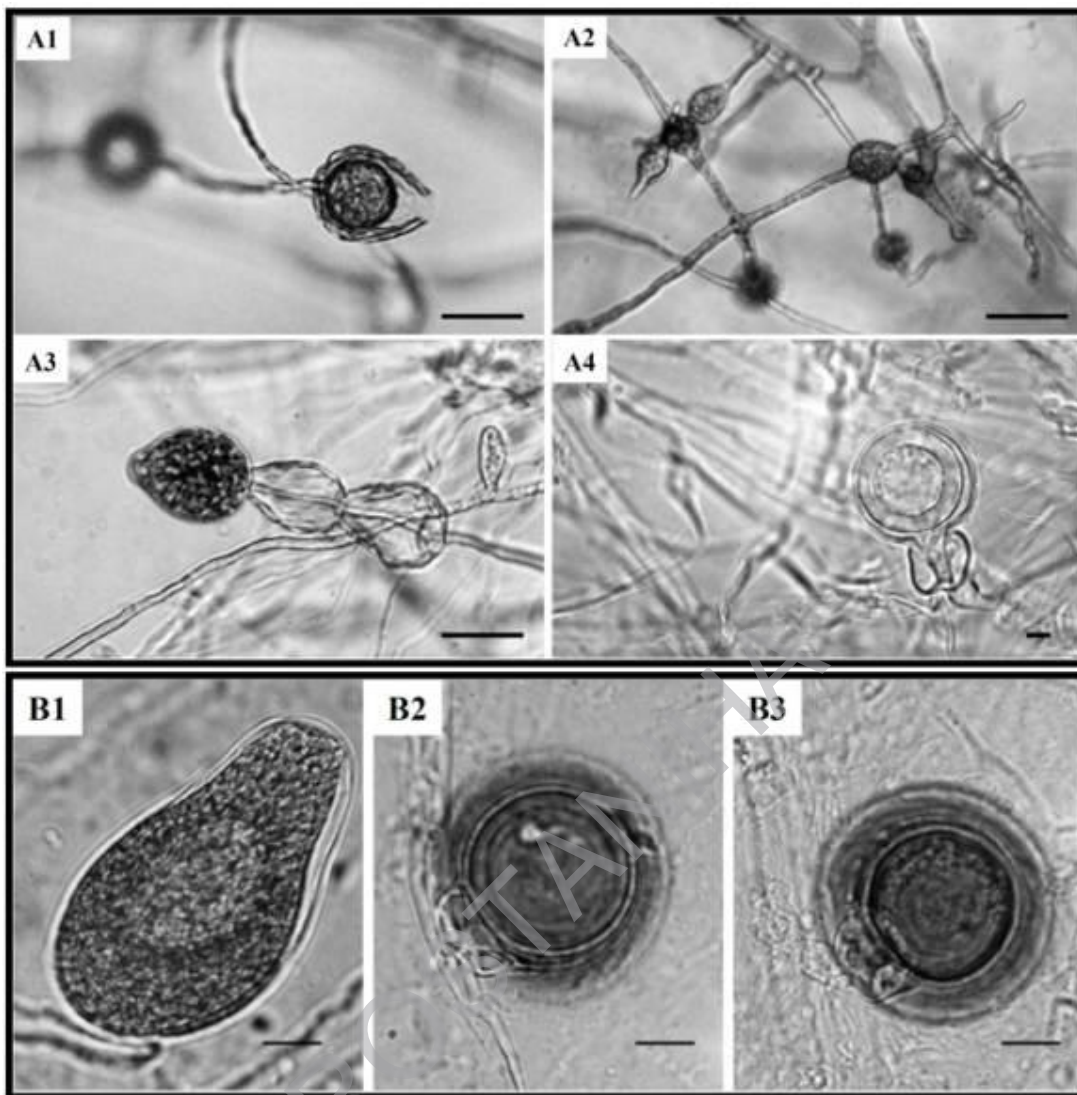
به طور کلی، به نظر می‌رسد که شالیزارهای برنج، زیست‌بومی مناسب برای فعالیت آمیست‌ها هستند. تنوع زیستی یافت شده، مؤید این امر است. وجود گونه‌های بیمارگر ممکن است خطری بالقوه برای کشت برنج یا سایر محصولات اقتصادی در منطقه باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که سایر شالیزارهای برنج ایران خصوصا استان‌های شمالی کشور (گیلان، مازندران و گلستان) مورد بررسی گونه‌های آمیستی قرار گیرند.

شواهد مبنی بر تایید وجود جنس‌های آمیستی جدید در استان فارس در مورد جنس *Pythiogeton* پیش از این در



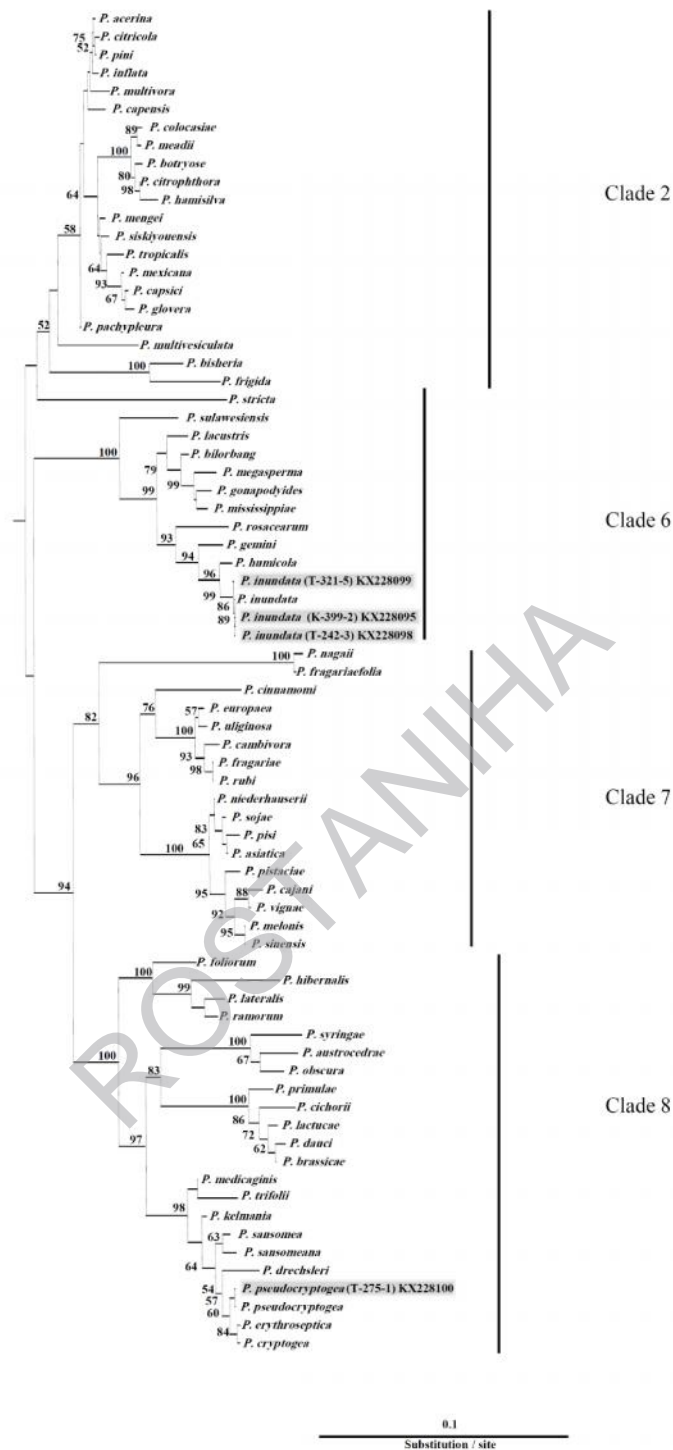
شکل ۳- موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Phytophythium* spp. در استان فارس در بین ۱۶ گونه *Phytophythium* براساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی آی‌تی‌اس در درخت پیوست همسایه‌ها (رس‌شمار TreeBase: ۱۹۲۳۶). اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده درصد مقادیر بوت‌استرپ بزرگ‌تر و یا مساوی ۵۰ درصد است.

Fig. 3. Phylogenetic relationships of *Phytophythium* spp. in Fars province (Iran) among 16 *Phytophythium* species based on the comparison of ITS sequences in neighbor joining tree (TreeBase Accession No.: 19236). Numbers above the branches represent the bootstrap values equal to or greater than 50%.



شکل ۴- ریخت‌شناسی گونه‌های *Phytophthora* جدا شده از شالیزارهای برنج استان فارس: A. گونه *Phytophthora inundata*. جدایه T-321-5. A1. اسپورانژیوم با افزولش داخلی (مقیاس = ۲۰ میکرومتر)، A2. تورم‌های ریشه (مقیاس = ۲۰ میکرومتر)، A3. اسپورانژیوم با افزولش خارجی (مقیاس = ۲۰ میکرومتر)، A4. آسپورهای ناپرساز به همراه آنترییدیوم پیراماده (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)؛ B. گونه *Phytophthora pseudocryptoea*. جدایه T-275-1. B1. اسپورانژیوم بدون پستانک و تخم‌مرغی، B2. آسپور پرساز، B3. آسپور با آنترییدیوم پیراماده (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 4. Morphology of *Phytophthora* species isolated from rice paddy fields in Fars province (Iran): A. Morphology of *Phytophthora inundata*, Isolate T-321-5. A1. Sporangium with internal proliferation (Bar = 20 μ m), A2. Hyphal swellings (Bar = 20 μ m), A3. Sporangium with external proliferation (Bar = 20 μ m), A4. Aplerotic oospore with amphigynous antheridium (Bar = 10 μ m); B. Morphology of *Phytophthora pseudocryptoea*, Isolate T-275-1. B1. Non-papillated, ovoid sporangium, B2. Plerotic oospore, B3. Oospore with amphigynous antheridium (Bar = 10 μ m).



شکل ۵- موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Phytophthora* spp. در استان فارس در بین سایر گونه‌های *Phytophthora* براساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی آی‌تی‌اس در درخت پیوست همسایه‌ها (رس‌شمار TreeBase: ۱۹۲۳۶). اعداد روی انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده درصد مقادیر بوت‌استرپ بزرگ‌تر یا مساوی ۵۰ درصد است.

Fig. 5. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* spp. in Fars province (Iran) among other *Phytophthora* species based on the comparison of ITS sequences in neighbor joining tree (TreeBase Accession No.: 19236). Numbers above the branches represent the bootstrap values equal to or greater than 50%.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های شالیزارهای برنج در استان فارس به همراه رس‌شمار آن‌ها

Table 1. Characteristics of isolates from rice paddy fields of Fars province (Iran) with their accession numbers

Taxon	Isolate [†]	Location	Date	Substrate	Coordinates	GenBank Accession No. [*]
<i>Phytophthora inundata</i>	K-399-2	Kamfiruz (Ghale no)	2014	irrigation water	30°16'.748"N 052°19'.255"E	KX228095
	T-242-3	Persepolis (Hajiabad)	2014	crown	29°59'.180"N 052°54'.112"E	KX228098
	T-321-5	Persepolis (Hashijan)	2014	root	29°58'.942"N 052°56'.804"E	KX228099
	K2	Ramjard (Fotouhabad)	2014	field soil	30°07'.403"N 052°32'.850"E	N/A
	K4	Ramjard (Jahanabad)	2014	field soil	30°07'.895"N 052°32'.347"E	N/A
	KrC5	Kamfiruz (Ghale no)	2014	field soil	30°16'.737"N 052°19'.236"E	N/A
	Ths299	Persepolis (Hashtijan)	2014	nursery soil	29°58'.907"N 052°57'.850"E	N/A
	Ths300	Persepolis (Hashtijan)	2014	nursery soil	29°58'.911"N 052°57'.854"E	N/A
	Ths305	Persepolis (Hashtijan)	2014	nursery soil	29°58'.883"N 052°58'.010"E	N/A
	Ts1	Persepolis (Dasht-e-Barm)	2014	field soil	30°00'.740"N 052°58'.074"E	N/A
<i>P. pseudocryptogea</i>	T-275-1	Persepolis (Hajiabad)	2014	root	29°58'.944" N 052°56'.557" E	KX228100
	KzC12	Kamfiruz (Dehkohne)	2015	field soil	30°18.212"N 052°17'.650"E	N/A
	Mz3	Ramjard (Kooshkak)	2015	field soil	30°05'.804"N 052°35'.489"E	N/A
	Ts2	Persepolis (Hajiabad)	2014	field soil	29°58'.954"N 052°56'.418"E	N/A
	TsC1	Persepolis (Hashtijan)	2014	field soil	29°58'.901"N 052°57'.228"E	N/A
	TsCr1	Persepolis (Dasht-e-Barm)	2014	field soil	30°00'.595"N 052°58'.290"E	N/A
<i>Phytophthora litorale</i>	039-2	Kamfiruz (Ghale no)	2014	field soil	30°16'.727"N 052°19'.268"E	KX228093
	Kr-Bz	Kamfiruz (Ghale no)	2015	nursery soil	30°16'.728"N 052°19'.269"E	KX228097
	KrC1	Kamfiruz (Ghale no)	2014	field soil	30°16'.725"N 052°19'.271"E	N/A
<i>Phy. ostracodes</i>	F-210-6	Firuzabad (Kelisan)	2014	irrigation water	28°52'.182"N 052°31'.364"E	KX228094
	F-211-6	Firuzabad (Keyzarrin)	2014	nursery soil	28°52'.865"N 052°31'.773"E	N/A
<i>Phy. sterile</i>	KH1-2	Kamfiruz (Hosseinabad)	2014	field soil	30°17'.417"N 052°18'.688"E	KX228096
	As5	Ramjard (Esmaeilabad)	2014	field soil	30°06'.898"N 052°34'.348"E	N/A
	Ssh1	Kamfiruz (Ghale no)	2015	field soil	30°16'.742"N 052°19'.244"E	N/A

[†]Codes for the Mycological Collections of the Department of Plant Protection, Shiraz University, Shiraz, Iran^{*}Internal Transcribed Spacer of rDNA (ITS)

جدول ۲- ریخت‌شناسی پرگنه و میزان رشد (میلی‌متر در روز) گونه‌های آمیستی شالیزارهای برنج در استان فارس در ۲۵ درجه سلسیوس در محیط کشت‌های مختلف

Table 2. Colony morphology and growth rate (mm/d) of oomyceteous species from rice paddy fields of Fars province (Iran) at 25° C on various media

Taxon	Isolate	HSA ¹		MEA ²		CA ³		PDA ⁴		CMA ⁵	
		Growth	Colony	Growth	Colony	Growth	Colony	Growth	Colony	Growth	Colony
<i>Phytophthora inundata</i>	K-399-2	7.7	Rad ⁶	6.1	Rad	4.6	Rad	5.6	Ros	3.3	Rad
<i>P. pseudocryptogea</i>	T-275-1	8	Ros	6	Ros	6	Rad	5.5	Ros	6.5	Rad
<i>Phytophythium litorale</i>	Kr-Bz	2	Med	9	Med	13	Ros	13	Ros	7	NP
<i>Phy. ostracodes</i>	F-210-6	12	Med	10	NP	12	Ros	14	Ros	4	Rad
<i>Phy. sterile</i>	KH1-2	4	Rad	9	Med	13	Ros	13	Med	7	NP

HSA= Hempseed agar; ² MEA= Malt extract agar; ³ CA= Carrot agar; ⁴ PDA= Potato dextrose agar; ⁵ CMA= Corn meal agar; ⁶ Rad= rRadiate, Ros= rosette, Med= mediated, NP= no particular pattern

جدول ۳- مقایسه خصوصیات ریخت‌شناختی گونه‌های آمیستی در این پژوهش

Table 3. Comparison of morphological characteristics of oomyceteous species in this study

Characters	Taxon				
	<i>Phytophthora inundata</i>	<i>P. pseudocryptogea</i>	<i>Phytophythium litorale</i>	<i>Phy. ostracodes</i>	<i>Phy. sterile</i>
Sporangia					
Papillae	-	-	+	+	+
Average length (µm)	77.7	42.4	27.1	31.1	-
Range length (µm)	65-79	34.3-50	21.7-28.1	16-38	-
Average width (µm)	50.5	30.3	25.5	28.7	27.5
Range width (µm)	45-61	19.9-34.6	22.9-25.9	25-55	16.9-32.7
Length: width ratio	1.3	1.6	1.4	1.5	-
Shapes	ovoid	ovoid, Globose	globose to ovoid	globose	spherical
Proliferation	+	+	+	+	+
Average pore diam. (µm)	10	8.1	-	-	-
Range (µm)	8.8-12	4-9.9	-	-	-
Mating type	A1	A1	sterile	homothallic	sterile
Oogonia					
Average diam. (µm)	34.9	36.1	-	35.1	-
Range (µm)	24-42	27.7-43.2	-	30.9-40.4	-
Oospores				+	
Average diam. (µm)	33.3	30.8	-	33.3	-
Range (µm)	18-35	23.2-40.2	-	31.1-40.8	-
Type	aplerotic	aplerotic	-	plerotic	-
Oospore wall average (µm)	4	1.8	-	4.1	-
Antheridia					
Average diam. (µm)	15.5	11.5	-	11 × 6	-
Range (µm)	13.9-16.8	9.3-13.4	-	10 × 5-20 × 7	-
Hyphae					
Average width (µm)	6	4.1	3.5	4.8	5
Range (µm)	4.8-7.6	3.9-4.5	3-5	4.4-6	5-6

References

- Abdul Baten, M.D., Asano, T., Motohashi, K., Ishiguro, Y., Ziaur Rahman, M., Inaba, Sh., Suga, H. & Kageyama, K. 2014. Phylogenetic relationships among *Phytophythium* species, and re-evaluation of *Phytophythium fagopyri* comb. nov. recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. *Mycological Progress* 13(4): 1145–1156.
- Babai-Ahary, A., Abrinnia, M. & Majidi Heravan, I. 2004. Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off in suger beet in northwest Iran. *Australasian Plant Pathology* 33(3): 343–347.
- Bala, K., Robideau, G.P., Lèvesque, A., de Cock, A.W.A.M., Adad, Z.G., Lodhi, A.M., Shahzad, S., Ghaffar, A. & Coffey, M.D. 2010. *Phytophythium* Adad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lèvesque gen. nov. and *Phytophythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Lèvesque sp. nov. *Persoonia* 24: 136–137.
- Banihashemi, Z., MacDonald, J.D. & Stite, J. 1992. Combine baiting and ELISA to detect and quantify *Phytophthora* spp. in container media. *Phytopathology* 82: 1101 (Abstract).
- Bolboli, Z. 2013. Phylogenetic relationship and taxonomic characteristics of the dominant homothallic isolates of *Pythium* spp. in cereal fields of Fars province. Master's Thesis, Shiraz University, Shiraz, Iran.
- Bolboli, Z. & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. 2015. Phylogenetic relationships and taxonomic characteristics of *Pythium* spp. isolates in cereal fields of Fars province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51(4): 471–492.
- Brasier, C.M., Cooke, D.E.L., Duncan, J.M. & Hansen, E.M. 2003. Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides*- *P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or strile. *Mycological Research* 107(3): 277–290.
- Chenari Bouket, A., Babai-Ahari, A., Arzanlou, M. & Tojo, M. 2016. Morphological and molecular characterization of *Phytophythium litorale* and *Pp. oedochilum* from Iran. *Nova Hedwigia* 102(1–2): 257–270.
- Cooke, D.E.L. & Duncan, J.M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. *Mycological Research* 101(6): 667–677.
- de Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S. & Lèvesque, C.A. 2015. *Phytophythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* 34: 25–39.
- Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, 592 pp., St. Paul, Minnesota, USA.
- Felsenstain, J. & Churchill, G.A. 1996. A hidden markov model approach to variation among sites in the rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution* 13(1): 93–104.
- Fukutomi, M., Akai, S. & Shiraishi, M. 1971. Fine structure of anthridia and oogonia of *Phytophthora macrospora*, the downy mildew fungus of rice plants. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 43(3): 249–258.
- Gallegly, M.E., ChuanXue, H. & Hong, C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press, 158 pp. USA.
- Gunnell, P.S. & Webster, R.K. 1988. Crown and root rot of cultivated wild rice in California caused by *Phytophthora erythroseptica* sensu lato. *Plant Disease* 72(10): 909–910.
- Hall, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41: 95–98.

- Hyde, K.D., Nilsson, H.R., Alias, S.A., Ariuawansa, H.A., Blair, J.E., Cai, L., de Cock, A.W.A.M., Dissanayake, A.J., Glockling, S.L., Goonasekara, I.D., Gorezak, M., Hahn, M., Jayawardena, R.S., van Kan, J.A.L., Laurence, M.H., Lévesque, C.A., Li, X., Liu, J., Maharachchikumbura, S.S.N., Manamgoda, D.S., Martin, F.N., McKenzie, E.H.C., McTaggart, A.R., Mortimer, P.E., Nair, P.V.R., Pawlowska, J., Rintoul, T.L., Shivas, R.G., Spies, C.F.J., Summerell, B.A., Taylor, P.W.J., Terhem, R.B., Udayanga, D., Vaghefi, N., Walther, G., Wilk, M., Wrzosek, M., Xu, J., Yan, J. & Zhou, N. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I 2014. *Fungal Diversity* 67(1): 21–125.
- Jeffers, S.N. & Martin, S.B. 1968. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70(11): 1035–1043.
- Lévesque, C.A. & de Cock, A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108(12): 1363–1383.
- Martin, F.N., Blair, J.E. & Coffey, M.D. 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics & Biology* 66: 19–32.
- Mirsoleimani, Z. & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. 2013. Characterization of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis, based on host range, morphology and ribosomal genome. *Phytopathologia Mediterranea* 53(1): 501–506.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. & Banihashemi, Z. 2005. Identification of soil *Pythium* species in Fars province of Iran. *Iranian Journal of Science and Technology* 29(A1): 79–87.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Cooke, D.E.L. & Banihashemi, Z. 2006. Multiple gene genealogies approach for phylogenetic relationship of *Phytophthora inundata* and other *Phytophthoras*. *Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran*, p. 434.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Panabieres, F., Banihashemi, Z. & Cooke, D.E.L. 2010. Phylogenetic relationship of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff and *P. drechsleri* Tucker. *Mycological Research* 114(4): 325–339.
- Normile, D. 2004. Yangtze seen as earliest rice site. *Science* 275(5298): 309–310.
- Robideau, G.P., de Cock, A.W.A.M., Coffey, M.D., Volgmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Desaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M., Hu, C.H., Kupper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C., Zhang, Y., Bonants, P.J., Ristaino, J.B. & Lévesque, A.C. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11(6): 1002–1011.
- Safaeifarahani, B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. & Cooke, D.E.L. 2013. Characterization of *Phytophthora inundata* according to host range, morphological variation and multigene molecular phylogeny. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 46–65.
- Safaeifarahani, B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Hardy, G.E.S.T. & Burgess, T.I. 2015a. Molecular and morphological characterization of the causal agent of potato pink rot in potato stores in Fars province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51(2): 197–214.
- Safaeifarahani, B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Hardy, G.E.S.T. & Burgess, T.I. 2015b. Re-evaluation of the *Phytophthora cryptogea* species complex and the description of a new species, *Phytophthora pseudocryptogea* sp. nov. *Mycological Progress* 14(11): 18. doi: 10.1007/s11557-015-1129-9.
- Strimmer, K. & von Haeseler, A. 1996. Quartet puzzling—A quartet maximum likelihood method for constructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution* 13(7): 964–969.

- Taheri, M., Mirabolfathi, M. & Rahnama, K. 2013. *Phytophthora* root and crown rot of several field and orchard crops in Gorgan area. Iranian Journal of Plant Pathology 48(2): 249–263.
- Tan, K.H. 1996. Soil sampling, preparation and analysis. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Taylor, R.J., Pasche, J.S. & Gudmestad, N.C. 2007. Susceptibility of eight potato cultivars to tuber infection by *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* and its relationship to mefenoxam-mediated control of pink rot and leak. Annals of Applied Biology 152(2): 189–199.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25(24): 4876–4882.
- Tuit, J. 1969. Plant pathological methods. Burgess Publishing Co., USA.
- van Buyten, E. & Höfte, M. 2013. *Pythium* species from rice roots differ in virulence, host colonization and nutritional profile. BMC Plant Biology 13(1): 1–17.
- van der Plaats-Niterink, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology. No. 21. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 198 pp. The Netherlands.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, USA.