

## Szójáról izolált *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálata Bayesian analízissel

Irinyi László – Kövics György – Sándor Erzsébet

Debreceni Egyetem Agrár-és Műszaki Tudományok Centruma,  
Mezőgazdaságtudományi Kar,  
Növényvédelmi Tanszék, Debrecen  
irinyil@yahoo.fr

### ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink során a szóján (*Glycine max*) előforduló *Phoma*-szerű gombák molekuláris taxonómiai vizsgálatát végeztük el genetikai markerek szekvenciáinak elemzésével. A szóján előforduló, szimptomatológiai és morfológiai hasonlóságok miatt egymástól alig megkülönböztethető *Phoma*-szerű fajok (*Phoma pinodella*, *Phoma sojicola*, *Phyllosticta sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*) taxonómiája terén a mai napig nagy a bizonytalanság. Vizsgálatunk során 9 *Phoma* faj 22 izolátumát vizsgáltuk, melyből 7 izolátum szójáról származott. A fajok *tefl*, *tubulin*, illetve ITS szekvenciáinak filogenetikai elemzését Bayesian analízissel végeztük MrBayes program alkalmazásával. A *tefl* és  $\beta$ -*tubulin* szekvenciákat *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálatának céljából ez idáig még nem alkalmazták.

Új eredményként értékelhető, hogy az ITS, *tefl* és a  $\beta$ -*tubulin* nukleinsav szekvenciák alapján az egyes *Phoma* taxonok jól elkülöníthetők egymástól, ami bizonyítja, hogy a filogenetikai markerek a *Phoma* fajoknál is alkalmasak molekuláris alapon történő filogenetikai rendszerezésre. Az elemzés során kapott filogenetikai törzsfá azonban nem minden esetben mutatott egyezést a morfológia bélyegeken alapuló *Phoma* taxonokkal.

Mindhárom szekvencia bayesian elemzése megerősítette, hogy az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba, a *Phoma sojicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött, ami szükségessé teheti a nevezett taxonok helyzetének újragondolását.

**Kulcsszavak:** *Phoma*, ITS régió, translációs elongációs faktor, *tubulin*, filogenetika, Bayesian analízis

### SUMMARY

We carried out phylogenetic study analyzing sequences of genetic markers in the taxonomy of *Phoma* and *Phoma*-like fungi. Different species of *Phoma* and *Phoma*-like fungi occurring on soybean (*Phoma pinodella*, *Phoma sojicola*, *Phyllosticta sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*) are difficult to identify because of their high morphological and symptomatic similarities.

Twenty-two isolates of nine different *Phoma* species were obtained from reference culture collections. Seven of them were isolated from soybean, the others were collected from different hosts.

The *Phoma* isolates were firstly characterised by morphologically, and then we employed a part of the gene responsible for the synthesis of translation elongation factor 1 subunit alpha protein (*tefl*), ITS region, as well as  $\beta$ -*tubulin* partial sequences as potential genetic markers to infer phylogenetic relationships among different *Phoma* species. Finally, their ITS and *tefl* sequences were sequenced and analysed by Bayesian approaches.

According to phylogenetic trees inferred by Bayesian analysis of *tefl*, ITS and  $\beta$ -*tubulin* sequences, different *Phoma* species can

be separated proving that these phylogenetic markers are well suited for phylogenetic studies of *Phoma* species. However, the phylogenetic tree does not support the traditional *Phoma* sections based on morphological characterization.

Bayesian analyses of the three sequences confirmed that the *Phyllosticta sojicola* species is clustered with the *Phoma exigua* var. *exigua* group and the *Phoma sojicola* is grouped with *Phoma pinodella* group. The molecular data provide evidence for reclassification of formerly mentioned soybean pathogens.

**Keywords:** *Phoma*, ITS sequences, translation elongation factor, *tubulin*, phylogenetics, Bayesian analyses

### BEVEZETÉS

A Coelomycetes osztályba tartozó *Phoma* genus világszerte elterjedt, többségében fitopatogén, opportunistá parazita vagy szaprofiton életmódot folytató fajokat foglal magába. Napjainkig mintegy 2000 *Phoma* fajt azonosítottak világszerte (Boerema et al., 2004).

Napjainkig a *Phoma* fajok rendszerezése a többi gombacsoportéhoz hasonlóan nagyrészt morfológiai, fenotípusos és fiziológiai vizsgálatokon alapult. Ennek a munkának az összefoglalásaként a közelmúltban jelent meg egy monográfia *Phoma* Identification Manual címmel (Boerema et al., 2004), amelyben a szerzők összegzik a *Phoma* fajok morfológiai szempontok alapján, több mint 40 év kutatási eredményei nyomán tisztázott rendszerét.

Boerema és munkatársai (1965, 1968, 1971, 1973, 1977, 1981) mellőzte az addig használt gazdanövény vagy szubsztrátum specificitást, mint a *Phoma* fajok elsődleges rendszertani kritériumát, és megpróbálták mind *in vivo* és *in vitro* körülmények között stabil rendszertani bélyegek alapján rendszerezni a *Phoma* fajokat, amelyeket standardizált körülmények között vizsgált telepjellemzőkkel egészítettek ki. Fontosnak találták a piknídium falának szerkezetét, valamint azt, hogy a piknídium rendelkezik-e sertével (*setae*). A genus fajainál a piknídium morfológiája bizonyult a legfontosabb hasznosítható bélyegnek az egyes szekciók elkülönítésénél. A piknídiumok rendszerint csupaszok, de esetenként a serték (*setae*) jelenléte és a piknídiumfal morfológiája szintén taxonómiai jelleggel bír. Ugyancsak taxonómiai jelentőséget tulajdonítanak a dictyoclamidospóra meglétének is. Tekintettel arra, hogy a piknídiumok és a konídiumok nagysága és alakja változó, a tenyésztési jellemzők nélkülözhetetlenül bizonyultak a fajok vagy fajok belüli taxonok elkülönítésében. Néhány másodlagos anyagcseretermék szintén specifikus

tulajdonság lehet egy fajra nézve. Jellegzetes mintázatú kristályképződés vagy kémiai reakcióval (NaOH teszt) kimutatható pigmentképzés („E” metabolit) segítik a gyors azonosítást (van der Aa et al., 1990; Noordeloos et al., 1993).

A '90-es évek közepén a molekuláris biológia és a biokémia fejlődésének köszönhetően izoenzimeket (fehérje polimorfizmus) próbáltak meg molekuláris markerként használni a *Phoma* genusban, hogy elkülönítsék a morfológiailag azonos megjelenésű, de feltételezhetően eltérő fajhoz tartozó izolátumokat (Monte et al., 1990, 1991; Kövics és de Gruyter, 1995; Saniewska és Prus-Glowacki, 1998; Kövics, 2004).

Más gombacsoportoknál már használt, és többé-kevésbé megbízhatónak bizonyult molekuláris markerek szekvencia analízise a *Phoma* fajoknál mindeztől alig került alkalmazásra.

Napjainkban a filogenetikai törzsfá készítésben az egyik leggyakrabban használt molekuláris biológiai módszer kiválasztott DNS szakaszok nukleinsav sorrendjének meghatározása, és ezeknek az összehasonlító elemzése.

A filogenetikai célú szekvencia összehasonlítás nagyrészt olyan genom szakaszok vizsgálatán alapul, amelyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak maradnak az evolúció során, mint pl. a riboszómális géneket, a tubulin fehérjét, illetve a translációs elongációs faktort kódoló gének szekvenciái. Ezek közül nagyon sok tudományos munka alapszik az úgynevezett ITS (Internal Transcribed Spacer) régió vizsgálatán, annak köszönhetően, hogy ennek a régióknak a nukleinsav sorrendje nagy variabilitást mutat más régiókhoz képest, így alkalmas mind a fajok belüli, mind a fajok közötti filogenetikai kapcsolatok felderítésére. Lutzoni et al. (2004) szerint a gombák körében végzett filogenetikai vizsgálatok 83,9%-a a riboszómális géneket kódoló tandem szekvenciák vizsgálatán alapul. A molekuláris biológiában újabb és újabb géneket (markereket) írnak le, amelyek tulajdonságaikból adódóan alkalmasak lehetnek filogenetikai kapcsolatok elemzésére.

Az alábbiakban a szóján (*Glycine max*) előforduló *Phoma*-szerű fajok molekuláris taxonómiáját kívánjuk tárgyalni nukleinsav szekvenciák alapján, mivel a szóján előforduló, szimptomatológiai és morfológiai hasonlóságuk miatt egymástól alig megkülönböztethető *Phoma*-szerű fajok taxonómiája terén meglehetősen nagy a bizonytalanság.

Molekuláris taxonómiai vizsgálatainkhoz három markert választottunk (*tefl*, ITS, *tubulin*), amelyek szakirodalmi adatok alapján korábban már alkalmaznak bizonyultak filogenetikai kapcsolatok tanulmányozására más élőlénycsoportokban, így a gombák körében is. Filogenetikai vizsgálatok során célszerű több gént vizsgálni, mivel GCPSR elmélet szerint (Taylor et al., 2000) több gén használatakor pontosabb és megbízhatóbb eredményt kapunk az egyes filogenetikai kapcsolatokra.

A szekvenciák filogenetikai elemzéseit Bayesian módszerrel végeztük. A Bayesian megközelítés a

filogenetikában egy viszonylag új módszer, mely még csak most kezd széles körben elterjedni. A módszer az úgynevezett utólagos megközelítésen, utólagos valószínűségeken (posterior probability) alapuló statisztikai módszer: egy esemény becsült valószínűségét azután adja meg, miután elvégezte a rendelkezésre álló adatok bizonyos elemzését. Mivel az utólagos valószínűséget lehetetlen kiszámolni analitikusan, ezért a módszer egy szimulációs technikát alkalmaz az utólagos valószínűség becsülésére. Az analízis a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmuson alapszik, mely egy randomizációs technika az eloszlás valószínűségének megbecslésére arra az esetre, amikor kivitelezhetetlen, vagy csak nagyon nehezen kivitelezhető lenne az eloszlás meghatározás analitikusan. A Bayesian módszer a statisztika egyik fő ágát képviseli. A legnépszerűbb kereső oldal, a Google is ezt a módszert használja a keresésre. Gyakran hangzik el a válasz a módszert kritizálók felé, ha nem bíznak a Bayesian módszerben, a Google keresőt sem kellene használniuk. A módszer nagy előnyét, aminek a Google is köszönheti a mai napig tartó töretlen sikertörténetét, a módszer megbízhatósága és gyorsasága jelenti.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkban a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Tanszékén található törzsgyűjteményből 11 *Phoma* faj 24 izolátumát vizsgáltuk, melyből 7 izolátum szójáról származott (1. táblázat). Minden egyes fajt morfológiai és élettani jellegzetességeik alapján azonosítottunk a Boerema et al. (2004) által közreadott *Phoma* monográfia alapján.

Az izolátumokat 50 ml maláta tápoldatban tenyésztettük 48 órán keresztül, 100 ml-es Erlenmayer lombikban, sötétben, rázatva (125 rpm). A sejteket dörzsmozsár segítségével, folyékony nitrogén jelenlétében tártuk fel, majd genomi DNS-t izoláltunk E.Z.N.A.<sup>®</sup> Fungal DNA Isolation Kit (Omega Bio-tek Inc., USA) alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. A ITS fragment felszaporításához az SR6R és LR1 primerpárt (White et al., 1990), a *tefl* fragment amplifikálásához az EF1-728F és EF1-986R primerpárt (Druzhinina és Kubicek, 2005), a  $\beta$ -tubulin fragment felszaporításához a Bt2a és Bt2b primerpárt (Glass és Donaldson, 1995) használtuk. A tisztított PCR termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany végezte.

A szekvenciákat a ClustalX (Thompson et al., 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (Nicholas et al., 1997) program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol szükséges volt. Ezt követően a filogenetikai analízishez a MrBayes (Huelsenbeck és Ronquist, 2000) programot alkalmaztuk, Bayesian analízist végezve. Az evolúciós modellek tesztelését a Modeltest v.3.7 (Posada és Grandall, 1998) programmal végeztük Bayesian information criterium (BIC) tesztet alkalmazva.

A kísérletbe bevont *Phoma* fajok listája

Izolátum száma(1)	Alternatív izolátum szám(2)	Fajnév(3)	Gazdanövény(4)	Izolálás helye(5)	Gyűjtötte(6)	GenBank hozzáférési számok(7)		
						Tef	ITS	$\beta$ -tubulin
D/035	BT-15	<i>Phoma pinodella</i>	<i>Glycine max</i>	Hungary	I. Walcz	EU543973	EU573015	EU541416
D/045	PD 82/550	<i>P. pinodella</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543971	EU573025	EU541417
D/046	PD 77/165 MYA-411	<i>P. pinodella</i>	<i>Pisum sativum</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543972	EU573024	EU541419
D/095	N.A.	<i>P. pinodella</i>	<i>P. sativum</i>	Hungary	L. Gergely	EU543970	EU573027	EU541418
D/159	CBS 318.90 PD 81/729	<i>P. pinodella</i>	<i>P. sativum</i>	Netherlands	M.E. Noordeloos	EU595355	EU573028	EU595352
D/054	MYA-406	<i>P. sojicola</i>	<i>G. max</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543974	EU573023	EU541434
D/056	CBS 567.97 PD97/2160	<i>P. sojicola</i>	<i>G. max</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543976	EU573026	EU541433
D/050	CBS 301.39	<i>Phyllosticta sojicola</i>	<i>G. max</i>	Germany	K. Böning	EU595356	EU573029	EU595357
D/075	N.A.	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>G. max</i>	Poland	G.J. Kövics	EU543982	EU555533	EU541421
D/077	N.A.	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>G. max</i>	Poland	G.J. Kövics	EU543983	EU573010	EU541422
D/063	Ph 58 MYA-408	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	Poland	J. Marcin-kowska	EU543975	EU573012	EU541420
D/145	N.A.	<i>P. exigua</i>	<i>Althaea officinalis</i>	Hungary	G. Nagy	-	EU573011	EU541425
D/146	N.A.	<i>P. exigua</i>	<i>Althaea rosae</i>	Hungary	G. Nagy	EU543984	EU573013	EU541427
D/158	ICMP 15330	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>Agapanthus</i> sp.	New Zealand	M. Braithwaite	EU543981	EU573008	EU541428
D/157	ICMP 13336	<i>P. exigua</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	New Zealand	P.G. Broadhurst	EU543980	EU573007	EU541429
D/071	PD 86/73	<i>P. exigua</i> var. <i>linicola</i>	<i>Linum usita-tissimum</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543979	EU573009	EU541423
D/072	PD 75/907	<i>P. plurivora</i>	<i>Medicago sativa</i>	Australia	J. de Gruyter	EU552929	EU573018	EU552932
D/155	ICMP 6875	<i>P. plurivora</i>	<i>Pennisetum clandestinum</i>	New Zealand	P.R. Johnston	EU552930	EU573019	EU552931
D/034	AI-416	<i>P. glomerata</i>	<i>G. max</i>	Hungary	G.J. Kövics	EU543969	EU573016	EU541424
D/156	ICMP 15788	<i>P. glomerata</i>	<i>Yucca</i> sp.	New Zealand	C.F. Hill	EU543968	EU573017	EU541426
D/058	CBS 375.91 PD78/745	<i>P. eupyrena</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Netherlands	G. H. Boerema	EU543977	EU573014	EU541415
D/048	PD 76/1021	<i>P. foveata</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	Netherlands	G. H. Boerema	EU543985	EU573021	EU541431
D/044	PD 77/508	<i>P. multirostrata</i>	<i>Phylodendron</i> sp.	Netherlands	G. H. Boerema	EU543986	EU573022	EU541430
D/144	N.A.	<i>Ascochyta rabiei</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Australia	N.A.	EU595354	EU595358	EU595353
D/160	CBS 581.83A	<i>Didymella rabiei</i>	<i>C. arietinum</i>	Syria	H.A. van der Aa	EU543978	EU573020	EU541432

Table 1: Isolates of *Phoma* species

Isolate number(1), Alternative isolate number(2), Fungal species(3), Host plant(4), Location of collection(5), Collector(6), GenBank accession number(7)

A *tefl* fragment elemzésekor a TrNef+I+G evolúciós modell került kiválasztásra, ahol az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=1,5807, A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=2,8067, G-T=1,000) gamma eloszlásúak, melynek alakparamétere 2,8788, az állandó bázishelyek aránya 0,3015. Az ITS fragment elemzéséhez a TrNef+I evolúciós modellt választottuk a következő paraméterekkel: az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=4,8974,

A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=0,9815, G-T=1,000) azonos eloszlásúak, állandó bázishelyek aránya 0,8497. A  $\beta$ -tubulin fragment elemzéséhez a TrNef+G evolúciós modellt választottuk, ahol az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=2,3500, A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=7,9886, G-T=1,000) gamma eloszlásúak, melynek alakparamétere 0,4090, az állandó bázishelyek aránya 0.

A törzsfák készítésében külső csoportként további taxonok *tefl*, ITS és tubulin szekvenciáit is bevontuk

a törzsfák jobb megalapozásához. A szekvenciákat a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> honlapról töltöttük le. A törzsfák elkészítéséhez a TreeView (Page, 1996) programot használtuk. A filogenetikai analízisekbe külső szekvenciákat is bevontunk, hogy teljesebbé tegyük a törzsfákat. A szekvenciákat a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> honlapról töltöttük le. A *tefl* szekvenciák elérhetőségei a 2. táblázatban, az ITS szekvenciák elérhetőségeit a 3. táblázatban,  $\beta$ -tubulin szekvenciák elérhetőségét a 4. táblázatban a foglaltuk össze.

2. táblázat

A *tefl* fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfa készítésébe külső csoportként bevont fajok listája, valamint *tefl* szekvenciájuk hozzáférési száma

Fajnév(1)	Izolátum kód(2)	Hozzáférési szám(3)
<i>Ascochyta pisi</i> teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i> (Kaiser et al., 1997)	AP2	DQ386494.1
<i>Ascochyta fabae</i> f. sp. <i>viciae</i> (= <i>Ascochyta fabae</i> ) teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i>	SAT AL	AY831546.1
<i>Ascochyta fabae</i> f. sp. <i>viciae</i> (= <i>Ascochyta fabae</i> ) teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i>	AV11	DQ386498.1
<i>Ascochyta fabae</i> f. sp. <i>viciae</i> (= <i>Ascochyta fabae</i> ) teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i>	AL1	DQ386493.1
<i>Ascochyta fabae</i> f. sp. <i>viciae</i> (= <i>Ascochyta fabae</i> ) teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i>	AF1	DQ386492.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831545.1

Forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Table 2: Species involved in the phylogenetic analyses and the accession number of their *tefl* fragments  
Species(1), Isolate number(2), Accession number(3)

3. táblázat

Az ITS fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfa készítésébe bevont fajok listája, valamint ITS szekvenciájuk hozzáférési száma

Fajnév(1)	Izolátum kód(2)	Hozzáférési szám(3)
<i>Phoma exigua</i> var. <i>heteromorpha</i>	?	AY899262.1
<i>Phoma exigua</i>	CSL 20316964	AY550992.1
<i>Phoma exigua</i> var. <i>populi</i>	CBS 100167	AF268189.1
<i>Phoma exigua</i>	?	AY927784.1
<i>Phoma herbarum</i>	?	DQ132841.1
<i>Phoma herbarum</i>	ATCC 12569	AY293803.1
<i>Phoma pinodella</i>	VPRI 32177	DQ087402.1
<i>Phoma pinodella</i>	VPRI 32171	DQ087400.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831556.1
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831562.1
<i>Phoma glomerata</i>	?	AF126816.1
<i>Ascochyta</i> sp.	Georgia6	DQ383955.1
<i>Ascochyta pisi</i>	AP1	DQ383954.1
<i>Ascochyta lentis</i>	MU AL1	AY131201.1
<i>Didymella lentis</i>	AL1	DQ383953.1
<i>Didymella fabae</i>	AF1	DQ383952.1
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	WAC 6693	AY831558.1

Forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Table 3: Species involved in the phylogenetic analyses and the accession number of their ITS fragments  
Species(1), Isolate number(2), Accession number(3)

4. táblázat

A  $\beta$ -tubulin fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfa készítésébe bevont fajok listája, valamint  $\beta$ -tubulin szekvenciájuk hozzáférési száma

Fajnév(1)	Izolátum kód(2)	Hozzáférési szám(3)
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831517
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831511
<i>Phoma exigua</i>	WAC 7988	AY831509
<i>Phoma medicaginis</i>	CBS 316.90	AY831518
<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i>	P3	DQ109962
<i>Ascochyta lentis</i>	SAT AL	AY831508
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	WAC 6693	AY831513

Forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Table 4: Species involved in the phylogenetic analyses and the accession number of their tubulin fragments  
Species(1), Isolate number(2), Accession number(3)

## EREDMÉNYEK

### Morfológiai vizsgálatok

A szóján előforduló *Phoma* fajok közül a következő fajokat és izolátumokat vizsgáltuk: *Phoma pinodella* (D/035), *Phoma sojicola* (D/047, D/054), *Phyllosticta sojicola* (D/050), *Phoma exigua* var. *exigua* (D/059, D/075, D/077). Az elvégzett morfológiai vizsgálatok alapján a *Phoma sojicola* és *Phoma pinodella* viszonylag jól elkülönül a *Phoma exigua* var. *exigua* és *Phyllosticta sojicola* fajtól, azonban a *Phoma sojicola* és *Phoma pinodella*, valamint a *Phyllosticta sojicola* és *Phoma exigua* var. *exigua* között csekély morfológia különbség mutatkozik.

### Molekuláris vizsgálatok

#### Transzlációs elongációs faktor

A PCR reakciót követően egy 290 bp nagyságú fragmentum szaporodott fel minden egyes mintában. Az egyes fragmentek méretben azonos nagyságúak voltak.

A *tefl* szekvenciák Blast analízise nagy hasonlóságot mutatott a *Phoma* fajokkal közeli rokonságban álló *Ascochyta* fajok *tefl* szekvenciáival, amelyekből néhányat kiválasztottunk és bevontunk az elemzésbe. Az adatbázisban nem találtunk *Phoma* fajtól származó *tefl* szekvenciát.

A több izolátummal is képviselt fajok mind egy csoportba (cluster) kerültek az elemzés során, ami megerősíti a *tefl* szekvencia alkalmazását a *Phoma* fajok elkülönítésére. A közeli rokon *Ascochyta* nemzetségbe tartozó fajok jól elkülönültek a vizsgált *Phoma* fajoktól.

A bayesian analízis során kapott magas bayesian utólagos valószínűség értékek (99-100%) megerősítették az egyes elágazások helyének a valószínűségét, ezzel alátámasztva a filogenetikai törzsfát.

A törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella*) egyaránt 100% Bayesian utólagos valószínűség értékkel lett megerősítve, ami azt jelenti, hogy a két csoport a *tefl* szekvencia alapján teljes bizonyossággal elkülönül egymástól és a többi taxontól (1. ábra).

Az egyes taxonok közötti távolságok (elágazások hossza), valamint a további bayesian utólagos valószínűség is elegendőnek bizonyultak az egyes taxonok egymástól való megbízható elkülönítéséhez.

A *P. sojicola* izolátumai (D/054 és D/056) pedig a *P. pinodella* csoportba rendeződtek az elemzés során, mivel az ITS szekvenciájuk gyakorlatilag megegyezik.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) a *tefl* régió alapján a *P. exigua* csoportba került.

Az egyes taxonómiai csoportok a Bayesian elemzés alapján sem mutatnak egyezést a morfológia bélyegeken alapuló *Phoma* taxonokkal.

1. ábra: A *tefl* szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik

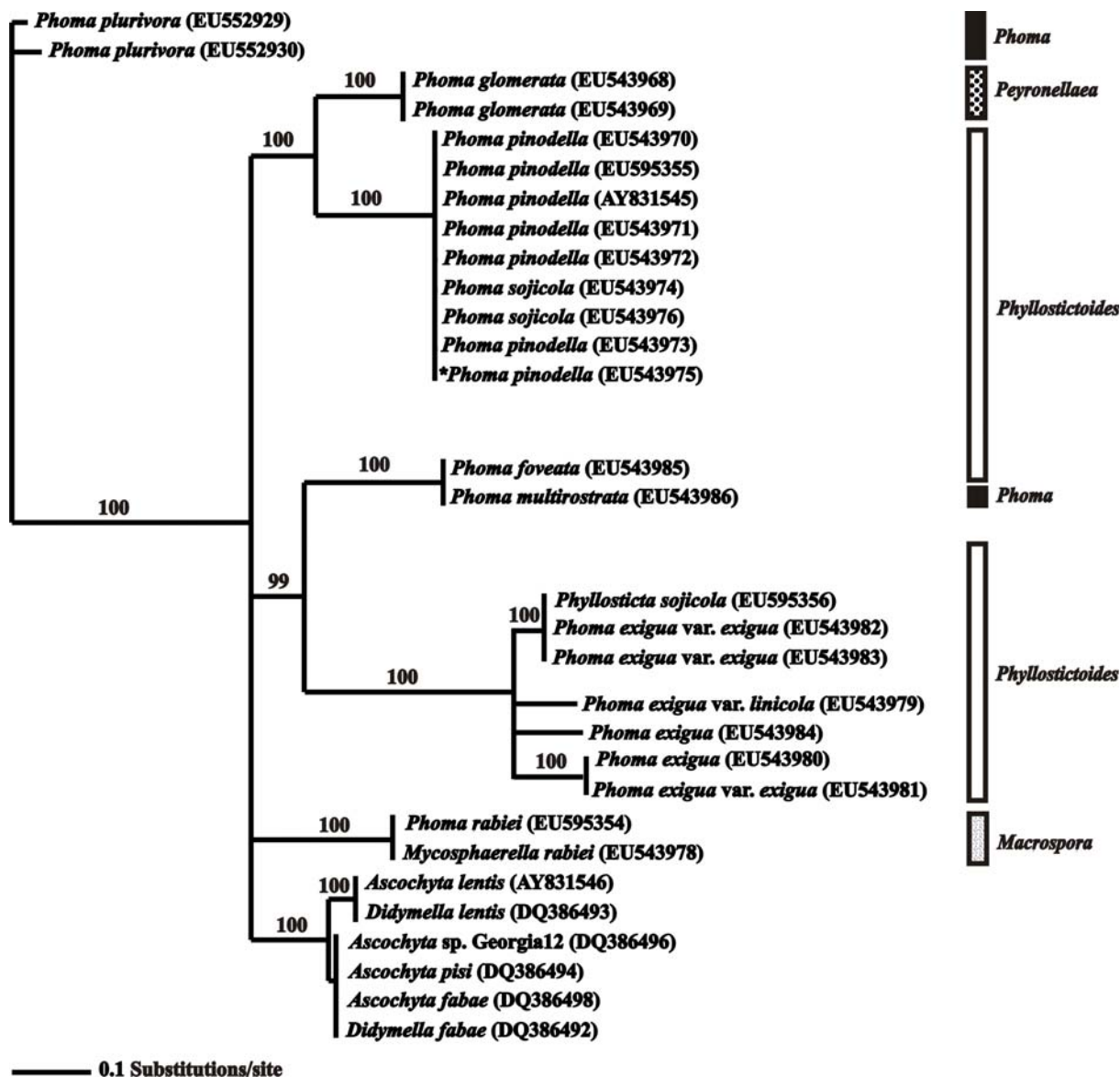


Figure 1: Phylogenetic relationships of *Phoma* strains inferred by Bayesian analysis of *tefl* sequences. The columns on the right side represent the *Phoma* section based on morphological characterization

**ITS fragment**

A PCR reakciót követően egy 520 bp nagyságú fragmentum szaporodott fel minden egyes mintában, amely tartalmazta az ITS1, ITS2, valamint az 5,8S régiókat. Az elemzést 454 bp-al végeztük, hogy

megkönnyítsük az adatbankból származó szekvenciákkal történő összehasonlítást.

Az ITS régió bayesian módszerrel történő elemzése során kapott filogenetikai törzsfá (2. ábra) lényegiekben egyezik kisebb eltérésekkel az előző két fragment alapján kapott törzsfával.

Amit az előző két törzsfánál elmondtunk, az itt is elmondható: a törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella* izolátumai) 99% Bayesian utólagos valószínűség értékkel lett megerősítve, ami azt jelenti, hogy a két csoport az ITS szekvencia alapján teljes bizonyossággal elkülönül egymástól és a többi *Phoma* taxontól.

Az egyes taxonok közötti távolságok (báziskülönbség), valamint a további Bayesian utólagos valószínűség értékek ez alkalommal nem bizonyultak elég jelentősnek az egyes taxonok

egymástól való megbízható, kétségeket kizáró elkülönítéséhez.

A *P. sojicola* izolátumai (D/054 és D/056) pedig a *P. pinodella* cluster-be kerültek a Bayesian elemzés során is.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) az ITS régió alapján a *P. exigua* csoportba került.

Az egyes csoportok az ITS régió Bayesian módszerrel történő elemzése során sem mutatnak egyezést a morfológia bélyegeken alapuló *Phoma* taxonokkal.

2. ábra: Az ITS szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik

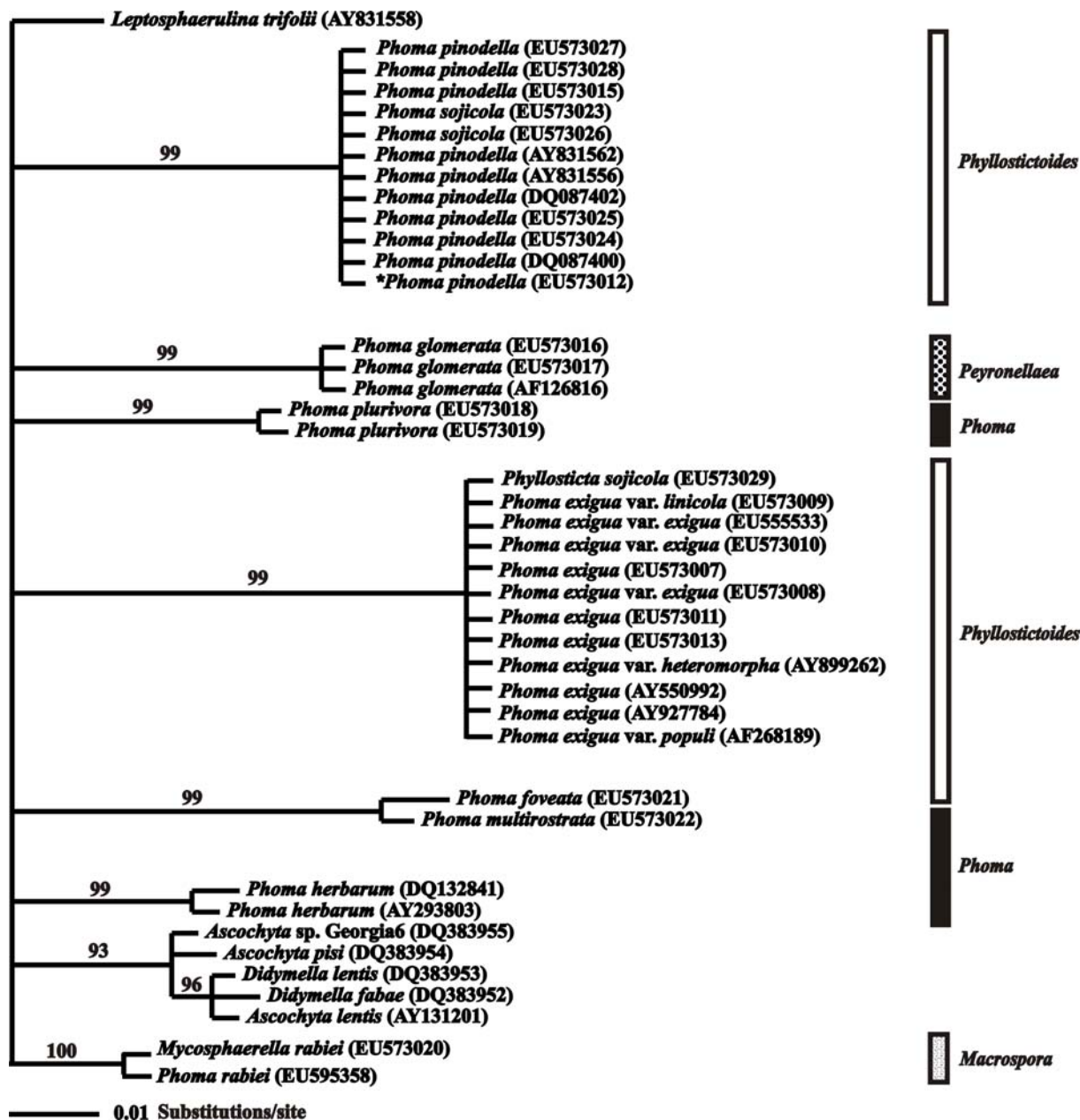


Figure 2: Phylogenetic relationships of *Phoma* strains inferred by Bayesian analysis of ITS sequences. The columns on the right side represent the *Phoma* section based on morphological characterization.

**β-tubulin fragment**

A genomi DNS izolációját követően a PCR reakcióban a felhasznált primerekkel (Bt2a és Bt2b) egy 300 bp nagyságú β-tubulin szakasz amplifikálódott mindegyik izolátum esetében. A PCR reakcióban melléktermék nem képződött, amely a primerek nagyfokú specifikusságát bizonyítja.

A β-tubulin szekvenciák Blast analízise szintén az *Ascochyta* fajokkal mutatott nagyfokú hasonlóságot, amelyekből néhányat kiválasztottunk és bevontunk az elemzésbe.

A β-tubulin szekvencia elemzésével kapott törzsfá alapján (3. ábra) a vizsgált *Phoma* fajok egyértelműen elkülönültek a közel rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól.

A *Phoma pinodella* és a *Phoma exigua* fajhoz tartozó izolátumok egymástól jól elhatárolódó csoportokat alkotnak a β-tubulin szekvencia alapján is.

*Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum a β-tubulin szekvencia alapján is a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba került. A *Phoma sojicola* pedig a *tefl* szekvenciához hasonlóan itt is a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött.

3. ábra: A tubulin szekvenciák maximum likelihood elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik

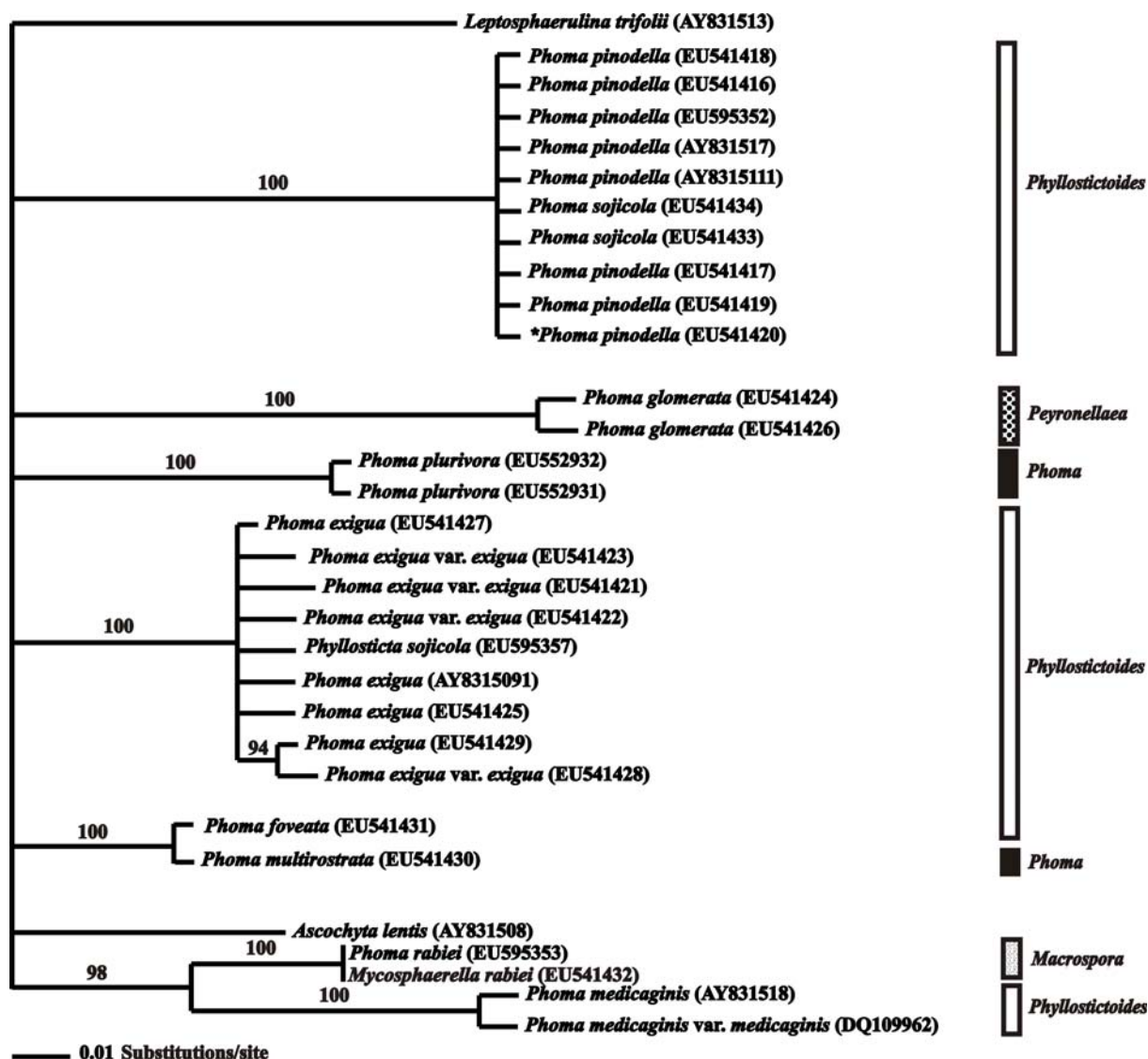


Figure 3: Phylogenetic relationships of *Phoma* strains inferred by the maximum likelihood analysis of tubulin sequences. The columns on the right side represent the *Phoma* section based on morphological characterization

**ÖSSZEGZÉS**

Vizsgálatunk során 9 *Phoma* faj 23 izolátumát vizsgáltuk. Először minden egyes fajt morfológiai és

életteni jellegzetességeik alapján azonosítottunk, majd elvégeztük a molekuláris vizsgálatokat.

Vizsgálataink során a szóján (*Glycine max*) előforduló *Phoma*-szerű gombák molekuláris

taxonómiai vizsgálatát végeztük el genetikai markerek szekvenciáinak elemzésével. A szóján előforduló, szimptomatológiai és morfológiai hasonlóságuk miatt egymástól alig megkülönböztethető *Phoma*-szerű fajok (*Phoma pinodella*, *Phoma sojaicola*, *Phyllosticta sojaicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*) taxonómiája terén a mai napig nagy a bizonytalanság.

A vizsgált izolátumok morfológiai sajátosságai, bizonyos esetekben rendkívüli hasonlósága (a *Phoma pinodella* és *Phoma sojaicola* között) megkérdőjelezheti a *Phoma sojaicola* faji identitásának fenntartását vagy revíziójának szükségességét.

Molekuláris vizsgálatainkhoz három markert választottunk (*tefl*, ITS, *tubulin*), amelyek szakirodalmi adatok alapján korábban már alkalmasnak bizonyultak filogenetikai kapcsolatok tanulmányozására más élőlénycsoportokban, így a gombák körében is. Filogenetikai vizsgálatok során célszerű több gént vizsgálni, mivel GCPSR elmélet szerint (Taylor et al., 2000) több gén használatakor pontosabb és megbízhatóbb eredményt kapunk az egyes filogenetikai kapcsolatokra.

A DNS szekvencia analízise a *Phoma* fajok esetében eddig csak kisebb csoportok elkülönítő vizsgálatára korlátozódott.

Az ITS szekvenciákat használták fel a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára (Mendes-Pereira et al., 2003), illetve a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas et al., 2005). Voigt et al. (2005) egyéb gének, köztük az ITS szekvenciák mellett a  $\beta$ -*tubulin* gént alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára, valamint Fatehi et al. (2003) az „*Ascochyta pinodes* komplex” taxonómiai vizsgálatokor. Landvik et al. (2001) a  $\beta$ -*tubulin* fehérjét alkotó aminosavak szekvenciájának egy részét próbálta használni magasabb rendű taxonok elkülönítésére az Ascomycota csoporton belül. Arra a következtetésre jutottak, hogy a  $\beta$ -*tubulin* gén kevésbé alkalmas magasabb szintű rendszertani kapcsolatok elemzésére, mint más gének. Nukleotid szinten azonban a  $\beta$ -*tubulin* gén informatívna bizonyult az Ascomycota csoportnál alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok

elkülönítésénél (Jong et al., 2001; O'Donnell et al., 1998; Schoch et al., 2001).

A *tefl* és  $\beta$ -*tubulin* szekvenciákat *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálatának céljából ez idáig még nem alkalmazták.

Vizsgálatunk során az ITS szekvenciák mellett a *tefl* és a  $\beta$ -*tubulin* szekvenciákat egyaránt alkalmasnak találtuk az egyes *Phoma* izolátumok genetikai elkülönítésére. Mindhárom szekvencia alapján készült filogenetikai törzsfá hasonló filogenetikai kapcsolatokat mutat.

Eredményeink alapján a *tefl* és a  $\beta$ -*tubulin* szekvenciák megbízhatóbbnak bizonyultak, mint az ITS, mivel az ITS szekvenciák esetében az egyes taxonok közötti távolságok (báziskülönbség), továbbá a Bayesian utólagos valószínűség értékek nem bizonyultak elég jelentősnek az egyes taxonok egymástól való megbízható, kétségeket kizáró elkülönítéséhez.

A három szekvencia közül különösen a *tefl* szekvencia bizonyult a legalkalmasabbnak a *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálatához, így a *tefl* a többi fonalas gombához hasonlóan (Druzhinina és Kubicek, 2005) a *Phoma* fajok körében is alkalmas filogenetikai vizsgálatokra.

Az egy fajhoz tartozó izolátumok (*Phoma exigua* var. *exigua* és *Phoma pinodella*) egymástól jól elkülönült csoportokat alkotnak mindhárom szekvencia alapján.

Az eredetileg *Phyllosticta sojaicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) a *tefl*, ITS és *tubulin* szekvenciák alapján egyaránt a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba került, ami alátámasztja Kövics et al. (1999) feltételezését, miszerint a *Phyllosticta sojaicola* megegyezik a *Phoma exigua* var. *exigua* fajjal. A *Phoma sojaicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba került az elemzés során, mivel *tefl*, ITS és *tubulin* szekvenciájuk gyakorlatilag teljesen azonos. Ez megerősítheti azt a feltételezést, hogy a *Phoma sojaicola* a *Phoma pinodella* egy, a szóján előforduló patovarietása (Kövics, személyes közlés).

Mindhárom szekvencia Bayesian módszerrel végzett filogenetikai elemzése megerősítette, hogy az eredetileg *Phyllosticta sojaicola*-ként deponált izolátum a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba, a *Phoma sojaicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött, ami szükségessé teheti a nevezett taxonok helyzetének újragondolását.

#### IRODALOM

- Aa, H. A. van der-Noordeloos, M. E.-Gruyter, J. de (1990): Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Studies in Mycology*. 32: 3-19.
- Balmas, V.-Scherer, B.-Ghignone, S.-Salem, A. O. M.-Cacciola, S. O.-Migheli, Q. (2005): Characterisation of *Phoma tracheiphila* by RAPD-PCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of species primers for in planta PCR detection. *European Journal of Plant Pathology*. 111: 235-247.
- Boerema, G. H.-Dorenbosch, M. M. J.-van Kesteren, H. A. (1965): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea*. *Persoonia*. 4: 47-68.
- Boerema, G. H.-Dorenbosch, M. M. J.-van Kesteren, H. A. (1968): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea* II. *Persoonia*. 5: 201-205.
- Boerema, G. H.-Dorenbosch, M. M. J.-van Kesteren, H. A. (1971): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea* III. *Persoonia*. 6: 171-177.
- Boerema, G. H.-Dorenbosch, M. M. J.-van Kesteren, H. A. (1973): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea* IV. *Persoonia*. 7: 131-139.
- Boerema, G. H.-Dorenbosch, M. M. J.-van Kesteren, H. A. (1977): Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea*. V. *Kew Bull.* 31: 533-544. „1976”



- Boerema, G. H.-van Kesteren, H. A. (1981): The nomenclature notes on some species of *Phoma* sect. *Plenodomus*. *Persoonia*. 11: 317-331.
- Boerema, G. H.-Gruyter, J. de-Noordeloos, M. E.-Hamers, M. E. C. (2004): *Phoma* identification manual. CABI Publishing. CAB International Wallingford. Oxfordshire. UK.
- Druzhinina, I.-Kubicek, C. P. (2005): Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species cluster? *J. Zhejiang University of Science*. 6B. 2: 100-112.
- Fatehi, J.-Bridge, P. D.-Punithalingam, E. (2003): Molecular relatedness within the "*Ascochyta pinodes*"-complex. *Mycopathologia*. 156: 317-327.
- Glass, N. L.-Donaldson, G. C. (1995): Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1323-1330.
- Huelsenbeck, J. P.-Ronquist, F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Jong, S. N.-Lévesque, C. A.-Verkley, G. J. M.-Abeln, E. C. A.-Rahe, J. E.-Braun, P. G. (2001): Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the  $\beta$ -tubulin gene. *Mycological Research*. 105: 658-669.
- Kaiser, W. J.-Wang, B. C.-Rogers, J. D. (1997): *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: Host specificity, teleomorphs (*Didymella*), Hybrid analysis, and taxonomic status. *Plant Disease*. 81: 809-816.
- Kövics, G. J. (2004): New observations on etiology of pea *Ascochyta-Phoma* disease complex and  $\alpha$ -esterase isozymes of *Phoma pinodella*. (Újabb megfigyelések a borsó ragya betegségkomplex etiológiája és a *Phoma pinodella* faj összehasonlító  $\alpha$ -észteráz izozimjeinek vizsgálatában.) In: Pepó, P.-Sárvári, M. (Eds) Integrated agronomy models in the agriculture of 21st century. Plant production] Debrecen University Press. Debrecen. 127-137.
- Kövics, G.-Gruyter, J. de (1995): Comparable esterase isozyme analysis of some *Phoma* species occur on soybean. (A szóján előforduló néhány *Phoma* faj észteráz izoenzim mintázatainak összehasonlító vizsgálata.) *Proceedings of Debrecen Agricultural University (DATE Tudományos Közleményei)*. 31: 191-207.
- Kövics, G. J.-Gruyter, J. de-Aa, H. A. van der (1999): *Phoma sojicola* comb. nov. and other hyaline-spored coelomycetes pathogenic on soybean. *Mycological Research*. 103. 8: 1065-1070.
- Landvik, S.-Eriksson, O. E.-Berbee, M. L. (2001): *Neoelecta* - a fungal dinosaur? Evidence from  $\beta$ -tubulin amino acid sequences. *Mycologia*. 93: 1151-1163.
- Lutzoni, F.-Kauff, F.-Cox, C. J.-McLaughlin, D.-Celio, G.-Dentinger, B.-Padamsee, M.-Hibbett, D.-James, T. Y.-Baloch, E.-Grube, M.-Reeb, V.-Hofstetter, V.-Schoch, C.-Arnold, A. E.-Miadlikowska, J.-Spatafora, J.-Johnson, D.-Hambleton, S.-Crockett, M.-Shoemaker, R.-Sung, G. H.-Lucking, 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.-Yahr, R.-Vilgalys, R. (2004): Assembling the fungal tree of life: progress classification and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*. 91: 1446-1480.
- Mendes-Pereira, E.-Balesdent, M. H.-Brun, H.-Rouxel, T. (2003): Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans-L. biglobosa* species complex. *Mycological Research*. 107.11: 1287-1304.
- Monte, E.-Bridge, P. D.-Sutton, B. C. (1990): Physiological and biochemical studies in Coelomycetes. *Phoma*. *Studies in Mycology*. 32: 21-28.
- Monte, E.-Bridge, P. D.-Sutton, B. C. (1991): An integrated approach to *Phoma* systematics. *Mycopathologia*, 115: 89-103.
- Nicholas, K. B.-Nicholas, H. B. Jr.-Deerfield, D. W. I. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *Embnew. News*. 4: 14.
- Noordeloos, M. E.-Gruyter, J. de-van Eijk, G. W.-Roelijmans, H. J. (1993): Production of dendritic crystals in pure cultures of *Phoma* and *Ascochyta* and its value as a taxonomic character relative to morphology, pathology, and cultural characteristics. *Mycological Research*. 97: 1343-1350.
- O'Donnell, K.-Cigelnik, E.-Nirenberg, H. I. (1998): Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90: 465-493.
- Page, R. D. M. (1996): Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 12: 357-358.
- Posada, D.-Grandall, K. A. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14. 9: 817-818.
- Saniewska, A.-Prus-Glowacki, W. (1998): Mycelial growth, pathogenicity and electrophoretic characteristics of some enzymes among isolates of *Phoma narcissii* (Aderh.) Boerema, de Gruyter et Noordeloos from *Hippeastrum*, *Narcissus* and *Hymanocallis*. *Phytopathologica Polonica*. 15: 5-13.
- Schoch, C. L.-Crous, P. W.-WingWeld, B. D.-WingWeld, M. J. (2001): Phylogeny of *Calonectria* based on comparisons of  $\beta$ -tubulin DNA sequences. *Mycological Research*. 105: 1045-1052.
- Taylor, J. W.-Jacobson, D. J.-Kroken, S.-Kasuga, T.-Geiser, D. M.-Hibbett, D. S.-Fisher, M. C. (2000): Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 21-32.
- Thompson, J. D.-Gibson, T. J.-Plewniak, F.-Jeanmougin, F.-Higgins, D. G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24: 4876-4882.
- Voigt, K.-Cozijnsen, A. J.-Kroymann, J.-Pöggeler, S.-Howlett, B. J. (2005): Phylogenetic relationships between members of the crucifer pathogenic *Leptosphaeria maculans* species complex as shown by mating type (MAT1-2), actin and  $\beta$ -tubulin sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37: 541-557.
- White, T. J.-Bruns, T.-Lee, S.-Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols. A guide to methods and applications. Innis, M. et al. (Eds.) Academic Press. New York. 315-322.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>