First report of *Neocosmospora vasinfecta* isolated from uncultivated soil in Iran

Received: 18.11.2018 / Accepted: 29.12.2018

Shima Saeedi: MSc Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

Samad Jamali⌧: Assistant Prof., Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran (jamali454@yahoo.com)

Neocosmospora E.F. Smith is a filamentous ascomycete fungal genus belong to *Hypocreales* order and contains several species mainly pathogenic for plants (Cannon & Hawksworth 1982). Species of *Neocosmospora* are known to live in the soil of tropical or subtropical areas and often in association with plant roots. During summer 2017, for isolation of *Fusarium* species from uncultivated soil (foothill) in Qasr-e Shirin (Kermanshah province, Iran), we recovered one isolate of *Neocosmospora.* Soil samples were collected from 0–20 cm depth. The isolates were recovered using a soil dilution plate method directly from uncultivated soil. Isolation was performed from soil using komada and potato dextrose agar. Genomic DNA was extracted using CTAB method (Garde *et al.* 1991). The internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and apart of the Ef1-α translation elongation factor (TEF1) gene were amplified by PCR using the primer pair ITS1 (5-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3)/ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (White *et al.* 1990) and EF1F (5-ATGGGTAAGGAGGACAAGACTC-3)/EF1R (5-TGGAGATACCAGCCTCGAAC-3) (O'Donnell *et al.* 2008) in a final volume of 25 µM reaction containing 20 ng genomic DNA, 1 µM of each primer, 100 µM of each dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase (CinnaGen, Iran), 1.5 mM of MgCl2, 2.5 µM of 10 × PCR buffer (CinnaGen, Iran), and 14.5 µM H2O. Amplifications were conducted in a T-Personal thermocycler (Biometra, Germany) for 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 60 s, with initial denaturation of 3 min at 94 °C before cycling and a final extension of 10 min at 72 °C after cycling. A portion (5 µM) of the amplified product was run on 1% TBE-agarose gel and the presence of a single band (ca. 540 bp) was a check for successful amplification. Phylogenetic analyses were conducted with maximum likelihood (ML) in the Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) Ver. 5 program (Tamura *et al.* 2011). The best fit nucleotide substitution model (Jukes-Cantor) was based on the bayesian information criterion and was implemented in MEGA 5. Sequence produced in this study is deposited in GenBank under accession numbers MG811579 (ITS region), and MH976665 (Ef1-α). Mycelium white to creamish (Fig. 1A). Perithecia orange to pinkish red, globose to subpyriform with small neck, ostiolate, 240–350 µm tall and periphyses present (Fig. 1B). Asci cylindrical, 8-spored, thin-walled, not amyloid, with truncated apex with a short pedicel, and 80–100 × 10–12 µm (Fig. 1C). Ascospores were uniseriate, rugose ornamentation, globose to ellipsoidal, hyaline when immature and brown at maturity, sometimes with oil droplets, and 11.23(10–12.58) × 9.63(8.03–10.45) µm (Fig. 1D). The fungal isolate was identified as *N. vasinfecta* using morphological characteristics and sequence analysis of ITS region and apart of the Ef1-α translation elongation factor. Based on a BLASTn search of NCBI GenBank nucleotide database, the closest sequence to our fungus (GenBank Accession Nos: MG811579 for ITS, and MH976665 for Ef1-α translation elongation factor) was *N. vasinfecta* isolated from soil from India (GenBank KM231804; identities = 99%) and France (GenBank JX997934; identities = 100%). The phylogenetic analysis of the sequenced ITS fragment positioned the our isolate within the *N. vasinfecta* clade (94 %) (Fig. 2). *Neocosmospora vasinfecta* has been reported from soil in South Africa and India (Lombard *et al.* 2015), clinical materials in France and Senegal (Ben Hamida *et al.* 1993, Dromer *et al.* 1997, Kac *et al.* 1999, Gabriel *et al.* 2013), and animal dungs (Doveri 2011). This species have been also reported as phytopathogenic fungus from peanuts in Vietnam, Australia, South Africa and Taiwan (Dau *et al.* 2010, Fuhlbohm *et al.* 2007, Huang *et al.* 1992, Baard & van Wyk 1985), *Arachis hypogaea* plant in Guinea (Lombard *et al.* 2015), and other plants (Manikandan *et al.* 2011). A culture of the fungus is deposited at the Iranian Fungal Culture Collection, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran. To our knowledge, this is the first report of *N. vasinfecta* from Iran.

Specimen examined: Iran: Kermanshah province, Qasr-e Shirin, 45° 95′ E, 33° 96′ N, 26.06.2017, from uncultivated soil, Sh. Saeedi (IRAN 3320 C).

ROSTANIHA

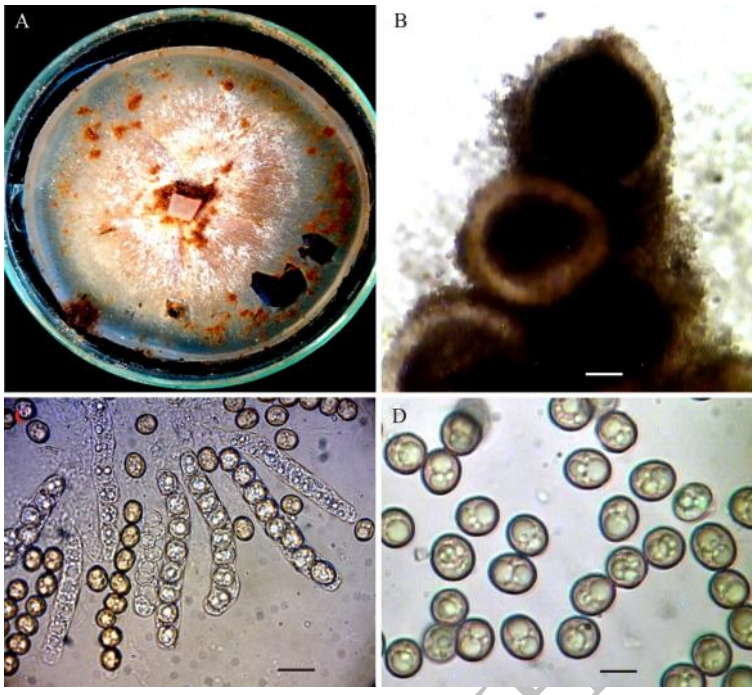

Fig. 1. A. Colony of *Neocosmospora vasinfecta* on PDA with orange ascomata, B. Ostiolate perithecia, C. Asci with immature ascospores, D. Mature ascospores with oil droplets (Bars = 10 µm).

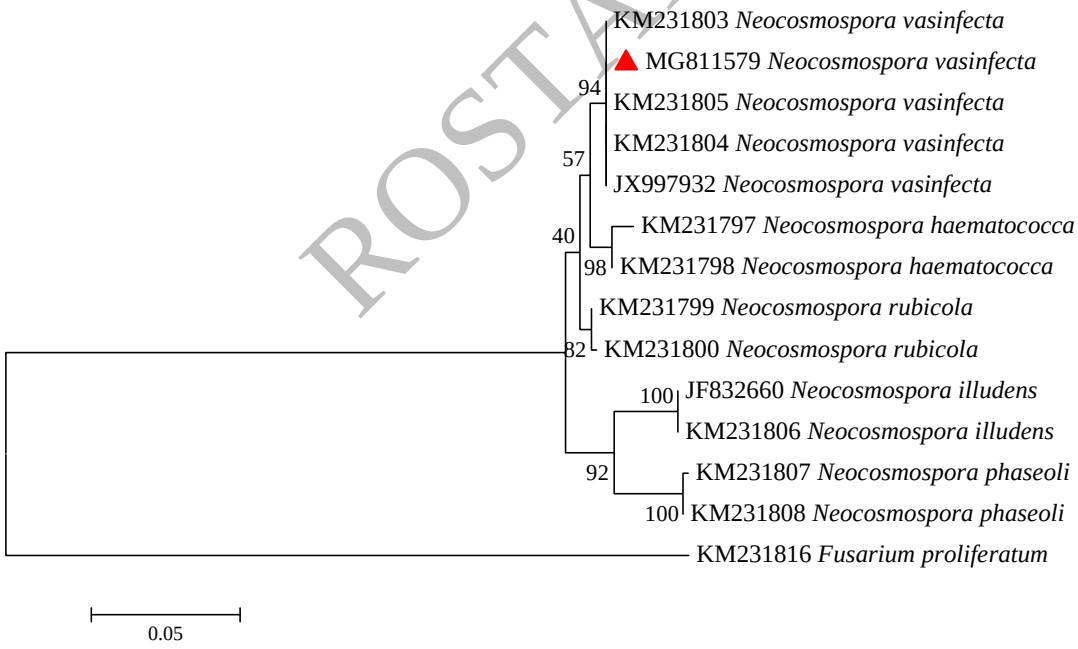

Fig. 2. Maximum likelihood phylogram generated in MEGA 5 from the alignment of 14 combined ITS1-5.8S-ITS2 regions of the genomic ribosomal DNA sequences of *Neocosmospora* species using Jukes-Cantor model with complete deletion gap handling and 1000-replication bootstrapping.

ROSTANIHA

References

Baard, S.W. & van Wyk, P.S. 1985. *Neocosmospora vasinfecta* pathogenic to groundnuts in South Africa. Phytophylactica 17: 49–50.

Ben Hamida, F., Achard, J.M., Westeel. P.F., Chandenier, J., Bouzernidj, M., Petit, J. & Fournier, A. 1993. Leg granuloma due to *Neocosmospora* v*asinfecta* in a renal graft recipient. Transplantation Proceedings 25: 2292.

Cannon, P.F. & Hawksworth, D.L. 1982. A revision of the genus *Neocosmospora* (*Hypocreales*). Transaction British Mycological Society 82: 673–688.

Doveri, F. 2011. Additions to "Fungi Fimicoli Italici": An update on the occurrence of coprophilous Basidiomycetes and Ascomycetes in Italy with new records and descriptions. Mycosphere 2: 331–427.

Dau, V.T., Pham, L.T., Luong, T.M., Huynh, L.M.T., Tran, N.T., Ho, T.D., Hoang, H.M.T., Phan, H.T. & Burgess, L.W. 2010. First report of *Neocosmospora vasinfecta* associated with the root rot complex of peanuts in Vietnam. Australasian Plant Disease Notes 5: 79–81.

Fuhlbohm, M.F., Tatnell, J.R. & Ryley, M.J. 2007. *Neocosmospora vasinfecta* is pathogenic on peanut in Queensland. Australasian Plant Disease Notes 2: 3–4.

Gabriel, F., DAlmeida, M., Albert, O., Fitton-Ouhabi, V., Noel, T. & Accoceberry, I. 2013. A disseminated infection with the antifungal-multiresistant teleomorphic fungus *Neocosmospora vasinfecta* in apatient with acute B-lymphoblastic leukemia. Medical Mycology Case Reports 2: 44–47.

Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Bruns, T.D. & Taylor, J.W. 1991. Identification of Indigenous and Introduced Symbiotic Fungi in *Ectomycorrhizae* by Amplification of Nuclear and Mitochondria1 Ribosomal DNA. Canadian Journal of Botany 69: 180–190.

Huang, J.W., Chen, S.S. & Chung, W. 1992. Neocosmospora foot rot of peanut in Taiwan. Plant Pathology Bulletin 1: 203–205.

Kac, G., Piriou, P., Gueho, E., Roux, P., Tremoulet, J., Denis, M. & Judet, T. 1999. Osteoarthritis caused by *Neocosmospora vasinfecta*. Medical Mycology 37: 213–217.

Lombard, L., van der Merwe, N.A., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2015. Generic concepts in *Nectriaceae*. Studies in Mycology 80: 189–245.

Manikandan, P. Vágvölgyi, C., Narendran, V., Panneer Selvam, K. & Kredics, L. 2011. *Neocosmospora*. Pp. 449–458. *In*: Molecular Detection of Human Fungal Pathogens (D. Liu., ed.). CRC Press.

O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., Mc Carthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N. & Geiser, D.M. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haploty penomenclature, and in vitro antifungal resistance with in the *Fusarium solani* species complex. Journal of Clinical Microbiology 46: 2477–2490.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28(10): 2731–2739.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Pp. 315–322. *In*: "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (Gelfand, M.A., Sninsky, D.H. & White, T.J., eds). Academic Press, San Diego, CA.

ROSTANIHA

نخستین گزارش از گونه *Neocosmospora vasinfecta* جداسازی شده از خاک‌های بکر در ایران*

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۷ / پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۸

شیما سعیدی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
صمد جمالی✉: استادیار قارچ‌شناسی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (jamali454@yahoo.com)

در تابستان سال ۱۳۹۶، طی یک بررسی به منظور شناسایی گونه‌های قارچی از خاک‌های بکر استان کرمانشاه، نمونه‌های خاک از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری جمع‌آوری و از خاک جداسازی و سپس با روش تهیه رقت با استفاده از محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار صورت گرفت. در این بررسی، یک جدایه از خاک بکر (دامنه کوه) سومار واقع در منطقه قصر شیرین به دست آمد. میسلیوم در این جدایه به رنگ سفید مایل به کرم بود (شکل 1A). پریتسیوم نارنجی رنگ تا قرمز تیره، کروی تا گلابی شکل با گردن کوتاه، روزنه‌دار، دارای پریفیز و به ابعاد ۲۴۰ تا ۳۵۰ میکرومتر بود (شکل 1B). آسک‌ها سیلندری، دارای هشت آسکوسپور، دیواره نازک، غیرآمیلوییدی، با انتهای صاف و پدیسل کوتاه و به ابعاد ۱۲–۱۰ × ۱۰۰–۸۰ میکرومتر بود (شکل 1C). آسکوسپورها یک جداره، دارای دیواره مضرس، کروی تا بیضوی، شفاف و در زمان بلوغ قهوه‌ای و گاهی اوقات دارای قطره روغن و به ابعاد ۹/۶۳ × ۱۱/۲۳ میکرومتر بود (شکل 1D). براساس خصوصیات مورفولوژیکی، این جدایه *Neocosmospora* شناسایی شد. برای شناسایی گونه، اسخراج دی.ان.ای. به روش سی تب صورت گرفت و نواحی نسخه‌برداری شده داخلی دی.ان.ای. ریبوزومی هسته (ITS) و قسمتی از فاکتور طویل‌کننده ترجمه (TEF1) با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 و EF1F/EF1R تکثیر شدند. آنالیز فیلوژتیکی به روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum likelihood) و با استفاده از نسخه ۵ نرم‌افزار مگا صورت گرفت. در توالی‌یابی ناحیه نسخه‌برداری شده داخلی دی.ان.ای. ریبوزومی هسته و قسمتی از فاکتور طویل‌کننده ترجمه برای این جدایه تعداد ۵۵۰ و ۶۵۰ جفت باز به ترتیب به دست آمد که ناحیه نسخه‌برداری شده داخلی دی.ان.ای. ریبوزومی هسته ۹۹ درصد با گونه *Neocosmospora vasinfecta* با شماره دسترسی KM231804 از کشور هند و فاکتور طویل‌کننده ترجمه ۱۰۰ درصد با گونه‌ای به همین نام با شماره دسترسی JX997934 از فرانسه شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی MG811579 برای ناحیه نسخه‌برداری شده داخلی دی.ان.ای. ریبوزومی هسته و با شماره دسترسی MH976665 برای فاکتور طویل‌کننده ترجمه در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت گردید. آنالیز فیلوژنتیکی ناحیه نسخه‌برداری شده داخلی دی.ان.ای. ریبوزومی هسته با بیشینه درست‌نمایی صحت شناسایی گونه را تایید کرد و نمونه ما با ضریب اطمینان بالا همراه با نمونه‌های معتبر از کشورهای دیگر در یک گروه قرار گرفت (شکل ۲). جدایه قارچ فوق در مجموعه قارچ‌های زنده وزارت جهاد کشاورزی در مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) نگهداری می‌شود. این گونه برای فلور قارچی ایران برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شود.

نمونه بررسی شده: استان کرمانشاه، قصر شیرین، سومار، 45° 95′ E, 33° 96′ N، ۱۳۹۶/۴/۵، جداسازی شده از خاک بکر، شیما سعیدی (IRAN 3320 C).

ROSTANIHA

* مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده نخست به راهنمایی دکتر صمد جمالی ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی