

***Radulidium subulatum*, new taxon for mycobiota of Iran**

Received: 31.07.2019 / Accepted: 04.12.2019

**Samira Karimzadeh:** MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, 31587-77871, Iran

**Khalil-Berdi Fotouhifar**✉: Associate Prof. in Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, 31587-77871, Iran (fotowhi@ut.ac.ir)

Alfalfa (*Medicago sativa* L.), a member of Fabaceae family, is a perennial or permanent plant with upright and very deep root that penetrates up to three meters into the soil, and therefore is the source of vitamins and minerals that takes from the soil. This plant is very important in terms of chemical and pharmaceutical compositions. In order to identify the fungi accompanying leaf spot symptoms of the alfalfa, leaves with leaf spot symptoms were collected from Sheikh Ali Khan region of the Chaharmahal and Bakhtiari province (Iran) during July 2018. The samples were transferred to laboratory and then small pieces (5 × 5 mm) were cut from the margin of leaf spots. Resulting leaf pieces were surface disinfested with 1% sodium hypochlorite for 30 sec. and then washed three times with sterilized water and were put on sterilized filter paper to remove excess water. Disinfested leaf pieces were transferred on 2% water agar medium. Isolates were purified by hyphal tip method and then were transferred to Petri dishes containing PDA culture medium and the grown fungal colonies were kept for seven days at 25 °C in continuous dark condition. Of the obtained fungal isolates, one isolate was identified as *Radulidium subulatum* (de Hoog) Arzanlou, W. Gams & Crous based on morphological features. According to the available literatures, this is the first report of *Radulidium subulatum* for mycobiota of Iran.

The diameter of the fungus colony on malt extract agar (MEA) after 14 days of growth at 24 °C in continuous dark condition were 50 mm, and the colony of the fungus was pale gray in color (Fig. 1a). Conidiophores were pale brown, smooth, tapering toward the apex and have short conspicuous denticles at the tip, where the conidia were attached to the conidiophores. Denticles were densely crowded, prominent, blunt at the end and pale brown in color. The dimension of the conidiophores were 14–28(21) × 1.5–3(2.25) μm (Fig. 1 b–d). Conidia were solitary, single-celled, smooth, ellipsoid, pale brown and 4–7(5.5) × 1.5–2(1.75) μm in diameter. Conidia had short hilum with about one micrometer in length (Fig. 1 e, f).

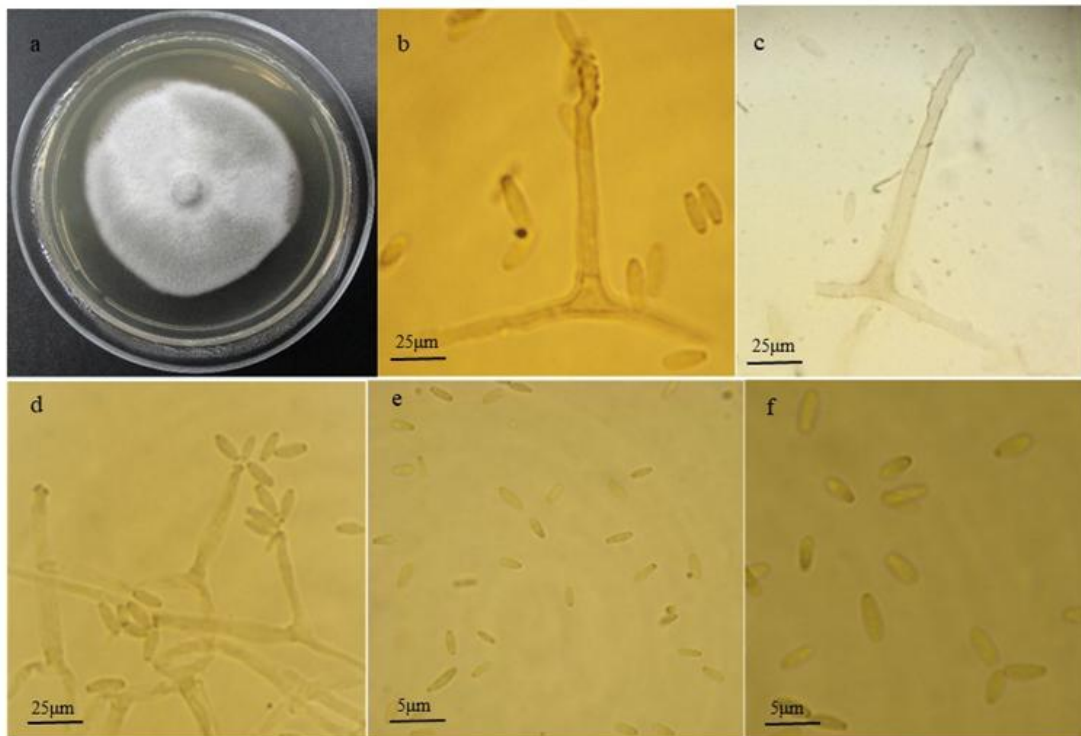
Specimen examined: Iran: Chaharmahal and Bakhtiari province, Sheikh Ali Khan farms, on *Medicago sativa* L., 11.07.2018, Samira Karimzadeh, isolate ShnY2-1 (isolate in the Agricultural Microbial Culture Collection of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj ABRIICC 10176).

According to the literature review, the morphological features of the investigated isolate were the same with description of *R. subulatum* provided by Arzanlou *et al.* (2007). In addition to the investigated isolate, isolates of *Phoma* and *Aspergillus* were also recovered from the same leaf spot symptoms of the alfalfa plants.

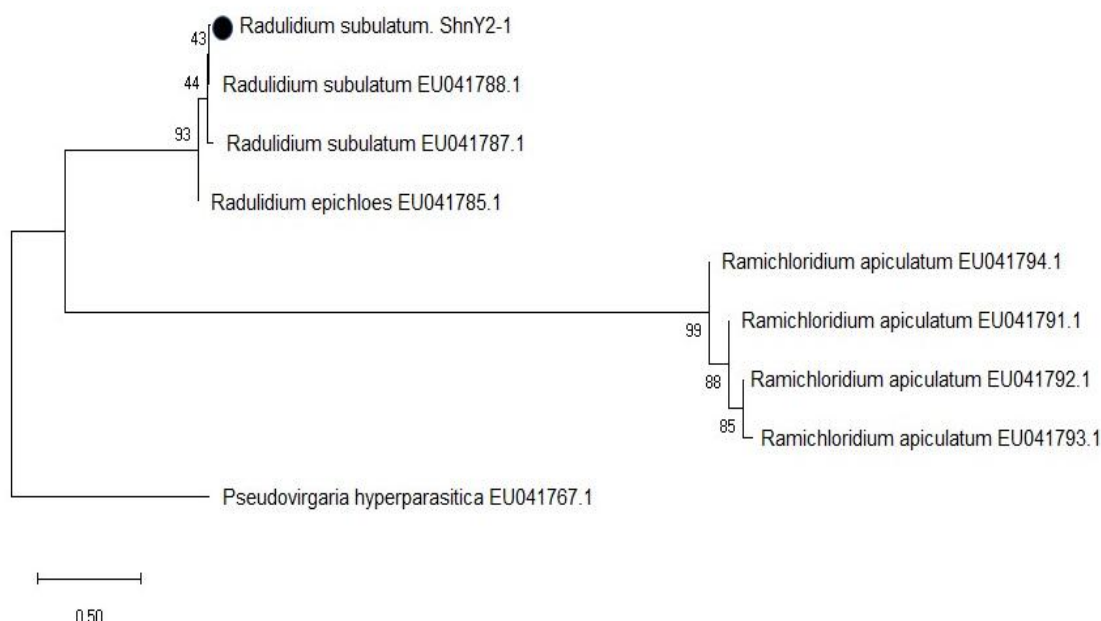
The genus *Radulidium* has four described species that are morphologically distinct from each other. In *R. epichloes*, the size of the conidia [(4.5–)7–8(–11) × 2–3 μm] (Arzanlou *et al.* 2007) are considerably bigger than that of *R. subulatum*. Also, the conidia of this species are verruculose. The size of the conidia in *R. xigazense* (Wu *et al.* 2013) (5–7 × 1.5–2 μm) is similar to that of *R. subulatum*, but conidia of *R. xigazense* have several oil droplets. In *R. guttiforme* (Jiang *et al.* 2018), conidia are guttiform or obovoid and their size (3.6–5 × 2.5–4 μm) is somewhat similar to that of *R. subulatum* while the conidia of the *R. guttiforme* are finely echinulate.

The ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified and sequenced for phylogenetic comparison of the

investigated isolate with close isolates and species and confirmation of its morphological identification. The obtained sequence in this study (accession No. MN658424) was 93% similar to the validated sequences of this species in the GenBank (NCBI), and generated maximum likelihood (ML) phylogenetic tree in MEGA Ver. 6.0 software, based on sequence data of ITS regions of the investigated isolate and obtained sequences from GenBank and *Pseudovirgaria hyperparasitica* (EU041767.1) as outgroup taxon, showed that, the studied isolate closely related to *R. subulatum* and placed in a well-supported group with other isolates of this species and resolved clearly from other species of this genus, *Radulidium epichloes* in the phylogenetic tree (Fig. 2).



**Fig. 1.** *Radulidium subulatum*, isolate ShnY2-1: a. Colony on MEA after 14 days at 24 °C in continuous dark condition, b-d. Conidiophores and conidia, e & f. Conidia.



**Fig. 2.** Phylogenetic tree inferred by maximum likelihood method in MEGA Ver. 6.0 using nucleotide sequences of ITS1-5.8S-ITS2 region of *Radulidium* isolates including isolate ShnY2-1. Solid circle shows the obtained isolate in the present study. Numbers on branches are bootstrap values of 1000 replicates. *Pseudovirgaria hyperparasitica* (EU041767.1) was used as outgroup taxon.

## References

- Arzanlou, M., Groenewald, J.Z., Gams, W. Braun, U., Shin, H.-D. & Crous, P.W. 2007. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. *Studies in Mycology* 58: 57–93.
- Jiang, Y.-L., Wu, Y.-M., Xu, J.-J., Kong, J.-H. & T.-Y., Zhang. 2018. *Endophragmiella terricola*, *Gliomastix verrucipes*, and *Radulidium guttiforme* spp. nov. from soil in China. *Mycotaxon* 133: 301–305.
- Wu, Y.-M., Xu, J.-J., Wang, H.-F. & T.-Y., Zhang. 2013. *Radulidium xigazense* sp. nov., *Rhinochlaidiella tibetensis* sp. nov., and three new records of *Ramichloridium* from China. *Mycotaxon* 125: 123–130.

## گونه *Radulidium subulatum* آرایه جدیدی برای بیوتای قارچی ایران\*

دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹ / پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۳

سمیرا کریمزاده: دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ۳۱۵۸۷-۷۷۸۷۱، ایران

خلیل‌پردی فتوحی فر: دانشیار قارچ‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ۳۱۵۸۷-۷۷۸۷۱، ایران (fotowhi@ut.ac.ir)

یونجه (*Medicago sativa* L.) متعلق به تیره باقلاییان، گیاهی چندساله یا دائمی با ریشه‌ای راست و بسیار عمیق است که تا سه متر به داخل زمین نفوذ می‌کند. این گیاه منبعی از ویتامین‌ها و مواد معدنی است که از خاک جذب می‌نماید و بنابراین، به لحاظ

براساس بررسی‌های انجام شده، خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه مورد بررسی با توصیف گونه *R. subulatum* ارائه شده توسط ارزنلو و همکاران (Arzanlou et al. 2007) مطابقت داشت. علاوه بر جدایه مورد بررسی، از علائم مشابه جدایه‌های قارچی مربوط به جنس‌های *Phoma* و *Aspergillus* نیز به دست آمدند.

در جنس *Radulidium* چهار گونه توصیف شده است که از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی به راحتی از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند. در گونه *R. epichloes* اندازه کنیدیوم‌ها  $(2-3) \times (11-17) \mu\text{m}$  می‌باشند. در گونه *R. subulatum* به طور قابل توجهی بزرگ‌تر است. همچنین، در سطح کنیدیوم‌های این گونه تزئیناتی نیز به صورت خارهای ریز (verruculose) وجود دارد. اندازه کنیدیوم‌های گونه *R. xigazense* (Wu et al. 2013)  $(5-12) \times (5-7) \mu\text{m}$  (میکرومتر) به گونه *R. subulatum* بسیار نزدیک است، اما درون کنیدیوم‌های این گونه چندین قطره چربی وجود دارد که این وضع در گونه *R. subulatum* وجود ندارد. در گونه *R. guttiforme* (Jiang et al. 2018) کنیدیوم‌ها به شکل‌های قطرهای (guttiform) یا واژتخم‌مرغی بوده و اندازه آن‌ها  $4-5 \times 5-6 \mu\text{m}$  (میکرومتر) تا حدودی مشابه گونه *R. subulatum* است، ولی در سطح کنیدیوم‌های گونه *R. guttiforme* تزئینات برجسته و مشخصی (echinulate) وجود دارد.

به منظور مقایسه فیلوژنتیکی جدایه مورد بررسی با گونه‌های نزدیک و تایید تشخیص ریخت‌شناختی آن، ناحیه ITS2-ITS1-5.8S-ITS2 تکثیر و تعیین توالی شد. توالی به دست آمده (شماره دسترسی MN658424)، با توالی‌های معتبر ثبت شده از این گونه در بانک ژن (NCBI) ۹۳ درصد شباهت داشت و شجره فیلوژنتیکی حداکثر احتمال (maximum likelihood) ترسیم شده در نرم‌افزار MEGA و نسخه ۶ براساس توالی نواحی ITS جدایه مورد بررسی و توالی‌های حاصل از بانک ژن از این گونه و گونه نزدیک به آن و همچنین توالی *Pseudovirgaria hyperparasitica* (EU041767.1) به عنوان آرایه خارجی، نشان داد که نمونه مورد بررسی با نمونه‌های معتبر مربوط به این گونه در یک گروه مجزا با مقدار اعتبارسنجی زیاد قرار می‌گیرد. همچنین، در شجره فیلوژنتیکی حاصل، جدایه‌های گونه *Radulidium subulatum* به خوبی از گونه *R. epichloes* تفکیک شده‌اند (شکل ۲).

داشتن ترکیبات شیمیایی و دارویی، بسیار حایز اهمیت است. به منظور شناسایی قارچ‌های همراه علائم لکه برگی گیاه یونجه، در تیر ماه سال ۱۳۹۷ نمونه‌هایی از برگ‌های دارای علائم لکه‌برگی از منطقه شیخ علیخان واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شدند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، قطعاتی از بخش‌های آلوده گیاهان به اندازه  $0.5 \times 0.5$  سانتی‌متر بریده شدند. ضدعفونی سطحی قطعات گیاهی آلوده به مدت ۳۰ ثانیه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد و متعاقب آن سه بار شستشو با آب مقطر استریل و آب گیری با کاغذ صافی استریل صورت گرفت. سپس قطعات گیاهی روی محیط کشت آب-آگار (WA) دو درصد قرار داده شدند. جهت خالص سازی، جدایه‌های به دست آمده به روش نوک ریس، به محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) منتقل و پرگنه‌های قارچی به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی مداوم نگهداری شدند. از بین جدایه‌های به دست آمده، براساس خصوصیات ریخت‌شناختی، یک جدایه از قارچ *Radulidium subulatum* (de Hoog) Arzanlou, W. Gams & Crous شناسایی شد. براساس منابع موجود، این گونه برای نخستین بار برای بیوتای قارچی ایران گزارش می‌شود.

قطر پرگنه قارچ روی محیط کشت عصاره-مالت-آگار (MEA) بعد از ۱۴ روز رشد در دمای ۲۴ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مداوم، ۵۰ میلی‌متر بود و پرگنه قارچ به رنگ خاکستری روشن دیده شد (شکل ۱a). کنیدیوم برها به رنگ قهوه‌ای روشن و صاف بودند و به طرف انتها باریک‌تر می‌شدند و در رأس آن‌ها و در محل اتصال کنیدیوم‌ها، زواید (denticles) مشخصی دیده شدند. این زواید که در انتها حالت تخت داشتند به تعداد زیاد و متراکم و برجسته بودند و به رنگ قهوه‌ای روشن دیده شدند. ابعاد کنیدیوم‌ها  $(25/2) \times (3-5) \times (21) \times (28-14) \mu\text{m}$  (میکرومتر) اندازه‌گیری شدند (شکل ۱b-d). کنیدیوم‌ها منفرد، تک‌سلولی، بیضوی، به رنگ قهوه‌ای روشن و سطح آن‌ها صاف بود. ابعاد کنیدیوم‌ها  $(175/2) \times (5/5) \times (7-4) \mu\text{m}$  (میکرومتر) بود. کنیدیوم‌ها دارای هیلومی به ارتفاع تقریبی یک میکرومتر بودند (شکل ۱e و f).

نمونه بررسی شده: استان چهارمحال و بختیاری، مزارع شیخ علیخان، از گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)، ۱۳۹۷/۴/۲۰، سمیرا کوریم‌زاده، جدایه ShnY2-1 (جدایه در کلکسیون میکروارگانسیم‌های تخصصی کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج ABRIICC 10176).