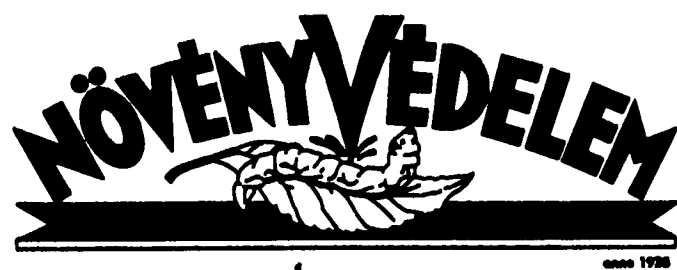


Pannon Egyetem  
Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar  
Keszthely  
Növényvédelmi Intézet



# XVIII. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum 2008.

kiadványa

Keszthely, 2008. január 30. - február 1.

# BAYESIAN MÓDSZER ALKALMAZÁSA A *PHOMA* TAXONOK FILOGENETIKAI VIZSGÁLATÁBAN

IRINYI LÁSZLÓ - KÖVICS GYÖRGY JÁNOS - SÁNDOR ERZSÉBET

Debreceni Egyetem, Agrártudományi és Műszaki Tudományok Centruma,  
Növényvédelmi Tanszék, Debrecen

## Összefoglaló

A filogenetikai törzsfák elkészítésére fehérje vagy nukleinsav szekvenciák alapján többféle módszer áll rendelkezésre, melyeket különböző programok segítségével végzünk. Az elemzés eredményeként egy olyan filogenetikai törzsfát kapunk, amely a feldolgozott adatok alapján rajzolja meg azt a törzsfát, melynek az elágazásai a legmegbízhatóbbak. A Bayesian megközelítés úgynevezett utólagos megközelítésen, utólagos valószínűségen (posterior probability) alapuló statisztikai módszer: egy esemény becsült valószínűséget azután adja meg, miután elvégezte a rendelkezésre álló adatok bizonyos elemzését.

Vizsgálatunk során 11 *Phoma* faj 24 izolátumát vizsgáltuk. A fajok *tefl*, ITS, illetve tubulin szekvenciáinak filogenetikai elemzését Bayesian analízissel végeztük MrBayes program alkalmazásával. A szekvenciák alapján az egyes *Phoma* taxonok jól elkülöníthetők egymástól, ami bizonyítja, hogy a szekvenciák, illetve a Bayesian elemzés a *Phoma* fajoknál is alkalmas molekuláris alapon történő filogenetikai elkülönítésre, rendszerezésre. Az elemzés során kapott filogenetikai törzsfá azonban nem minden esetben mutatott egyezést a morfológia bélyegeken alapuló *Phoma* taxonokkal.

Mindhárom szekvencia Bayesian módszerrel végzett filogenetikai 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.

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

Boerema és munkatársai (Boerema és mtsai, 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* mind *in vitro* körülmények között stabil rendszertani bélyegek alapján rendszerezni a *Phoma* fajokat, amelyeket standardizált körülmények között vizsgált telepjellemzőkkel egészítettek ki.

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

Napjainkban a filogenetikai törzsfa 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 transzlációs 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 több esetben.

Az utóbbi években a mikológusok egyre szélesebb körben alkalmazzák az rDNS szekvenciákban talált variabilitást a taxonok közötti rokonsági viszonyok elemzésére. 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 és mtsai, 1995; Lutzoni és Vilgalys, 1995; Moncalvo és mtsai, 1995; Nicholson, 1995; Hopple és Vilgalys, 1999; Pine és mtsai, 1999, Thon és Royse, 1999; Hibbett és Thorn, 2001; Binder és Hibbett, 2002). Az ITS szekvenciákat használták fel a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára (Mendes-Pereira és mtsai, 2003), illetve a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas és mtsai, 2005).

A transzlációs elongációs 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 fajon belüli rendszertani kapcsolatok felderítésére egyaránt alkalmas, mint azt Druzhinina és Kubicek (2005) is bizonyították *Trichoderma* fajoknál, illetve Roger és mtsai (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 és mtsai, 1999). A tubulint felépítő fehérjéket kódoló gének, különösképpen a  $\beta$ -tubulint kódoló gén, egyre nagyobb figyelmet kap különböző taxonok közötti (evolúciósan egymáshoz távol és egymáshoz közel lévő taxonok esetében egyaránt) az evolúciós rokonsági kapcsolatok elemzésében során (Keeling és Doolittle, 1996; Baldauf és mtsai, 2000). A gént alkalmazták már filogenetikai vizsgálatokra egysejtűeknél, állatoknál, növényeknél és gombáknál egyaránt (Mages és mtsai, 1995; Keeling és mtsai, 1998; Schutze és mtsai, 1999; Ayliffe és mtsai, 2001, Edgcomb és mtsai, 2001; Hansen és mtsai, 2004). Voigt és mtsai (2005) egyéb gének mellett a  $\beta$ -tubulin gént alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára is, az ITS szekvenciák mellett.

A szekvenciák filogenetikai elemzéseit Bayesian módszerrel végeztük. A Bayesian megközelítés a filogenetikában egy viszonylag új módszer, melyet még csak most kezd széles körben elterjedni. A módszer az úgynevezett utólagos megközelítésen, utólagos valószínűségen (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 becslésére. 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.

A filogenetikában használt Bayesian algoritmus (Rannala és Yang, 1996; Mau és Newton, 1997; Mau és mtsai, 1999) hasonlít a Maximum Likelihood módszerhez abban a tekintetben, hogy a felhasználónak itt is lehetősége adódik megválasztani a használni kívánt evolúciós modellt, valamint abban, hogy ez a módszer is azokat a törzsfákat keresi, amelyek a leginkább megfelelnek a választott evolúciós modellnek, illetve a kiindulási adathalmaznak (szekvencia összerendezés). Azonban, amíg a ML analízis egy törzsfát keres, a legvalószínűbbet, addig a Bayesian módszer a legvalószínűbb törzsfák egy halmazát keresi. Az ML azt a törzsfát keresi, amely maximalizálja a megfigyelt adatok valószínűségét, amelyek a törzsfát adták. A Bayesian módszer pedig azokat a törzsfákat keresi, amelyek maximalizálják azon törzsfák valószínűségét, amelyek az adatokat és az evolúciós modellt adták. Az optimális hipotézis az lesz, amely maximalizálja az utólagos valószínűséget. Egy hipotézis utólagos valószínűsége arányos a likelihood értéknek a hipotézis előzetes valószínűségével kapott szorzatával. A különböző hipotézisek előzetes valószínűsége a kutató meggyőződését tükrözi a hipotézisről mielőtt még látta volna az adatokat.

A Bayesian módszer nem csak sokkal gyorsabb mint az ML analízis de pontosabb is bizonyos szempontból, mivel lehetővé teszi a szekvenciaevolúció komplexebb modelljeinek az alkalmazását is. A módszer olyan modellek alkalmazását is lehetővé teszi, amelyek ML analízissel egyáltalán nem vagy csak nagyon nehezen kivitelezhetők. A módszer másik nagy előnye közt említhető, hogy az elemzés során nem csak egy törzsfát kapunk, hanem az egyes elágazások megbízhatóságára is kapunk egyfajta becslést, így már nem szükséges külön bootstrap elemzést végezni. A módszer talán egyetlen hátrányaként említhető, ami akár előnye is lehet, hogy a felhasználó maga dönti el, milyen hosszan akarja futtatni a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmust. Nyilvánvalóan célszerű egy közepes időintervallumot megadni, amikor is az eredmény már elég megbízható, ugyanakkor a számítás belátható időn belül befejeződik. Nincs pontos recept a helyes időtartam megválasztására, mivel az mintánként változik. Nem célszerű túl hosszú elemzést választani, mivel egy pont után a számítás megbízhatósága nem változik jelentősen.

Az elemzés során a végső eredmény nem függ egy vagy több speciális értéktől, mivel a módszer az összes lehetséges paramétert figyelembe veszi a számítás során. Amíg az ML által használt „hill-climbing” algoritmus a paraméterek számának a növekedésével egyre inkább megbízhatatlan, hiszen minden esetben a paraméter maximális értékét keresi addig az MCMC algoritmus nem próbálja megtalálni mindenegybes paraméternek a maximális értékét, azonban az összes paramétert figyelembe veszi. Az MCMC algoritmus a valószínűségek eloszlását közelíti meg.

A Bayesian módszert a gyorsasága, egyszerű kezelhetősége, valamint az ez idáig még megválaszolatlan kérdések tanulmányozásának a lehetősége predesztinálja arra, hogy rövid időn belül a legelterjedtebb filogenetikai módszerré váljon.

## **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 és mtsai (2004) által közreadott *Phoma* monográfia alapján.

1. táblázat: Az elemzésbe bevont *Phoma* fajok listája

Fajnév	Izolátum kód		Gazdanövény
	Saját	Eredeti	
<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>eigua</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>eigua</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>

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.<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 és mtsai, 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 and Donaldson, 1995) használtuk. A tisztított PCR termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany végezte.

A szekvenciákat a ClustalX (Thompson és mtsai, 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (Nicholas és mtsai, 1997) program segítségével

manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol szükséges volt. Ezt követően a filogenetikai analízishez a MrBayes (Huelsenbeck, 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 *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, 1966) programot használtuk.

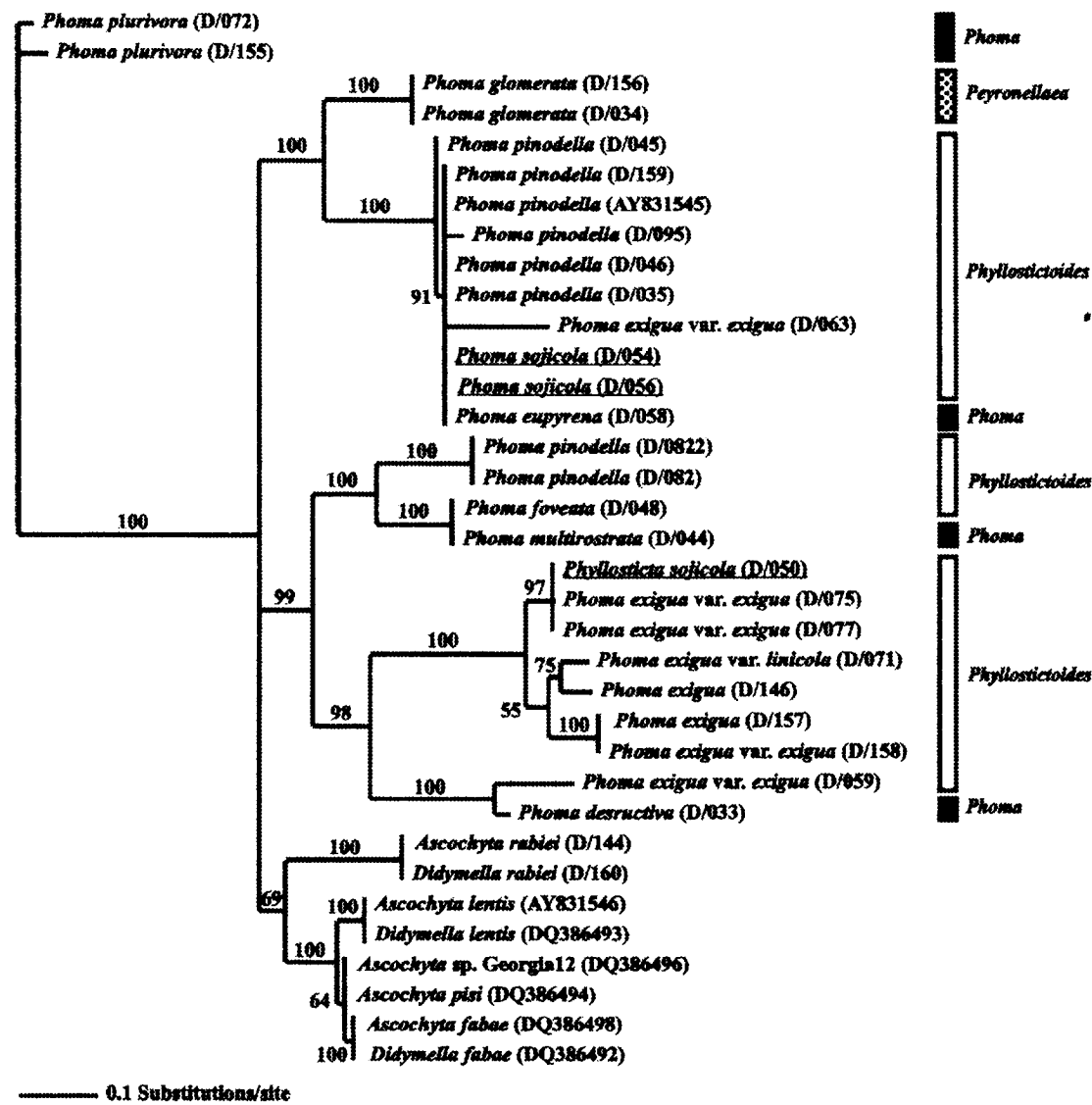
## Eredmények és megvitatásuk

A genomi DNS izolációját követően a PCR reakciókban a felhasznált primerekkel egy 280-290 bp hosszúságú, a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó szakasz, egy 600 bp hosszúságú ITS fragment és egy 300 bp hosszúságú tubulin szakasz szaporodott fel mindegyik izolátum esetében. A PCR reakciókban melléktermékek nem képződtek, amely a primerek nagyfokú specifikusságát bizonyítja. A fragmentek szekvencia sorrendje alapján a filogenetikai elemzést Bayesian módszerrel végeztük.

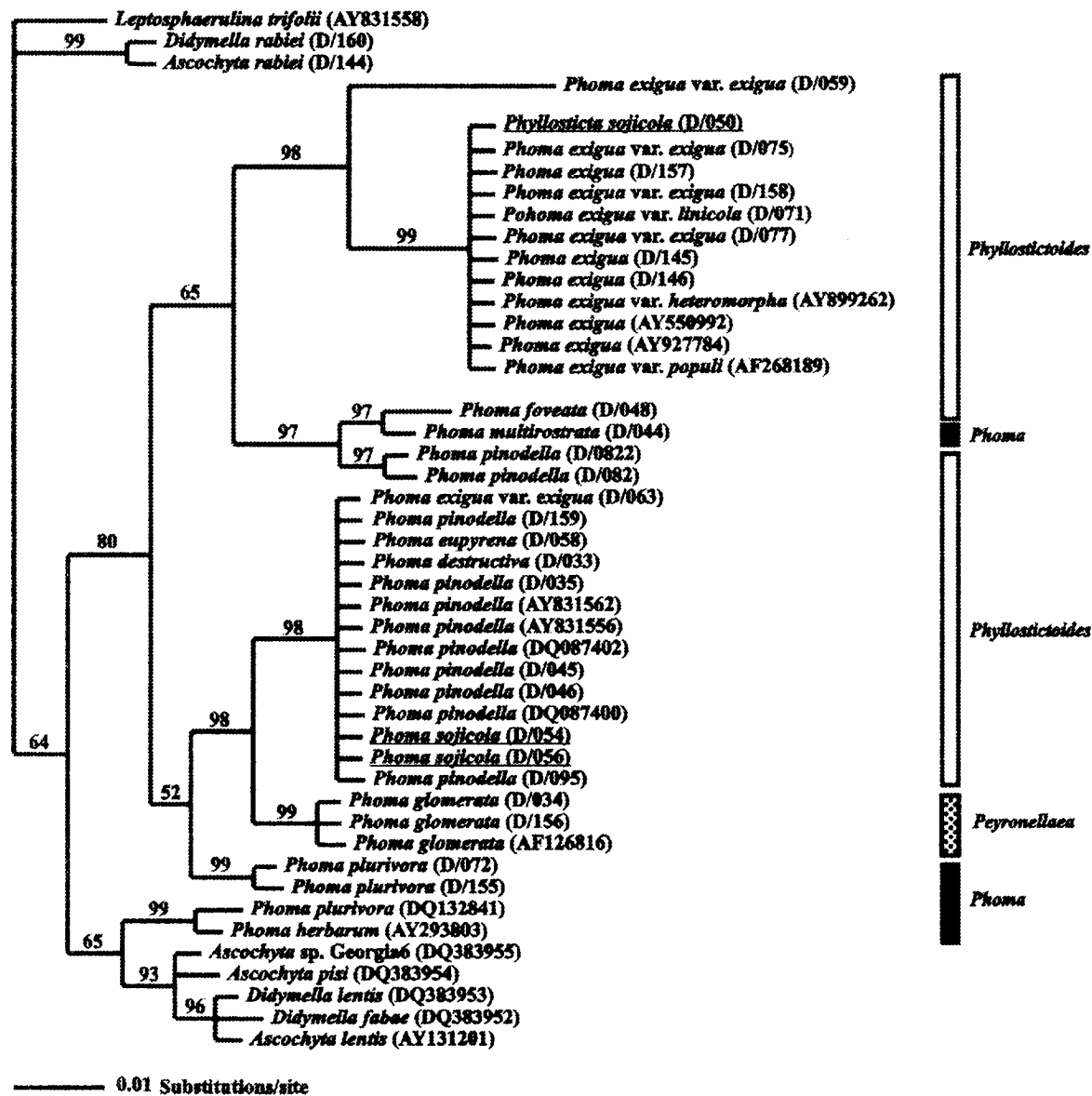
Az egyes szekvenciák által kapott filogenetikai törzsfák (1. ábra, 2. ábra, 3. ábra) alapján a vizsgált *Phoma* fajok egyértelműen elkülönülnek egymástól, illetve a közel rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól. Az egy fajhoz tartozó izolátumok (*Phoma pinodella* és *Phoma exigua*) egymástól jól elhatárolódó 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, ez a molekuláris bélyeg további segítséget nyújthat a hovatartozás egyértelmű megállapításához. Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) a *tefl*, ITS és tubulin szekvenciák alapján a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba került, ami alátámasztja Kövics és mtsai (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 megerősítheti azt a feltételezést, hogy a *Phoma sojicola* a *Phoma pinodella* egy a szóján előforduló patovarietása (Kövics, személyes közlés).

Mindhárom szekvencia Bayesian módszerrel végzett filogenetikai 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. A vizsgálatok alapján a Bayesian módszer alkalmasnak tűnik *Phoma* taxonok filogenetikai vizsgálatára. A módszer gyors, pontos és megbízható, valamint lehetővé teszi az evolúciós modellek megválasztását.

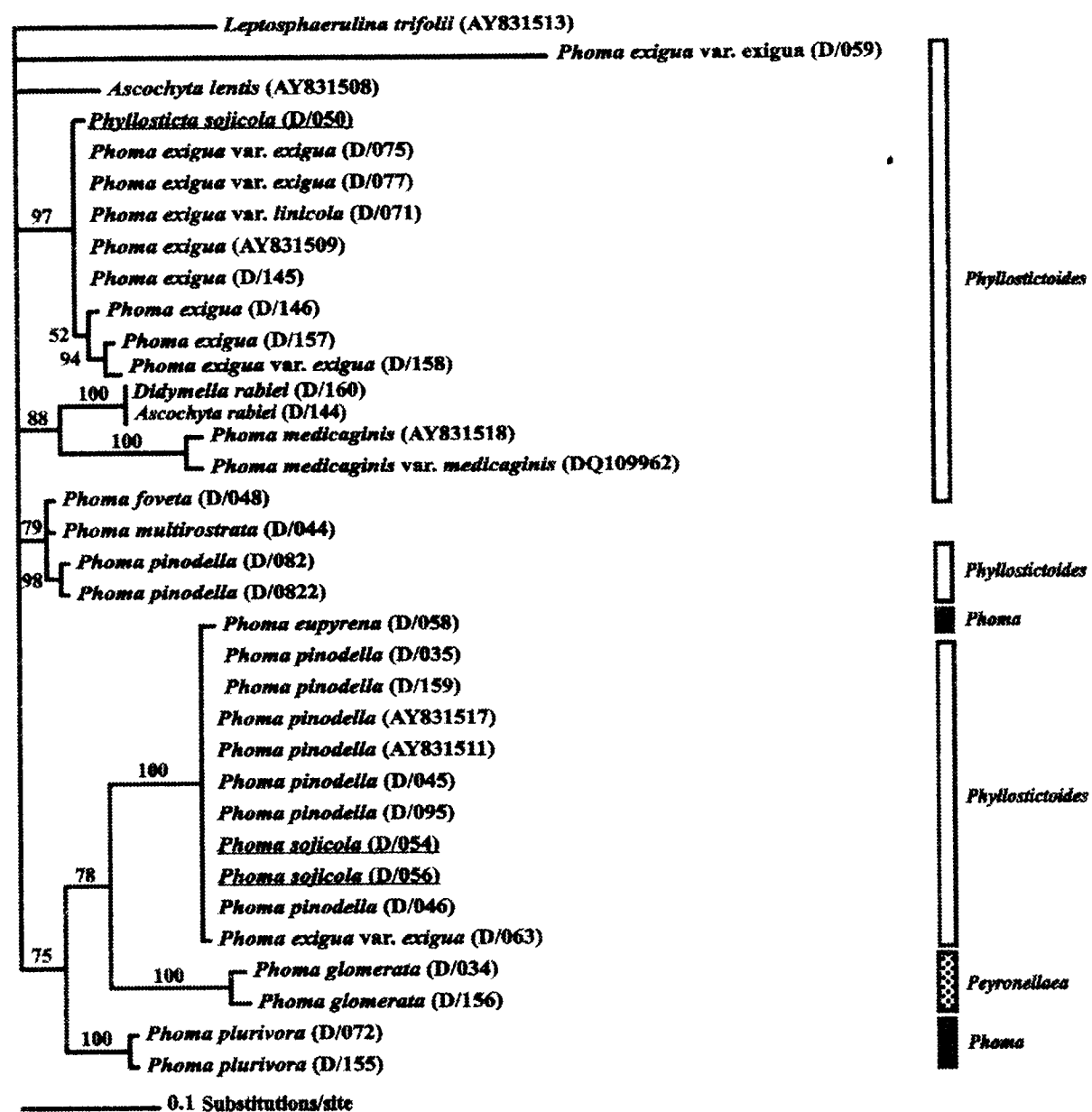




1. ábra: A *tef1* szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfa. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik. A vonalakra írt számok az egyes elágazások valószínűségeinek felelnek meg.



2. ábra: A ITS szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfa. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik. A vonalakra írt számok az egyes elágazások valószínűségeinek felelnek meg.



3. ábra: A tubulin szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik. A vonalakra írt számok az egyes elágazások valószínűségeinek felelnek meg.

### Bayesian approaches for phylogenetic studies among *Phoma* taxons

L. Irinyi - G.J. Kövics - E. Sándor

University of Debrecen, Centre for Agricultural Sciences and Engineering,  
Department of Plant Protection, Debrecen, Hungary

In phylogenetic there are several ways to construct to infer phylogenetic relationships. Bayesian inference for estimating phylogenetic trees have been proposed as one of the most suitable character based method. It is based on the notion of posterior probabilities: probabilities that are estimated after learning something about the date.

In this study we have tried to study phylogenetic relationships by Bayesian methods in the *Phoma* genus.

Twenty-four isolates of eleven different *Phoma* species were firstly characterised by morphologically, and then their *tefl*, ITS and tubulin sequences were sequenced and analysed by Bayesian methods carried out by MrBayes program.

According to phylogenetic trees inferred by Bayesian analysis, the different *Phoma* taxons are well separated proving that Bayesian inference is well suited for phylogenetic studies among *Phoma* species. However these trees do not support the traditional *Phoma* sections based on morphological characterization.

The Bayesian analyses of all three sequences confirmed that the *Phyllosticta sojicola* species is clustered with the *Phoma exigua* var. *exigua* group as Kövics et al. (1999) claimed and the *Phoma sojicola* is grouped with *Phoma pinodella* group. The experienced



molecular evidences initiate the demand of reclassification of formerly mentioned soybean pathogens.

## Irodalomjegyzék

- 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., 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.; BALDAUF, S.L. AND DOOLITTLE, W.F. (1997): Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12007-12012.; BALMAS, V., SCHERM, 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. AND 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.; 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,  $\beta$ -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: *The Mycota VII Part B, Systematics and Evolution*. Mclaughlin, D.J., Mclaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.) 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.; HUELSENBECK, J.P. (2000): MrBayes: Bayesian Inferences of Phylogeny (software). University of Rochester, NY.; 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., GRUYTER, J. DE, AND 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., 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.; 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.; MAU, B., NEWTON, M. (1997): Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *Journal of Computer and Graphics Statistical* 6: 122-131. MAU, B., NEWTON, M., LARGET, B. (1999): Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* 55: 1-12.; MENDES-PEREIRA, E., BALESSENT, M.-H., BRUN, H., ROUXEL, T. (2003): Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycol. Res.* 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.; NICHOLAS, K.B., NICHOLAS, H.B.JR., DEERFIELD, D.W. II. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *Embnew. 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 p.; 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: 817-818.; RANNALA, B., YANG, Z. H. (1996): Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304-311.; ROGER, A.J., SANDBLOM, O., DOOLITTLE, W.F., PHILIPPE, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 $\alpha$  as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 218-233.; SCHUTZE, J., KRASKO, 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.; 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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. 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.