معرفی گونه‌های جدید از راسته *Mucorales* برای میکوبیوتای ایران*

دریافت: ۱۳۹۲/۴/۴/ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۶

زهرا ده‌بوید: دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری
محمدعلی تاجیک قنبری✉: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری (m.tajick@gmail.com)
حشمت‌اله رحیمیان: استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری
مهدی ارزنلو: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز

چکیده

به منظور بررسی میکوبیوتای خاک‌زی استان‌های مازندران و گلستان، نمونه‌برداری از عمق ۱۰-۵ سانتی‌متری خاک‌های برخی مناطق زراعی و غیرزراعی به عمل آمد. پس از جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی، ۶۱ جدایه از هفت جنس *Absidia*، *Actinomucor*، *Cunninghamella*، *Lichtheimia*، *Mucor*، *Syncephalastrum* و *Rhizopus* متعلق به راسته *Mucorales* مورد بررسی تاکسونومیکی قرار گرفت. DNA جدایه‌های جمع‌آوری شده در بافر CTAB به روش راپلی استخراج گردید، سپس با استفاده از آغازگر ITS4 و ITS5 نواحی ITS2 + 5.8S + ITS1 تکثیر و توالی‌یابی شد. برای تأیید شناسایی مورفولوژیکی و توالی‌یابی دندروگرام مربوطه با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 و روش‌های Maximum Parsimony و Neighbor Joining رسم گردید. دندروگرام حاصل از آغازگر ITS، جدایه‌های مورد بررسی را در سه گروه اصلی قرار داد. براساس نتایج به دست آمده، پنج آرایه جدید از فلور ایران شناسایی شد که عبارتند از: *Absidia repens*، *Cunninghamella blakesleeana* و *Mucor fragilis* (به عنوان گونه‌های جدید) و *Syncephalastrum racemosum*، *Lichtheimia ramosa* (به عنوان جنس و گونه‌های جدید).

واژه‌های کلیدی: تاکسونومی، DNA، *Mucorales*، *Zygomycetes*

Some new species of *Mucorales* for mycoflora of Iran

Received: 25.06.2013/ Accepted: 28.08.2013

Zahra Dehbovid: MSc Student of Plant Pathology, College of Agronomic Science, Sari Agriculture and Natural Resources University, Sari, Iran

Mohammad Ali Tajick✉**:** Assistant Prof., Department of Plant Protection, College of Agronomic Science, Sari Agriculture and Natural Resources University, Sari, Iran (m.tajick@gmail.com)

Heshmatollah Rahimian: Prof., Department of Plant Protection, College of Agronomic Science, Sari Agriculture and Natural Resources University, Sari, Iran

Mahdi Arzanlou: Assistant Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Summary

In order to determine soil inhabitant fungi of Mazandaran and Golestan provinces (N Iran), some soil samples from arable and non-arable areas were collected. After the isolation, purification and identification of fungi, 61 isolates, belonging to *Absidia*, *Actinomucor*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Syncephalastrum* and *Rhizopus* were identified. After DNA extraction, all genera were subjected to PCR using ITS4 and ITS5 primers then amplified regions were sequenced. To confirm the morphological identification and sequencing, dendrogram was drawn using MEGA5 by Maximum Parsimony and Neighbor Joining methods. Dendrograms derived from the primers ITS 4 & 5 were separated into three groups. Between the studied isolates, *Absidia repens*, *Cunninghamella blakesleeana* and *Mucor fragilis* (species) and *Syncephalastrum racemosum*, *Lichtheimia ramosa* (genera and species) are new records from Iranian mycobiota.

Keywords: DNA extraction, *Mucorales*, taxonomy, *Zygomycetes*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر محمدعلی تاجیک قنبری ارایه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

راسته *Mucorales* با بیش از ۳۰۰ گونه توصیف شده یکی از بزرگترین راسته‌های شناخته شده زیرشاخه *Mucoromycotina* است. بیشتر اعضاء این راسته به صورت ساپروفیت در خاک، فضولات حیوانات و مواد ارگانیک مرتبط با خاک یافت می‌شوند که در کلونیزاسیون اولیه سوبسترا نیز نقش مهمی دارند، اما برخی دیگر به عنوان پاتوژن‌های ضعیف در پوسیدگی نرم گیاهان نقش دارند. مثلا *Rhizopus stolonifer* می‌تواند باعث پوسیدگی شیرین سیب‌زمینی و میوه‌هایی مثل سیب، گوجه‌فرنگی و توت‌فرنگی شود که این آلودگی‌ها منجر به ضایعات غذایی می‌شوند (Samson *et al.* 2002). بعضی از گونه‌ها پارازیت قارچهای دیگر هستند، *Spinellus fusiger* اسپورانژیفورهای خود را روی کلاهک‌های در حال زوال *Mycena* spp. تشکیل می‌دهد. بقیه *Mucorales* بیماری‌هایی در حیوانات و انسان ایجاد می‌کنند، در بیمارانی که از دیابت و سرطان رنج می‌برند، ممکن است زخم‌هایی ناشی از این قارچ در مغز، شش و بقیه ارگان‌ها ایجاد و در نقاط مختلفی از سیستم عروقی منتشر شوند (Kwon-Chung & Bennett 1992). تعدادی از گونه‌ها در تولید غذاهای آسیایی مثل تمپ و سوفا استفاده می‌شوند (Nout & Aidoo 2010). در بیوتکنولوژی مدرن نیز بسیاری از قارچهای این راسته در فرآیند انتقال زیستی به کار برده می‌شوند (Kieslich 1997). تعدادی از گونه‌های روغنی متعلق به راسته *Mucorales* قادر به سنتز و تجمع مواد لیپیدی با بیشتر از ۲۰٪ از وزن خشک خودشان هستند، این لیپیدها (بیشتر تری‌اسیل گلیسیرید) ممکن است غنی از اسیدهای چرب غیراشباع باشند (PUFAs) که به لحاظ بیوتکنولوژی حایز اهمیت می‌باشند (Certik & Shimizu 1999).

رده‌بندی و شناسایی اعضاء این راسته تا حد زیادی براساس مورفولوژی فرم غیرجنسی آن‌ها صورت می‌گیرد. ریسه‌ها ضخیم، بدون دیواره عرضی و کاملا منشعب هستند، انشعابات باریکی ممکن است به وجود آید و در محل پیدایش آن‌ها دیواره ظاهر شود (Benjamin 1979). تولید مثل جنسی در بعضی از گونه‌ها مشاهده نشده اما در صورت وقوع به وسیله تشکیل زیگوسپور بین پایه‌های نگهدارنده موازی یا روبروی هم رخ می‌دهد، به همین دلیل برای شناسایی گونه‌ها، ساختارهای تولید مثل غیرجنسی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در بیشتر اعضاء این راسته، هاگ‌های بیشماری در اسپورانژیوم‌های کروی در رأس اسپورانژیفور تولید می‌شوند. در داخل اسپورانژیوم‌ها هاگ‌ها یک هسته مرکزی یا کلوملا را احاطه می‌کنند. اسپورانژیوم در برخی از گونه‌ها دارای تعداد کمی هاگ می‌باشد که اسپورانژیول نامیده می‌شود و به عنوان یک واحد پراکنده می‌شوند. در بعضی گروه‌ها، هاگ‌ها در یک ردیف در داخل اسپورانژیوم استوانه‌ای شکلی به نام مرواسپورانژیوم مرتب می‌شوند. سایر *Mucorales* با کنیدیوم‌های تک‌یاخته تولید مثل می‌کنند (Webster & Weber 2007).

اکثر اعضاء این گروه به غیر از تیره *Umbelopsidaceae* (با پرگنه‌های قرمز مایل به ارغوانی و کند رشد) پرگنه‌های سریع‌الرشد با ریسه‌های هوایی تولید می‌نمایند که تشتک‌های به قطر ۱۰۰ میلی‌متر را در کمتر از یک هفته پر می‌کنند (Meyer & Gams 2003).

در نخستین مطالعات فیلوژنتیکی انجام شده توسط ادنل و همکاران (O'Donnell *et al.* 2001)، تعداد زیادی از جنس‌های راسته *Mucorales* (حدود ۶۳ گونه متعلق به ۵۴ جنس و ۱۳ تیره) براساس توالی rDNA و EF-1α آنالیز و نشان داده شد که رده‌بندی در سطح تیره به دلیل وجود چهار تیره پلی‌فیلیتیک (*Chaetocladiaceae*, *Mucoraceae*, *Thamnidiaceae* و *Radiomycetaceae*)، مصنوعی است و نبود جد مشترک در بین اعضاء این راسته را اثبات می‌نماید. مطالعات اخیر مولکولی، به منظور شناسایی فیلوژنتیکی و تاکسونومیکی گونه‌ها براساس آنالیز توالی چند ژن مانند rDNA (Abe *et al.* 2010, Dannaoui *et al.* 2010)، اکتین (Hoffmann *et al.* 2007, Abe *et al.* 2010)، عوامل افزاینده ترجمه (Garcia-Hermoso *et al.* 2009, Alastruey-Izquierdo *et al.* 2010) و لاکتیک دهیدروژناز (Saito *et al.* 2004) صورت گرفت که نتیجه پیشنهادی ادنل (O'Donnell *et al.* 2001) مبنی بر مصنوعی بودن رده‌بندی را تایید کرد.

امروزه استفاده از روش‌های مولکولی مانند RFLP (Chakrabarti *et al.* 2010) AFLP ،(Larche *et al.* 2005)، RAPD (Papp *et al.* 2001) و PFGE (Nagy *et al.* 2000) به ندرت برای شناسایی و تاکسونومی قارچهای موکورال استفاده می‌شود. براساس مطالعات مولکولی انجام شده، در سال ۲۰۰۷ راهنمای شناسایی مولکولی قارچها با استفاده از توالی DNA توسط CLSI (CLSI 2007) منتشر و نواحی ITS به عنوان یک استاندارد طلایی برای شناسایی جنس‌ها و گونه‌های راسته *Mucorales* پیشنهاد شد که توسط گروه شناسایی مولکولی قارچها در انجمن بین‌المللی قارچ‌شناسی انسانی و حیوانی (ISHAM) مورد حمایت قرار گرفت. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی موکورال‌های خاک‌زی استان‌های گلستان و مازندران براساس خصوصیات مورفولوژیکی و نواحی ITS،

rDNA، تعیین موقعیت تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی جدایه‌ها می‌باشد.

روش بررسی

- نمونه‌برداری

نمونه‌برداری به صورت تصادفی از خاک‌های زارعی و غیرزراعی استان مازندران و گلستان از تابستان ۱۳۸۹ تا اردیبهشت ۱۳۹۰ انجام شد. نمونه خاک‌ها از عمق ۱۵-۱۰ سانتی‌متری تهیه شد و پس از یاداشت‌برداری مشخصات جغرافیایی محل نمونه‌برداری، داخل کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل شدند. نگهداری از نمونه خاک‌ها در دمای محیط انجام شد.

- استخراج قارچ‌ها از خاک

استخراج قارچ‌های *Mucorales* از نمونه خاک‌های مورد مطالعه با تهیه سوسپانسیون خاک به روش دینگرا و سینکلر (Dhingra & Sinclair 1995) با اعمال تغییرات صورت گرفت. جداسازی قارچ با کشت سوسپانسیون خاک با رقت ۱:۵۰۰۰ در محیط اختصاصی رزبنگال (حاوی $MgSO_4$ ۰/۵گرم، KH_2PO_4 ۰/۵گرم، K_2HPO_4 ۰/۵گرم، Yeast extract ۰/۵گرم، Pepton ۰/۵گرم، Rose Bengal ۰/۰۵گرم، Streptomycin ۰/۰۵گرم و Agar ۱۷ گرم) انجام شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، پرگنه زیگومیست‌ها از رز بنگال به محیط WA (Water Agar) منتقل شد و ۲۴ ساعت بعد با سوزن سترون به صورت نوک ریسه به محیط PDA (Potato Dextrose Agar) انتقال داده شد. سپس با استفاده از مورفولوژی پرگنه در محیط کشت و خصوصیات میکروسکوپی قارچ‌ها شناسایی آن‌ها در حد جنس و گونه انجام شد.

- استخراج DNA

به منظور استخراج DNA به روش راپلی (Rapley 2000)، ابتدا یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های سه تا چهار روزه در محیط PDA برداشته و در محیط کشت مایع PDB (Potato Dextrose Broth) قرار داده شد که به مدت سه روز در دمای ۲۵ $^{\circ}$C با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. توده میسلیوم قارچ در هاون توسط ازت مایع پودر گردید. پودر حاصله در بافر CTAB [CTAB (W/V) ۲٪، ۱/۴ M NaCl، ۱۰۰ mM Tris-HCl با pH= ۸ و ۲۰ mM EDTA] در دمای ۶۵ درجه سلسیوس مخلوط شد. یک میکرولیتر 2-Mercaptoethanol افزوده شد و پس از ورتکس به مدت ۴۵ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. قبل از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه هم حجم با مخلوط، کلروفرم- ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴:۱ اضافه گردید سپس فاز رویی محتوی DNA برداشته شد که بعد از اضافه کردن هم حجم ایزوپروپانول خنک (۲۰- $^{\circ}$C)، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و در نهایت، پس از رسوب DNA فاز مایع تخلیه و رسوب حاصله با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. بعد از خشک کردن رسوب DNA در دمای محیط به هر ویال ۷۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ mM Tris-HCl, pH= ۸، ۱ mM EDTA) استریل اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در یخچال به فریزر ۲۰- $^{\circ}$C منتقل شد. کیفیت و کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتر و آگارز ۰/۸درصد در بافر 1XTBE mM (۹۰ Tris، ۹۰ mM Boric acid و ۲ mM EDTA) ارزیابی گردید.

- تکثیر با PCR و توالی‌یابی

تکثیر کامل نواحی ITS1, 5.8, ITS2 از ژن‌های rDNA با استفاده از پرایمر، ITS5 (5´GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3´) و ITS4 (5´ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) White *et al.* 1990) انجام شد. واکنش PCR در مخلوط ۲۵ µl (۱ X PCR buffer، ۲/۵ mM MgCl2، ۰/۲ mM dNTP، ۰/۲ Primers mM، ۲/۵ U *Taq* polymerase enzyme) آماده شد و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Bio RAD) با واسرشتگی مقدماتی ۴ دقیقه در ۹۴ $^{\circ}$C، واسرشتگی یک دقیقه در ۹۴ $^{\circ}$C اتصال، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ $^{\circ}$C، گسترش یک دقیقه در ۷۲ $^{\circ}$C، گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ $^{\circ}$C به تعداد ۳۵ سیکل صورت گرفت. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد بافر TBE با ولتاژ ۸۰V الکتروفورز شد. از نشانگر با وزن مولکولی ۱Kb (SM0311, DNA ladder) به عنوان شاخص مورد استفاده قرار گرفت. ژل در اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/mL) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر با UV دستگاه ژل خوان کداک (GEL LOGIC 200) مشاهده گردید. سپس با کیت خالص‌سازی PCR (Qiagen Inc Valencia, CA, USA) مطابق با دستور عمل شرکت سازنده خالص شد. محصولات خالص شده در جهت فوروارد توسط شرکت BIONEER کره توالی‌یابی شدند.

برای تصحیح و هم‌ردیف کردن توالی‌ها از برنامه BioEdit (Hall 1999) استفاده شد. با انجام Blastn در بانک ژن (NCBI) همولوژی توالی جدایه‌های مورد بررسی و گونه‌های نزدیک بررسی شد. توالی‌های به دست آمده در بانک ژن ثبت شدند (جدول ۱).

- آنالیز فیلوژنتیکی

روابط فیلوژنی میان جدایه‌های جمع‌آوری شده همراه با توالی تعدادی دیگری از جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن به روش Neighbor Joining و Parsimony (پایداری شاخه با ارزش بیشتر از ۵۰٪ و تکرار ۲۰۰۰) در نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) مورد ارزیابی قرار گرفت. از راسته *Mortierellales* به عنوان گروه خارجی استفاده شد.

نتیجه

- تاکسونومی

با جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های خاکزی، ۶۱ جدایه به دست آمد که بعد از مشاهده پرگنه‌ها، تهیه اسلاید میکروسکوپی در هفت جنس قرار گرفتند. از این بین ۱۲ جدایه به جنس *Absidia*، دو جدایه به *Lichtheimia*، چهار جدایه به *Actinomucor*، ۱۴ جدایه به *Mucor*، ۱۳ جدایه به *Cunninghamella*، شش جدایه به *Syncephalastrum* و ۱۰ جدایه به *Rhizopus* متعلق می‌باشند. براساس گزارش‌های موجود (Ershad 2009)، از بین نمونه‌های بررسی شده پنج آرایه برای ایران به شرح زیر جدید تشخیص داده شدند:

Absidia repens Tiegh., Annls Sci. Nat., Bot., sér. 64(4): [1876] 363 (1878) (شکل ۱)

پرگنه قارچ روی محیط غنی PDA پنبه‌ای و سریع‌الرشد است به ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متر که در مدت پنج تا شش روز تشتک ۶ سانتی‌متری را کاملا پر می‌نماید (شکل ۱-a). پرگنه‌ها ابتدا سفید رنگ و بعد از هفت روز از مرکز پرگنه زرد تا قهوه‌ای رنگ می‌شود و دارای حاشیه نامنظم می‌باشد. سطح زیرین پرگنه کرم مایل به خردلی است و حالت گل به خود می‌گیرد (شکل ۱-a و b). دارای استولون و ریزوییدهای بی‌رنگ است (شکل ۱-c). اسپورانژیوفورها طولی بیش از ۱۳۰ میکرومتر دارند، بی‌رنگ، صاف، معمولا به شکل خمیده و منشعب هستند که در انتها اسپورانژیوم‌های دارای آپوفیز و کلومالا تولید می‌کند (شکل ۱-d و e). اسپورانژیوم‌ها به قطر ۲۵-۲۰ میکرومتر کروی، خاکستری رنگ دارای دیواره نازک هستند، پس از کامل شدن از بین می‌روند و از خود یک یقه به جا می‌گذارند (شکل ۱-f، g و h). کلومالا (به ابعاد ۱۵-۱۰ × ۱۸-۱۰ میکرومتر) نیم‌کروی است و یک آپوفیز قیفی شکل دارد. معمولا در زیر آپوفیز در فاصله ۱۸-۱۲ میکرومتری یک بند وجود دارد. اسپورانژیواسپورها (به قطر ۳-۲ میکرومتر) بی‌رنگ، قایقی شکل و تک‌یاخته‌ای هستند. بیشترین رشد این جدایه در دمای ۳۴-۲۵ درجه سلسیوس است. خصوصیات قارچ توصیف شده با توصیف هسلتین و الیس (Hesseltine & Ellis 1966) مطابقت دارد. جدایه مورد بررسی از خاک‌های مناطق زراعی و غیرزراعی دامیر، اوجی آباد، ساری، بهشهر، جنگل دارب کلا و جنگل نکا از استان مازندران جداسازی شد.

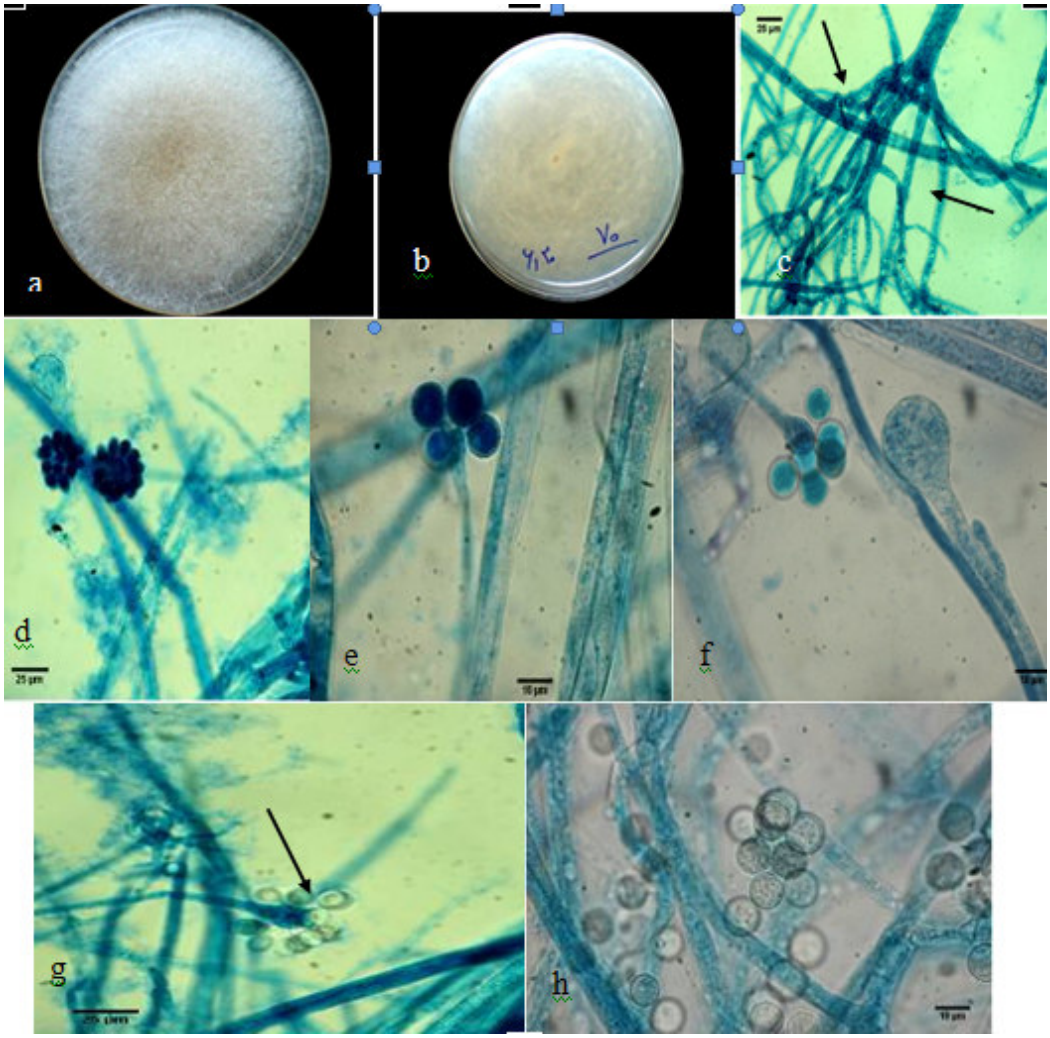
Cunninghamella blakesleeana Lendn., Bull. Soc. bot. Genève, 2 sér. 19: 234 (1927) (شکل ۲)

قارچ پرگنه پنبه‌ای با ریسه‌های هوایی در محیط PDA تولید می‌کند که ظرف سه تا پنج روز تشتک را پر می‌نماید. پرگنه ابتدا سفید است، سپس رنگ آن از مرکز به کرم تیره تغییر می‌نماید و سرانجام کل پرگنه قهوه‌ای تیره می‌شود (شکل ۲-b, a). ریزویید و استولون نیز در این گونه مشاهده شد (شکل ۲- c). ریسه‌ها بیش از ۱۸ میکرومتر قطر دارند. اسپورانژیوفورها مستقیم یا دارای انشعابات منفرد و روبروی هم می‌باشد. وزیکول انتهایی کروی تا تخم‌مرغی شکل و اغلب ۳۸-۱۵ میکرومتر قطر دارد، وزیکول‌های جانبی مشابه وزیکول انتهایی اما به لحاظ اندازه کوچکتر و دارای ۳۰-۸ میکرومتر قطر می‌باشد (شکل ۲- e, d و f). در سطح این وزیکول پایک‌های متعددی تشکیل و به اسپورانژیول تک هاگی منتهی و تمام سطح وزیکول را می‌پوشاند (شکل ۲-g). اسپورانژیول‌ها کروی تا نیمه‌کروی، صاف، معمولا دارای خارهای کوتاه و ۱۸-۹ میکرومتر قطر دارند (شکل ۳-h). این قارچ از خاک‌های چالوس، لشتو، سوادکوه و علمدار ده از استان مازندران و جنگل دلند از استان گلستان جداسازی شد و مطابق توصیف کاتر (Cutter 1946) و بایجال و مهروترا (Baijal & Mehrotra 1980) می‌باشد.

Lichtheimia ramosa (Zopf) Vuill., Bull. Soc. Mycol. Fr. 19: 126 (1903) (شکل ۳)

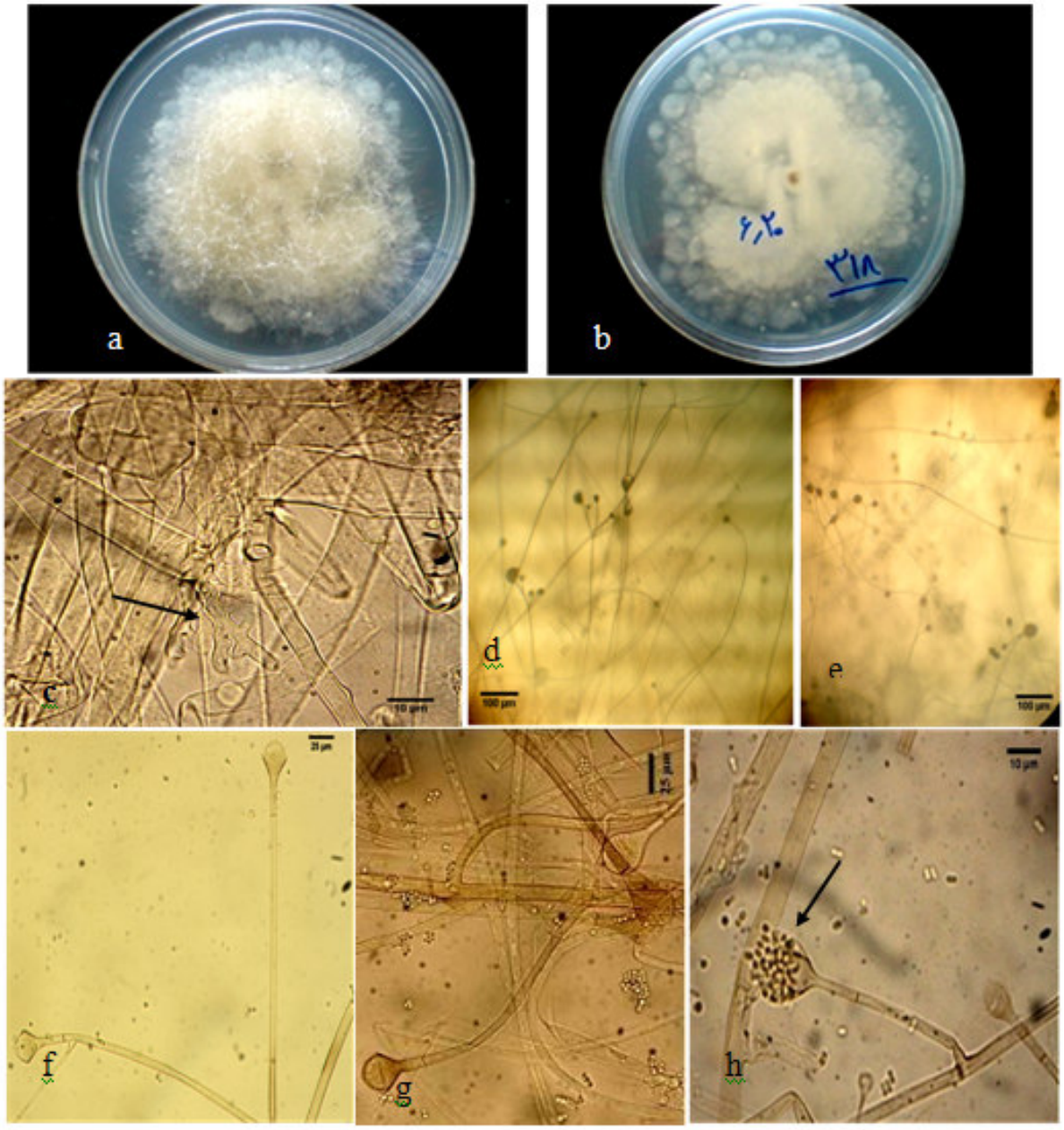
قارچ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به خوبی رشد می‌کند و در محیط PDA پرگنه‌های سفید رنگ با هیف‌های هوایی تولید که در مدت ۷-۵ روز کل تشتک را پر می‌نماید. ریسه‌های حاشیه تشتک نامنظم هستند و سطح زیرین پرگنه مشابه *Absidia* نقش گل دارد (شکل ۳-a). اسپورانژیوفورها (قطر اسپورانژیوفور اصلی ۱۲-۸ میکرومتر) بسیار منشعب، صاف و بدون دیواره عرضی هستند، انشعابات جانبی (با قطر ۴-۳ میکرومتر) اغلب به صورت قوسی شکل است (شکل ۳-b). اسپورانژیوم‌ها گلابی شکل، صاف، در مواردی مسطح، با قطر ۸۰-۲۰ میکرومتر و دارای دیواره ناپایدار هستند. ریزویید ضعیف (۹-۳ میکرومتر عرض و بیش از ۷۰ میکرومتر طول)، بی‌رنگ و صاف می‌باشد (شکل ۳-c). برخلاف *Absidia* اسپورانژیوم‌ها

انتهایی هستند و دیواره زیر اسپورانژیوم در این گونه وجود ندارد (شکل ۳-d). کلوملا صاف با قطر ۲۸-۱۰ میکرومتر، کروی-تخم‌مرغی است. کلامیدوسپور مشاهده نشد اما حضور سلول‌های غول‌آسا (با قطر ۳۵-۲۸ میکرومتر)، با انشعابات انگشتی شکل نامنظم بسیار معمول می‌باشد (شکل ۳-e). این قارچ از خاک‌های درکاسر و فرح‌آباد استان مازندران جداسازی شده و با توصیف ارایه شده توسط هسلتین و الیس (Hesseltine & Ellis 1966) و هوفمن (Hoffmann *et al.* 2009) مطابقت دارد.



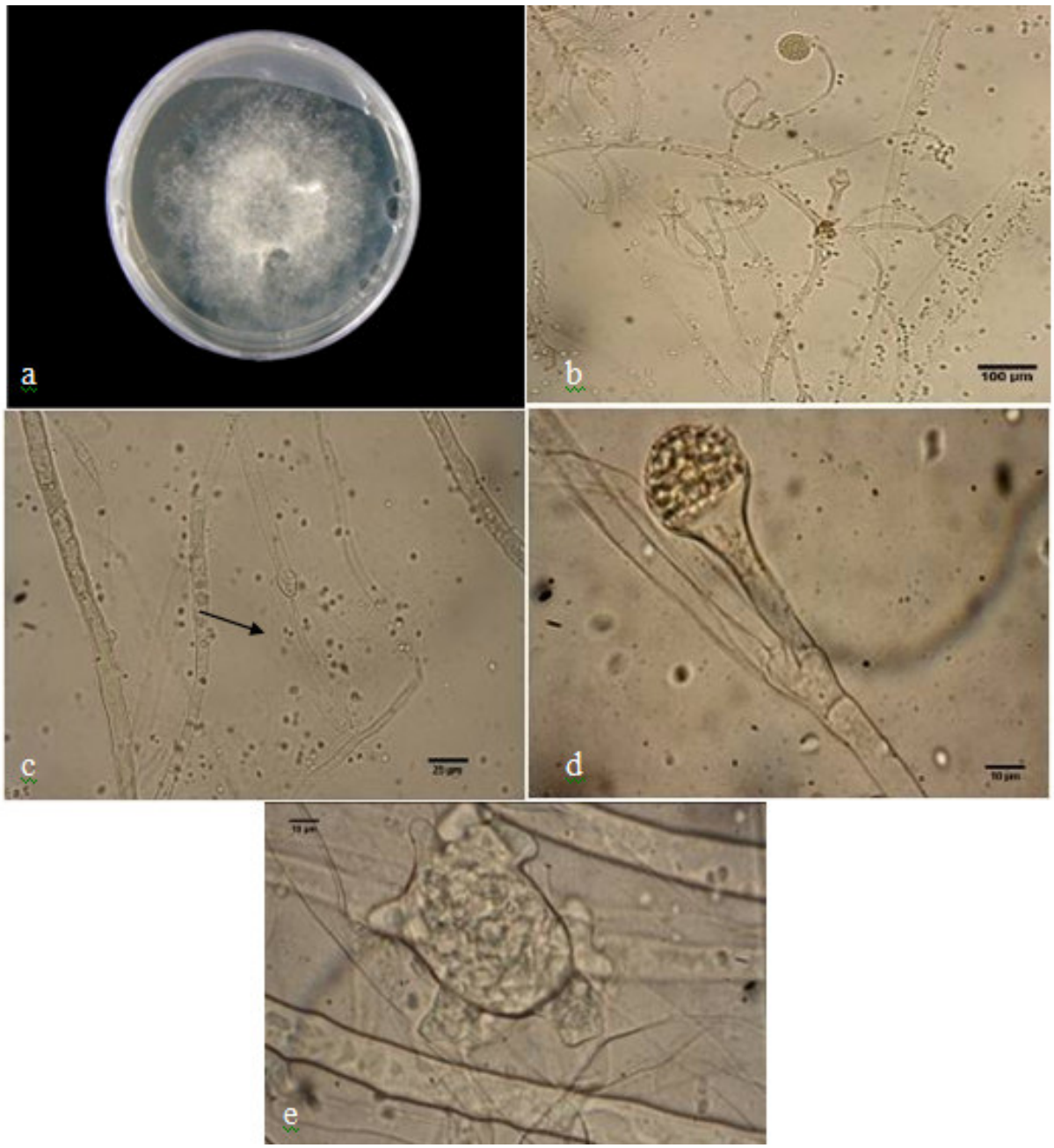
شکل ۱- *Absidia repens*: a. پرگنه شش روزه در محیط PDA و دمای ۲۵° C، b. شکل معکوس پرگنه که حالت گل به خود گرفته، c. ریزویید در انتهایی استولون (نوک پیکان)، d, e. اسپورانژیوفورهای برافراشته از محیط کشت، h, f, g. مراحل تکامل و تخریب دیواره اسپورانژیوم (نوک پیکان) (مقیاس: f, g = ۲۵ میکرومتر؛ c, h = ۱۰ میکرومتر؛ d, e = ۱۰۰ میکرومتر).

Fig. 1. *Absidia repens*: a. 6-day colony of the PDA at 25° C, b. The colony reverse with flower shape, c. Rhizoids at the end of stolon (arrow). d, e. Sporangiophor raised from medium, f, g, h. Formation and destruction of the wall sporangium (Bars: f, g = 25 µm; c, h = 10 µm; e, d = 100 µm).



شکل ۲- *Cunninghamella blakesleeana*: a, b. پرگنه چهار روزه در دمای ۲۵° C، c. ریزویید در انتهای استولون (نوک پیکان)، d, e, f. اسپورانژیوفورهای ساده و منشعب، g. پایک‌های روی سطح وزیکول منتهی به اسپورانژیول (نوک پیکان)، h. اسپورانژیول (مقیاس: c, d, g = ۲۵ میکرومتر؛ e, f, h = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2.*Cunninghamella blakesleeana*: a, b. 4-day colony at 25° C, c. Rhizoids at the end of stolon (arrow), d, e, f. Sporangiophores simple and branched, g. Terminal vesicle with sterigmata and sporangiola (arrow), h. Sporangiola (Bars: c, d, g = 25 µm; e, f, h = 10 µm).



شکل ۳- *Lichtheimia ramosa*: a. پرگنه سه روزه در دمای ۲۵° C، b. اسپورانژهای جانبی، c. ریزوییـد (نـوک پیکـان)، d. موقعیـت اسپورانژیوم به اسپورانژیوفور و وجود تک‌دیواره در زیـر اسـپورانژیوفور، e. یاختـه‌هـای غـول‌آسـا (مقیـاس: c = ۲۵ میکرومتـر؛ b =۱۰۰ میکرومتر؛ d, e = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 3. *Lichtheimia ramose*: a. 3-day colony at 25° C, b. Side branches of sporangiophores, c. Rhizoid, d. Sporangium on sporangiophor and single septum is formed in the subtending sporangiophore, e. Giant cells (Bars: c = 25 µm; b = 100 µm; d, e = 10 µm).

جدول ۱- جدایه‌های ایرانی مطالعه شده و شماره دسترسی آن‌ها برای توالی ITS

Table 1. List of tested isolates from agricultural soils with accession numbers of amplified ITS regions

جدایه (Isolate)	کد قراردادی (Code)	منطقه (Location)	استان (Province)	شماره دسترسی (Asseccion No.)
Absidia repens	A-4	Damir	Mazandaran	JQ683213
	A-14	Oji abad		JQ683215
	A-33	Sari		JQ683216
	A-310	Sari		JQ683217
	A-318	Behshahr		JQ683218
	A-327	Neka		JQ683219
Cunninghamella blakesleeana	A-11	Chalous		JQ683234
	A-17	Lashtou		JQ683235
	A-83-2	Alamdar deh		JQ683237
	A-458	Daland	Golestan	JQ683238
Lichtheimia ramosa	L-15	Darkasar	Mazandaran	JQ683222
	L32	Farah abad		JQ683223
Syncephalastrum racemosoum	S47	Zeynab abad		JQ683224
	s51-3	Minodashat	Golestan	JQ683225
	s204	Amol	Mazandaran	JQ683226
	s330	Daneshgah Keshavarzi Sari		JQ683227
Mucor fragilis	100	Joybar		JQ085485
	129(2)	Chalous		JQ085486

Mucor fragilis Bainier, Annls Sci. Nat., Bot., sér. 6 19: 208 (1884) (شکل ۴)

این جدایه پرگنه‌های کرم تا خاکستری رنگ در محیط PDA تولید که بسیار سریع الرشد هستند و تشتک ۶ سانتی‌متری را در عرض سه روز پر می‌نماید (شکل ۴-a). اسپورانژیوفورها با قطر ۱۵ میکرومتر، صاف، دارای انشعابات کوتاه، زیگزاکی و قوسی شکل هستند و به صورت مستقیم از قاعده محیط منشأ می‌گیرند. دارای یک دیواره عرضی در محل تولید می‌باشد. اسپورانژیوم‌های نابالغ سفید و کرم‌رنگ هستند که در زمان بلوغ قهوه‌ای متمایل به سیاه می‌شوند، کروی و به قطر ۹۰-۱۵(۶۰) میکرومتر می‌باشند (شکل ۴-b). دارای دیوارهای ناپایدار می‌باشند که بعد از تخلیه هاگ فقط یقه‌ای از آن بر جا می‌ماند (شکل ۴-c). کلوملا کروی، تخم‌مرغی، بی‌رنگ و به طور میانگین دارای ۳۲-۳۰ میکرومتر قطر می‌باشد. کلامیدوسپورها تخم‌مرغی، گاهی اوقات بیضوی، بی‌رنگ، در میان ریسه‌ها تشکیل می‌شوند و دارای ۲۶-۱۰ میکرومتر قطر می‌باشند (شکل ۴-d). هاگ‌ها (به طور تقریبی ۶-۴ میکرومتر قطر) کروی تا بیضوی، مایل به آبی هستند (شکل ۴-e). دمای اپتیمم رشد برای این گروه ۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد. توصیف جدایه مورد بررسی از خاک چالوس و جویبار از استان مازندران با توصیف مهروترا (Mehrotra 1965) مطابقت دارد.

Syncephalastrum racemosum Cohn ex J. Schröt., in Cohn, Krypt-Fl. Schlesien (Breslau) 3.1(916): 217. [1889] (1886) (شکل ۵)

پرگنه طی پنج تا هفت روز در محیط PDA تشتک را کاملا پر می‌نماید، ابتدا سفید رنگ بوده و از روز چهارم به بعد از مرکز پرگنه متمایل به قهوه‌ای تیره تغییر رنگ می‌دهد (شکل ۵-a, b). اسپورانژیوفورها راست، ساده یا منشعب (به طول ۳/۵-۳ میلی‌متر) هستند. مرواسپورانژیوم‌ها روی وزیکول انتهایی

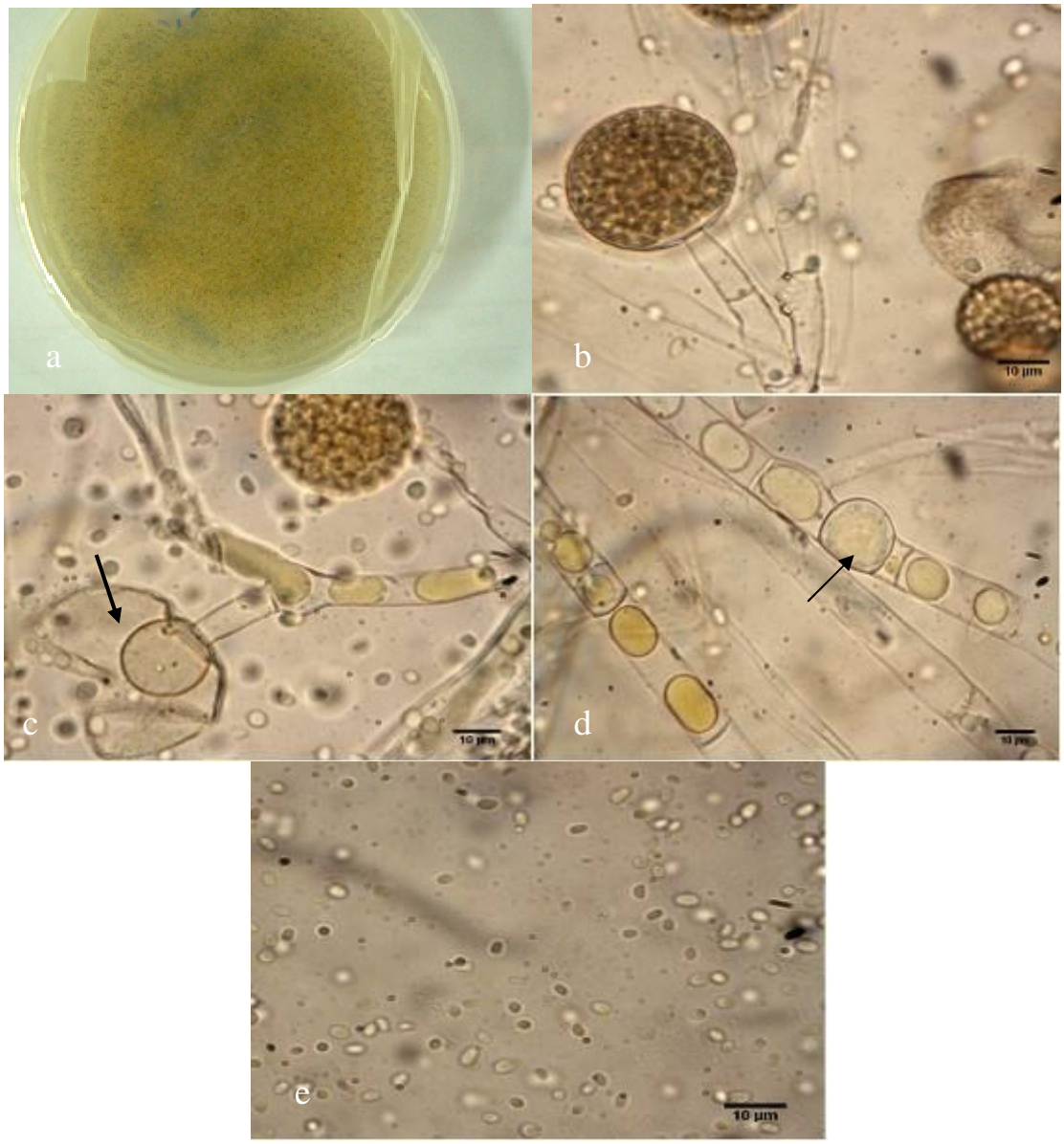
تشکیل می‌شوند (با طولی بیش از ۳۰ میکرومتر) بی‌رنگ تا قهوه‌ای روشن، استوانه‌های که در هر ردیف ۱ تا ۸ اسپورانژیوسپور دارند (شکل ۵-c, d). به ندرت در قاعده ریزویید دارند. وزیکول‌ها (۱۵-۱۲ میکرومتر قطر دارند) کروی تا نیمه‌کروی، بی‌رنگ یا قهوه‌ای کمرنگ (شکل ۵-e) اسپورانژیوسپور کروی (۴-۲ میکرومتر قطر)، تخم‌مرغی (۵-۳ میکرومتر قطر) و متنوع در شکل هستند (شکل ۵-f). توصیف ارایه شده از جدایه مورد بررسی از خاک‌های درکاسر، مینودشت، آمل و نوشهر از استان مازندران، زینب آباد و مینودشت از استان گلستان با توصیف بنجامین (Benjamin 1966)، دومش و گمس (Domsch & Gams 1980) و زیکا و همکاران (Zycha *et al.* 1969) مطابقت دارد.

- آنالیز فیلوژنی

- بررسی روابط فیلوژنی در داخل *Mucorales*

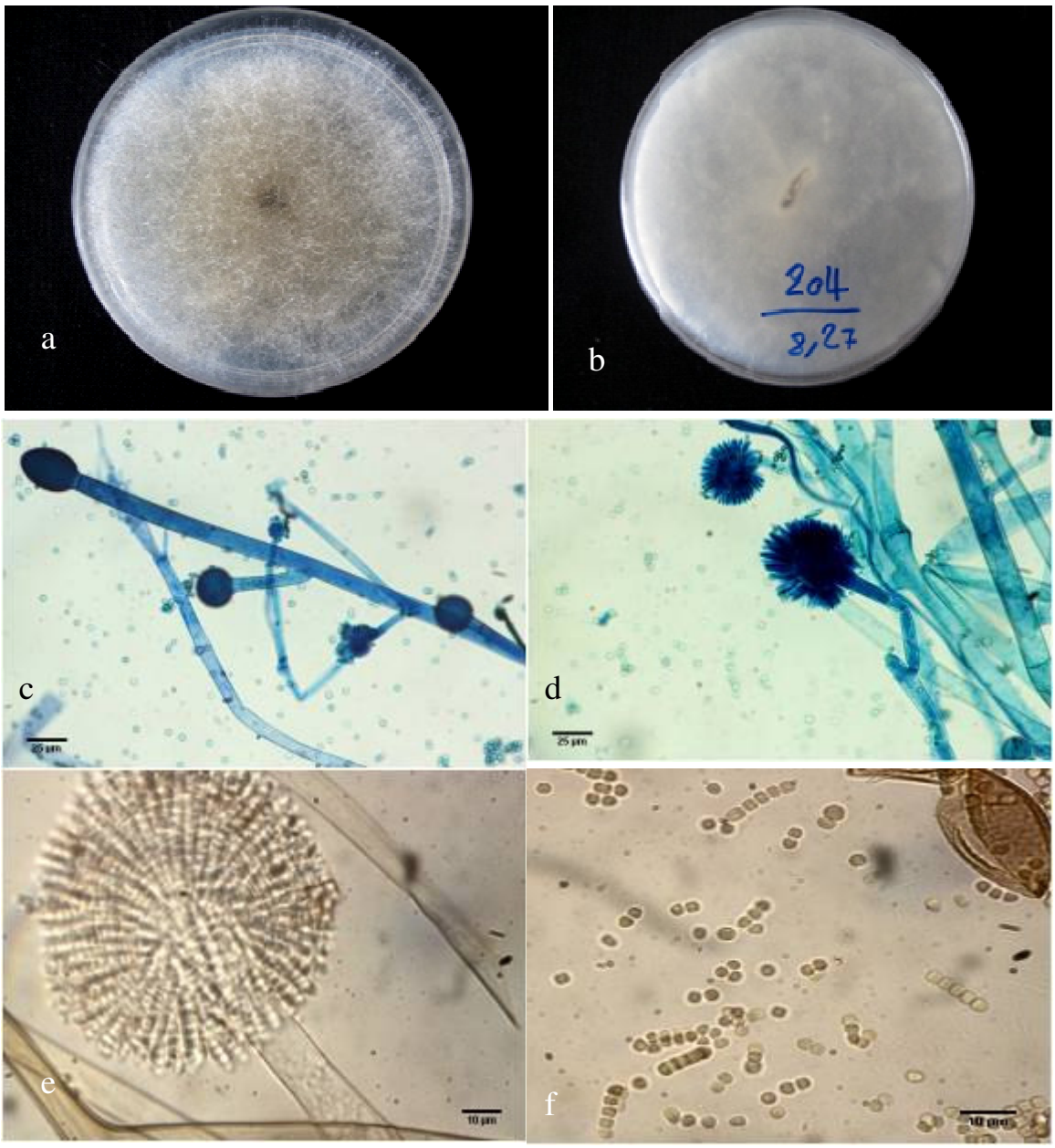
در این پژوهش، مجموعه اطلاعات جامع به لحاظ موفولوژیکی و مولکولی برای پنج گونه مرتبط با پنج جنس از پنج تیره *Mucorales* گردآوری شد. محصول PCR جفت آغازگرهای ITS 4 و ITS5 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد متشکل از تک‌باند DNA در محدوده ۹۰۰-۶۰۰ جفت باز برای جنس‌ها بود. توالی نوکلیوتیدی به دست آمده با روش Neighbor Joining (در این مقاله آورده نشده است) و Parsimony Maximum آنالیز شدند. دندروگرام ترسیم شده در هر دو روش مشابه هم بود.

نتایج حاصل از دندروگرام ITS4 وITS5 (شکل ۶) به صورت مشخص تمایز بین جنس‌های *Mortierellales* به عنوان گروه خارجی، از جنس‌های راسته *Mucorales* نشان داده است و جدایه مورد بررسی به همراه توالی گرفته شده از بانک ژن را در سه گروه جای داد. گروه A اعضاء تیره *Mucoraceae* (با ارزش ۹۵٪ Bootstrap) را در بر می‌گیرد که در آن شاخه *R. oryzae* به همراه شاخه‌های *Actinomucor elegans* و *Mucor hiemalis* به صورت پله‌ای (با ارزش ۹۶٪ Bootstrap) گروه خواهری کلاد سه زیرشاخه‌ای شامل شاخه‌های *M. racemosus*، *M. elegans* و زیرکلاد *M. fragilis* می‌باشد. گروه B از کلاد منوفیلیتیک پنج زیرشاخه‌ای *Syncephalastrum racemosum* (با ارزش ۹۹٪ Bootstrap) و کلاد سه زیرشاخه‌ای (با ارزش ۹۹٪ Bootstrap) *Absidia corymbifera* و *Lichtheimia ramosa* تشکیل شده است. گروه C شامل توده درون گروهی پلی‌تومی است که با ضریب احتمال ۹۳٪ از دو کلاد *Cunninghamella* و *Absidia* تشکیل شده است.



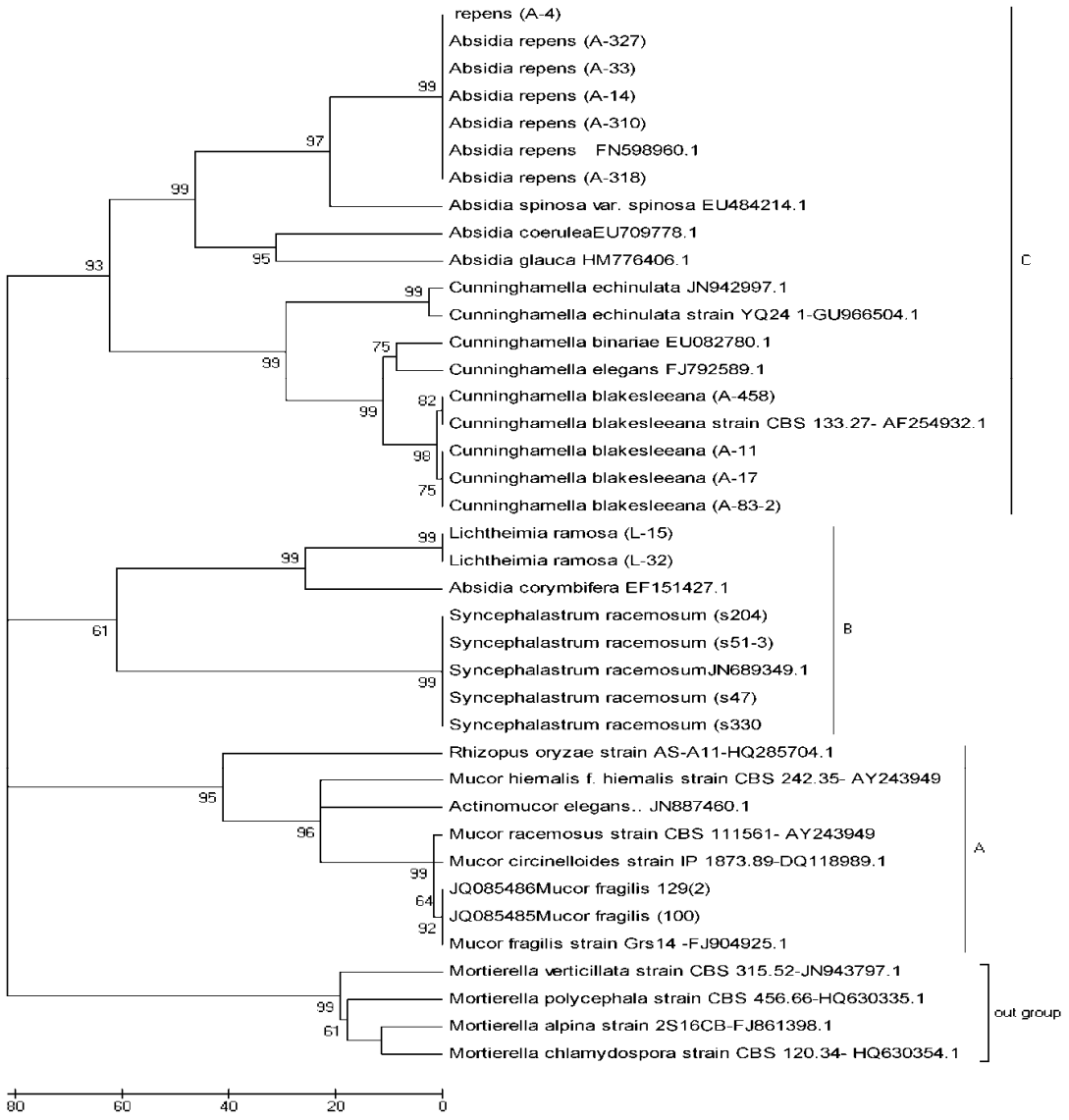
شکل ۴- *Mucor fragilis*: a. پرگنه سه روزه در دمای ۲۵° C، b. اسپورانژیوم به صورت جانبی روی اسپورانژیوفور، c. تخلیه اسپورانژیوم، به جا ماندن یقه و کلوملا روی اسپورانژیوفور (نوک پیکان)، d. کلامیدوسپور (نوک پیکان)، e. هاگ‌ها (مقیاس =۱۰ میکرومتر).

Fig. 4. *Mucor fragilis*: a. 3-day colony at 25° C, b. Sporangium laterally on sporangiophor, c. A ruptured sporangium, d. Chlamydospore, sporangiospores (Bars = 10 µm).



شکل ۵- *Syncephalastrum racemosum*: a, b. پرگنه چهار روزه در دمای ۲۵° C، c, d. اسپورانژیوفور مستقیم، ساده و منشعب e. مرواسپورانژیوم روی وزیکول انتهایی، f. مرواسپورانژیوم چنداسپوری (مقیاس: c, d = ۲۵ میکرومتر؛ e, f = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 5. *Syncephalastrum racemosum*: a, b. 4-day colony at 25° C, c, d. Sporangium, erect, simple or branched, e. Merosporangia on the terminal vesicle, f. Merosporangium (Bars: c, d = 25 µm; e, f = 10 µm).



شکل ۶- دندروگرام با آغازگر ITS میان جدایه‌های به دست آمده در این بررسی به همراه توالی‌ها و گروه خارجی استخراج شده از NCBI. کد قراردادی جدایه‌های جمع‌آوری شده در سمت راست هر جدایه آورده شده (ترسیم با روش Maximum Parsimony در نرم‌افزار MEGA5). اعداد روی شاخه‌ها Bootstrap با ۲۰۰۰ تکرار می‌باشند و ارزش‌های کمتر از ۵۰٪ نشان داده نشده‌اند.

Fig. 6. Dendrogram obtained based on ITS sequence of selected isolates in this study, out group and sequences extracted from NCBI. Code of isolates collected, at the right of the isolates (Maximum Parsimony method was drawn in MEGA5 software). Bootstrap values out of 2,000 replicates and values less than 50% were not shown.

بحث

در جریان پیشرفت‌های حاضر در زمینه فیلوژنی که تاریخ تکاملی قارچها را بازگو می‌کند، بیشترین توجهات به قارچهای آسکومیست و بازیدیومیست معطوف شده، در حالی که زیگومیست‌ها به عنوان یکی از شاخه‌های اساسی در سلسله قارچها به طور ناقص مطالعه شده‌اند (Kwasna *et al*. 2006). مطالعات مولکولی در جهت بررسی روابط فیلوژنی اغلب براساس آنالیز توالی‌هایی از (۱۸S) nuSSU، (۲۸S) nuLSU، *actin* و EF-1α پایه‌گذاری شده است (Voigt & Wostemeyer 2001). در مطالعه حاضر، مقایسه توالی‌های ITS جدایه‌ها با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن همولوژی ۱۰۰-۹۵٪ را نشان داد که به همراه نتایج حاصل از دندروگرام ITS تأیید کننده شناسایی موفولوژیک می‌باشد و با نتایج ارایه شده توسط هوفمن و همکاران (Hoffmann *et al*. 2009) و شوارتز و همکاران (Schwarz *et al*. 2006) که آنالیز توالی ITS rDNA را به عنوان یک روش معتبر برای شناسایی قارچهای زیگومیست در سطح گونه معرفی کردند، مطابقت دارد.

ادونل و همکاران (O'Donnell *et al*. 2001)، مجموعه‌ای از توالی‌های EF-1α+ nuLSU+nuSSU را در همه جنس‌های *Mucorales* با روش MP آنالیز کردند. لوتزونی و همکاران (Lutzoni *et al*. 2004) نیز توالی‌های nuLSU+nuSSU از مجموعه قارچهایی که توسط ادنل و همکاران (O'Donnell *et al*. 2001) استفاده شد را با روش Bayesian metropolis-coupled MCMC آنالیز کردند، دندروگرام حاصل از هر دو روش (MP و B-MCMCMC) که روابط فیلوژنی درون *Mucorales* را نشان می‌دادند تنها در جزییات با هم اختلاف داشتند. به صورت کلی، هر دو دندروگرام شباهت کمی با طبقه‌بندی‌های متداول از سطح تیره در این راسته داشتند و نتایج هر دو آنالیز پلی‌فیلی بودن تیره‌های *Mucorales* را تایید کردند. بیشترین پلی‌فیلی در تیره *Mucoraceae* که با داشتن طیف وسیعی از گونه‌ها در مقایسه با بقیه تیره‌ها تعریف می‌شود، مشاهده شد. در تحقیق حاضر نیز جدا قرار گرفتن کلادهای مورد بررسی *Absidia*، *Mucor* و *Rhizopus* متعلق به تیره *Mucoraceae* به همراه مطالعات مورفولوژیکی و مولکولی فرضیه پلی‌فیلیتیک بودن اعضاء این تیره را قوت می‌بخشد.

لیندت در سال ۱۸۸۶ گونه *M. ramosa* را در جنس *Mucor* (Micheli 1729) توصیف کرد. زوف در سال ۱۸۹۰ این گونه را در جنس *Rhizopus* (Ehrenberg 1820) قرار داد. در سال ۱۹۰۳ ویلیمین (Vuillemin 1903) جنس *Lichtheimia* را با دو گونه *L. ramosa* و *L. corymbifera* توصیف نمود. در این پژوهش جنس *Lichtheimia* نه تنها در سطح مولکولی بلکه براساس تفاوت در مورفولوژی و فیزیولوژی رشد از جنس *Absidia* جدا شده و در کلاد مستقل از *Absidia* حاضر شد، در دندروگرام حاصل از ITS گونه سابق *A. corymbifera* گرفته شده از بانک ژن در موقعیت اصلی خود یعنی جنس *Lichtheimia* قرار گرفته و از *Absidia* جدا شده است که با مطالعات فیلوژنی هوفمن (Hoffmann *et al*. 2009) مطابقت دارد.

به طور کلی، نتایج حاصل از این پژوهش مشخص نمود که نواحی ITS rDNA کارایی قابل قبولی در شناسایی و تعیین موقعیت تاکسونومیکی قارچهای *Mucorales* دارد که می‌تواند در کنار شناسایی مورفولوژیک به عنوان یک روش سریع و مطمئن برای شناسایی اعضاء این گروه به کار برده شود.

References

Abe, A., Asano, K. & Sone, T. 2010. A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 74: 1325–1331.

Alastruey-Izquierdo, A., Hoffmann, K., Hoog de, G.S., Rodriguez-Tudela, J.L., Voigt, K., Bibashi, E. & Walther, G. 2010. Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn *Mycocladus*, *Absidia* spp.). Journal of Clinical Microbiology 48: 2154–2170.

Baijal, U. & Mehrotra, B.S. 1980. The genus *Cunninghamella*: A reassessment. Sydowia 33: 1–13.

Benjamin, R.K. 1966. The merosporangium. Mycologia 58: 1–42.

Benjamin, R.K. 1979. *Zygomycetes* and their spores. Pp. 573–621. *In*: The Whole Fungus (Kendrick, E.B., ed.). National Museum of Natural Sciences, Ottawa (Canada).

Certik, M. & Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. Journal of Bioscience and Bioengineering 87: 1–14.

Chakrabarti, A., Shivaprakash, M., Curfs-Breuker, I., Baghela, A., Klaassen, C. & Meis, J. 2010. *Apophysomyces elegans*: epidemiology, amplified fragment length polymorphism typing, and in vitro antifungal susceptibility pattern. Journal of Clinical Microbiology 48: 4580–4585.

Cutter, V.M. 1946. The genus *Cunninghamella* (*Mucorales*). Farlowia 2: 321–343.

Dannaoui, E., Schwarz, P., Slany, M., Loeffler, J., Jorde, A.T., Cuenca-Estrella, M., Hauser, P.M., Shrief, R., M. Huerre & Freiberger, T. 2010. Molecular detection and identification of *Zygomycetes* species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis: a collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation. Journal of Clinical Microbiology 48: 2043–2046.

Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press document MM-18A.

Domsch, K.H. & Gams, W. 1980. Compendium of Soil Fungi. Volume 2. Academic Press, London.

Ehrenberg, C.G. 1820. De mycetogenesi as Acad C.L.C.N.C Praesidem Epistola Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Germanicae. Naturae Curiosorum 10: 159–222.

Ershad, D. 2009. Fungi of Iran. (3rd. ed.). Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, 531 pp.

Garcia-Hermoso, D., Hoinard, D., Gantier, J.C., Grenouillet, F., Dromer, F. & Dannaoui, E. 2009. Molecular and phenotypic evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (formerly *Absidia corymbifera*) complex isolates associated with human mucormycosis: rehabilitation of *L. ramosa*. Journal of Clinical Microbiology 47: 3862–3870.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.

Hesseltine, C.W. & Ellis, J.J. 1964. The genus *Absidia*: *Gongronella* and cylindrical-spored species of *Absidia*. Mycologia 56: 568–601.

Hesseltine, C.W. & Ellis, J.J. 1966. Species of *Absidia* with ovoid sporangiospores I. Mycologia 58: 761–785.

Hoffmann, K., Discher, S. & Voigt, K. 2007. Revision of the genus *Absidia* (*Mucorales*, *Zygomycetes*) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladiaceae* fam. nov. Mycological Research 111: 1169–1183.

Hoffmann, K., Walther, G. & Voigt, K. 2009. *Mycocladus* vs. *Lichtheimia*: a correction (*Lichtheimiaceae* fam. nov., *Mucorales*, *Mucoromycotina*). Mycological Research 113: 277–278.

Kieslich, K. 1997. Biotransformations. Pp. 297–399. *In*: Fungal Biotechnology (Anke, T., ed.). London. Chapman & Hall.

Kwasna, H., Ward, E. & Bateman, G.L. 2006. Phylogenetic relationships among *Zygomycetes* from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. Mycological Research 110: 501–510.

Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. 1992. Medical mycology. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 34: 504–504.

Larché, J., Machouart, M., Burton, K., Collomb, J., Biava, M., Gé, A. & Fortier, B. 2005. Diagnosis of cutaneous mucormycosis due to *Rhizopus* microsporus by an innovative PCR-restriction fragment-length polymorphism method. Clinical Infectious Diseases 41: 1362–1365.

Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, J.C., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T.Y., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Shcoch, C., Arnold, A.E., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, S., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, G.H., Luücking, R., Lumbsch, T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hansen, K., Harris, R.C., Hosaka, K., Lim, Y.W., Matheny, B., Nishida, H., Pfister, D., Rogers, J., Rossman, A., Schmitt, I., Sipman, H., Stone, J., Sugiyama, J., Yah, R. & Vilgalys, R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. American Journal of Botany 91: 1446–1480.

Mehrotra, B.R., Baijal, U. & Mehrotra, B. 1965. Species of *Mucor* from India. I. Sydowia 19: 238–243.

Meyer, W. & Gams, W. 2003. Delimitation of *Umbelopsis* (*Mucorales*, *Umbelopsidaceae* fam. nov.) based on its ITS sequence and RFLP data. Mycological Research 107: 339–350.

Micheli, P.A. 1729. Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodi disposita. Florence: Bernardi Paperinii. 234 pp.

Nagy, A., Pesti, M., Galgóczy, L. & Vágvölgyi, C. 2004. Electrophoretic karyotype of two *Micromucor* species. Journal of Basic Microbiology 44: 36–41.

Nout, M.J.R. & Aidoo, K.E. 2010. Asian fungal fermented food. Pp. 29–58. *In*: Industrial Applications. (Esser, K. & Hoftricher, M., eds). Ruhr University. Springer. 458 pp.

O'Donnell, K., Lutzoni, F.M., Ward, T.J. & Benny, G.L. 2001. Evolutionary relationships among mucoralean fungi (*Zygomycota*): evidence for family polyphyly on a large scale. Mycologia 93: 286–296.

Papp, T., Vastag, M., Michailides, T.J., Ferenczy, L. & Vágvölgyi, C. 2001. Genetic variability of the postharvest pathogen *Gilbertella persicaria*: identification of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers correlating with (+) and (–) mating types. Antonie van Leeuwenhoek 80: 301–309.

Rapley, R. 2000. The Nucleic Acid Protocols Handbook. Humana Press Inc. 1072 pp.

Saito, K., Saito, A., Ohnishi, M. & Oda, Y. 2004. Genetic diversity in *Rhizopus oryzae* strains as revealed by the sequence of lactate dehydrogenase genes. Archives of Microbiology 182: 30–36.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. 2002. Introduction to food and airborne fungi. CBS Fungal Biodiversity Centre.

Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J.C., Garcia-Hermoso, D., Lortholary, O., Dromer, F. & Dannaoui, E. 2006. Molecular identification of *Zygomycetes* from culture and experimentally infected tissues. Journal of Clinical Microbiology 44: 340–349.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731–2739.

Voigt, K. & Wostemeyer, J. 2001. Phylogeny and origin of 82 *Zygomycetes* from all 54 genera of the *Mucorales* and *Mortierellales* based on combined

analysis of actin and translation elongation factor EF-1 [alpha] genes. Gene 270: 113–120.

Vuillemin, P. 1903. Le genre *Tieghemella* et la se´rie de Absidie´es. Bulletin de la Société Mycologique de France 19: 119–127.

Webster, J. & Weber, R. 2007. Introduction to Fungi (3rd. ed.). Cambridge University Press.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. *In*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J., eds). Academic Press. New York. USA.

Zycha, H., Siepmann, R. & Linnemann, G. 1969. *Mucorales*: Eine Beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe. Mit einem Beitrag zur Gattung *Mortierella*. Lubrecht and Cramer Limited. 355 pp.