Archive of SID

رستنیها ۲۰(۱): ۷۹–۷۶ (۱۳۹۸) - گزارش کوتاه Rostaniha 20(1): 76–79 (2019) – Short Report

DOI: 10.22092/botany.2019.125181.1142

نخستین گزارش گونه *Preussia africana* برای فلور قارچ‌های ایران*

دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۴ / پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۳

ساره حاتم‌زاده: دانشجوی دکتری قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ۴۹۱۸۹-۴۳۴۶۴، ایران

کامران رهنما✉: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ۴۹۱۸۹-۴۳۴۶۴، ایران (kamranrahnama1995@gmail.com)

خلیل‌بِردی فتوحی‌فر: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ۳۱۵۸۷-۷۷۸۷۱، ایران

سعید نصرالله‌نژاد: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ۴۹۱۸۹-۴۳۴۶۴، ایران

خدایار همتی: دانشیار گروه باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ۴۹۱۸۹-۴۳۴۶۴، ایران

جیمز وایت: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه بیولوژی و بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه راتگرز، نیوبرونزویک نیوجرسی، ۰۸۹۰۱-۸۵۲۰، آمریکا

به منظور شناسایی قارچ‌های اندوفیت برخی از گیاهان دارویی تیره کاسنیان (*Asteraceae*)، نمونه‌برداری از گیاهان کاملا سالم بومادران (*Achillea filipendulina* Lam.) از تمام مناطق بومی این گیاهان در استان گلستان و در فصل بهار سال ۱۳۹۵ انجام گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه زیر جریان آب شیر شسته شدند و برای ضدعفونی سطحی ابتدا در اتانول ۷۵٪ به مدت ۱ دقیقه و در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ تا ۲/۵ درصد (بسته به ضخامت بافت) به مدت ۳ تا ۵ دقیقه و سپس اتانول ۷۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند. نمونه‌ها پس از ضدعفونی، روی کاغذ صافی در شرایط سترون برای خشک شدن قرار داده شدند. سپس قطعات ضدعفونی شده درون تشتک‌های پتری محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (Potato Dextrose Agar, PDA) حاوی تتراسایکلین (۵۰ ppm) برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها قرار داده شدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. پس از ظاهر شدن قارچها روی قطعات گیاهی، به روش نوک ریسه، قارچ‌های رشد یافته از قطعات برگ جداسازی و در محیط کشت جدید خالص‌سازی شدند. پس از خالص‌سازی قارچ‌های اندوفیت، هر تیمار روی PDA و (Oat Meal Agar) OMA کشت و در معرض چرخه‌های متناوب ۱۲ ساعت نور UV و نور روز به مدت ۱۴ روز برای تحریک هاگ‌زایی قرار داده شدند.

واژه‌های کلیدی: اسپورومیاسه، استان گلستان، بومادران سرخسی، پلئوسپورالز، تیره کاسنیان

مشخصات ریخت‌شناسی با استفاده از منابع معتبر (Ahmed & Cain 1972, Arenal *et al.* 2005, Asgari & Zare 2010, Kornerup & Wanscher 1989) بررسی گردید. براساس خصوصیات ریخت‌شناختی، جدایه مورد نظر گونه *Preussia africana* Arenal, Platas & Peláez (*Sporomiaceae*, *Pleosporales*) شناسایی شد که توصیف آن به شرح ذیل می‌باشد:

پرگنه قارچ قهوه‌ای تیره تا سیاه و دارای بافت متراکم پنبه‌ای بود. قطر پرگنه روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز-آگار پس از ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به ۷۰ میلی‌متر رسید. آسکوکارپ‌ها به قطر ۲۸۸–۲۰۵ میکرومتر، پراکنده تا مجتمع، اغلب فرورفته در بافت محیط کشت، گلابی شکل، صاف، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره، دارای گردن باریک به ابعاد ۴۰–۲۲ × ۶۰–۵۲ میکرومتر، استوانه‌ای و پوشیده شده با ریسه‌هایی به ابعاد ۴–۲ × ۲۰–۱۲ میکرومتر بودند. پریدیوم به رنگ قهوه‌ای تیره و دارای بافت سودوپارانشیمی و دارای ضخامت ۱۵–۱۰ میکرومتر بود. آسک‌ها به ابعاد ۱۷–۱۶ × ۱۱۰–۹۰ میکرومتر، دارای هشت آسکوسپور، بی‌رنگ و استوانه‌ای و دارای پایه به ابعاد ۱۳–۴ میکرومتر بودند. سودوپارافیزها به ابعاد ۲–۱ میکرومتر، نخی شکل و دیواره‌دار بودند. آسکوسپورها به ابعاد ۴–۳ × ۴۲–۳۷ میکرومتر، استوانه‌ای و بی‌رنگ تا قهوه‌ای تیره، چهارسلولی، یاخته‌های میانی آسکوسپورها عریض‌تر از یاخته‌های انتهایی، شیار تندشی صاف تا مقداری موجی شکل و مورب، در غلاف ژلاتینی، بی‌رنگ و باریک بود (شکل ۱).

* مستخرج از رساله دکتری نگارنده نخست به راهنمایی دکتر کامران رهنما ارایه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

www.SID.ir

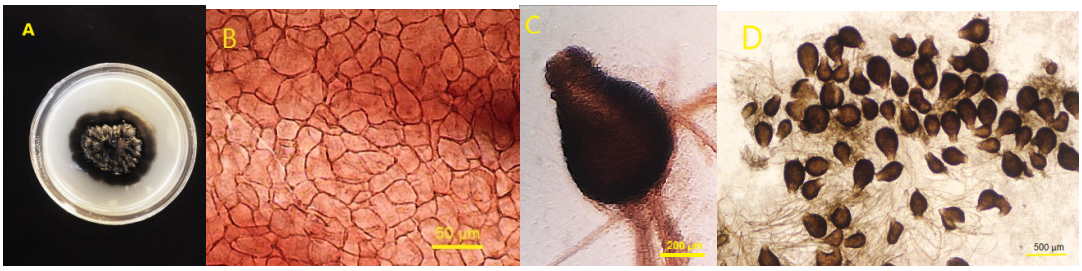
Archive of SID

به منظور تایید شناسایی این قارچ براساس داده‌های مولکولی، ابتدا استخراج DNA جدایه مورد بررسی به روش CTAB انجام شد و سپس تکثیر منطقه ITS1-5.8S-ITS2 همراه با ژن 28S rRNA و یک قطعه از ژن EF-1α، به ترتیب با استفاده از ترکیب‌های پرایمری LROR/LR5، EF1-983F/Efgr و ITS4/ITS5 انجام شد. محصول PCR به دست آمده برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شد. توالی ژنوم به دست آمده از طریق جستجوی بلاست در بانک ژن (GenBank) مورد بررسی قرار گرفت و همولوژی آن با سایر توالی موجود در این بانک تعیین و مراحل ثبت ژن در پایگاه مذکور انجام پذیرفت (شماره دسترسی توالی‌ها: ITS = MH250006, EF-1α = MK952151, LSU = MH255557).

جدایه مورد بررسی در کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران (Iranian Fungal Culture Collection) تحت شماره IRAN 3262C نگهداری می‌شود.

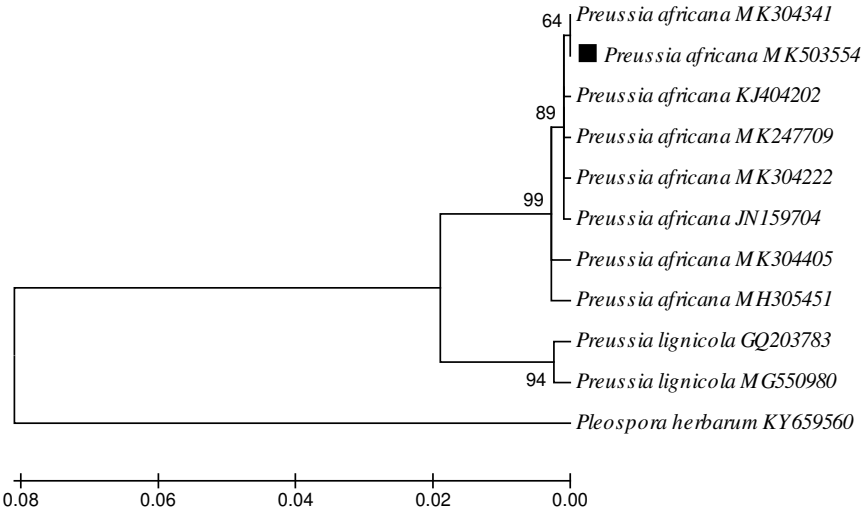
گونه *Preussia africana* برای نخستین بار از روی برگ گیاه *Vibrunum tinus* subsp. *rigidum* از جزایر قناری جداسازی و گزارش شده (Arenal *et al*. 2005) و در این بررسی برای نخستین بار از ایران معرفی می‌شود.

نمونه بررسی شده: استان گلستان، منطقه چهارباغ، روی *A. filipendulina*، ۱۳۹۵/۲/۲۵، ساره حاتم‌زاده (IRAN 3262C).



شکل ۱– *Preussia africana*: A. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA پس از ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مداوم، B. سطح بیرونی پریدیوم، C. آسکوکارپ به همراه زواید، D. مجموع آسکوکارپ‌ها.

Fig. 1. *Preussia Africana*: A. Colony on PDA after 14 days in continuous dark condition, B. Outer surface view of peridium, C. Ascomata, D. Ascocarpes.



شکل ۲– شجره فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنومی ITS1-5.8S-ITS2 با نرم‌افزار MEGA 5، علامت مربع توپر نشان‌دهنده جدایه به دست آمده از این تحقیق می‌باشد. جدایه‌ای از *Pleospora herbarum* به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Fig. 2. Phylogenetic tree inferred by ML method in MEGA 5.0 using nucleotide sequences of ITS1-5.8S-ITS2 region. Solid circle indicates the obtained isolate in the present study. *Pleospora herbarum* was used as an outgroup.

www.SID.ir

Archive of SID

First report of *Preussia africana* for Iranian mycoflora

Received: 13.02.2019 / Accepted: 03.06.2019

Sareh Hatamzadeh: PhD Student in Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan 49189-43464, Iran

Kamran Rahnama✉: Associate Prof. in Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan 49189-43464, Iran (kamranrahnama1995@gmail.com)

Khalil-Berdi Fotouhifar: Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran

Saeed Nasrollahnejad: Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan 49189-43464, Iran

Khodayar Hemmati: Associate Prof., Department of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan 49189-43464, Iran

James White: Prof. in Plant Pathology, Department of Plant Biology & pathology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey 08901-8520, USA

Summary

In order to identify the endophytic fungi of some plants of the family *Asteraceae*, samples of *Achillea filipendulina* Lam. were collected from Golestan province (Iran) in spring 2016. The plants were rinsed gently with running water, and then were cut into 0.5–1 cm pieces. The surface sterilization was done by sodium hypochlorite (1.5–2.5% NaOCl), followed by 75% ethanol. The surface sterilized samples were placed on Potato-Dextrose-Agar (PDA, Merck, Germany) containing 50 ppm tetracycline, and incubated at 25±2 ºC for 30 days. After purification, endophytic fungi was cultured on PDA and OMA (Oat Meal Agar) and exposed to 12 hr cycles of UV light and daylight for 14 days to stimulate sporulation. Their identification was based on morphological studies (Ahmed & Cain 1972, Arenal *et al*. 2005, Asgari & Zare 2010, Kornerup & Wanscher 1989). The method for measuring asci and ascospores and the terminology used for the descriptions are those used by Ahmed & Cain (1972). Based on morphological characteristics, *Preussia africana* Arenal, Platas & Peláez (*Sporomiaceae*, *Pleosporales*) was identified. A description of the fungus is given bellow:

Colony reaching 70 mm diam. on PDA in 14 days at 25 °C, dark brown to black. Ascomata 205–288 µm diam., scattered, immersed, pear-shaped, smooth-walled, light brown to dark brown with a narrow, cylindrical neck, 52–60 × 20–40 µm, covered with ornamental hyphae measuring 12–20 × 2–4 µm. Peridium brown, pseudoparenchymatous in surface view, and 10–15 µm thick. Asci 90–110 × 16–17 µm, eight-spored, hyaline, cylindrical, gradually to abruptly tapering into a short stipe up to 4 × 13 µm. Pseudoparaphyses 1–2 µm diam., filiform, septate. Ascospores 42–43 × 3–4 µm, cylindrical, four-celled, middle cells of equal length and broader than terminal cells, germ slit parallel to slightly sinuous; gelatinous sheath hyaline and narrow (Fig. 1).

In order to confirm the identification of this fungus based on molecular data, DNA extraction of examined isolate was performed by CTAB method, molecular analysis based on the ITS1-5.8S-ITS2 region, 28S rRNA gene and a fragment of the translation elongation factor 1α gene amplified using primers ITS4/ITS5, LROR/LR5 and EF1-983F/Efgr. BLAST searches were conducted in GenBank. All sequences generated in this study are deposited in GenBank (Accession numbers: LSU = MH255557, ITS = MH250006, EF-1α = MK952151). Living culture of this fungus is deposited at the Iranian Fungal Culture Collection (IRAN 3262C) of the "IRAN" herbarium.

Preussia africana was reported for the first time from Canary Islands and Spain on leaves of *Viburnum tinus* subsp. *rigidum* (Arenal *et al.* 2005) and in this study, it is reported for the first time from Iran.

Specimen examined: Iran: Golestan province, Chaharbagh, Isolated from *A. filipendulina*, 14.5.2016, coll. Sareh Hatamzadeh (IRAN 3262C).

Keywords: *Achillea filipendulina*, *Asteraceae*, Golestan province, *Pleosporales* , *Sporomiaceae*

www.SID.ir

Archive of SID

References

Ahmed, S.I. & Cain, R.F. 1972. Revision of the genera *Sporormia* and *Sporormiella*. Canadian Journal of Botany 50: 419–477.

Arenal, F., Platas, G. & Peláez, F. 2005. *Preussia africana* and *Preussia isabellae*, two new *Preussia* species based on morphological and molecular evidence. Fungal Diversity 20: 1–15.

Asgari, B. & Zare, R. 2010. Two new species of *Preussia* from Iran. Nova Hedwigia 90(3–4): 533–548.

Cain, R.F. 1961. Studies of coprophilous ascomycetes. VII. *Preussia*. Canadian Journal of Botany 39: 1633–1666.

Collado, J., Platas, G. & Peláez, F. 1996. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. Nova Hedwigia 63: 347–360.

Ellis, M.B. 1997. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane Kew, Surrey, England. 608 pp.

Guarro, J., Abdullah, S.K., Gené, J. & Al-Saadoon, A.H. 1997. A new species of *Preussia* from submerged plant debris. Mycological Research 101: 305–308.

Kornerup, A. & Wanscher, J.H. 1989. Methuen Handbook of Colour. Methuen, UK. Mycology and Phytopathology 34: 11–13.

www.SID.ir