

بازنگری جدایه‌های *Phytophthora parsiana* با استفاده از چندشکلی ساختاری

تکرشته‌ی دی‌ان‌ای ریپوزومی

زهرا میرسلیمانی^۱ و رضا قلمفرسا مستوفی زاده^{۲*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱)

چکیده

تاکنون *Phytophthora parsiana* به عنوان گونه‌ای منفرد و بیمارگر مهم باغ‌های پسته‌ی ایران به شمار آمده است. توصیف گونه‌های جدید و بسیار نزدیک به این آرایه‌ی فیلوژنتیک در تبار نه درخت فیلوژنتیکی فیتوفتورا و همچنین مشاهده‌ی خصوصیات ریخت‌شناختی، فیزیولوژیک و دامنه‌ی میزبانی ناهمگن در بین جدایه‌های منسوب به این گونه، موجب لزوم مطالعه‌ی مقایسه‌ای جدایه‌های آن تحت عنوان یک گونه‌ی مرکب شده است. جدایه‌هایی که در طول ۲۵ سال اخیر تحت عنوان این آرایه در نظر گرفته شده بودند همراه با جدایه‌های حاصل از نمونه‌برداری‌های انجام شده در سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ با استفاده از روش چندشکلی ساختاری تکرشته‌ی دی‌ان‌ای ریپوزومی (SSCP) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از نقوش به دست آمده نشان داد که جدایه‌های منسوب به *P. parsiana* در چهار گروه کاملاً مجزا دسته‌بندی می‌شوند. بررسی فیلوژنتیکی زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی (CoxI) با رویکرد پیشینه‌ی احتمال نیز نتایج به دست آمده را تأیید کرد و جدایه‌ها را در چهار گروه مجزا در کنار سایر اعضای تبار نه درخت فیلوژنتیکی فیتوفتورا قرار داد. بررسی خصوصیات بارز ریخت‌شناختی، فیزیولوژیک و بیماری‌زایی نیز تفاوت‌هایی را در بین این چهار گروه نشان داد. جدایه‌ی گروه سوم، برخلاف سایر گروه‌ها، قادر به ایجاد بیماری روی نهال پسته نبود و همچنین مانند جدایه‌های گروه اول و چهارم، در دمای ۴۰ درجه‌ی سلسیوس رشد نکرد. علاوه بر این، ویژگی‌های ریزسنجی اسپورانژیوم‌های گروه دوم با سایر گروه‌ها متفاوت بود. شواهد حاصل از این گروه‌بندی وجود تنوع قابل ملاحظه‌ی درون‌گونه‌ای و همچنین لزوم بازنگری در توصیف اولیه‌ی این گونه‌ی مرکب را تأیید می‌کند.

کلیدواژه: آمیکوتا، گونه‌ی فیلوژنتیک، چندشکلی ساختاری تکرشته‌ی دی‌ان‌ای ریپوزومی، زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی، پسته، انجیر

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

۱. دانش‌آموخته دکتری، بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

A revision of *Phytophthora parsiana* isolates based on single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA

Z. Mirsoleymani¹ and R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa^{2*}

(Received: 8.12.2018; Accepted: 21.1.2018)

Abstract

Phytophthora parsiana has been considered as a unique and important pathogen in Iranian pistachio orchards. The description of novel and closely related species to this phylogenetic taxon in Clade 9 of *Phytophthora* spp. phylogenetic trees, including *P. hydropathica*, *P. hydrogena* and *P. virginiana*, as well as extremely heterogeneous morphological, physiological and host range of the assigned isolates, necessitates a comparative study of the isolates as a complex species. Isolates that have been assigned to this taxon during the last 25 years, along with the isolates which have been isolated in 2014-2015 were studied using single-strand-conformation polymorphism (SSCP) of ribosomal DNA. The results of the patterns showed that the isolates assigned to *P. parsiana* were classified into four distinct groups. Phylogenetic analysis of cytochrome C oxidase subunit I based on maximum-likelihood inference also confirmed the results and the isolates grouped in four distinct groups along with other members of the *Phytophthora* spp. of clade 9. Morphology and physiology characteristics and pathogenicity tests revealed some differences between these four groups. Unlike other groups, the isolate of the third group was not pathogenic to pistachio seedlings, and the same as isolates of groups one and four it was not able to grow at 40 °C. Additionally the micrometric characteristics of sporangia were significantly different from those of other groups. The evidence from this grouping confirms the existence of a significant intra-species variation as well as the need for a revision of the initial description of this complex species.

Keywords: *Oomycota*, *Phylogenetic species*, *single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA*, *Cytochrome C oxidase subunit I*, *Pistachio*, *Fig*

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

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

2. Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

مقدمه

و کاملاً متمایز از گونه‌های *P. cryptogea* و *P. drechsleri* قرار داد. این جدایه‌ها در نزدیکی تبار ۹ و ۱۰ از درخت آی‌تی‌اس گونه‌های فیتوفتورا گروهی تک‌نیایی را تشکیل دادند و تحت عنوان *Phytophthora* sp. C10 معرفی شدند (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2011). در نهایت در سال ۲۰۰۸ بر اساس واکاوی‌های تبارزایی روی ژن‌های مختلف، ارزیابی اطلاعات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی تبار به دست آمده به طور رسمی تحت عنوان *Phytophthora parsiana* sp. nov. Mostowf., D.E.L. Mostowfizadeh- (Cooke & Banihash. 2008).

مطالعات مختلف در زمینه ریخت‌شناسی، فیزیولوژی، فیلوژنتیک و دامنه‌ی میزبانی نشان‌دهنده‌ی نتایج ناهمگن در میان جدایه‌های منسوب به *P. parsiana* است (Hajebrahimi & Banihashemi 2011, Rafiee 2011, Anvari et al. 2018, Anvari 2014). بررسی‌های انجام شده وجود جدایه‌هایی که دارای میزبان‌های علفی هستند یا جدایه‌هایی که دمای رشد آن‌ها تا ۴۰ درجه‌ی سلسیوس می‌رسد را نشان داد. از سوی دیگر برخی جدایه‌ها عقیم بوده و برخی تولید اندام جنسی می‌کردند. این مشاهدات دلایلی هستند که ضرورت مطالعه‌ی مقایسه‌ای را در میان جدایه‌های منسوب به این گونه نشان می‌دهد (Hajebrahimi & Banihashemi 2011, Rafiee 2014, Anvari 2014, Rafiee & Banihashemi 2013b).

یکی از چالش‌های مهم در میان گونه‌های فیتوفتورا تمایز و تشخیص مرزهای نامعین گونه‌ای و گونه‌های مرکب جنس فیتوفتورا بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی است. از جمله مثال‌های مشهور گونه‌های مرکب جنس فیتوفتورا می‌توان به *P. megasperma* Drechsler, *P. citricola* Sawada و *P. cryptogea*

تاکنون گونه‌های مختلفی از بیمارگر فیتوفتورا شامل *Phytophthora citrophthora* Smith & Smith، *P. pistaciae* Pethybridge & Lafferm، *P. nicotianae*، *P. drechsleri* Tucker، Mirabolfathy و Breda و *P. parsiana* Mostowf., D.E.L. Cooke & Banihash. از درختان پسته مبتلا به گموز جداسازی و بیماری‌زایی آن‌ها اثبات شده است (Banihashemi 1983, Mirabolfathy 1988, Mirabolfathy et al. 1989, Mirabolfathy et al. 1990, Aminae & Ershad 1991, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al. 2008). در سال ۱۹۹۱ جدایه‌ای از فیتوفتورا از طوقه‌ی پوسیده‌ی درخت انجیر (*Ficus carica* L.) واقع در منطقه‌ی شبانکاره‌ی استان بوشهر جداسازی شد. خصوصیت متمایز این جدایه توانایی رشد در ۳۹ درجه‌ی سلسیوس بود که به عنوان جدایه‌ای بسیار گرم‌پسند از گونه‌ی *P. cryptogea* در نظر گرفته شد (Banihashemi & Ghaisi 1993). در سال ۱۹۹۲ و ۱۹۹۳ جدایه‌ای از فیتوفتورا با همان خصوصیات ریخت‌شناختی مشابه با *P. cryptogea* و توانایی رشد در ۳۹ درجه‌ی سلسیوس و بالاتر، از درختان پسته (*Pistacia vera* L. در کرمان به دست آمد (ض. بنی‌هاشمی، منتشر نشده) و جدایه‌هایی مشابه نیز از ایالات متحد آمریکا گزارش شد (MacDonald et al. 1992). این جدایه‌ها در بررسی چالش‌های موجود در رده‌بندی گونه‌های *P. cryptogea* و *P. drechsleri* و ارزیابی تاریخچه‌ی تکاملی این دو گونه، ارزیابی شدند (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al. 2006). واکاوی‌های ابتدایی بر اساس ناحیه‌ی آی‌تی‌اس (ITS¹) جدایه‌ها را در گروهی جداگانه

¹ Internal transcribed spacer

دی‌ان‌ای ریبوزومی (SSCP)^۲ یکی از روش‌های رایج برای بررسی جهش‌های نقطه‌ای است (Sambrook and Russell, 2000). در این روش قطعات دی‌ان‌ای که با آغازگرهای خاص عمومی تکثیر شده‌اند، با سرعت بالایی برای یافتن هرگونه تغییر در توالی غربال می‌شوند. به کمک این روش می‌توان تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در رشته‌های دی‌ان‌ای را نیز شناسایی کرد (Kong et al. 2003).

روش چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریبوزومی در ابتدا برای بررسی جهش‌های نقطه‌ای در انسان مورد استفاده قرار گرفته بود (Orita et al. 1989). در ادامه این رویکرد آسان، سریع و کم هزینه برای بررسی تنوع در ویروس‌ها (Kong et al. 2000)، ناماتدا (Clapp et al. 2000)، قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها (Hong et al. 2010, Moricca et al. 2000, Kong et al. 2003, 2004) مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب پتانسیل استفاده از این رویکرد به عنوان ابزاری قدرتمند برای بررسی جهش‌ها و همین‌طور واکاوی‌های تنوع مورد توجه قرار گرفت و سرانجام با انتشار آخرین کلید تشخیصی توسط گالگلی و هانگ (Gallegly & Hong 2008) به منظور تشخیص گونه‌های مختلف فیتوفتورا مورد استفاده گسترده قرار گرفت. با وجود تقارن انتشار این کلید با توصیف اولیه *P. parsiana*، الگوی چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریبوزومی این گونه در کلید مذکور نیامده است.

طی سال‌های اخیر جدایه‌هایی از *P. parsiana* بر اساس توالی‌های مربوط به ناحیه‌ی آی‌تی‌اس از سایر نقاط دنیا گزارش شده است که یا شبیه به جدایه‌های این گونه‌اند یا آرایه‌های خواهری بسیار نزدیک به آن به شمار

P. palmivora, *P. capsici* Leonian, Pethybr. & Laff. Butler و *P. alni* Brasier & Kirk (Tsao & Alizadeh 1987; Hansen & Maxwell 1991; Brasier et al. 2003; Ioos et al. 2007; Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2010) اشاره کرد. پس از مطالعات صورت گرفته روی خصوصیات متفاوت گونه‌ی *P. palmivora* دو گونه‌ی *P. capsici* و *P. megakarya* Brasier & Griffin از آن جدا شد (Brasier & Griffin 1979). گونه‌ی *P. capsici* از زمان توصیف، سطوح بالای تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای را نشان داده و با مطالعات بیش‌تر گونه‌ی *P. tropicalis* Aragaki & Uchida از این گونه جدا شد (Zhang et al. 2004). بریزیر و همکاران (Brasier et al. 2004) نیز سه جور (variant) از گونه‌ی جدید *P. alni* را با نام‌های *P. alni* subsp. *alni* Brasier & Kirk, *P. alni* subsp. *uniformis* Brasier & Kirk, *P. alni* subsp. *multiformis* Brasier & Kirk و *P. citricola* واقع کردند. جدایه‌های مربوط به گونه مرکب *P. citricola* در تبار دوم درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس ژن‌گاه‌های هسته‌ای و میتوکندریایی نیز پس از واکاوی‌های چندژن‌گاهی ژن‌های میتوکندریایی تبدیل به چهار گونه‌ی *P. capensis* Bezuid et al., *P. multivora* Scott & Jung, *P. pini* Leonian و *P. plurivora* Jung & Burgess, al. شدند (Bezuidenhout et al. 2010; Martin et al. 2014).

رویکردهای مولکولی همواره به دنبال روشی است تا بتواند منجر به شناسایی سریع و دقیق گونه‌های جنس فیتوفتورا شود. در مقایسه با واکاوی‌های توالی‌سنجی، بررسی چندشکلی دی‌ان‌ای یا اثرنگاری روشی مستقیم و کم هزینه است که هم به صورت دستی و هم خودکار قابل انجام است. واکاوی چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی

² Single-strand-conformation polymorphism

تکرشته‌ی دی‌ان‌ای ریپوزومی، جدایه‌های این گونه با هدف بررسی امکان وجود تنوع درون گونه‌ای و یا دودمان‌های مجزا مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تأیید نتایج حاصل از روش چندشکلی ساختاری تکرشته‌ی دی‌ان‌ای ریپوزومی، واکاوی‌های مولکولی و فیلوژنتیکی نیز با استفاده از توالی‌سنجی ناحیه‌ی میتوکندریایی زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی (CoxI) انجام شد.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی بیمارگر

بخشی از جدایه‌های مورد استفاده در این بررسی، از مجموعه‌ی قارچ بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز و بخش بیماری‌شناسی، فیزیولوژی گیاهی و علف‌های هرز دانشگاه ویرجینیا تک، ایالات متحد آمریکا اخذ شد. همچنین، به منظور جداسازی بیمارگر در سال ۲۰۱۴-۲۰۱۵ نیز از مناطق مختلف استان‌های کرمان و یزد مجدداً نمونه‌برداری صورت گرفت (جدول ۱). از فاصله بین بافت سالم و آلوده‌ی ریشه و طوقه‌ی درختان پسته‌ی مشکوک به آلودگی به *Phytophthora spp.*، قطعات ۰/۵ سانتی‌متری جدا شده، روی محیط کشت CMA-PARPH (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، ۰/۰۲۵ گرم در لیتر هیمکسازول) کشت گردید (Jeffers & Martin 1986). برای جداسازی بیمارگر از خاک از روش طعمه‌گذاری برگ مرکبات (Banihashemi 1983) و برگ پسته (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2013) استفاده گردید. پس از جداسازی و خالص‌سازی روی محیط کشت WA (۲۰ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) جدایه‌ها روی

می‌روند. تعدادی جدایه‌ی از آب‌های آبیاری گیاهان زینتی و شاخه‌های در حال پژمردگی *Rhododendron catawbiense Hoffmanns.* و شاخه‌های *Kalmia latifolia L.* مبتلا به سوختگی در آمریکا جداسازی شده که از لحاظ خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک مشابه گونه‌های *P. melonis Katsura*، *P. parsiana* و *P. drechsleri* بوده و همانند آن‌ها قادر به رشد در دماهای بالا هستند (Hong et al. 2008). بررسی‌های بیش‌تر ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک و فیلوژنتیکی بر اساس واکاوی توالی‌های آی‌تی‌اس نشان داد که این جدایه‌ها به صورت دو گروه مجزا و مشخص بوده که در درخت‌های فیلوژنتیکی در کنار و وابسته به گروه *P. parsiana* قرار می‌گیرد. در سال ۲۰۰۸ و ۲۰۱۰ این دو آرایه به عنوان گونه‌ی جدید شناخته شده و به طور رسمی تحت عنوان *P. irrigata* و *P. hydropathica* Hong & Gallegly. (Hong et al. 2008) معرفی شدند. پس از توصیف این دو گونه‌ی جدید گرمپسند و بسیار مشابه با *P. parsiana* طی واکاوی‌های مولکولی ترادف‌های آی‌تی‌اس و انجام چندشکلی طولی قطعات برشی (آراف‌ال‌پی)^۳، هانگ و همکاران (Hong et al. 2010) عنوان نمودند که جدایه‌های درختان پسته و انجیر که تحت نام *P. parsiana* در ایران شناسایی شده است باید مجدداً از لحاظ خصوصیات ریخت‌شناختی، بیماری‌زایی و تشابه مولکولی مورد بررسی قرار گیرند. در این مطالعه با در نظر گرفتن این شواهد و نتایج ناهمگن مطالعات فیلوژنتیکی، فیزیولوژیک و دامنه‌ی میزبانی جدایه‌های منسوب به *P. parsiana* و با توجه به حساسیت و کارایی بالای روش چندشکلی ساختاری

³ Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های منسوب به *Phytophthora parsiana* به کار رفته در این مطالعه که براساس روش چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریبوزومی گروه‌بندی شده‌اند.

Table 1. Characteristics of isolates assigned to *Phytophthora parsiana* used in this study which were grouped according to a single-stranded DNA polymorphic.

Group	Isolate code	Other codes	Host	Substrate	Location	Year of isolation
گروه	کد جدایه	سایر کدها	میزبان	بستره	محل جداسازی	سال جداسازی
Group 1	PH21.4.08 ^{a, c}	SUC19, PH21.4.92	Pistachio	Crown	Iran (Kerman)	1992
Group 1	PH21.8.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 1	PH21.9.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 1	PH21.10.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 1	PH21.11.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 1	PH21.12.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 1	PH21.13.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 1	PH21.26.10	-	Pistachio	Soil	Iran (Yazd)	2010
Group 1	PH21.27.10	-	Pistachio	Soil	Iran (Yazd)	2010
Group 1	PH21.40.14 ^{a, b}	-	Pistachio	Crown	Iran (Kerman)	2014
Group 1	PH21.41.14 ^{a, b}	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2014
Group 1	PH21.44.14 ^b	-	Pistachio	Crown	Iran (Kerman)	2014
Group 2	PH21.6.08 ^{a, c}	SURf6, PH21.6.92	Pistachio	Crown	Iran (Kerman)	1993
Group 2	PH21.7.08 ^a	SURf17, PH21.7.92	Pistachio	Crown	Iran (Kerman)	1993
Group 3	PH21.5.08 ^{a, c}	SUC25, PH21.5.90	Fig	Crown	Iran (Bushehr)	1991
Group 4	PH21.3.08 ^{a, c}	SUC7, PH21.3.92	Pistachio	Trunk and branches	USA	1992
Group 4	PH21.14.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 4	PH21.15.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 4	PH21.16.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 4	PH21.17.08 ^a	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 4	PH21.18.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 4	PH21.19.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 4	PH21.20.08	-	Pistachio	Crown & Root	Iran (Kerman)	2008
Group 4	PH21.43.14 ^{a, b}	-	Pistachio	Crown	Iran (Kerman)	2014

a. Selected isolates for pathogenicity test

b. Isolated in this study

c. sequenced isolates in this study

Mostowfizadeh-Ghalmfarsa) انجام شد (*parsiana* (2012).

تشکیل اسپورانژیوم با استفاده از بذر شاهدانه

ویژگی‌های ریخت‌شناختی اسپورانژیوم‌ها یکی از اساسی‌ترین خصوصیات تاکسونومی محسوب می‌شود و به عنوان یک صفت اشتقاقی از نخستین کلیدهای موجود (Waterhouse 1963) تا مطالعات فیلوژنتیکی (Blair et al. 2000, al. 2008, Yang et al 2017) همواره

محیط کشت CMA (عصاره‌ی ۴۰ گرم ذرت، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) در ۱۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Singleton et al. 1992). تشخیص ابتدایی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای موجود (Stamps et al., 1990; Erwin & Ribeiro, 1996) انجام گرفت و سپس با استفاده از جفت آغازگر ITS-PF2 (5'CGG 3' CTC CAT CAA ACG AGG C) و ITS-PR2 (5'GCA CGA AGC CGC ACA ATC G 3') واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به منظور شناسایی جدایه‌های *P.*

از (A1: isolate 22G2, A2: isolate 22B3) *P. cryptogea* (A1: isolate 23B1, A2: isolate 23B2) و *cinamomi* (A1: isolate 22G1, A2: isolate 22F9) روی محیط کشت HSA (عصاره‌ی ۶۰ گرم شاهدانه، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) و CA (عصاره‌ی ۲۵۰ گرم هویج، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم ۱ لیتر) محتوی ۳۰ میلی‌گرم بتاسیسترون استفاده شد (Riberio 1983). به این ترتیب که بلوکی به قطر پنج میلی‌متر از هر جدایه بیمارگر در کف تشتک پتری شش سانتی‌متری گذاشته شد و روی آن یک بلوک از محیط کشت مورد استفاده به همان اندازه و بلوک سوم از تیپ‌آمیزی A^1 یا A^2 نیز با همان قطر قرار داده شد. حاشیه‌ی تشتک‌ها با نوار پارافیلیم بسته شد و به مدت یک ماه در تاریکی و در ۲۰ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت. تشکیل آسپور به منظور تایید و تعیین تیپ‌آمیزی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار شد (Mitchell & Kannwicher- Mitchell 1992).

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های منسوب به *P. parsiana*

به منظور انجام این آزمایش از نهال‌های سه ماهه‌ی پسته‌ی رقم سرخس و جدایه‌های گروه دوم و سوم و سه جدایه‌ی منتخب از هر یک از گروه‌های اول و چهارم استفاده شد (جدول ۱). برای تهیه‌ی مایه‌ی بیماری‌زا از عصاره‌ی شاهدانه و ورمی‌کولایت استفاده شد (Banhashemi 1989). پس از انتقال گلدان‌ها به گل‌خانه، ۱۰ میلی‌لیتر از مایه در هر گلدان و پای طوقه‌ی نهال‌ها ریخته شد و روی آن با ماسه سترون پوشانیده شد. گلدان‌ها به مدت ۲۴ ساعت غرقاب گردید و متناوباً پس از مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت. گلدان‌ها در گلخانه با حداکثر دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و حداقل ۱۵ درجه‌ی

برای تمایز آرایه‌ها یا گروه‌های مختلف فیتوفورا به کار رفته است. در این مطالعه نیز به عنوان شاخصی پایه برای تمایز گروه‌های موجود استفاده گردید. مقداری از بذر شاهدانه را در آب مقطر سترون به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه جوشانیده و پس از خنک شدن، تعدادی از آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی تشتک پتری PDA (عصاره‌ی ۳۰۰ گرم سیب‌زمین، ۲۰ گرم دکستروز، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم ۱ لیتر) یا FBA (عصاره‌ی ۳۰ گرم لوبیا قرمز، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم ۱ لیتر) حاوی پرگنه‌های جوان کلیه‌ی جدایه‌های بیمارگر قرار گرفت. شاهدانه‌ها پس از ۲۴ ساعت به تشتک‌های پتری حاوی عصاره خاک سترون (Mircetich & Matheron 1976) منتقل شده، به مدت ۲۴ ساعت در فاصله‌ی ۴۰ سانتی متری لامپ فلورسان (حدود ۱۰۰۰ لوکس)، قرار گرفت. تشکیل اسپورانژیوم با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد (Schmitthenner 1973).

تعیین دمای بهینه و پیشینه‌ی رشد

از حاشیه پرگنه‌های جوان کلیه‌ی جدایه‌ها رشد یافته روی محیط کشت نیمه انتخابی (CMA-PARP)، یک قطعه ۵ تا ۶ میلی‌متری برداشته و در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت CMA قرار داده شد. برای هر جدایه در هر دما سه تکرار در نظر گرفته شد. دماهای مورد بررسی در این آزمون به دلیل گرمادوست بودن جدایه‌ها و تعیین دقیق حداکثر دمای رشد شامل ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۳۹ و ۴۰ درجه‌ی سلسیوس بود.

تعیین تیپ‌آمیزی با استفاده از روش ساندویچی

در این روش از کشت‌های پنج روزه‌ی کلیه‌ی جدایه‌ها و سه جفت تیپ‌آمیزی جنسی شناخته شده‌ی A1 و A2

ای حاصل، ۲/۵ میکرولیتر از هر آغازگرها با غلظت ۱۰ میکرو مولار، ۲ میکرولیتر dNTPs دارای غلظت ۲ میکرومولار، ۰/۱ میکرولیتر Taq DNA polymerase (Ta-) (KaRa, Shuzo, Japan)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰× واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری تهیه شد. از آغازگرهای بهینه برای تکثیر ناحیه‌ی آی‌تی‌اس ۱ دی‌ان‌ای ریپوزومی ITS6F7R (ITS6:5'-GAAGGTGA) و ITS7: 5'-AGCGTTCTT و AGTCGTAACAAGG-3' (CATCGATGTGC-3' استفاده شده و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طبق شیوه‌ی کانگ و همکاران (Kong et al. 2003) انجام شد.

واکوی‌های چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریپوزومی

یک میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز همراه با ۹ میکرولیتر از بافر واسرشتگی (فرم آمید ۹۵ درصد، EDTA ۲۰ میلی مولار و برم فول بلو ۰۵/ درصد) مخلوط شده و پس از ۱۰ دقیقه در ۹۶ درجه‌ی سلسیوس، یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. ۲/۵ میکرولیتر از این مخلوط در مینی ژل ۸ درصد پلی‌اکریل‌آمید: بیس (۱:۲۹) درون قالب‌های الکتروفورز Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ریخته شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز واسرشته شده پس از انتقال به ژل در بافر سرد ۱×TBE با ولتاژ ثابت ۲۲۰ و طی مدت زمان ۱۳۰ دقیقه در دمای اتاق الکتروفورز گردید. ژل‌ها با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی و تصاویر با استفاده از دستگاه Bio Imaging and Chemi System (UVP Lab Inc., Upland, CA, USA) ثبت شد (Kong et al. 2003, Gallegly & Hong 2008). به منظور تسهیل بررسی و مقایسه الگوهای حاصله در یک ژل و بین

سلسیوس و میانگین ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری و روزانه آبیاری شدند. ردیابی بیمارگر در گلدان‌ها هر ماه با استفاده از طعمه‌های برگ پسته شناور در زه آب گلدان‌ها انجام شد و رشد بیمارگر روی محیط‌کشت CMA-PARP بررسی شد. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. همچنین از مخلوط سترون شده‌ی ورمیکولایت و عصاره‌ی شاهدانه به عنوان شاهد منفی استفاده شد. برای تأیید حضور فیتوفتورای عامل بیماری و تکمیل اصول کخ، جداسازی مجدد از ریشه و طوقه گیاه صورت گرفت (Banihashemi 2004).

استخراج دی‌ان‌ای و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به منظور انجام چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریپوزومی

کلیه‌ی جدایه‌های مورد نظر روی محیط کشت عصاره هشت سبزی- آگار (V8A) (عصاره‌ی هشت سبزی ۲۰ درصد، ۴ گرم در لیترکربنات کلسیم، ۱۵ گرم در لیتر آگار) در تشتک‌های پتری ۶ سانتی متری کشت شده و به مدت دو هفته در دمای بیست و سه درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد. در این مرحله به منظور استخراج دی‌ان‌ای از روش تک مرحله‌ای جوشاندن ریشه‌ها استفاده شد. به این منظور ریشه‌های یک بلوک دو سانتی متری از محیط‌کشت دو هفته‌ای جدایه‌ها، تراشیده شده و به ریزلوله‌های ۱/۵ میکرولیتری محتوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ میلی مولار Tris-HCl دارای پی‌اچ ۷/۵ انتقال یافت. سپس ریزلوله‌ها در یک بلوک گرمایی با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و پس از ۳ دقیقه ورتکس، روشنین بلافاصله به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قابل استفاده بود (Kong et al. 2003).

مواد مورد استفاده مخلوطی حاوی ۲ میکرولیتر از دی‌ان-

قلمفرسسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh- 2013) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ناحیه‌ی میتوکندریایی زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی COXR4N: 5'CGTGAAC () COXR4N و COXF4N COXF4N: 5'GTATTTC و AATGTTACATATAC3' (TTCTTTATTAGGTG C3' طبق شرایط دمایی و مخلوط گزارش شده برای آغازگر انجام شد (Kroon et al. 2004). نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با الکتروفورز در ژل یک درصد آگارز حاوی ۰/۰۵٪ اتیدیوم بروماید در بافر TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم EDTA، ۵/۵ گرم اسید بوریک، آب مقطر تا حجم یک لیتر) به مدت یک ساعت و در ۸۰ ولت تأیید شد و قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش با استفاده از دستگاه ژل-داکیومنتر (سین‌ژن، ایالات متحد آمریکا) عکس برداری شد. قطعات فزون‌سازی شده به منظور خالص‌سازی و توالی‌سنجی دی‌ان‌ای به مرکز فناوری پیشرفته ژنتیک دانشگاه کنتاکی (University of Kentucky Advanced Genetic Technologies Center) (لگزی‌نگتون، کنتاکی، ایالات متحد آمریکا) ارسال شد.

ویرایش توالی‌های دی‌ان‌ای و واکاوی‌های فیلوژنتیکی

ویرایش و هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Geneious v10.2.3 با مقایسه‌ی نسخه‌ی مستقیم و معکوس ویرایش شده، رشته‌ی برآیند به دست آمد و پس از ارائه به بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; [Online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> رَس- شمار آن‌ها اخذ و برای مطالعات بعدی استفاده شد. توالی‌های به دست آمده در این پژوهش همراه با توالی‌های معتبر زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی اعضای تبار نه

ژل‌های مختلف نیز از نردبان SSDNA طراحی شده توسط کانگ و همکاران (Kong et al. 2003) استفاده شد. ترکیب مورد استفاده شامل نردبان DNA/HaeIII Φ X174 (Promega, Madison, WI) همراه با محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز *P. cinnamomi* است که با بافر واسرشتگی مخلوط شده و در ژل وارد شد. انتخاب این نردبان از بین سه نردبانی که توسط کانگ و همکاران (Kong et al. 2003) معرفی شده بود به دلیل تعداد نوارهای تولیدی، مکان قرارگیری نوارها، میزان تفکیک-پذیری و تکرارپذیری الگوی ایجاد شده است. به طور کلی الگوهای به دست آمده برای هر جدایه با استفاده از این نردبان بررسی و شناسایی شد. در صورت مشاهده‌ی تنوع درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای الگوهای SSCP در زمانی که الگوهای به دست آمده شبیه به هم بودند، الگوها به صورت پهلوی به پهلوی با هم مقایسه شد (Kong et al. 2003).

استخراج، فزون‌سازی و توالی‌سنجی دی‌ان‌ای

قطعاتی به قطر تقریبی پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی جوان پرگنه‌های جدایه‌های مورد مطالعه جدا و به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر عصاره‌ی سترون شده‌ی سیب‌زمینی منتقل شد. فلاسک‌ها به مدت ده روز در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از ده روز محتویات هر فلاسک در تشتک‌های پتری سترون خالی و پرگنه‌ها با استفاده از آب مقطر سترون شسته شدند. میسلیم‌ها با استفاده از سوزن‌های سترون از قطعات محیط کشت آگاردار جدا شده، داخل لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفته و پس از یخ زدن به کمک ازت مایع، لوله‌های اپندورف به مدت ۲۴ ساعت سرماخشک شدند. استخراج دی‌ان‌ای به روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده

فیتوفتورا (اخذ شده از بانک ژن) هم ردیف شدند. در نهایت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از رهیافت پیشینه‌ی درست‌نمایی و مدل Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993) با ۱۰۰۰ دور آزمون بوت استراپ توسط نرم‌افزار MEGA7.0 (Tamura et al. 2017) رسم، ویرایش و نمایش داده شد.

نتایج

در این بررسی جدایه‌های مختلف آمیست از ریشه و طوقه‌ی درختان دارای علائم گموز و خاک اطراف درختان آلوده از باغات پسته مربوط به مناطق پسته‌کاری استان کرمان و یزد جداسازی شد. با توجه به خصوصیات ریخت‌شناختی از جمله توانایی رشد در ۳۵ درجه‌ی سلسیوس و در نهایت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *P. parsiana* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2012) که بر مبنای توصیف اولیه‌ی این گونه‌ی مرکب طراحی شده بود، جداسازی جدایه‌های منسوب به *P. parsiana* انجام شد. این جدایه‌ها همراه با سایر جدایه‌های مربوط به توصیف اولیه‌ی این بیمارگر، و سایر جدایه‌های منسوب به *P. parsiana* اخذ شده از سایر مجموعه‌ها مورد بررسی‌های SSCP، ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک قرار گرفت (جدول ۱).

بررسی‌های فیلوژنتیکی و واکاوی‌های چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریبوزومی

بررسی نتایج حاصل از نقوش به دست آمده نشان داد که جدایه‌های منسوب به *P. parsiana* در چهار گروه (Group 1, 2, 3, 4) کاملاً مجزا و متمایز دسته‌بندی می‌شوند. الگوهای به دست آمده در ژل پلی‌اکریل‌آمید به وضوح تفاوت‌های معنی‌داری با هم داشته و در مقایسه با

الگوهای مرجع موجود در کلید تشخیصی گالگلی و هانگ (Gallegly & Hong 2008) قابل تفکیک بودند و به هیچ‌کدام از گونه‌های توصیف شده در این کلید شباهت نداشتند (شکل ۱). گروه اول منحصرأ شامل جدایه‌های به دست آمده از مناطق پسته‌کاری استان‌های کرمان و یزد در ایران بود که در فاصله‌ی سال‌های ۱۹۹۲ تا ۲۰۱۴ متناوباً جداسازی شده بودند. این گروه پنج نوار اصلی متمایز ایجاد کرد که نوار بالا در محدوده‌ی ۹ نردبان (Kong et al. 2003) جای گرفت، دو نوار میانی نزدیک به هم و در فاصله‌ی میانی ناحیه‌ی ۱۰ و ۱۱، نوار بعدی در محدوده‌ی ۱۲ و نوار انتهایی کمی بالاتر از محدوده‌ی ۱۶ نردبان قرار گرفت. گروه دوم شامل تنها دو جدایه از مناطق پسته‌کاری‌های استان کرمان در ایران بود که تنها در سال ۱۹۹۳ جدا شده بودند و این دو جدایه در نوارهای ابتدایی، میانی و انتهایی با سه گروه دیگر کاملاً متفاوت و متمایز بودند. به طور مشخص دو نوار در ناحیه‌ی ۱۲ تا ۱۳ و همین‌طور دو نوار در زیر ناحیه‌ی ۱۴، این دو جدایه را از سایر گروه‌ها جدا کرد. با توجه به این نتایج از زمان جداسازی این دو جدایه در سال ۱۹۹۳ تاکنون نیز جدایه‌ای نزدیک به آن‌ها جداسازی نشده است. گروه سوم، حاوی تک جدایه‌ی تیپ *P. parsiana* جدا شده از انجیر در استان بوشهر با داشتن تمایز واضح و تعدد معنی‌دار نوارهای مشخص، گروهی مجزا را ایجاد کرد. تمایز این جدایه نسبت به سه گروه دیگر به خصوص در نوارهای قرار گرفته در ناحیه‌ی ۱۱، ۱۳ و بالاتر از ۱۵ کاملاً شاخص بود. به نظر می‌رسد این جدایه که نخستین بار از استان بوشهر جدا شده و تاکنون نیز گزارش دیگری از آن در دست نیست به عنوان یک آرایه‌ی مجزا از سایر آرایه‌ها قرار می‌گیرد. گروه چهارم شامل جدایه‌هایی از مناطق پسته‌کاری ایران و آمریکا بود که جدایه‌های ایران در

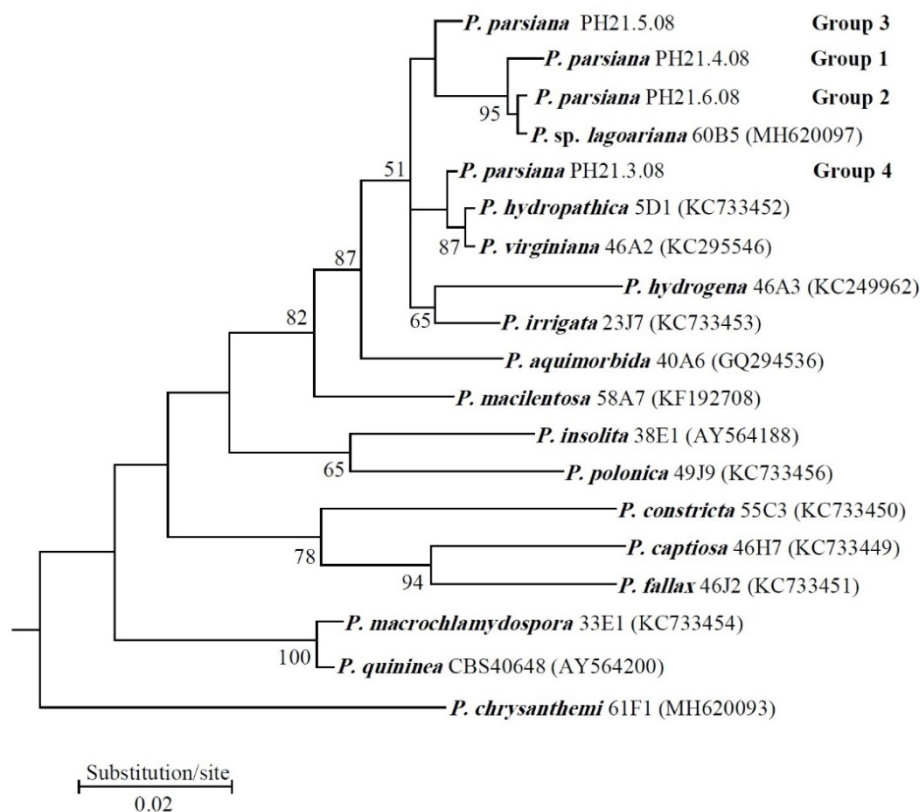


شکل ۱ - چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی مربوط به تکثیر ناحیه‌ی ترانویسی داخلی ۱ دی‌ان‌ای ریبوزومی با آغازگرهای ITS6 و ITS7 در جدایه‌های منسوب به *Phytophthora parsiana*. راهک ۱: نشانگر ۱ تا ۱۶ نردبان ssDNA (Kong et al. 2003). گروه اول، راهک ۲ تا ۱۳: PH21.27.10, PH21.26.10, PH21.13.08, PH21.12.08, PH21.11.08, PH21.10.08, PH21.9.08, PH21.8.08, PH21.4.08, PH21.40.14, PH21.41.14, PH21.44.14, گروه دوم، راهک ۱۴ و ۱۵: جدایه‌های PH21.6.08 و PH21.7.08، گروه سوم، راهک ۱۶: جدایه‌ی PH21.5.08، گروه چهارم، راهک ۱۷ تا ۲۵: PH21.3.08, PH21.14.08, PH21.15.08, PH21.16.08, PH21.17.08, PH21.18.08, PH21.19.08, PH21.20.08, PH21.43.14.

Figure 1. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) of amplified ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 region with primers ITS6 and 7 isolates assigne to *Phytophthora parsiana*. Lane 1: 1-16 markers of the single-stranded DNA (ssDNA) ladder (Kong et al. 2003). Group 1, Lane 2 to 13: PH21.4.08, PH21.8.08, PH21.9.08, PH21.10.08, PH21.11.08, PH21.12.08, PH21.13.08, PH21.26.10, PH21.27.10, PH21.40.14, PH21.41.14, PH21.44.14; Group 2, Lane 14 & 15: PH21.6.08 & PH21.7.08; Group 3, Lane 16: PH21.5.08; Group 4, Lane 17 to 25: PH21.3.08, PH21.14.08, PH21.15.08, PH21.16.08, PH21.17.08, PH21.18.08, PH21.19.08, PH21.20.08, PH21.43.14.

ناحیه‌ی زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی جدایه‌های PH21.6.08 و PH21.5.08, PH21.4.08, PH21.3.08 به عنوان جدایه‌های منتخب از هر یک از گروه‌های ۱ تا ۴ به دست آمده از واکاوی‌های SSCP انجام شد. درخت فیلوژنتیکی حاصل از این توالی‌ها وجود چهار گروه مجزا را در کنار سایر اعضای تبار نه گونه‌های فیتوفتورا نشان داد (شکل ۲). این دسته‌بندی نتایج واکاوی‌های SSCP را تأیید نمود. هر یک از جدایه‌ها در شاخه‌ای مجزا از سایر گونه‌های تبار نه قرار گرفته و هر چهار گروه از هم و از گونه‌های نزدیک به خودشان مانند *P. hydrophatica*, *P. virginiana* و *sp. lagoariana* متمایز بودند.

سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۱۴ گزارش شده بودند. نوارهای ابتدایی این گروه از جدایه‌ها در ناحیه‌ی ۸ و بالاتر از سایر گروه‌ها قرار گرفته و الگوی کلی متفاوتی را نسبت به سایر گروه‌ها ایجاد کرده و هیچ نوازی از ناحیه‌ی ۱۲ به بعد نردبان ایجاد نکرد (شکل ۱). الگوهای ایجاد شده‌ی گروه‌های چهارگانه با الگوهای مرجع مربوط به گونه‌های نزدیک به آنها در تبار نه درخت فیلوژنتیکی مانند *P. virginiana* و *P. hydrophatica* وجود در آزمایشگاه بخش بیماری‌شناسی، فیزیولوژی و علف‌های هرز دانشگاه ویرجینیا تک ایالات متحده آمریکا (Hong et al. 2010) مقایسه و تمایز آنها تأیید شد. توالی‌سنجی



شکل ۲- روابط فیلوژنتیکی گروه‌های چهارگانه‌ی جدایه‌های منسوب به *Phytophthora parsiana* و کلیه‌ی اعضای تبار نه فیتوفتورا براساس توالی ناحیه‌ی میتوکندریایی زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی در درخت پیشینه‌ی درست‌نمایی. اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده‌ی درصد مقادیر بوت‌استراپ بزرگتر یا مساوی ۵۰ درصد است.

Figure 2. Phylogenetic relationships of four groups of isolates assigned to *Phytophthora parsiana* with all members of *Phytophthora* clade 9 based on the cytochrome c oxidase subunit I sequences in maximum likelihood tree. Numbers above the branches represent the bootstrap values equal to or greater than 50%.

شکل فاقد پستانک، ناریزان، با افزولش داخلی (تودرتو) بودند (شکل ۳). جدایه‌های گروه اول دارای میانگین اندازه‌ی $۳/۰۳ \pm ۲۹/۱ \times ۳/۶۲ \pm ۴۵/۱$ میکرومتر (دامنه‌ی $۲/۴۳ - ۱۳/۰۲ \times ۶۲/۳ - ۲۸/۱$) با میانگین نسبت طول به عرض $۱/۵۵$ ، جدایه‌های گروه دوم دارای میانگین اندازه‌ی $۱/۸۰ \pm ۳۸/۱ \times ۲/۰۲ \pm ۵۶/۱$ میکرومتر (دامنه‌ی $۴ - ۶۰$) و نسبت طول به عرض $۱/۴۷$ ، جدایه‌ی گروه سوم دارای میانگین اندازه‌ی $۲/۸۴ \pm ۲۸/۱۲ \times ۲/۶۰ \pm ۴۷/۳۱$ میکرومتر (دامنه‌ی $۵۷ - ۱۲ \times ۸۲ - ۲۵$) و نسبت طول به

خصوصیات اسپورانژیوم، تیپ آمیزشی و پیشینه‌ی دمای رشد استفاده از بذر شاهدانه و عصاره خاک منجر به تولید اسپورانژیوم‌هایی بدون پستانک و غیرریزان در کلیه‌ی جدایه‌های مورد بررسی شد (شکل ۳). میزان تولید اسپورانژیوم در جدایه‌ی انجیر (گروه سوم) بسیار بیشتر بوده و در سایر جدایه‌ها به صورت محدودتر تولید اسپورانژیوم صورت گرفت. اسپورانژیوم‌ها به طور کلی تخم‌مرغی، بیضی تا گلابی

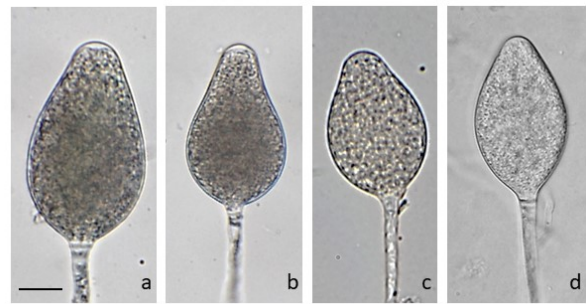
درجه‌ی سلسیوس، جدایه‌های گروه دوم ۳۷ درجه‌ی - سلسیوس، تک جدایه‌ی گروه سوم ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و برای جدایه‌های گروه چهارم ۴۰ درجه‌ی سلسیوس بود.

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های منسوب به *P. parsiana*

با توجه به اینکه پسته رقم سرخس حساس‌ترین پایه در مقابل گونه‌های رایج فیتوفتورای بیمارگر پسته به شمار می‌رود (Mirsoleimani et al. 2013)، از این رقم برای انجام آزمون بیماری‌زایی استفاده شد. نهال‌های یک ماهه‌ی مایه‌زنی شده با جدایه‌های منتخب بیمارگرها (جدول ۱) از گروه اول، دوم و چهارم، دو هفته پس از مایه‌زنی علائم بیماری را به صورت پژمردگی، سبز خشکی اندام‌های هوایی و پوسیدگی طوقه و ریشه در دمای ۲۵-۳۰ درجه‌ی سلسیوس نشان دادند. این علائم در نهال‌های مایه‌زنی شده دارای روند افزایشی بوده، منجر به مرگ کلیه‌ی نهال‌ها سه هفته پس از مایه‌زنی شد. عامل بیماری مجدداً از مرز بین نواحی آلوده و سالم جداسازی گردید. درصد آلودگی نهال‌ها برای همه‌ی جدایه‌ها ۱۰۰ درصد بود. نهال‌های پسته مایه‌زنی شده با جدایه‌ی بیمارگر گروه سوم، تا دو ماه پس از مایه‌زنی هیچ علائم بیماری را نه در اندام‌های هوایی و نه در طوقه و ریشه نشان ندادند. جداسازی زئوسپورهای جدایه‌ی گروه سوم از زه‌آب گلدان‌ها، فعال بودن این جدایه را طی دوره‌ی بررسی تأیید کرد.

بحث

تاکنون تعداد اندکی جدایه‌ی *P. parsiana* از مناطق مختلف دنیا جداسازی شده است. جدایه‌های منسوب به *P. parsiana* که در سال‌های گذشته جداسازی شده بود همرا با جدایه‌های به دست آمده از باغات پسته در این مطالعه بر اساس نقوش به دست آمده از چندشکلی



شکل ۳- دامنه‌ی ریخت‌شناسی اسپورانژیوم جدایه‌های منسوب به *Phytophthora parsiana* (a) گروه اول جدایه‌ی (PH.21.40.14)، (b) گروه دوم (PH.21.6.08)، (c) گروه سوم (PH.21.43.14). خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر

Figure 3. Range of sporangial morphology of isolates assigned to *Phytophthora parsiana* a) Group 1 (PH.21.40.14), b) Group 2 (PH.21.6.08), C) Group 3 (PH.21.5.08), d) Group 4 (PH.21.40.14) Bar= 20 μ m

عرض ۱/۶ میکرومتر و جدایه‌های گروه چهارم دارای میانگین اندازه‌ی $48/15 \pm 2/62 \times 27/34 \pm 1/43$ میکرومتر (دامنه‌ی ۱۴-۵۵/۷ \times ۲۳/۳-۷۸/۷) با میانگین نسبت طول به عرض ۱/۷ بودند.

در این آزمون تمامی جدایه‌های مربوط به هر چهار گروه در مقابل تیپ آمیزشی A1 و A2 گونه‌های *P. cryptogea* و *P. cinnamomi nicotianae* قرار گرفته و نتایج مشابه‌ی روی محیط‌کشت‌های HSA و CA به دست آمد. کلیه‌ی جدایه‌ها دگرتال بوده و دارای تیپ آمیزشی A1 بودند و فقط در مقابل تیپ آمیزشی A2 آسپور تولید کردند. همچنین جفت کردن هر یک از جدایه‌ها با خودش نیز در هیچ موردی منجر به تشکیل آسپور نشد و در ضمن هیچ‌کدام از جدایه‌ها نیز عقیم نبودند.

دمای بهینه‌ی رشد برای تمامی جدایه‌های ۳۰ اندازه‌گیری شد. بیشینه‌ی دما برای جدایه‌های گروه اول ۴۰

از رویکرد چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریوزومی نشان داد که بدون نیاز به توالی‌یابی دی‌ان‌ای و همچنین با داشتن تعداد بالای جدایه‌های به دست آمده پس از نمونه‌برداری می‌توان به یک دسته‌بندی دقیق در مورد شناسایی و تعیین مرز گونه‌های فیتوفتورای جداسازی شده رسید. تفاوت‌های آشکار در تولید الگوهای به دست آمده اجازه نمی‌دهد که جدایه‌های فاقد قرابت مولکولی در یک گروه دسته‌بندی شوند (Gallegly & Hong 2008). همچنین وجود این الگوها منجر به شناسایی تغییرات توالی در پدیدگان‌هایی همگرا و نزدیک به هم می‌شود و میزان خطا در دسته‌بندی گونه‌های مختلف نزدیک به هم را کاهش می‌دهد. این روش به تغییراتی در حد یک جفت باز هم حساس است و سبب ایجاد الگوهای کاملاً متمایز می‌شود (Kong et al. 2003). یکی دیگر از مزایای مهم این روش کاربرد آن در زمانی است که نیاز به بررسی‌های یک‌سان روی تعداد زیادی از جدایه‌های به دست آمده از یک نمونه‌برداری است. به این ترتیب می‌توان محصول پی‌سی‌آر به دست آمده با استفاده از آغازگر عمومی (ITS6 و ITS7) را با هم مقایسه و دسته‌بندی کرد و برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار داد (Gallegly & Hong 2008).

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریزسنجی اسپورانژیوم‌ها به عنوان یکی از اساسی‌ترین خصوصیات تاکسونومی تفاوت‌های قابل توجهی را در میان گروه‌ها نشان نداد. با این حال، گروه دوم در بین سایر گروه‌ها دارای میانگین اندازه‌ی بیشتری بود. بنابر توصیف اولیه‌ی *P. parsiana* تنها سه جدایه‌ی PH21.4.08 (SUC19)، PH21.5.08 (SUC25) و PH21.6.08 (SURF6) قادر به تولید اسپور بودند (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al 2008) و سایر جدایه‌ها به عنوان جدایه‌ی عقیم معرفی

ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریوزومی در چهار گروه مجزا قرار گرفت. نقوش به دست آمده در ژل پلی‌آکریل‌آمید چهار الگوی متمایز را در مقایسه با یکدیگر، نقوش موجود در کلید شناسایی گونه‌های فیتوفتورا (Gallegly & Hong 2008) و نقوش گونه‌های جدیدتر نزدیک به این گونه‌ی مانند *P. hydrogena*، *P. hydropathica* و *P. virginiana* (Hong et al. 2010) نمایش داد. واکاوی‌های فیلوژنتیکی ناحیه‌ی میتوکندریایی زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی نیز جدایه‌ها را در چهار گروه مجزا قرار داد که مانند نتایج به دست آمده از واکاوی‌های چندشکلی ساختاری تک‌رشته‌ی دی‌ان‌ای ریوزومی بود. هر چهار گروه در تبار نه درخت فیلوژنتیکی گونه‌های فیتوفتورا قرار گرفته و گروه‌هایی مستقل از اعضای تبار نه را تشکیل دادند. این نتایج با نتایج انواری و همکاران (Anvari et al. 2018) مبنی بر قرار دادن جدایه‌های *P. parsiana* در تبار نه درخت فیلوژنتیکی فیتوفتورا مطابقت نداشت.

در مطالعات قبلی کلیه‌ی جدایه‌های به دست آمده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک هم‌خوان با توصیف اولیه‌ی گونه تحت عنوان *P. parsiana* شناسایی شده بودند و شامل جدایه‌هایی با توانایی رشد بالاتر از ۳۵ درجه‌ی سلسیوس و تکثیر ناحیه‌ی آی‌تی‌اس توسط آغازگرهای طراحی شده (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2012) به منظور تشخیص این بیمارگر بود (Hajebrahimi & Banihashemi 2011; Rafiee 2011). به دلیل مشاهده‌ی تفاوت در دامنه‌ی میزبانی و بیماری‌زایی، دمای بیشینه‌ی رشد، عدم تولید اسپور و کلامیدوسپور در برخی جدایه‌ها نیاز به بازبینی مجدد جدایه‌های منسوب به این گونه ضروری به نظر می‌رسید (Hajebrahimi & Banihashemi 2011, Rafiee & Banihashemi 2013a, Anvari 2014, Anvari & Banihashemi 2015). استفاده

قادر به رشد در ۴۰ درجه‌ی سلسیوس معرفی شده بود و سایر جدایه‌ها را تنها قادر به رشد تا ۳۷ درجه‌ی سلسیوس معرفی کرد. در بررسی دیگر توسط حاج/ابراهیمی (Hajebrahimi 2008) علاوه بر جدایه‌ی PH21.3.08 (SUC7)، جدایه‌ی PH21.5.08 (SUC25) و جدایه‌ی PH21.4.08 (SUC19) نیز به عنوان جدایه‌های قادر به رشد در ۴۰ درجه‌ی سلسیوس معرفی شده و در نهایت دمای بیشینه‌ی گونه‌ی *P. parsiana* در ۴۰ درجه‌ی سلسیوس بیان شده بود. جدایه‌ی نماینده‌ی *P. parsiana*، PH21.5.08 (SUC25)، از گروه سوم در بررسی هانگ و همکاران (Hong et al. 2010) که برای توصیف *P. hydrophatica* انجام شد، مورد مطالعه‌ی مقایسه‌ای قرار گرفت و نتایج آن‌ها نیز نشان داد که این جدایه برخلاف *P. hydrophatica* و *P. irrigate* قادر به رشد در دمای ۴۰ درجه‌ی سلسیوس نیست.

در این بررسی مشخص شد که جدایه‌ی تیپ *P. parsiana* PH21.5.08 (SUC25)، روی پسته بیمارگر نبوده و این نتایج با نتایج حاج/ابراهیمی (Hajebrahimi 2008) مطابقت دارد. حال آن‌که بررسی‌هایی که به منظور تعیین دامنه‌ی میزبانی جدایه‌های *P. parsiana* روی رقم پسته سرخس توسط رفیعی و بنی‌هاشمی (Rafiee & Banhashemi 2013a) و انواری (Anvari 2014) انجام شده بود کلیه‌ی جدایه‌های منسوب به *P. parsiana* را به عنوان بیمارگر پسته‌ی رقم سرخس معرفی کرده بودند اما همین جدایه‌ی PH21.5.08 (SUC25) روی رقم پسته‌ی اردکانی هیچ علائمی را ایجاد نکرده بود. این در حالی است که جدایه‌ای با الگوی مشابه با این جدایه هیچ‌گاه از مناطق پسته‌کاری ایران یا سایر نقاط جهان جداسازی نشده است و صرفاً به دلیل تشابه مولکولی به واسطه‌ی استفاده از آغازگرها و ریخت‌شناختی در کنار سایر جدایه‌های نزدیک

شدند. حال آن‌که بررسی‌های بعدی نشان داد که جدایه‌ی PH21.3.08 (SUC7) و برخی از جدایه‌های جدا شده در سال‌های بعد نیز قادر به تولید آسپور هستند، گرچه برخی جدایه‌ها ممکن است عقیم باشند (Anvari 2014). در این بررسی کلیه‌ی جدایه‌های که در توصیف اولیه‌ی این بیمارگر بودند همراه با سایر جدایه‌های به دست آمده در سال‌های مختلف تا سال ۲۰۱۴ با سه جفت تیپ آمیزشی معتبر متعلق به سه گونه *P. cinamomi*، *P. cryptogea* و *P. nicotiani* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که همگی قادر به تولید آسپور بوده و هیچ یک عقیم نبودند. این امکان وجود دارد که جدایه‌هایی که در مطالعه‌ی اولیه عقیم گزارش شده‌اند دارای دگرگرتالی نسبی^۴ (Ko 1988) بوده و فقط با برخی جدایه‌ها تولید آسپور نمایند. سایر گونه‌های نزدیک به *P. parsiana* مانند *P. hydrophatica*، *P. virginiana* و *P. irrigate* که همگی در تبار نه درخت فیلوژنتیکی فیتوفتورا می‌باشند نیز دگرگرتالی و داری تیپ‌آمیزی A1 بوده و در توصیف نهایی عقیم نبودند (Hong et al. 2008, Hong et al. 2010, Yang et al. 2017).

بررسی دمای بیشینه‌ی رشد نیز نشان دهنده‌ی تفاوت بین جدایه‌های منسوب به این بیمارگر بود چرا که تک جدایه‌ی متعلق به گروه سوم، قادر به رشد در ۴۰ درجه‌ی سلسیوس نبوده و جدایه‌های گروه اول و چهارم قادر به رشد در ۴۰ درجه‌ی سلسیوس بودند. گروه دوم نیز تا ۳۷ درجه‌ی سلسیوس رشد کرده و در دماهای بالاتر قادر به رشد نبود. در توصیف اولیه‌ی این گونه تنها جدایه‌ی PH21.3.08 (SUC7) که در این مطالعه به عنوان جدایه‌ای از گروه چهارم معرفی شده است به عنوان تنها جدایه‌ی

⁴ Partial heterothallism

دست آمده از روش SSCP و روابط فیلوژنتیکی به دست آمده براساس توالی‌های ناحیه‌ی میتوکندریایی زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی جدایه‌های مورد مطالعه مشخص کرد که احتمال وجود چهار آرایه‌ی مجزا و متفاوت در میان جدایه‌های منصوب به *P. parsiana* که طی ۲۵ سال گذشته خصوصاً از باغات پسته ایران گزارش شده است، قابل مشاهده است. تفاوت در اثر نگاری دی-ان‌ای، بیماری‌زایی، دمای بیشینه و ریزسنجی اسپورانژیوم‌ها به این فرضیه قوت می‌بخشد که *P. parsiana* گونه‌ای مرکب و متشکل از رگه‌هایی متفاوت است که هر یک ممکن است گونه‌ای مستقل یا دورگی از دو گونه‌ی مختلف باشند. بنابراین مطالعه روی سایر ژن‌های خانه-داری هسته‌ای و میتوکندریایی که معرف واگرایی فیلوژنتیکی این گروه‌ها یا امتزاج گونه‌های مختلف باشند و بررسی دقیق‌تر سایر خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک به منظور ارزیابی دقیق گروه‌ها به عنوان گونه‌های مجزا و در نهایت توصیف رسمی آن‌ها پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر جوانگرو هانگ، سرکار خانم دکتر بینگ کانگ و سرکار خانم پاتریشیا ریچاردسون (بخش بیماری‌شناسی، فیزیولوژی گیاهی و علف‌های هرز، مرکز تحقیقات و توسعه کشاورزی همپتون رودز، دانشگاه ویرجینیا تک، ویرجینیا بیچ، ایالات متحد آمریکا) به دلیل کمک در انجام آزمایش‌ها قدردانی می‌شود. از جناب آقای دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی به دلیل در اختیار قرار دادن برخی جدایه‌های *P. parsiana* از مجموعه‌ی قارچ بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تشکر می‌گردد.

به خودش تحت عنوان *P. parsiana* معرفی شده است. در این مطالعه نتایج بیماری‌زایی جدایه‌های دیگر که در سه گروه اول، دوم و چهارم قرار گرفته‌اند نشان‌دهنده بیمارگر بودن این جدایه‌ها بود که این نتایج با نتایج حاج‌ابراهیمی و بنی‌هاشمی (Hajebrahimi & Banhashemi 2011) و رفیعی (Rafiee 2011) مطابقت داشت. نتایج مطالعات دامنه‌ی میزبانی میزبان‌های علفی و چوبی نیز نشان‌دهنده تفاوت در بین جدایه‌های این گونه بوده است. در بررسی انجام شده توسط حاج‌ابراهیمی و بنی‌هاشمی (Hajebrahimi & Banhashemi 2011) جدایه‌های بیمارگر در هیچ‌یک از میزبان‌های یک‌ساله علائمی را ایجاد نکردند. مطالعات بعدی توسط انواری (Anvari 2014, Anvari et al. 2018) نشان داد که برخی از جدایه‌ها روی فلفل بیماری‌زاست اما رفیعی (مکاتبات شخصی) در یک بررسی تکمیلی با کلیدی ارقام فلفل و همه‌ی جدایه‌های بیمارگر بیان کرد که هیچ‌یک از جدایه‌های بیمارگر روی فلفل بیماری‌زا نبودند.

نتایج متفاوت به دست آمده از بررسی‌های متفاوت دامنه‌ی میزبانی نشان‌دهنده‌ی تنوع در جدایه‌هایی است که تحت عنوان *P. parsiana* شناخته می‌شدند و به نظر می‌رسد گروه‌بندی صحیح این جدایه‌ها سبب جهت‌دهی صحیح مطالعات در راستای معرفی گونه‌های احتمالی موجود در این گونه‌ی مرکب است. در این مطالعه مشخص شد که جدایه‌ای که به عنوان جدایه‌ی تیپ این گونه معرفی شده است به احتمال زیاد بیمارگر پسته نیست چرا که نه از مناطق پسته‌کاری جدا شده و نه روی رقم سرخس حساس‌ترین پایه‌ی پسته به گونه‌های فیتوفتورا علائمی را ایجاد می‌کند. بررسی‌های پیشین نگارندگان بیماری‌زایی جدایه را روی بستره‌ی جداسازی آن یعنی انجیر تأیید کرده است. از سوی دیگر بررسی الگوهای به

- Aminae M. and Ershad D. 1991. Isolation of *Phytophthora drechsleri* from infected pistachio trees. Proceedings of the 10th Plant Protection Congress. Iran, Bahonar University, Kerman, Iran. 106.
- Anvari Z. 2014. Comparison of *Phytophthora parsiana* isolates with other high temperature species in terms of host range, thermal, morphological characteristics and molecular traits. MSc Thesis. Shiraz University, Shiraz, Iran. 110 pp.
- Anvari Z. and Banihashemi Z. 2015. Host range and certain morphological characteristics of three similar high temperature species of *Phytophthora parsiana*, *P. hydropathica* and *P. irrigate*. Iranian Journal of Plant Pathology 52(1): 57–65.
- Anvari Z., Mirtalebi M. and Banihashemi Z. 2018. Herbaceous host plants diversity and phylogenetic relationship among isolates of *Phytophthora parsiana*. Iranian Journal of Plant Pathology 54(1): 49–56.
- Banihashemi Z. and Ghaisi K. 1993. Identification of *Phytophthora* disease of fig tree in Bushehr Province. Proceedings of the 7th Iran Plant Protection Congress, Karaj, Iran: 91
- Banihashemi Z. 1983. Detection and isolation of *Phytophthora* spp. in citrus soils and its distribution in citrus growing areas of southern Iran. Proceedings of the 7th Iran Plant Protection Congress, Karaj, Iran: 91.
- Banihashemi Z. 1989. Study of pistachio gummosis in southern provinces of Iran. Proceedings of the 9th Iran Plant Protection Congress, Mashad, Iran: 87.
- Banihashemi Z. 2004. A model to monitor population changes of *Phytophthora* species in root zone of *Pistacia* spp. under greenhouse condition. Proceedings of the 12th Iran Plant Protection Congress, Karaj, Iran: 225.
- Bezuidenhout C. M., Denman S., Kirk S. A., Botha W. J., Mostert L., and McLeod A. 2010. *Phytophthora* taxa associated with cultivated Agathosma, with emphasis on the *P. citricola* complex and *P. capensis* sp. nov. Persoonia 25: 32–49.
- Bhat R. G., Browne G. T. 2007. Genetic diversity in populations of *Phytophthora citricola* associated with horticultural crops in California. Plant Disease 91:1556–1563.
- Blair J. E., Coffey M. D., Park S. Y., Geiser D. M. and Kang S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology 45: 266–277.
- Brasier C. M. and Griffin M. J. 1979. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. Transactions of British Mycological Society 72: 111–143.
- Brasier C. M., Cooke D. E. L., Duncan J. M. and Hansen E. M. 2003. Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides*-*P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. Mycological Research 107: 277–290.
- Brasier C. M., Kirk S. A., Delcan J., Cooke D. E. L., Jung T. and Man In't Veld W. A., 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. Mycological Research 108: 1172–1184.
- Clapp J. P., van der Stoep, C. D. and van der Putten W. H., 2000. Rapid identification of cyst (*Heterodera* spp., *Globodera* spp.) and root knot (*Meloidogyne* spp.) nematodes on the basis of ITS2 sequence variation detected by PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) in cultures and field samples. Molecular Ecology 9: 1223–1232.
- Cooke D. E. L., Drebbel A., Duncan J. M., Wagels G., and Brasier C. M., 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Genetic and Biology 30: 17–32.
- Erwin D. C. and Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora: Diseases Worldwide*. APS Press. St. Paul. Minnesota. USA. 562 pp.
- Galleghy M. and Hong C. 2008. *Phytophthora*. Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 185 pp.
- Hajebrahimi S. 2008. Host range and production of survival units in vitro in *phytophthora parsiana*, the causal agent of Pistachio crown and root rot. MSc Thesis. Shiraz University, Shiraz, Iran. 87pp.
- Hajebrahimi S., and Banihashemi Z. 2011. Host range of *Phytophthora parsiana*: a new high temperature pathogen of woody plants. Phytopathology Mediterraneana 50: 159–165.
- Hansen E. M. and Maxwell D. P. 1991. Species of the *Phytophthora megasperma* complex. Mycologia 83: 376–381.

- Hong C. X., Gallegly M. E., Richardson P. A., Kong P., Moorman G. W., Lea-Cox J. D. and Ross D.S. 2010. *Phytophthora hydropathica*, a new pathogen identified from irrigation water, *Rhododendron catawbiense* and *Kalmia latifolia*. Plant Pathology 59: 913–921.
- Hong C.X., Gallegly M. E., Richardson P. A., Kong P., Moorman G. W., Lea-Cox J. D. and Ross D. S. 2008. *Phytophthora irrigata*, a new species isolated from irrigation reservoirs and rivers in eastern United States of America. FEMS Microbiology Letters 285: 203–11.
- Ioos R., Andrieux A., Marcais B. and Frey P. 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analysis. Fungal Genetics and Biology 43: 511–529.
- Jeffers S. N. and Martin S. B. 1968. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* spp. Plant Disease. 70: 1038–1043.
- Ko W. H. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. Annual Review of Phytopathology. 26(1): 57–73.
- Kong P., Hong C. X., Richardson P. A. and Gallegly M. E. 2003. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. Fungal Genetics and Biology 39: 238–49.
- Kong P., Hong C. X., Tooley P. W., Ivors K., Garbelotto M. and Richardson P. A. 2004. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. Letters in Applied Microbiology 38: 433–9.
- Kong P., Rubio L., Polek M. L. and Falk B. W. 2000. Population structure and genetic diversity within California citrus tristeza virus (CTV) isolates. Virus Gene 21: 139–145.
- Kroon L. P. N. M., Bakker F. T., van den Bosch G. B. M., Bonants P. J. M. and Flier W. G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Fungal Genetics and Biology 41: 766–782.
- MacDonald J. D., Bolkan L., Banihashemi Z. and Mircetich S. M. 1992. Trunk and branch canker of pistachio gummosis caused by *Phytophthora* spp. Plant Disease Annual Report Crop 167–170.
- Martin F. N., Blair J. E. and Coffey M. D. 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. Fungal Genetics and Biology 66: 19–32.
- Mirabolfathy M., Ershad D. and Hedjaroud, G. 1989. Isolation of *Phytophthora citrophthora* from root and crown of pistachio in Damghan. Iranian Journal of Plant Pathology 25: 73–80.
- Mirabolfathy M. 1988. Study of root and crown rot of pistachio trees. MSc thesis, University of Tehran, Karaj, Iran. 200pp.
- Mirabolfathy M. Cooke, D. E. L. Duncan, J. M., Williams N. A., Ershad, D. and Alizadeh, A. 2001. *Phytophthora pistaciae* sp. nov. and *P. melonis* the principal causes of pistachio gummosis in Iran. Mycological Research. 105:1166–1175.
- Mirabolfathy M., Ershad, D. and Hedjaroud, G. H. A. 1990. Study of pistachio gummosis in Rafsanjan area. Iranian Journal of Plant Pathology 26: 1–11.
- Mircetich S. M. and Matheron M. E. 1976. *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees. Phytopathology 66: 549–558.
- Mirsoleimani Z. and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. 2013. Characterization of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis, based on host range, morphology, and ribosomal genome. Phytopathologia Mediterranea 52(3): 501–516.
- Mirsoleimani Z., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R., Mohammadi, A. H., Djavaheri M. and Banihashemi Z. 2013. Reaction of pistachio cultivars to *Phytophthora pistaciae* and the influence of temperature on its pathogenicity. Iranian Journal of Plant Pathology 49(3): 279–296.
- Mitchell D. L. and Kannwischer-Mitchel E. 1992. *Phytophthora*. pp. 31–38 In: Soilborn Phytopathogenic Fungi. Singleton L., Mihali S. D. and Rush C. M (eds). APS Press. USA. 262 pp.
- Moricca S., Borja I., Vendramin G. G. and Raddi P. 2000. Differentiation of *Seiridium* species associated with virulent cankers on cypress in the Mediterranean region by PCR-SSCP. Plant Pathology 49: 774–781.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R., Banihashemi Z. and Cooke D. E. L. 2006. Phylogeny and taxonomy of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri*. Proceedings of the 17th Iran Plant Protection Congress, Karaj, Iran:

444.

- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R, Cook D. E. L and Banihashemi Z. 2008. *Phytophthora parsiana* sp. nov, a new high-temperature tolerant species. Mycology Research 112: 783–749.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R, Panabieres F, Banihashemi Z. and Cooke D. E. L. 2010. Phylogenetic relationship of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. and Laff and *P. drechsleri* Tucker. Fungal Biology 114: 325–339.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. 2011. Molecular phylogenetics of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri*: A Multiple Gene Genealogy Approach. Lambert Academic. Germany. 168 pp.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. 2012. Identification of *Phytophthora parsiana* the causal agent of pistachio gummosis by species specific oligonucleotides. proceeding of the 20th Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, Iran 400.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. and Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. USA 86: 2766–2770.
- Rafiee V. 2011. *Phytophthora parsiana*: Distribution in Fars and neighboring provinces, host range of woody plants and effect of temperature on disease severity. MSc thesis. Shiraz University. Shiraz. Iran. 123 pp.
- Rafiee V. and Banihashemi Z. 2013a. *Phytophthora parsiana* a new threat to almond tree and its host range expansion. Iranian Journal of Plant Pathology 49: 191–196.
- Rafiee V. and Banihashemi Z. 2013b. Formation of chlamydo spores in *Phytophthora parsiana* in vivo and vitro as survival propagules. Iranian Journal of Plant Pathology 49: 109–113.
- Sambrook J., Russell D. W., 2001. Molecular Cloning-A Laboratory Manual, third ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.
- Schmitthenner A. F. 1973. Isolation and identification methods for *Phytophthora* and *Pythium*. spp. Proceedings of the Woody Ornamental Diseases Workshop. University of Columbia. Columbia. 94–110
- Singleton L. L., Mihail J. D. and Rush C. M. 1992. Methods for Research on Soilborn Phytopathogenic Fungi. APS Press, USA. 265 p.
- Stamps D. J., Waterhouse G. M., Newhook F. T. and Hall G. S. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*. Mycological paper 62. CAB. International Mycological Institute.
- Tamura K. and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution. 10: 512–526.
- Tamura K. Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger data set. Molecular Biology and Evolution 33: 1870–1874.
- Tsao P. H. and Alizadeh A. 1988. Recent advances in the taxonomy and nomenclature of the so called “*Phytophthora palmivora* MF4” occurring on cocoa and other tropical crops. in 10th International Cocoa Research Conference. Santo Domingo. 441–445
- Waterhouse G. M. 1963. Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. International Mycological Institute. Kew, UK. 22 pp.
- Zhang Z. G., Zhang J. Y., Zheng X. B., Yang Y. W. and Ko W. H. 2004. Molecular distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* based on ITS sequences of ribosomal DNA. Journal of Phytopathology 152: 358–364.
- Yang X., Tyler B. M. and Hong C. 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. IMA Fungus. 8:355–384.