ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی دو گونه *Phoma* جدا شده از علف‌های هرز *Taraxacum officinale* و *Chenopodium murale*

Molecular and Morphological Chracterestics of Two *Phoma* Species Iolated from *Taraxacum officinale* and *Chenopodium murale*

پریسا رزاقی[۱]، دوستمراد ظفری[۲*] و محمود بهادر[۳]

چکیده

به‌منظور شناسایی قارچ‌های مرتبط با علف‌های هرز در استان همدان طی فصل‌های بهار و تابستان ۱۳۸۸ از مناطق مختلف استان نمونه‌برداری شد. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، پنج جدایه قارچ مربوط به گل قاصد وحشی (*Taraxacum officinale*) و سه جدایه مربوط به غازپا (*Chenopodium murale*) بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی و توالی‌یابی نواحی ITS از ژن rDNA به‌ترتیب به‌عنوان *Phoma herbicola* و *Phoma medicaginis* var. *medicaginis* شناسایی شدند. این گونه‌های قارچی برای اولین بار از روی این میزبان‌ها در دنیا گزارش می‌شوند

واژه‌های کلیدی: توالی نواحی ITS، علف‌های هرز، همدان

۱ و ۲. به‌ترتیب فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳. کارشناس، شرکت سینا ریز تِک، همدان
*: نویسنده مسوول

مقدمه

قارچ‌های سلومیست (*Coelomycetes*) از نظر جغرافیایی دارای پراکندگی وسیعی هستند، به‌طوری‌که در نیچ‌های اکولوژیکی متنوعی یافت می‌شوند (Grove, 1935). تعداد قابل توجهی از آن‌ها به‌صورت ساپروفیت یا حتی بیمارگر ثانویه در ارتباط با مواد گیاهی مختلف هستند (Sutton, 1980) *Phoma* sacc. یکی از متنوع‌ترین جنس‌های سلومیستی از نظر تنوع اکولوژیکی است که اغلب به‌صورت عوامل لکه برگی یا لکه روی ساقه گیاهان مختلف دیده می‌شود (Zhang *et al*. 2009). تاکنون گونه‌های مختلفی از این جنس از روی علف‌های هرز مختلف در دنیا گزارش شده است. *P. herbarum* از روی ترشک (*Rumex obtusifolius*) از آمریکا (Greene, 1964) و کاسنی (*Cichorium intybus*) از ارمنستان (Simonyan, 1981)؛ *P. sorghina* از روی چسبک (*Setaria viridis*) از استرالیا (Lenne, 1990)؛ *P. proboscis* از روی پیچک صحرائی (*Convolvulus arvensis*) از آمریکا (Ormeno *et al*. 1988)؛ *P. exigua* از روی گل گندم خاردار (*Centaurea solstitialis*) از روسیه (Widmer, 2002) و از روی تلخه (*Acroptilon repense*) از ترکیه (Tunali *et al*. 2003) گزارش شده‌اند. استان همدان به دلیل شرایط آب و هوائی مناسب دارای فلور گیاهی نسبتاً غنی از خانواده‌های متنوع گیاهی به‌ویژه علف‌های هرز می‌باشد. با توجه به این‌که تاکنون مطالعه قابل توجهی روی قارچ‌های علف‌های هرز در این استان صورت نگرفته و بنا بر اهمیت قارچ‌های سلومیستی روی این گیاهان، پژوهش حاضر به منظور بررسی و شناسایی گونه‌های مختلف *Phoma* روی علف‌های هرز استان صورت گرفت.

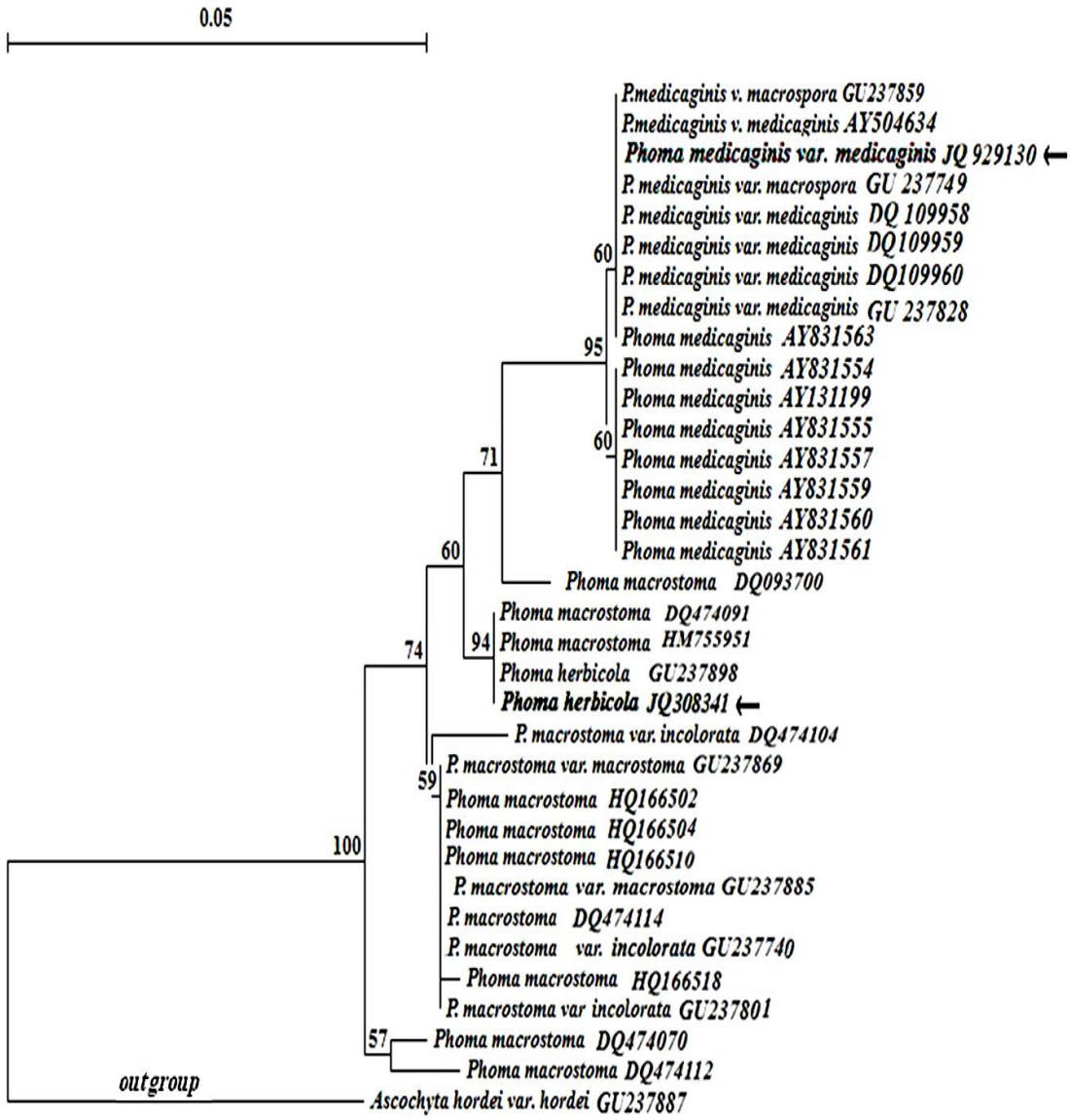
روش بررسی

در بهار و تابستان ۱۳۸۸ از مناطق مختلف استان همدان شامل کوریجان، باغ جنت آباد، سراب گیان، گردنه اسد آباد، الفاوت و رزن بازدید به‌عمل آمد و از علف‌های هرز به ویژه گل قاصد وحشی و غازپا که دارای علائمی از آلودگی قارچی بودند نمونه‌هایی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها پس از ضدعفونی سطحی به‌وسیله محلول هیپوکلریدسدیم ۰/۵-۱ درصد، روی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) کشت گردیدند. جهت خالص سازی پرگنه‌های رشد کرده از روش تک اسپور یا نوک ریسه استفاده شد. صفات پرگنه و اندام‌های غیر جنسی آن‌ها روی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار و سیب زمینی-هویج-آگار (PCA) مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت و اطلاعات جمع‌آوری شده با کمک کلید تشخیص این جنس (Boerema *et al*, 2004) مقایسه و گونه‌های قارچی شناسایی شدند. برای بررسی مولکولی و تعیین توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن کد کننده پروتئین ریبوزومی 5.8S، استخراج DNA ژنومی به روش اصلاح شده ماری و تامپسون صورت گرفت. قطعات DNA با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر گردیدند. به‌منظور تعیین توالی DNAی نمونه‌ها در این بررسی از نرم افزار TreeCon و روش Neighbour-Joining برای تجزیه و تحلیل نتایج استفاده گردید. به‌کمک جستجوی بلاست (Blast Search) و با توجه به مقالات متعدد در زمینه تاکسونومی قارچ‌های سلومیست، Outgroup مناسب انتخاب گردید. بعد از هم‌ردیف کردن توالی‌های به‌دست آمده با کمک نرم‌افزار GeneDoc برای رسم درخت، از نسخه ۱/۲ نرم‌افزار TreeCon استفاده شد و درخت مورد نظر با روش NJ و مدل دو پارامتری کیمورا با هزار Bootstrap ترسیم شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی پنج جدایه قارچ از روی گل قاصد وحشی (*T. officinale*) به‌عنوان گونه *Phoma herbicola* و سه جدایه قارچ از روی غازپا (*C. murale*) بر اساس کلید شناسای بورما و همکاران به‌عنوان *Phoma medicaginis* var. *medicaginis* تشخیص داده شدند. به‌منظور بررسی صحت شناسایی‌های انجام شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، توالی نواحی ITS (ITS1، ITS2 و ژن کد کننده پروتئین ریبوزومی 5.8S) از DNA ریبوزومی در.جدایه TA1282 از بین جدایه‌های مربوط به *T. officinale* و جدایه CH838 از بین جدایه‌های مربوط به *C. mural* تعیین شد. در درخت به‌دست آمده از مقایسه توالی نواحی ITS گونه‌های *Phoma* در این پژوهش با سایر گونه‌های نزدیک در این جنس (شکل۱)، جدایه TA1282 (*Phoma herbicola* JQ308341) با جدایه GU237898 *Phoma herbicola* و دو جدایه DQ474091 *P. macrostoma*، *P. macrostoma* HM755951 در کنار هم قرار می‌گیرند. از بین جدایه‌های مختلف این گونه، تنها جدایه با شماره دسترسی DQ474091 از کانادا و هم‌چنین جدایه‌ای که برای اولین بار روی ازمک (*Lepidium draba*) از آمریکا گزارش شده با شماره دسترسی HM755951 با توالی جدایه TA1282، در یک گروه فرعی نسبت به سایر جدایه‌ها قرار می‌گیرند. اما نواحی مختلف ژنوم *Phoma herbicola* در دنیا

بسیار کم بررسی شده است، به‌طوری‌که تنها یک توالی از نواحی ITS آن در بانک ژن وجود دارد (Aveskamp *et al*, 2010). بنابراین توالی نواحی ITS جدایه TA1282 به دو گونه *P. herbicola* و *P. macrostoma* بسیار شبیه است، اما از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، *P. macrostoma* نمی‌تواند شناسایی شود. هم‌چنین جدایه CH838 به‌دست آمده در این پژوهش (*P. medicaginis* var. *medicaginis* JQ929130) در کنار سایر جدایه‌های *P. medicaginis* موجود در بانک ژن یک کلاد را تشکیل داده‌اند که به‌خوبی از بقیه گونه‌های *Phoma* جدا می‌شوند. بنابراین براساس توالی نواحی ITS، جدایه CH838 به‌عنوان *Phoma medicaginis* var. *medicaginis* تشخیص داده می‌شود. شرح ریخت‌شناسی این دو گونه در ذیل آمده است:

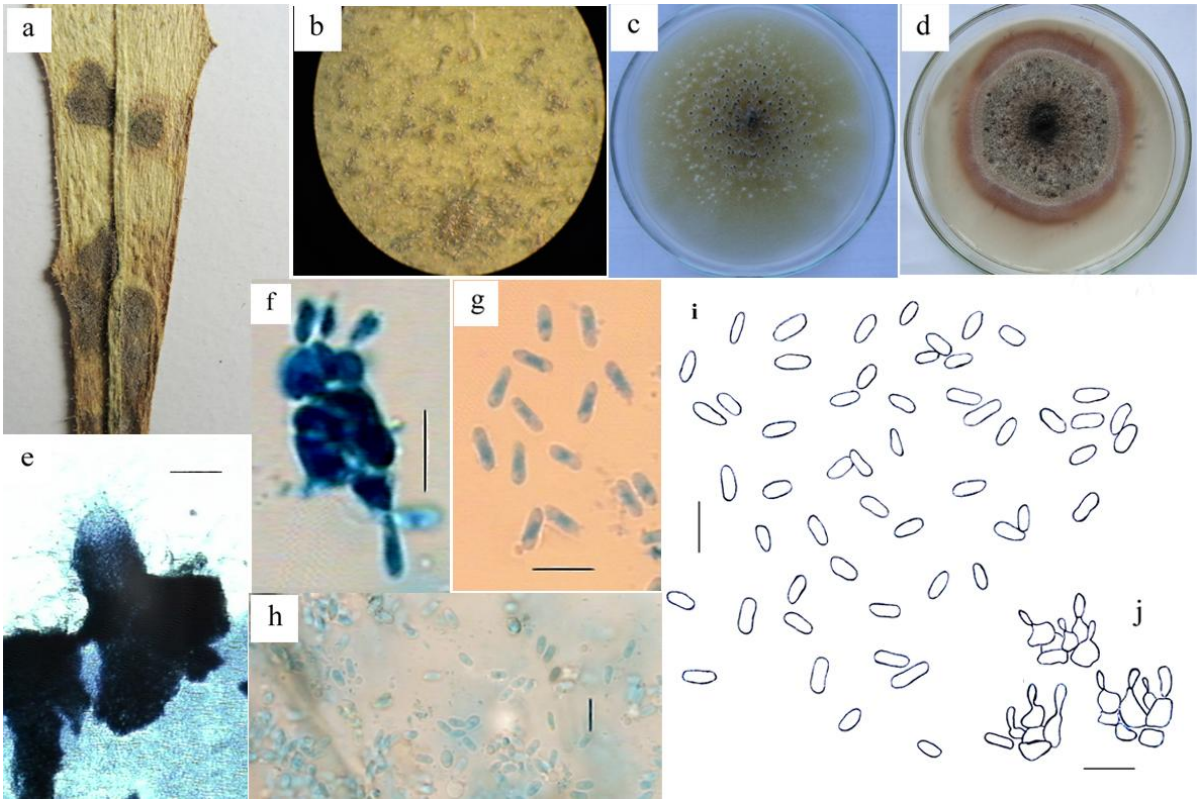


شکل۱: کلادوگرام به دست آمده از مقایسه توالی ITS جدایه‌های *Phoma* به‌دست آمده در این پژوهش با برخی جدایه‌های *Phoma* موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار TreeCon به روش neighbor joining با هزار Bootstrap.

Fig. 1: Cladogram constructed from ITS1-5.8S-ITS2 nucleotid sequence data of *Phoma* isolates from this research with some *Phoma* isolates obtained from GenBank using the neighbourjoining method with 1000 bootstrap.

***Phoma herbicola* Wehmeyer**

علائم جدایه‌های متعلق به این گونه روی برگ‌ها لکه های کم و بیش گرد تا نامنظم و به رنگ خاکستری بودند که پیکنیدیوم‌های نیمه فرو رفته به رنگ خاکستری تا قهوه‌ای نیز در آن‌ها دیده می‌شد. رنگ پرگنه روی محیط PDA در ابتدا زرد کم رنگ و به تدریج پر رنگ‌تر گردید. سطح زیرین پرگنه نیز به همین رنگ بود. سپس پیکنیدیوم‌های خاکستری تا سیاه رنگ به صورت تکی یا مجتمع در سطح یا درون آگار به‌وجود آمدند که تولید آن‌ها از مرکز پرگنه به سمت حاشیه بود. توده کنیدیومی در PDA به رنگ زرد تا نارنجی روشن مایل به قهوه‌ای دیده شد. پرگنه در محیط PCA سفید مایل به صورتی و دارای حاشیه صاف و تیره‌تر بود. مرکز پرگنه به سرعت با تشکیل پیکنیدیوم‌های خاکستری رنگ فراوان تیره شده و رنگ سطح زیرین پرگنه به طور غیر یکنواخت در مرکز و حاشیه‌ها قهوه‌ای مایل به قرمز بود. میزان رشد پرگنه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز به ۵۰-۴۵ میلی‌متر رسید. پیکنیدیوم‌ها کروی شکل تا نامنظم دارای یک تا دو استیول و با قطر ۳۵۰-۱۰۰ میکرومتر بودند و دارای سلول‌های کنیدیوم‌زا به‌صورت مجتمع، آمپولی شکل و به اندازه ۶-۲/۵ × ۷-۳/۵ میکرومتر بودند. خصوصیات اصلی که باعث تمایز *Phoma herbicola* از بقیه گونه‌های *Phoma* می‌شود، وجود گردن کشیده در پیکنیدیوم به اندازه (۱۰۰) ۶۵-۵۰ × ۳۰۰-۱۰۰ میکرومتر و کنیدیوم‌های استوانه‌ای تا نیمه استوانه‌ای، تک حجره‌ای به اندازه ۳-۱/۵×(۷/۵-) ۶-۴ میکرومتر در محیط کشت است (شکل۲). این ویژگی‌ها با توصیف ارائه شده توسط *گرویتر و همکاران* (Gruyter *et al.* 1998) مطابقت داشت. آن‌ها بیان کردند که این گونه فاقد ذرات چربی در کنیدیوم است. همان‌گونه که قبلاً ذکر شد جدایه‌های به‌دست آمده در این پژوهش از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، *P. macrostoma* نمی‌توانند شناسایی شوند، چون *P. macrostoma* دارای ذرات چربی کوچک و به تعداد زیاد و دارای دیواره‌های عرضی در کنیدیوم‌های با اشکال متنوع می‌باشند.



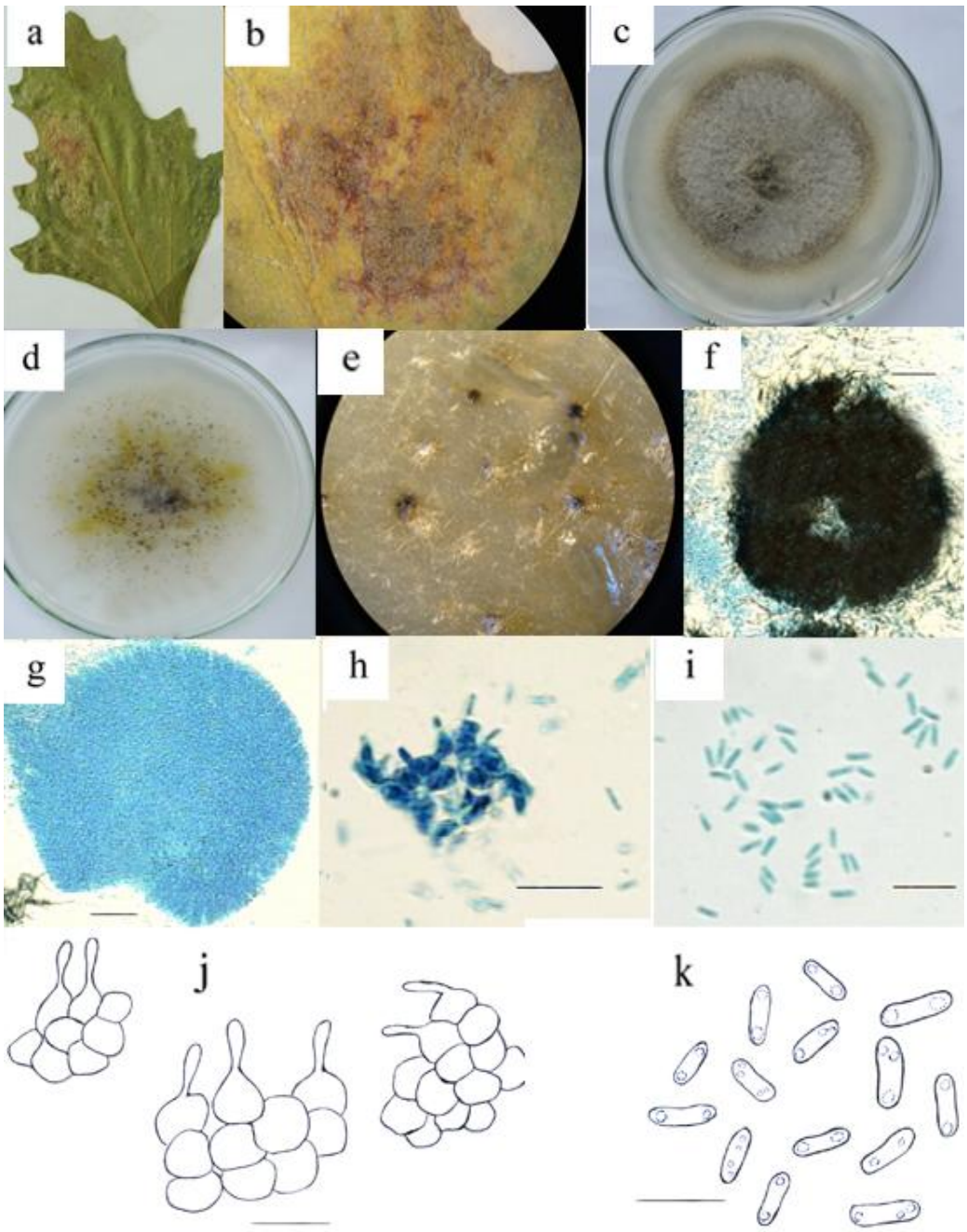
شکل ۲: *Phoma herbicola* a. علائم لکه برگی، b. پیکنیدیوم‌ها در سطح برگ، c. پرگنه روی محیط PDA، d. پرگنه روی محیط PCA، e. پیکنیدیوم گردن‌دار، f.j. سلول‌های کنیدیوم‌زا، g،h،i. کنیدیوم‌ها (مقیاس f، g، h،i زیرابر ۱۰ میکرومتر، e برابر ۵۰ میکرومتر).

Fig.2: *Phoma herbicola* a. Symptoms of leaf spot, b. pycnidia on leaf, c. colony on PDA medium, d. colony on PCA medium, e. necked pycnidia, f,j. Conidiogenus cells, g,h,i,. conidia (Bar f,g,h,i,j =10 µm, e =50 µm).

تاکنون گونه‌های مختلف *Phoma* شامل *P. herbarum* و *P. exigua* نیز از روی *Taraxacum* از کانادا توسط *بربائوم و بولاند* گزارش شده است (Boland, 1999 **&** Brebaum). اما *P. herbarum* نیز با داشتن ذرات چربی کوچک در کنیدیوم‌های خود و عدم وجود گردن در پیکنیدیوم و *P. exigua* با داشتن کنیدیوم‌های چند حجره‌ای و عدم وجود گردن در پیکنیدیوم نیز با جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش تفاوت دارند. لازم به‌ذکر است که کنیدیوم‌ها در جدایه‌های این تحقیق نسبت به *P. herbarum* اندکی باریک‌تر و استوانه‌ای‌تر می‌بلشند. در نهایت با توجه به بررسی‌های مولکولی و ریخت‌شناسی گونه‌های *Phoma* جدا شده از *T. officinale* به‌عنوان *P. herbicola* شناسایی شدند، که این گونه برای اولین بار از روی *T. officinale* در دنیا گزارش می‌شود.

Phoma medicaginis var. *medicaginis* Malbranche & Roumeguère

علائم جدایه‌های این گونه روی برگ‌ها به صورت لکه‌های دارای اشکال نامنظم و به رنگ خاکستری روشن با حاشیه صورتی رنگ بودند. پرگنه روی محیط PCA بی‌رنگ و به‌طور غیر یکنواخت در قسمت‌هائی از آن زرد کم رنگ بود. میسلیوم‌های هوائی تشکیل نشدند و پیکنیدیوم‌ها از مرکز پرگنه به سمت حاشیه‌ها توسعه یافتند. قطر پرگنه پس از ده روز به ۴۵ میلی‌متر رسید. پرگنه در محیط PDA خزه مانند و دارای میسلیوم‌های هوائی فراوان به حالت کرکی تا پشمی بود که رنگ آن مایل به خاکستری و به تدریج سفید شد. قطر آن پس از ۱۰ روز به ۵۵ میلی‌متر رسید. پیکنیدیوم‌های فراوان به‌صورت دوایر متحدالمرکز در زیر میسلیوم‌های هوائی به‌صورت تکی یا به صورت مجتمع، کروی تا نیمه کروی، بدون مو، به قطر ۳۰۰-۲۰۰ میکرومتر و به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، دارای یک استیول دایره‌ای شکل مرکزی با قطر ۵۰- ۲۵ میکرومتر تشکیل شدند. سلول‌های کنیدیوم‌زا به صورت مجتمع یا جدا از هم با سطح صاف، روشن، آمپولی شکل و با اندازه (۸) ۶-۴(۳) × ۵ /۸-۴/۵ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها باسیلی تا استوانه‌ای شکل و در دو انتها گرد و برخی از آن‌ها اندکی در وسط فرورفته، در توده‌های کرمی مایل به سفید تشکیل شدند. کنیدیوم‌ها بدون دیواره عرضی با اندازه ۲/۵-۱/۵ × ۷/۵-۵ (۴) میکرومتر بودند. اکثر کنیدیوم‌ها دارای دو تا سه ذره چربی در قطب‌ها و تعدادی نیز دارای ذرات کوچک در قسمت‌های مختلف کنیدیوم بودند (شکل۳). این ویژگی‌ها با توصیف ارائه شده توسط وبر و همکاران (Weber *et a*l. 2004) مطابقت داشت. همان‌گونه که درخت رسم شده در شکل ۲ نشان می‌دهد، جدایه CH838 به‌عنوان *Phoma medicaginis* var. *medicaginis* تشخیص داده می‌شود. از آن‌جائی‌که *بورما* و همکاران (Boerema *et al*. 2004) نیز بیان کردند، *P. medicaginis* var. *macrospora* در دمای پایین، تولید کنیدیوم‌های بزرگ‌تر با یک دیواره عرضی می‌کند و تنها از این طریق از *P. medicaginis* var. *medicaginis* تشخیص داده می‌شود و با توجه به این‌که جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش نیز در دمای پایین، حتی پس از گذشت ۱۱ ماه، تولید کنیدیوم‌های بزرگ با دیواره عرضی نکردند، بنابراین در نهایت با توجه به بررسی‌های مولکولی و ریخت‌شناسی گونه‌های *Phoma* جدا شده از *C. mural* به عنوان *P. medicaginis* var. *medicaginis* شناسایی می‌شوند.



شکل ۳: *Phoma medicaginis var. medicaginis* : a،b. علائم لکه برگی، c. پرگنه روی محیط PDA، d. پرگنه روی محیط PCA، e. تصویر پیکنیدیوم‌ها، f. پیکنیدیوم دارای یک استیول مرکزی، g. ترشحات کنیدیوم، j.h . سلول‌های کنیدیوم‌زا، k،i. کنیدیوم‌ها (مقیاس k،j برابر ۱۰ میکرومتر، i،h برابر ۲۰ میکرومتر، f، g برابر ۵۰ میکرومتر).

Fig. 3: *Phoma medicaginis var. medicaginis*: a, b. Symptoms of leaf spot, c. colony on PDA medium, d. colony on PCA medium, e. picture of pycnidia, f. pycnidium with 1 central ostiole ,g. conidial exudation, h,j. Conidiogenesis cells, i,k. conidia (Bar j,k =10 µm, h,i =20 µm, f,g =50 µm).

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه ۱۱ متن انگلیسی مراجعه شود.

Molecular and Morphological Chracterestics of Two Phoma Species Iolated from *Taraxacum officinale* and *Chenopodium murale*

Razaghi[1], P., Zafari[2*], D. and Bahador[3], M.

Abstract

In order to identify fungi associated with weeds in Hamedan Province, samples were collected from different geographic regions during spring and summer in 2009. Species were identified using morphological characteristics and sequences of ITS regions (ITS1, ITS2, 5.8S gene) of ribosomal DNA. Five isolates related to *Taraxacum officinale* and three isolates related to *Chenopodium murale* were identified as *Phoma herbicola* and *Phoma medicaginis* var *medicaginis,* respectively. This is the first report of *Phoma herbicola* on *Taraxacum officinale* and *Phoma medicaginis* var *medicaginis* on *Chenopodium murale* in the World.

Keywords: ITSsequences, Weeds, Hamedan

References

Boerema, G. H., Gruyter, J. de, Noordeloos, M. E. and Hamers, M. E. C. 2004. *Phoma* Identification Manual. Differentiation of Specific and Infra-specific Taxa in Culture. CABI publishing, Wallingford, U.K, 479 pp.

Brebaum, S. N., and Boland, G. J. 1999. First report of ***Phoma herbarum*** and ***Phoma exigua*** as pathogens of dandelion in southern Ontario. Plant Disease 83: 200.

Greene, H. C. 1964. Notes on parasitic fungi XXX". Trans Wisconsin Academic Science. 53: 177-196.

Grove, W. B. 1935. British Stem- and Leaf-Fungi (Coelomycetes) Vol. 1 Sphaeropsidales. Cambridge University Press, Cambridge.

Gruyter, J.de, Noordeloos, M. E. and Boerema, G. H. 1998. Contributions Towards a Monograph of *Phoma* (Coelomycetes) — I-3. Section *Phoma*: Taxa with conidia longer than 7 –m. Persoonia. 16(4): 471–490.

Lenne, J. M. 1990. World List of Fungal Diseases of Tropical Pasture species. Phytopathology. 31: 1-162.

Ormeno-Nunez, J., Reeleder, R.D. and Watson, A.K. 1988. A foliar disease of field bindweed (convolvulus arvensis) caused by phomopsis convolvulus" . Plant Disease. 72: 338-342.

Simonyan, S. A. 1981. [Mycoflora of Botanical Gardens and Arboreta in Armenia.]. Hayka. 232 PP.

Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. CMI, Kew.

Tunali, B., Eskandari, F. M., Berner, D. K., Farr, D. F. and Castlebury, L. A. 2003. First report of leaf blight caused by *Phoma exigua* on *Acroptilon repens* in Turkey. Plant Disease. 87(12): 1540.

Weber, R. W. S., Stenger, E. Meffert, A. and Hahn, M. 2004. Brefeldin a production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue*:* a strategy for habitat conquest?. Mycological Research. 108 (6): 662–671.

Widmer, T. 2002. First report of *Phoma exigua* on *Centaurea solstitialis* (*Asteraceae*) in Russia. Plant Disease. 86(8): 922.

Zhang, T. Y., Hou, T. J. and Zhao, G. Z. 2009. Taxonomic studies on 20 dictyosporic hyphomycete genera from China and molecular systematics of represented species of 5 allied genera. Flora Fungorum Sinicorum. 31: 62.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 43-48= ۴۳-۴۸).

1 and 2. M.Sc student and Associate Professor respectively, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan.

3. Sina Riz Tec Co, Hamadan.

∗: Corresponding author