Penicillium albocoremium، آرایه جدید از پیازهای گل لاله در ایران

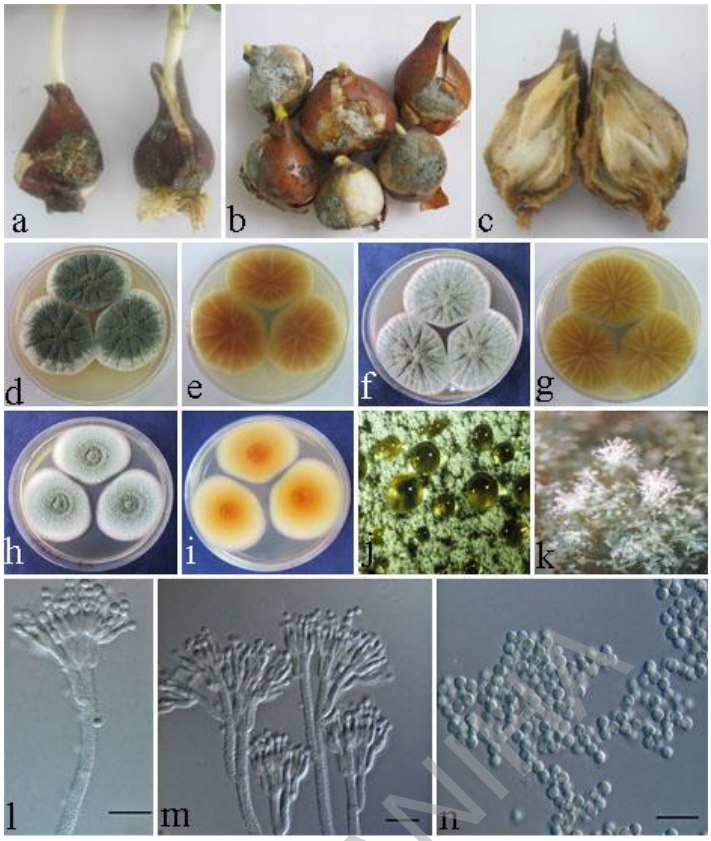
دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۶ / پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۸

یوبرت قوستا: دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (y.ghoosta@urmia.ac.ir)
رزیتا صمدی: کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آفاق، ارومیه، ایران

طی سال‌های اخیر، کشت گل‌های لاله به طور گسترده‌ای در پارک‌ها و فضاهای سبز شهر ارومیه رایج شده است. در بررسی‌های انجام شده در فاصله سال‌های ۹۵-۱۳۹۳، موارد متعددی از نشانه‌های مرتبط با بیماری پوسیدگی کپک آبی پیازهای کشت و نگهداری شده در شرایط انبار از گونه *Tulipa gesneriana* L. مشاهده شد که پیازهای پوسیده، توسط پوشش سفید تا سبز مایل به آبی از میسلیوم‌ها و هاگ‌های قارچی پوشیده شده بودند. به منظور شناسایی قارچ‌های همراه با پوسیدگی پیاز گل‌های لاله، پیازهای دارای نشانه‌های آلودگی (شکل‌های 1a-c) از مناطق مختلف تحت پوشش فضای سبز و نیز گلخانه‌های شهرداری جمع‌آوری شدند. برای جداسازی قارچ‌ها از دو روش استفاده شد: در روش اول، قطعات کوچکی از پرگنه‌های قارچی از سطح پیازها توسط یک سوزن سترون برداشته و سوسپانسیون هاگ در داخل آب مقطر سترون تهیه شد. مقدار کمی از این سوسپانسیون روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار که حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین بود، پخش گردید. در روش دوم، پیازها ابتدا به طور کامل زیر آب جاری شیر شسته شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی گردیدند و بلافاصله سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. بخش‌های بیرونی پیازها حذف و از بخش‌های داخلی، قطعات کوچکی برداشته شد و در سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار کشت شدند (Kim *et al.* 2006, Valdez *et al.* 2009). تشتک‌های پتری در آنکوباتور با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. جدایه‌های قارچی با استفاده از روش تک‌اسپور کردن خالص‌سازی شدند و در داخل لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت سیب‌زمینی-هویج-آگار (PCA) در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. از ۴۰ جدایه به دست آمده، به غیر از سه جدایه که متعلق به جنس *Rhizopus* بودند، بقیه جدایه‌ها ویژگی‌های شاخص جنس *Penicillium* را دارا بودند. برای شناسایی ریخت‌شناختی، جدایه‌های خالص شده روی محیط‌های کشت عصاره مالت آگار (MEA)، زاپک آگار (CZ)، زاپک مخمر اتولیزات آگار (CYA) و عصاره مخمر سوکروز آگار (YES) به صورت سه نقطه‌ای کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی برای هفت روز نگهداری شدند. رنگ سطح رویی و زیرین پرگنه براساس نگاره رنگی راینر (۱۹۷۰) تعیین شد. برای تهیه لام‌های میکروسکوپی، اسید لاکتیک به عنوان محلول تثبیت کننده و یک قطره اتانول برای حذف هاگ‌های زیادی اضافه شد. تمام صفات اندازه‌گیری شده، در بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر میکروسکوپ نوری المپوس مدل AF1 بررسی شدند و از هر صفت، تعداد ۳۰ مورد اندازه‌گیری گردید. بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناختی، تمامی جدایه‌ها به عنوان گونه *Penicillium albocoremium* (Frisvad) Frisvad شناسایی شدند (Visagie *et al.* 2014, Houbraken & Samson 2011, Kim *et al.* 2006, Overy *et al.* 2005, Frisvad & Samson 2004, Overy & Frisvad 2003). براساس اطلاعات نگارندگان، این نخستین گزارش از وجود این گونه در ایران است. جدایه Pen081 از این گونه، به شماره دستیابی IRAN 2425C در کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران واقع در مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) نگهداری می‌شود. توصیف این گونه به شرح زیر است:

قطر رشد پرگنه روی محیط کشت CZ برابر با ۳۴ میلی‌متر؛ رشد به صورت دسته‌ای (fasciculate)، حاشیه کامل، دارای برآمدگی در بخش مرکزی و با ۱۱-۸ شیار شعاعی؛ میسلیوم‌ها سفید رنگ؛ هاگ‌زایی متراکم و به رنگ سبز مایل به آبی؛ با ترشحات فراوان به رنگ زرد روشن و رنگدانه‌های محلول به رنگ زرد، فاقد سختینه؛ سطح زیرین پرگنه به رنگ قرمز مایل به زرد؛ قطر رشدی پرگنه روی محیط کشت CYA برابر با ۴۵ میلی‌متر، دارای بافت کرک‌دار تا رشد به صورت دسته‌ای، با ۱۴-۹ شیار شعاعی؛ میسلیوم‌ها سفید رنگ؛ هاگ‌زایی متراکم و به رنگ سبز تیره؛ ترشحات به صورت پراکنده و به رنگ زرد فسفری، بدون رنگدانه‌های محلول؛ فاقد سختینه؛ سطح زیرین

ROSTANIHA



شکل ۱- *Penicillium albocoremium*: نشانه‌های پوسیدگی کپک آبی در پیاز گل‌های لاله به همراه تغییر رنگ قهوه‌ای و پوشش قارچی سفید تا سبز مایل به آبی (a-b) و پیاز کاملا پوسیده (c). ویژگی‌های پرگنه روی محیط‌های کشت زاپک مخمر اتولیزات آگار (d-e)، عصاره مخمر سوکروز آگار (f-g) و عصاره مالت آگار (h-i) بعد از گذشت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس (e, g و i مربوط به سطح زیرین پرگنه‌ها می‌باشند). j، قطرات ترشحی. k، ریسه‌های دسته‌ای. l-m، هاگ‌برها، راموس‌ها، رامولوس‌ها، متولاها و فیالیدها. n، هاگ‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. *Penicillium albocoremium*: Symptoms of tulip blue mold rot with brown discoloration and grayish green fungal hyphae and spores (a-b) and a bulb with sever rot symptoms (c). Colony characteristics grown for seven days at 25° C on CYA (d-e); YES (f-g) and MEA (h-i), (e, g and i are reverse). j. Exudate droplets. k. Fasciculate hyphae; l-m. Conidiophores, rami, ramuli, metulae and phialides. n. Conidia (Bars = 10 µm).

ROSTANIHA

پرگنه در بخش مرکزی زرد رنگ و در حاشیه زرد طلایی روشن می‌باشد. قطر رشدی پرگنه روی محیط کشت MEA برابر با ۴۳ میلی‌متر، دارای بافت کرک‌دار تا رشد به صورت دسته‌ای، فاقد شیارهای شعاعی، دارای برجستگی در بخش مرکزی؛ هاگ‌زایی متراکم و به رنگ سبز که به سطح پرگنه ظاهر گرانوله‌ای می‌دهد؛ ترشحات به میزان متوسط و به رنگ نارنجی؛ فاقد رنگدانه‌های محلول؛ فاقد سختینه؛ سطح زیرین پرگنه در بخش مرکزی به رنگ نارنجی روشن و در حاشیه‌ها زرد رنگ می‌باشد. قطر رشدی پرگنه روی محیط کشت YES برابر با ۴۰ میلی‌متر، دارای بافت کرک‌دار تا رشد به صورت متراکم، دارای ۲۱-۱۶ شیار شعاعی؛ میسلیوم‌ها سفید رنگ؛ هاگ‌زایی متراکم و به رنگ سبز تیره؛ ترشحات در مرکز پرگنه تولید شده و به رنگ زرد فسفری هستند؛ فاقد رنگدانه محلول؛ فاقد سختینه؛ سطح زیرین پرگنه در بخش مرکزی به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای و در حاشیه‌ها زرد روشن می‌باشد (شکل‌های ۱d-k).

هاگ‌برها دارای انشعاب در سه سطح، ندرتا در چهار سطح و اغلب کم و بیش به صورت دسته‌های مشخصی مجتمع شده‌اند؛ فیالیدها فلاسکی شکل با نوک کوتاه، دارای سطح صاف، به ابعاد (۴-)۲/۵-۲(-۱/۵) × (۲۵-)۱۱-۸(-۷) میکرومتر؛ متولاها استوانه‌ای شکل، در انتها عریض شده، با دیواره زبر، به ابعاد (۴-)۳-۲/۵(-۲) × (۳۲-)۱۸-۱۵(-۱۰) میکرومتر؛ رامولوس‌ها استوانه‌ای، در انتها عریض شده، با دیواره زبر و

به ابعاد (۴-)۳-۲/۵(-۲) × (۳۲-)۱۸-۱۵(-۱۰) میکرومتر؛ راموس‌ها استوانه‌ای و با دیواره زبر، به ابعاد ۴-۳ × ۲۸-۲۰ میکرومتر، پایه‌ها با دیواره زبر، به ابعاد ۴/۵-۳/۵ × ۲۰۰۰-۱۷۰ میکرومتر؛ هاگ‌ها با دیواره صاف، کروی تا نسبتا کروی و به قطر (۵-) ۳-۲ میکرومتر هستند (شکل‌های n-1l).

این گونه از پیازهای گیاهان خوراکی و یا زینتی مانند گونه‌های مختلف جنس *Allium*، گل‌داوودی، زنبق‌هلندی، سوسن و گل‌لاله، به عنوان عامل بیماری‌زا و از ریشه‌های گیاهان کرفس، جعفری‌فرنگی، زنجبیل، کلم‌پیچ، توت‌فرنگی جنگلی، سیب‌زمینی ترشی و همچنین از کیک، فرآورده‌های گوشتی، محیط‌های سربسته و نمک‌زارها در آلمان، آمریکا، انگلستان، دانمارک، کره و هلند گزارش شده است (Overy & Frisvad 2003, Frisvad & Samson 2004, Kim *et al*. 2006, Dugan *et al*. 2017). گونه *P. albocoremium* دارای شباهت‌های ریخت‌شناختی میکروسکوپی به خصوص از نظر ابعاد هاگ‌ها، فیالیدها، متولاها، رامولوس‌ها، راموس‌ها و پایه‌ها و نیز الگوی انشعابات هاگ‌برها با گونه‌های *Penicillium tulipae* و *P. radicicola* است، ولی به دلیل تفاوت‌ها در تزیینات دیواره پایه‌های هاگ‌برها، الگوی رشد دسته‌ای، رنگ سطح پشتی پرگنه‌ها در محیط‌های کشت CYA و YES و نیز هاگ‌زایی فراوان روی محیط کشت YES از گونه‌های اخیر متمایز می‌شود (Frisvad & Samson 2004).

***Penicillium albocoremium*, a new taxon from tulip bulbs in Iran**

Received: 05.04.2017 / Accepted: 09.07.2017

Youbert Ghosta: Associate Prof. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, P.O. Box 165, Urmia, Iran (y.ghoosta@urmia.ac.ir)

Rosita Samadi: MSc in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Afagh University, Urmia, Iran

ROSTANIHA

In recent years, tulip flowers have been grown extensively in parks and green spaces of Urmia city (NW Iran). During the surveys in a period from 2014–16, characteristic symptoms of the blue mold rot were observed on both planted and stored tulip bulbs, as the bulbs were covered with a white to bluish-green mycelia and spores. In order to determine the fungi associated with tulip bulbs (*Tulipa gesneriana* L.), the bulbs with characteristic rot symptoms or signs (Fig. 1a-c) were collected from different green spaces and municipal greenhouses. The fungi were isolated in two ways: First, small pieces of fungal colonies were taken with a sterile fine needle and a suspension of spores was prepared in sterile distilled water. A small aliquot of suspension was spread all over the PDA medium amended with streptomycin sulfate. Second, the bulbs were washed thoroughly under tap water, then surface sterilized in 0.5% sodium hypochlorite solution for 10 minutes and washed for three times again with sterile distilled water. The outer parts of the bulbs were removed and small pieces were taken from the inner parts and put on PDA medium (Kim *et al*. 2006, Valdez *et al*. 2009). Petri dishes were incubated at 25±2º C in dark. The isolated fungi were purified using single spore method and the purified isolates were stored on PCA slants at 4° C. From the 40 obtained isolates, except three which were belonged to the genus *Rhizopus*, the remaining isolates had typical characteristics of the genus *Penicillium*. For morphological characterization, the purified isolates were three points inoculated onto malt extract agar (MEA), Czapek's agar (CZ), Czapek yeast autolysate agar (CYA) and yeast extract sucrose agar (YES), and incubated for seven days in dark at 25° C. Colony colors were determined based on Rayner's (1970) color chart. Lactic acid was used as a mounting fluid and a drop of 75% ethanol was added to remove excess conidia. Measurements of all parameters were made at ×1000 magnification using Olympus AF1 microscope, with 30 measurements per structure.

Based on morphological studies, all the isolates were identified as *Penicillium albocoremium* (Frisvad) Frisvad (Visagie *et al*. 2014, Houbraken & Samson 2011, Kim *et al*. 2006, Overy *et al*. 2005, Frisvad & Samson 2004, Overy & Frisvad 2003). To the best of our knowledge, this is the first report of this species from Iran. A representative isolate (Pen081), was deposited under IRAN 2425C in the Iranian Fungal Culture Collection at the Iranian Research Institute of Plant Protection (Tehran, Iran). A description of the fungus is given bellow:

Colony on CZ reaching 34 mm diam., with fasciculate growth, center umbonate and with 8–11 radially sulcae; margin entire, mycelium white; sporulation dense, in bluish-green shades; exudates abundant, pure yellow; soluble pigments present, apricot in color; sclerotia absent; reverse scarlet. Colony on CYA reaching 45 mm diam., lanose to fasciculate, with 9–14 radially sulcae; mycelium white; sporulation dense; in dark green shades; exudates sparse, sulphur yellow; soluble pigments absent; sclerotia absent; reverse apricot in center and pale luteus at margins. Colony on MEA reaching 43 mm diam., lanose to fasciculate; mycelium white, plane, without radial sulcae, center umbonate; sporulation dense, in greenish shades, giving a granular appearance to the colony surface; exudates moderate, orange; soluble pigments absent; sclerotia absent; reverse light orange in center and yellow at margins. Colony on YES reaching 40 mm diam., lanose to fasciculate; with 16–21 radial sulcae; mycelium white; sporulation dense, in greenish-green shades; exudates mainly produced at center, clear sulphur yellow; soluble pigments absent; sclerotia absent; reverse brownish-yellow at center to pale yellow at margins (Fig. 1 d-k). Conidiophores treverticillate, rarely quarterverticillate, more or less aggregated into definite fascicles; phialides flask-shaped, with short necks, smooth-walled, (7–)8–11(–25) (1.5–)2–2.5(–4) µm; metulae cylindrical, apically inflated, rough- or smooth-walled, (2–)9.5–11.5(–16) × 3–4 µm; ramuli cylindrical, apically inflated, rough-walled, (10–)15–18(–32) × (2–)2.5–3(–4) µm; rami cylindrical, rough-walled, 20–28 × 3–4 µm; stipes rough-walled, 3.5–4.5 × 170–2000 µm; conidia smooth-walled, globose to subglobose, 2–3(–5) µm (Fig. 1 l-n).

This species has been reported from edible and/or ornamental bulbs such as *Allium* spp., *Chrysanthemum* sp., *Iris* × *hollandica*, *Lilium longiflorum* Thumb., and *Tulipa* sp., mainly as a pathogen, from the roots of *Apium graveolens* L., *Petroselinum crispum* Mill., *Zingiber officinale* Roscoe, and on *Glycyrrhiza* sp., *Brassica oleracea* L., *Fragaria vesca* L., *Helianthus tuberosus* L., cake, salami, indoor air and in a saltern in Denmark, Germany, Korea, the Netherlands and USA (Overy & Frisvad 2003, Frisvad & Samson 2004, Kim *et al*. 2006, Dugan *et al*. 2017).

Penicillium albocoremium has micro-morphological resemblance especially in dimensions of conidia, phialides, metula, ramuli, rami and stipes as well as conidiophore branching pattern with *Penicillium tulipae*, and *P. radicicola*, but it could be distinguished based on wall ornamentation of the stipes, fasciculation, colony reverse color on CYA and YES media and also abundant sporulation on YES (Frisvad & Samson 2004).

POSTANIHA

References

Dugan, F.M., Lupien, S.L., Vahling-Armstrong, C.M, Chastagner, G.A. & Schroeder, B.K. 2017. Host ranges of *Penicillium* species causing blue mold of bulb crops in Washington State and Idaho. Crop Protection 96: 265–272.

Frisvad, J.C. & Samson, R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Studies in Mycology 49: 1–174.

Houbraken, J. & Samson, R.A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. Studies in Mycology 70: 1–51.

Kim, W.K., Park, M.S., Hahm, S-S & Yu, S. 2006. Two new records of *Penicillium* associated with blue moldy bulbs of Lily in Korea. Mycobiology 34: 176–179.

Overy, D.P. & Frisvad, J.C. 2003. New *Penicillium* species associated with bulbs and root vegetables. Systematics and Applied Microbiology 26: 631–639.

Overy, D.P., Frisvad, J.C., Steinmeier, U. & Thrane, U. 2005. Clarification of the agents causing blue mold storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. Postharvest Biology and Technology 35: 217–221.

Valdez, J.G., Makuch, M.A., Ordovini, A.F., Frisvad, J.C., Overy, D.P., Masuelli, R.W. & Piccolo, R.J. 2009. Identification, pathogenicity and distribution of *Penicillium* spp. isolated from garlic in two regions in Argentina. Plant Pathology 58: 352–361.

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C. Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. & Samson, R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Studies in Mycology 78: 343–371.

ROSTANIHA