

## Identification of *Chaetomium* and *Amesia* Species Associated with Different Diseases of some Herbaceous Ornamentals in Ahwaz

**Reihaneh Larki**

MSc Student of Plant Pathology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran, larki.reihan1994@gmail.com

**Mehdi Mehrabi-Koushki\***

Associate Professor of Plant Pathology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran; Biotechnology and Bioscience Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran, mhdmhrb@scu.ac.ir

**Reza Farokhinejad**

Professor of Plant Pathology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran, farokhi\_reza@yahoo.com

### Abstract

**Introduction:** Common zinnia (*Zinnia elegans*), canna (*Canna* sp.), petunia (*Petunia hybrida*), compacta (*Dracaena Compacta*), dahlia (*Dahlia* sp.), gazania (*Gazania* sp.), marigold (*Tagetes* sp.), rose moss (*Portulaca grandiflora*) and nasturtium (*Tropaeolum majus*) are common ornamental plants in Ahwaz. The identification of fungi associated with these plants will contribute to improving the future management of their cultivation. Members of the genera *Amesia* and *Chaetomium* are widely distributed in soil, water, plants, animals and humans. In this study, 12 isolates from *Chaetomium* and *Amesia* genera, obtained from herbaceous ornamentals, were identified based on morphology and phylogenetic analysis.

**Materials and methods:** During 2017-2018, 40 symptomatic plants, showing root rot, stem canker and leaf spot, were collected and their associated fungi were isolated. Among those, 12 chaetomiaceae-like isolates were obtained, which their morphological and molecular characterizations were surveyed. Mycelial biomass of the isolates, produced into potato-dextrose-broth (PDB), was collected by passing through filter paper and freeze-dried. ITS and partial regions of the 28S-D1/D2 (for 4 isolates) and *tub2* (for 9 isolates) were amplified using appropriate primers and sequenced.

**Results:** The isolates under survey were compared with known strains using BLASTn search and phylogenetic analysis based on ITS, 28S and *tub2* regions. Accordingly, the isolates under study were identified as follows: *Amesia atrobrunnea*, *Chaetomium rectangulare*, *C. globosum*, *C. ascotrichoides* and *C. olivaceum*. The morphological characteristics of these isolates were in accordance with the type strains of each species.

**Discussion and conclusion:** To our knowledge, this is the first record of *C. ascotrichoides* in Iran and the association of *C. rectangulare* on compacta, *C. globosum* on zinnia and canna, *C. ascotrichoides* on petunia, *C. olivaceum* on common zinnia, nasturtium and marigold in the world.

**Key words:** Chaetomiaceae,  $\beta$ -tubulin, Molecular Phylogeny, Morphology, Associated Fungi

---

\* Corresponding author

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)

سال هشتم، شماره ۳۱، پاییز ۱۳۹۸، صفحه ۳۳-۵۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۴

Doi: [10.22108/BJM.2019.117357.1205](https://doi.org/10.22108/BJM.2019.117357.1205)

## شناسایی گونه‌های *Chaetomium* و *Amesia* همراه بیماری‌های مختلف در گیاهان زینتی علفی اهواز

**ریحانه لرکی:** دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، [larki.reihan1994@gmail.com](mailto:larki.reihan1994@gmail.com)  
**مهدی مهربانی کوشکی\*:** دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران؛ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، [mhdmhrb@scu.ac.ir](mailto:mhdmhrb@scu.ac.ir)  
**رضا فرخی‌نژاد:** استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، [farokhi\\_reza@yahoo.com](mailto:farokhi_reza@yahoo.com)

### چکیده

**مقدمه:** گیاهان زینتی آهار (*Zinnia elegans*)، اختر (*Canna sp.*)، اطلسی (*Petunia hybrida*)، کمپکت (*Dracaena compacta*)، کوکب (*Dahlia sp.*)، گازانیا (*Gazania sp.*)، گل جعفری (*Tagetes sp.*)، گل ناز (*Portulaca grandiflora*) و لادن (*Tropaeolum majus*) از گیاهان زینتی شهر اهواز هستند و شناسایی قارچ‌های همراه این گیاهان به بهبود مدیریت پرورش آنها در آینده کمک می‌کند. اعضای جنس‌های *Amesia* و *Chaetomium* عموماً در خاک، آب، گیاهان، حیوانات و انسان یافت می‌شوند. در مطالعه حاضر، ۱۲ جدایه از جنس‌های *Amesia* و *Chaetomium* جداسازی شده از گیاهان زینتی علفی بر اساس ریخت‌شناسی و تجزیه و تحلیل تبارشناسی شناسایی شدند.

**مواد و روش‌ها:** در طول سال‌های ۹۷-۱۳۹۶، ۴۰ نمونه از گیاهان یادشده با نشانه‌های پوسیدگی ریشه، شانکر ساقه و لکه‌برگی جمع‌آوری و قارچ‌های همراه این نشانه‌ها جداسازی شد؛ در بین آنها، ۱۲ جدایه از خانواده Chaetomiaceae به دست آمد که ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی آنها بررسی شد. جدایه‌های قارچی در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-براث (PDB) رشد یافتند و زیست‌توده میسیلیومی آنها پس از عبور از کاغذ صافی استریل جمع‌آوری و خشک-انجمادی شد. نواحی ITS و بخش‌هایی از ژن‌های 28S-D1/D2 (برای چهار جدایه) و *tub2* (برای نه جدایه) با استفاده از آغازگرهای مناسب تکثیر و توالی‌یابی شدند.

**نتایج:** جدایه‌های مطالعه‌شده با استفاده از الگوریتم جستجوی بلاست و تجزیه و تحلیل تبارشناسی مبتنی بر ناحیه‌های ITS، 28S و *tub2* با سویه‌های شناخته‌شده مقایسه شدند؛ بر اساس این، گونه‌های *Chaetomium olivaceum*، *C. globosum ascotrichoides*، *C. rectangulare*، *C. atrobrunnea* و *Amesia* شناسایی شدند و ویژگی‌های ریخت‌شناسی این جدایه‌ها با سویه‌های تایپ هر گونه انطباق داشت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** بر اساس دانش ما، این نخستین گزارش گونه *C. ascotrichoides* در ایران و همراهی *C. rectangulare* روی کمپکت، *C. globosum* روی آهار و اختر، *C. ascotrichoides* روی اطلسی و *C. olivaceum* روی آهار، لادن و جعفری در جهان است.

**واژه‌های کلیدی:** Chaetomiaceae، بتاتوبولین، فیلوژنی مولکولی، ریخت‌شناسی، قارچ‌های همراه

\* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

گیاهان زینتی آهار (*Zinnia elegans*)، اختر (*Canna sp.*)، اطلسی (*Petunia hybrida*)، کمپکت (*Dracaena Compacta*)، کوکب (*Dahlia sp.*)، گازانیا (*Gazania sp.*)، گل جعفری (*Tagetes sp.*)، گل ناز (*Portulaca grandiflora*) و لادن (*Tropaeolum majus*) از گیاهان زینتی شهر اهواز هستند. گیاه آهار دارای گل‌های جذاب و کوچک، برگ‌هایی با بافت کاغذی و ساقه‌های سفتی است که در مرکز به رنگ سبز کم‌رنگ هستند و در ارتفاع ۱۵ تا ۱۰۰ سانتی‌متر رشد می‌کند. اختر، گیاهی ریزوم‌دار با ساقه‌های طویل و بدون انشعاب است، برگ‌های آن بزرگ، پهن با رگبرگ‌های برجسته و سبز تا مسی یا ارغوانی هستند و گل‌های نامنظم آن به شکل خوشه در انتهای ساقه قرار می‌گیرند. گیاه اطلسی جزو گیاهان علفی با ساقه نیمه‌چوبی است که گل‌هایش به شکل قیف با دو رنگ بنفش و سفید دیده می‌شوند. این گیاه زینتی به علت داشتن گل‌های فراوان، در تزئین تپه‌گل‌ها و حاشیه‌های صاف یا شیب‌دار استفاده می‌شود. گیاه کمپکت، برگ‌های پهن و کشیده‌ای به رنگ سبز تیره دارد و نام گیاه از آرایش برگ‌ها در کنار هم گرفته شده است؛ برگ‌ها به شکل متراکم و دسته‌ای در انتهای شاخه‌ها تشکیل می‌شوند. گیاه کوکب دارای برگ‌های متناوب، بیضی‌شکل و قدری کشیده و کرک‌دار و خشن و ساقه‌های ضخیم و منشعب و گل‌های شبیه آفتابگردان با مخروطی به رنگ سیاه، قهوه‌ای یا سبز در وسط است؛ گل‌ها اواخر تابستان یا اوایل پاییز ظاهر می‌شوند. گیاه گازانیا دارای برگ‌های سبز تیره و صاف در سطح بالایی و نم‌دی‌شکل و سفید در پشت

است، گل‌های این گیاه در روشنایی آفتاب، باز و در شب و هوای ابری و مه‌آلود، بسته می‌شوند. گل‌ها درخشان و به رنگ‌های نارنجی، زرد، کرم و قرمز برنزی و اغلب در قاعده خود دارای هاله‌هایی به رنگ‌های تیره یا روشن هستند. گل جعفری دارای برگ‌های مرکب است و گل‌های آن به رنگ زرد لیمویی، زرد، کرم، طلایی و نارنجی قهوه‌ای دیده می‌شوند. گل ناز دارای برگ‌های ضخیم و گوشتی و مرتب و متناوب در خوشه‌های کوچک است و گل‌ها با پنج گلبرگ به رنگ‌های متغیر قرمز، نارنجی، صورتی، سفید و زرد دیده می‌شوند. گیاه لادن دارای برگ‌های دایره‌ای شکل و دم‌برگ‌های بلند است و گل‌ها به رنگ نارنجی پرتقالی و درشت هستند و از کنار برگ‌ها خارج می‌شوند و دم‌گل بلندی دارند.

وجود قارچ‌های بیمارگر و همراه در گیاهان یادشده (از جمله گونه‌های *Amesia* و *Chaetomium*) روی وضعیت رشدی آنها تأثیر می‌گذارد و شناسایی این قارچ‌ها به مدیریت مناسب‌تر پرورش این گیاهان کمک می‌کند. جنس *Chaetomium* و آرایه‌های وابسته به آن به علت داشتن توانایی تخریب سلولز و تولید انواع متابولیت‌های زیستی، قادر به کلونیزه کردن بسترهای مختلف هستند. بیش از ۴۰۰ گونه از جنس *Chaetomium* توصیف و برخی گونه‌ها عامل حساسیت‌زای مهم در هوا گزارش شده‌اند که به گسترش ورم غشای مخاطی بینی و آسم (به‌علاوه تولید مایکوتوکسین‌ها و ترکیبات آلی فرار) کمک می‌کنند (۱-۶). جنس *Chaetomium* معمولاً آسکوکارپ‌هایی با دیواره غشایی تولید می‌کند که زیر پوشش موهای نسبتاً زیاد رشد کرده‌اند. این جنس دارای آسکوسپورهای

مترادف با *C. globosum* شناخته شده‌اند (۸ و ۲۱).  
 گریف<sup>۶</sup> و همکاران (۲۲) ارتباط تبارشناسی جنس *Chaetomium* را با استفاده از داده‌های توالی LSU- $\beta$ -tubulin و rpb2 بررسی کردند و نتیجه گرفتند *Chaetomidium* چندنیایی است. عسگری<sup>۷</sup> و زارع<sup>۸</sup> ریخت‌شناسی جنس *Chaetomium* را در ایران مطالعه کردند (۲۳). در این مطالعه، بررسی تبارشناسی چندژنی مبتنی بر نواحی ITS، LSU-nrDNA و *tub2* جایگاه طبقه‌بندی و جداسازی تبارشناسی پنج گروه گونه‌*Chaetomium* را به‌طور درخور توجهی روشن کرد و این تفکیک تا حدی با ریخت‌شناسی، ساختار پریدیم، شکل آسکوسپورها و موقعیت منافذ تندش منطبق بود. این مطالعه نشان داد ارتباط تبارشناسی دوری بین جدایه‌های معتبر *C. globosum* (CBS 148.51) و سویه *C. coarctatum* CBS 162.62 وجود دارد (۲۳). بر اساس نتایج تبارشناسی مبتنی بر شش جایگاه ژنی، ویژگی‌های ریخت‌شناسی (۲۴) و حدود و ثغور گونه *C. globosum* بازنگری شد و شش گونه که مترادف *C. globosum* معرفی شده بودند (۸)، احیا شدند. در مطالعه وونارکس و همکاران، *Chaetomidium* به‌عنوان جنس بدون منفذ آسکوکارپ (استیول) و مترادف *Chaetomium* معرفی شده است (۲۴). این جنس دارای آسکوکارپ با موهای بلند و انعطاف‌پذیر است و آسکوسپورها بیضی تا لیمویی‌شکل، تک‌سلولی با یک منفذ جوانه‌زنی در رأس خود هستند. در حال حاضر، این جنس شامل ۱۲ گونه است (۲۵-۲۸). با مطالعه تبارشناسی بر اساس ژن‌های LSU، SSU، *tub2* و *rpb2* (۲۷)، جنس‌های *Amesia* (با ۳ گونه)، *Arcopilus* (با ۱ گونه)، *Collariella* (با ۴ گونه)، *Dichotomopilus* (با ۷ گونه) و *Ovatospora* (با

تک‌سلولی، صاف و رنگی با منفذ تندش است (۷ و ۸). ابتدا کنز<sup>۱</sup> گونه *C. globosum* را معرفی و توصیف (۹) کرد و سپس چندین بار بر اساس ریخت‌شناسی موهای اطراف آسکوکارپ‌ها توصیف شد (۷، ۱۰-۱۶)؛ باوجود این، فیوکل<sup>۱</sup> (۱۷) با کشف آسک‌های استوانه‌ای و زوف<sup>۱</sup> (۱۲) با کشف منافذ جوانه‌زنی آسکوسپورها یینش بهتری در توصیف ریخت‌شناسی جنس *Chaetomium* ارائه کردند. سورگل<sup>۲</sup> (۱۸) و دریفس<sup>۳</sup> (۱۹) ویژگی‌های ریخت‌شناسی آسکوسپورها، آسک‌ها و ساختار سطح دیواره آسکوکارپ‌ها را برای طبقه‌بندی جنس *Chaetomium* پیشنهاد کردند. میلنر<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰) برای طبقه‌بندی گونه‌های *Chaetomium* با استفاده از ویژگی‌های منافذ جوانه‌زنی آسکوسپورها و پاسخ‌های رشدی گونه‌ها در درجه‌حرارت‌های مختلف تلاش کردند. مطالعه‌های تکمیلی وونارکس<sup>۵</sup> و همکاران (۲۱) که اساس طبقه‌بندی معاصر جنس *Chaetomium* را تشکیل می‌دهند، مطالعه‌های پیشین را مدنظر قرار می‌دهند؛ هرچند بر ریخت‌شناسی آسک‌ها، آسکوسپورها، منافذ جوانه‌زنی و ساختار دیواره آسکوکارپ‌ها تأکید می‌کنند و ریخت‌شناسی موهای اطراف آسکوکارپ‌ها را مبنا قرار نمی‌دهند؛ بر اساس این طبقه‌بندی، *C. globosum* دارای آسکوکارپ‌هایی با اشکال کروی تا تخم‌مرغی یا تخم‌مرغی معکوس، متشکل از دیواره اسفنجی و پوشیده از اشکال متنوعی از موهایی صاف، انعطاف‌پذیر یا به‌طور منظم پیچ‌خورده است. آسکوکارپ‌ها حاوی آسک‌های چماقی‌شکل و آسکوسپورهای لیمویی‌شکل و دوطرفه مسطح‌شده با اندازه ۱۲-۱۰×۹-۸×۶ میکرومتر و دارای منفذ قارچی در رأس خود هستند. بر اساس توصیف یادشده، ۲۸ گونه

کیسه‌های نایلونی) و در یخچال نگهداری شدند. به منظور جداسازی بیمارگرهای احتمالی، برشی از مرز مشترک بافت آلوده و سالم هر نمونه گیاهی (قطعه‌هایی با اندازه ۵×۵ میلی‌متر) تهیه و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱ تا ۲ دقیقه، نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از خشک شدن نمونه‌ها به وسیله کاغذ صافی استریل، قطعه‌های گیاهی روی محیط غذایی سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) قرار گرفتند. پس از ۳ تا ۷ روز نگهداری تشک‌های پتری در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های قارچی ظاهر شده روی محیط کشت به محیط کشت جدید مایه‌زنی شدند.

**خالص‌سازی جدایه‌های قارچی:** مقدار ۹ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد توئین ۸۰ به هر شیشه مکاریتی اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. تعدادی از آسکوکارپ‌های تولیدی روی سطح پرگنه قارچی با لوپ استریل شده جمع‌آوری و به لوله‌های مکاریتی اضافه شدند؛ سپس این لوله‌ها به شدت با ویراتور تکان داده شدند. سوسپانسیون حاصل از لایه پشم شیشه استریل عبور داده شد تا قطعه‌های ریشه، بقایای آسکوکارپ و محیط کشت از آن جدا شوند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف (۰/۱ و ۰/۰۱) این سوسپانسیون آسکوسپور به ظروف پتری حاوی PDA اضافه و با پخش‌کننده L شکل به خوبی پخش شد. ظروف پتری به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی مطلق نگهداری شدند و با مشاهده پرگنه‌های مستقل قارچ در ظروف پتری، یکی از آنها به عنوان قارچ تک‌اسپور شده به محیط کشت PDA جدید مایه‌زنی شد.

۲ گونه) برای نخستین بار معرفی و توصیف شدند. در مطالعه وونارکس و همکاران، جنس *Amesia* با تغییر نام چند گونه *Chaetomium* و توصیف گونه *A. atrobrunnea* گونه نام‌گذاری یا تایپ معرفی شد. گونه‌های موجود در این جنس از نظر ریخت‌شناسی به ویژه شکل موهای اطراف کلیستوتسیوم و ریخت‌شناسی آسکوسپورها متنوع هستند. گونه‌های توصیف شده این جنس عبارتند از: *Amesia nigricolor* و *cymbiformis* در این جنس، آسکوکارپ‌های سطحی، منفذدار و کروی، بیضوی یا تخم‌مرغی شکل تشکیل می‌شوند. آسک‌ها چماقی یا دوکی شکل و حاوی هشت آسکوسپور هستند که با نظم و پشت‌سرهم تشکیل می‌شوند و دیواره آنها تجزیه‌شونده است. آسکوسپورهای قهوه‌ای‌رنگ معمولاً دوکی شکل یا تخم‌مرغی کشیده با منفذ جوانه‌زنی رأسی یا زیررأسی هستند. تاکنون شکل جنسی این قارچ مشاهده نشده است (۲۷).

در مطالعه حاضر، ۱۲ جدایه از جنس‌های *Amesia* و *Chaetomium* که از گیاهان زینتی علفی شهر اهواز (دارای نشانه‌های پوسیدگی ریشه، لکه‌برگی و شانکر ساقه) جداسازی شده بودند، بر اساس ریخت‌شناسی و تجزیه و تحلیل تبارشناسی شناسایی شدند.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی:** طی سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶، ۴۰ نمونه از نه‌گونه گیاه زینتی علفی با نشانه‌های پوسیدگی ریشه، لکه‌برگی و شانکر ساقه از مناظر شهری اهواز جمع‌آوری (جدول ۱) و تا زمان جداسازی درون کیسه‌های کاغذی (قرارداده شده در

جدول ۱- ویژگی‌های گیاهان نمونه‌برداری شده و جدایه‌های به دست آمده از آنها

کد جدایه	میزبان	نام علمی	محل جمع‌آوری	تاریخ جمع‌آوری	نشانه‌های نمونه
SCUA-C1	گل آهار	<i>Zinnia elegans</i>	فلکه فرودگاه	۹۶/۸/۲۷	لکه‌برگی
SCUA-D1	گل آهار	<i>Zinnia elegans</i>	نیوساید	۹۶/۸/۲۷	لکه‌برگی
SCUA-D2	گل آهار	<i>Zinnia elegans</i>	نیوساید	۹۶/۸/۲۷	لکه‌برگی
SCUA-AT3	گل اطلسی	<i>Petunia hybrida</i>	ملت، فاز ۴	۹۷/۱/۱۸	شانکر ساقه
SCUA-AT10	گل اطلسی	<i>Petunia hybrida</i>	ملت، فاز ۴	۹۷/۱/۱۸	پژمردگی گیاه
SCUA-Z9	گل ناز	<i>Portulaca grandiflora</i>	زیتون	۹۷/۶/۳۱	شانکر ساقه و پوسیدگی ریشه
SCUA-Q1	گازانیا	<i>Gazania sp.</i>	کیانپارس	۹۶/۷/۲۰	لکه‌برگی
SCUA-K3	کمپکت	<i>Dracaena Compacta</i>	گلخانه کیانپارس	۹۶/۷/۲۰	لکه‌برگی
SCUA-CO1	کوکب	<i>Dahlia sp.</i>	شهرک نفت	۹۶/۹/۱۲	لکه‌برگی
S8 SCUA-	گل جعفری	<i>Tagetes sp.</i>	سایت دانشگاه	۹۶/۹/۲۱	لکه‌برگی و شانکر ساقه
SCUA-C3	اختر	<i>Canna sp.</i>	شهرک دانشگاه	۹۶/۱۰/۱۰	لکه‌برگی
SCUA-L2	گل لادن	<i>Tropaeolum majus</i>	نیوساید	۹۷/۱/۱۸	لکه‌برگی
SCUA-Neae	-	-	دانشگاه	۹۶/۸/۱۷	-

به منظور تعیین سرعت رشد، دیسک‌های یکسانی از حاشیه در حال رشد پرگنه جدایه‌های قارچی تهیه و روی محیط کشت‌های PDA قرار داده شدند و کشت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوباتور و تاریکی مطلق نگهداری شدند. میزان رشد پرگنه‌های جدایه‌های بررسی شده به‌طور روزانه و به‌مدت هشت روز اندازه‌گیری شد.

#### تولید زیست‌توده جدایه‌ها و آماده‌سازی برای

استخراج DNA: قطعه‌های ۵ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های در حال رشد قارچ جدا و به محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز-براث (PDB) (۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره سیب‌زمینی همراه با ۱ گرم ساکارز) اضافه شدند. ظروف کشت ۵ تا ۱۵ روز در شرایط تاریکی مطلق، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ تا ۱۲۰ تکان در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. توده میسیلیومی رشد یافته در محیط کشت‌های PDB با پمپ خلأ، قیف و کاغذ صافی استریل جمع‌آوری و با آب مقطر استریل شستشو شد.

#### بررسی ریخت‌شناسی و شاخص‌های رشدی: شکل و

اندازه آسکوکارپ‌ها و آسکوسپورها بررسی شد (۲۹). یک قطره محلول رنگ آمیزی لاکتوفنل یا آبی لاکتیک (لاکتوفنول+کاتن‌بلو) روی لام اسلاید ریخته و چند آسکوکارپ با سوزن سترون و به آرامی به قطره موجود روی لام منتقل شد؛ سپس ساختارهای قارچی با قراردادن لامل روی آنها، هواگیری و تثبیت با شعله مشاهده شدند. جدایه‌ها به روش بینک<sup>۹</sup> و روگز<sup>۱۰</sup> (۳۰) روی اسلاید کشت شدند. در تشتک پتری حاوی کاغذ صافی، لام و لامل استریل، قطعه‌های کوچک مربع‌شکلی از محیط کشت PDA روی لام قرار داده شدند و مقدار کمی از پرگنه قارچ مدنظر با سوزن استریل برداشته و به آرامی به چهار سوی آن منتقل شد؛ سپس لامل روی قطعه‌های PDA قرار داده شد و تشتک پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوباتور نگهداری شد. پس از رشد قارچ مدنظر روی لام و لامل، اسلاید ساختارهای قارچی با استفاده از محلول رنگ آمیزی تهیه شد.

نانو گرم) و ۳۱/۹ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده استفاده شد. در تکثیر با هر جفت آغازگر، مخلوط واحدی برای تمام نمونه‌ها از مواد موردنیاز (به‌غیر از DNA الگو) روی یخ ساخته، با ورتکس مخلوط و سپس در میکروتیوب‌های استریل تقسیم شد؛ سپس، DNA الگو به هر کدام از میکروتیوب‌ها اضافه شد. برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه تکراری (شامل یک مرحله ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۵۱ تا ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ITS و ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای tub2 و ۹۰ ثانیه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و یک مرحله طولیل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسیکلر (مدل MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler) بود. محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شدند.

#### خالص‌سازی محصولات PCR، توالی‌یابی و

تجزیه و تحلیل توالی‌ها: تعداد ۹ نمونه به روش استخراج از ژل توسط شرکت ماکروژن (Humanizing Genomics, Macrogen, South Korea) و سپس با آغازگرهای رفت و برگشت توالی‌یابی شدند. محصولات PCR مربوط به ۸ نمونه بدون انجام خالص‌سازی توسط شرکت نرگس (اهواز) توالی‌یابی شدند. توالی‌های به‌دست آمده از هر ژن با نرم‌افزار BioEdit v. 7.0.9.0 (۳۷) ویراستاری و خوانش‌های پیش‌رو و معکوس با نرم‌افزار DNA Baser Sequence Assembler v4 ([www.DnaBaser.com](http://www.DnaBaser.com)) مونتاژ شدند. توالی‌ها با الگوریتم BLASTn و تجزیه و تحلیل

توده میسلیومی حاصل بی‌درنگ به لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و تا مرحله خشک-انجمادی در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌منظور خشک-انجمادی، در لوله‌های سانتریفیوژ حاوی توده‌های میسلیومی منجمد شده با قطعه‌های گاز استریل جایگزین و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریزدرایر (منفی ۲۰ تا منفی ۵۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. توده میسلیومی خشک شده به هاون چینی استریل منتقل و با ازت مایع به خوبی پودر شد. پودر ایجاد شده در لوله ۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری و با پارافیلیم مسدود شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### استخراج DNA و تکثیر نواحی ژنی: استخراج DNA

به روش ریدر<sup>۱۱</sup> و برودا<sup>۱۲</sup> (۳۱) با اندکی تغییر (۳۲) انجام شد. به‌منظور تکثیر حدود ۱۲۰۰ جفت باز از نواحی 18S، ITS1، 5.8S، ITS2 و 28S مربوط به rDNA هسته‌ای از آغازگرهای عمومی ITS1 (۳۳) و NL4 (۳۴) و برای تکثیر حدود ۷۰۰ جفت باز از ژن بتاتوبولین از جفت آغازگر اختصاصی T1 (۳۵) و tub4Rd (۳۶) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ترموسایکلر مدل Biometra و Biorad انجام شد. برای ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۵ میکرولیتر بافر 10x Taq buffer، ۴ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (۲۵ میلی‌مولار)، ۲ میکرولیتر آغازگر مستقیم (۱۰ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر از مخلوط ۲/۵ میکرومولار هر کدام از dNTPها، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم (واحدبر میکرولیتر) Taq DNA Polymerase (GenBio، کره جنوبی)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو (حدود ۵۰۰

سویه‌های تیپ یا شناخته‌شده خود همراه و از نظر تبارشناسی از سایر گونه‌ها متمایز شدند.

### بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌های

#### بررسی شده

۱- گونه *Chaetomium olivaceum* Cooke & Ellis,

Grevillea 6(39): 96(1878)

۱-۱- ریخت‌شناسی گونه *C. olivaceum* (جدایه

SCUA-C1) (شکل ۲): قطر پرگنه روی PDA در شرایط تاریکی مطلق و دمای  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد پس از هشت روز برابر ۴۹ میلی‌متر است. در مراحل اولیه رشد، پرگنه در سطح رویی تشتک‌های پتری به رنگ کرم روشن با حاشیه بی‌رنگ و منظم است و با افزایش سن به رنگ قهوه‌ای تیره در مرکز و حاشیه منظم به رنگ کرم مشاهده می‌شود. میسلیم‌ها به شکل کرکی و بی‌رنگ و آسکوکارپ‌ها به سمت مرکز به طور فشرده‌تر رشد می‌کنند. موهای اطراف آسکوکارپ‌ها در محیط PDA به رنگ خاکستری مایل به زیتونی هستند. سطح زیرین پرگنه به رنگ قهوه‌ای تیره با حاشیه روشن است.

آسکوکارپ‌ها به شکل انفرادی یا تجمع زنجیرمانند در سطح محیط تشکیل می‌شوند و رنگ آنها با افزایش سن تیره‌تر می‌شود. آسکوکارپ‌ها عمدتاً تخم‌مرغی شکل و به رنگ قهوه‌ای تیره با موهای فراوان در دو سمت طول خود مشاهده می‌شوند؛ ابعاد آسکوکارپ‌ها  $3.4-1.52$  (۱۰۳)  $\times$   $(4.7-3.47-2.12)$  (۱۸۶/۶-) میکرومتر و میانگین اندازه گیری‌ها  $44/43 \pm 240 \times 29/85 \pm 280/85$  میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد آسکوکارپ) است و ۹۵ درصد اندازه گیری‌ها در بازه اطمینان  $252/99-246/46 \times 227/73-296/97$  میکرومتر قرار دارند. آسکوسپورها به رنگ قهوه‌ای روشن، کروی تا لیمویی شکل و در دو سمت تخت هستند؛ اندازه آنها  $(12/64)-(11/24-9/83-14/33 \times 5/62)$  میکرومتر و

تبارشناسی (الگوریتم درست‌نمایی بیشینه) با توالی‌های مربوط به سویه‌های تیپ یا شناخته‌شده با نرم‌افزار MEGA 6 (۳۸) مقایسه شدند.

### نتایج

در پژوهش حاضر، ۴۰ نمونه از ۹ گونه گیاه زینتی با نشانه‌های پوسیدگی ریشه، لکه‌برگی و شانکر ساقه از مناظر شهری اهواز جمع‌آوری شدند و پس از کشت روی PDA، ۱۲ جدایه قارچی متعلق به خانواده Chaetomiaceae به دست آمدند (جدول ۱). پس از بررسی‌های ریخت‌شناسی و تبارشناسی مولکولی (شکل ۱)، جدایه‌ها در سطح گونه شناسایی شدند و شامل گونه‌های *Chaetomium olivaceum*، *C. C. rectangulare*، *C. globosum*، *ascotrichoides* و *Amesia atrobrunnea* بودند. جزئیات شناسایی این گونه‌ها و شرح ریخت‌شناسی آنها در ادامه به تفکیک آورده شده است.

#### بررسی مولکولی جدایه‌های مورد مطالعه: واکنش

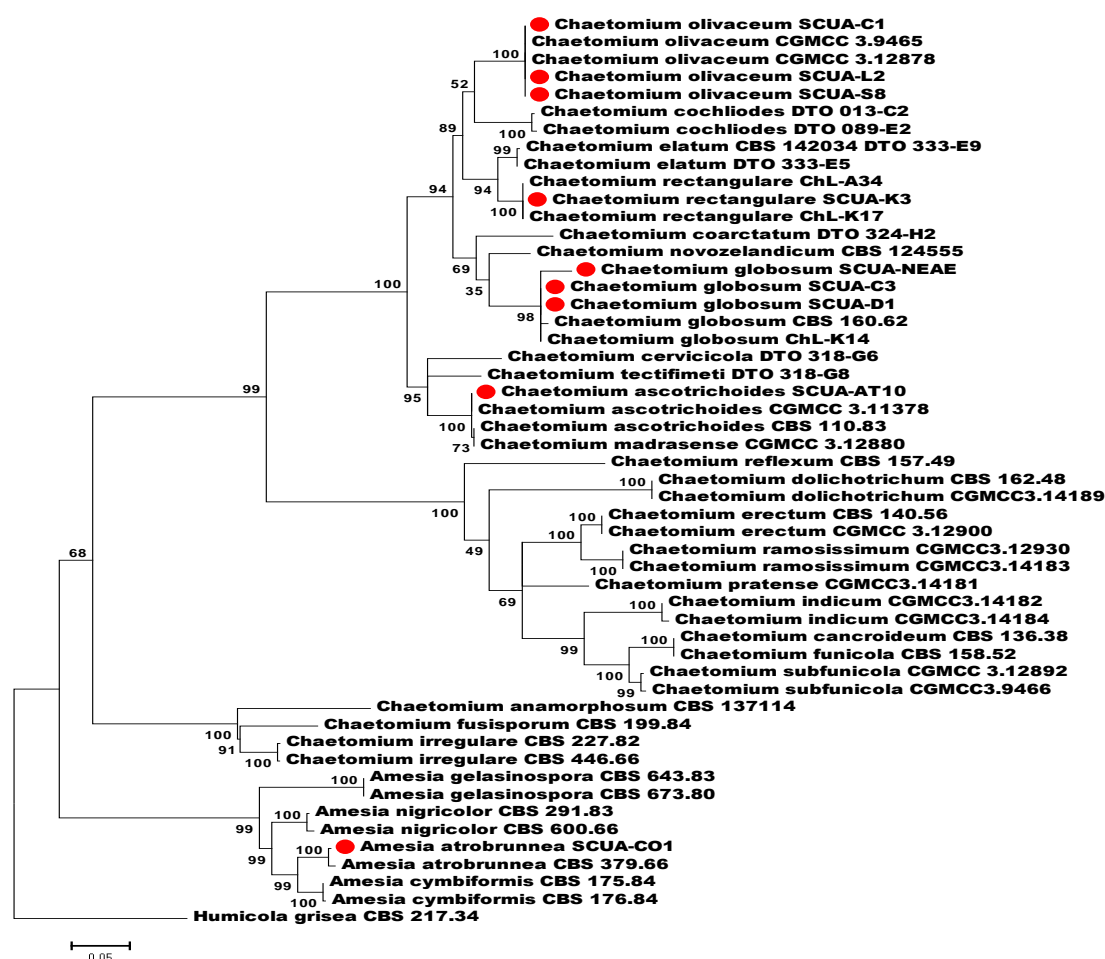
زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگر عمومی ITS-F و NL4-R برای تکثیر نواحی ITS و بخش‌هایی از 28S (D1/D2) به تولید قطعه‌های تکثیری حدود ۱۲۰۰ جفت بازی برای تمام جدایه‌ها منجر شد. تکثیر بخش‌هایی از ژن *tub2* با استفاده از جفت آغازگرهای T1 و Btub4Rd به ظهور باندهای حدود ۷۰۰ جفت بازی برای جدایه‌های *Chaetomium* و *Amesia* در ژل آگارز منجر شد. توالی‌های تولیدشده در مطالعه حاضر با شماره‌های دسترسی یادشده در جدول ۲ در بانک ژن NCBI ثبت شدند. یک بررسی تبارشناسی مبتنی بر ناحیه *tub2* و با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه انجام شد (شکل ۱) که در آن، گونه‌های بررسی شده با



تکثیر *tub2* نیز مشخص کرد جدایه‌های مطالعه‌شده (*SCUA-C1*، *SCUA-L2* و *SCUA-S8*) با سویه شناخته‌شده *C. olivaceum* CGMCC 3.12878 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارند. در درخت تبارشناسی ترسیمی مبتنی بر ناحیه *tub2* (شکل ۱)، جدایه‌های مطالعه‌شده با سویه‌های شناخته‌شده *C. olivaceum* CGMCC 3.12878 و *C. olivaceum* CGMCC 3.9465 خوشه‌بندی شدند و شاخه‌ای تکاملی با ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد ایجاد کردند.

میانگین اندازه‌گیری‌ها  $12/34 \pm 1/32 \times 9/01 \pm 1/61$  میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد آسکوسپور) است و ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان ۹/۴۶-۱۱/۹۷-۱۲/۷۱×۸/۵۶ میکرومتر قرار دارند.

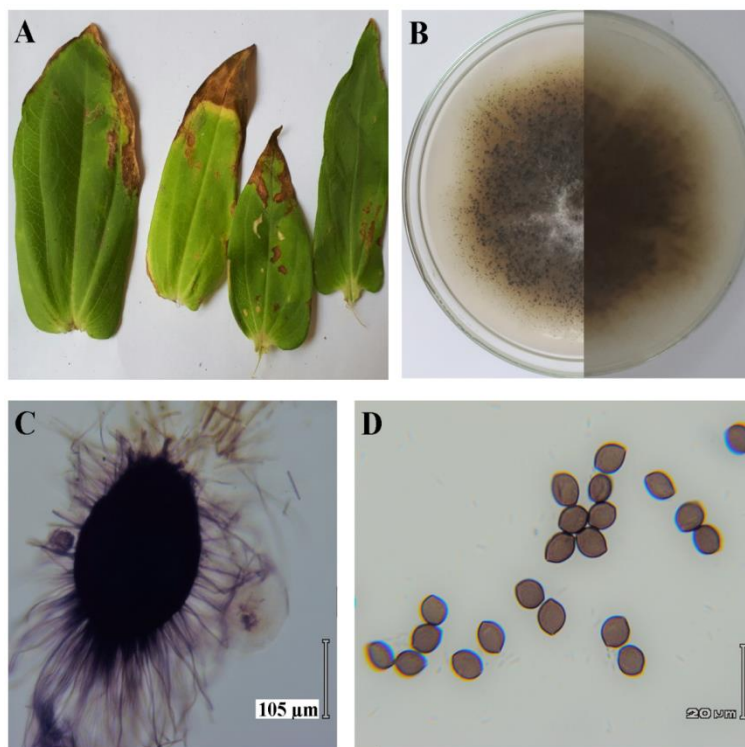
۱-۲- نتایج مولکولی گونه *C. olivaceum*: نتایج جستجوی بلاست جدایه *C. olivaceum* *SCUA-C1* نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته‌شده‌ای از گونه‌های *C. cucumericola*، *C. globosum* و *C. olivaceum* دارای ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی است. جستجوی بلاست مبتنی بر توالی



شکل ۱- درخت تبارشناسی جدایه‌های بررسی و انتخاب‌شده از بانک ژن که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر اساس توالی *tub2* با استفاده از مدل K2+G+I به دست آمده است. درصد تکرار شاخه‌های تکاملی در ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری کاذب (بوت‌استرپ) در محل ریشه شاخه تکاملی درج شده است. نمونه‌های بررسی شده با دایره توپر نشان داده شده‌اند. درخت تبارشناسی با گونه *Humicola grisea* ریشه‌دار شده است.

جدول ۲- شماره‌های دسترسی توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده در بانک ژن NCBI مربوط به جدایه‌های بررسی شده

نام گونه	نام جدایه	شماره دسترسی توالی‌ها در بانک ژن		
		ITS	28S	tub2
<i>Chaetomium rectangulare</i>	SCUA-K3	MN402762	MN402716	MN417754
<i>Amesia atrobrunnea</i>	SCUA-CO1	-	-	MN417746
<i>C. olivaceum</i>	SCUA-C1	MN402760	MN402714	MN417750
<i>C. olivaceum</i>	SCUA-S8	-	-	MN417753
<i>C. olivaceum</i>	SCUA-L2	-	-	MN417751
<i>C. globosum</i>	SCUA-C3	-	-	MN417747
<i>C. globosum</i>	SCUA-Neae	MN402763	MN402717	MN417749
<i>C. globosum</i>	SCUA-D1	MN402761	MN402715	MN417748
<i>C. ascotrichoides</i>	SCUA-AT10	-	-	MN417755



شکل ۲- ریخت‌شناسی گونه *C. olivaceum* (جدایه SCUA-C1); A. همراه با نشانه‌های لکه‌برگی و سوختگی مشاهده شده در گیاه *Zinnia* *elegans*. B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA (سطح رویی و پشتی)، C. آسکوکارپ، D. آسکوسپورها

سانتی‌گراد به مدت هشت روز برابر ۴۰ میلی‌متر است. در مراحل اولیه رشد، پرگنه در سطح رویی تشک‌های پتری به رنگ کرم روشن با حاشیه منظم است و با افزایش سن به رنگ کرم تیره با حاشیه نامنظم مشاهده می‌شود. آسکوکارپ‌ها به سمت مرکز به‌طور فشرده‌تر

۲- گونه *Chaetomium ascotrichoides* Calviello, *Revta Mus. argent. Cienc. nat., B. Aires, Bot.: 372* (1972)  
 ۱-۲- ریخت‌شناسی گونه *C. ascotrichoides* (جدایه SCUA-AT10) (شکل ۳): قطر پرگنه‌ها روی PDA در شرایط تاریکی مطلق و دمای  $28 \pm 0/5$  درجه

*C. madrasense* و *ascotrichoides* دارای ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی است. در درخت تبارشناسی ترسیمی مبتنی بر ناحیه *tub2* (شکل ۱)، جدایه *C. ascotrichoides* SCUA-AT10 با سویه‌های تایپ *C. ascotrichoides* CGMCC 311378 و *C. madrasense* CBS 11083 و *C. ascotrichoides* CGMCC 312880 خوشه‌بندی شد و یک شاخه تکاملی با ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد ایجاد کردند. بررسی‌های ریخت‌شناسی این جدایه (داشتن موهای صاف در اطراف آسکوکارپ) مشخص کرد جدایه *C. ascotrichoides* SCUA-AT10 از سویه‌ی تیپ *C. madrasense* CGMCC 312880 متمایز است.

۳- گونه *Chaetomium globosum* Kunze ex Fr.,  
Systema Mycologicum 3: 255 (1829)

۱-۳- ریخت‌شناسی گونه *C. globosum* (جدایه SCUA-D1) (شکل ۴): قطر پرگنه‌ها روی محیط PDA در شرایط تاریکی مطلق و دمای  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد به مدت هشت روز برابر ۸۴ میلی‌متر است. در مراحل اولیه رشد، پرگنه در سطح رویی تشتک‌های پتری به رنگ کرم روشن با حاشیه منظم است و با افزایش سن به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره با حاشیه بی‌رنگ و منظم مشاهده می‌شود. آسکوکارپ‌ها از مرکز به سمت حاشیه پرگنه به‌طور فشرده‌تر ایجاد می‌شوند. موهای اطراف آسکوکارپ‌ها در محیط PDA به رنگ خاکستری است. پرگنه در سطح زیرین تشتک پتری به رنگ نارنجی تا قهوه‌ای روشن دیده می‌شود. میسلیم‌ها به شکل کرکی و بی‌رنگ رشد می‌کنند.

آسکوکارپ‌ها به شکل انفرادی یا تجمع زنجیرمانند در سطح محیط کشت تشکیل می‌شوند و رنگ آنها با

ایجاد می‌شوند. موهای اطراف آسکوکارپ‌ها در محیط PDA به رنگ زیتونی هستند. پرگنه در سطح زیرین تشتک پتری به رنگ زرد با حاشیه بی‌رنگ و نامنظم مشاهده می‌شود. میسلیم‌ها به شکل کرکی و سفیدرنگ رشد می‌کنند.

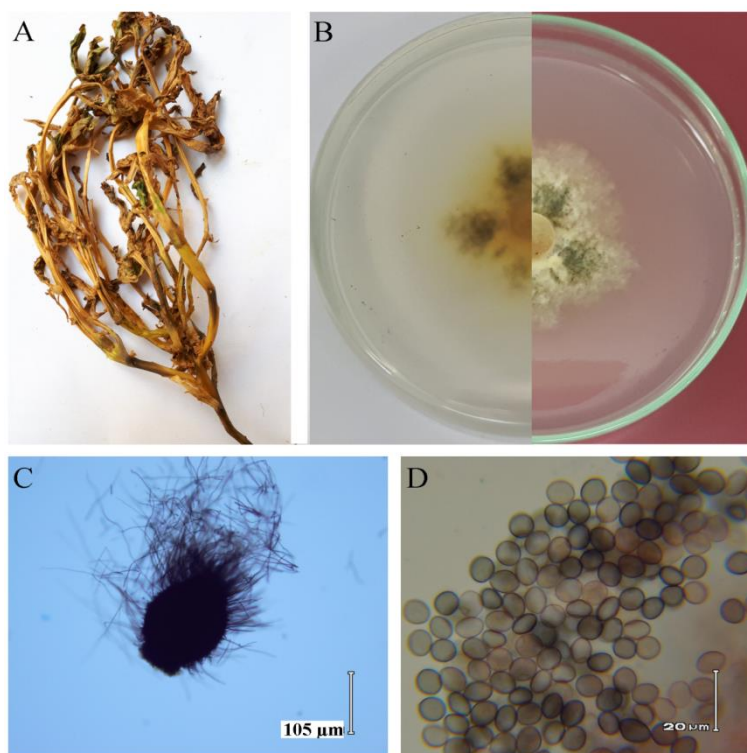
آسکوکارپ‌ها به شکل انفرادی یا تجمع زنجیرمانند در سطح محیط کشت تشکیل می‌شوند و رنگ آنها با افزایش سن تیره‌تر می‌شود. آسکوکارپ‌ها عمدتاً تخم‌مرغی شکل هستند، اما اشکال کروی نیز بین آنها دیده می‌شوند و رنگ آنها قهوه‌ای تیره با موهای فراوان در یک انتهای خود است. ابعاد آسکوکارپ‌ها  $(-315) - 250 - 164 (-130) \times (-378) - 320 - 184 (-152)$

میکرومتر و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $262/08 \pm 55/75 \times 213/38 \pm 38/69$  (بر اساس ۵۰ عدد آسکوکارپ) است و ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $224/27 - 202/50 - 277/76 \times 202/40 - 246/40$  میکرومتر قرار دارند. آسکوسپورها به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره، کروی تا بیضوی با دیواره ضخیم هستند و اندازه آنها  $9/83 - 12/64 \times 8/43 - 9/83$  میکرومتر و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $11/14 \pm 0/43 \times 9/006 \pm 0/62$  (بر اساس ۵۰ عدد آسکوسپور) است و ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $11/001 - 11/28 \times 8/80 - 9/20$  میکرومتر قرار دارند.

۲-۲- نتایج مولکولی گونه *C. ascotrichoides*: نتایج جستجوی بلاست جدایه *C. ascotrichoides* SCUA-AT10 نشان دادند توالی تکثیر *tub2* این جدایه با سویه‌های تایپ شناخته‌شده از گونه‌های *C.*

میکرومتر قرار دارند. آسکوسپورها به رنگ قهوه‌ای روشن، کروی یا لیمویی شکل با دیواره ضخیم هستند و اندازه آنها  $۸/۷۱-۱۱/۲۴ \times ۵/۹-۸/۴۳$  میکرومتر و میانگین اندازه گیری‌ها  $۸/۱۳ \pm ۰/۷۹ \times ۱۰/۳۲ \pm ۰/۷۹$  میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد آسکوسپور) است و ۹۵ درصد اندازه گیری‌ها در بازه اطمینان  $۸/۲۸-۱۰/۵۵ \times ۷/۹۹-۱۰/۵۵$  میکرومتر قرار دارند.

افزایش سن تیره‌تر می‌شود. آسکوکارپ‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره و به شکل کروی یا نیمه کروی با موهای فراوان و فنی شکل در اطراف خود مشاهده می‌شوند. ابعاد آسکوکارپ‌ها  $(۲۳۳-۱۹۸) \times (۱۲۰/۵-۸۱/۴) \times (۲۸۱-۲۲۸) \times (۱۰۸/۶-۱۵۲)$  میکرومتر و میانگین اندازه گیری‌ها  $۱۹۵/۶۷ \pm ۲۸/۶۰ \times ۱۶۳/۶۰ \pm ۲۷/۰۴$  میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد آسکوکارپ) است و ۹۵ درصد اندازه گیری‌ها در بازه اطمینان  $۱۷۱/۳۷-۱۵۵/۸۴ \times ۲۰۳/۸۹-۱۸۷/۴۶$



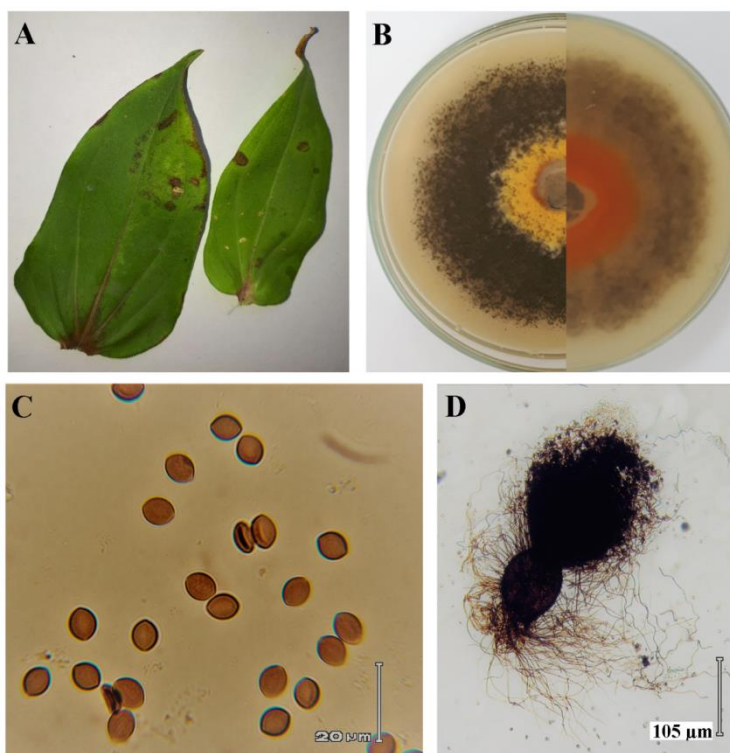
شکل ۳- ریخت‌شناسی گونه *C. ascotrichoides* (جدایه SCUA-AT10)؛ A. همراه با نشانه‌های پوسیدگی ساقه مشاهده شده در گیاه *Petunia hybrida*. B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA (سطح رویی و پشتی)، C. آسکوکارپ. D. آسکوسپورها

*tub2* نیز مشخص کرد جدایه‌های مطالعه شده (SCUA-SCUA-C3, D1 و SCUA-Neae) با سویه‌های شناخته شده از گونه *C. globosum* دارای ۹۸ تا ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی است. در درخت تبارشناسی ترسیمی مبتنی بر ناحیه *tub2* (شکل ۱)، این جدایه‌ها

۲-۳- نتایج مولکولی گونه *C. globosum*: نتایج جستجوی بلاست جدایه SCUA-D1 *C. globosum* نشان دادند توالی ITS این جدایه دارای ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی با سویه شناخته شده *C. globosum* CBS 160.62 است. جستجوی بلاست مبتنی بر توالی تکثیری

ChL-K14 خوشه‌بندی شدند و شاخه تکاملی معتبری با ارزش بوت‌استرپ ۹۸ درصد ایجاد کردند.

(SCUA-Neae و SCUA-C3، SCUA-D1) بسویه‌های *C. globosum* و *C. globosum* CBS 160.62



شکل ۴- ریخت‌شناسی گونه *C. globosum* (جدایه SCUA-D1)؛ A. همراه با نشانه‌های لکه‌برگی مشاهده‌شده در گیاه *Zinnia elegans*، B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA (سطح رویی و پشتی)، C. آسکوسپورها، D. آسکوکارپ

سه هفته در سطح محیط تشکیل می‌شوند. شبه‌آسکوکارپ‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره و شکل کروی یا نیمه کروی با موهای صاف و ضخیم در اطراف خود مشاهده می‌شوند. ابعاد شبه‌آسکوکارپ (۳۵/۵۳- $41/88-41/88 \times 20/94-20/94$ ) میکرومتر و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $31/72 \pm 8/87 \times 38/42 \pm 9/1$  میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد شبه‌آسکوکارپ) است و ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $34/24-41/02 \times 29/20-35/82$  میکرومتر قرار دارند. شبه‌آسکوکارپ‌های عقیم و بدون آسکوسپور تشکیل می‌شود.

#### ۴- گونه *Chaetomium rectangulare* Asgari & Zare,

*Mycologia* 103 (4): 872 (2011)

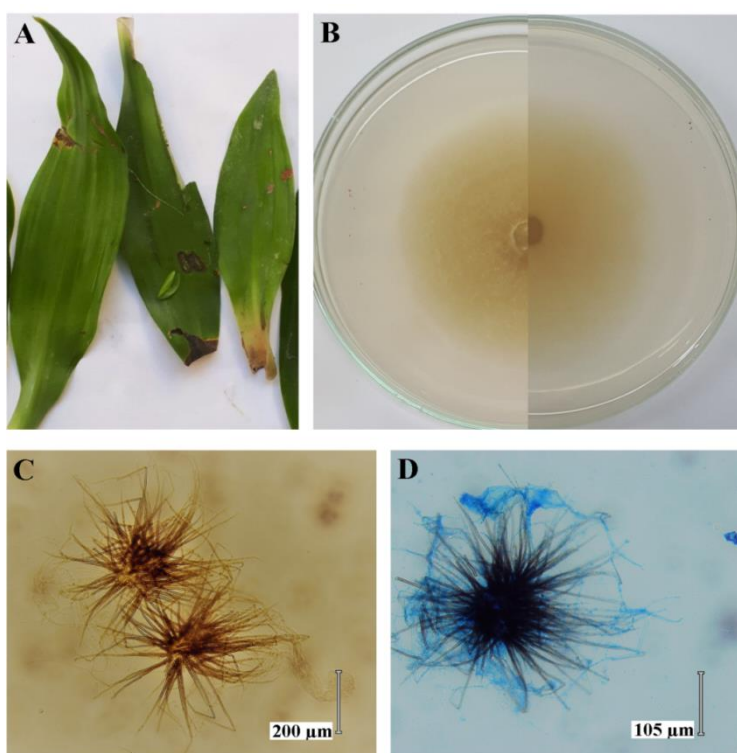
#### ۴-۱- ریخت‌شناسی گونه *C. rectangulare* (جدایه

SCUA-K3) (شکل ۵): قطر پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA در شرایط تاریکی مطلق و دمای  $28 \pm 0/5$  درجه سانتی‌گراد به مدت هشت روز برابر ۵۵ میلی‌متر است. رنگ پرگنه در سطح رویی تشک‌های پتری زرد با حاشیه سفید و منظم و در سطح پشتی به رنگ زرد با حاشیه بی‌رنگ و منظم مشاهده می‌شود. آسکوکارپ‌ها پس از حدود سه هفته در سطح محیط تشکیل می‌شوند. اندام‌هایی که شبیه آسکوکارپ و بدون آسکوسپور هستند (شبه‌آسکوکارپ‌ها) به شکل انفرادی پس از حدود

شناخته شده‌ای از گونه *C. rectangulare* ChL-K17 در ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت تبارشناسی ترسیمی مبتنی بر ناحیه *tub2* (شکل ۱)، جدایه *C. rectangulare* SCUA-K3 با سویه‌های *C. rectangulare* ChL-A34 و *C. rectangulare* ChL-K17 خوشه‌بندی شدند و یک شاخه تکاملی معتبر با ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد ایجاد کردند.

#### ۴-۲- نتایج مولکولی گونه *C. rectangulare*: نتایج

جستجوی بلاست جدایه *C. rectangulare* SCUA-K3 نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده *C. rectangulare* IRAN1641C و *C. rectangulare* CBS 126778 دارای ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی است. جستجوی بلاست مبتنی بر توالی تکثیری *tub2* این جدایه مشخص کرد با سویه



شکل ۵- ریخت‌شناسی گونه *C. rectangulare* (جدایه SCUA-K3); A. همراه با نشانه‌های لکه‌برگی مشاهده شده در گیاه *Dracaena Compacta*. B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA (سطح رویی و پشتی)، C و D. آسکوکارپ

تشتک‌های پتری سفید با حاشیه بی‌رنگ و منظم است و با افزایش سن به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی با حاشیه سفید و منظم مشاهده می‌شود. آسکوکارپ‌ها در مرکز به‌طور فشرده‌تر ایجاد می‌شوند و موهای اطراف آنها قهوه‌ای‌رنگ هستند. پرگنه در سطح زیرین تشتک پتری به رنگ زیتونی

#### ۵- گونه *Amesia atrobrunnea* (L.M. Ames) X. Wei

Wang & Samson, *Studies in Mycology* 84: 158 (2016)

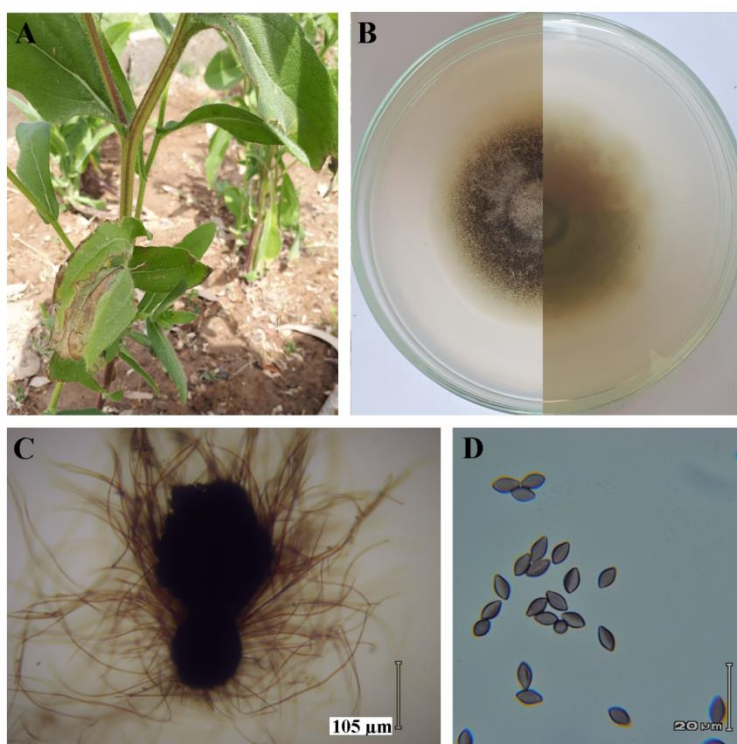
#### ۵-۱- ریخت‌شناسی گونه *A. atrobrunnea* (جدایه

SCUA-CO1) (شکل ۶): قطر پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA در شرایط تاریکی مطلق و دمای  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد به مدت هشت روز برابر ۴۱ میلی‌متر است. در مراحل اولیه رشد، رنگ پرگنه در سطح رویی

دیده می‌شود. میسلیوم‌ها به رنگ سفید رشد می‌کنند. آسکوکارپ‌ها به شکل انفرادی یا تجمع زنجیرمانند در سطح یا فرورفته در محیط تشکیل می‌شوند و رنگ آنها با افزایش سن تیره‌تر می‌شود. آسکوکارپ‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره و به شکل کروی یا نیمه‌کروی با موهای صاف و ضخیم در اطراف خود مشاهده می‌شوند. ابعاد آسکوکارپ‌ها  $126-70(63-155) \times (87-96-140)$  میکرومتر و میانگین اندازه گیری‌ها  $118/04 \pm 15/8 \times 95/21 \pm 115/07$  میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد آسکوکارپ) است و ۹۵ درصد اندازه گیری‌ها در بازه اطمینان  $110/62-119/51 \times 90/09-100/34$  میکرومتر قرار دارند. آسکوسپورها به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره و بادامی شکل با دیواره ضخیم هستند و اندازه آنها  $7-11/24 \times 4/21-5/62(-7/86)$  میکرومتر و میانگین اندازه گیری‌ها

۵-۲- نتایج مولکولی گونه *A. atrobrunnea*. نتایج جستجوی بلاست جدایه *A. atrobrunnea* SCUA-CO1 نشان دادند توالی تکثیری ناحیه *tub2* این جدایه با سویه‌های شناخته شده *A. atrobrunnea* CBS 379.66 و CBS 250.75 به ترتیب ۹۸ و ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت تبارشناسی ترسیمی مبتنی بر ناحیه *tub2* (شکل ۱)، جدایه *A. atrobrunnea* SCUA-CO1 با سویه تایپ *A. atrobrunnea* CBS 379.66 خوشه‌بندی شد و یک شاخه تکاملی معتبر با ارزش ۱۰۰ درصد ایجاد کرد.

دیده می‌شود. میسلیوم‌ها به رنگ سفید رشد می‌کنند. آسکوکارپ‌ها به شکل انفرادی یا تجمع زنجیرمانند در سطح یا فرورفته در محیط تشکیل می‌شوند و رنگ آنها با افزایش سن تیره‌تر می‌شود. آسکوکارپ‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره و به شکل کروی یا نیمه‌کروی با موهای صاف و ضخیم در اطراف خود مشاهده می‌شوند. ابعاد آسکوکارپ‌ها  $126-70(63-155) \times (87-96-140)$  میکرومتر و میانگین اندازه گیری‌ها  $118/04 \pm 15/8 \times 95/21 \pm 115/07$  میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد آسکوکارپ) است و ۹۵ درصد اندازه گیری‌ها در بازه اطمینان  $110/62-119/51 \times 90/09-100/34$  میکرومتر قرار دارند. آسکوسپورها به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره و بادامی شکل با دیواره ضخیم هستند و اندازه آنها  $7-11/24 \times 4/21-5/62(-7/86)$  میکرومتر و میانگین اندازه گیری‌ها



شکل ۶- ریخت‌شناسی گونه *A. atrobrunnea* (جدایه SCUA-CO1)؛ A. همراه نشانه‌های لکه‌برگی مشاهده شده در گیاه *Dahlia* sp. B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA (سطح رویی و پشتی)، C. آسکوکارپ، D. آسکواسپورها

## بحث

*atrobrunnea* را نخستین بار وانگ و همکاران (۲۷) بیمارگر انسانی معرفی کردند. چندین جدایه از این گونه باعث عفونت سیستمیک و عمیق در انسان می‌شوند. نام پیشین این گونه، *C. atrobrunneum* L.M. است Ames که از مواد و تجهیزات نظامی گزارش شده است (۴۱)؛ همچنین، این گونه از مواد کپک‌زده و هوا در ایسلند و هند (۲۷) و از گیاه جو (*Hordeum vulgare*) در آذربایجان شرقی ایران جداسازی شده است (۴۰).

## نتیجه‌گیری

همراهی گونه *C. olivaceum* روی گیاهان زینتی آهار، لادن و جعفری، گونه *C. ascotrichoides* روی گیاه زینتی اطلسی، گونه *C. globosum* روی گیاه زینتی آهار و اختر، گونه *C. rectangulare* روی گیاه زینتی کمپکت و گونه *A. atrobrunnea* روی گیاه زینتی کوکب برای نخستین بار در مطالعه حاضر گزارش شد؛ همچنین بر اساس دانش ما، این نخستین گزارش از گونه *C. ascotrichoides* در ایران است. شناسایی و توصیف گونه‌های دو جنس *Chaetomium* و *Amesia* از روی گیاهان مورد بررسی به شناسایی بیشتر میکروبیوتای ایران و میزبان‌های آنها کمک می‌کند.

## سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای حمایت مالی از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

## References

- (1) Gonianakis M., Neonakis I., Darivianaki E. Airborne Ascomycotina on the island of crete: seasonal patterns based on an 8-year volumetric survey. *Aerobiologia* 2005; 21: 69-74.

در مطالعه حاضر، گونه‌های *Chaetomium C. globosum*، *C. ascotrichoides*، *olivaceum* و *rectangulare* از روی *Amesia atrobrunnea* جداسازی شدند. گونه *C. olivaceum* را نخستین بار کوک<sup>۱۳</sup> و الیس<sup>۱۴</sup> (۳۹) توصیف کردند؛ این گونه تاکنون از کود گاو (هند)، کود شتر، خاک (چین) (۲۴) و کنجد (*Sesamum indicum*) در ایران (۴۰) جداسازی و شناسایی شده است. گونه *C. ascotrichoides* را نخستین بار کالویلو و همکاران (۱۹۷۲) توصیف کردند (۲۴)؛ پیش از آن، این گونه با نام‌های *C. gibberosporum*، *C. heterosporum* و *madrasense* معرفی شده بود. گونه یادشده از پنبه (آرژانتین)، پشم گوسفند، گوسفند مرده (چین) و خاک (اسرائیل) گزارش شده است (۲۴). گونه *C. globosum* را نخستین بار کنز در ۱۸۲۹ توصیف کرد (۲۴). گونه یادشده از کمپوست (آلمان)، کتاب کپک‌زده (هلند)، کاغذ، خاک رس و پنبه (آمریکا)، باغ گیاه‌شناسی (لهستان) و ساقه ازبین‌رفته گیاه هرز سازو (مجارستان) جداسازی شده است (۲۴)؛ همچنین در ایران از گیاه زردتاغ (*Haloxylon ammodendron*)، سفیدتاغ (*Haloxylon persicum*) در گنبد و سبزواری، ذرت (*Zea mays*) در کرج، ساری و مغان، سویا (*Glycine max*) و پنبه (*Gossypium hirsutum*) گزارش شده است (۴۰). گونه *C. rectangulare* را نخستین بار عسگری و زارع (۲۳) از دانه گندم (*Triticum aestivum*) در هادی‌شهر (آذربایجان غربی) و برگ‌های جو (*Hordeum vulgare*) در سلماس (آذربایجان شرقی) گزارش و توصیف کردند؛ این گونه از کود حیوانی در چین نیز جداسازی شده است (۲۴). گونه *Amesia*



- (2) Apetrei IC., Draganesc GE., Popescu IT. Possible cause of allergy for the librarians: books manipulation and ventilation as sources of fungus spores spreading. *Aerobiologia* 2009; 25: 159-166.
- (3) Polizzi V., Delmulle B., Adams A., Moretti A., Susca A., Picco AM. JEM spotlight: Fungi, mycotoxins and microbial volatile organic compounds in mouldy interiors from water-damaged buildings. *Journal of Environmental Monitoring* 2009; 11: 1849-1858.
- (4) Mason S., Cortes D., Horner WE. Detection of gaseous effluents and byproducts of fungal growth that affect environments (RP-1243). *Heating, Ventilation and Air Conditioning (HVAC) Systems Research* 2010; 16: 109-121.
- (5) Andersen B., Frisvad JC., Søndergaard I., Rasmussen IS., Larsen LS. Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77: 4180-4188.
- (6) Miller JD., McMullin DR. Fungal secondary metabolites as harmful indoor air contaminants: 10 years on. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2014; 98: 9953-9966.
- (7) Ames LM. *A monograph of the Chaetomiaceae*. Series 2. Washington D. C.: U. S. Army Research and Development; 1961.
- (8) von Arx JA., Guarro J., Figueras MJ. The Ascomycete genus *Chaetomium*. *Beihefte Zur nova Hedwigia* 1986; 84: 1-162.
- (9) Kunze G., Schmidt JK. *Mykologische Hefte*. vol. 2. Leipzig: Vossische Buchhandlung; 1817.
- (10) Corda ACJ. *Icones Fungorum Hucusque Cognitorum*. vol. 4. Prague: Calve JG.; 1840.
- (11) Fries E. *Summa vegetabilium scandinaviae*. Stockholm and Leipzig: Typographia Academica; 1849.
- (12) Zopf W. Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten: *Chaetomium*. *Nova Acta der Kaiserlich Leopoldinisch-Carolinisch Deutschen Aakademie der Naturforscher* 1881; 42: 199-292.
- (13) Chivers AH. A monograph of the genera *Chaetomium* and *Ascotricha*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 1915; 14: 155-240.
- (14) Skolko AJ., Groves JW. Notes on seed-borne fungi VII. *Chaetomium*. *Canadian Journal of Botany* 1953; 31: 779-809.
- (15) Udagawa S. A taxonomic study on the Japanese species of *Chaetomium*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 1960; 6: 223-251.
- (16) Seth HK. A monograph of the genus *Chaetomium*. *Beihefte Zur nova Hedwigia* 1970; 37: 1-133.
- (17) Fuckel L. *Symbolae mycologicae. Beitrage zur Kenntniss der Rheinischen Pilze*. *Jahrbucher des Nassauischen Vereins fur Naturkunde* 1870; 23-24: 1-459.
- (18) Sorgel G. Zum problem der trennung von arten bei pilzen, dargestellt am beispiel der ascomycetengattung *Chaetomium*. *Archives of Microbiology* 1960; 36: 51-66.
- (19) Dreyfuss M. Taxonomische untersuchungen innerhalb der gattung *Chaetomium*. *Sydowia* 1976; 28: 50-133.
- (20) Millner PD., Motta JJ., Lentz PL. Ascospores, germ pores, ultrastructure, and thermophilism of *Chaetomium*. *Mycologia* 1977; 69: 720-733.
- (21) von Arx JA., Dreyfuss M., Muller E. A reevaluation of *Chaetomium* and Chaetomiaceae. *Persoonia* 1984; 12: 169-179.
- (22) Greif MD., Stchigel AM., Miller AN., Huhndorf SM. A re-evaluation of genus *Chaetomidium* based on molecular and

- morphological characters. *Mycologia* 2009; 101: 554-564.
- (23) Asgari B., Zare R. The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species. *Mycologia* 2011; 103: 863-882.
- (24) Wang XW., Lombard L., Groenewald JZ., Li J., Videira SI., Samson RA., Liu XZ., Crous PW. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. *Persoonia* 2016a; 36: 83-133.
- (25) Stchigel AM., Guarro J., Jato V., Aira MJ. Two new species of *Chaetomidium* (Sordariales). *Studies in Mycology* 2004; 50: 215-220.
- (26) Greif MD., Currah RS. Development and dehiscence of the cephalothecoid peridium in *Aporoethelavia leptoderma* shows it belongs in *Chaetomidium*. *Mycological Research* 2007; 111: 70-77.
- (27) Wang XW., Houbraken J., Groenewald JZ., Meijer M., Andersen B., Nielsen KF., Crous PW., Samson RA. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology* 2016b; 84: 145-224.
- (28) von Arx JA. On *Achaetomium* and a new genus *Subramaniula*. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Plant Science)* 1975; 94: 341-345.
- (29) Alexopoulos CJ, Beneke ES. *Laboratory manual for introductory mycology*. Minneapolis: Burgess Pub. Co; 1962.
- (30) Beneke ES., Rogers AL. *Medical mycology and human mycoses*. Belmont: Star Publishing Company; 1996.
- (31) Raeder U., Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1985; 1: 17-20.
- (32) Ahmadpour SA., Mehrabi-Koushki M., Farokhinejad R. *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia* 2017; 69: 171-182.
- (33) White TJ., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA., Gelfand DH., Shinsky JJ., White TJ., editors. *PC Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1990: 315-322.
- (34) O'Donnell K. *Fusarium* and ITS near relatives. In: Reynolds DR., Taylor JW., editors. *The fungal jolomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Wallingford: CAB International; 1993: 225-233.
- (35) O'Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1997; 7: 103-116.
- (36) Groenewald JZ., Nakashima C., Nishikawa J., Shin HD., Park JH., Jama AN., Groenewald M., Braun U., Crous PW. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Study in Mycology* 2013; 75: 115-170.
- (37) Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41: 95-98.
- (38) Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 2725-2729.
- (39) Cooke MC., Ellis JB. New Jersey fungi. *Grevillea* 1878; 6: 81-96.
- (40) Ershad D. *Fungi of Iran*. 3rd ed. Tehran: Iranian research institute of plant protection; 2009.
- (41) Ames LM. New cellulose destroying fungi isolated from military material and equipment. *Mycologia* 1949; 41: 641.

- 
- 1- Kunze
  - 2- Sorgel
  - 3- Dreyfuss
  - 4- Millner
  - 5- von Arx
  - 6- Greif
  - 7- Asgari
  - 8- Zare
  - 9- Beneke
  - 10- Rogers
  - 11- Raeder
  - 12- Broda
  - 13- Cooke
  - 14- Ellis