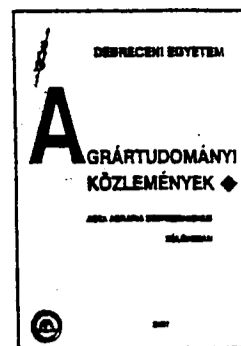


Phoma fajok filogenetikai vizsgálata

Irinyi László – Kövics György – Sándor Erzsébet

Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
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 több standard táptalajon megfigyelhető morfológiai bélyeg 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 faktorra (*tefl*) esett, melynek intron régiója az rDNS-ben található (Internal Transcribed Spacer=ITS) szekvenciák mellett az egyik leggyakrabban alkalmazott alternatív filogenetikai marker. A *tefl* szekvencia által kódolt fehérje (EF-1 α) az evolúció során konzervatív, minden sejtben megtalálható, a fehérjeszintézisben kulcsfontosságú protein.

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a *tefl* szekvencia rendelkezik azon tulajdonságokkal, amelyek alkalmassá teszik a fajok belüli és a fajok közötti filogenetikai kapcsolatok meghatározására.

Vizsgálatunk során 11 *Phoma* faj 12 izolátumából izoláltunk genomi DNS-t, majd két specifikus primerrel (EF1-728F és EF1-986R) amplifikáltuk a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó szakaszát, és meghatároztuk azok szekvenciáját. A fajok filogenetikai elemzését *tefl* szekvenciák parsimony-típusú elemzésével végeztük a PAUP*4.0b program alkalmazásával. A *tefl* szekvenciák alapján az egyes *Phoma* fajok jól elkülöníthetők egymástól, ami bizonyítja, hogy a *tefl* szekvencia a *Phoma* fajoknál is alkalmas molekuláris alapon történő filogenetikai rendszerezésre. Az elemzés során kapott filogenetikai törzsfák azonban nem minden esetben mutatott egyezést a morfológia bélyegeken alapuló *Phoma* taxonokkal. A *tefl* szekvencia alapján a *Phoma* fajok egyértelműen elkülönülnek a közeli rokon *Ascochyta* fajoktól is.

Kulcsszavak: *Phoma*, ITS régió, translációs elongációs faktor, filogenetika

SUMMARY

The cosmopolitan *Phoma* genus contains mainly phytopathogenic, opportunistic parasites, and saprophyte fungal species. Up to now, the characterization of *Phoma* species and other taxa of *Phoma* has 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 tried to find molecular markers which can be used as phylogenetics markers in the molecular based classification in the *Phoma* genus.

We employed a part of the translation elongation factor 1 subunit alpha (EF-1 α =*tefl*) containing both introns and exons 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. Twelve different *Phoma* species sequences were analysed together with the closely related *Ascochyta* ones. The constructed phylogenetic trees, based on *tefl* and ITS sequences, do not support the traditional *Phoma* sections based on morphological characterization. However, we managed to distinguish between the *Phoma* strains and *Ascochyta* species by comparing their *tefl* sequences through parsimony analysis. We proved that a *tefl* can be a useful phylogenetic marker to resolve phylogenetic relationships at species level in *Phoma* genus.

Both parsimony sequence analyses confirmed that the *Phyllosticta sojicola* species is identical to the *Phoma exigua* var. *exigua* species as Kövics et al. (1999) claimed. However, the evolutionary distance by ITS sequences within *Phoma* species is too small to get well based consequences for the phylogenetic relationships of *Phoma* genus.

Further investigations would be necessary to clarify whether the *tefl* and ITS sequences as phylogenetic molecular markers are well suited for the classification of *Phoma* species.

Keywords: *Phoma*, ITS sequences, translation elongation factor, phylogenetics

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 bélyegekkal, az élettani és biokémiai funkciókon át egészen a legmodernebbnek tekintett nukleinsav szekvenciák összehasonlító elemzéséig.

A gombataxonómiában jelenleg 3 elfogadott faj fogalom van elterjedve: a morfológiai, a biológiai, és a filogenetikai. A morfológiai faj fogalom az egyes gombafajok morfológiai megjelenését, bélyegeit veszi alapul, és ennek alapján rendszerezi őket. A biológiai faj fogalom szerint azon populációk tartoznak egy fajba, amelyek egymással szexuális úton szaporodási közösséget alkotnak (Mayr, 1940). A biológiai faj fogalom azonban csak korlátozva használható a gombák taxonjaira, mivel a gombák mintegy 20%-a nem rendelkezik meiosporával, azaz szexuális úton szaporodni nem képesek (Reynolds és Taylor, 1993). Ennek ellenére nagyon sok aszexuálisan szaporodó gombafaj, beleértve a *Phoma* genus tagjait is, meglepően nagy genetikai variabilitással rendelkezik (Khon, 1995; Talhinhas et al., 2002).

A legújabb, *filogenetikai faj* fogalom bizonyos nukleinsav szekvenciák változatosságát (DNS polimorfizmus) alapul véve próbálja meghatározni a különbségeket vagy azonosságokat az izolátumok között. Harrington és Rizzo (1999) szerint filogenetikai szempontból azonos fajnak tekintendő a populáció azon legkisebb egysége, amely bizonyíthatóan egy közös őstől származik, és valamilyen egyedi, jól diagnosztizálható fenotípusos jelleggel rendelkezik.

A gombafajok többségének rendszerezése egészen napjainkig a régebbi, tradicionálisnak tekintett morfológiai alapon, esetenként a *biológiai faj* kategória alapján történt. A morfológiai alapú faj meghatározásnak azonban gyakori gyengesége, hogy a morfológiai alapon egy fajba sorolt izolátumokról a genetikai vizsgálatok alapján bebizonyosodik, hogy valójában nem egy fajba tartoznak. Mivel a *Phoma* fajok többsége nem szaporodik ivaros úton, csak ivartalanul, ezért a *biológiai faj* fogalom nem alkalmazható erre a genusra. A *morfológia faj* fogalom viszont, a fentebb említett okok miatt nem ad mindig megbízható eredményt.

A molekuláris biológia rohamos fejlődésének köszönhetően elérhetővé válik a taxonómusok számára a filogenetikai összefüggések feltárása. Taylor et al. (2000) szerint a filogenetikai módszerek hamarosan széles körben elterjedt és népszerűvé válnak a gombataxonómiával foglalkozó mikológusok körében, mivel egyaránt alkalmazható ivaros és ivartalanul szaporodó fajokra is.

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.

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 (Kövecses és Gruyter, 1995).

A későbbiek során azonban a fehérje polimorfizmus profil meghatározásokat egyre inkább felváltották a DNS polimorfizmus vizsgálatok a filogenetikai céllal történő elemzések során.

A DNS polimorfizmusnak, amely egy adott gén (marker) nukleinsav sorrendjének változatosságán alapszik, három nagy előnye van a fehérje polimorfizmussal szemben. Az első, hogy a szekvencia változás már az első szinten, a DNS szintjén kimutatható. A második előny, hogy DNS szinten sokkal nagyobb valószínűséggel történnek evolúciós változások, (amelyek nem biztos, hogy fehérje szinten is megmutatkoznak), és végül ehhez kapcsolódik a harmadik előny is, hogy ezen változások nincsenek szelekciós nyomásnak kitéve, hacsak nem befolyásolja jelentősen az egyed

fenotípusát, így azok hosszabb távon képesek fennmaradni a genomban.

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

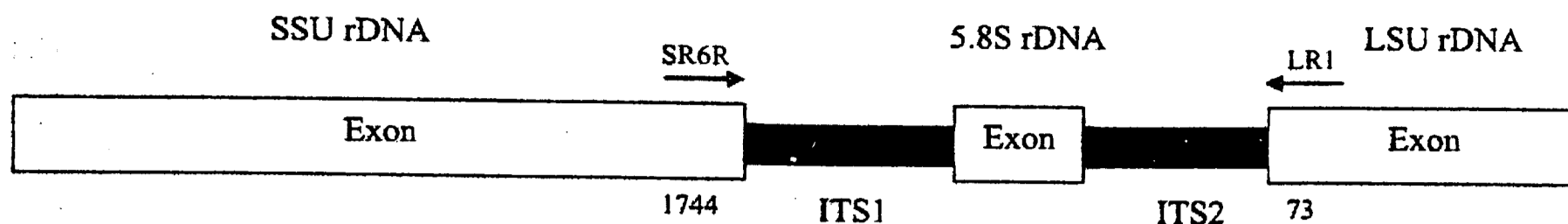
A filogenetikai célú szekvencia összehasonlítás nagyrészt olyan genom szakaszok vizsgálatán alapul, amelyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak maradnak az evolúció során, mint pl. a riboszómális géneket kódoló szekvenciák. Ezek közül nagyon sok tudományos munka alapszik az úgynevezett ITS (Internal Transcribed Spacer) régió vizsgálatán, annak köszönhetően, hogy ennek a régióknak a nukleinsav sorrendjén, amely nagy variabilitást mutat más régiókhoz képest, így alkalmas mind a fajon 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 alapult. A molekuláris biológiában újabb és újabb géneket (markereket) találnak, amelyek tulajdonságaikból adódóan alkalmasak lehetnek filogenetikai kapcsolatok elemzésére.

Vizsgálatunkban az ITS régió mellett a más élőlény csoportok mellett a gombáknál is eredményesen használt transzlációs elongációs faktort kódoló gén (*tef1*) nagy intronját tartalmazó szakaszát használtuk a *Phoma* fajok közötti filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára.

Filogenetikai kapcsolatok feltárására az egyik leggyakrabban használt molekuláris markerek a riboszómális géneket kódoló szekvenciák (rDNS) (Avisé, 2004). Ezek közül is különösen azok, amelyek gyakorlatilag azonos szekvenciájú tandem másolatként vannak jelen a genomban. Minden egyes másolat rendelkezik kódoló és nem kódoló régiókkal. A kódoló régiókhoz tartoznak a 18S, 5.8S, és 28S alegységeket kódoló gének (Gerbi, 1985), amelyek sokkal kevésbé változékonyak, mint a nem kódoló szakaszok. Ez utóbbiak lehetnek átírtak, mint az Internal Transcribed Spacer 1 és 2, valamint olyan régiók, amelyek nem íródnak át (Intergenic Spacer 1 és 2). Mivel a kódoló régiók evolúciósan erősen konzerváltak, az évmilliók alatt alig változott szakaszok, ezért főleg nagyobb taxonok rokonsági viszonyainak megállapítására használják (Hillis és Dixon, 1991). A két ITS régiót, evolúciós mércével mérve viszonylag gyorsan változó tulajdonságaiból adódóan, többségében alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok vizsgálatánál használják, mint például közel rokon fajok vagy populációk egymástól való elkülönítésére gombáknál, növényeknél és állatoknál egyaránt (Baldwin, 1992; Schlötterer et al., 1994; Mai és Coleman, 1997; Weekers et al., 2001; Oliverio et al., 2002; Chen et al., 2000, 2002).

Vizsgálatunkhoz az rDNS régió egy olyan szakaszát választottuk, amely tartalmazza a ITS 1 és 2, valamint az 5,8 rDNS egy részét (1. ábra).

1. ábra: az ITS régió sematikus vázlata, valamint a PCR reakcióban használt primerek helyzete



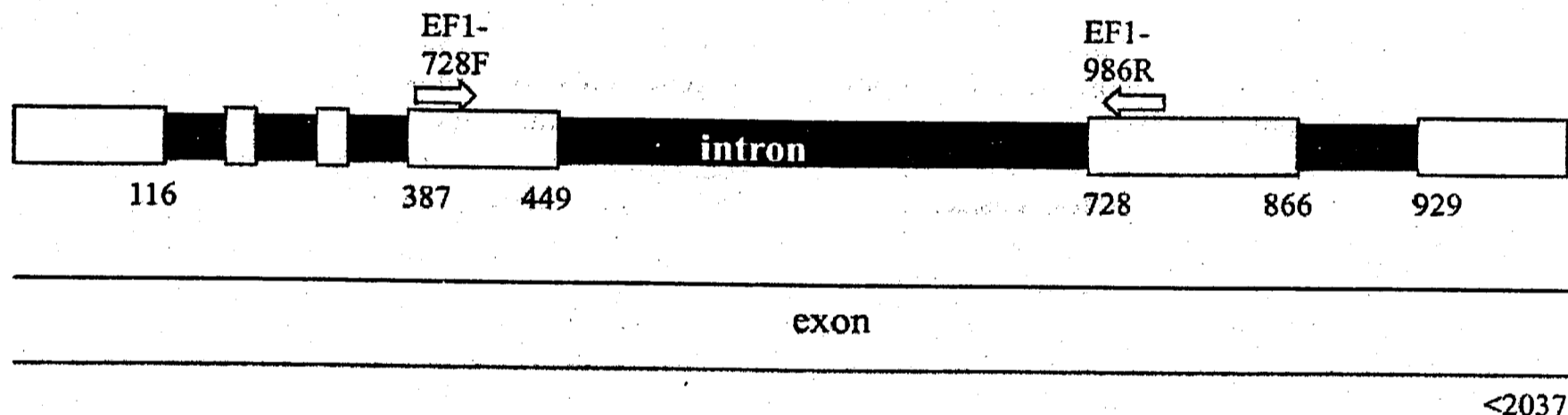
Forrás: White et al., 1990

 Figure 1: Schematic structure of ITS region in *Phoma* spp. and location of primers for phylogenetic analysis

A „translation elongation factor 1 subunit alpha” (EF-1 α) fehérje a sejten belül a citoszólban található. Eukariótáknál és Archaea baktériumoknál a fehérjeszintézis folyamatában elsődleges funkciója, hogy katalizálja a GTP függő aminoacil-tRNS komplex felbomlását (Moldave, 1985). Az EF-1 α fehérje, és így a fehérjét kódoló gén is erősen konzervált az élővilágban, ami alkalmassá teszi a filogenetikai vizsgálatokra (Roger et al., 1999). A fehérjét kódoló *tef1* 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 fajon 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 *tef1* gén rövidebb, mint más filogenetikai markerként használt gének. Mintegy 2 kb hosszúságú, intront és exont egyaránt tartalmazó szakasz. Filogenetikai vizsgálatunkhoz a *tef1* gén nagy intronját tartalmazó fragmentjét választottuk (2. ábra).

Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az ITS régió valamint a EF-1 α fehérjét kódoló *tef1* gén alkalmas-e rendszertani vizsgálatokra a *Phoma* genusban?

 2. ábra: *tef1* gén sematikus vázlata, valamint a PCR reakcióban használt primerek helyzete


Forrás: Druzhinina és Kubicek, 2005

 Figure 2: Schematic structure of *tef1* gene in *Phoma* spp. and location of primers for phylogenetic analyses (Druzhinina and Kubicek, 2005)

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkban a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Tanszékén található törzsgyűjteményből 11 *Phoma* faj 12 izolátumát vizsgáltunk (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 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), míg a *tef1* fragment

amplifikálásához az EF1-728F és EF1-986R primerpárt használtuk (Druzhinina és Kubicek, 2005). 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, parsimony-típusú analízist végezve, heurisztikus keresést alkalmazva, ami a felrajzolható törzsfák közül megkeresi a legkevesebb bázisváltozást tükrözőt. A törzsfák készítésében külső csoportként további fajok *tef1* (2. táblázat) és ITS (3. táblázat) szekvenciáit is bevontuk. A törzsfák készítéséhez a TreeView programot használtuk. A felrajzolt törzsfát bootstrap analízissel (1000 ismétlés) ellenőriztük.

A kísérletbe bevont *Phoma* fajok listája

Fajnév(1)	Izolátum kód(2)		Gazdanövény(5)
	Saját(3)	Eredeti(4)	
<i>Phoma eupyrena</i>	D/058	CBS 375.91	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Phoma destructiva</i>	D/033	?	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Phoma pinodella</i>	D/035	D/035	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma foveata</i>	D/048	PD 76/1021	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Phoma herbarum</i>	D/143	MTCC 2319	?
<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>linicola</i>	D/071	PD 86/73	<i>Linum usitatissimum</i>
<i>Phoma glomerata</i>	D/034	D/034	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma multirostrata</i>	D/044	PD 77/508	<i>Phylodendron</i> sp.
<i>Phoma plurivora</i>	D/072	PD 75/907	<i>Medicago sativa</i>
<i>Phyllosticta sojicola</i> (= <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> ?)	D/050	CBS 301.39	<i>Glycine max</i>

 Table 1: Isolates of *Phoma* species

species(1), isolate number(2), our collection(3), original(4), host of origin(5)

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 (EF1-728F és EF1-986R) egy 280-290 bp nagyságú, a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó szakasz amplifikálódott mind a 12 izolátum esetében. A PCR reakcióban melléktermék nem képződött, amely a primerek nagyfokú specifikusságát bizonyítja. A PCR reakció után az felszaporodott fragmentek szekvenálási eredményei alapján az elemzést parsimony-típusú analízissel, a PAUP*4.0b program (bootstrap=1000) alkalmazásával végeztük el. A filogenetikai törzsfák készítésében további *Ascochyta* és *Phoma* fajok *tefl* szekvenciáit is bevontuk (2. táblázat), valamint külső csoportként a *Phoma* fajoktól két távolabbi *Ascomycota* faj, a *Claviceps sorghi* és a *Leptosphaerulina trifolii* *tefl* szekvenciáit használtuk.

A *tefl* szekvencia elemzésével kapott törzsfák alapján (3. ábra) a vizsgált *Phoma* fajok egyértelműen elkülönültek a közel rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól. 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, ez a molekuláris bélyeg további segítséget nyújthat a hovatartozás egyértelmű megállapításához.

A *tefl* fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfakészítésbe külső csoportként bevont fajok listája, valamint a *tefl* szekvenciájuknak 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 és mtsai, 1997)	AF1	DQ386492.1
<i>Claviceps sorghi</i>	?	AY960837.1
<i>Claviceps sorghi</i>	?	AY960836.1
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831542.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831545.1

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

 Table 2: Species involved in the phylogenetic analyses and the accession number of their *tefl* fragments

species(1), isolate number(2), accession number(3)

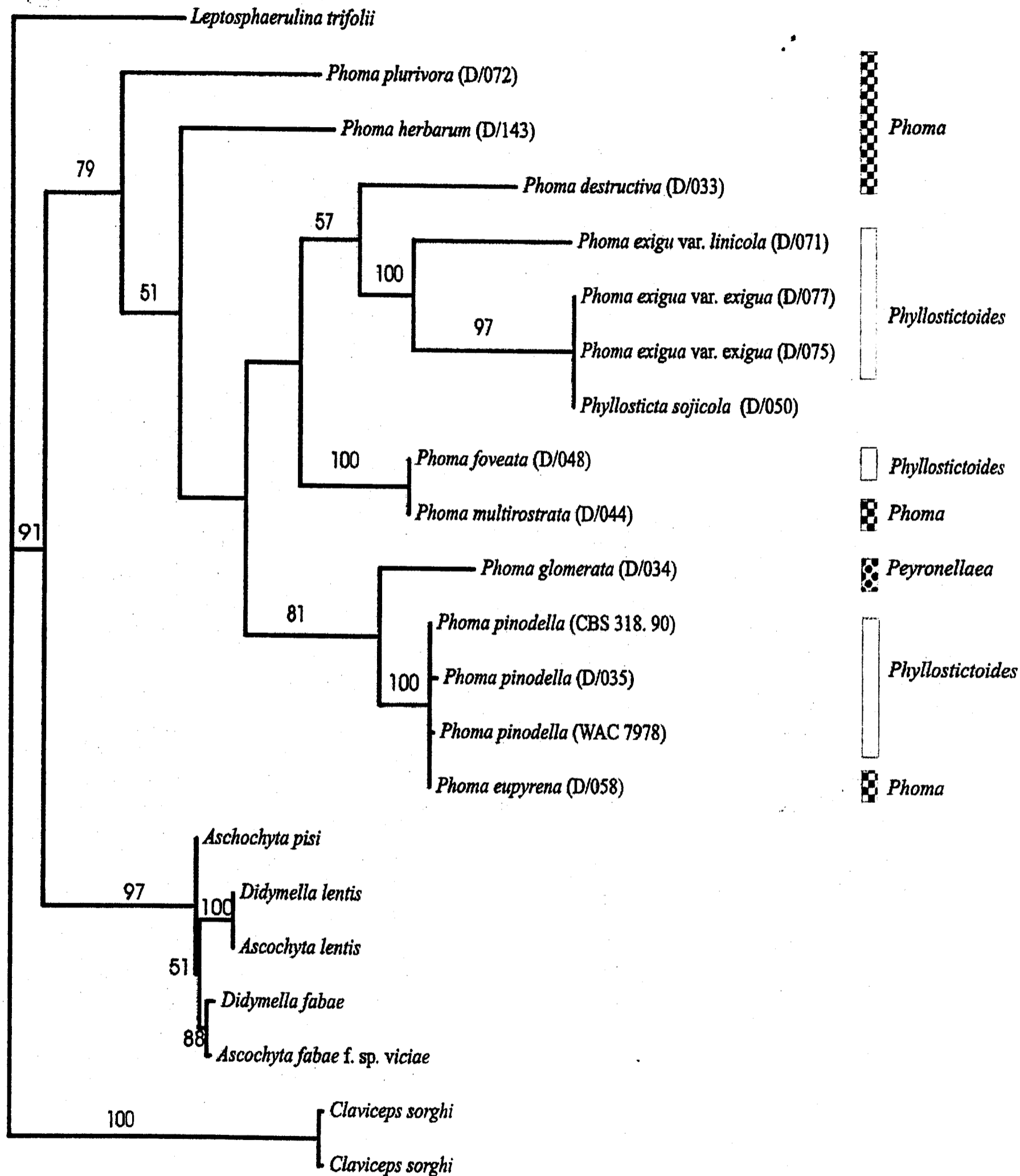
A *Phoma* fajok egy része (*P. plurivora*, *P. herbarum*, *P. destructiva*, *P. glomerata*) egyértelműen elkülöníthetők a *tefl* szekvencia segítségével a többi vizsgált *Phoma* fajtól. Más részük fajcsoportot alkot a *tefl* szekvenciák alapján. Nem különíthetők el egymástól a *Phoma foveata* és *Phoma multirostrata*, valamint a *Phoma pinodella* és *Phoma eupyrena* fajok sem. A több izolátummal is képviselt fajok mind egy csoportba kerültek az elemzés során, ami megerősíti a *tefl* szekvencia alkalmasságát a *Phoma* fajok elkülönítésére.

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.

Az egyes csoportok nem mutatnak egyezést a morfológia bélyegeken alapuló *Phoma* taxonokkal (Boerema et al., 2004) (3. ábra).

3. ábra: A *tefl* szekvenciák parsimony elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá



Megjegyzés: A vonalakra írt számok az elágazás valószínűségét jelölik, százalékban, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptunk. Az 50%-nál kisebb valószínűségű elágazások értékeit nem tüntettük fel. Jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik.(1)

Figure 3: Phylogenetic relationships of *Phoma* strains inferred by the parsimony analysis of ITS sequences. The numbers above the lines represent the bootstrap (bootstrap=1000) values. The columns on the right side represent the *Phoma* section based on morphological characterization.(1)

A DNS szekvencia analízise a *Phoma*-k 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 et al., 2003), illetve a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas et al., 2005). Vizsgálataink alapján a transzkripció elongációs faktor 1 (*tefl*) nagy intron régióját tartalmazó DNS szakasz megfelelően használható a *Phoma* fajok elkülönítésére a közeli rokon *Ascochyta* fajoktól.

A *tefl* szekvencia vizsgálata alapján az összes *Phoma* egyetlen, a közeli rokon *Ascochyta* genus megvizsgált fajaitól elkülönülő csoportot alkot. Ez a *Phoma* genus monofiletikus eredetét bizonyítja.

A *tefl* szekvencia az analizált 11 *Phoma* faj 14 izolátumának összehasonlító elemzése alapján alkalmasnak látszik a *Phoma* fajok egy részének egymástól való elkülönítésére. A *tefl* szekvenciák alapján egymástól el nem különíthető fajok esetében (*Phoma pinodella* és *Phoma eupyrena*) további variábilis szekvenciák vizsgálata szükséges.

ITS fragment

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

Az ITS fragment filogenetikai analíziséhez további *Phoma*, *Ascochyta*, *Leptosphaeria* és *Didymella* fajokat is bevontunk, amelyeknek az ITS szekvenciáit a NCBI által üzemeltetett GenBank-ból töltöttük le (3. táblázat).

Az ITS szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák a 4. ábrán látható.

A különbség *Phoma* és *Ascochyta*, *Leptosphaeria* és *Didymella* fajok között nem volt jelentős, mindössze csak 23 bázishelyet tekintett informatívnak a program a parsimony elemzés során. Valamint bootstrap elemzést követően csak 3 klaszternek volt 80%-nál nagyobb a valószínűsége.

Az ITS szekvencia parsimony elemzése alapján is a *Phyllosticta sojicola* a *Phoma exigua* csoportba került csakúgy, mint a *tefl* szekvencia alapján. A *Phoma foveta* és *Phoma multirostrata* a *tefl* szekvenciához hasonlóan az ITS szekvencia alapján is egy csoportba került.

A továbbiakban az ITS szekvenciát egyéb módszerrel szükséges elemezni, mint például a MEGA vagy maximum likelihood módszer, amely a parsimony analízisnél megbízhatóbb törzsfát eredményezhet.

3. táblázat

Az ITS fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfakészítésbe bevont fajok listája, valamint az ITS szekvenciájuknak 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> var. <i>linicola</i>	CBS 113.28	AF268187.1
<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>	CBS 318.90	AY831562.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831556.1
<i>Phoma glomerata</i>	?	AF126816.1
<i>Phoma glomerata</i>	?	AY618248.1
<i>Phoma glomerata</i>	?	AY183371.1
<i>Phoma eupyrena</i>	Gr61	AJ890436.1
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	WAC 6693	AY831558.1
<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

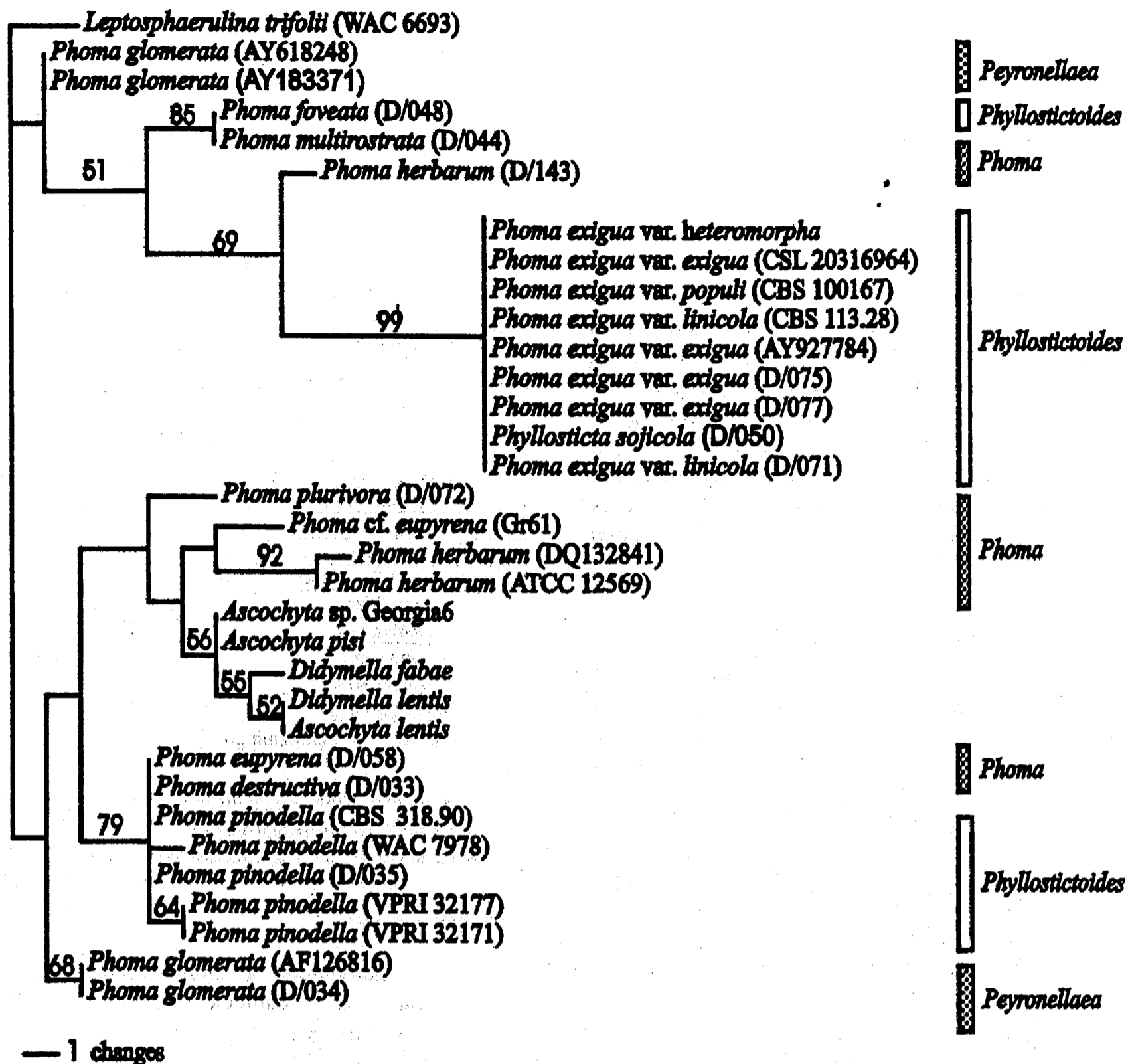
Forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

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

ÖSSZEGRZÉS

A *tefl* szekvencia, a többi fonalas gombához (Druzhinina és Kubicek, 2005) hasonlóan alkalmasnak látszik a *Phoma* fajok filogenetikai elemzésére. Az ITS szekvenciák parsimony módszerrel történő filogenetikai elemzése nem ad megbízható eredményt, amelynek egyik oka az lehet, hogy a szekvencia kevés variábilis bázishelyet tartalmaz. Ez egyben azt is jelentheti, hogy az evolúciós távolság az ITS szekvencia alapján az egyes *Phoma* fajok között túl kicsi ahhoz, hogy rokonsági kapcsolatokat állapítsunk meg a *Phoma* nemzetségben. Más nemzetségekhez hasonlóan további szekvenciák bevonása szükséges, mint pl. az actin vagy tubulin a filogenetikai elemzésekbe. Mindkét szekvencia elemzés megerősítette azt a korábbi feltételezést (Kövics et al., 1999), hogy a *Phyllosticta sojicola* azonos a *Phoma exigua* var. *exigua* fajjal.

4. ábra: Az ITS szekvenciák parsimony elemzése alapján készített filogenetikai törzsfa



Megjegyzés: A vonalakra írt számok az elágazás valószínűségét jelölik, százalékban, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptunk. Az 50%-nál kisebb valószínűségű elágazások értékeit nem tüntettük fel. Jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik.(1)

Figure 4: Phylogenetic relationships of *Phoma* strains inferred by the parsimony analysis of ITS sequences. The numbers above the lines represent the bootstrap (bootstrap=1000) values. The columns on the right side represent the *Phoma* section based on morphological characterization.(1)

IRODALOM

- Avise, J.C. (2004): Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Underland, MA: Sinauer Associates
- Baldauf, S.L.-Doolittle, W.F. (1997): Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94. 12007-12012.
- Baldwin, B.G. (1992): Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Composite. Mol. Phylogenet. Evol. 1. 3-16.
- 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.-Gruyter, J. de-Noordeloos, M.E.-Hamers, M.E.C. (2004): *Phoma* identification manual. CABI Publishing. CAB International Wallingford, Oxfordshire, UK
- Chen, C.A.-Wallace, C.C.-Wolstenholme, J. (2002): Analysis of mitochondrial 12S rRNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals. Mol. Phylogenet. Evol. 23. 137-149.
- Chen, C.A.-Yu, J.K.-Wei, N.W. (2000): Strategies for amplification by polymerase chain reaction of the complete sequence of nuclear large subunit ribosomal RNA-encoding gene in corals. Mar. Biotechnol. 6. 558-570.
- Druzhinina, I.-Kubicek, C.P. (2005): Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species cluster? J. Zhejiang Univ. Sci. 6B (2). 100-112.

- Gerbi, S.A. (1985): Evolution of ribosomal DNA. pp. 419-517. In: Molecular evolutionary genetics. Macintyre, R.J. (Ed.) Plenum, New York
- Harrington, T.C.-Rizzo, D.M. (1999): Defining species in the fungi. pp. 43-70. In: Structure and Dynamics of Fungal Populations. Worrall, J.J. (Ed.) Kluwer Academic, Dordrecht
- Hillis, D.M.-Dixon, M.T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biol. 66. 411-453.
- 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 Dis. 81. 809-816.
- Khon, L.M. (1995): The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations. Canadian Journal of Botany 73. (Suppl. 1): S 1231-1240.
- Kövics, G.J.-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. Mycol. Res. 103. 8. 1065-1070.
- 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. Am. J. Bot. 91. 1446-1480.
- Mai, J.C.-Coleman, A.W. (1997): The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. J. Mol. Evol. 44. 258-271.
- Mayr, E. (1940): Systematics and the origin of species from a viewpoint of a zoologist. Columbia University Press, New York
- Mendes-Pereira, E.-Balesdent, M.H.-Brun, H.-Rouxel, T. (2003): Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. Mycol. Res. 107. 11. 1287-1304.
- Moldave, K. (1985): Eukaryotic protein synthesis. Annu. Rev. Biochem. 54. 1109-1149.
- Nicholas, K.B.-Nicholas, H.B. Jr.-Deerfield, D.W. II. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, Embnew. news 4. 14.
- Oliverio, M.-Cervelli, M.-Mariottini, P. (2002): ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoidea). Mol. Phylogenet. Evol. 25. 63-69.
- Reynolds, D.R.-Taylor, J.W. (1993): The fungal holomorph: An overview. pp. 15-25. In: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Reynolds, D.R.-Taylor, J.W. (Eds.) CAB International, Wallingford, UK
- Roger, A.J.-Sandblom, O.-Doolittle, W.F.-Philippe, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes. Mol. Biol. Evol. 16. 218-233.
- Schlötterer, C.-Hauser, M.-Haeseler, A.-von Tautz, D. (1994): Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 11. 513-522.
- Swofford, D.L. (2002): PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Talhinhas, P.-Sreenivasaprasad, S.-Neves-Martins, J.-Oliveira, H. (2002): Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. Phytopathology, 92. 986-996.
- 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 Genet. Biol. 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.
- Weekers, P.H.H.-Jonckheere, F.J. de-Dumont, H.J. (2001): Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representative of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent west European zone. Mol. Phylogenet. Evol. 20. 89-99.
- White, T.J.-Bruns, T.-Lee, S.-Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: PCR protocols. A guide to methods and applications. Innis, M.A.-Gelfand, D.H.-Sninsky, J.J.-White, T.J. (Eds.) Academic Press, New York
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>