

بررسی روابط فیلوژنتیکی و خصوصیات تاکسونومیکی جدایه‌های *Pythium* spp. در مزارع غلات استان فارس*

زینب بلبلی و رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۱۸)

چکیده

به منظور بررسی فلور پیتومی مزارع غلات استان فارس، طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۲ از خاک مزارع غلات (برنج، ذرت، جو و ارزن) در نقاط مختلف استان فارس (ارسنجان، باجگاه، اقلید، جیلان، جهرم، کامفیروز، کوار، کازرون، خرم‌بید، لارستان، میمند، ممسنی، نقش‌رستم، سپیدان، سورمق، سیدان، سیوند و زرقان) نمونه‌برداری شد. حاصل مطالعات ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی و فیلوژنتیکی جدایه‌ها شناسایی ۱۳ گونه‌ی پیتومی شامل *Pythium adhaerens*, *P. amasculinum*, *P. aphanidermatum*, *P. carolinianum*, *P. coloratum*, *P. dissotocum*, *P. diclinum*, *P. kashmirensis*, *P. marsipium*, *P. nunnii*, *P. oligandrum*, *P. periplocum* و *Pythium* sp. بود. گونه‌های "*hordeum*" برای فلور پیتومی ایران جدید بودند. گونه‌ی "*hordeum*" *Pythium* sp. گونه‌ای جدید برای فلور پیتومی جهان بود.

کلیدواژه: آمیکوتا، غلات، فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی، فارس

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmostofi@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز.

Phylogenetic relationships and taxonomic characteristics of *Pythium* spp. isolates in cereal fields of Fars Province

Z. Bolboli and R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa^{1*}

(Received: 28.12.2014; Accepted: 10.10.2015)

Abstract

In order to investigate the *Pythium* flora in cereal fields of Fars Province of Iran, During 2012-2013 soil from cereal (rice, maize, barley and millet) fields in various parts of Fars Province (Arsanjan, Bajgah, Eqlid, Jahrom, Kamfiruz, Kavar, Kazerun, Khorambid, Larestan, Mamsani Meymand, Naghsh-e-Rostam, Sepidan, Surmaq, Seydan, Sivand and Zarghan) were sampled. Thirteen *Pythium* species were identified based on morphological, physiological and phylogenetic studies, including: *Pythium adhaerens*, *P. amasculinum*, *P. aphanidermatum*, *P. carolinianum*, *P. coloratum*, *P. dissotocum*, *P. diclinum*, *P. kashmirensis*, *P. marsipium*, *P. nunn*, *P. oligandrum*, *P. periplocum* and *Pythium* sp. "hordeum". *P. adhaerens*, *P. carolinianum*, *P. dissotocum*, *P. kashmirensis*, *P. marsipium*, *P. nunn* and *Pythium* sp. "hordeum" were new to Iran flora. *Pythium* sp. "hordeum" was considered as a new species.

Keywords: Oomycota, cereal, Internal transcribed spacer regions of rDNA (ITS), Fars

* Corresponding author's E-mail: rmostofi@shirazu.ac.ir

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, 7144165186.

مقدمه

حال حاضر مطالعات مولکولی نشان داده که بسیاری از گونه‌های ریخت‌شناختی، اجتماعاتی چندنیایی هستند (Uzhashi et al. 2010). بنابراین برای تشخیص باید از معیارهای دیگری مانند معیارهای مولکولی، به عنوان مکمل ویژگی‌های ریخت‌شناختی، استفاده کرد. این امر امکان رده‌بندی طبیعی‌تری را برای این جنس فراهم خواهد کرد که برای بیماری‌شناسان مفید خواهد بود (Villa et al. 2006). شناسایی دقیق گونه‌های این جنس با استفاده از ابزارهای مولکولی امکان طراحی آغازگرهای اختصاصی گونه را فراهم می‌کند که این امر خود باعث شناسایی سریع و ردیابی گونه‌های مختلف این بیمارگر مخرب در محیط‌های بوم‌شناختی مختلف خواهد شد (Kageyama et al. 2003, Godfery et al. 2003, Wang et al. 1997).

وقتی که شرایط محیطی برای گسترش بیماری‌های ناشی از شبه‌قارچ‌های شاخه‌ی آُمیکوتا فراهم باشد، گونه‌های مختلف جنس پیتوم، عوامل اصلی بیماری از پافتادگی دانه‌های درحال جوانه‌زنی و گیاهچه‌ها هستند. بنابراین مطالعه روی گونه‌های پیتوم موجود در زمین‌های زراعی و به خصوص، مزارع غلات، به منظور بررسی شیوه‌ی پراکنش گونه‌های مختلف این جنس ضروری به نظر می‌رسد (Al-Sheikh 2010). به دلیل کمبود اطلاعات در زمینه‌ی گونه‌های غالب مزارع غلات ایران و مخصوصاً استان فارس، عدم اطلاع از روابط فیلوژنتیکی آن‌ها و هم‌چنین وجود جدایه‌هایی که از لحاظ ریخت‌شناختی حالت حد واسط دارند بررسی جدایه‌های مزارع غلات الزامی به نظر می‌رسد.

روش بررسی

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از خاک مزارع غلات (برنج، جو، ذرت و

جنس *Pythium Pringshem* یک آرایه‌ی متنوع است که تقریباً ۲۰۰ گونه‌ی توصیف شده‌ی پوده‌رست و انگل را شامل می‌شود (Paul et al. 2008). گونه‌های انگل هم روی گیاهان (Harison 1989, Chang et al. 1994, Hou et al. 1997) و هم روی جانوران (Dick 1990, Barr 1992) گزارش شده‌اند. بعضی از گونه‌های این جنس، از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی هستند که باعث بیماری‌های از پافتادگی گیاهچه قبل و بعد از سبز شدن، پوسیدگی نهال، ریشه و ساقه‌های اصلی، فاسد شدن میوه و سبزیجات در طی کشت، انبارداری و نقل و انتقال در بازار می‌شوند و به محصولات کشاورزی خسارت جدی وارد می‌کنند (Yu & Ma 1989, Abdelzاهر et al. 1997).

به دلیل اثرات شدید و مخرب گونه‌های انگل این جنس روی محصولات مهم اقتصادی در سراسر جهان، شناسایی و تعیین خصوصیات گونه‌های این جنس در مفهوم زیست‌شناسی و روابط تکاملی میان گونه‌ها بسیار اهمیت دارد (Bala et al. 2010). در حال حاضر کلیدهای شناسایی این جنس عمدتاً بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی، زیست‌شناختی و ریخت‌سنجی استوار است (Waterhouse 1967, van der Plaats-Niterink 1981, Dicke 1990). از یک طرف تعداد این خصوصیات کم است و از طرف دیگر تعداد بسیار زیادی از گونه‌ها بر اساس این خصوصیات تعریف و توصیف شده‌اند. هم‌پوشانی ویژگی‌های مورد استفاده برای رده‌بندی گونه‌ها، امر شناسایی دقیق را بسیار دشوار ساخته است (Wang et al. 2003). سیستم‌های رده‌بندی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی برای بیماری‌شناسان مفید است، ولی در

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های به دست آمده از مزارع غلات استان فارس.

Table 1. Characteristics of the isolates collected from the cereal fields in Fars Province.

Accession number ¹	Coordinates	Matrix	Date	Location	Isolate	Species
KP063120	30°16'.282"N 053°13'.004"E	Nursery bed of rice	2013	Arsanjan	ArR1	<i>P. adhaerense</i>
KP063121	30°03'.536"N 052°07'.511"E	Barley field	2013	Sepidan	SB1-a	<i>P. amasculinum</i>
KP063122	30°03'.502"N 052°07'.144"E	Barley field	2013	Sepidan	SB2-2	
KP063123	29°44'.114"N 052°35'.359"E	Corn field	2013	Bajgah	BC2	<i>P. aphanidermatum</i>
	30°16'0.28"N 052°48'.171"E	Corn field	2012	Eghlid	EC1	
	29°57'.312"N 052°52'.711"E	Corn field	2012	Jailan	GC1	
	27°56'.712"N 054°12'.187"E	Barley field	2012	Jahrom	GB1	
	29°37'.710"N 051°35'.375"E	Corn field	2013	Kazerun	KC3-3	
KP063124	30°00'.879"N 052°57'.829"E	Paddy field	2012	Naghsh-e-Rostam	NrR1	
	30°00'.499"N 052°59'.041"E	Paddy field	2012	Seydan	SeR1	
	29°43'.619"N 052°35'.437"E	Paddy field	2012	Sivand	SR1	
KP063125	30°11'.405"N 051°55'.125"E	Corn field	2013	Mamsani	MaC1	<i>P. carolinianum</i>
KP063126	30°16'.282"N 053°13'.004"E	Corn field	2012	Khorrambid	KhC1	<i>P. coloratum</i>
KP063128	29°44'.149"N 052°35'.253"E	Corn field	2013	Bajgah	BC3	<i>P. dissotocum</i>
KP063129	29°37'.710"N 051°35'.375"E	Corn field	2012	Kazerun	KC3	

اساس سیستم مکان‌یابی جهانی (GPS) ثبت شد (جدول ۱).

ارزن) در مناطق مختلف استان فارس به روش تصادفی انجام شد. مختصات جغرافیایی مکان نمونه برداری بر

جدول ۱- ادامه.

Table 1. Continued.

Accession number ¹	Coordinates	Matrix	Date	Location	Isolate	Species
						<i>P. dissotocum</i>
KP063130	29°81'.817"N 052°75'.611"E	Corn field	2012	Zarqan	ZC2	
	29°82'.075"N 052°75'.438"E	Corn field	2012	Zarqan	ZC1	
						<i>P. diclinum</i>
KP063127	29°57'.425"N 052°52'.879"E	Corn field	2012	Jailan	GC2	
						<i>P. kashmirensis</i>
KP063131	28°03'.566"N 054°07'.317"E	Barley field	2013	Larestan	LB3	
						<i>P. marsipium</i>
KP063132	29°92'.804"N 053°28'.120"E	Nursery bed of rice	2013	Arsanjan	ArR3	
KP063133	30°12'.131"N 052°27'.453"E	Paddy field	2013	Kamfiruz	KmR8	
						<i>P. nunn</i>
KP063134	29°43'.619"N 052°35'.437"E	Corn field	2013	Surmaq	SuC1	
						<i>P. oligandrum</i>
KP063135	28°55'.152"N 053°17'.501"E	Barley field	2013	Jahrom	GB1	
						<i>P. periplocum</i>
KP063136	30°12'.131"N 052°27'.453"E	Paddy field	2013	Kamfiruz	KMR8-3	
						<i>P. sp. "hordeum"</i>
KP063137	28°54'.975"N 052°43'.907"E	Barley field	2012	Meymand	Mb1-2	

1. Internal transcribed spacer (ITS)

(عصاره‌ی ۴۰ گرم ذرت خردشده، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) منتقل شد (Tuit 1969). جدایه‌های خالص شده به لوله‌های حاوی محیط کشت CMA منتقل و در ۱۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای موجود (van der Plaäts-Niterink 1981, Dick 1990) انجام شد.

جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

جدایه‌های آُمیست به روش طعمه‌گذاری با برگ مرکبات (Banihashemi et al. 1992) و با استفاده از محیط کشت CMA-PARP (CMA آماده شده با ۰/۰۲ گرم در لیتر دلواسید، ۰/۵ گرم در لیتر آمپی‌سیلین، ۰/۰۱ گرم در لیتر ریفامپین و ۰/۱ گرم در لیتر PCNB) (Jeffers & Martin 1968) جداسازی شدند. خالص‌سازی به روش نوک‌ریسه انجام شد و نوک‌ریسه‌ها به محیط کشت CMA

کیت DNGTM-PLUS (سیناژن، ایران) و به روش توصیه شده توسط تولید کننده انجام گرفت. رسوب دی‌ان‌ای در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. دی‌ان‌ای حاصل در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد. پس از استخراج دی‌ان‌ای جدایه‌ها کیفیت و کمیت دی‌ان‌ای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ام-دی ۱۰۰۰ (نانودراپ تکنولوژی، ایالات متحد آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد.

فزون‌سازی دی‌ان‌ای

دی‌ان‌ای مربوط به فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی (آی‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریپوزومی با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS6 (Cooke & Duncan 1997) و ITS4 (White *et al.* 1990) توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز فزون‌سازی شد. مخلوطی حاوی ۵۰ نانوگرم از دی‌ان‌ای قالب، یک میکرومول از هر آغازگر، ۱۰۰ میکرومول dNTPs، ۰/۴ میکرومول Taq DNA polymerase (سیناژن، ایران)، ۱/۵ میکرومول MgCl₂، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (۲۰۰ میلی‌مول Tris-HCl با pH=۸ و ۵۰۰ میلی‌مول KCl) و ۱۰۰ میکرومول BSA (bovine serum albumine) برای واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری تهیه شد. در این آزمون برای اطمینان از عدم آلودگی مواد مصرفی و واکنش‌ها، در هر دور آزمایش نمونه‌ی شاهد فاقد دی‌ان‌ای به کار برده شد. تحت شرایط یک چرخه‌ی واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، هم‌جوشی در دمای ۵۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، و یک چرخه‌ی

تشخیص ابتدایی جدایه‌ها با بررسی خصوصیات ریخت-شناختی و فیزیولوژیک

تشخیص گونه‌های جنس *Pythium* بر اساس ریخت‌شناسی اسپورانژیوم (کروی، رشته‌ای)، تزئینات سطح آگونیوم (صاف یا دارای تزئینات)، مقدار فضایی که آسپور در آگونیوم اشغال کرده است (پرساز یا ناپرساز)، خاستگاه (تک‌بُن یا دوئِن) و حالت اتصال آنتریدیوم به آگونیوم (پراماده یا زیرماده)، تشکیل آماس ریشه، اندازه‌ی قطر ریشه و خصوصیات فیزیولوژیک شامل ریخت‌شناسی پرگنه و میزان رشد روزانه در دماهای مختلف از پنج تا ۴۰ درجه سلسیوس (با فواصل ۵ درجه) روی محیط‌کشت CMA و با استفاده از کلیدهای موجود (Van der Plaäts- Niterink 1981, Dick 1990) صورت گرفت.

الگو و سرعت رشد روی انواع محیط‌کشت

الگو و سرعت رشد هر یک از جدایه‌ها روی انواع محیط‌کشت‌ها شامل CA، CMA (عصاره‌ی ۲۵۰ گرم هویج، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر)، HSA (عصاره‌ی ۶۰ گرم شاهدانه‌ی خرد شده، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) (van der Plaäts-Niterink 1981)، PDA (عصاره‌ی ۲۵۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) (van der Plaäts-Niterink 1981) و MEA (۲۰ گرم مالت و ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) (Dutton & Penn 1998) بررسی شد.

استخراج دی‌ان‌ای

استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2013) و با استفاده از

(GenBank, NCBI, USA; [Online])
 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt) و اخذ رس-
 شمار برای مطالعات بعدی استفاده شد.

واکاوی‌های فیلوژنتیکی

به منظور یافتن روابط بین گونه‌های هدف با سایر گونه‌های *Pythium* و همچنین آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای ارزیابی سطح تنوع ژنتیکی صورت گرفت. ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش شده به همراه توالی‌های به دست آمده از بانک ژن مربوط به گونه‌های معتبر (Robideau et al. 2011) با نرم افزار ClustalX (Thompson et al. 1997) انجام شده، متعاقباً به صورت دستی تنظیماتی روی آن صورت گرفت. از توالی *Phytophthora melonis* رس‌شمار AF266767 به عنوان گروه خارجی استفاده شد. فراسنجه‌های مدل شامل فراسنجه‌های میزان ناهمگونی و جایگزینی مانند: نسبت مورد انتظار گذار به تراگشت، پراکنش گامای فراسنجه‌ی آلفا و لگاریتم طبیعی احتمال با استفاده از نرم افزار PUZZLE (Strimmer & von Haeseler 1996) تخمین زده شد. واکاوی فیلوژنتیکی پیوست‌همسایه‌ها به روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalemfarsa 2013) انجام شد. ثبات تبارهای به دست آمده با ۵۰۰ دور آزمون بوت‌استرپ سنجیده شد.

نتایج

حاصل نمونه‌برداری طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۲ از ۴۰ نمونه خاک مزارع غلات نقاط مختلف استان فارس (جدول ۱)، حدود ۶۰۰ جدایه‌ی آمیست بود. با توجه به مشخصات اندام‌های جنسی و غیرجنسی و خصوصیات

گسترش نهایی در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسیکلر CG1-96 (کوربت ریسرچ، استرالیا) انجام شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با الکتروفورز در ژل یک درصد آگارز حاوی ۰/۰۵٪ اتیدیوم بروماید در بافر تی‌بی‌ئی (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم ئی‌دی‌تی‌ای، ۵/۵ گرم اسید بوریک، آب مقطر تا حجم یک لیتر) به مدت یک ساعت و در ۹۰ ولت تأیید شد. قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داکیومتر (سین-ژن، ایالات متحد آمریکا) عکس برداری شد، اندازه‌ی باندهای به دست آمده در مقایسه با یک نشانگر دی‌ان‌ای ۱۰۰ جفت‌بازی (Gene Ruler؛ فرمتاز، بریتانیا) برآورد شد.

توالی سنجی دی‌ان‌ای فزون‌سازی شده

قطعات فزون‌سازی شده برای استفاده در توالی‌سنجی دی‌ان‌ای با یک ستون خالص‌سازی (GeneJet™ PCR Purification Kit؛ فرمتاز، بریتانیا) با استفاده از شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده از بقایای مواد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و نوکلئوتیدهای اضافی جداسازی و خلوص محصول به دست آمده توسط الکتروفورز تأیید شد. ژن‌های فزون‌سازی شده برای توالی‌سنجی به شرکت ماکروژن کروی جنوبی ارسال شد و از دو جهت مستقیم و معکوس با استفاده از آغازگرهای مرتبط توالی‌سنجی شد. توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نرم افزار Bioedit (Hall, 1999) با مقایسه‌ی نسخه‌ی مستقیم و معکوس ویرایش شده، رشته‌ی برآیند به دست آمد. رشته‌های برآیند پس از ارائه به بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; Online: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt) طریق وب جهانی با استفاده از نرم افزار

جدول ۲- ریخت‌شناسی پرگنه و میزان رشد (میلی‌متر در روز) گونه‌های *Pythium* روی محیط‌کشت‌های مختلف در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس.

Table 2. Morphology of colony and growth rate (mm day⁻¹) of *Pythium* isolates on various media at 25 °C.

CMA		HSA		CA		PDA		MEA		جدایه	گونه
M	G	M	G	M	G	M	G	M	G		
Cry	13.5	Cry	8	Cry	<1	Cry	12.66	Cry	6	ARr1	<i>P. adherence</i>
Uni	22	Uni	27	Uni	29.5	Uni	16	Uni	17	SB2-2	<i>P. amasculinum</i>
Uni	33	Uni	31	Uni	28	Uni	30	Uni	30	KC3-3	<i>P. aphanidermatum</i>
Rad	21.5	Cry	25	Cry	24.66	Ros	9.5	Cry	21.33	MaC1	<i>P. carolinianum</i>
Uni	27.25	Uni	23.7	Uni	25.5	Uni	18	Uni	27.7	KhC1	<i>P. coloratum</i>
Rad	32	Uni	27	Uni	24.5	Uni	19.5	Uni	30.7	GC2	<i>P. diclinum</i>
Rad	29.7	Rad	23.25	Uni	24.25	Rad	19.75	Rad	29.5	Zc2	<i>P. dissotocum</i>
Uni	9	Ros	8.16	Ros	13.75	Ros	13.5	Ros	8.5	LB3	<i>P. kashmirensis</i>
Rad	37	Rad	27.5	Rad	32.25	Rad	19.25	Rad	29	3R-1	<i>P. marsipium</i>
Rad	22	Cry	18	Rad	27.75	Rad	17.5	Str	18	Suc1	<i>P. nunn</i>
Uni	18	Uni	17	Uni	16	Uni	19	Uni	21	KmR8-3	<i>P. oligandrum</i>
Uni	19	Rad	23	Uni	26	Ros	14	Ros	15	GB1	<i>P. periplocum</i>
Rad	14.25	Str	25.75	Cry	25.75	Str	16.5	Cry	17	MB1-2	<i>Pythium</i> sp. "hordeum"

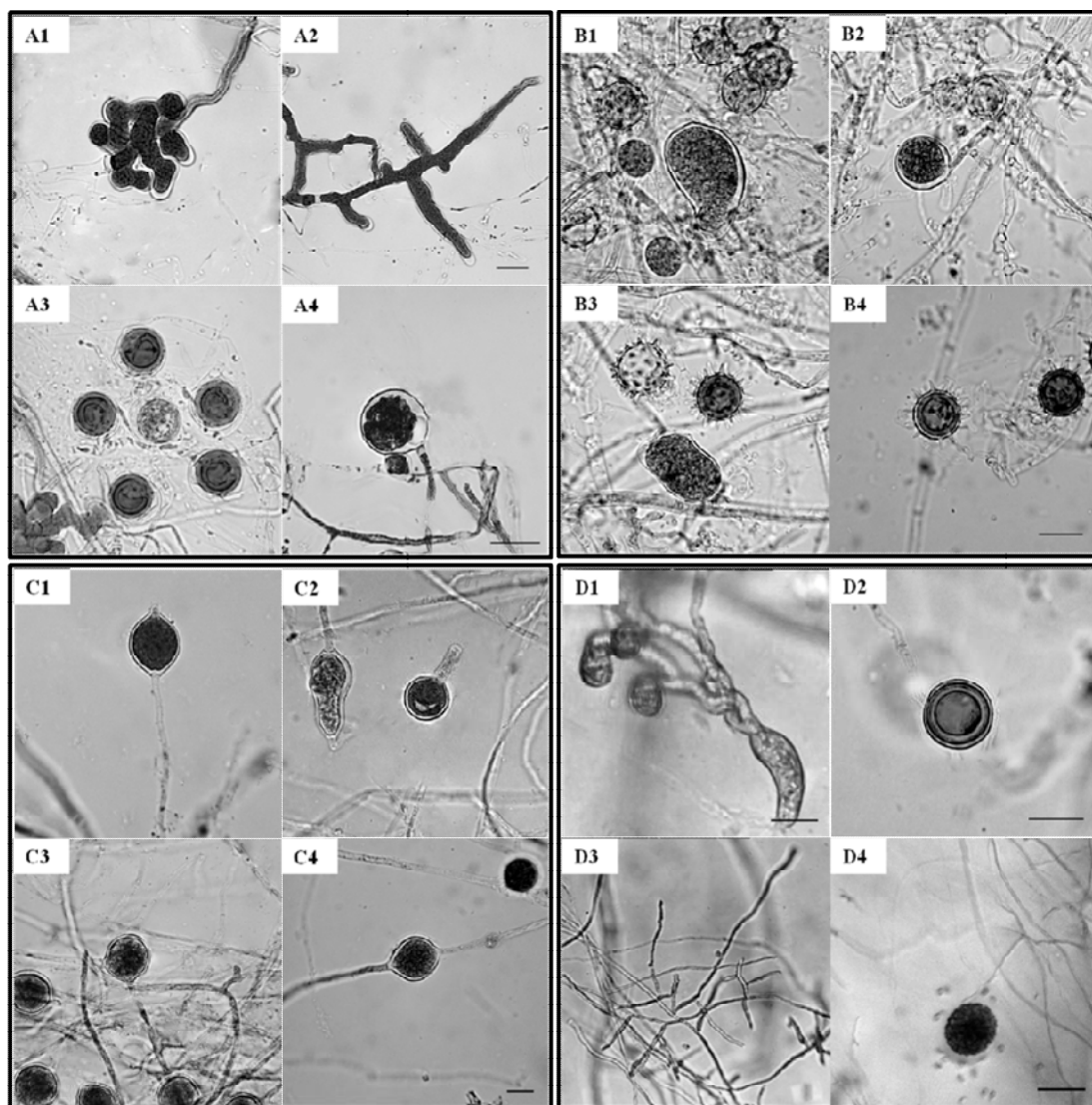
ریخت‌شناسی پرگنه: Rad = Radial (شعاعی)؛ Uni = Uniform (یک‌دست)؛ Cry = *Chrysanthemum* (گل‌داودی) = Rose shaped (گل سرخی)؛ Str = Star shaped (ستاره‌ای شکل)؛ G: رشد؛ M: ریخت‌شناسی.

جدایه‌ای از خاک خزانه‌های برنج ارسنجان به دست آمد (جدول ۱). پرگنه روی محیط‌کشت MEA، PDA، CA، CMA و HSA دارای الگوی گل‌داودی با قطاع‌های کوچک بود (جدول ۲). تنها جدایه‌ی این گونه با وجود کاربرد تمام روش‌های معمول اُسپور تولید نکرد. این گونه دارای اسپورانژیوم رشته‌ای بدون آماس و مشابه ریشه با ابعاد متغیر (شکل ۲، G)، ریشه‌ها دارای قطری معادل (۳/۱-۶/۲) و میانگین قطر ۴/۱±۰/۸ میکرومتر بود. دمای رشدی کمینه ۱۰، بهینه ۳۵ و بیشینه ۴۰ درجه‌ی سلسیوس اندازه‌گیری شد. این گونه در تبار A درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس قرار گرفت (شکل ۴).

***Pythium amasculinum* Yu 1973**: از این گونه دو جدایه از مزارع جو در شهرستان سپیدان به دست آمد (جدول ۱). جدایه‌های مربوط به این گونه روی محیط کشت MEA، PDA، CA، HSA و CMA دارای الگوی رشدی یک‌دست و یک‌نواخت است (جدول ۲). قطر ریشه‌ی اصلی ۴-۹ میکرومتر با میانگین ۷/۵۱±۱

فیزیولوژیک و واکاوی فیلوژنتیک ۱۳ گونه‌ی پیتیوم شناسایی شد که شامل *Pythium adhaerens*، *P. aphanidermatum*، *P. amasculinum*، *P. dissotocum*، *P. coloratum*، *P. carolinianum*، *P. nunn*، *P. marsipium*، *P. kashmirensis*، *P. diclinum*، *P. oligandrum* و *P. periplocum* و *Pythium* sp. "hordeum" بود. از میان این گونه‌ها هفت گونه برای فلور پیتیومی ایران جدید بود (ر.ک. ادامه مطلب) که یکی از این گونه‌ها ("*Pythium* sp. "hordeum") گونه‌ای جدید برای فلور پیتیومی جهان به شمار می‌رفت. گونه‌های جدید به علاوه‌ی دو گونه‌ی *P. amasculinum* و *P. periplocum* که توصیف دقیقی از جدایه‌های ایرانی آن در دست نیست در ذیل توصیف شده‌اند. حاصل واکاوی‌های فیلوژنتیکی فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی ژن آرانی ریوزومی (آی‌تی‌اس) این گونه‌ها را در شش تبار (Robideau et al. 2011) مختلف قرار داد (شکل ۴).

***Pythium adhaerens* Sparrow 1931**: از این گونه



شکل ۱- (A): ریخت‌شناسی *Pythium aphanidermatum* جدایه‌ی KC3-3. A1: اسپورانژیوم انگشتی، A2: اسپورانژیوم رشته‌ای آماسیده، A3: اُاسپوره‌های ناپرساز، A4: اُگونیوم و آنتریدیوم، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر). (B): ریخت‌شناسی *Pythium amasculinum* جدایه‌ی SB2-2. B1 و B2: آماس‌های ریشه‌ای، B3: اُگونیوم خاردار، B4: اُاسپور ناپرساز، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر). (C): ریخت‌شناسی *Pythium carolinianum* جدایه‌ی MaC1. C1: اسپورانژیوم، C2: اسپورانژیوم با لوله‌ی تخلیه، C3: آماس بین‌ریشه‌ای، C4: اسپورانژیوم، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر). (D): ریخت‌شناسی *Pythium coloratum* جدایه‌ی KhC1. D1: آنتریدیوم (Bar = 20 μ m). D2: اُاسپور ناپرساز با دیواره‌ی ضخیم (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر). D3: اسپورانژیوم رشته‌ای کمی آماسیده، D4: زئوسپور و وزیکول، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

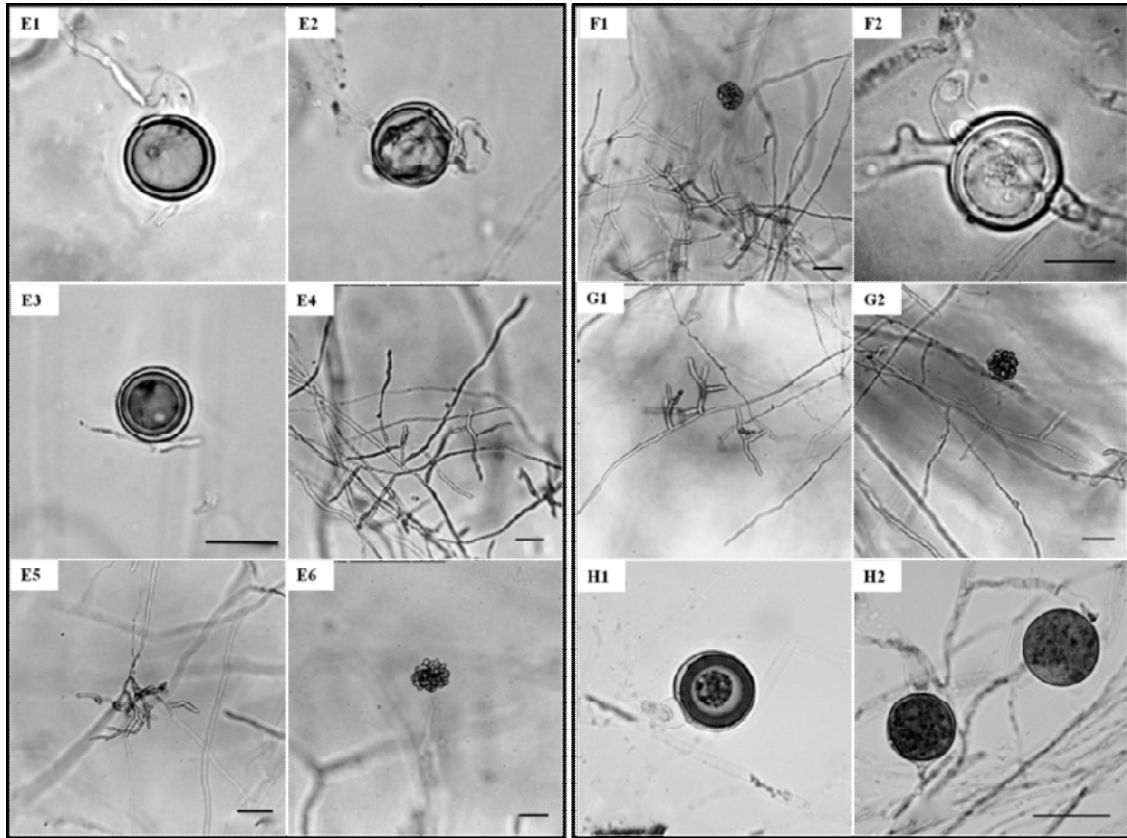
Fig1. (A): *Pythium aphanidermatum* isolate KC3-3. A1: Toruloid sporangium, A2: Filamentous inflated sporangium, A3: Aplerotic oospores, A4: Oogonium and antheridium, (Bar = 20 μ m). (B): *Pythium amasculinum* isolate SB2-2. B1 & B2: Hyphal swelling, B3: Ornamented oogonium, B4: Aplerotic oospore, (Bar = 20 μ m). (C): *Pythium carolinianum* isolate MaC1. C1: Sporangium, C2: Sporangium with discharge tube, C3: Intercalary hyphal swelling. C4: Sporangium, (Bar = 20 μ m). (D): *Pythium coloratum* isolate KhC1. D1: Antheridium (Bar = 20 μ m). D2: Aplerotic, thick wall oospore, (Bar = 20 μ m). D3: Filamentous slightly inflated sporangium, D4: Zoospores & vesicle, (Bar = 20 μ m).

تمامی محیط‌کشت‌های مخصوص تشکیل آسپور بودند (شکل ۱، C). جدایه‌ها دارای دمای رشدی کمینه‌ی ۱۰، بهینه‌ی ۳۰ و بیشینه‌ی ۴۰ درجه‌ی سلسیوس بودند. در واکاوی فیلوژنتیک این گونه در تبار E از درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر آی‌تی‌اس قرار گرفت (شکل ۴).

***Pythium dissotocum* Drechsler 1930**: از این گونه جدایه‌هایی از خاک مزارع ذرت شهرستان زرقان، و کازرون جداسازی شد (جدول ۱). پرگنه‌ها روی محیط-کشت‌های MEA، PDA، و CMA دارای الگوی رشد شعاعی و روی HSA و CA بدون الگوی ویژه‌ای بود (جدول ۲). قطر ریشه‌ی اصلی بین ۳/۴-۷/۷ میکرومتر با میانگین قطر ۵/۶±۰/۶ میکرومتر، اسپورانژیوم رشته‌ای بدون آماس یا کمی آماسیده، منشعب، دارای ساختار درخت‌مانند، لوله‌ی تخلیه‌ی بلند، قطر زئوسپورهای سیست شده هشت تا نه میکرومتر، آگونیوم انتهایی یا بین‌ریشه‌ای با قطری بین ۱۸/۷-۲۴/۵ و میانگین ۲۱/۲±۱/۷ میکرومتر، آنتریدیوم یک تا سه عدد به ازای هر آگونیوم با حالت‌های مختلف: تک‌بن و ساقه‌دار که خاستگاه ساقه‌ی آن از ساقه-ی آگونیوم بود و بی‌ساقه که از ساقه‌ی آگونیوم به وجود می‌آمد یا دو‌بن که از فواصل مختلف به آگونیوم متصل می‌شد، دارای قطری بین ۳/۳-۶/۲ میکرومتر و میانگین ۴/۷±۰/۷ میکرومتر است، آسپورها با دیواره‌ی صاف ناپرساز یا تقریباً پرساز به اندازه‌ی ۱۶/۱-۲۲/۵ و با قطر میانگین ۱۸±۱/۶ میکرومتر، دیواره‌ی آسپورها یک تا سه میکرومتر مشاهده شد (شکل ۲، E). دمای رشدی کمینه ۵، بهینه ۳۰ و بیشینه ۳۷ درجه‌ی سلسیوس اندازه‌گیری شد. در واکاوی فیلوژنتیکی، این گونه در تبار B و در زیرتبار B2 در درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس قرار گرفت (شکل ۴).

میکرومتر، عدم مشاهده اسپورانژیوم و وجود آماس‌های ریشه‌ای به اشکال و ابعاد مختلف با اندازه‌ی بین ۲۰-۴۲ میکرومتر و میانگین ۲۳/۹۳±۶/۸ میکرومتر در محیط-کشت‌های جامد و مایع که از نظر ریخت‌شناختی بسیار شبیه اسپورانژیوم است با این تفاوت که هیچ گونه تولید زئوسپوری در این گونه دیده نشد. آگونیوم انتهایی یا بین-ریشه‌ای با دیواره‌ی خاردار با اندازه‌ی ۱۹/۵-۲۴ میکرومتر و میانگین قطر ۲۱/۶±۱/۴ میکرومتر، خارها دارای ۲/۵ تا ۵ میکرومتر طول و در پایه دارای قطری معادل ۲/۵ میکرومتر، آسپور کروی با اندازه‌ی ۱۷/۵-۲۱/۸ میکرومتر و میانگین قطر ۱۹/۳±۱/۲ میکرومتر، قطر دیواره‌ی آسپور تا دو میکرومتر، عدم تشکیل آنتریدیوم در انواع محیط-کشت‌ها بود (شکل ۱، B). جدایه‌ها دارای دمای رشدی کمینه ۱۰، بهینه‌ی ۳۰ و بیشینه‌ی ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بودند. در واکاوی فیلوژنتیک این گونه در تبار D از درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر آی‌تی‌اس قرار گرفت (شکل ۴).

***Pythium carolinianum* Matthews 1930**: جدایه‌های مربوط به این گونه از خاک ذرت مزارع ذرت شهرستان ممسنی به دست آمد (جدول ۱). پرگنه‌ها روی محیط-کشت‌های MEA، CA و HSA دارای الگوی رشد گل-داودی، روی محیط PDA گل‌سرخ‌ی و روی محیط‌کشت CMA دارای الگوی رشد شعاعی بودند (جدول ۲). قطر ریشه‌ی اصلی ۴/۱-۹/۸ میکرومتر با میانگین قطر ۶/۵±۱/۴ میکرومتر، اسپورانژیوم به اشکال مختلف، کروی، بیضی-شکل عمدتاً انتهایی با اندازه‌ی ۱۶/۹-۱۲/۶ و میانگین قطر ۱۵/۲±۱/۲ میکرومتر، لوله‌ی تخلیه‌ی بلند، دارای آماس-های ریشه‌ای دارای قطری بین ۱۷/۴-۲۳/۲ با میانگین قطر ۲۱/۶±۱/۴ میکرومتر زئوسپورهای سیست شده نه تا ده میکرومتر، دارای رفتار دگرتال، عدم تشکیل آسپور در



شکل ۲- (E): ریخت‌شناسی *Pythium dissotocum* جدایه‌ی ZC2. E1: اُسپور و آنتریدیوم دوئین، E2: اُگونیوم و آنتریدیوم تک‌ئین، E3: اُسپور ناپرساز، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر)؛ E4 و E5: اسپورانژیوم رشته‌ای بدون آماس و شبیه‌ریسه (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر)؛ E6: توده‌ی زئوسپوره‌های محصور در وزیکول (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر)؛ (F): ریخت‌شناسی *Pythium diclinum* جدایه‌ی GC2. F1: اسپورانژیوم رشته‌ای کمی آماسیده و وزیکول حاوی توده‌ی زئوسپور (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر)؛ F2: اُگونیوم بین‌ریسه‌ای و اُسپور ناپرساز، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر)؛ (G): ریخت‌شناسی *Pythium adhaerens* جدایه‌ی ArR1. G1 و G2: اسپورانژیوم رشته‌ای بدون آماس به همراه وزیکول، (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر). (H): ریخت‌شناسی *Pythium nunn* جدایه‌ی SuC1. H1: اُسپور ناپرساز و آنتریدیوم دوین و پراماده، H2: اُگونیوم و آنتریدیوم، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

Fig 2. (E): *Pythium dissotocum* isolate ZC2. E1: Oospore & declinous antheridium, E2: oogonium & monoclinous antheridium, E3: Aplerotic oospore, (Bar = 20 μ m) E4 & E5: Filamentous not inflated sporangium, (Bar = 10 μ m). E6: Zoospores & vesicle, (F): *Pythium diclinum* isolate GC2. F1: Filamentous not inflated sporangium, (Bar = 10 μ m). F2: Aplerotic oospore & intercalary oogonium, (Bar = 20 μ m). (G): *Pythium adhaerens* isolate ArR1. G1 & G2: Filamentous not inflated sporangium with vesicle. (Bar = 10 μ m). (H) *Pythium nunn* isolate SuC1. H1: Aplerotic oospore & declinus, paragynus antheridium, H2: Oogonium & antheridium, (Bar = 20).

به خوبی منشعب شده بودند، قطر ریشه‌ی اصلی بین ۸-۴/۷ و به طور میانگین $6/2 \pm 0/9$ میکرومتر، اسپورانژیوم به میزان فراوان به شکل پیوسته یا مرکب، یعنی به شکل رشته‌ای دارای آماس‌های فراوان که پیوسته بود و به وسیله‌ی رشته‌های باریک به هم متصل می‌شدند، تشکیل

Pythium kashmirensis B. Paul 2008: جدایه این گونه از مزارع جو در شهرستان لارستان جداسازی شد (جدول ۱). پرگنه روی محیط‌کشت‌های MEA، PDA، CA و HSA دارای الگوی رشد گل سرخی، با قطع‌های بزرگ و روی CMA بدون الگوی ویژه‌ای بود (جدول ۲). ریشه‌ها

گونه در تبار E از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس قرار گرفت (شکل ۴).

***Pythium nunn* Lifsh. Stangh. & R.E.D. Baker**

1984: از این گونه جدایه‌ای از مزارع ذرت در شهرستان سورمق به دست آمد (جدول ۱). پرگنه‌ها روی محیط-کشت‌های MEA و HSA دارای الگوی رشدی نزدیک به گل داودی و روی محیط‌کشت‌های PDA و CMA و CA دارای الگوی رشد تقریباً شعاعی و کم‌پشت بود (جدول ۲). قطر ریشه‌ی اصلی بین ۳/۲-۷/۹ و میانگین $5/6 \pm 1$ میکرومتر فاقد اسپورانژیوم و زئوسپور، آگونیوم انتهایی، دارای اندازه‌ی ۲۳-۱۸/۶ و با میانگین قطر $20 \pm 1/5$ میکرومتر، آنتریدیوم تک‌بُن یا دو‌بُن، به تعداد یک تا چهار عدد به ازای هر آگونیوم دارای قطری بین ۴/۱-۶/۵ و میانگین $5/3 \pm 1/4$ ، آسپور ناپرساز با اندازه‌ی ۱۸-۲۰ و با میانگین قطر $19/2 \pm 1/2$ میکرومتر دارای دیواره‌ای به ضخامت بیش از دو میکرومتر، ناپرساز بود (شکل ۲، H). دمای رشدی کمینه پنج، بهینه ۳۰ و بیشینه‌ی ۴۰ درجه سلسیوس بود. این گونه در تبار J از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس قرار گرفت (شکل ۴).

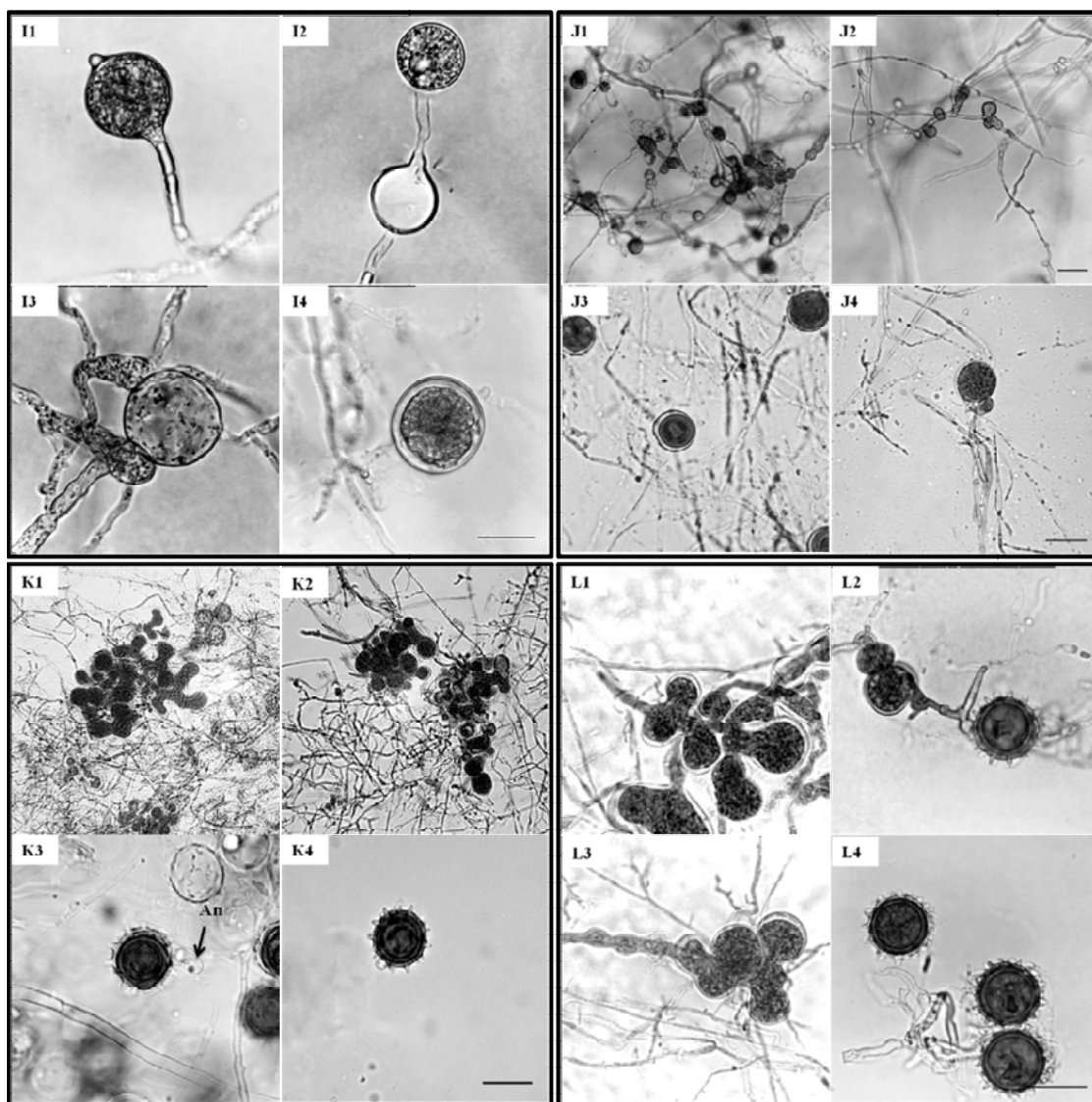
***Pythium periplocum* Drechsler 1939**

جدایه‌ای از شالیزارهای برنج کامفیروز جداسازی شد (جدول ۱). پرگنه روی همه‌ی محیط‌کشت‌های MEA، HAS، CA، PDA و CMA دارای الگوی رشدی گل‌رزی بود (جدول ۲). قطر ریشه‌ی اصلی بین سه تا هفت و میانگین $5/32 \pm 0/68$ میکرومتر اسپورانژیوم از نوع رشته‌ای آماسیده، آگونیوم انتهایی یا بین‌ریشه‌ای دارای اندازه‌ی $25/4 - 16/1$ میکرومتر با میانگین قطر $21/5 \pm 2/3$ میکرومتر، سطح آن دارای خارهای مخروطی شکل با میانگین قطر چهار میکرومتر که در پایه دارای قطر میانگین

وزیکول و زئوسپورها در طی ۲۴ ساعت و در دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه‌ی سلسیوس)، آگونیوم کروی، بین‌ریشه‌ای یا انتهایی با اندازه‌ی ۱۹/۴-۱۴/۵ و با میانگین قطر $16/6 \pm 1/2$ میکرومتر، آسپور پُرساز، دارای قطری بین ۱۳/۵-۱۸/۴ میانگین $15/4 \pm 1/3$ میکرومتر، ضخامت دیواره‌ی آسپور کم‌تر از یک میکرومتر، آنتریدیوم دو‌بُن، به دور آگونیوم پیچیده شده و تشکیل لُپ می‌داد و اندازه‌ی آن بین ۵/۵-۲ و میانگین قطر 4 ± 1 میکرومتر بود (شکل ۳، J). دمای رشدی کمینه ۵، بهینه ۳۰ و بیشینه ۳۷ درجه‌ی سلسیوس اندازه‌گیری شد. این تنها گونه‌ای بود که در این پژوهش در تبار B و زیر تبار B1 از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس گونه‌های پیتیوم قرار گرفت (شکل ۴).

***Pythium marsipium* Dreschler 1941**

گونه از خزانه‌های برنج ارسنجان و شالیزارهای برنج کامفیروز جداسازی شد (جدول ۱). پرگنه روی محیط-کشت‌های MEA، HSA، CA، PDA و CMA دارای الگوی رشد تقریباً شعاعی بود (جدول ۲). قطر ریشه‌ی اصلی بین ۷/۵-۴/۵ میکرومتر و میانگین 6 ± 1 میکرومتر، اسپورانژیوم کروی یا گلابی شکل، اغلب انتهایی، به ندرت بین‌ریشه‌ای با قطر ۳۹/۳-۲۷ و میانگین قطر $33/8 \pm 2/6$ میکرومتر، آگونیوم گاهی انتهایی اما اغلب بین‌ریشه‌ای با اندازه‌ی ۳۲/۷-۲۷/۳ میکرومتر و میانگین $31 \pm 1/4$ میکرومتر، آنتریدیوم دو‌بُن، یک تا چهار عدد به ازای هر آگونیوم با قطر ۱۲-۷/۴ میکرومتر، با میانگین قطر $9/5 \pm 1/3$ میکرومتر، در محل تماس با آگونیوم از نوک پهن شده، آسپور ناپرساز، با قطر ۳۱/۹-۲۷ میکرومتر و میانگین قطر $29 \pm 1/5$ میکرومتر و قطر دیواره آسپور دو میکرومتر بود (شکل ۳، I). جدایه‌ها دارای دمای رشدی کمینه‌ی ۱۰، بهینه‌ی ۳۵ و بیشینه‌ی ۳۷ درجه‌ی سلسیوس بودند. این



شکل ۳- (I): ریخت‌شناسی *Pythium marsipium* جدایه‌ی KmR8I1: اسپورانژیوم کروی، I2: اسپورانژیوم همراه با لوله‌ی تخلیه و وزیکول حاوی توده‌ی سیتوپلاسم، I3: آگونیوم و آنتریدیوم‌های منشعب و دوئین، I4: آسپور ناپرساز، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر)؛ (J): ریخت‌شناسی *Pythium kashmirensis* جدایه‌ی LB3: J1 و J2: اسپورانژیوم مرکب (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر)، J3: آسپور ناپرساز، J4: آگونیوم و آنتریدیوم دوئین و پراماده (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر)؛ (K): ریخت‌شناسی *Pythium periplocum* جدایه‌ی KmR8-3: K1 و K2: اسپورانژیوم رشته‌ای آماسیده، K3: آگونیوم خاردار و آنتریدیوم دوئین پراماده (An = آنتریدیوم)، K4: آسپور ناپرساز، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر)؛ (L): ریخت‌شناسی *Pythium oligandrum* جدایه‌ی GB1: L1 و L3: اسپورانژیوم مرکب، L2 و L4: آگونیوم کروی با دیواره‌ی خاردار و آسپور ناپرساز بدون وجود آنتریدیوم، (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

Fig 3. (I): *Pythium marsipium* isolate KmR8. I1: Spherical sporangium, I2: Spherical sporangium with discharge tube and cytoplasm in vesicle, I3: Oogonium & dichlinous branching antheridia. I4: Apterotic oospore, (Bar = 20 μ m). (J): *Pythium kashmirensis* isolate LB3. J1 & J2: Continuous sporangium, J3: Apterotic oospore, J4: Oogonium & antheridium, (Bar = 20 μ m). (K): *Pythium periplocum* isolate KmR8-3. K1 & K2: Filamentous inflated sporangium, K3: Ornamented oogonium with dichlinous, paragynous antheridium, (An = antheridium) K4: Apterotic oospore, (Bar = 20 μ m). (L): *Pythium oligandrum* isolate GB1. L1 & L3: Continuous sporangium, L2 & L4: Ornamented oogonium & apterotic oospore without antheridium, (Bar = 20 μ m).

P. adhaerens Takah. & M. Sasaki و *P. porphyrae* De Cock است که دارای اسپورانژیوم رشته‌ای بدون آماس، سرعت رشد بسیار کم (پنج میلی‌متر در روز)، یک تا چهار آنتریدیوم به حالت دوئین هستند. در خوشه‌ی دیگری *P. deliense* Meurs و *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp. وجود دارند. این گونه‌ها بر خلاف خوشه‌ی قبلی دارای اسپورانژیوم رشته‌ای آماسیده، سرعت رشد بالا (۳۰ میلی‌متر در روز) و دارای یک تا دو آنتریدیوم به حالت تک‌ئین و اغلب بین‌ریسه‌ای هستند. ولی گونه‌های موجود در هر دوی این خوشه‌ها معمولاً گیاهان دولپه در مناطق گرمسیری را بیمار می‌کنند (Lévesque & de Cock 2004).

گونه‌ی *P. adhaerens* برای نخستین بار از ایران در این پژوهش معرفی شد. از نظر ریخت‌شناختی بسیار شبیه به گونه‌ی *P. angustatum* Sparrow بود چون هر دو دارای اسپورانژیوم رشته‌ای بدون آماس هستند. اما *P. angustatum* با داشتن اُسپور با دیواره‌ی نازک و آنتریدیوم تک‌بن از *P. adherence* متمایز می‌شود (van der Plaäts-Niterink 1981). این گونه اولین بار از جلبک دریایی جداسازی شده‌اند و بیمارگر جلبک‌های مختلف، عامل بیماری مرگ گیاهیچه‌ی چغندر و پوسیدگی ریشه در نخود است (Sparrow 1932).

تبار B از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس پیتوم

تعداد زیادی از جدایه‌های به دست آمده در این پژوهش در زیرتبار B2 از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس قرار گرفتند. این زیرتبار شامل گونه‌های *P. aquatile*، *P. diclinum* Tokun، *P. dissotocum* Höhnk، *P. coloratum* Vaartaja، *P. flavoens* Plaäts-Nit و *P. lutarium* Ali-Shtayeh و *P. marinum* Sparrow است.

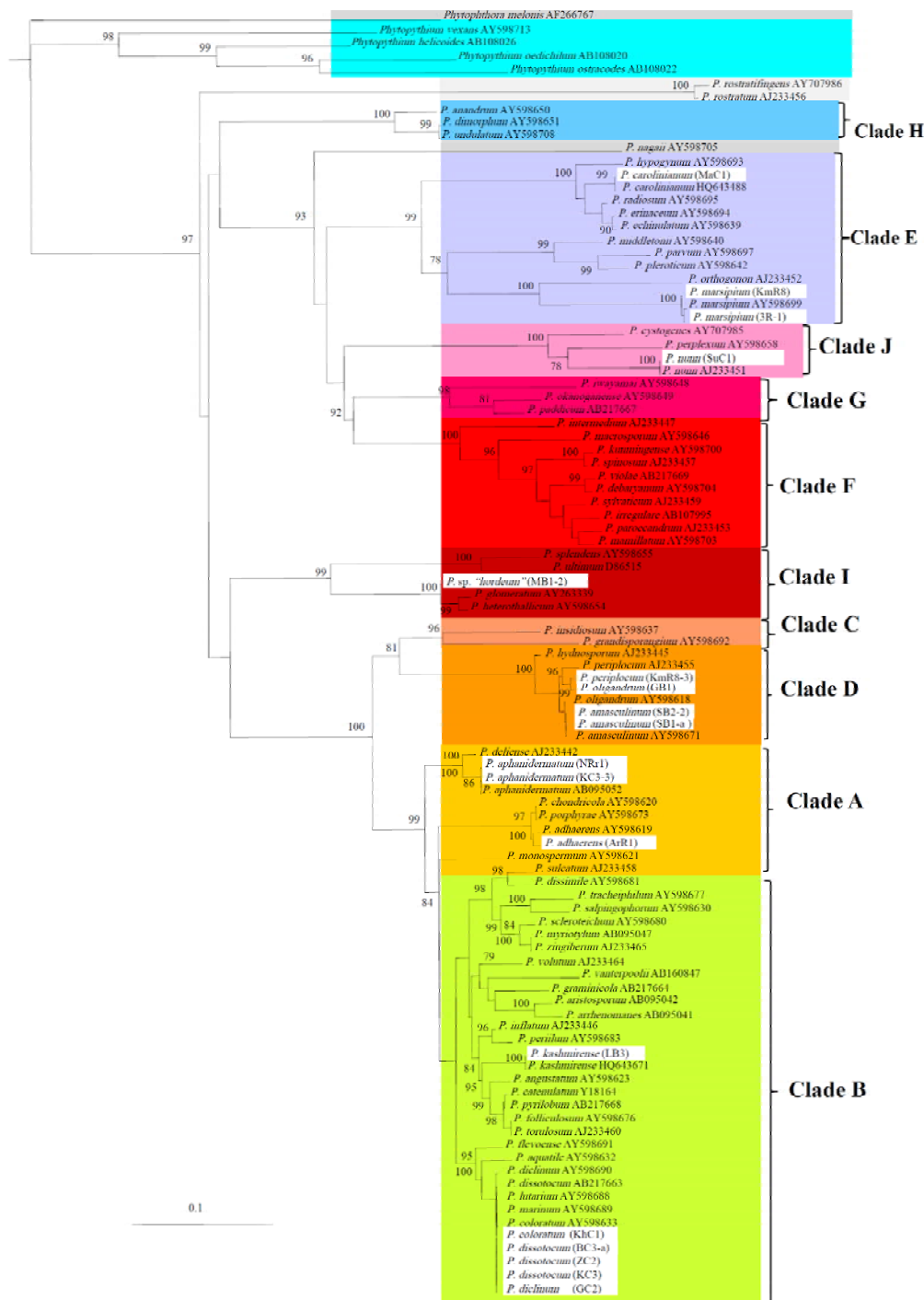
دو میکرومتر، آنتریدیوم به تعداد یک تا چهار عدد با اندازه‌ی ۳/۷-۷/۳ میکرومتر، دوئین، اُسپور ناپرساز با اندازه‌ی ۱۷/۳-۲۱/۷ میکرومتر، کروری با میانگین قطر ۱۹/۴±۱/۱ میکرومتر و با دیواره‌ی ضخیم تقریباً سه میکرومتری بود (شکل ۳، K). دمای رشدی کمینه پنج، بهینه ۳۰ و بیشینه ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. این گونه در تبار D از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس قرار گرفت (شکل ۴).

Pythium sp. "hordeum": این گونه از مزارع جو شهرستان میمند جداسازی شد (جدول ۱). پرگنه‌ها روی محیط‌کشت‌های MEA، PDA و CA دارای الگوی رشد گل داوودی، روی HSA ستاره‌ای و CMA بدون الگوی ویژه‌ای بود (جدول ۲). قطر ریشه‌ی اصلی ۵-۷/۹ و با میانگین ۶±۰/۹ میکرومتر، فاقد اسپورانژیوم و زئوسپور، دارای آماس ریشه‌ی فراوان، به شکل کروری یا لیمویی، انتهایی یا بین‌ریسه‌ای با اندازه‌ی ۱۶-۲۱ با میانگین قطر ۱۸/۸±۱/۵ میکرومتر، دارای رفتار آمیزشی دگرتال، عدم تشکیل اندام‌های جنسی در محیط‌کشت‌های HSA با بتاسیتسترول و بدون آن، CA با بتاسیتسترول و بدون آن، PCA با بتاسیتسترول، دمای رشدی کمینه ۵، بهینه ۲۵ و بیشینه‌ی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. در واکاوی فیلوژنتیک این گونه در تبار I درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر آی‌تی‌اس قرار گرفت (شکل ۴).

بحث

تبار A از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس پیتوم

تبار A، تباری ناهمگون، شامل دو خوشه‌ی کاملاً متفاوت است. یک خوشه شامل گونه‌های *P.*



شکل ۴- موقعیت فیلوژنتیکی جدا شده‌های *Pythium* spp. استان فارس در بین ۸۹ گونه‌ی پیتومیوم بر اساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی آی‌تی‌اس در درخت پیوست همسایه‌ها. اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده‌ی درصد مقادیر بوت‌استرپ $\leq 50\%$ است.

Fig 4. Phylogeny of the *Pythium* spp. isolates in Fars province, together with 89 *Pythium* species based on the ITS regions of the rDNA in neighbor-joining tree. The numbers at the branch points indicate the percentages of bootstrap values ≥ 50 .

درون‌گونه‌ای گذاشت. علاوه بر این، از نظر ریخت‌شناختی نیز دارای ویژگی‌های مشترکی هستند. این گونه‌ها دارای اسپورانژیوم رشته‌ای بدون آماس یا کمی آماسیده، آگونیوم صاف اغلب کوچکتر از ۳۰ میکرومتر، میزان سرعت رشد روزانه‌ی ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر هستند (Lévesque & de Cock 2004). با این حال ترکیب ویژگی‌های ریخت-شناختی، فیزیولوژیکی و نتایج حاصل از واکاوی‌های فیلوژنتیکی در شناسایی درست این جدایه‌ها مؤثر خواهد بود. ویژگی‌های ریخت‌شناختی، مخصوصاً در مرحله‌ی جنسی، در گونه‌های ذکر شده بسیار مهم است. مهم‌ترین ویژگی تفکیک‌کننده، شکل آنتریدیوم و نحوه‌ی اتصال آن به آگونیوم است. وجود هر دو نوع آنتریدیوم تک‌بُن و دو-بُن، به طور قطعی *P. dissotocum* را از *P. diclinum*، که آنتریدیوم آن فقط دو بُن است، متمایز می‌کند. ساقه‌ی آنتریدیوم در *P. dissotocum* غیرمنشعب است. در حالی که ویژگی منحصر به فرد *P. coloratum*، داشتن آنتریدیومی با ساقه‌ی منشعب است.

پس از گونه‌ی *P. aphanidermatum*، بیش‌ترین تعداد جدایه‌های به دست آمده در این پژوهش به *P. dissotocum* اختصاص داشت. این گونه برای نخستین بار از ایران در این پژوهش معرفی می‌شود. ویژگی‌های اصلی این گونه داشتن اسپورانژیوم رشته‌ای بدون آماس و یا کمی آماسیده، آنتریدیوم به تعداد کم، کیسه‌مانند، تک‌بُن یا دو بُن است. آسپور دارای دیواره‌ی ضخیم، ناپرساز یا تقریباً پرساز و آنتریدیوم دارای ساقه‌ی غیرمنشعب است. مشخصات ریخت‌شناسی جدایه‌های شناسایی شده‌ی این گونه در استان فارس، اختلاف اساسی با گونه‌ی توصیف-شده در تک‌نگاره‌ی واندرپلاتس نیتیرینک (van der Plaäts-Niterink 1981) نداشت. ولی در دماهای رشدی تفاوت‌هایی مشاهده شد. دمای بهینه و بیشینه‌ی رشد برای

به جز *P. dissotocum* که به طور معمول در گلخانه‌ها روی چندین محصول گلخانه‌ای مانند کاهو و گوجه‌فرنگی پیدا می‌شود، گونه‌های دیگر اغلب گونه‌هایی غیرمعمول هستند.

بررسی‌های ما نشان داد که گونه‌های ذکر شده دارای ناحیه‌ی آی‌تی‌اس بسیار مشابه هستند به طوری که همه‌ی آن‌ها با هم در یک تبار قرار گرفتند (شکل ۴). این مشاهده نتایج لاوسکو و دکاک (Lévesque & de Cock 2004) را تأیید کرد. این گروه یکی از بحث برانگیزترین تبارهای جنس پیثیوم است. لاوسکو و دکاک (Lévesque & de Cock 2004) این گروه را در تبار B2 درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس خود قرار دادند. طبق نظر آن‌ها این گروهی دارای شباهت بسیار زیاد در توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس خود هستند، بنابراین پیشنهاد کردند که واکاوی این ناحیه به تنهایی برای تفکیک گونه‌های موجود در این گروه یا تبار کافی نیست و شاید واکاوی ژن‌های دیگری از جمله ژن‌های میتوکندریایی مانند سیتوکروم اکسیداز سی (COX) در این مورد کارایی بیش‌تری داشته باشد.

رویدوی و همکاران (Robideau et al. 2011)، هر دو ژن آی‌تی‌اس و سیتوکروم سی اکسیداز را برای تفکیک گونه‌های این زیرتبار استفاده کردند ولی نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که حتی واکاوی هر دوی این نواحی نیز در امر شناسایی دقیق مؤثر نخواهد بود. آن‌ها این فرضیه را مطرح کردند که تنها دلیل قابل قبول برای خویشاوندی بسیار نزدیک این گونه‌ها وجود جریان ژنی بین آن‌هاست. بررسی‌های ما نیز نشان داد که این فرضیه بسیار منطقی است زیرا اختلافات موجود در اندام‌های جنسی به خصوص شکل آنتریدیوم در گونه‌های ذکر شده نشان می‌دهد که این‌ها گونه‌های ریخت‌شناختی واقعی هستند و روابط فیلوژنتیکی بسیار نزدیک را نمی‌توان به حساب تنوع

آنتریدیومی که به دور ساقه‌ی آگونیوم پیچیده شده است. این گونه‌ی جدید بسیار شبیه به گونه‌های *P. plurisporium* Abad, Shew, Grand & L.T. Lucas و *P. inflatum* V.D. ، *P. periilum* Drechsler، 1996 Matthews و *P. folliculosum* B. Paul است. همه‌ی این گونه‌ها دارای اسپورانژیوم رشته‌ای آماسیده هستند. اما با وجود این *P. kashmirensis* با توالی آی‌تی‌اس منحصر به فرد خود و ویژگی‌های ریخت‌شناختی بارز در مرحله‌ی جنسی، یعنی شکل آنتریدیوم و نحوه‌ی اتصال آن به آگونیوم (شکل ۳، J) از گونه‌ی مشابه به راحتی قابل تمایز و تفکیک است (Paul & Bala 2008). اکثر افراد در هنگام شناسایی با دیدن شکل اسپورانژیوم مذکور و حالت دوئین در آنتریدیوم این گونه را به اشتباه گونه‌ی *P. inflatum* شناسایی می‌کنند. در حالی که شکل آنتریدیوم در گونه-ی *P. inflatum* به صورت دوین ساده است و این پیچیدگی به دور آگونیوم یا ساقه‌ی آن وجود ندارد. علاوه بر این توالی آی‌تی‌اس این گونه کاملاً از گونه‌ی *P. inflatum* متمایز است. پس از نخستین گزارش از جداسازی تنها یک گزارش دیگر از جداسازی این گونه از مزارع سویا در سال ۲۰۱۳ وجود دارد (Anderson & Korthauer 2013). این سومین گزارش از وجود این گونه در جهان است. دلیل این امر شاید به شباهت زیاد این گونه به گونه‌های معمول از جمله *P. inflatum* و عدم شناسایی دقیق این گونه برگردد. اما واکاوی توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس این دو گونه را به خوبی از هم تفکیک خواهد کرد.

تبار E از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس پیتوم

تاکنون هیچ گزارشی از وجود گونه‌ی *P. carolinianum* در ایران در دست نبوده و این نخستین گزارش از وجود این گونه‌ی پیتوم دگرتال از ایران است.

جدایه‌های استان فارس به ترتیب ۳۰ و ۳۷ درجه‌ی سلسیوس بود در حالی که در تک‌نگاره‌ی واندریلاتس به ترتیب ۲۰ تا ۲۵ و ۳۵ درجه‌ی سلسیوس گزارش شده است. الشیخ و عبدالظاهر (Al-Sheikh & Abdelzاهر 2012) نیز بهینه‌ی دمای رشدی برای این گونه را ۳۰ درجه‌ی سلسیوس ذکر کرده‌اند. به نظر می‌رسد این شباهت به علت شباهت در شرایط جوی جنوب ایران و عربستان باشد. میانگین قطر میانگین آگونیوم و آسپورها در جدایه‌ی استان فارس به ترتیب ۲۱/۲ و ۱۸ میکرومتر بود در حالی که در تک‌نگاره‌ی واندریلاتس نیتزینک (۱۹۸۱) ۲۲/۵ و ۱۹/۵ میکرومتر ذکر شده است.

گونه‌ی دیگری که در تبار B قرار گرفت *P. kashmirensis* بود. این نخستین گزارش از وجود این گونه از ایران است. این گونه از خاک مزارع جو در شهرستان لارستان از استان فارس جداسازی شد. این گونه‌ی جدید از جنس پیتوم اولین بار توسط پائول و بالا (Paul & Bala 2008) از نمونه‌ی خاک ارتفاع ۱۶۱۵ متری در کوه‌های هیمالیا در ایالت کشمیر از کشور هند جداسازی شد و به عنوان یک گونه‌ی منحصر به فرد و جدید گزارش شد. ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های ما با جدایه‌ی تیپ این گونه که پائول و بالا (۲۰۰۸) در مقاله‌ی توصیف گونه-ی خود آورده‌اند، کاملاً مطابقت داشت. در مورد خصوصیات فیزیولوژیکی نوع الگوی رشدی نیز مشابه بود ولی سرعت رشد روزانه در جدایه‌ی پائول و بالا (Paul & Bala 2008) ۱۵ میلی‌متر در روز است در حالی که جدایه-ی استان فارس در دمای بهینه‌ی خود ۱۳/۳ میلی‌متر در روز رشد می‌کرد. ویژگی‌های بارز این گونه وجود اسپورانژیوم در این گونه به مقدار فراوان، به شکل رشته‌ای دارای آماس‌های فراوان که به حالت پیوسته بوده و به وسیله‌ی رشته‌های باریک به هم متصل می‌شوند و

محدود پس از اولین جداسازی این گونه، موجود است. این گونه اولین بار از برگ‌های گیاه *Nymphaea tuberosa* توسط درکسلر (Drechsler 1941) در ایالات متحد آمریکا جداسازی شد. همچنین ایتو و توکونگا (Ito & Tokunaga 1933) این گونه را از آب خزانه‌های برنج و از یک دریاچه در کیتوی ژاپن، از گیاه خالص‌کننده پس‌آب و در چین نیز جداسازی شده است. جدایه‌ی موجود در این پژوهش نیز از خزانه‌ها و شالیزارهای برنج جدا شده‌اند. جدیدترین گزارش‌ها در مورد این گونه متعلق به هو و همکاران (Ho et al. 2012) از آب و برگ در ژاپن است. مشخصات ریخت‌شناختی جدایه‌های استان فارس تقریباً مشابه با توصیفات واندرپلاتس نیتریک (van der Plaäts-Niterink 1981) بود. اما میانگین قطر آسپور در مورد جدایه‌های استان فارس ۲۹ میکرومتر، ولی در توصیفات واندرپلاتس نیتریک (van der Plaäts-Niterink 1981) ۲۶ میکرومتر است. در توصیفات واندرپلاتس نیتریک (van der Plaäts-Niterink 1981) از دمای بهینه‌ی این گونه مطلبی وجود نداشت. اما طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش دمای بهینه‌ی رشد این گونه ۳۵ درجه‌ی سلسیوس محاسبه شد.

تبار [از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس پیتیوم

تاکنون هیچ گزارشی از وجود *P. nunn* در ایران در دسترس نبوده و این نخستین گزارش از این گونه در ایران است. این گونه برای اولین بار از خاک زمین‌های چمن در کلرادو، ایالات متحد آمریکا گزارش شده است (Lifshitz et al. 1984). در جدیدترین پژوهش توسط یوزوهاشی و کوبایاشی (Uzhashi & Kobayashi 2010) دو جدایه که شباهت بسیار زیادی به *P. nunn* داشتند مورد مطالعه قرار گرفت. این دو جدایه با جدایه‌ی

عبدالظاهر و النقی (Abdelzاهر. & Elnaghy 1998.) اشاره کردند که این گونه، یک گونه‌ی منحصر به فرد است که به راحتی با اسپورانژیوم دارای افزولش، کلامیدوسپور با دیواره ضخیم، آماس ریشه‌ی رنگی و عدم تشکیل آسپور شناسایی می‌شود. این گونه از لحاظ شکل و قطر ریشه و همچنین از نظر شکل اندام‌های غیر جنسی مانند اسپورانژیوم، وزیکول و زئوسپور بسیار شبیه *P. guiyangenes* است با این تفاوت که *P. guiyangenes* دارای مرحله‌ی تولید مثل جنسی است در حالی که *P. carolinianum* تولید اندام جنسی نمی‌کند. به علاوه دمای رشدی آن‌ها نیز متفاوت است (Xiao-Qing 2006).

گونه‌های از جنس پیتیوم که دارای اسپورانژیوم با افزولش هستند و آسپور تشکیل نمی‌دهند شامل *P. carolinianum undulatum* H.E Petersen و *Pythium group P undulatum* گونه‌ی داشتن اسپورانژیومی بزرگ به اندازه‌ی ۱۵۰ میکرومتر از *P. carolinianum* با اندازه‌ی اسپورانژیوم ۵۲ میکرومتر قابل تمایز است. دمای کمینه، بهینه و بیشینه‌ی رشد برای *P. undulatum* به ترتیب ۵، ۲۰ تا ۲۵ و ۳۵ درجه‌ی سلسیوس است، در حالی که این دماها برای *P. carolinianum*، به ترتیب ۱۰، ۳۰ و ۴۰ درجه‌ی سلسیوس است. نتایج پژوهش حاضر با این دماها کاملاً در تطابق بود. گونه‌ی *Pythium group P* دارای اسپورانژیوم با افزولش است ولی تولید هیچ‌گونه اسپور استراحتی نمی‌کند و با این ویژگی از *P. carolinianum* که کلامیدوسپور تشکیل می‌دهد، متمایز می‌شود (Xiao-Qing 2006).

بررسی منابع نشان داد که *P. marsipium* تاکنون از ایران گزارش نشده و در این پژوهش برای نخستین بار برای فلور پیتیومی ایران معرفی می‌شود. فقط چند گزارش

تبار I از درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس پیتیوم

اعضای این تبار شامل گونه‌های *P. heterothallicum* و *P. glomeratum* هستند. با بررسی نتایج به دست آمده و ترکیب داده‌های حاصل از مطالعات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و فیلوژنتیکی مشخص شد که جدایه‌ی MB1-2 یک گونه‌ی جدید و توصیف نشده از تبار I درخت فیلوژنتیکی آی‌تی‌اس پیتیوم است و نام موقت "Pythium sp. hordeum" برای آن انتخاب شد. این جدایه هم از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی و هم از نظر توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس به گونه‌های *P. heterothallicum* و *P. glomeratum* B. W.A. Campb. & F.F. Hendrix شباهت داشت. خصوصیات مشترک آن‌ها عبارتند از عدم توانایی تولید اسپورانژیوم و زئوسپور و وجود آماس-های ریشه‌ی کروی یا لیمویی شکل فراوان در محیط‌کشت است. اما تفاوت‌های بین این گونه‌ها وجود دارد که با توجه به این تفاوت‌ها می‌توان این گونه‌ها را از هم تفکیک کرد.

گونه‌ی *P. heterothallicum* همان‌طور که از نام آن پیداست دارای رفتار دگرتال است و برای تولید اسپور نیاز به تیپ آمیزشی سازگار دارد یعنی به هیچ عنوان در صورت نبود تیپ آمیزشی سازگار خود وارد مرحله‌ی جنسی نمی‌شود. گونه‌ی *P. glomeratum* دارای آنتریدیومی منشعب است که به دور آگونیوم پیچیده شده است. جدایه‌ی MB1-2 ابتدا به عنوان *heterothallicum* *P.* شناسایی شد ولی با واکاوی توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس و هم‌ردیف‌سازی توالی این ناحیه با توالی گونه‌های *P. heterothallicum* مستخرج از مقالات معتبر، به خوبی روشن شد که این شناسایی فاقد اعتبار است. آزمایش‌های بیشتر برای تعیین گونه‌ی این جدایه در دست انجام است.

تیپ این گونه از کلورادو، توصیف شده توسط لیفشیتز و همکاران (Lifshitz et al. 1984) مقایسه شد. جدایه‌ی تیپ این گونه فاقد اسپورانژیوم و زئوسپور است. جدایه‌ی موجود در این پژوهش به دلیل عدم تشکیل اسپورانژیوم بسیار شبیه جدایه‌ی لیفشیتز و همکاران (Lifshitz et al. 1984) بود. اما جدایه‌های یوزوهاشی و کوبایاشی (Uzuhashi & Kobayashi 2010) دارای اسپورانژیوم کروی هستند. در سایر ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی جدایه‌ی موجود در این پژوهش و دو دسته‌ی مذکور از جدایه‌ها کاملاً شبیه بودند. نتایج توالی‌سنجی و مقایسه‌ی توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس جدایه‌ی SuC1 با جدایه‌ی مذکور نیز مشاهدات ریخت‌شناختی را تأیید کرد. جدایه‌ی SuC1 بیش‌ترین شباهت (۹۹ درصد) را به جدایه‌ی لیفشیتز و همکاران (Lifshitz et al. 1984) (AY598709) داشت. میزان شباهت این جدایه به جدایه‌ی های یوزوهاشی و کوبایاشی (Uzuhashi & Kobayashi 2010) (AB537557 و AB468771) کم‌تر و ۹۵ درصد بود.

گونه‌ی *P. nunn* یک قارچ‌انگل است و قابلیت مهار زیستی علیه بیمارگرهای دیگر دارد و تاکنون از هیچ گیاه بیماری‌جدا سازی نشده است. جدایه‌های این گونه قادرند به طور کاملاً مؤثری از مرگ گیاهچه‌ی خیار که توسط *P. ultimum* var. *ultimum* Trow در شرایط گلخانه ایجاد می‌شود جلوگیری کنند همچنین قادرند است از پوسیدگی ریشه‌ی آزالیا و پرتقال توسط *Phytophthora cinnamomi* Rands, *P. citrophthora* R. E. & E. H. Smith, *parasitica* Dresher Paulitz & Baker (1987, Paulitz et al. 1985)

های تکاملی بین گونه‌های مشابه باشند و بتوان از آنها به عنوان بارکدی مناسب استفاده کرد، موجب شناسایی دقیق‌تر و سریع‌تر این دسته از بیمارگرهای گیاهی خواهد شد. بررسی مشاهده‌ها و نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که شالیزارها و خزانه‌های برنج در بردارنده‌ی فلور آُمیستی بکر و جدیدی هستند. احتمالاً عامل این امر شاید وجود شرایط محیطی مناسب برای این شبه‌قارچ‌ها، از جمله رطوبت در این بسترها باشد. بررسی‌های بیش‌تر روی این فلور در دست انجام است. به نظر می‌رسد برای افزایش وضوح تفاوت‌های ملکولی بین گونه‌های مشابه در تبارهای A، B و D و رسیدن به شناسایی دقیق در کوتاه‌ترین زمان ممکن، بهتر است علاوه بر ناحیه‌ی آی‌تی‌اس، از ژن‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی بیش‌تری مانند بتابوبولین و سیتوکروم اکسیداز II برای بارکدگذاری گونه‌ها استفاده شود. همچنین بیماری‌زایی گونه‌های به دست آمده در این پژوهش مورد آزمون قرار بگیرد. برای شناسایی بهتر گونه‌های جدید توصیف شده از سال ۱۹۸۷ به بعد به طراحی و نگارش کلید آرایه‌بندی جدیدی نیاز است.

این جدایه در تبار I و به عنوان یک گونه‌ی جدید و متفاوت در کنار دو گونه‌ی مشابه خود آمده است. این جدایه از خاک مزارع جو در شهرستان میمند جداسازی شد.

نتایج این پژوهش نشان داد که بهترین روش برای شناسایی گونه‌های مختلف جنس پیتوم، از طریق ترکیب تمام نتایج مطالعات ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی، فیلوژنتیکی به دست خواهد آمد. در این مطالعه مشخص شد که گونه‌های موجود در تبارهای A، B و D دارای ناحیه‌ی آی‌تی‌اس مشابهی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، تبارهای A و B مهم‌ترین تبارهای موجود در درخت فیلوژنتیکی این پژوهش بودند، زیرا گونه‌های غالب مزارع غلات مورد مطالعه در این پژوهش یعنی *P. aphanidermatum*، *P. dissotocum*، *P. P. kashmirensis* و *P. diclinum* درون این تبارها قرار گرفتند.

سرعت در امر شناسایی عوامل بیمارگر محصولات کشاورزی، به خصوص بیمارگرهای خاک‌زاد مانند گونه‌های پیتوم، اهمیت دارد. بنابراین بررسی کاربرد ژن‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی بیش‌تری که نشان‌دهنده‌ی تفاوت-

منابع

- Abdelzaher H. M. A., Elanaghy M. A. and Fadl-Allah E. M. 1997. Isolation of *Pythium oligandrum* from Egypt on soil and its mycoparasitic effect on *Pythium ultimum* var. *ultimum* the damping-off organism of wheat. *Mycopathologia* 139: 97.
- Abdelzaher H. M. A. and Elnaghy M. A. 1998. Identification of *Pythium carolinianum* causing 'root rot' of cotton in Egypt and its possible biological control by *Pseudomonas fluorescens*. *Mycopathologia* 142: 143-151.
- Al-Sheikh H. 2010. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17: 347-352.
- Al-Sheikh H. and Abdelzaher M. A. 2012. Occurrence, identification and pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. diclinum*, *P. dissotocum* and *Pythium* "Group P" isolated from Dawmat Al-Jandal Lake, Saudi Arabia. *Research Journal of Environmental Sciences* 6: 196-209.
- Anderson Z. and Korthauer K. 2013. Characterization and identification of *Pythium* on soybean in North Dakota. North Dakota State. Online: <http://www.search.proquest.com>. [Accessed 16 Jun 2014]
- Bala K., Robideus G. P., Desaulniers N., De-Cock A. W. A. M. and Lévesque C. A. 2010. Taxonomy, DNA

- barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* 25: 22-31.
- Banihashemi Z., Macdonald J. D. and Stite J. 1992. Combine baiting and ELISA to detect and quantify *Phytophthora* spp. in container media. *Phytopathology* 82: 1101(Abstr.).
- Barr D. J. S. 1992. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* 84: 1-11.
- Chang K. F., Chen W., Choban B. and Mirza M. 1994. *Pythium* root rot of field grown cucumbers in Central Alberta in 1994. *Canadian Plant Disease Survey* 74: 111.
- Cooke D. E. L. and Duncan J. M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. *Mycological Research* 101: 667-677.
- Dick M. W. 1990. Oomycota. Pages 661-685. *In: Handbook of the Protoctista: The structure, cultivation, habits and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi.* Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., and Chapman, D. J. (eds). Jones & Barlett Publishers, Boston, USA.
- Drechsler C. 1930. Some new species of *Pythium*. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 20: 398-418.
- Drechsler C. 1941. Three species of *Pythium* with proliferous sporangia. *Phytopathology* 31: 478-507.
- Dutton S. and Penn C. W. 1998. Biological attributes of colony-type variants of *Candida albicans*. *Journal of general microbiology* 12: 1(Abs).
- Ershad D. 1977. Contribution to the knowledge of *Pythium* species of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 13: 55-74.
- Godfery S. A., Monds R. D., Lasb D. T. and Marshall J. W. 2003. Identification of *Pythium oligandrum* using species-specific ITS rDNA PCR oligonucleotides. *Mycological Research* 107: 790-796.
- 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.
- Harrison L. M. 1989. Canola disease survey in the Peace River region in 1988. *Canadian Plant Disease Survey* 69: 59.
- Hendrix F. F. and Campbell W. A. 1966. Root rot organisms isolated from ornamental plants in Georgia. *Plant Disease* 50: 393-395.
- Hendrix J. W. 1966. Inability of *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora palmivora* to incorporate acetate into digitonin-precipitable sterols. *Mycologia* 58: 307-312.
- Ho H., Chen X., Zeng H. and Zheng F. 2012. The occurrence and distribution of *Pythium* species on Hainan Island of South China. *Botanical Studies* 53: 525-534.
- Hou T. J., Huang H. C. and Acharya S.N. 1997. A preliminary study on damping-off of *Cicer milkvetch* in Southern Alberta. *Acta Prataculturae Sinica* 6: 47-50.
- Ito S. and Tokunaga Y. 1933. Studies on the rot-disease of rice seedlings caused by *Pythium* species. *Journal of Faculty Agriculture of Hokkaido University* 32: 201-233.
- Jeffers S. N. and Martin S. B. 1968. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* spp. *Plant Disease* 70: 1038-1034.
- Kageyama K., Ohyama A. and Hyakumachi M. 1997. Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species-specific primers. *Plant Disease* 81:1155-1160.
- Lévesque C. A. and De Cock A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108: 1363-1383.
- Lifshitz R., Stanghellini M. E. and Baker R. 1984. A new species of *Pythium* isolated from soil in Colorado. *Mycotaxon* 20: 373-379.
- Matsumoto C., Kageyama K., Suga H. and Hyakumachi M. 1999. Phylogenetic relationship of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience* 40: 321-331.
- Matsumoto C., Kageyama K. and Suga H. 2000. Intraspecific DNA polymorphisms of *Pythium irregular*. *Mycological Research* 104: 1333-1341.
- Mirsoleimani Z. and Mostowfizadeh-Ghahamfarsa R. 2013. Characterization of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis, based on host range, morphology, and ribosomal genome. *Phytopathologia Mediterranea* 53(3): 501-506.
- Paul B. and Bala K. 2008. A new species of *Pythium* with inflated sporangia and coiled antheridia, isolated from

- India. Microbiological Letter 282: 251-257.
- Paulitz T. C. and Baker R. 1987. Biological control of *Pythium* damping-off of cucumbers with *Pythium nunn*: influence of soil environment and organic amendments. *Phytopathology* 77:341-346.
- Paulitz T. C. and Adams K. 2003. Composition and distribution of *Pythium* communities in wheat fields in Eastern Washington State. *Phytopathology* 93: 867-873.
- Paulitz T. C., Windham M. and Baker R. 1985. *Pythium nunn* a potential biological control agent. *Phytopathology* 75:1326-1327.
- Robideau G. P., De Cock W. A. M., Coffey M. D., Voglmayr H., Brouwer H., Bala K., Chitty D. W., Desaulniers N., Eggertson Q. A., Ristaino J. B., Gachon C. M. M., Hu C., Kupper F. C., Rintoul T. L., Sarhan E., Verstappen E. C. P., Zhang Y., Bonants P. J. M., Ristaino J. B. and Levesque C. A. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11: 1002-1011.
- Sparrow F. K. Jr. 1932. Observations on the parasitic ability of certain species of *Pythium*. *Phytopathology* 22: 385-390.
- Strimmer K., and Von Haeseler A. 1996. Quartet puzzling - A quartet maximum likelihood method for constructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution* 13: 964-969.
- Thompson J. D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Ito S. and Tokunaga Y. 1933. Studies on the rot-disease of rice seedlings caused by *Pythium* species. *Journal of Faculty Agriculture of Hokkaido University* 32: 201-233.
- Tuit J. 1969. *Plant Pathological Methods*. Burgess Publishing Co. USA.
- Uzuhashi S. and Kobayashi S. 2010. Characterization of *Pythium nunn* newly recorded in Japan and its antagonistic activity against *P. ultimum* var. *ultimum*. *General Plant Pathology* 76: 278-283.
- Uzuhashi S., Tojo M. and Kakishima M. 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51: 337-365.
- Vaartaja O. 1967. Occurrence of falcate antheridia in *Pythium* species, particularly in *P. irregulare* and its synonym, *P. polymorphom*. *Mycologia* 59: 870-877.
- Van Der Plaäts-Niterink A. J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*. No. 21. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands.
- Villa N. O., Kayeyama K., Asona T. and Suga H. 2006. Phylogenetic relationship of *Pythium* and *Phytophthora* species Based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia* 98: 410-422.
- Wang P. H., Wang T. Y. and White J. G. 2003. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. *Applied Microbiology* 37: 127-132.
- Waterhouse G. M. 1967. Key to *Pythium* Pringsheim, *Mycological paper* 109: 1-15.
- White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky J. J., and White T. J. (eds). Academic Press, San Diego. USA.
- Xiao-Qing S. 2006. A new species of *Pythium* isolated from mosquito larvae and its ITS region of rDNA. *Mycosystema* 25: 523-528.
- Yu Y.N. and Ma G. Z. 1989. The genus *Pythium* in China. *Mycosystema* 2: 1-110.