

Phoma fajok filogenetikai vizsgálata maximum likelihood analízissel

Irinyi László – Kövics György – Sándor Erzsébet

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

ÖSSZEFOGLALÁS

A *Phoma* genusba tartozó gombafajok többsége fitopatogén, opportunista parazita vagy szaprofiton életmódot folytat. Az egyes *Phoma* fajokat standard táptalajon megfigyelhető morfológiai bélyegek alapján rendszerezik. Más gombacsoportoknál már használt, és többé-kevésbé megbízhatónak bizonyult molekuláris markerek szekvencia analízise a *Phoma* fajoknál napjainkig alig került alkalmazásra.

Vizsgálatainkhoz olyan filogenetikai markert kerestünk, amely már megbízhatónak bizonyult mind a fajok közötti, mind a fajok belüli csoportok elkülönítésére más gombataxonoknál.

Ezek közül választásunk az élővilágban erősen konzervatív, translációs elongációs faktor fehérjét kódoló génre (*tef1*) és a tubulin fehérjét kódoló génre, illetve rDNS-ben található (Internal Transcribed Spacer=ITS) szekvenciákra esett.

Vizsgálatunk során 11 *Phoma* faj 24 izolátumát vizsgáltuk. A fajok *tef1*, tubulin, illetve ITS szekvenciáinak filogenetikai elemzését maximum likelihood analízissel végeztük PAUP*4.0b program alkalmazásával. Új eredményként értékelhető, hogy a nukleinsav szekvenciák alapján az egyes *Phoma* taxonok jól elkülöníthetők egymástól, ami bizonyítja, hogy a szekvenciák 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 analízise maximum likelihood módszerrel 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, maximum likelihood

SUMMARY

The cosmopolitan *Phoma* genus contains mainly phytopathogenic, opportunistic parasite, and saprophyte fungal species. Up to now the characterization of *Phoma* species and other taxa of *Phoma* has so far been determined on the basis of morphology on standardized media, and gene sequence analysis was only used as a confirmative or distinctive complement.

In this study we have tried to study phylogenetic relationships by maximum likelihood method in the *Phoma* genus. We employed a part of the gene responsible for the synthesis of translation elongation factor 1 subunit alpha protein (*tef1*) containing both introns and exons, a part of the gene responsible for synthesis of tubulin protein and ITS region containing the internal transcribed spacer regions 1 and 2 and the 5.8S rDNA as potential genetic markers to infer phylogenetic relationships among different *Phoma* taxa.

Twenty-four isolates of eleven different *Phoma* species were firstly characterised by morphologically, and then their *tef1*, tubulin and ITS sequences were sequenced and analysed by maximum likelihood method carried out by PAUP*4.0b program.

According to constructed phylogenetic trees, the different *Phoma* taxons are well separated. However these trees do not support the traditional *Phoma* sections based on morphological characterization.

The maximum likelihood analyses of all 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 experienced molecular evidences initiate the demand of reclassification of formerly mentioned soybean pathogens.

Keywords: *Phoma*, ITS sequences, translation elongation factor, tubulin, phylogenetics, maximum likelihood

BEVEZETÉS

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

A tradicionális és a molekuláris mikológiában több út is lehetséges az egyes gombafajok identifikálására, kezdve a morfológiai bélyegekkel, az élettani és biokémiai funkciókon át egészen a legmodernebbnek tekintett nukleinsav szekvenciák összehasonlító elemzéséig.

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 (Boerema et al., 1965, 1968, 1971, 1973, 1977; Boerema és van Kesteren, 1981) mellőzte az addig használt gazdanövény vagy szubsztrátum specificitást, mint a *Phoma* fajok elsődleges rendszertani kritériumát, és megpróbálták mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között stabil rendszertani bélyegek alapján rendszerezni a *Phoma* fajokat, amelyeket standardizált körülmények között vizsgált telepjellemzőkkel egészítettek ki. Fontosnak találták a piknidium falának szerkezetét, valamint azt, hogy a piknidium 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 pikindiumfal 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 a 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 kódoló szekvenciák.

Molekuláris taxonómiai vizsgálatainkba az ITS régió mellett a translációs elongációs faktort kódoló gén (*tefl*) nagy intronját, illetve a tubulin fehérjét kódoló gén egy szakaszát vontuk be, amelyeket más élőlény csoportok mellett a gombáknál is eredményesen használtak.

Az utóbbi években a mikológusok egyre szélesebb körben alkalmazzák az rDNS szekvenciákban talált variabilitást a taxonok közötti rokonsági viszonyok elemzésére (Avise, 2004). Népszerűségüknek egyik fő oka, hogy a szekvenálandó régió céltudatos megválasztásával megfelelő variabilitás kapható a taxonok közötti rokonsági viszonyok feltárásához: osztály, család, nemzetség, faj, sőt faj alatti szinteken is (Hillis és Dixon, 1991; Hibbet et al., 1995; Lutzoni és Vilgalys, 1995; Moncalvo et al., 1995; Nicholson, 1995; Hopple és Vilgalys, 1999; Pine et al., 1999; Thon és Royse, 1999; Hibbet és Thorn, 2001; Binder és Hibbet, 2002). 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).

A translation elongation factor alpha fehérjét kódoló *tefl* gén minden élő szervezetben megtalálható, és az ITS szekvenciákkal szemben nagy előnye, hogy a gén csak egy kópiában van jelen a genomban (Baldauf és Doolittle, 1997). A fajok közötti és fajok belüli rendszertani kapcsolatok felderítésére egyaránt alkalmas, mint azt Druzhinina és Kubicek (2005) is bizonyították *Trichoderma* fajoknál, illetve Roger et al. (1999) egyéb fajoknál (pl. *Mucor racemosus*, *Podospora anserina*). Egyetlen hátránya, hogy a fehérjét kódoló *tefl* gén rövidebb, mint más filogenetikai markerként használt gének. Mintegy 2 kb hosszúságú, intront és exont egyaránt tartalmazó szakasz. Filogenetikai vizsgálatunkhoz a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó fragmentjét választottuk.

A tubulin fehérje létfontosságú szerepet játszik az eukarióta sejt felépítésében és működésében, hiszen a mikrotubulusok (melyek a citoskeletális rendszer alkotórészei) jórészt tubulin molekulákból épülnek fel. Mivel minden eukarióta sejt tartalmaz mikrotubulusokat, így tubulin molekulákat is, ezért feltételezhető, hogy a tubulin eredete egyidejű az eukarióta szervezetek megjelenésével, mintegy 1,6 milliárd évvel ezelőtt (Wang et al., 1999). A tubulint felépítő fehérjéket kódoló gének, különösképpen a β -tubulint kódoló gén, egyre nagyobb figyelmet kap különböző taxonok közötti (evolúciósan egymáshoz távol és egymáshoz közel lévő taxonok esetében egyaránt) evolúciós rokonsági kapcsolatok elemzése során (Keeling és Doolittle, 1996; Baldauf et al., 2000). A gént alkalmazták már filogenetikai vizsgálatokra egysejtűeknél, állatoknál, növényeknél és gombáknál egyaránt (Mages et al., 1995; Keeling et al., 1998; Schutze et al., 1999; Ayliffe et al., 2001; Edgcomb et al., 2001; Hansen et al., 2004). Voigt et al. (2005) egyéb gének mellett a β -tubulin gént alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára.

A szekvenciák filogenetikai elemzéseit maximum likelihood módszerrel végeztük. A módszer azt a törzsfát keresi, amely maximalizálja az adatok valószínűségét, éppen ezért leggyakrabban csak egy törzsfát kapunk a módszerrel. A maximum likelihood (maximális valószínűség) módszer a szekvencia rendezés során nyert adatokat arra használja, hogy meghatározza a szubsztitúciók valószínűségét, a négy nukleotid relatív gyakoriságát, valamint a tranzíciók és transzverziók különböző valószínűségeit. Az adatok figyelembe vételével a módszer azt a törzsfát választja ki, amely maximalizálja az adatok helyes összerendezésének a valószínűségét. A maximum likelihood módszer szerint azt a magyarázatot kell választani, amely a kapott eredményt a legvalószínűbb jelenséggé írja le. Az elemzés során a módszer az adatokat az összes lehetséges módon összehasonlítja. Elméletben az algoritmus egyes szekvenciák várt valószínűségét adja meg egy közös

ősben, és ezen adatokból következtet a filogenetikai törzsfá felépítésének a valószínűségére.

A valószínűséget az összes, ily módon alkotott lehetséges törzsfára kiszámítja, majd megadja a legvalószínűbb törzsfát. Fontos leszögezni, hogy a likelihood nem annak a valószínűsége, hogy az elemzés során kapott törzsfá milyen valószínűséggel egyezik meg a valódi evolúciós törzsfával, hanem annak a valószínűsége, hogy a törzsfá milyen valószínűségben felel meg annak az adatnak, amit elemeztünk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

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

1. táblázat

A kísérletbe bevont *Phoma* fajok listája

Fajnév(1)	Izolátum kód(2)		Gazdanövény(5)
	Saját(3)	Eredeti(4)	
<i>Phoma pinodella</i>	D/035	D/035	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma pinodella</i>	D/082	D/082	<i>Pisum sativum</i>
<i>Phoma pinodella</i>	D/0822	D/0822	<i>Pisum sativum</i>
<i>Phoma pinodella</i>	D/045	PD82/550	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Phoma pinodella</i>	D/046	PD77/165	<i>Pisum sativum</i>
<i>Phoma pinodella</i>	D/095	D/095	<i>Pisum sativum</i>
<i>Phoma pinodella</i>	D/159	CBS 318.90	<i>Pisum sativum</i>
<i>Phoma sojicola</i>	D/054	D/054	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma sojicola</i>	D/056	PD97/2160	<i>Glycine max</i>
<i>Phyllosticta sojicola</i> (= <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> ?)	D/050	CBS 301.39	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	D/059	D/059	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	D/075	D/075	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	D/077	D/077	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	D/063	Ph58	<i>Petroselinum crispum</i>
<i>Phoma exigua</i>	D/145	D/145	<i>Althaea officinalis</i>
<i>Phoma exigua</i>	D/146	D/146	<i>Althaea rosae</i>
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	D/158	ICMP 15330	<i>Agapanthus</i> sp.
<i>Phoma exigua</i>	D/157	ICMP 13336	<i>Cucurbita maxima</i>
<i>Phoma exigua</i> var. <i>linicola</i>	D/071	PD 86/73	<i>Linum usitatissimum</i>
<i>Phoma plurivora</i>	D/155	ICMP 6875	<i>Pennisetum clandestinum</i>
<i>Phoma plurivora</i>	D/072	PD 75/907	<i>Medicago sativa</i>
<i>Phoma glomerata</i>	D/156	ICMP 15788	<i>Yucca</i> sp.
<i>Phoma glomerata</i>	D/034	D/034	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma eupyrena</i>	D/058	CBS 375.91	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Phoma destructiva</i>	D/033	D/033	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Phoma foveata</i>	D/048	PD 76/1021	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Phoma multirostrata</i>	D/044	PD 77/508	<i>Phylodendron</i> sp.
<i>Ascochyta rabiei</i>	D/144	D/144	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Didymella rabiei</i>	D/160	CBS 581.83A	<i>Cicer arietinum</i>

Table 1: Isolates of *Phoma* species

Species(1), Isolate number(2), Our collection(3), Original(4), Host of origin(5)

Az izolátumokat 50 ml folyékony 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.[®] 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 β -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 analízist a PAUP*4.0b (Swofford, 2002) program segítségével végeztük, maximum likelihood analízist végezve. Az evolúciós modellek tesztelését a Modeltest v.3.7 (Posada és Grandall, 1998) programmal végeztük. Akaike information criterium (AIC) és hierarchical likelihood ratio teszteket

használtunk a modellek kiválasztásához. Mindhárom esetben az AIC kritérium szerint választottuk meg az evolúciós modelleket. Az ITS fragment elemzéséhez a GTR+I evolúciós modellt választottuk a következő paraméterekkel: az egyes bázisok gyakorisága (A=0,2987, C=0,2158, G=0,2482, T=0,2373), a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=0,5286, A-G=3,9034, A-T=1,5164, C-G=0,2882, C-T=0,9530, G-T=1,000), azonos eloszlású, az állandó bázishelyek aránya 0,8475. A *tefl* fragment elemzésekor a TVM+I+G evolúciós modell került kiválasztásra, ahol az egyes bázisok gyakorisága (A=0,1858, C=0,3062, G=0,2337, T=0,2744), a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,9115, A-G=3,4463, A-T=1,8477, C-G=1,7686, C-T=3,4463, G-T=1,000), gamma eloszlás, melynek alakparamétere 2,9239, az állandó bázishelyek aránya 0,3076. A β -tubulin fragment elemzéséhez a

GTR+G evolúciós modellt választottuk, ahol az egyes bázisok gyakorisága (A=0,1883, C=0,3027, G=0,2686, T=0,2404), a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,7611, A-G=3,7036, A-T=3,0483, C-G=0,5541, C-T=9,8991, G-T=1,000), gamma eloszlás, melynek alakparamétere 0,3759, az állandó bázishelyek aránya 0,3759. A törzsfák készítésében külső csoportként további fajok *tefl* (2. táblázat), ITS (3. táblázat) és tubulin (4. táblázat) szekvenciáit is bevontuk a törzsfák jobb megalapozásához. A szekvenciákat a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> honlapról töltöttük le. A *Didymella fabae* és a *Didymella lentis* az *Ascochyta fabae* és *Ascochyta lentis* teleomorf alakja (Kaiser et al., 1997).

A törzsfák elkészítéséhez a TreeView (Page, 1996) programot használtuk.

2. táblázat

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

Fajnév(1)	Izolátum kód(2)	Hozzáférési szám(3)
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	WAC 6693	AY831543.1
<i>Ascochyta pisi</i>	AP2	DQ386494.1
teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i> (Kaiser et al., 1997)	SAT AL	AY831546.1
<i>Ascochyta fabae</i> f. sp. <i>Viciae</i> (= <i>Ascochyta fabae</i>)	AV11	DQ386498.1
teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i>	AL1	DQ386493.1
teleomorf: <i>Didymella fabae</i> anamorf: <i>Ascochyta fabae</i> (Kaiser et al., 1997)	AF1	DQ386492.1
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831542.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831545.1

Forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>(4)

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

3. táblázat

Az ITS fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfák 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>	API	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/>(4)

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

A β -tubulin fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfák készítésébe bevont fajok listája, valamint β -tubulin szekvenciájuk hozzáférési száma

Fajnév(1)	Isolátum 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/>(4)

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

EREDMÉNYEK

Első lépésként a *Phoma* fajok morfológiai azonosítását végeztük el Boerema et al. (2004) monográfiája alapján. A mikroszkópi- és telepjellemzők alapján kapott eredmények azt mutatták, hogy a törzsgyűjteményünkben szereplő fajok valóban megegyeznek az 1. táblázatban szereplő fajokkal.

Transzlációs elongációs faktor

A genomi DNS izolációját követően a PCR reakcióban a felhasznált primerekkel egy 280-290 bp nagyságú, a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó szakasz szaporodott fel mindegyik izolátum esetében. A PCR reakcióban melléktermék nem képződött, amely a primerek nagyfokú specifikusságát bizonyítja. A PCR reakció után a felszaporodott fragmentek szekvenálási eredményei alapján az elemzést maximum likelihood-típusú analízissel, a PAUP*4.0b program (bootstrap=1000) alkalmazásával végeztük el.

A *tefl* szekvencia maximum likelihood elemzésével kapott törzsfák alapján (1. ábra) a vizsgált *Phoma* fajok egyértelműen elkülönülnek egymástól, illetve a közel rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól. Az egy fajhoz tartozó izolátumok (*Phoma pinodella* és *Phoma exigua*) egymástól jól elhatárolódó csoportokat (cluster) alkotnak.

Mivel a *Phoma* és *Ascochyta* fajok elkülönítése morfológiai alapon gyakran nem könnyű feladat az *in vivo* különböző sejtszámú konídiummal rendelkező *Phoma* (pseudo-*Ascochyta*) fajok esetében (Fatehi et al., 2003), ez a molekuláris bélyeg további segítséget nyújthat a hovatartozás egyértelmű megállapításához.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) a *tefl* szekvencia alapján a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba került, ami

alátámasztja Kövics et al. (1999) feltételezését, miszerint a *Phyllosticta sojicola* megegyezik a *Phoma exigua* var. *exigua* fajjal. A *Phoma sojicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba került az elemzés során, mivel az *tefl* szekvenciájuk gyakorlatilag teljesen azonos. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy a *Phoma sojicola* a *Phoma pinodella* egy a szóján előforduló patovarietasa.

ITS fragment

A PCR reakciót követően egy 0,6 kb nagyságú fragmentum szaporodott fel minden egyes mintában, amely tartalmazta az ITS1, ITS2, valamint az 5,8S régiókat. PCR melléktermék nem képződött.

Az ITS fragment alapján maximum likelihood analízissel készített filogenetikai törzsfák (2. ábra) hasonló a *tefl* fragment alapján készült törzsfához. Az egyes *Phoma* fajok itt is jól elkülönülnek egymástól, és a több izolátummal képviselt fajok (*Phoma pinodella* és *Phoma exigua*) hasonlóképpen clustereket alkotnak.

A *Phyllosticta sojicola* az ITS fragment alapján is a *Phoma exigua*, míg a *Phoma sojicola* a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött.

B-tubulin fragment

A PCR reakcióban egy 300 bp hosszúságú szakasz szaporodott fel, mely a β -tubulint kódoló gén egy polimorf régiójának felel meg.

A tubulin szekvenciák maximum likelihood elemzésével készített filogenetikai törzsfák (3. ábra) nagyon hasonló képet mutat az előző két törzsfához. A *Phoma pinodella* és *Phoma exigua* izolátumok clustert alkotnak, melyekbe rendeződik a *Phoma sojicola* és *Phyllosticta sojicola* az előzőekhez hasonlóan. Az *Ascochyta* fajok itt is külön csoportot alkotnak a *Phoma* fajoktól.

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

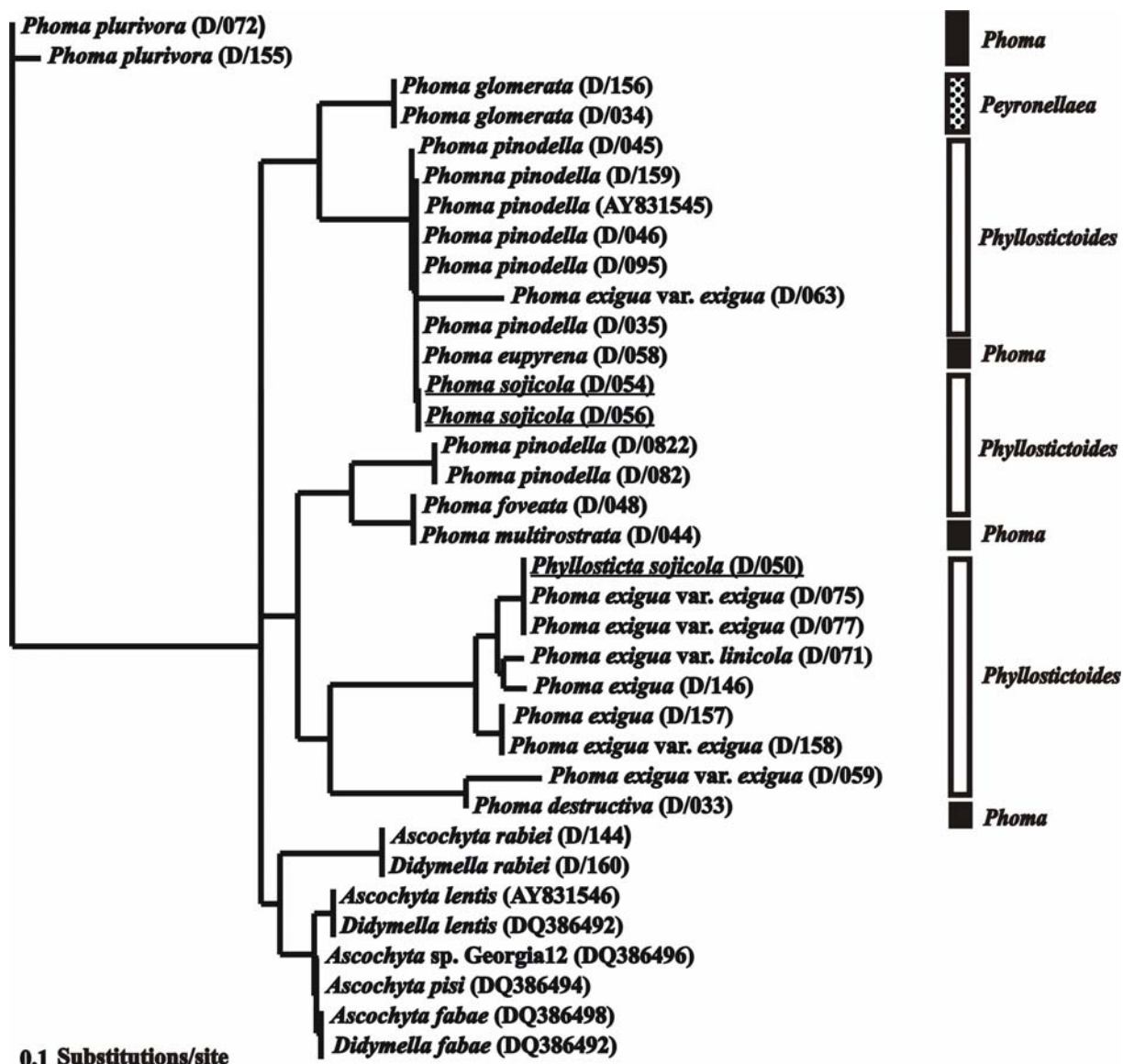


Figure 1: Phylogenetic relationships of *Phoma* strains inferred by the maximum likelihood analysis of *tefl* sequences. The columns on the right side represent the *Phoma* section based on morphological characterization

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

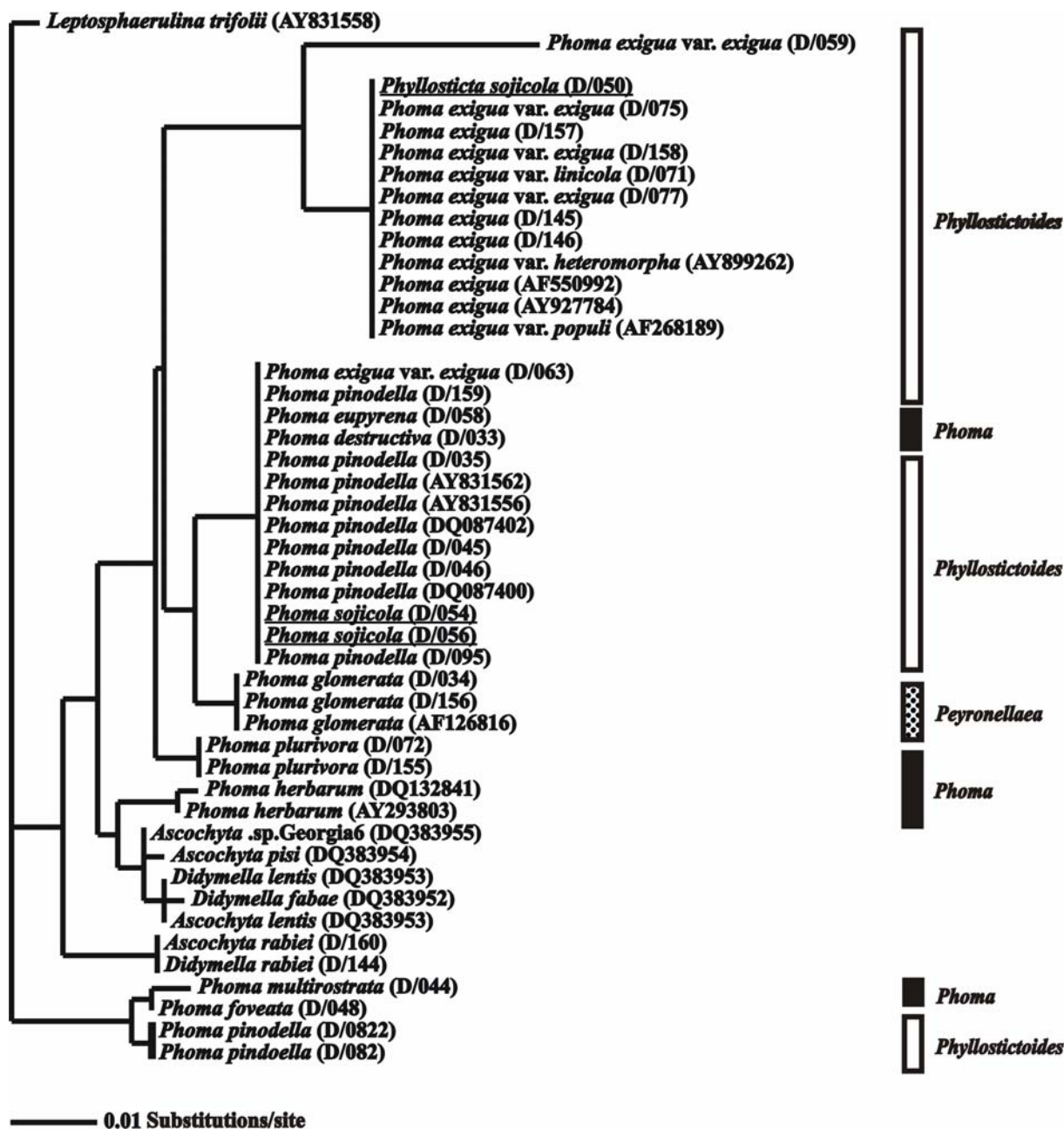


Figure 2: Phylogenetic relationships of *Phoma* strains inferred by maximum likelihood analysis of ITS sequences. The columns on the right side represent the *Phoma* section based on morphological characterization

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

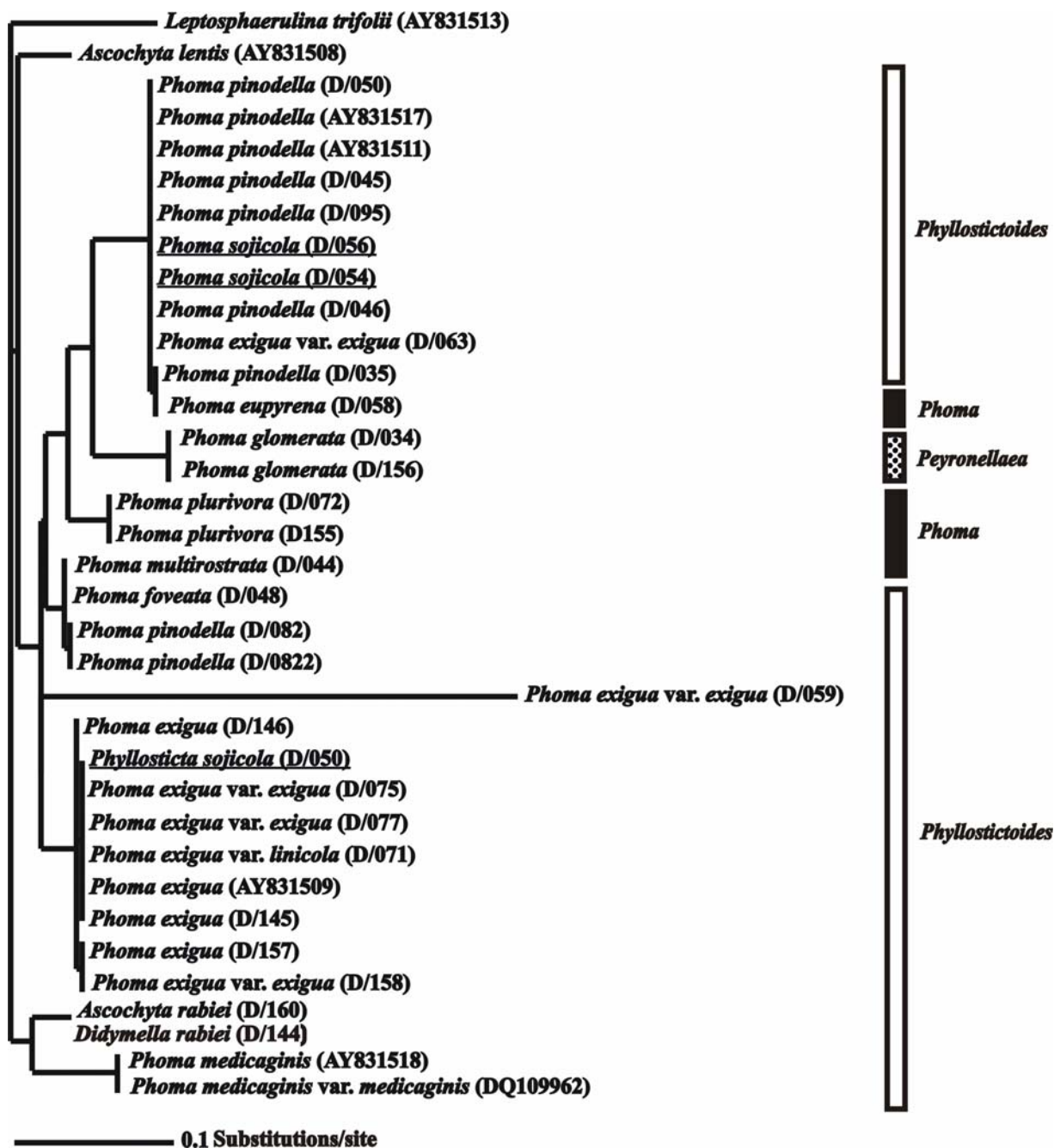


Figure 3: Phylogenetic relationships of *Phoma* strains inferred by the maximum likelihood analysis of tubulin sequences. The columns on the right side represent the *Phoma* section based on morphological characterization

ÖSSZEFOGLALÁS

A *tefl* gén, a többi fonalas gombához hasonlóan alkalmasnak látszik a *Phoma* fajok filogenetikai elemzésére maximum likelihood módszerrel. Az ITS fragment maximum likelihood módszerrel történő filogenetikai elemzése hasonló eredményt ad, mint a *tefl* fragment. Tehát más taxonokon végzett vizsgálatokhoz hasonlóan az ITS fragment a *Phoma* genus filogenetikai vizsgálataira is alkalmas. A tubulin szekvenciák ugyancsak alkalmasnak

bizonyultak a vizsgált *Phoma* fajok elkülönítésére maximum likelihood analízist végezve.

Mindhárom fragment analízise maximum likelihood módszerrel 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. A vizsgált szekvenciák közül a *tefl* látszik leginkább alkalmasnak a *Phoma* fajok *Ascochyta* fajoktól történő elkülönítésre.

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.
- Awise, J. C. (2004): Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Underland, MA: Sinauer Associates.
- Ayliffe, M. A.-Dodds, P. N.-Lawrence, G. J. (2001): Characterisation of a beta-tubulin gene from *Melampsora lini* and comparison of fungal beta-tubulin genes. *Mycological Research*, 105: 818-826.
- Baldauf, S. L.-Doolittle, W. F. (1997): Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94: 12007-12012.
- Baldauf, S. L.-Roger, A. J.-Wenk-Siefert, I.-Doolittle, W. F. (2000): A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 290: 972-977.
- 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.
- Binder, M.-Hibbett, D. S. (2002): Higher-level phylogenetic relationships of *Homobasidiomycetes* (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22: 1: 76-90.
- 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.
- Edgcomb, V. P.-Roger, A. J.-Simpson, A. G. B.-Kysela, D. T.-Sogin, M. L. (2001): Evolutionary relationships among “jakobid” flagellates as indicated by alpha- and beta-tubulin phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 514-522.
- 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.
- Hansen, K.-LoBuglio, K. F.-Pfister, D. H. (2004): Evolutionary relationships of the cup-fungus *Peziza* and Pezizaceae inferred from multiple nuclear genes: RPB2, β -tubulin, and LSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 1-23.
- Hibbett, D. S.-Fukumasa-Nakai, Y.-Tsuneda, A.-Donoghue, M. J. (1995): Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 87: 618-638.
- Hibbett, D. S.-Thorn, R. G. (2001): *Basidiomycota: Homobasidiomycetes*. [In: Mclaughlin, D. J.-Mclaughlin, E. G.-Lemke, P. A. (Eds.) *The Mycota VII Part B, Systematics and Evolution*] Springer-Verlag, Berlin.
- Hillis, D. M.-Dixon, M. T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66: 411-453.
- Hopple, J. S.-Vilgalys, R. (1999): Phylogenetic Relationships in the Mushroom Genus *Coprinus* and Dark-Spored Allies Based on Sequence Data from the Nuclear Gene Coding for the Large Ribosomal Subunit RNA: Divergent Domains, Outgroups, and Monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13: 1-19.
- 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.
- Keeling, P. J.-Doolittle, W. F. (1996): Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 1297-1305.
- Keeling, P. J.-Deane, J. A.-McFadden, G. I. (1998): The phylogenetic position of alpha- and beta-tubulins from the *Chlorarachnion* host and *Cercomonas* (Cercozoa). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45: 561-570.
- Kövics, G. J. (2004): New observations on etiology of pea *Ascochyta-Phoma* disease complex and α -esterase isozymes of *Phoma pinodella*. (Újabb megfigyelések a borsó ragya betegségkomplex etiológiája és a *Phoma pinodella* faj összehasonlító α -észteráz izozimjeinek vizsgálatában.) [In: Pépó, 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.
- Lutzoni, F.-Vilgalys, R. (1995): Integration of morphological and molecular data sets in estimating fungal phylogenies. *Canadian Journal of Botany*, 73: S649-659.
- Mages, W.-Cresnar, B.-Harper, J. F.-Brüderlein, M.-Schmitt, R. (1995): *Volvox carteri* alpha-2-tubulin-encoding and beta-2-tubulin-encoding genes: regulatory signals and transcription. *Gene*, 160: 47-54.
- 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.

- Moncalvo, J. M.-Wang, H. H.-Hseu, R. S. (1995): Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 87: 223-238.
- 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. II. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *Emblnew. News*, 4: 14.
- Nicholson, M. S. (1995): Restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA for mapping and phylogenetic inference of *Lentinula* species. Ph.D. Thesis, Pennsylvania State University, Dept. of Plant Pathology, 109.
- Noordeloos, M. E.-Gruyter, J. de-van Eijk, G. W.-Roeijmans, 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.
- Page, R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Pine, E. M.-Hibbett, D. S.-Donoghue, M. J. (1999): Phylogenetic relationships of cantharelloid and clavarioid Homobasidiomycetes based on mitochondrial and nuclear rDNA sequences. *Mycologia*, 91: 944-963.
- Posada, D.-Grandall, K. A. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14.9: 817-818.
- Roger, A. J.-Sandblom, O.-Doolittle, W. F.-Philippe, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 218-233.
- 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.
- Schutze, J.-Kraske, A.-Custodio, M. R.-Efremova, S. M.-Muller, I. M.-Muller, W. E. G. (1999): Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. *Proceedings of the Royal Society London. B* 266: 63-73.
- Swofford, D. L. (2002): PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 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.
- Thon, M. R.-Royse, D. J. (1999): Evidence for two independent lineages of shiitake of the Americas (*Lentinula boryana*) based on rDNA and β -tubulin genes sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13: 520-524.
- 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 β -tubulin sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 541-557.
- Wang, D. Y. C.-Kumar, S.-Hedges, S. B. (1999): Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings of the Royal Society London, B* 266: 163-171.
- 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. A.-Gelfand, D. H.-Sninsky, J. J.-White, T. J. (Eds.) Academic Press, New York. 315-322.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>