

شناسایی برخی گونه‌های *Mucorales* از استان‌های فارس و خوزستان

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲ / پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۹

اسماعیل راه‌خدایی: محقق مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، رضا مستوفی‌زاده قلم‌فرسا: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶، ایران (rmostofi@shirazu.ac.ir)

چکیده

طی سال ۱۳۹۵، ۲۷۷ نمونه از مناطقی از استان‌های فارس و خوزستان به طور تصادفی، از کمپوست برگ گیاهان در سطح خاک (خاک‌برگ)، کود دامی پوسیده، خاک بکر و خاک فراریشه گیاهان به آزمایشگاه منتقل شد. قارچ‌ها به دو روش کشت خاک در تشتک و رقیق‌سازی خاک، از نمونه‌ها جداسازی و پس از خالص‌سازی، جدایه‌های موکورالز براساس خصوصیات رشدی، ریخت‌شناختی و میکروسکوپی قارچ‌ها، شناسایی شدند. گونه‌های *Absidia cylindrospora*، *A. pseudocylindrospora* و *Cunninghamella echinulata* var. *indica*، برای میکوبیوتای ایران جدید بودند.

Identification of some species of *Mucorales* from Fars and Khuzestan provinces (Iran)

Received: 23.12.2017 / Accepted: 09.06.2018

Esmail Rahkhodaie: Researcher, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Reza Mostowfizadeh-Ghalamfarsa: Prof., Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, 07144165186, Iran (rmostofi@shirazu.ac.ir)

Summary

During 2016–17, 277 samples of leaf compost, manure, virgin and rhizosphere soil of some plants from Fars and Khuzestan provinces (Iran) were transferred to Mycology Laboratory of the Department of Plant Protection, Shiraz University (Iran). Fungi were recovered by soil plate and soil dilution methods. After purification, the isolates of *Mucorales* were identified based on growth, morphological and microscopic characteristics. *Absidia cylindrospora*, *A. pseudocylindrospora*, and *Cunninghamella echinulata* var. *indica* were new to Iran mycobiota.

به طور کلی در ایران، از راسته *Mucorales* از استان‌های مازندران، گیلان، چهارمحال و بختیاری و اصفهان گونه‌هایی از جنس‌های *Absidia* Van Tieghem، *Mucor* P. Micheli ex *Actinomucor* Schostak، *Lichtheimia* Vuill، *Cunninghamella* Matruchot، *Syncephalastrum* J. و *Rhizomucor* Lucet & Costantin Schrot از خاک، جداسازی و شناسایی شده است (Ershad 2009, Dehbovid et al. 2013, Ziaee, et al. 2016). هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی گونه‌های راسته *Mucorales* در استان‌های فارس و خوزستان، براساس خصوصیات رشدی، ریخت‌شناختی و میکروسکوپی قارچ‌های این راسته است.

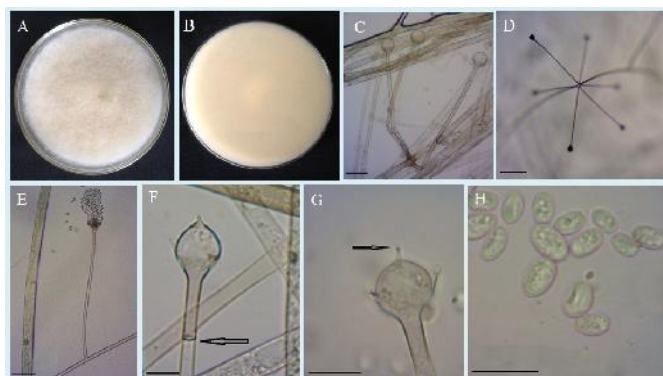
زیگومیست‌ها به مفهوم عام آن، در بر گیرنده دامنه متنوعی از گونه‌های قارچی با انواع رفتارهای مختلف هستند. بخش مهمی از این گروه، امروزه در زیرشاخه *Mucoromycotina* رده‌بندی می‌شوند (Hibbett et al. 2007). راسته *Mucorales* از معروف‌ترین راسته‌های این زیرشاخه از قارچ‌ها است. این راسته شامل قارچ‌هایی است که در همه جا یافت می‌شوند و به صورت پوده‌زی در خاک، مدفوع، انواع کمپوست و یا روی بسترهای متنوعی از میوه‌های رسیده، زندگی می‌کنند. بعضی از آن‌ها انگل سایر قارچ‌ها و گیاهان بوده و برخی بیمارگر فرصت‌طلب انسان و جانوران هستند (Thirion-Delalande et al. 2005).

Absidia cylindrospora Hagem – ۱

پرگنه، در ۲۵ تا ۲۶ درجه سلسیوس روی محیط کشت PDA به سرعت رشد کرده، در مدت یک هفته تشک پتری شش سانتی‌متری را پر کرد. رنگ پرگنه ابتدا سفید و پس از چهار روز به رنگ قهوه‌ای روشن در آمد و پس از دو هفته متمایل به خاکستری رنگ پریده شد. پرگنه بی‌بو بود. اسپورانژیوفورها شفاف تا قهوه‌ای براق، راست، با سطحی صاف، با حداکثر خروج هفت عدد (اغلب یک تا چهار عدد) اسپورانژیوفور از یک نقطه از استولون، به ابعاد بین ۱۳۰ تا ۲۵۰ میکرومتر و ۲/۵ تا ۴/۵ میکرومتر بودند. اسپورانژیوفورها عمدتاً ساده بوده و در بعضی مواقع منشعب می‌شدند. اسپورانژیوم‌ها، گلابی شکل، شفاف تا خاکستری با دیواره صاف با کلوملای نیمه‌کروی، شفاف تا قهوه‌ای روشن، به ابعاد ۲۱/۲-۱۲/۲ × ۱۵/۱-۱۲/۳ میکرومتر و اسپورانژیوسپورها، تقریباً استوانه‌ای، صاف و شفاف، به ابعاد ۴/۱-۷/۱ × ۲/۱-۴/۲ میکرومتر مشاهده شدند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های این گونه با توصیف هسلتین و ایلس (Hesseltine & Ellis 1964) مطابقت داشت (شکل ۱). جدایه‌ها از خاک‌برگ درختان افرا، چنار و خرمالو در استان فارس جداسازی شدند. این گونه انتشار جهانی داشته (Domsch *et al.* 2007) و برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شود.

طی سال ۱۳۹۵، از مناطقی از استان‌های فارس (شیراز، فراه‌سبند، جهرم، سروستان، مهارلو، بیضا و سپیدان) و خوزستان (اهواز، شادگان و آبادان) به طور تصادفی، از کمیوست برگ گیاهان در سطح خاک (خاک‌برگ)، کود دامی پوسیده، خاک بکر، خاک اطراف ریشه گیاهان، نمونه‌برداری و پس از ثبت مشخصات جغرافیایی، نمونه‌ها در کیسه‌های نایلونی به آزمایشگاه منتقل شدند. قارچ‌ها به دو روش کشت خاک در تشک (Soil Plate Method=SPM) (Warcup 1950) و رقیق‌سازی خاک (Soil Dilution Method=SDM) (Rapilly 1968) با اندکی تغییر، از نمونه‌ها جداسازی شدند.

پس از شناسایی و تفکیک جنس‌های *Mucorales* (Hesseltine 1955) برای شناسایی گونه‌های *Absidia*، قطعات کوچکی از پرگنه جدایه‌ها در وسط تشک‌های پتری به قطر شش سانتی‌متر حاوی PDA و برای شناسایی گونه‌های *Cunninghamella* قطعات کوچکی از پرگنه جدایه در وسط تشک پتری حاوی محیط کشت آرد-یولاف-آگار (Oat Meal Agar=OMA) کشت گردیدند. تشک‌های پتری در ۲۵ تا ۲۶ درجه سلسیوس به مدت یک هفته در تاریکی نگهداری و سپس براساس صفات ریخت‌شناختی با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود، گونه‌های *Absidia* (Hesseltine & Ellis 1961, 1964) و *Cunninghamella* (Ho *et al.* 2004) (Baijal & Meheotba 1980) شناسایی شدند.

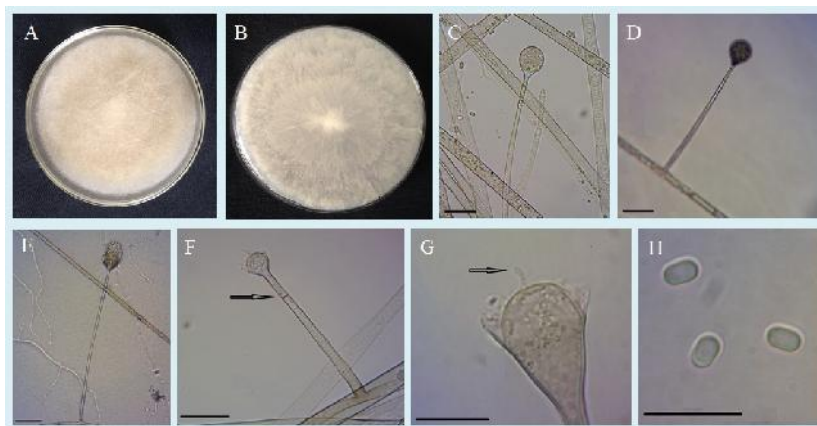


شکل ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناختی *Absidia cylindrospora*: A-B. کشت یک هفته‌ای جدایه 16E در ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط کشت PDA (A) سطح رویی و (B) سطح زیرین محیط کشت، C-D. اسپورانژیوفور چندتایی، E. اسپورانژیوفور تکی، F. کلوملا و آپوفیز (پیکان = دیواره عرضی زیر آپوفیز)، G. برجستگی نوک کلوملا (پیکان)، H. اسپورانژیوسپور (مقیاس: C، E = ۳۰ میکرومتر؛ D، F، G، H = ۵۰ میکرومتر).

Fig. 1. Morphological characteristics of *Absidia cylindrospora*: A-B. A 7-day old culture of isolate 16E at 25 °C on PDA (A, front and B, back view of the Petri dish), C-D. Scanty whorls sporangiophores, E. Single sporangiophore, F. Columella and apophysis, (arrow = septum under apophysis), G. Finger-like projection of columella (arrow), H. Sporangiospores (Bar = 30 μm for C, E; Bar = 50 μm for D; Bar = 10 μm for F, G, H).

صاف، شفاف و به ابعاد $2/8-2/2 \times 3/6-4/2$ میکرومتر بودند. جدایه‌های این گونه روی محیط کشت، زیگوسپوری تولید نکردند و ویژگی‌های جدایه‌های آن مطابق با توصیف هسلتین و الیس (Hesseltine & Ellis 1961) بود (شکل ۲). از مهم‌ترین تفاوت‌های دو گونه ذکر شده، هاگ‌ها کاملاً سیلندری شکل و صاف در گونه مذکور نسبت به شکل نامنظم و تقریباً بیضی شکل در گونه *A. cylindrospora* می‌باشد. جدایه‌های گونه *A. pseudocylindrospora* از خاک‌برگ درختان چنار و زبان گنجشک در استان فارس، جداسازی و برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شود.

۲- *Absidia pseudocylindrospora* Hesselt. & J.J. Ellis
پرگنه در ۲۵ تا ۲۶ درجه سلسیوس در محیط کشت PDA رشد سریعی داشت و در مدت یک هفته تشک پتری شش سانتی‌متری را پر کرد. رنگ پرگنه در ابتدا سفید و سپس بعد از دو هفته به خاکستری کم‌رنگ تغییر رنگ داد. عرض اسپورانژیوفور به ابعاد $5/8$ تا $3/6$ میکرومتر بوده و از یک نقطه از استولون تعداد یک تا هفت عدد اسپورانژیوفور خارج می‌شود. اسپورانژیوم گلابی شکل، خاکستری تیره، به قطر $15/5$ تا $35/5$ میکرومتر بوده و در زیر آپوفیز دیواره عرضی مشاهده شد. کلوملا، نیمه‌کروی و به قطر $7/6$ تا $16/5$ میکرومتر بود. اسپورانژیوسپورها عمدتاً استوانه‌ای شکل و



شکل ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناختی *Absidia pseudocylindrospora*: A-B. کشت یک هفته‌ای جدایه 356B در ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط کشت PDA (A) سطح رویی و (B) سطح زیرین محیط کشت، C-E. اسپورانژیوفور و اسپورانژیوم، F. کلوملا و آپوفیز (پیکان = دیواره عرضی زیر آپوفیز)، G. برجستگی نوک کلوملا (پیکان)، H. اسپورانژیوسپور (مقیاس: C، F = ۲۰ میکرومتر؛ D، E = ۳۰ میکرومتر؛ G، H = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2. Morphological characteristics of *Absidia pseudocylindrospora*: A-B. 7-day old culture of isolate 356B at 25 °C on PDA (A, front and B, back view of the Petri dish), C-E. Sporangiophore and Sporangium, F. Columella and apophysis (arrow = septum under apophysis), G. Finger-like projection of columella (arrow), H. Sporangiospores (Bar = 20 μm for C, F; Bar = 30 μm for D, E; Bar = 10 μm for G, H).

نیمه‌کروی به قطر $11/5$ تا $17/7$ میکرومتر، قهوه‌ای براق تا مات و کاملاً خاردار بودند. اسپورانژیول‌ها روی پایک‌های (استریگماهای) کوتاه یا بلند، تشکیل می‌شدند (شکل ۳). صفات دیده شده از جدایه‌های این گونه، مشابه توصیف بایجال و مهبوتبا (Baijal & Meheotba 1980) بوده و برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شود. این گونه از خاک اطراف ریشه گیاهان بارهنگ، یونجه، خارشتر، فرقیون و نوعی علف هرز از استان فارس جداسازی و شناسایی شد.

***Cunninghamella echinulata* var. *indica* Baijal & B.S. Mehrotra** -
پرگنه در ۲۵ تا ۲۶ درجه سلسیوس روی محیط کشت OMA رشد سریعی داشته و در مدت یک هفته تشک پتری شش سانتی‌متری را پر کرد. رنگ پرگنه در ابتدا سفید و سپس زرد کم‌رنگ شد. ریزوئید توسعه یافته و اسپورانژیوفورها منشعب، اغلب با انشعابات مساوی، به عرض $4/9$ تا $8/5$ میکرومتر بودند. وزیکول‌های اولیه، تخم‌مرغی تا چماقی پهن و گاهی کروی، به ابعاد $11-49 \times 13/5-70$ میکرومتر و وزیکول‌های ثانویه، اغلب چماقی پهن و به ابعاد $17-35 \times 31-60$ میکرومتر و تمام یا قسمتی از آن‌ها بارور بودند. اسپورانژیول‌ها، اغلب کروی تا



شکل ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناختی *Cunninghamella echinulata* var. *indica*: A. کشت یک هفته‌ای جدایه 40C در ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط کشت OMA (سطح رویی محیط کشت)، B-C. اسپوروفور و اسپورانژیول (کنیدیوم)، D-E. وزیکول اولیه، F. پایک روی وزیکول (پیکان)، G. اسپورانژیول، H. ریزویید (پیکان) (مقیاس: B = ۵۰ میکرومتر؛ C، D = ۲۰ میکرومتر؛ E، F، G = ۱۰ میکرومتر؛ H = ۴۰ میکرومتر).

Fig. 3. Morphological characteristics of *Cunninghamella echinulata* var. *indica*: A. 7-day old culture of isolate 40C at 25 °C on OMA (A, front view of the Petri dish), B-C. Sporophore and sporangiole (conidium), D-E. Primary vesicle, F. Sterigma on a vesicle (arrow), G. Sporangiol, H. Rhizoid (arrow) (Bar = 50 μm for B; Bar = 20 μm for C, D; Bar = 10 μm for E, F, G; Bar = 40 μm for H).

References

- Baijal, U. & Meheotba, B.S. 1980. The genus *Cunninghamella* - a reassessment. *Sydowia* 33: 1-13.
- Dehbovid, Z., Tajick, M.A., Rahimian, H. & Arzanlou, M. 2013. Some new species of *Mucorales* for mycoflora of Iran. *Rostaniha* 14(2): 108-123.
- Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H. 2007. *Compendium of Soil Fungi*. IHW-Verlang, Eching, Germany. 672 pp.
- Ershad, D. 2009. *Fungi of Iran* (3rd. ed.). Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran. 531 pp.
- Hibbett, S.A. et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
- Hesseltine, C.W. 1955. Genera of *Mucorales* with notes on their synonymy. *Mycologia* 47(3): 344-363.
- Hesseltine C.W. & Ellis J.J. 1961. Notes on *Mucorales*, especially on *Absidia*. *Mycologia* 53: 406-426.
- Hesseltine, C.W. & Ellis, J.J. 1964. The genus *Absidia*: *Gongronella* and cylindrical-spored species of *Absidia*. *Mycologia* 56: 568-601.
- Ho, H., Chuang, S. & Chen, S. 2004. Notes on *Zygomycetes* of Taiwan (IV): Three *Absidia* species (*Mucoraceae*). *Fungal Science* 19(3-4): 125-131.
- Rapilly, F. 1968. *Les techniques de mycologie en pathologie vegetale*. INRA, Paris, France. 102 pp.
- Thirion-Delalande, C., Guillot, J., Jensen, H.E., Crespeau, F.L. & Bernex, F. 2005. Disseminated acute contaminant Aspergillosis and mucormycosis in a pony. *Transboundary and Emerging Diseases* 52: 121-124.
- Warcup, J.H. 1950. The soil plate method for isolation of fungi from soil. *Nature* 166: 117-118.
- Ziaee, A., Zia, M., Bayat, M. & Hashemi, J. 2016. Identification of *Mucorales* isolates from soil using morphological and molecular methods. *Current Medical Mycology* 2(1): 13-19.