

تاکسونومی، فیلوژنی و بیماری‌زایی گونه‌های *Pythium* در شالیزارهای برنج استان فارس

فاطمه سلمانی‌نژاد^۱ و رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۰)

چکیده

به منظور بررسی گونه‌های پیتیومی شالیزارهای برنج استان فارس طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ از خاک، آب آبیاری، ریشه و طوقه‌ی گیاهان بیمار نمونه‌برداری انجام گرفت. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها به همراه بررسی‌های فیلوژنتیکی فاصله‌ی ترانویسی‌شده‌ی داخلی (آی‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریبوزومی با روش پیوست همسایه‌ها، ۱۴ گونه‌ی *Pythium* شامل *Py. aphanidermatum*، *Py. catenulatum*، *Py. coloratum*، *Py. debaryanum*، *Py. dissotocum*، *Py. hydnosporum*، *Py. inflatum*، *Py. oopapillum*، *Py. nunn*، *Py. kashmirensense*، *Py. pyriforme*، *Py. porphyrae*، *Py. plurisporium* و *Py. rhizo-oryzae* شناسایی شد. تمامی گونه‌های یاد شده، به جز گونه‌های *Py. inflatum*، *Py. dissotocum* و *Py. rhizo-oryzae*، برای نخستین بار از فراریشه‌ی برنج در دنیا گزارش می‌شوند. گونه‌های *Py. oopapillum*، *Py. plurisporium*، *Py. porphyrae*، *Py. rhizo-oryzae* برای ایران جدیدند. فراوان‌ترین گونه‌های جدا شده *Py. aphanidermatum*، *Py. rhizo-oryzae* و *Py. catenulatum* بودند. بیماری‌زایی گونه‌های *Py. debaryanum*، *Py. oopapillum*، *Py. plurisporium*، *Py. porphyrae* و *Py. rhizo-oryzae* روی برنج برای نخستین بار در دنیا گزارش می‌شود.

کلیدواژه: اُمیکوتا، پوسیدگی ریشه، پیتیا، شناسایی

* بخشی از پایان نامه 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 استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

Taxonomy, phylogeny and pathogenicity of *Pythium* species in rice paddy fields of Fars Province

F. Salmaninezhad^{1*} and R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa¹

(Received: 10.10.2016; Accepted: 28.2.2017)

Abstract

In order to investigate the *Pythium* species of the rice paddy fields of Fars Province, Iran during 2013 to 2015, infected roots and crowns together with soil around seedlings and irrigation water were sampled. According to the morphological, morphometrical and physiological studies along with phylogenetic analyses based on internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA, fourteen *Pythium* species including *Py. aphanidermatum*, *Py. catenulatum*, *Py. coloratum*, *Py. debaryanum*, *Py. dissotocum*, *Py. hydnosporum*, *Py. inflatum*, *Py. kashmirensense*, *Py. nunn*, *Py. oopapillum*, *Py. plurisporium*, *Py. porphyrae*, *Py. pyrilobum*, and *Py. rhizo-oryzae* were identified. All species are reported for the first time in the world from rice rhizosphere except *Py. dissotocum*, *Py. inflatum* and *Py. rhizo-oryzae*. *Pythium oopapillum*, *Py. plurisporium*, *Py. porphyrae* and *Py. rhizo-oryzae* were new to Iran. *Pythium aphanidermatum*, *Py. rhizo-oryzae* and *Py. catenulatum* were the most abundant species. Pathogenicity of *Py. debaryanum*, *Py. oopapillum*, *Py. porphyrae*, *Py. plurisporium* and *Py. rhizo-oryzae* on rice plants were reported in this study for the first time, worldwide.

Keywords: Identification, Oomycota, Pythiaceae, Root rot

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

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

مقدمه

گسترش بیماری‌های ناشی از شبه‌قارچ‌های آُمیستی فراهم باشد، گونه‌های مختلف جنس *Pythium*، عوامل اصلی بیماری ازپافتادگی دانه‌های درحال جوانه‌زنی و گیاهچه‌ها هستند (Al-Sheikh 2010). بنابراین مطالعه روی گونه‌های *Pythium* موجود در زمین‌های زراعی و به‌خصوص مزارع غلات به منظور بررسی شیوه‌ی پراکنش گونه‌های مختلف این جنس ضروری به نظر می‌رسد.

در سال‌های اخیر در مزارع برنج استان فارس، علائمی نظیر پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی برنج و نیز کوتولگی گیاهچه دیده شده است. بررسی‌های بیش‌تر نشان داد که این زیست‌بوم کشاورزی از نظر گونه‌های آُمیستی بسیار غنی است (Bolboli & Mostowfizadeh-Ghalemfarsa 2015). با این حال تاکنون گزارش‌های بسیار اندکی در مورد گونه‌های *Pythium* مزارع برنج وجود دارد که از آن جمله می‌توان به *Pythium adhaerens* Sparrow، *Py. dissotocum*، *aphanidermatum* Edson Fitzp و *Py. marsipium* Drechsler اشاره کرد (Bolboli & Mostowfizadeh-Ghalemfarsa 2015). در این پژوهش سایر گونه‌های *Pythium* همراه با برنج شالیزارهای استان فارس با بررسی‌های ریخت‌شناختی و واکاوی‌های فیلوژنتیکی شناسایی و توصیف شده‌اند و همچنین امکان بیماری‌زایی آن‌ها روی برنج بررسی شده است.

روش بررسی

نمونه‌برداری: 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،

برنج (*Oryza sativa* L.) به انواع بیماری‌ها، به خصوص بیمارگرهای ریشه و طوقه حساس است. از مهم‌ترین بیماری‌های برنج می‌توان به بیماری گیاهچه برنج با عامل *Phytophthora erythroseptica* Pethybr. پوسیدگی ساقه (*Sclerotium oryzae* Catt.)، سوختگی غلاف برگ (*Helminthosporium oryzae* Breda de Han.)، پوسیدگی بذر و گیاهچه (*Pythium A. Achlya proliferans* Nees، *aphanidermatum* Fitzp. A. A. americana Humphrey، *flagellate* Coker A. A. klebsiana Pieters، *megasperma* Humphrey *oryzae* Ito & Nagai)، سوختگی غلاف (*Rhizoctonia solani* Kuhn) و بلاست (*Magnaporthe grisea* TT Webster et al. 1970, Bridge & Hebert & ME Barr Page 1982, Mew 1991, Silue et al. 1991, Ahn et al. 1992, Webster & Gunnell 1992, Fisher 1996, Zhang et al. 1996, Zhang & Watson 2000, Padashtdehkhahi et al. 2009, Mousanejad et al. 2009, Safari Motlagh et al. 2011, Tavakoli et al. 2011) اشاره کرد.

آُمیست‌ها به علت شرایط ویژه‌ی زیستی در محیط‌های مرطوب از عوامل عمده‌ی بیماری‌زای برنج در سطح جهانی هستند (Erwin & Ribeiro 1996). گونه‌های جنس‌های *Pythium* Pringsheim و *Phytophthora de Bary* به همراه *Achlya* Nees، *Phytophythium* Abad، *Cock*، *Bala*، *Robideau*، *A.M. Lodhi* & *Lévesque* و *Pythiogeton* Minden از آُمیست‌ها به کرات از مزارع برنج در زمان‌ها و مکان‌های مختلف جداسازی شده‌اند (Fukutomi et al. 1971, van der Plaats-Niterneck 1981, Thompson et al. 1991, Ahn et al. 1992, Furuya et al. 2003, Furuya et al. 2005, Furuya et al. 2007, Kato et al. 2013). وقتی که شرایط محیطی برای

قلعه‌نو، کامفیروز، کوشک، مرودشت، نقش‌رجب و هشتی‌جان) به طور کاملاً تصادفی انجام گرفت. نمونه‌های به دست آمده، به بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز برای بررسی‌های بعدی منتقل شد.

جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها: جدایه-

ها به روش طعمه‌گذاری با برگ مرکبات (Banihashemi et al. 1992) و برگ چمن (Tan 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 عصاره‌ی ذرت-آگار منتقل و در ۱۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود (van der Pläats-Niternick 1981, Dick 1990) و سایر مقاله‌های معتبر انجام گرفت. شناسایی ریخت‌شناختی گونه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی اندام‌های جنسی و غیرجنسی (نوع اسپورانژیوم، شکل و تزئینات سطح آگونیوم، نوع اتصال آنتریدیوم به آگونیوم و نوع آسپور)، سرعت رشد در دماهای مختلف (از پنج تا ۴۰ درجه‌ی سلسیوس به فواصل دمایی پنج درجه‌ی سلسیوس) و ریخت‌شناسی پرگنه روی محیط‌کشت‌های مختلف (عصاره‌ی ذرت-آگار (CMA)، عصاره‌ی هویج-آگار (CA)، عصاره‌ی مخمر-آگار (MEA)، عصاره‌ی شاهده‌-آگار (HSA) و عصاره‌ی سیب‌زمینی دکستروز-آگار (PDA) (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi 2005)) انجام شد.

آزمون بیماری‌زایی: تهیه‌ی مایه‌ی بیمارگر با استفاده از روش بنی‌هاشمی و فاتحی (Banihashemi & Fatehi

1989) صورت گرفت. برای آزمون‌های بیماری‌زایی از گیاهچه‌ی برنج رقم محلی کامفیروز (منطقه‌ی بکیان) استفاده شد. مایه‌ی بیماری‌زا به نسبت یک به ۱۰ با خاک سترون و ماسه (۱:۱) مخلوط شد. جهت بررسی آزمون بیماری‌زایی از پافتادگی بعد از سبز شدن از روش بنی-هاشمی (Banihashemi 1989) و آن و همکاران (Ann et al. 2006) استفاده شد و مایه‌زنی بعد از گذشت سه هفته از رشد گیاهچه‌ها صورت گرفت.

استخراج دی‌ان‌ای، توالی‌سنجی و واکاوی‌های

فیلوژنتیکی: استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2013) و با استفاده از کیت DNGTM-PLUS (سیناژن، 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 متحد آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد.

دی‌ان‌ای مربوط به فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی (آی‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS6 (Cooke & Duncan 1997) و ITS4 (White et al. 1990) و نیز دی‌ان‌ای مربوط به زیرواحد دو ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز سی با استفاده از آغازگرهای FM58 و FM66 (Villa et al. 2006) توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به روش میرسلیمانی و مستوفی-زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2013) و ویلا و همکاران (Villa et al. 2006) انجام شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با الکتروفورز در ژل یک درصد آگاروز حاوی ۰/۰۵ اتیدیوم بروماید در بافر تی‌بی‌ئی (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم تی‌دی‌تی‌ای، ۵/۵ گرم اسیدبوریک، آب مقطر تا حجم

یک لیتر) به مدت یک ساعت و در ۹۰ ولت تأیید شد. قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتوی فرابنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داکیومتر (سین‌ژن، ایالات متحد آمریکا) عکس‌برداری و اندازه‌ی نوارهای به دست آمده در مقایسه 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 شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده انجام و خلوص محصول به دست آمده توسط الکتروفورز تأیید شد.

توالی‌سنجی ژن‌های فزون‌سازی شده توسط شرکت ماکروژن کره‌ی 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 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>) استفاده از نرم‌افزار BankIt (GenBank, NCBI, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/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) با نرم‌افزار ClustalX (Thompson et al. 1997) انجام شده، متعاقباً به صورت دستی تنظیماتی روی آن صورت گرفت. از توالی گونه‌ی *Phytophthora infestans* رس‌شمار AF266779 به عنوان

گروه خارجی در رسم درخت فیلوژنتیکی گونه‌های *Pythium* استفاده شد. پارامترهای مدل شامل پارامترهای میزان ناهمگونی (rate heterogeneity) و جایگزینی (substitution) مانند: نسبت مورد انتظار گذار به تراگشت (transition/transversion ratios)، پراکنش گامای پارامتر آلفا و لگاریتم طبیعی احتمال با استفاده از نرم افزار PUZZLE (Strimmer & von Haeseler 1996) تخمین زده شد. واکاوی فیلوژنتیکی پیوست همسایه‌ها به روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalemfarsa 2013) انجام و ثبات تبارهای حاصل با ۵۰۰ دور آزمون بوت‌استرپ سنجیده شد. کلیه‌ی درخت‌های فیلوژنتیکی در پایگاه اطلاعاتی TreeBASE (<https://treebase.org>) وارد و شماره‌ی دست‌رسی به آن‌ها اخذ شد. گونه‌های شناسایی شده بر اساس فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی (آی‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریپوزومی جدایه‌ها، توالی‌سنجی و با روش پیوست همسایه‌ها واکاوی فیلوژنتیکی شدند.

نتایج

حاصل نمونه‌برداری طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ از خاک خزانه و مزارع برنج نقاط مختلف استان فارس ۱۱۶۹ جدایه‌ی *Pythium* بود (جدول ۱ و جدول تکمیلی ۱). با توجه به خصوصیات ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی و فیلوژنتیکی ۱۴ گونه‌ی *Pythium* شناسایی شد که شامل *Py. catenulatum*, *Py. aphanidermatum*, *Py. coloratum* Vaartaja, Matthews, *Py. dissotocum*, *Py. debaryanum* Hesse, *Py. kashmirensis*, *Py. inflatum*, *Py. hydnosporum* Schröt., *Py. nunn* Lifsh., Stangh. & R.E.D. Baker, Paul, *Py. plurisporium*, *Py. oopapillum* Bala & Lévesque

جدول ۱- مشخصات جدایه های پیتیوم به دست آمده از شالیزارهای برنج استان فارس.

Table1. Characteristics of the *Pythium* isolates collected from rice paddy fields of Fars Province.

Species	Isolate	Substrate	Date	Location	Coordinates	Accession Number ¹
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Kr10	Pond water	2014	Ramjard	30°05'.857"N 052°35'.469"E	KX228070
<i>Pythium catenulatum</i>	F-219-3	Pond water	2014	Firuzabad	28°52'.563"N 052°32'.963"E	KX228078
<i>Pythium debaryanum</i>	PG1	Rice crown	2015	Kamfiruz	30°18'.193"N 052°17'.629"E	KX228092
<i>Pythium dissotocum</i>	Fr16	Soil	2014	Firuzabad	28°52'.880"N 052°31'.773"E	KX228075
<i>Pythium hydnosporum</i>	Kr8	Soil	2014	Ramjard	30°06'.897"N 052°34'.308"E	KX228069
<i>Pythium inflatum</i>	N25B1	Rice root	2015	Kamfiruz	30°20'.350"N 052°16'.370"E	KX228090
<i>Pythium kashmirens</i>	TD1	Rice crown	2015	Persepolis	30°00'.599"N 052°58'.285"E	KX228087
<i>Pythium nunn</i>	K-330-5	Soil	2014	Kamfiruz	30°17'.132"N 052°19'.042"E	KX228091
<i>Pythium oopapillum</i>	K-444-3	Rice root	2014	Kamfiruz	30°20'.351"N 052°16'.372"E	KX228076
	Kr13	Rice crown	2014	Ramjard	30°07'.270"N 052°34'.154"E	KX228077
<i>Pythium plurisporium</i>	KC12	Rice root	2014	Ramjard	30°05'.671"N 052°35'.522"E	KX228082
<i>Pythium porphyrae</i>	Kz2	Rice crown	2014	Kamfiruz	30°17'.238"N 052°19'.039"E	KX228074
<i>Pythium pyrilobum</i>	KL4	Rice root	2014	Firuzabad	28°53'.353"N 052°32'.021"E	KX228088
<i>Pythium rhizo-oryzae</i>	Ar15	Pond water	2014	Persepolis	29°58'.884"N 052°57'.912"E	KX228080
	Kr19	Rice root	2014	Ramjard	30°07'.905"N 052°32'.363"E	KX228089
	Kr5	Soil	2014	Ramjard	30°07'.428"N 052°32'.794"E	KX228079

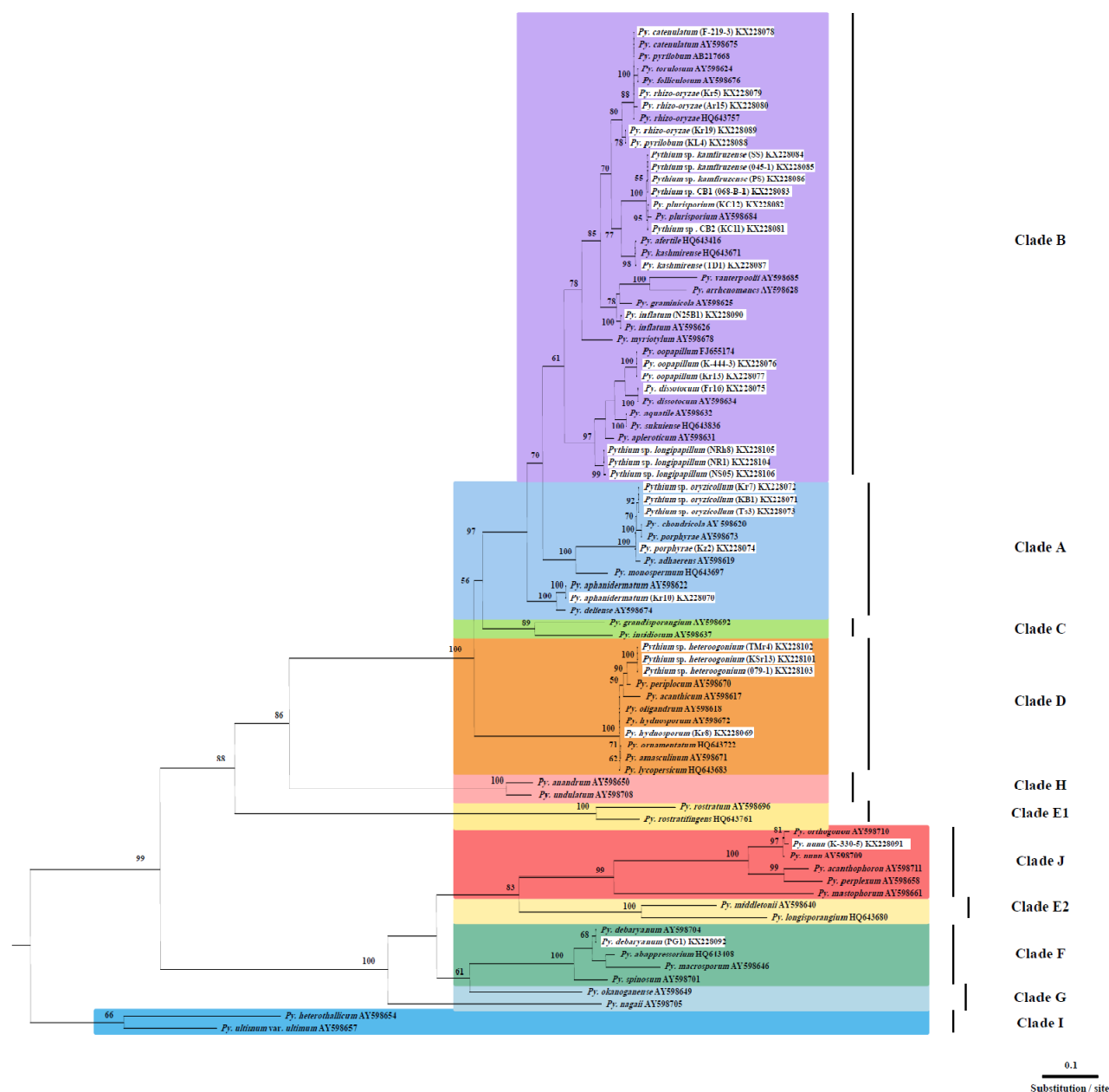
¹ GenBank accession number for internal transcribed spacer (ITS) of rDNA

(Lenney & Klemmer 1966) تشکیل شدند. زئوسپورهای سیستم شده قطری معادل ۸ تا ۱۰ میکرومتر دارند. اسپورانژیوم از نوع رشته ای آماسیده و حاوی عناصر لپ مانند بود (شکل ۲، A). آگونیوم ها اغلب بین ریشه ای و گاهی انتهایی، صاف و گرد با قطری معادل ۱۸/۱ تا ۲۵/۲ میکرومتر (میانگین ۲۰/۳ میکرومتر) بودند (شکل ۲، A). آنتریدیوم تک بن یا دو بن که اغلب به صورت انتهایی بر روی ساقه ای منشعب آنتریدیوم قرار می گرفتند. به ازای هر آگونیوم یک تا چهار عدد آنتریدیوم چماقی شکل با اتصال از نوع انتهایی یا جانبی و به صورت پراماده یا ندرتاً زیر ماده دیده شد. آسپور ناپرساز یا تقریباً پرساز به قطر تقریبی ۱۵ تا ۱۹ میکرومتر (میانگین ۱۷/۳ میکرومتر)، اغلب دارای دیواره ای ضخیم (یک تا سه میکرومتر) بود (جدول ۳) که این دیواره دارای یک پستانک گرد، نیمه-کروی یا بیضی به ابعاد ۵/۸ در ۱/۸ میکرومتر داشت (شکل ۲، A). این گونه در تبار B از درخت فیلوژنتیکی *Pythium* قرار گرفت (شکل ۱). آزمون های بیماری زایی دو بار تکرار

Py. py. porphyrae Abad, Shew, Grand & Lucas
Py. rhizo- pyrilobum Vaartaja, Takah & Sasaki
oryzae Bala, Gautam & Paul بود. از میان این گونه ها چهار گونه برای ایران جدید بودند. حاصل واکاوی های فیلوژنتیکی فاصله ای ترانویسی شده ای داخلی دی ان ای ریپوزومی (آی تی اس) این گونه ها را در پنج تبار مختلف قرار داد (شکل ۱). گونه های جدید برای ایران در ذیل توصیف شده اند.

Pythium oopapillum Bala & Lévesque 2010

جدایه های این گونه از خزانه و شالیزارهای برنج نواحی مرکزی و شمال غربی استان فارس جداسازی شدند (جدول ۱ و جدول تکمیلی ۱). پرگنه روی محیط کشت- های MEA, PDA, CA و HSA دارای الگوی رشد گل- سرخی و روی CMA دارای الگوی رشد شعاعی تا یک- نواخت بود (جدول ۲). قطر ریشه ای اصلی ۵ میکرومتر بود. ریزکیسه ها و زئوسپورها در ۲۵ درجه ای سلسیوس در آب مقطر سترون محتوی شاهدانه ای سترون و نیترا ت کلسیم



شکل ۱. موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Pythium* spp. استان فارس در بین ۱۳۲ گونه‌ی *Pythium* بر اساس مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی نواحی آی‌تی‌اس در درخت پیوست همسایه‌ها (رس‌شمار TreeBase ۱۹۲۳۶). اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده‌ی درصد مقادیر بوت‌استرپ بزرگ‌تر و یا مساوی ۵۰ درصد است.

Fig1. Phylogenetic relationships of *Pythium* spp. from Fars province among 132 *Pythium* species based on the comparison of ITS sequences in neighbor joining tree (TreeBase accession number: 19236). Numbers above the branches represent the bootstrap values greater and equal to 50 %.

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

Table 2. Colony morphology and growth rate (mm/d) of *Pythium* species on various media at 25 °C.

Species	Isolate	HSA		MEA		CA		PDA		CMA	
		Growth	Colony	Growth	Colony	Growth	Colony	Growth	Colony	Growth	Colony
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Kr10	31	Uni	30	Uni	28	Uni	30	Uni	33	Uni
<i>Pythium catenulatum</i>	F-219-3	7.7	Med	8	Uni	9	Ros	10	Uni	5	Rad
<i>Pythium coloratum</i>	Kz7	23	Ros	30	Uni	24	Ros	20	Med	31	Uni
<i>Pythium debaryanum</i>	PG1	9	Rad	8	Rad	10	Rad	11	Rad	6	Rad
<i>Pythium dissotocum</i>	Fr16	23	Ros	30	Med	24	Ros	20	Med	31	Uni
<i>Pythium hydnosporum</i>	Kr8	11	Uni	11	Uni	11	Uni	11	Ros	6	Uni
<i>Pythium inflatum</i>	N25B1	12	Med	8	Med	10	Ros	11	Ros	5	Rad
<i>Pythium kashmirensense</i>	TD1	8	Med	9	Uni	10	Rad	10	Med	3	Rad
<i>Pythium nunn</i>	K-330-5	8	Ros	9	Rad	7	Med	12	Ros	3	Rad
<i>Pythium oopapillum</i>	K-444-3	6	Ros	7	Ros	9	Ros	7	Ros	4	Uni
<i>Pythium plurisporium</i>	KC12	8	Med	7	Cry	9	Rad	10	Cry	8	Rad
<i>Pythium porphyrae</i>	Kz2	3	Uni	4	Uni	5	Rad	5	Uni	2	Uni
<i>Pythium pyrillobum</i>	KL4	8	Ros	10	Ros	7	Ros	10	Uni	6	Ros
<i>Pythium rhizo-oryzae</i>	Ar15	7.5	Ros	8	Ros	9	Ros	10	Med	5	Ros

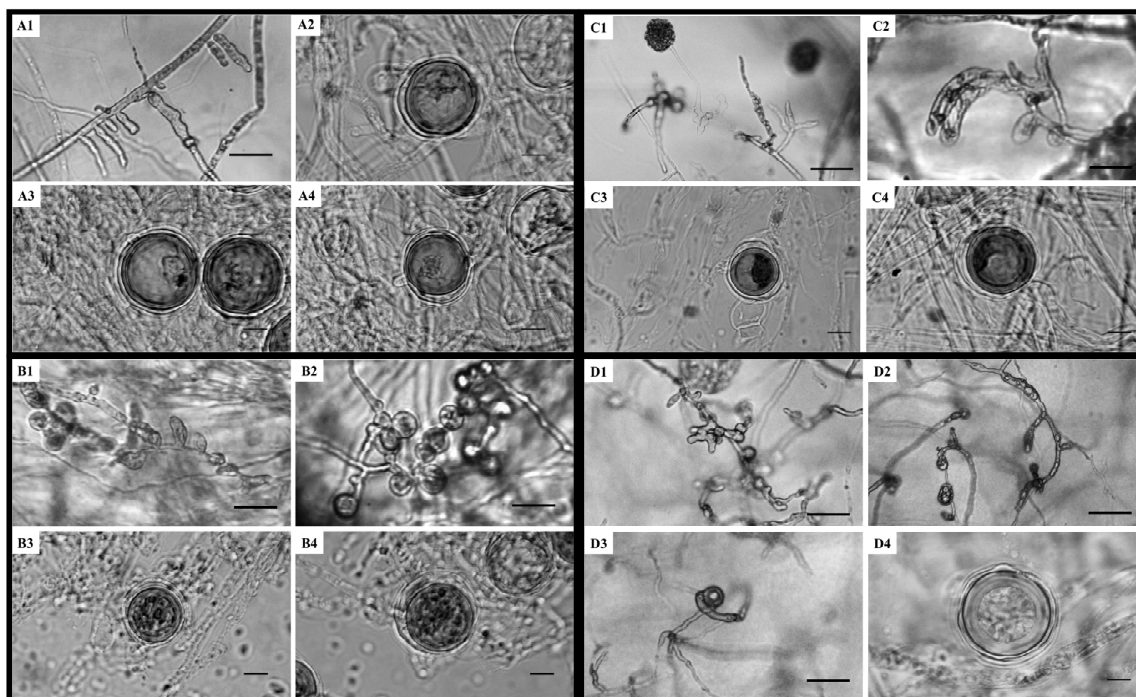
Rad = Radial .Ros = Rosette .Cry = *Chrysanthemum* .Uni = Uniform .Med = Mediated form.

CA دارای الگوی رشد شعاعی، روی MEA و PDA دارای الگوی رشد گل‌سرخی و روی HSA دارای الگوی رشد حدواسط بود (جدول ۲). ریشه‌ی اصلی شبیه درخت با قطری معادل پنج تا هفت میکرومتر بود (جدول ۳). اسپورانژیوم از نوع رشته‌ای و به صورت لوب‌مانند و حاوی عناصر آماسیده‌ی مرتبط با به قطر ۱۲ تا ۱۶ میکرومتر (میانگین ۱۳ میکرومتر) با طول‌های متفاوت و همچنین دارای لوله‌ی تخلیه‌ی بسیار بلند به طول تقریبی ۸۰ میکرومتر بود (شکل ۳، A). قطر زئوسپوره‌ای سیست شده ۴ تا ۸ میکرومتر (میانگین ۵/۵ میکرومتر) بود.

شدند و در هر دو مرتبه نتایج یک‌سانی به دست آمد. نتایج این آزمون نشان داد که تمامی جدایه‌های این گونه منجر به کاهش رشد گیاهچه‌های برنج در مرحله‌ی بعد از سبز شدن و نیز کاهش حجم گیاهچه‌های برنج می‌شوند (جدول ۴).

***Pythium plurisporium* Abad, Shew, Grand & Lucas 1996**

جدایه‌های این گونه از خزانه و شالیزارهای برنج شمال غربی استان فارس جداسازی شدند (جدول ۱ و جدول تکمیلی ۱). پرگنه روی محیط‌کشت‌های CMA و عصاره‌ی



شکل ۲- (A) ریخت‌شناسی *Pythium oopapillum*: A1: اسپورانژیوم رشته‌ای آماسیده. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. A2: اُسپور ناپرساز. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. A3: اُسپورهای ناپرساز و پستانک‌دار. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. A4: اُسپورهای ناپرساز پستانک‌دار به همراه آنترییدیوم انتهایی با اتصال پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (B) ریخت‌شناسی *Pythium rhizo-oryzae*: B1: اسپورانژیوم رشته‌ای اندکی آماسیده. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. B2: تورم‌های ریشه‌ی زنجیری. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. B3: اُسپور ناپرساز. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. B4: اُسپورهای ناپرساز به همراه تعداد زیادی آنترییدیوم پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (C) ریخت‌شناسی *Pythium aphanidermatum*: C1: اسپورانژیوم آماسیده به همراه لوله‌ی تخلیه و ریزکیسه‌ی خارج‌شده از آن. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. C2: چنگک. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. C3: اُسپور ناپرساز به همراه آنترییدیوم بین‌ریشه‌ای با اتصال پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. C4: اُسپورهای ناپرساز به همراه آنترییدیوم انتهایی با اتصال پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (D) ریخت‌شناسی *Pythium kashmirensis*: D1: اسپورانژیوم رشته‌ای اندکی آماسیده. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. D2: تورم‌های ریشه‌ی مرکب. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. D3: چنگک. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. D4: اُسپور تقریباً پرساز. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Fig2. Morphology of *Pythium* species isolated from rice paddy fields of Fars province. (A): Morphology of *Pythium oopapillum*. A1: Filamentous, inflated sporangium (bar = 20 μ), A2: Aplerotic oospore (bar = 20 μ), A3: Aplerotic oospore with papillae (bar = 10 μ), A4: Aplerotic oospores with papillae and terminal paragynous antheridia (bar = 10 μ); (B) Morphology of *Pythium rhizo-oryzae*. B1: Filamentous, slightly inflated sporangium (bar = 20 μ); B2: catanulated hyphal swellings (bar = 20 μ), B3: Aplerotic oospore (bar = 10 μ), B4: Aplerotic oospore with numerous paragynous antheridia (bar = 10 μ); (C) Morphology of *Pythium aphanidermatum*. C1: Inflated sporangium with discharged tube and vesicle (bar = 20 μ), C2: Appressorium (bar = 20 μ), C3: Aplerotic oospore with intercalary paragynous antheridium (bar = 10 μ), C4: Aplerotic oospore with terminal paragynous antheridium (bar = 10 μ); (D) Morphology of *Pythium kashmirensis*. D1: Slightly inflated sporangium (bar = 20 μ), D2: Continuous hyphal swellings (bar = 20 μ), D3: Appressorium (bar = 20 μ), D4: Nearly plerotic oospore (bar = 10 μ).

به ازای هر آگونیوم چهار تا ۱۰ آنترییدیوم عصایی شکل به
 قطر ۵ تا ۷ میکرومتر وجود داشت که این آنترییدیوم‌ها بر
 روی دو تا چهار پایه‌ی منشعب مجزا تشکیل می‌شدند که
 این پایه‌ها نیز معمولاً به دور آگونیوم می‌پیچید (شکل ۲، A۴).

جدول ۳. مقایسه ی خصوصیات ریخت شناختی گونه های *Pythium* جدا شده از شالیزارهای برنج استان فارس.
Table 3. Comparison of morphological characters of *Pythium* species isolated from rice paddy fields of Fars Province.

Character	P. aphanidermatum	P. catenulatum	P. coloratum	P. debaryanum	P. dissotocum	P. hydnosporu m	P. inflatum	P. kashmirens e	P. numm oopapillum	P. plurisporium	P. porphyrae	P. pyriform	P. rhizo-
Shape	F, inflated ¹	F, inflated	F, inflated	G ²	F, inflated	-	F, inflated	Contiguous	-	F, inflated	F ³	F, inflated	F, inflated
Average(μm)	Variable	Variable	Variable	23.4	Variable	-	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable
Range (μm)	Variable	Variable	Variable	12.8-29.7	Variable	-	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable
Hyphal swelling													
Average (μm)	-	17.0	-	-	-	-	Variable	-	-	-	-	-	19.7
Range (μm)	-	11.1-23.4	-	-	-	-	Variable	-	-	-	-	-	13-30
Oogonia													
Shape	G	-	G	G	G	G	G	G	G	Obovoid	G	G	G
Average diam. (μm)	25.1	-	19.5	25.4	21.2	27.7	22.5	16.7	20.2	21.1	25.3	27.0	18.0
Range (μm)	20.9-26.8	-	16.9-22.1	17.7-26.9	18.7-23.9	25.5-30.3	21.7-26.2	14.5-19.4	18.5-23.1	17.7-24.6	17.4-30.1	25.6-28.7	17.5-22.1
Oospore													
Average diam. (μm)	22.7	-	18.8	19.1	18.0	26.9	21.5	15.4	18.9	17.1	17.7	23.5	16.7
Range (μm)	19.8-24.6	-	17.5-22.1	16.6-26.1	16.3-23.1	25.3-29.9	22.1-25.9	13.6-18.8	18.1-20.2	14.8-18.2	12.1-24.8	25.3-27.2	14.1-20.3
Type	A ⁴	-	A	A	A	P ⁵	P	A	A	A	A	A	A
Oospore wall average (μm)	1.8	-	3.1	1.1	2.8	2.4	2.0	0.7	2.1	1.9	2.0	1.4	1.5
Antheridia													
Shape	Sack-Shaped	-	Crook-necked	Crook-necked	Club-Shaped	Crook-necked	Sack-Shaped	Club-Shaped	Sack-Shaped	Club-Shaped	Crook-necked	Crook-necked	Sack-Shaped ⁶
Average diam. (μm)	11.2	-	5.6	5.3	4.8	11.0	9.5	4.1	10.9	4.3	7 × 15	9 × 5.5	9.5
Range (μm)	7.9-13.7	-	4.5-7.1	4.3-6.2	3.3-6.5	9.9-12.3	7.9-10.1	2.1-5.5	10.3-11.6	5 × 16-6 × 17	4.0-5.5	8 × 5-12 × 6	8.1-9.9
Hyphae													
Average width (μm)	9.5	3.2	7.3	3.4	5.6	6.1	2.7	6.2	5.6	3.5	3.2	7.7	5.4
Range (μm)	6.3-11.5	2.2-4.4	4.1-9.1	2.5-6	3.4-7.7	4.4-8.0	2.2-4.0	4.7-8.1	3.2-8.1	3.3-4.5	2.8-3.9	5.5-12.0	5.0-6.0

T. F, inflated= Filamentous inflated; ² G=Globose; ³ F=Filamentous; ⁴ A= Aplerotic; ⁵ P=Plerotic; ⁶ Sack-Shaped with nodes.

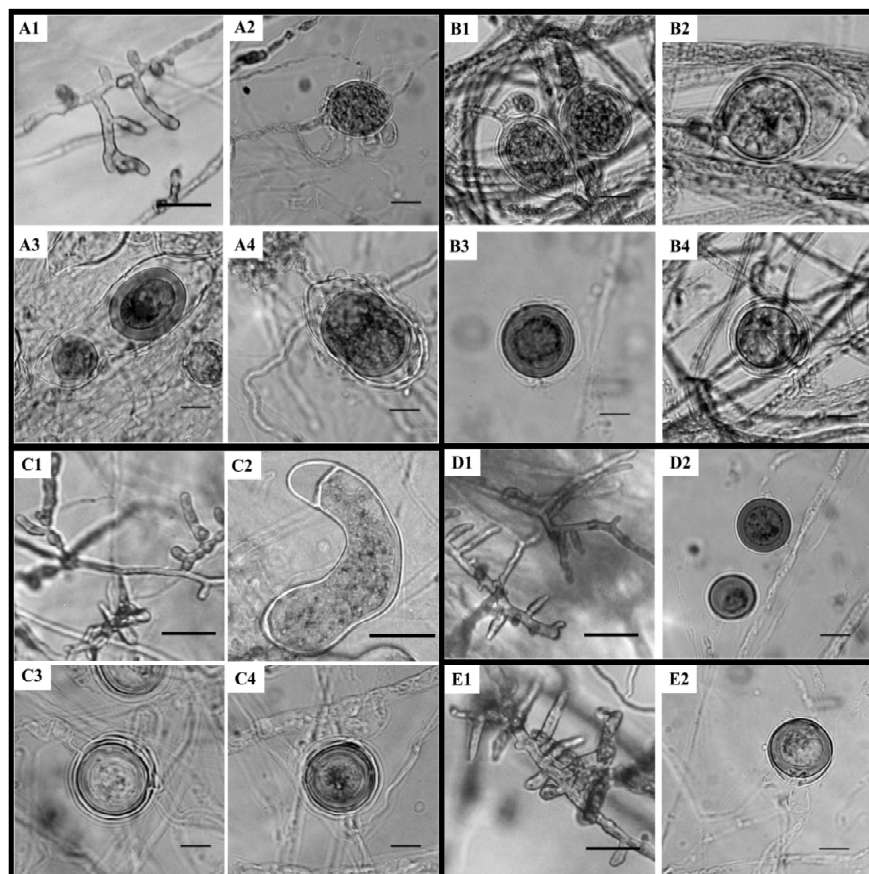
جدول ۴. نتایج آزمون بیماری‌زایی گونه‌های *Pythium* جداشده از شالیزارهای برنج استان فارس.

Table 4. Pathogenicity test results of *Pythium* species isolated from rice paddy fields of Fars province.

Species isolates	Pathogenicity on rice	Symptoms					Tissue colonization
		No growth (%)	Stunting (%)	Post-emergence damping-off (%)	Pre-emergence damping-off (%)	Seed rot (%)	
<i>Pythium aphanidermatum</i>							
Kr10	-	0	0	0	0	0	+
<i>Pythium catenulatum</i>							
F-219-3	-	0	0	0	0	0	-
<i>Pythium coloratum</i>							
Kz7	-	0	0	0	0	0	-
<i>Pythium debaryanum</i>							
PG1	+	0	60	90	0	0	+
<i>Pythium dissotocum</i>							
Fr16	-	0	0	0	0	0	+
<i>Pythium hydnosporum</i>							
Kr8	-	0	0	0	0	0	-
<i>Pythium inflatum</i>							
N25B1	-	0	0	0	0	0	-
<i>Pythium kashmirensense</i>							
TD1	-	0	0	0	0	0	+
<i>Pythium oopapillum</i>							
K-444-3	+	0	0	80	0	0	+
Kr13	+	0	0	90	0	0	+
<i>Pythium plurisporium</i>							
KC12	+	0	0	60	0	0	+
<i>Pythium porphyrae</i>							
Kz2	+	0	0	80	0	0	+
<i>Pythium pyrilobum</i>							
KL4	-	0	0	0	0	0	-
<i>Pythium rhizo-oryzae</i>							
Ar15	+	0	0	50	60	0	+
Kr19	+	0	0	70	80	0	+
Kr5	+	0	0	70	70	0	+

انشعاب ریشه‌ی آگونیومی دو تا سه عدد آگونیوم تشکیل شد. تعداد آسپورها در یک آگونیوم از یک تا شش عدد متغیر بود (شکل ۳، A). آگونیوم حاوی دو آسپور ابعادی معادل ۱۵/۹ در ۲۵/۲ میکرومتر (میانگین ۲۵/۵ در ۲۴/۷ میکرومتر) داشت. آسپور از نوع ناپرساز با دیواره‌ای به ضخامت ۲/۷ میکرومتر بود. در زمان وجود یک آسپور در آگونیوم قطر آسپور ۱۴/۱ تا ۲۶/۲ میکرومتر (میانگین

اتصال آنتریدیوم به آگونیوم از نوع انتهایی و پراماده بود. آگونیوم صاف، کروی تا نیمه‌کروی و اکثراً به شکل تخم-مرغی وارونه بودند. برخی از آگونیوم‌ها همراه با ریشه‌ی آگونیومی دم‌پایکی (pedicelled) با یک تا چهار عناصر متورم با پهنایی معادل ۱۰/۵ تا ۲۰/۱ میکرومتر (میانگین ۱۵ میکرومتر) دیده شدند. دم‌پایک آگونیوم طولی معادل ۸۷ تا ۱۲۸ میکرومتر (میانگین ۱۱۰ میکرومتر) داشت. از یک



شکل ۳. (A) ریخت شناسی *Pythium plurisporium*. A1: اسپورانژیوم رشته ای لوب مانند. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. A2: اُاسپور در حال تشکیل با آنتریدیوم های تک بن و دوبن با اتصال پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. A3: اُگونیوم حاوی دو اُاسپور. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. A4: اُاسپور ناپرساز به همراه ۱۰ تا ۱۲ عدد آنتریدیوم پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (B) ریخت شناسی *Pythium debaryanum*. B1: اسپورانژیوم گرد و بیضی شکل. B2: اسپورانژیوم با افزودن داخلی. B3: اُاسپور ناپرساز به همراه آنتریدیوم با اتصال پراماده. B4: اُاسپورهای ناپرساز به همراه آنتریدیوم انتهایی با اتصال زیرماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (C) ریخت شناسی *Pythium dissotocum*. C1: اسپورانژیوم رشته ای بدون آماس. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. C2: چنگک. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. C3: اُاسپور ناپرساز و بین ریشه ای. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. C4: اُاسپور ناپرساز به همراه آنتریدیوم پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (D) ریخت شناسی *Pythium porphyrae*. D1: اسپورانژیوم رشته ای بدون آماس. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. D2: اُاسپورهای پرساز با یک آنتریدیوم پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (E) ریخت شناسی *Pythium coloratum*. E1: اسپورانژیوم رشته ای بدون آماس. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. E2: اُاسپور ناپرساز به همراه آنتریدیوم با اتصال پراماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Fig 3. Morphology of *Pythium* species isolated from rice paddy fields of Fars province. (A) Morphology of *Pythium plurisporium*. A1: Filamentous, inflated sporangium (bar = 20 μ), A2: Oospore with monoclinal and diclinal paragynous antheridia (bar = 10 μ), A3: Oogonium with two oospores (bar = 10 μ), A4: Aplerotic oospore with 10 to 12 paragynous antheridia (bar = 10 μ); (B) Morphology of *Pythium debaryanum*. B1: Globose and ellipsoidal sporangia, B2: Sporangium with internal proliferation, B3: Aplerotic oospore with paragynous antheridium, B4: Aplerotic oospore with terminal hypogynous antheridium (bar = 10 μ); (C) Morphology of *Pythium dissotocum*. C1: Filamentous, not inflated sporangium (bar = 20 μ), C2: Appressorium (bar = 20 μ), C3: Aplerotic intercalary oospore (bar = 10 μ), C4: Aplerotic oospore with paragynous antheridium (bar = 10 μ); (D) Morphology of *Pythium porphyrae*. D1: Filamentous, not inflated sporangium (bar = 20 μ), D2: Plerotic oospores with one paragynous antheridium (bar = 10 μ); (E) Morphology of *Pythium coloratum*. E1: Filamentous, not inflated sporangium (bar = 20 μ), E2: Aplerotic oospore with paragynous antheridium (bar = 10 μ).

Pythium قرار گرفت (شکل ۱). نتایج آزمون بیماری‌زایی در هر دو بار تکرار نشان داد که تمامی جدایه‌های این گونه منجر به پوسیدگی ریشه و کاهش رشد گیاهچه‌های برنج در مرحله‌ی بعد از سبز شدن می‌شوند (جدول ۴).

***Pythium rhizo-oryzae* Bala, Gautam & Paul 2006**

جدایه‌های مربوط به این گونه از نواحی شمالی، شمال غربی و جنوب غربی خزانه و شالیزارهای برنج استان فارس جداسازی شدند (جدول ۱ و جدول تکمیلی ۱). پرگنه روی محیط‌کشت‌های MEA، CA و HSA دارای الگوی گل‌سرخی و روی PDA و CMA به ترتیب دارای الگوی رشد حدواسط و شعاعی تا گل‌سرخی بود (جدول ۲). پهنای ریشه‌ی اصلی ۶ تا ۷ میکرومتر بود (جدول ۳). اسپورانژیوم در تمامی جدایه‌های این گونه به صورت رشته‌ای غیر آماسیده تا اندکی آماسیده و به شکل درخت بود (شکل ۲، B). این جدایه‌ها تولید دو نوع تورم ریشه می‌کردند: نوع اول که ندرتاً در آن‌ها دیده می‌شد از نوع انتهایی بود که بر روی پایه‌های کوتاه و جانبی تشکیل می‌شد. نوع دوم که غالباً مشاهده شد به صورت زنجیره‌های ۸ تا ۱۰ تایی بود (شکل ۲، B). آگونیوم صاف، گرد، انتهایی و بین‌ریشه‌ای، با قطری معادل ۱۹ تا ۲۳/۲ میکرومتر (میانگین ۲۰ میکرومتر) بود و به ازای هر آگونیوم دو تا هشت آنتریدیوم تک‌بن یا دو بن مشاهده شد. آنتریدیوم‌ها طوری آگونیوم را احاطه کرده و دور آن می‌پیچند که دیدن تعداد دقیق آن بسیار مشکل بود (شکل ۲، B). آسپور از نوع ناپرساز تا ندرتاً پرساز، گرد، به قطر ۱۵/۱ تا ۲۱ میکرومتر (میانگین ۱۷ میکرومتر) و با دیواره‌ای به ضخامت یک تا دو میکرومتر مشاهده شد (شکل ۲، B). دمای رشد کمینه‌ی ۱۰، بهینه‌ی ۳۰ و بیشینه‌ی ۴۰ درجه‌ی سلسیوس اندازه‌گیری شد. این گونه در تبار B از درخت

۱۸/۹ میکرومتر) و در زمان وجود دو آسپور در آگونیوم قطر آسپور ۱۱/۱ تا ۲۰/۳ میکرومتر (میانگین ۱۶/۱ میکرومتر) اندازه‌گیری شد. آسپور از نوع ناپرساز با دیواره‌ای نسبتاً ضخیم (به ضخامت تقریبی ۲/۷ میکرومتر) بود. دمای رشد کمینه در ۵، بهینه در ۳۰ و ۳۵ و بیشینه در ۴۰ درجه‌ی سلسیوس بود. این گونه در تبار B از درخت فیلوژنتیکی *Pythium* قرار گرفت (شکل ۱). در هر دو بار تکرار آزمون‌های بیماری‌زایی نتایج یکسانی به دست آمد. نتایج این آزمون نشان داد که تمامی جدایه‌های این گونه منجر به کاهش رشد گیاهچه‌های برنج در مرحله‌ی بعد از سبز شدن و نیز کاهش حجم ریشه می‌شوند (جدول ۴).

***Pythium porphyrae* Takah & Sasaki 1977**

جدایه‌های این گونه از خزانه‌ها و شالیزارهای برنج نواحی شمالی، شمال غربی و جنوب غربی استان فارس جداسازی شدند (جدول ۱ و جدول تکمیلی ۱). پرگنه روی محیط‌کشت PDA دارای الگوی رشد حدواسط تا بدون الگو، روی MEA، HSA و CMA بدون الگوی رشد و روی CA دارای الگوی رشد شعاعی بود (جدول ۲). پهنای ریشه‌ی اصلی ۳ میکرومتر بود (جدول ۳). تمامی جدایه‌های این گونه تولید اسپورانژیوم کاملاً رشته‌ای کردند (شکل ۳، D). آگونیوم صاف، گرد، بین‌ریشه‌ای یا انتهایی به قطر ۱۳/۸ تا ۲۱/۲ میکرومتر (میانگین ۱۹/۵ میکرومتر) بودند (شکل ۳، D). به ازای هر آگونیوم یک تا چهار عدد آنتریدیوم دو بن و به صورت پراماده مشاهده شد. آسپور از نوع پرساز، کاملاً گرد، به قطر ۱۲/۹ تا ۱۸/۱ میکرومتر (میانگین ۱۷/۴ میکرومتر) و با دیواره‌ای به ضخامت ۱/۴ تا ۱/۵ مشاهده شد (شکل ۳، D). دمای رشد کمینه‌ی ۱۵، بهینه‌ی ۲۰ و بیشینه‌ی ۳۵ درجه‌ی سلسیوس اندازه‌گیری شد. این گونه در تبار A از درخت فیلوژنتیکی

فیلوژنتیکی *Pythium* قرار گرفت (شکل ۱). بررسی نتایج آزمون بیماری زایی نشان داد که تمامی جدایه های این گونه منجر به کاهش رشد گیاهچه ها و کاهش حجم ریشه ی برنج می شوند و با تکرار آزمایش نتایج مشابهی به دست داد (جدول ۴).

بحث

از تبار A از درخت فیلوژنتیکی گونه های پیتیوم، دو گونه ی *Pythium aphanidermatum* و *Py. porphyrae* به دست آمدند. این تبار طبق نظر لاوسکو و دکاک (Lévesque & de Cock 2004) یک تبار ناهمگون و متشکل از دو خوشه ی کاملاً مجزا است. در یک خوشه *Py. aphanidermatum* و *Py. deliense Meurs* با سرعت رشد بسیار بالا، اسپورانژیوم های رشته ای آماسیده و یک یا دو آنتریدیوم به صورت اغلب بین ریشه ای قرار می گیرند. در حالی که در خوشه ی دیگر *Py. adhaerens*، *Py. chondricola de Cock* و *Py. porphyrae* با سرعت رشد بسیار کم، اسپورانژیوم های کاملاً رشته ای و سه تا چهار آنتریدیوم اغلب به صورت انتهایی قرار دارند. وجود *Py. porphyrae* برای اولین بار از این پژوهش در ایران گزارش می شود. همچنین بیماری زایی این گونه روی برنج برای نخستین بار از دنیا گزارش می شود.

بیشترین گونه های پیتیوم به دست آمده از این پژوهش از تبار B هستند. اعضای این تبار از نظر ریخت شناسی اسپورانژیوم به یکدیگر بسیار شبیه هستند (Lévesque & de Cock 2004, Robideau et al. 2011). یکی از مهم ترین ویژگی های تفکیک کننده ی این اعضا از یکدیگر، شکل آنتریدیوم و نحوه ی اتصال آن به آگونیوم است و شاید تنها با بررسی ژن های میتوکندریایی بتوان گونه های موجود در این تبار را از یکدیگر کاملاً تفکیک کرد

(Robideau et al. 2011). از میان گونه های به دست آمده از این تبار، گونه های *Py. catenulatum* و *Py. rhizo-oryzae* بسیار به هم نزدیک هستند. گونه ی *Py. rhizo-oryzae* با میزان رشد کم تر روی محیط کشت PDA، داشتن تورم های ریشه ی بین ریشه ای و انتهایی با قطر کم تر، کوچک تر بودن آگونیوم و نیز تولید گره هنگام اتصال آنتریدیوم به آگونیوم از گونه ی *Py. catenulatum* طبق بررسی های بالا و همکاران (Bala et al. 2010) تفکیک می شود. حالت عدم تولید آسپور تنها در یک جدایه از گونه های *Py. rhizo-oryzae* دیده شد. قطر آگونیوم های گونه ی *Py. rhizo-oryzae* در این پژوهش نیز به قطر اندازه گیری شده توسط این پژوهشگران شباهت داشت. یافته های این محققان با یافته های این پژوهش در مورد *Py. rhizo-oryzae* مطابقت داشت. گونه ی *Py. rhizo-oryzae* بر خلاف گونه ی *Py. catenulatum* روی برنج بیماری زا بود (جدول ۴). همچنین این گونه برای فلور پیتیومی ایران جدید است.

گونه ی *Py. dissotocum* نیز یکی از گونه های فراوان جداسازی شده از مزارع برنج استان فارس از تبار B بود. همه ی جدایه ها تولید اسپورانژیوم رشته ای و درخت مانند به همراه آسپورهای ناپرساز با آنتریدیوم سرعصایی به همراه چنگک های چماقی شکل کردند (شکل ۳، C). اگرچه گزارش هایی از بیماری زا بودن این گونه روی برنج وجود دارد، (Hsieh 1978) ولی در آزمون های بیماری زایی این پژوهش روی برنج علائمی ایجاد نکرد. این گونه نخستین بار در ایران توسط بلبلی و مستوفی زاده قلمفرسا (Bolboli & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2015) از مزارع ذرت و برنج استان فارس جداسازی شده است. این دومین گزارش از وجود این گونه در شالیزارهای برنج استان فارس است. یکی از گونه هایی که از نظر فیلوژنتیکی

و ریخت‌شناختی به این گونه بسیار شباهت دارد، گونه‌ی *Py. coloratum* است (شکل ۳، E). تنها تفاوت این دو گونه از نظر ریخت‌شناختی یکی در شکل پرگنه روی محیط‌کشت‌های مختلف و دیگری وجود چنگک چماقی-شکل یا استوانه‌ای در *Py. dissotocum* است. این گونه نیز نخستین‌بار در ایران توسط بلبلی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Bolboli & Mostowfizadeh-Ghalefarsa 2015) از خاک مزارع ذرت استان فارس جداسازی شده است. این نخستین گزارش از وجود این گونه در شالیزارهای برنج استان فارس است.

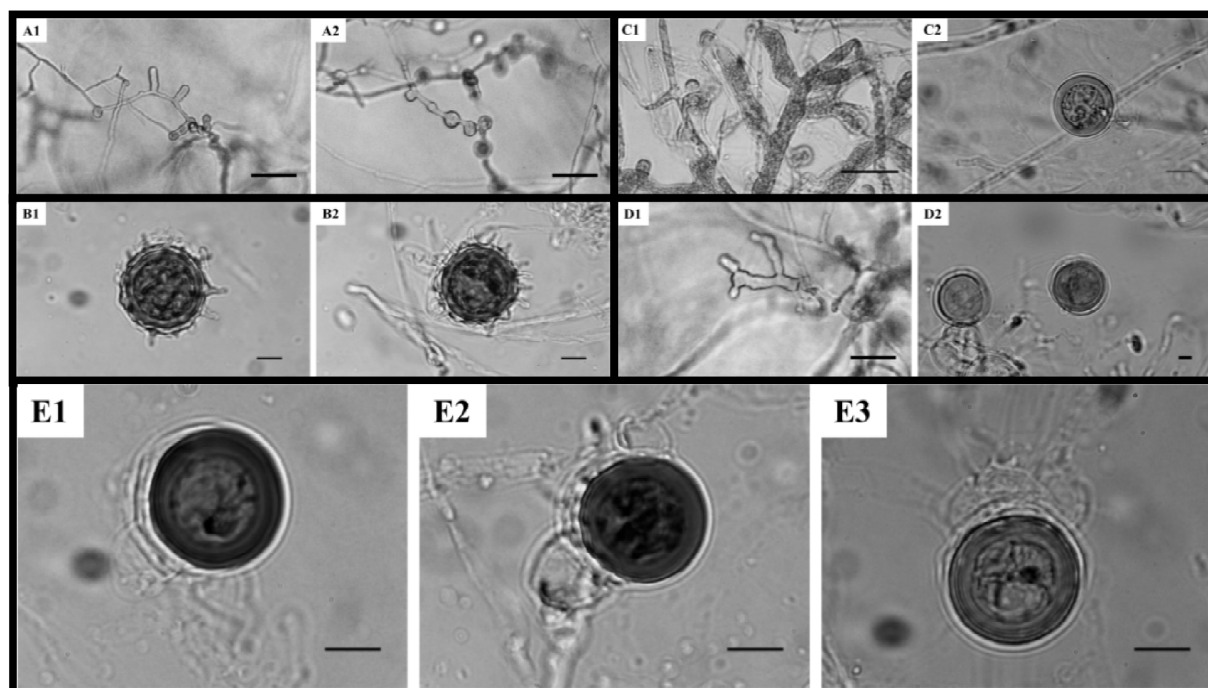
گونه‌ی *Py. inflatum* از تبار B شالیزارهای برنج کامفیروز جدا شد (شکل ۱) و تولید اسپورانژیوم‌های مرکب رشته‌ای همراه با عناصر آماسیده، اسپورهای پرساز تا ناپرساز با دو تا حداکثر چهار آنتریدیوم کرد (شکل ۴، C). اندازه‌های به‌دست آمده از اندام‌های جنسی مشاهده شده در این پژوهش، ریخت‌شناسی پرگنه و دماهای رشدی با مطالعات واندراپلاتس-نیترنیک (۱۹۸۱) تفاوت بسیار کمی داشت. ون‌بوتین و هافته (van Buyten & Höfte 2013) با بررسی فلور پیتیومی شالیزارهای برنج فیلیپین، فراوان‌ترین گونه‌های بیماری‌زایی برنج را *Py. graminicola* Drechsler، *Py. inflatum* Matthews و *Py. arrhenomanes* Subraman بر خلاف گزارش‌های موجود مبنی بر بیماری‌زا بودن *Py. inflatum* روی برنج، جدایه‌ی به دست آمده قادر به ایجاد علائمی روی برنج نشد (جدول ۴). این گونه برای نخستین‌بار از شالیزارهای برنج استان فارس از ایران گزارش می‌شود.

تعداد زیادی از جدایه‌های به‌دست آمده از خزانه‌های برنج شمال استان فارس متعلق به گونه‌ی *Py.*

kashmirensis از تبار B بودند (شکل ۱). این گونه با داشتن اسپورانژیوم مرکب، تورم‌های ریشه‌ای نامنظم، آگونیوم کروی و صاف، آنتریدیوم چماقی‌شکل و اسپورهای پرساز از سایر گونه‌ها تفکیک می‌شود (شکل ۲، D). فراوانی این گونه در دنیا بسیار کم است. در ایران نخستین‌بار بلبلی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Bolboli & Mostowfizadeh-Ghalefarsa 2015) این گونه را از مزارع جو استان فارس جدا کردند. ویژگی‌های ریخت-شناختی جدایه‌های ما با ویژگی‌های ریخت‌شناختی توصیف‌شده توسط این پژوهشگران مطابقت داشت. هیچ-یک از جدایه‌های این گونه قادر به ایجاد بیماری روی گیاهچه یا بذر برنج نبودند (جدول ۴). این دومین گزارش از *Py. kashmirensis* از ایران و نخستین گزارش از وجود این گونه در شالیزارهای برنج است.

تمامی جدایه‌های مربوط به گونه‌ی *Py. oopapillum* از تبار B تولید اسپورانژیوم درختی و بدون آماس کردند. شکل خاص آگونیوم (دارای یک پستانک) آن را از سایر گونه‌ها تفکیک کرد (شکل ۱، A). این گونه نخستین‌بار در سال ۲۰۱۰ توسط بالا و همکاران (Bala et al. 2010a) توصیف شد. ابعاد اندازه‌گیری شده، ریخت‌شناسی پرگنه-های به‌دست آمده و نیز واکاوی‌های فیلورنیتیکی انجام شده در این پژوهش با یافته‌های بالا و همکاران (۲۰۱۰) و روبیدئو و همکاران (۲۰۱۱) شباهت زیادی داشت. بیماری‌زایی این گونه روی برنج برای نخستین‌بار در دنیا از این پژوهش گزارش می‌شود (جدول ۴). این گونه همچنین برای فلور آمیستی ایران جدید است.

تمامی جدایه‌های مربوط به گونه‌ی *Py. plurisporium* مورد شناسایی کامل ریخت‌شناختی قرار گرفتند. این گونه به دلیل وجود چند اسپور (تا شش عدد) در یک آگونیوم



شکل ۴- (A) ریخت شناسی *Pythium catenulatum*. A1: اسپورانژیوم رشته ای حاوی عناصر متورم. A2: تورم های ریشه ی زنجیری. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. (B) ریخت شناسی *Pythium hydnosporum*. B1: اُسپور خاردار تقریباً ناپرساز. B2: اُسپور خاردار ناپرساز به همراه آنتریدیوم زیرماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (C) ریخت شناسی *Pythium inflatum*. C1: اسپورانژیوم مرکب، رشته ای و آماسیده. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. C2: اُسپور پرساز با آنتریدیوم پرآماده. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (D) ریخت شناسی *Pythium pyrlobum*. D1: اسپورانژیوم مرکب. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر. D2: اُسپور ناپرساز. خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر. (E) ریخت شناسی *Pythium nunn*. E1: اُسپور ناپرساز با یک آنتریدیوم پرآماده. E2: اُسپور ناپرساز با دو آنتریدیوم پرآماده. E3: اُسپور ناپرساز با سه آنتریدیوم پرآماده. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Fig4. Morphology of *Pythium* species isolated from rice paddy fields of Fars province. (A) Morphology of *Pythium catenulatum*. A1: Filamentous sporangium with inflated elements, A2: Catenulated hyphal swellings (bar = 20 μ); (B) Morphology of *Pythium hydnosporum*. B1: Nearly aplerotic oospore, B2: Aplerotic oospore with hypogynous antheridium (bar = 10 μ); (C) Morphology of *Pythium inflatum*. C1: Continuous, filamentous, inflated sporangium (bar = 20 μ), C2: Plerotic oospore with paragynous antheridium (bar = 10 μ); (D) Morphology of *Pythium pyrlobum*. D1: Continuous sporangium (bar = 20 μ), D2: Aplerotic oospore (bar = 10 μ); (E) Morphology of *Pythium nunn*. E1: Aplerotic oospore with one paragynous antheridium, E2: Aplerotic oospore with two paragynous antheridia, E3: Aplerotic oospore with three paragynous antheridia (bar = 10 μ).

عدد آنتریدیوم سرعصایی تک بن یا دوبن، اُگونیم های انتهایی و قرارگیری در تبار B از درخت فیلوژنتیکی از گونه ی *Py. multisporum* تفکیک می شود (Abad et al. 1995). وجود این گونه در ایران و نیز بيمارى زايى آن روی برنج برای نخستین بار در دنیا از این مطالعه گزارش می شود.

از سایر گونه های جنس *Pythium* به جز *Py. multisporum* Poitras تفکیک می شود (شکل ۳، A). گونه ی *Py. plurisporium* با تولید الگوی رشد اگل - سرخی تا شعاعی ولی در مورد *Py. multisporum* به صورت کاملاً شعاعی روی محیط کشت CMA، اسپورانژیوم های رشته ای تا اندکی آماسیده، چهار تا ۱۰

گونه‌ی *Py. pyrlobum* از شالیزارهای نواحی شمالی، مرکزی، شمال غربی و جنوب غربی استان فارس جدا شد. جدایه‌های این گونه با داشتن اسپورانژیوم مرکب و آگونیوم‌های با سطح صاف به همراه دو تا چهار آنتریدیوم از سایر گونه‌های این جنس تفکیک شدند (شکل ۴، D). ابعاد آگونیوم و اسپور و همچنین دمای بهینه، کمینه و بیشینه‌ی اندازه‌گیری شده در این پژوهش با یافته‌های واندربلاکس-نیترنیک (۱۹۸۱) و وارد و شیتون (Ward & Shipton 1984) مطابقت داشت. هیچ‌یک از جدایه‌های این گونه قادر به بیماری‌زایی یا ایجاد علائم روی برنج نبودند. این نخستین گزارش از وجود این گونه در خاک شالیزارهای برنج استان فارس است.

از تبار D درخت فیلوژنتیکی گونه‌های پیتیوم، گونه‌ی *Py. hydnosporum* از شالیزارهای برنج نواحی شمال غربی و شمالی استان فارس به دست آمد (شکل ۱). این گونه با داشتن اسپورهای خاردار به همراه آنتریدیوم‌های زیرماده و عدم تولید اسپورانژیوم و ریزکسه و زئوسپور از سایر گونه‌های *Pythium* تفکیک می‌شود (شکل ۴، B). طبق نظر لاوسکو و دکاک (Lévesque & de Cock 2004) تمامی اعضای این تبار تولید آگونیوم‌های خاردار و آنتریدیوم‌های پرآماده می‌کنند و گونه‌ی *Py. hydnosporum* با تولید آنتریدیوم‌های زیرماده از این قاعده مستثنی است. مشاهدات این پژوهش با یافته‌های این محققان مطابقت داشت. بر خلاف توصیف این گونه در کلید واندربلاکس-نیترنیک (van der Pläats-Niternick 1981) هیچ‌یک از جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش قادر به تولید ساختارهای شبه اسپورانژیوم یا تورم‌های ریشه‌ی مرکب نبودند. این امر موجب شد تا علاوه بر ژنوم هسته‌ای، با استفاده از ژنوم سیتوپلاسمی یکی از ژن‌های میتوکندریایی (زیرواحد دو سیتوکروم اکسیداز سی) نیز

مورد بررسی قرار گیرد. این گونه با میزان اطمینان بالایی از گونه‌های نزدیک به خود یعنی *Py. oligandrum* و *Py. amasculinum* با این روش کاملاً تفکیک شد (داده‌ها نشان داده نشده است). هیچ‌یک از جدایه‌های این گونه قادر به ایجاد بیماری روی گیاهچه یا بذر برنج نبودند. وجود این گونه در شالیزارهای برنج استان فارس برای اولین بار از این پژوهش گزارش می‌شود.

از تبار J از درخت فیلوژنتیکی گونه‌های پیتیوم، گونه‌ی *Py. nunn* به دست آمد که تولید اسپورهای ناپرساز با سه تا چهار آنتریدیوم سرعصایی کرد (شکل ۴، E). هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به تولید اسپورانژیوم یا تورم ریشه نبود. این گونه در ایران ابتدا از ذرت از منطقه‌ی سورمق توسط بلبلی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Bolboli & Mostowfizadeh- 2015 Ghalamfarsa) گزارش شد. مشاهدات این پژوهش با یافته‌های لیفشیتز و همکاران (۲۰۰۴) و بلبلی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (۲۰۱۵) تطابق دارد. این گونه یک قارچ انگل اثبات شده است (Elad et al. 1985, Paulitz & Baker 1987, Paulitz & Baker 1988, Paulitz et al. 1990, Kobayashi et al. 2010). وجود این گونه در شالیزارهای برنج ایران برای اولین بار در این پژوهش گزارش می‌شود.

از تبار A، B و D درخت فیلوژنتیکی آی تی‌اس پیتیوم، جدایه‌هایی یافت شدند که امکان انتساب آن‌ها به هیچ گونه‌ی شناخته‌شده‌ای نبود و بررسی بیش‌تر با استفاده از ژن سیتوپلاسمی سیتوکروم اکسیداز سی نیز مشخص نبودن گونه‌ها را تأیید کرد.

از ۱۱۶۹ جدایه‌ی *Pythium* به دست آمده از شالیزارها و خزانه‌های نقاط مختلف استان فارس سه گونه‌ی *Py. rhizo-oryzae*، *Py. aphanidermatum* و *Py. catenulatum* با مجموع ۹۲۳ عدد جدایه (۸۴٪) فراوان-

است. به طور کلی به نظر می رسد که شالیزارهای برنج زیست بومی مناسب برای فعالیت آُمیست ها هستند. تنوع زیستی یافت شده مؤید این امر است. وجود گونه های بیمارگر ممکن است خطری بالقوه برای کشت برنج یا سایر محصولات اقتصادی در منطقه باشد. بنابراین پیشنهاد می شود که فلور پیتیومی سایر شالیزارهای برنج کشور خصوصاً در منطقه ی شمال ایران مورد بررسی قرار بگیرد. همچنین بررسی بیماری زایی گونه های حاصل از این پژوهش روی سایر گیاهان مهم اقتصادی به خصوص غلات اهمیت دارد. شناسایی گونه های ناشناخته بر اساس ره یافت دودمان های چند ژنی و با استفاده از سایر ژن های هسته ای و سیتوپلاسمی در دست بررسی است.

ترین گونه های جمع آوری شده بودند. پژوهش حاضر نشان داد که ۹۰ درصد گونه های *Pythium* به دست آمده از شالیزارهای برنج متعلق به تبار B از درخت فیلوژنتیکی آی تی اس پیتیوم و دارای اسپورانژیوم های رشته ای تا رشته ای آماسیده هستند. گونه های *Py. aphanidermatum*، *Py. dissotocum* و *Py. kashmirensis* همگی از روی خود گیاه برنج جدا شده اند ولی در آزمون بیماری زایی هیچ علائمی روی گیاه ایجاد نکردند. البته باید خاطر نشان کرد که همگی آن ها قادر به کلنیزه کردن بافت ریشه و طوقه بودند. مطالعه ی حاضر نشان داد که بیش ترین تنوع گونه ها در منطقه ی کامفیروز بود ولی بیش ترین تعداد گونه های جمع آوری شده مربوط به مناطق مرودشت و کامفیروز بوده

منابع

- Abad G., Shew H.D., Grand L.F. and Lucas L.T. 1995. A new species of *Pythium* producing multiple oospores isolated from bentgrass in North Carolina. *Mycologia* 87:896-901.
- Ahn S.W., Bonman J.M., Brandon D.M., Groth D.E., Gunnell P.S., Hibino H., Hollier C.A., Lee F.N., Mew T.W., Prot J.C., Rush M.C., Schneider R.W., Webster R.K., and Whitney G. 1992. Compendium of Rice Diseases. St. Paul, Min., USA: APS Press. 86 p.
- Al-Sheikh H. 2010. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. *Saudi Journal of Biological Science* 17:347-352.
- Ann P.J., Huang J.H., Wang I.T. and Ko W.H. 2006. *Pythiogeton zizaniae*, a new species causing basal stalk rot of water bambo in Taiwan. *Mycologia* 98:116-120.
- Bala K., Robideau G.P., Désaulniers N., de Cock A.W. A. M. and Lévesque C. A. 2010a. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* 25:22-31.
- Bala K., Robideau G.P., Lévesque A., de Cock A.W.A.M., Adad Z.G., Lodhi A.M., Shahzad S., Ghaffar A. and Coffey M.D. 2010. *Phytopythium* Adad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi and Lévesque gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad and Lévesque sp. nov. *Persoonia* 24:136-137.
- 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.).
- Banihashemi Z. 1989. Study of pistachio gummosis in southern provinces of Iran. *Proceedings of the 9th Iranian Plant Protection Congress*, Mashhad, Iran, p.87.
- Banihashemi Z. and Fatehi J. 1989. Reaction of cucurbit cultivars to *Phytophthora drechsleri* and *P. capsici* in greenhouse. *Proceeding of the 9th Iranian Plant Protection Congress*, Mashhad, Iran, p.89.
- Bolboli Z. and Mostowfizadeh-Ghalefarsa R. 2015. Phylogenetic relationships and taxonomic characteristics of *Pythium* spp. isolates in cereal fields of Fars Province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51:471-492.
- Bridge J. and Page S.L.J. 1982. The rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on deep water rice (*Oryza sativa* subsp. *indica*). *Revue de Nématologie* 5:225-232.
- 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. Keys to *Pythium*. University of Reading, UK. 64 p.
- Elad Y., Lifshitz R. and Baker R. 1985. Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. *Physiological Plant Pathology* 27:131-148.
- Erwin D.C. and Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 592 p.
- Fisher A.J. 1996. Integrated red rice management in Latin American rice fields. Proceedings of the 2nd International Weed Control Congress Copenhagen, Denmark, p.653.
- Fukutomi M., Akai S. and Shiraishi M. 1971. Fine structure of anthridia and oogonia of *Phytophthora macrospora*, the downy mildew fungus of rice plants. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 43:249-258.
- Furuya H., Matsumoto T., Fuji S. and Naito H. 2003. Inconspicuous restraint of rice seedling growth by root-infecting fungi in soil of a rice paddy field. *Journal of General Plant Pathology* 69:115-119.
- Furuya H., Tubaki K., Matsumoto T., Fuji S. and Naito H. 2005. A case study of infection of rice roots by deleterious fungi and minor pathogenic *Pythium* species in a paddy field. *Journal of General Plant Pathology* 73:8-14.
- Furuya H., Matsumoto T., Fuji S. and Naito H. 2007. A case study of infection of rice roots by deleterious fungi and minor pathogenic *Pythium* species in a paddy field. *Journal of General Plant Pathology* 73:8-14.
- Gunnell P.S. and Webster R.K. 1988. Crown and root rot of cultivated wild rice in California caused by *Phytophthora erythroseptica* sensu lato. *Plant Disease* 72:909-910.
- 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.
- Hsieh H.J. 1978. An annotated list of *Pythium* in Taiwan. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 19:199-205.
- Huang J.H., Chen C.Y., Lin Y.S., Ann P.J., Huang H.C. and Chung W.H. 2013. Six new species of *Pythiogeton* in Taiwan, with an account of the molecular phylogeny of this genus. *Mycoscience* 54:130-147.
- Lenney J.F. and Klemmer H.W. 1966. Factors controlling sexual reproduction and growth in *Pythium graminicola*. *Nature* 209:1365-1366. Jeffers S.N. and Martin S.B. 1968. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70:1035-1043.
- Kato M., Minamida K., Tojo M., Kokuryu T., Hamaguchi H. and Shimada S. 2013. Association of *Pythium* and *Phytophthora* with pre-emergence seedling damping-off of soybean grown in a field converted from a paddy field in Japan. *Plant Production Science* 16:95-104.
- Kobayashi S., Uzuhashi S., Tojo M. and Kakishima M. 2010. Characterization of *Pythium nunn* newly recorded in Japan and its antagonistic activity against *P. ultimum* var. *ultimum*. *Journal of General Plant Pathology* 76:278-283.
- Lévesque C.A. and de Cock A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108:1363-1383.
- Mew T.W. 1991. Rice diseases. pp. 187-236. In: B.S. Luh (Ed), Rice. Springer Science +Business media, New York, USA.
- Mirsoleimani Z. and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. 2013. Characterization of *Phytophthora pistaciae*, the casual agent of pistachio gummosis, based on host range, morphology and ribosomal genome. *Phytopathologia Mediterranea* 53:501-506.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. and Banihashemi Z. 2005. Identification of soil *Pythium* species in Fars Province of Iran. *Iranian Journal of Science and Technology* 29:79-87.
- Mousanejad S., Momeni A., Khosravi V. and Javannikkhah M. 2009. Identification of the physiological races of the blast causal agent in Guilan and Mazandaran Provinces. *Journal of Plant Diseases* 3:257-262.
- Padashtdehkahi F., Akhvat S.M., Nikkhah M.J. and Mahmoudi S.B. 2009. Optimization of inoculation method of sheath blight in order to separate the actual reaction of rice cultivars in farm. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 40:99-108.
- Paulitz T.C. and Baker R. 1987. Interactions between *Pythium nunn* and *Pythium ultimum* on bean leaves. *Canadian Journal of Microbiology* 34:947-951.
- Paulitz T.C. and Baker R. 1988. The formation of secondary sporangia by *Pythium ultimum*: the influence of organic amendments and *Pythium nunn*. *Soil Biology and Biochemistry* 20:151-156.
- Paulitz T.C., Ahmed J. S. and Baker R. 1990. Integration of *Pythium nunn* and *Trichoderma harzianum* isolate T-

- 95 for biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Plant and Soil 121:243-250.
- 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. and Lévesque A. C. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. Molecular Ecology Resources 11:1002-1011.
- Safari Motlagh M.R., Javadzadeh Haghighat S.A., Rashidi V. and Yaghoubi B. 2011. Reaction of some rice cultivars against the fungus *Curvularia lunata* in Gilan Province. Journal of Biological Sciences 5:59-66.
- Silue D., Nottegham J. L. and Tharreau D. 1991. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa*-*Magnaporthe grisea* pathosystem. Phytopathology 82:577-580.
- 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.
- Tan K.H. 1996. Soil sampling, preparation and analysis. Marcel Dekker Inc., New York, USA. 639 p.
- Tavakoli F., Aghajani M. A., Etebarian H. R. and Rostami M. 2011. Evaluation of rice sheath blight disease in rice paddy fields of Mazandaran Province. Journal of Plant Disease Research 1:13-23.
- 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.
- Thompson R.A., Quisenberry S.S., Robinson J.F. and Schneider R.W. 1991. Effect of rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae) and *Pythium* spp. on water-seeded rice. Journal of Economic Entomology 84:317-323.
- Tuit J. 1969. Plant pathological methods. Burgess Publishing Co., USA.
- van Buyten E. and Höfte M. 2013. *Pythium* species from rice roots differ in virulence, host colonization and nutritional profile. BMC Plant Biology 13:1-17.
- van der Plaats-Niterink A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology. No. 21. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands. 198 p.
- Ward D.E. and Shipton W.A. 1984. Root rot of papaw caused by *Pythium pyrilobum*. Australasian Plant Pathology 13:25-27.
- Webster R.K. and Gunnell P. S. 1992. Compendium of rice diseases. APS Press, USA. 86 pp.
- Webster R.K., Hall D.H., Heeres J., Wick C.M. and Brandon D.M. 1970. *Achlya klebsiana* and *Pythium* species as primary causes of seed rot and seedling disease of rice in California. Phytopathology 60:964-968.
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds), PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, USA.
- Zhang W. and Watson A.K. 2000. Isolation and partial characterization of phytotoxins produce by *Exserohilum monoceras*, a potential bioherbicide for control of *Echinochola* species. Proceedings of the 10th International Symposium on Biocontrol. Bozman, Montana, p. 125.
- Zhang W.M. Mood K. and Watson A.K. 1996. Responses of *Echinochola* species and rice (*Oryza sativa*) to indigenous pathogenic fungi. Plant Disease 80:1053-1058.