

گزارش‌ها و میزبان‌های جدید گونه‌های *Curvularia* در ایران\*

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۷ / پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۱

**سحر جانبزرگی:** دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران  
**مهدی مهرابی کوشکی**✉: دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران؛ گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (mhdmhrb@scu.ac.ir; mhdmhrb@gmail.com)  
**رضا فرخی‌نژاد:** استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

## چکیده

در مطالعه حاضر، هشت جدایه از جنس *Curvularia*، جداسازی شده از گیاهان لوبیا چشم‌بلبلی، ذرت و شیشه‌شور در استان خوزستان، براساس روش مبتنی بر فیلوژنی مولکولی و ریخت‌شناسی شناسایی شدند. زیست‌توده میسلیمی جدایه‌ها، تولید شده در محیط مایع سیب زمینی-دکستروز، به وسیله کاغذ صافی جمع‌آوری و خشک-انجمادی شد. توده DNA با استفاده از یک روش مبتنی بر فنل و کلروفرم استخراج شد. بخش‌هایی از نواحی rDNA هسته‌ای و *gpd* با استفاده از آغازگرهای مناسب تکثیر و سپس توالی‌یابی شدند. توالی‌های ITS و *gpd* مربوط به جدایه‌های تحت تحقیق با توالی‌های معتبر مربوط به سویه‌های تپ در بانک ژن با استفاده از الگوریتم BLASTn و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی (مبتنی بر دو ناحیه ژنومی) مورد مقایسه قرار گرفتند. بر این اساس، جدایه‌ها در سطح گونه شناسایی و گونه‌های *C. americana*، *C. muehlenbeckiae* و *C. verruculosa* را شامل شدند. لذا، این نخستین گزارش دو گونه *C. americana* و *C. muehlenbeckiae* در ایران می‌باشد. به علاوه، این مطالعه برای هر سه گونه مورد بررسی میزبان جدیدی گزارش می‌کند و مشخصات ریخت‌شناسی و مولکولی بیشتری برای گونه *C. verruculosa* ارائه می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** ذرت، ریخت‌شناسی، شیشه‌شور، فیلوژنی مولکولی، لوبیا چشم‌بلبلی

New records and hosts of the *Curvularia* species in Iran

Received: 18.10.2018 / Accepted: 10.04.2019

**Sahar Janbozorgi:** MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

**Mehdi Mehrabi-Koushki**✉: Associate Prof. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran; Biotechnology and Bioscience Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran (mhdmhrb@scu.ac.ir; mhdmhrb@gmail.com)

**Reza Farokhinejad:** Prof. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

## Summary

In present study, eight isolates of the genus *Curvularia*, recovered from plants of the cowpea, maize and bottlebrush in Khuzestan province, were identified based on molecular phylogeny in combination with morphology. The mycelial biomass of the isolates, produced in potato-dextrose-Broth, were collected by passing through filter papers and freeze-dried. DNA was extracted using a phenol- and chloroform-based method. The partial regions of nrDNA and *gpd* were amplified using the appropriate primers and then sequenced. The consensus ITS and *gpd* sequences of the isolates under survey were compared to reference sequences of the type strains in GenBank by BLASTn algorithm and two-loci phylogenetic analysis. Accordingly, the isolates were identified at species level as follow: *Curvularia americana*, *C. muehlenbeckiae*, and *C. verruculosa*. To our knowledge, this is the first record of both the *C. americana* and *C. muehlenbeckiae* in Iran. Moreover, this study reports new hosts for all three species with further morphological and molecular characterization of *C. verruculosa* species as well.

**Keywords:** Bottlebrush, cowpea, maize, molecular phylogeny, morphology

\* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده نخست به راهنمایی دکتر مهرابی کوشکی و دکتر فرخی‌نژاد ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

## مقدمه

*B. crustacea* (Lefebvre & Aar. G. Johnson) Shoemaker  
*B. dactyloctenii* *B. cylindrica* Alcorn (Henn.) Alcorn  
*B. nicotiae* *B. neergaardii* (Danquah) Alcorn, Alcorn  
*B. papendorffii* *B. ovariicola* Alcorn (Mouch.) Alcorn  
*B. sesuvii* *B. portulacae* (Rader) Alcorn (Aa) Alcorn  
*B. subpapendorffii* (Mouch.) Alcorn Jing. Z. Zhang  
*B. tripogonis* (A.S. Patil & V.G. Rao) Alcorn  
*D. boeremae* *D. ellisii* Danquah *B. tropicalis* Sivan.  
*D. homomorpha* (Luttr. & A.S. Patil & V.G. Rao  
*D. miyakei* (Y. Nisik.) Subram. & B.L. Rogerson) Sivan.  
*D. indica* (J.N. Rai, Wadhvani & J.P. Tewari) Jain  
*D. nodulosa* (Berk. & M.A. Curtis ex Sacc.) Mouch.  
*D. ravenelii* (M.A. Curtis) Subram. Subram. & B.L. Jain  
*H. geniculatum* Tracy و *H. borrierae* Viégas. & B.L. Jain  
*Curvularia* & Earle که در بررسی‌های فیلوژنتیکی با دودمان  
خوشه‌بندی می‌شوند.

در مطالعه حاضر، سه گونه *Curvularia* که از  
میزبان‌های گیاهی در استان خوزستان جداسازی شده است،  
توصیف می‌شوند. بررسی ریخت‌شناسی و یک تجزیه و تحلیل  
فیلوژنتیکی مبتنی بر نواحی ژنی ITS و *gpd* برای شناسایی این  
گونه‌ها استفاده شده است.

## روش بررسی

- جداسازی قارچ‌ها از نمونه‌های گیاهی و خالص‌سازی  
در طول سال‌های ۹۵-۱۳۹۴، نمونه‌های گیاهی از برگ  
ذرت (دارای علائم لکه‌برگی)، گیاه کامل لوبیا چشم‌بلبلی (بدون  
علائم با هدف شناسایی اندوفیت‌ها) و شاخه شیشه‌شور  
(پوسیدگی چوب) از شهرستان‌های اهواز، اندیمشک، صفی‌آباد و  
هفت‌تپه جمع‌آوری گردید. جداسازی قارچ‌ها براساس روش‌های  
متداول انجام شد (Babaahmadi et al. 2018, Heidari et al. 2018a  
2018). قطعات کوچکی از اندام‌های گیاهی (برای نمونه‌های  
ذرت و شیشه‌شور، مرز آلوده و سالم) با استفاده متوالی از اتانول  
۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۲٪ ضدعفونی سطحی شدند و پس از  
شستشو و خشک کردن روی کاغذ صافی به محیط کشت  
سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) حاوی ۵۰-۳۰ میلی‌گرم در  
لیتر سولفات استرپتومایسین منتقل شدند. در این مطالعه از بین  
قارچ‌های به دست آمده، هشت جدایه قارچی از سه تیپ  
مورفولوژیکی جنس *Curvularia* برای شناسایی مبتنی بر

جنس *Curvularia* یکی از قارچ‌های تولید کننده  
کنیدیوم‌های چندحجره‌ای با دیواره عرضی (Phragmoconidia)  
است که با استفاده از بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی از  
سایر قارچ‌های شبه‌هلمینتوسپوریوم جدا می‌شوند (Heidari et al. 2018b  
al. 2018b). اغلب گونه‌های *Curvularia* به صورت بیمارگر  
(Manamgoda et al. 2011, Madrid et al. 2014), اندوفیت  
(Tadych et al. 2012, Gautam et al. 2013, Jena & Tayung )  
یا ساپروفیت (Manamgoda et al. 2013, Heidari et al. 2018b  
al. 2011, 2012a, b, 2014, 2015, Scott & Carter 2014, Tan  
et al. 2014) با بافت‌های گیاهی، حیوانی و انسانی همراه هستند.  
برخی گونه‌های این قارچ از هوا (Almaguer et al. 2012, )  
خاک (Manamgoda et al. 2011, ) (Hargreaves et al. 2013  
Verma et al. 2017a) (Marin-Felix et al. 2017a) و محیط‌های آبی (Verma et al. 2016  
2016, Sharma et al. 2013) نیز جداسازی شده‌اند.

جنس *Curvularia* با توصیف گونه *C. lunata* به عنوان  
نمونه نامگذاری (گونه تیپ) توسط بوجین (Boedijn 1933)  
معرفی شد. در حال حاضر (Hibbett 2007)، این جنس در  
تیره *Pleosporaceae*، راسته *Pleosporales* و رده  
*Dothideomycetes* قرار دارد. شناسایی گونه‌های این جنس در  
ابتدا براساس ریخت‌شناسی بود، ولی در ادامه با استفاده از  
بررسی‌های توأم ریخت‌شناسی و مولکولی انجام شد  
(Manamgoda et al. 2012a, b, 2014, 2015, Madrid et al. )  
2014, Tan et al. 2014, 2018, Tomaso-Peterson et al.  
2016, Marin-Felix et al. 2017a, b, Dehdari et al. 2018,  
Heidari et al. 2018b, Liang et al. 2018, Mehrabi-Koushki  
et al. 2018). مطالعات سال‌های اخیر نشان می‌دهد که  
بررسی‌های ریخت‌شناسی برای جداسازی دقیق گونه‌های  
*Curvularia* از سایر جنس‌ها و گونه‌های خویشاوند کافی  
نمی‌باشد. برای جداسازی گونه‌های *Curvularia*، عموماً از نواحی  
ژنی ITS، *gpd* (ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز) و *tefl*  
(ژن عامل تداوم ترجمه) به صورت انفرادی یا ترکیبی استفاده  
شده است (Manamgoda et al. 2012a, b, 2014, 2015, )  
Madrid et al. 2014, Tan et al. 2014, 2018, Tomaso-  
Peterson et al. 2016, Marin-Felix et al. 2017a, b, Dehdari  
et al. 2018, Heidari et al. 2018b, Liang et al. 2018,  
Mehrabi-Koushki et al. 2018) و این مطالعات فیلوژنی  
مولکولی باعث انتقال تعدادی از گونه‌های قدیمی *Bipolaris*  
و *Drechslera* به جنس *Curvularia* شده است مانند گونه‌های  
*B. australiensis* (M.B. Ellis) *B. australis* Alcorn, Tsuda & Ueyama  
*B. buchloes*

ریخت‌شناسی و مولکولی انتخاب شدند. این جدایه‌ها به روش تک‌اسپور خالص‌سازی و در مجموعه کشت‌های زنده قارچی در مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (IRAN) و مجموعه کشت‌های زنده قارچی در دانشگاه شهید چمران اهواز (SCUA) ذخیره شدند.

شرایط رشدی و بررسی‌های ریخت‌شناسی - سرعت رشد و مشخصات پرگنه روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) در دمای  $28 \pm 0/5$  سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعته انجام شد. قطر پرگنه‌ها حداقل برای هفت روز اندازه‌گیری شد. مشخصات و اندازه ساختارهای هاگ‌زایی (شامل کنیدیوم‌ها، کنیدیوفورها و سلول‌های کنیدیوم‌زایی) با استفاده از عدسی شیئی 40x و 100x یک میکروسکوپ نوری (Leitz Wetzlar, SM-LUX) تعیین شد. اندازه‌گیری‌ها در یک دامنه کمینه-بیشینه، ۹۵ درصد حدود اطمینان و میانگین اندازه‌ها با انحراف معیار مبتنی بر حداقل ۱۰۰ اندازه‌گیری برای هر ساختار تعیین شد. کشت‌های روی اسلایدهای میکروسکوپی جهت تهیه تصاویر مناسب براساس دستورالعمل بینک و روگرز (Beneke & Rogers 1996) انجام شد. تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS BX51) متصل به یک دوربین دیجیتال (OLYMPUS DP12) تهیه شد. برای شناسایی و تطبیق خصوصیات جدایه‌ها با توصیف رسمی این گونه‌ها، ترجیحا از توصیف اصلی این گونه‌ها در محل انتشار و در صورت عدم دسترسی از توصیف غیررسمی در بانک قارچ‌ها (<http://www.mycobank.org>) استفاده شد (Manamgoda et al. 2012a, b, 2014, 2015, Madrid et al. 2014, Tan et al. 2014, 2018, Tomaso-Peterson et al. 2016, Marin-Felix et al. 2017a, b, Heidari et al. 2018b, Liang et al. 2018).

- تولید زیست‌توده، استخراج DNA و تکثیر نواحی ژنی زیست‌توده میسلیومی در فلاسک‌های ارلن‌مایر حاوی محیط مایع سیب‌زمینی-دکستروز (PDA) تولید و به وسیله فیلتراسیون با کاغذ صافی جمع‌آوری گردید. سپس، این زیست‌توده در دستگاه فریزدرایر (Freeze-Dryer, Alpha 1-) (2LD Plus, Christ) خشک‌انجمادی شد و در ازلت مایع پودر و تا هنگام استخراج DND در فریزر ۲۰- نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از روش ریدر و برودا (Raeder & Broda, 1985) با اندکی تغییرات انجام شد (Ahmadpour et al. 2017). حدود ۱۲۰۰ جفت باز از ناحیه rDNA هسته‌ای (شامل 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 و 28S-D1/D2) و ۶۰۰ جفت باز از ناحیه *gpd* به ترتیب با استفاده از جفت‌آغازگرهای عمومی ITS1/NL4

- توالی‌یابی، الگوریتم BLASTn و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی - تولیدات PCR روی ژل آگاروز بارگذاری و بعد از انجام الکتروفورز، باندهای جداسازی و با استفاده از کیت استخراج از ژل GF-1 AmbiClean (Vivantis, Malaysia) برابر دستورالعمل ارائه شده خالص‌سازی گردید. توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر توسط شرکت ماکروژن (Humanizing Genomics, Macrogen, South Korea) انجام شد. توالی‌های خام مستقیم و معکوس با استفاده از نرم‌افزارهای DNABaserver 3.5.0 و BioEdit Ver. 4.0.6.2 (Hall 1999) و [www.DnaBaser.com](http://www.DnaBaser.com) ویراستاری و تلفیق شد و در بانک ژن NCBI ذخیره گردید (جدول ۱). میزان شباهت توالی‌های به دست آمده با توالی‌های مرجع مربوط به سویه‌های تیپ با استفاده از الگوریتم جستجوی BLASTn تعیین شد. جهت تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، توالی‌های ITS و *gpd* مربوط به سویه‌های تیپ و گاهی شناخته شده از تمام گونه‌های معتبر *Curvularia* از بانک ژن NCBI انتخاب و در کنار توالی‌های بومی در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) با کمک نرم‌افزار MEGA Ver. 6.0 (Tamura et al. 2013) استفاده شدند (شکل ۱). برای ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنتیکی، سویه *Bipolaris drechleri* MUS0028 به عنوان آرایه خارج از گروه (outgroup) استفاده شد. انتخاب بهترین مدل برای رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از همین نرم‌افزار انجام شد.

### نتیجه و بحث

در این پژوهش، ریخت‌شناسی هشت جدایه از سه گونه *Curvularia americana* (از گیاه ذرت)، *C. muehlenbeckiae* (از گیاه شیشه‌شور) و *C. verruculosa* (از گیاه لوبیا چشم‌بلبلی) بررسی شد. برای تشخیص گونه‌ها، علاوه بر ریخت‌شناسی، از یک تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مبتنی بر دو ناحیه ژنومی ITS و *gpd* استفاده شد (شکل ۱). جزییات بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی هر گونه به تفکیک آورده شده است.

۱۸ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از ناحیه ITS و *gpd* و ۲۹۱ سایت متغیر و حاوی اطلاعات متمایزکننده آرایه‌ها (Parsimony-informative) (شامل ۱۰۹ و ۱۸۲ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از ناحیه ITS و *gpd*) بود. براساس آزمون انتخاب مدل برای جانیشینی نوکلئوتیدی در نرم‌افزار MEGA6، بهترین الگوریتم جانیشینی نوکلئوتیدی برای رسم درخت فیلوژنتیکی مدل Tamura-Nei (TN93+G+I) بود. در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر دو ناحیه ژنومی ITS و *gpd*، جدایه‌های مورد بررسی با سویه‌های مرجع گونه خود (در مورد گونه *Curvularia muehlenbeckiae* به همراه تعدادی از گونه‌های خویشاوند) خوشه‌بندی شدند و شاخه‌های تکاملی با ارزش و معتبر ایجاد کردند (شکل ۱).

- توالی‌یابی نواحی ITS و *gpd* و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی در این بررسی، ۲۶۲ توالی از ۱۳۱ آرایه (که پوشش‌دهنده حداقل یک سویه از تمام گونه‌های معتبر *Curvularia*، جدایه‌های مورد بررسی و آرایه خارج از گروه می‌باشد)، در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه استفاده شدند. مجموع طول توالی ترکیبی هم‌ردیف شده چهار ناحیه مورد بررسی، با احتساب گپ‌های داخلی ۹۶۳ سایت نوکلئوتیدی (شامل ۴۶۸ و ۴۹۵ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از ناحیه ITS و *gpd*) بود. از این تعداد سایت نوکلئوتیدی با شامل کردن آرایه غریبه، ۶۱۶ سایت محافظت شده (شامل ۳۲۳ و ۲۹۳ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از ناحیه ITS و *gpd*)، ۵۱ سایت متغیر و عاری از اطلاعات متمایزکننده آرایه‌ها (Parsimony-uninformative) (شامل ۳۳ و

جدول ۱- اطلاعات مربوط به جدایه‌های مطالعه شده در این بررسی

آرایه	نام جدایه	میزبان		مکان نمونه‌برداری	شماره دسترسی در بانک ژن	
		نام علمی	اندام گیاهی		ITS	<i>gpd</i>
<i>Curvularia americana</i>	SCUA-Hey-W; IRAN 3132C	<i>Zea mays</i>	لکه‌برگی	اندیمشک	MG846738	MK050845
<i>C. muehlenbeckiae</i>	SCUA-Shu-Vig- 7lb; IRAN 3122C; CBS 144693	<i>Vigna unguiculata</i>	برگ سالم	صفی‌آباد	MG971291	MK050844
<i>C. muehlenbeckiae</i>	SCUA-Saf-Vig- 6Sa; IRAN 3127C	<i>V. unguiculata</i>	ساقه سالم	صفی‌آباد	MG971288	MG975603
<i>C. muehlenbeckiae</i>	SCUA-Hat-Vig- 5Rc; IRAN 3128C	<i>V. unguiculata</i>	ریشه سالم	جاده هفت‌تپه	MG971286	MG975601
<i>C. muehlenbeckiae</i>	SCUA-Hat-Vig- 5La; IRAN 3129C	<i>V. unguiculata</i>	برگ سالم	جاده هفت‌تپه	MG971284	MG975599
<i>C. muehlenbeckiae</i>	SCUA-Hat-Vig- 5LC; IRAN 3130C	<i>V. unguiculata</i>	برگ سالم	جاده هفت‌تپه	MG971285	MG975600
<i>C. muehlenbeckiae</i>	SCUA-6La	<i>V. unguiculata</i>	برگ سالم	صفی‌آباد	MG971287	MG975602
<i>C. verruculosa</i>	SCUA-6bi; IRAN 3140C; CBS 144677	<i>Callistemon</i> sp.	شاخه خشک و پوسیده	اهواز	KX139034	MG428698

نمونه بررسی شده: استان خوزستان، شهرستان اندیمشک، برگ ذرت دارای علائم لکه‌برگی (*Zea mays*)، آذر ۱۳۹۵، کبری حیدری (جدایه IRAN 3132C).

- بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌های شناسایی شده *Curvularia americana* Da Cunha, Madrid, Gené & Cano, Five New *Curvularia* species From Clinical Specimens 33: 54 (2014)

*C. spicifera*, *C. lunata*, *C. chiangmaiensis*, *C. alcornii*, *C. verruculosa* و *C. tuberculata* نیز گزارش شده است (Ershad 2009, Manamgoda et al. 2015, Tan et al. 2018).

***Curvularia muehlenbeckiae*** Madrid, Da Cunha, Gené Guarro & Crous, Five New *Curvularia* species From Clinical Specimens 33: 56 (2014)

نمونه‌های بررسی شده: استان خوزستان، صفی‌آباد، برگ سالم لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata*)، شهریور ۱۳۹۵، سحر جانبزرگی (جدایه‌های IRAN 3122C و SCUA-6La)؛ استان خوزستان، صفی‌آباد، ساقه سالم لوبیا چشم‌بلبلی، شهریور ۱۳۹۵، سحر جانبزرگی (جدایه IRAN 3127C)؛ استان خوزستان، جاده هفت‌تپه، برگ سالم لوبیا چشم‌بلبلی، شهریور ۱۳۹۵، سحر جانبزرگی (جدایه‌های IRAN 3129C و IRAN 3130C)؛ استان خوزستان، جاده هفت‌تپه، ریشه سالم لوبیا چشم‌بلبلی، شهریور ۱۳۹۵، سحر جانبزرگی (جدایه IRAN 3128C).

سطح رویی پرگنه‌ها در محیط کشت PDA، طوسی روشن تا مایل به قهوه‌ای می‌باشد. سطح پشتی نیز سیاه متمایل به خاکستری می‌باشد. قطر پرگنه روی محیط کشت PDA پس از یک هفته در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سلسیوس، ۶۸ میلی‌متر است. ریشه‌ها نیمه‌روشن تا قهوه‌ای، منشعب، دیواره‌دار و با دیواره‌های نازک و صاف هستند. کنیدیوفورها به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره، دیواره‌دار و غیرمنشعب؛ به صورت منفرد ظاهر می‌شوند و در قسمت‌های بالایی عریض‌تر و خمیده هستند؛ دیواره‌های سلولی آن‌ها ضخیم‌تر از ریشه‌های رویشی است؛ ابعاد کنیدیوفورها  $(2/2-4/9-5/2)$   $\times$   $(2/6-2/9)$   $\times$   $(260-185-39)$  میکرومتر، ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $3/7-3/9$   $\times$   $100-86/2$  میکرومتر قرار دارد و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $3/8 \pm 0/9$   $\times$   $93/1 \pm 44/3$  میکرومتر می‌باشد (براساس ۱۰۰ عدد کنیدیوفور). سلول‌های کنیدیوم‌زایی غالباً ادغام شده و اغلب همراه با نقاط گره‌دار می‌باشد. کنیدیوم‌زایی به حالت زیگزاگ (سیمپودیال) دیده می‌شود. کنیدیوم‌ها بیضی تا نیمه‌استوانه‌ای، دارای دیواره صاف و غالباً چهارحجره‌ای و نامتقارن هستند؛ اغلب خمیده و حجره سوم از سلول قاعده‌ای تیره‌تر و بزرگ‌تر می‌باشد؛ در دو انتها گرد و دو حجره انتهایی روشن‌تر از حجره‌های میانی است؛ ابعاد کنیدیوم‌ها  $(12/7-13)$   $\times$   $(7/5-7/8)$   $\times$   $(23/4-15/6-15/3)$  میکرومتر، ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $9/5-9/8$   $\times$   $20-19/6$  میکرومتر قرار دارد و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $9/6 \pm 1/2$   $\times$   $19/8 \pm 1/7$

سطح رویی پرگنه‌ها در محیط کشت PDA، سبز با حاشیه سیاه رنگ و سطح پشتی آن‌ها سیاه متمایل به خاکستری است. ریشه‌ها نیمه‌روشن تا قهوه‌ای روشن، منشعب، دیواره‌دار و با دیواره‌های نازک و صاف هستند. کنیدیوفورها به صورت منفرد و بدون انشعاب ظاهر می‌شوند، دیواره‌دار و در قسمت‌های بالایی عریض‌تر می‌شوند؛ دیواره‌های سلولی کنیدیوفورها ضخیم‌تر از ریشه‌های رویشی است؛ اندازه کنیدیوفورها  $(2/8-3/5)$   $\times$   $(136-116)$   $\times$   $(7/1-3/3)$  میکرومتر، ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $3/8-4/2$   $\times$   $44-68$  میکرومتر قرار دارد و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $4 \pm 0/6$   $\times$   $56 \pm 36$  میکرومتر می‌باشد (براساس ۱۰۰ عدد کنیدیوفور). سلول‌های کنیدیوم‌زایی اغلب ادغام شده و بیشتر همراه با نقاط گره‌دار می‌باشد. کنیدیوم‌زایی به صورت زیگزاکی (سیمپودیال) است. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای روشن، بیضی تا نیمه‌استوانه‌ای، اغلب چهارسلولی، دارای دیواره صاف، بیشترین قطر در سلول سوم از ناف، دو سلول انتهایی روشن‌تر، انتهای کنیدیوم‌ها در هر دو قطب تقریباً گرد شده، اغلب کمی خمیده و گاهی دارای خمیدگی زیاد است؛ اندازه کنیدیوم‌ها  $(7/1-9/1)$   $\times$   $(12/1-13/1)$   $\times$   $(28/3-24/2)$   $\times$   $(8/1-12)$  میکرومتر، ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $9/9-10/5$   $\times$   $16/2-18/5$  میکرومتر قرار دارد و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $10/2 \pm 1/2$   $\times$   $17/3 \pm 4/6$  میکرومتر می‌باشد (براساس ۱۰۰ عدد کنیدیوم). ناف بیرون‌زده، تیره و ضخیم است. کلامیدوسپور و شکل جنسی مشاهده نشد (شکل ۲).

نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه IRAN 3132C نشان داد که توالی ITS و *gpd* این جدایه با سویه‌های شناخته شده *C. americana* (از جمله سویه تیپ *C. americana* UTHSC 083414) به ترتیب ۹۹ و ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی مبتنی بر توالی ترکیبی دو ناحیه *gpd* و ITS (شکل ۱)، جدایه IRAN 3132C با دو سویه تیپ *C. americana* UTHSC 08-3414 و *C. americana* UTHSC 07-2649 خوشه‌بندی شد و یک شاخه تکاملی با ارزش بوت‌استراپ ۹۶ درصد ایجاد کردند.

سویه تیپ این گونه (*C. americana* UTHSC 083414) و سویه‌های شناخته شده دیگر به عنوان بیمارگر از بافت‌های انسانی جداسازی و توصیف شده است (Madrid et al. 2014). این مطالعه، برای نخستین بار این گونه را از یک میزبان گیاهی (ذرت) گزارش می‌کند. از گیاه ذرت قبلاً گونه‌های

ترسیمی مبتنی بر توالی ترکیبی دو ناحیه ITS و *gpd* (شکل ۱)، جدایه‌های تحت مطالعه این گونه با سویه تیپ این گونه (*C. muehlenbeckiae* CBS 144.63) و دو سویه شناخته شده از گونه‌های خویشاوند *C. pisi* (CBS 190.48) و *C. platzii* (BRIP 27703b) خوشه‌بندی شدند و یک شاخه تکاملی با ارزش بوت‌استرپ ۷۹ درصد ایجاد کردند.

میکرومتر می‌باشد (براساس ۱۰۰ عدد کنیدیوم). ناف بیرون‌زده، تیره و ضخیم است. کلامیدوسپور و شکل جنسی مشاهده نشد. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه‌های تحت مطالعه این گونه نشان داد که توالی ITS و *gpd* این جدایه‌ها با سویه‌های شناخته شده *Curvularia muehlenbeckiae* (از جمله سویه تیپ *C. muehlenbeckiae* CBS 144.63) به ترتیب ۱۰۰ و ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی

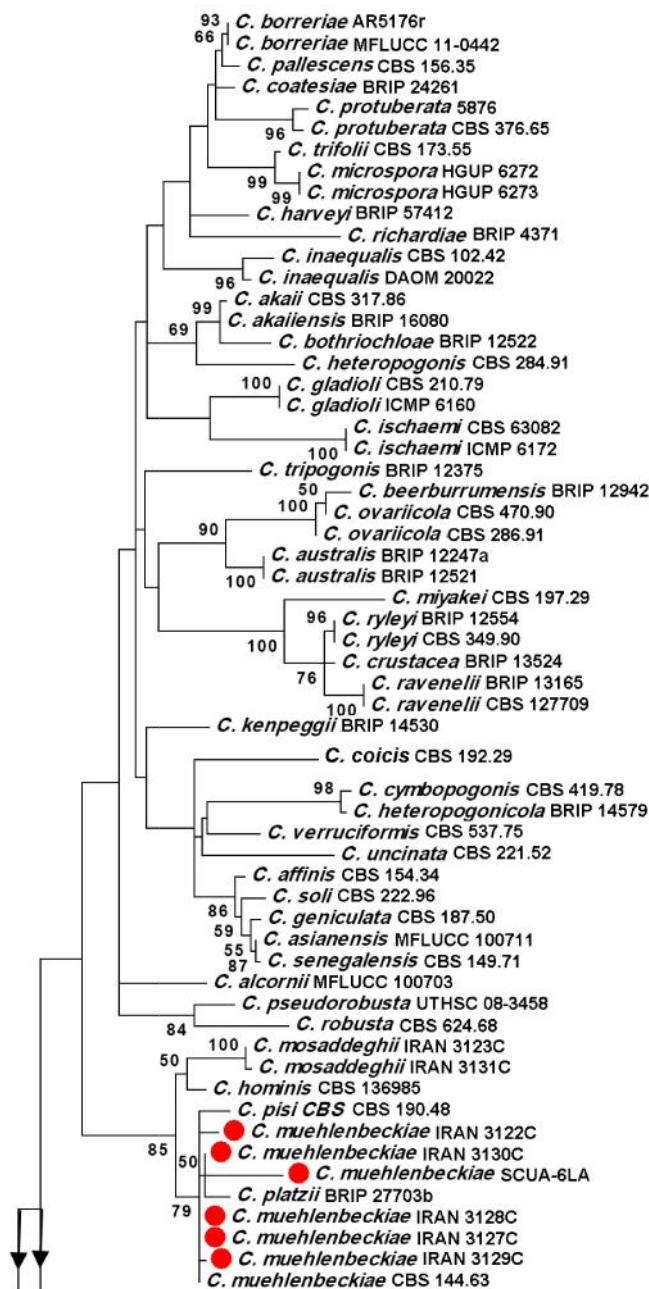
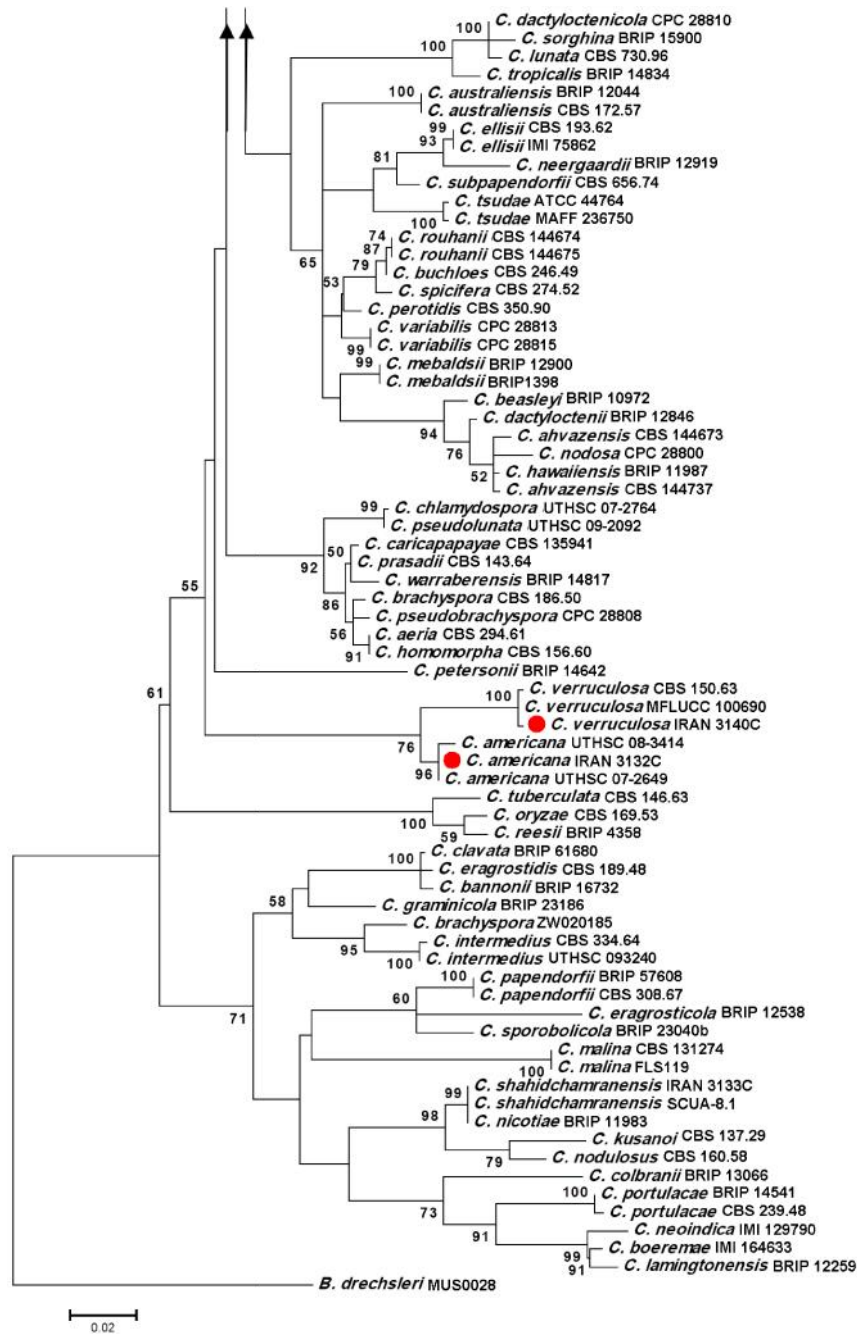


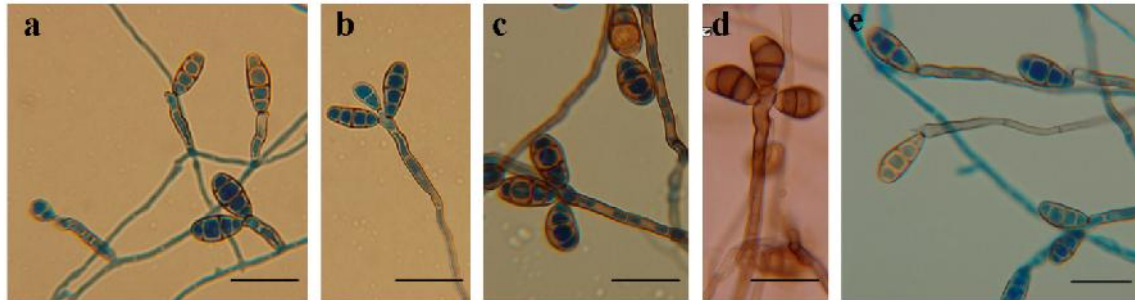
Fig. 1 (contd)

شکل ۱ (ادامه)



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Curvularia*. ترسیم شده با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه که براساس توالی‌های ترکیبی نواحی ITS و *gpd* با استفاده از مدل TN93+G+I به دست آمده است. درصد تکرار شاخه‌ها در ۵۰۰ بار نمونه‌گیری کاذب (بوت‌استرپ) در محل ریشه شاخه‌های تکاملی درج شده است. درخت با استفاده از گونه *Bipolaris drechsleri* ریشه‌دار شده است. آرایه‌های مورد بررسی با دایره توپر نشان داده شده است.

**Fig. 1.** Phylogenetic tree of the *Curvularia* isolates constructed, using a maximum likelihood algorithm, based on combined sequences of ITS and *Tub2* regions under TN93+G+I model. Bootstrap values greater than 50% (expressed as percentages of 500 replications) are shown at the node. The tree was rooted with *Bipolaris drechsleri*. Taxa under study are shown with filled circles.



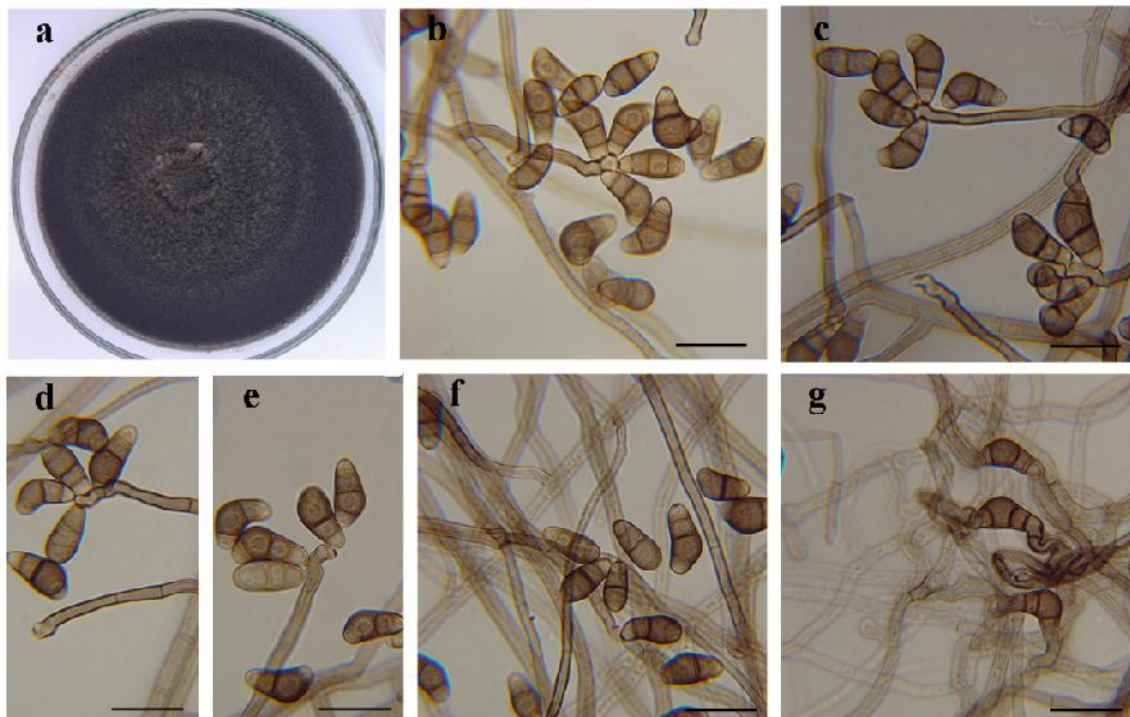
شکل ۲- گونه *Curvularia americana* (IRAN 3132C): a-e. ریشه‌ها، کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).  
**Fig. 2.** *Curvularia americana* (IRAN 3132C): a-e. Hyphae, conidiophores and conidia (Bar = 20  $\mu$ m).

گزارش شده است. سایر سویه‌ها از سورگوم (*Sorghum* sp.)، انسان (*Homo sapiens*) و *Oryza* sp. جداسازی شده است (Manamgoda et al. 2015).

این مطالعه، برای نخستین بار گونه مذکور را از گیاه لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata*) گزارش می‌کند.

در این بررسی که سه گونه خویشاوند مذکور براساس دو ناحیه ژنومی از همدیگر جداسازی معتبر فیلوژنتیکی نشدند، ریخت‌شناسی تعلق جدایه‌های مورد بررسی را به گونه *C. muehlenbeckiae* ثابت کرد (شکل ۳).

سویه تیپ این گونه (*C. muehlenbeckiae* CBS 144.63) از گیاه *Muehlenbeckia* sp. (Madrid et al. 2014)



شکل ۳- گونه *Curvularia muehlenbeckiae* (IRAN 3128C): a. پرگنه روی PDA، ریشه‌ها، کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها، g. کنیدیوم‌هایی که به صورت دو قطبی جوانه زده است (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

**Fig. 3.** *Curvularia muehlenbeckiae* (IRAN 3128C): a. Colony on PDA, b-f. Hyphae, conidiophores and conidia, g. Bipolar-germinated conidia (Bar = 20  $\mu$ m).

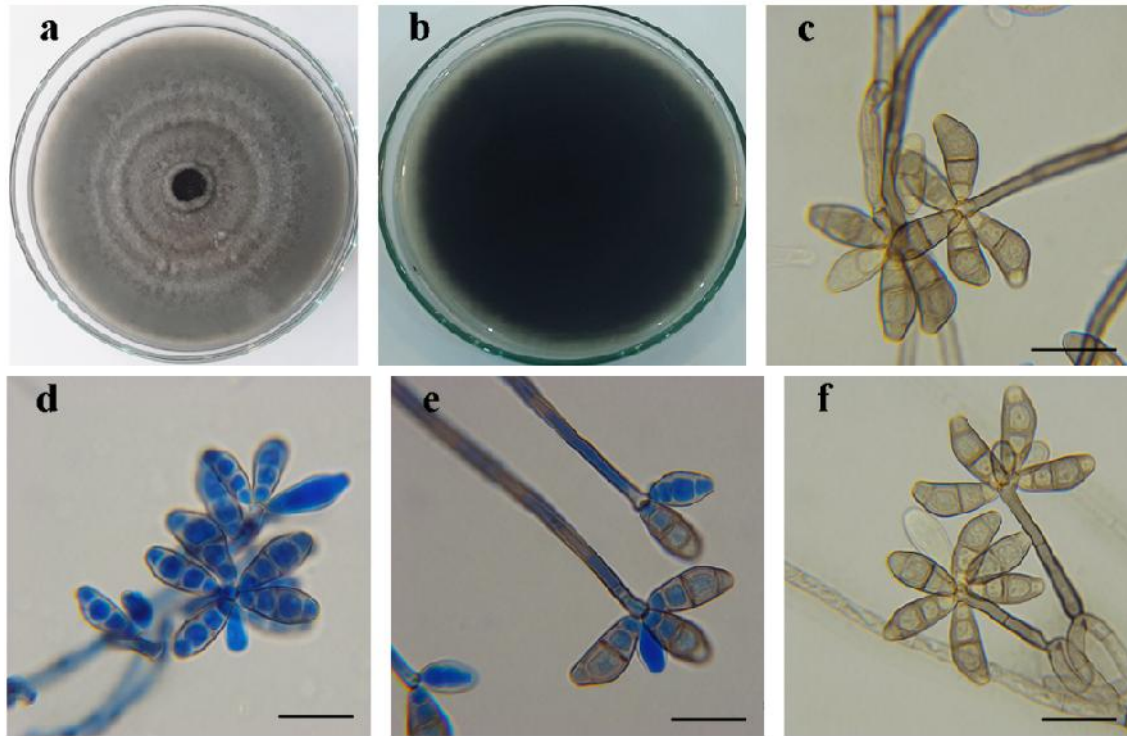


میکرومتر قرار دارد و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $4/7 \pm 0/9 \times$   $44 \pm 18/8$  میکرومتر می‌باشد (براساس ۱۰۰ عدد کنیدیوفور). سلول‌های کنیدیوم‌زایی قهوه‌ای، نیمه‌استوانه‌ای تا متورم، غالباً ادغام شده و کنیدیوم‌زایی به صورت زیگزاکسی (سیمپودیال) همراه با زخم‌های ضخیم و حلقوی می‌باشد. کنیدیوم‌ها دارای دیواره صاف، بیضوی تا نیمه‌استوانه‌ای یا گاهی بشکله‌ای شکل هستند؛ اغلب چهارسلولی و خمیده، در دو انتها گرد و بیشترین قطر در حجره سوم از سلول پایه دیده می‌شود؛ ابعاد کنیدیوم‌ها  $(12-11-8-7/5) \times (28-27-20)$  میکرومتر، ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $9/7-10 \times 23/4-24/2$  میکرومتر قرار دارد و میانگین اندازه‌گیری‌ها  $9/8 \pm 1 \times 23/8 \pm 2$  میکرومتر می‌باشد (براساس ۱۰۰ عدد کنیدیوم). ناف کمی بیرون‌زده، تیره و ضخیم است. کلامیدوسپور و شکل جنسی مشاهده نشده است (شکل ۴).

*Curvularia verruculosa* Tandon & Bilgrami, Current Science 31 (6): 254 (1962)

نمونه بررسی شده: استان خوزستان، اهواز، چوب خشک‌شده و پوسیده شیشه‌شور (*Callistemon* sp.)، آبان ۱۳۹۴، گلنوش بابااحمدی (جدایه IRAN 3140C).

سطح رویی پرگنه‌ها در محیط کشت PDA در ابتدا طوسی مایل به سبز و در ادامه تیره‌تر می‌شود. سطح پشتی نیز سیاه متمایل به خاکستری می‌باشد. قطر پرگنه روی محیط کشت PDA پس از یک هفته در شرایط دمایی  $28 \pm 0/5$  درجه سلسیوس، ۶۳ میلی‌متر است. ریشه‌ها نیمه‌روشن تا قهوه‌ای، منشعب، دیواره‌دار و با دیواره‌های نازک و صاف هستند. کنیدیوفورها به صورت منفرد ظاهر می‌شوند، دیواره‌دار و در قسمت‌های بالایی عریض‌تر و خمیده می‌شوند؛ غیرمنشعب و دیواره‌های سلولی آن‌ها ضخیم‌تر از ریشه‌های رویشی است؛ ابعاد کنیدیوفورها،  $(9-7/9) \times 3-5/2$  میکرومتر، ۹۵ درصد اندازه‌گیری‌ها در بازه اطمینان  $4/4-5 \times 38/6-49/1$



شکل ۴- گونه *Curvularia verruculosa* (IRAN 3140C): a و b. پرگنه روی PDA، c-f. ریشه‌ها، کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

**Fig. 4.** *Curvularia verruculosa* (IRAN 3140C): a-b. Colony on PDA, c-f. Hyphae, conidiophores and conidia (Bar = 20  $\mu$ m).

چندین گونه *Curvularia* قبلا از گیاهان چوبی و علفی در مناطق مختلف ایران جداسازی و شناسایی شده که شامل *C. affinis*، *C. ahvazensis*، *C. australiensis*، *C. clavata*، *C. hawaiiensis*، *C. inaequalis*، *C. lunata*، *C. pallescens*، *C. papendorffii*، *C. prasadii*، *C. mosaddeghii*، *C. rouhanii*، *C. senegalensis*، *C. shahidchamranensis*، *C. trifolii*، *C. tuberculata* و *C. verruculosa* می‌باشند (Ershad 2009, Ahmadpour et al. 2013, Dehdari et al. 2018, Heidari et al. 2018b, Mehrabi-Koushki et al. 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2018).

مطالعه حاضر، دو گونه *C. americana* و *C. muehlenbeckiae* را با استفاده از بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی و برای مایکوبیوتای ایران گزارش می‌کند. همچنین، برای گونه *C. verruculosa* شناسایی دقیق‌تری مبتنی بر ریخت‌شناسی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مبتنی بر دو ناحیه ژنی ارائه می‌کند. علاوه بر این، هر سه گونه مورد بررسی در این مطالعه از یک میزبان جدید گزارش می‌شوند.

#### سپاسگزاری

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت پوشش مالی این تحقیق قدردانی می‌شود.

#### References

- Ahmadpour, A., Heidarian, Z., Karami, S., Pordel, A., Jabbarifar, S.M. & Javan-Nikkhah, M. 2013. New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on poaceous plants in Iran. *Rostaniha* 14: 216–228.
- Ahmadpour, S.A., Mehrabi-Koushki, M. & Farokhinejad, R. 2017. *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia* 69: 171–182.
- Almaguer, M., Rojas, T.I., Dobal, V., Batista, A. & Aira, M.J. 2013. Effect of temperature on

نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه *C. verruculosa* IRAN 3140C نشان داد که توالی ITS و *gpd* این جدایه با سویه‌های شناخته شده *C. verruculosa* CBS (از جمله سویه 150.63) به ترتیب ۹۹ و ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی مبتنی بر توالی ترکیبی دو ناحیه ITS و *gpd* (شکل ۱)، جدایه *C. verruculosa* IRAN 3132C با دو سویه *C. verruculosa* CBS 150.63 و MFLUCC 100690 خوشه‌بندی شد و یک شاخه تکاملی با ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد ایجاد کرد.

سویه‌های *C. verruculosa* تاکنون از انسان (*H. sapiens*)، *Chloris* spp.، *Cynodon dactylon*، *Eleusine*، *Elaeis guineensis*، *Dactyloctenium* sp.، *Zea mays* و *Punica granatum*، *Oryza sativa indica* Manamgoda et al. 2015, Madrid et al. 2017 b (al. 2014, Tan et al. 2018, Marin-Felix et al. 2017 b) گونه مذکور در سال ۱۳۸۳ توسط مهربان و رهجو از گیاه *Sorghum bicolor* براساس مشخصات ریخت‌شناسی شناسایی و گزارش شده است (Ershad 2009). مطالعه حاضر، برای نخستین بار این گونه را از گیاه شیشه‌شور (*Callistemon* sp.) و براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی گزارش می‌کند.

- growth and germination of conidia in *Curvularia* and *Bipolaris* species isolated from the air. *Aerobiologia* 29: 13–20.
- Babaahmadi, G., Mehrabi-Koushki, M. & Hayati, J. 2018. *Allophoma hayatii* sp. nov., an undescribed pathogenic fungus causing dieback of *Lantana camara* in Iran. *Mycological Progress* 17(3): 365–379.
- Beneke, E.S. & Rogers, A.L. 1996. Medical mycology and human mycoses. Star Publishing Company, Belmont, 239 pp.
- Berbee, M., Pirseyedi, M. & Hubbard, S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of

- known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91: 964–977.
- Boedijn, K.B. 1933. Ueber einige phragmosporen Dematiaceen. *Bulletin du Jardin botanique de Buitenzorg* 13: 120–134.
- Dehdari, F., Mehrabi-Koushki, M. & Hayati, J. 2018. *Curvularia shahidchamranensis* sp. nov., a crude oil-tolerant fungus. *Current Research in Environmental and Applied Mycology* 8: 572–584.
- Ershad, D. 2009. *Fungi of Iran*, 3rd edn. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran.
- Gautam, A.K., Kant, M. & Thakur, Y. 2013. Isolation of endophytic fungi from *Cannabis sativa* and study their antifungal potential. *Archive of Phytopathology and Plant Protection* 46: 627–635.
- 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.
- Hargreaves, M., Parappukaran, S., Morawska, L., Hitchins, J., He, C. & Gilbert, D. 2003. A pilot investigation into associations between indoor airborne fungal and non-biological particle concentrations in residential houses in Brisbane, Australia. *Science of Total Environment* 312: 89–101.
- Heidari, K., Farokhinejad, R. & Mehrabi-Koushki, M. 2018a. Occurrence of purslane leaf spot caused by *Dichotomophthora lutea* in Iran. *Australasian Plant Disease Notes* 13(1): 1–4.
- Heidari, K., Mehrabi-Koushki M. & Farokhinejad R. 2018b. *Curvularia mosaddeghii* sp. nov., a novel species from the family Pleosporaceae. *Mycosphere* 9: 635–646.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Stalpers, J.A., Crous, P.W., Gams, W. *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509–547.
- Jena, S.K. & Tayung, K. 2013. Endophytic fungal communities associated with two ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India and their antimicrobial prospective. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3: 7.
- Liang, Y., Ran, S.F., Bhat, J., Hyde, K.D., Wang, Y. & Zhao, D.J. 2018. *Curvularia microspora* sp. nov. associated with leaf diseases of *Hippeastrum striatum* in China. *MycKeys* 29: 49–61.
- Madrid, H., da Cunha, K.C., Gene, J., Dijksterhuis, J., Cano, J., Sutton, D.A., Guarro, J. & Crous, P.W. 2014. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia* 33: 48–60.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., Bahkali, A.H., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity* 51: 3–42.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., McKenzie, E.H., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R.G., Tan, Y.P. & Hyde, K.D. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 56: 131–44.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. 2012. Two new *Curvularia* species from northern Thailand. *Sydowia* 64: 255–266.

- Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. 2015. taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa* 212: 175–198.
- Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79: 221–288.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J.Z., Cai, L., Chen, Q., Marinowitz, S., Barnes, I., Bensch, K., Braun, U., Camporesi, E., Damm, U., de Beer, Z.W., Dissanayake, A., Edwards, J., Giraldo, A., Hernández-Restrepo, M., Hyde, K.D., Jayawardena, R.S., Lombard, L., Luangsa-ard, J., McTaggart, A.R., Rossman, A.Y., Sandoval-Denis, M., Shen, M., Shivas, R.G., Tan, Y.P., van der Linde, E.J., Wingfield, M.G., Wood, A.R., Zhang, J.Q., Zhang Y. & Crous, P.W. 2017a. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology* 86: 99–216.
- Marin-Felix, Y., Senwana, C., Cheewangkoon, R. & Crous, P.W. 2017b. New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere* 8: 1556–1574.
- Mehrabi-Koushki, M., Pooladi, P., Eisvand, P. & Babaahmadi, G. 2018. *Curvularia ahvazensis* and *C. rouhanii* spp. nov. from Iran. *Mycosphere* 9: 1173–1186.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and ITS near relatives, pp. 225–233. In: Reynolds, D.R. & Taylor, J.W. (eds). *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CABI Publishing, Wallingford.
- Raeder, U. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17–20.
- Scott, E.M. & Carter, R.T. 2014. *Canine keratomycosis* in 11 dogs: A case series (2000–2011). *Journal of the American Animal Hospital Association* 50: 112–118.
- Sharma, R., Prakash, O., Sonawane, M.S., Nimonkar, Y., Golellu, P.B. & Sharma, R. 2016. Diversity and distribution of phenol oxidase producing fungi from soda lake and description of *Curvularia lonarensis* sp. nov. *Frontiers in Microbiology* 7: 1847.
- Tadych, M., Bergen, M., Johnson, J.C., Polashock, J. & Vorsa, N. 2012. Endophytic and pathogenic fungi of developing cranberry ovaries from flower to mature fruit: diversity and succession. *Fungal Diversity* 54: 101–116.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Tan, Y.P., Madrid, H., Crous, P.W. & Shivas, R.G. 2014. *Johnalcornia* gen. et. comb. nov., and nine new combinations in *Curvularia* based on molecular phylogenetic analysis. *Australasian Plant Pathology* 43: 589–603.
- Tan, Y.P., Crous, P.W. & Shivas R.G. 2018. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. *MycKeys* 35: 1–25.
- Tomaso-Peterson, M., Jo, Y.K., Vines, P.L. & Hoffmann, F.G. 2016. *Curvularia malina* sp. nov. incites a new disease of warm-season turf grasses in the southeastern United States. *Mycologia* 108: 915–924.

Verma, P., Singh, S. & Singh, R. 2013. Seven species of *Curvularia* isolated from three lakes of Bhopal. *Advances in Life Science and Technology* 8: 13–15.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.L. 1990. Amplification and direct sequencing of

fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322. *In*: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press.