

ارتباط فیلوژنتیک بین جدایه‌های ایرانی *Microsphaera* و
Erysiphe s. lat. براساس توالی بخش ITS دی آن آریبوزومی^۱

Phylogenetic relationships between Iranian isolates of *Microsphaera* and
Erysiphe s. lat. based on rDNA Internal Transcribed Spacers sequences

سید اکبر خداپرست^۲، قربانعلی حجارود و سوسومو تاکاماتسو
دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و
آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه میه، ژاپن

پذیرش ۱۳۸۲/۸/۱۸

دریافت ۱۳۸۱/۱۲/۴

چکیده

به منظور مطالعه روابط فیلوژنتیک بین جنس‌های *Microsphaera* و *Erysiphe s. lat.* توالی ناحیه ITS روی DNA ریبوزومی همراه با ناحیه 5.8S برای ۲۳ تاکسون به دست آمد. برای این مطالعه DNA کل از آسکوکارپ یا میسلیم با روش Chelax استخراج شد. سپس با استفاده از واکنش زنجیری پلی مرز ناحیه فوق دو بار به وسیله آغازگرهای ITS1، ITS5 و P3 تکثیر گردید و توالی یابی مستقیم ناحیه ITS با استفاده از توالی یاب Applied Biosystems 373A انجام گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که *Erysiphe sect. Erysiphe* و گونه‌های *Microsphaera* ارتباط فیلوژنتیک بسیار نزدیکی با هم دارند و در یک گروه قرار می‌گیرند. *E. sect. Galeopsidis* و *E. sect. Golovinomyces* که به دلیل تولید کنیدیوم‌های زنجیری به خوبی از *Erysiphe sect. Erysiphe* متمایز می‌شوند در دو

۱- بخشی از رساله دوره دکتری نگارنده اول با راهنمایی دکتر قربانعلی حجارود که به دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ارایه شده است.

۲- مسئول مکاتبه

گروه جداگانه قرار گرفتند. میزان تنوع ژنتیکی بین گونه‌های *Microsphaera* و *Erysiphe* sect. *Erysiphe* ۷۱٪-۲ درصد متغیر بود، در حالی که بین *Erysiphe* sect. *Erysiphe* و دو بخش دیگر این جنس تنوع ژنتیکی بالایی به میزان ۲۲/۴-۱۷/۶ درصد به دست آمد. علاوه بر این تنوع ژنتیکی بین *E. sect. Golovinomyces* و *E. sect. Galeopsidis* نیز بالا بوده (۱۸/۷-۱۷/۳) و مشابه تنوع ژنتیکی بین دو جنس دور از هم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سفیدک‌های سطحی، فیلوژنی، rDNA، *Microsphaera*، *Erysiphe*

مقدمه

جنس‌های *Erysiphe* s. lat. و *Microsphaera* بیمارگرهای مهم بسیاری از گیاهان زراعی هستند که به تیره Erysiphaceae (Ascomycota: Erysiphales) تعلق دارند. دوکاندول (DeCondole 1815) اولین قارچ شناسی بود که همه Erysiphaceae را داخل یک جنس مشخص به نام *Erysiphe* قرار داد. لویه (Léveillé 1851) این قارچ‌ها را با توجه به تعداد آسک در هر آسکوکارپ و شکل زواید آنها به هفت جنس تقسیم کرد. این دو صفت به طور عمومی مورد قبول واقع گردید و برای سالهای طولانی در تاکسونومی Erysiphaceae استفاده شد. بر این اساس دو جنس *Erysiphe* s. lat. و *Microsphaera* اساساً با توجه به شکل زواید از هم متمایز می‌شوند، به طوری که زواید در *Erysiphe* s. lat. میسلیومی و ساده یا با انشعابات نامنظم هستند، در حالی که زواید در *Microsphaera* دارای انشعابات دو شاخه‌ای می‌باشند. اگر گونه‌هایی با بیشترین تفاوت در شکل زواید در نظر گرفته شوند، می‌توان به سهولت این جنس‌ها را از هم تفکیک کرد و تشخیص داد، اما وجود گونه‌هایی که به لحاظ شکل زواید حالت حد وسط بین *Erysiphe* و *Microsphaera* دارند حدود و ثغور این دو جنس را در هم می‌آمیزند و در بسیاری از موارد تشخیص را مشکل می‌نمایند. طی دهه گذشته بیولوژی مولکولی و بویژه توالی‌یابی rDNA به طور وسیع برای شناسایی، درک فیلوژنی و کمک به حل مسایل تاکسونومیک در قارچ‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.

این نوع مطالعات مولکولی به تدریج از سال ۱۹۹۰ در سفیدک‌های سطحی نیز مورد استقبال قرار گرفت. استفاده از نقوش ایزوزایمی، روش RFLP، روش RAPD و توالی‌یابی DNA ریبوزومی از جمله روش‌هایی هستند که در سالهای اخیر در این قارچ‌ها استفاده شده‌اند. (Gabriel & Ellingboe 1982, Torp & Andersen 1982, O'Dell et al. 1989 Delye et al. 1997, Zeller & Levy 1995, Saenz et al. 1994, Hirata & Takamatsu 1996, Takamatsu et al. 1998 & 1999, Saenz & Taylor 1999, Mori et al. 2000).

به نظر می‌رسد اولین تحقیق فیلوژنتیک بر اساس توالی یابی rDNA توسط سینز و همکاران (۱۹۹۴) انجام شده است. در این مطالعه که به منظور درک جایگاه راسته Erysiphales میان سایر راسته‌های آسکومیست‌ها صورت گرفته است حدود ۱۷۰۰ باز از واحد کوچک rDNA در دو جدایه از *Blumeria graminis* مشخص شده است و در یک تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک با ۱۸ آسکومیست دیگر مقایسه شده است. براساس مطالعات هیراتا و تاکاماتسو (۱۹۹۶) توالی بازهای ناحیه ITS (Internal Transcribed Spacers) دارای تنوع قابل ملاحظه‌ای است و لذا استفاده از توالی بازهای ناحیه ITS برای مقایسه‌های فیلوژنتیک بین گونه‌های نزدیک، داخل گونه و یا بین جنس‌های نزدیک به هم مفید تشخیص داده شده است. تاکاماتسو و همکاران (۱۹۹۹) روابط فیلوژنتیکی *Erysiphe* و *Microsphaera* sect. *Erysiphe* Braun را بررسی کرده‌اند. بر اساس این مطالعه ارتباط فیلوژنتیک بسیار نزدیکی بین *Erysiphe* sect. *Erysiphe* و *Microsphaera* دیده شده است. انتشار این مقاله ارزش تاکسونومیکی برخی از صفات نظیر شکل زواید روی آسکوکارپ را به طور جدی مورد شک و تردید قرار داد. سینز و تیلور (۱۹۹۹) کاری مشابه با تاکاماتسو در آمریکا انجام دادند و نتایج تقریباً مشابهی گرفته‌اند. با این وجود به نظر می‌رسد هنوز مطالعات بیشتری جهت شناخت روابط فیلوژنتیک بین این دو جنس لازم است. به همین دلیل در این مطالعه روابط فیلوژنتیک بین این قارچ‌ها با استفاده از ۲۳ تاکسون جمع‌آوری شده از ایران مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه

به استثنای سه مورد، سایر نمونه‌ها از استان گیلان جمع‌آوری شده‌اند. مشخصات نمونه‌ها شامل نام گونه، میزبان، محل جمع‌آوری و نیز شماره دستیابی توالی نمونه‌ها از شبکه اینترنت، در جدول ۱ آمده است.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)

در این مطالعه DNA ژنومی از نمونه‌های خشک و هر باریومی به روش 5% Chelex استخراج شد (Walsh, et al. 1991, Hirata & Takamatsu 1996). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به کمک دستگاه PCR Thermal Cycler SP TP400 (Takara, Japan) انجام شد.

برای تکثیر ناحیه ITS، در اولین PCR، از دو آغازگر ITS5 (5'- GGA AGT AAA - 3') و P3 (5'- GCC GCT TCA CTC GCC GTT AC - 3') و (AGT CGT AAC AAGG - 3')

جدول ۱- فهرست آرایه‌ها، میزبان‌ها، محل‌های جمع‌آوری و کد دسترسی به توالی‌ها در شبکه اینترنت

Table 1. Sources of fungal materials and sequence database accession numbers

Original fungal name	Host plant	Location of collection	GenBank Accession No.
<i>Erysiphe aquilegiae</i>	<i>Ranunculus constantinopolitanus</i>	Gilan	AB104523
<i>E. betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Karaj	AB104516
<i>E. buhrii</i>	<i>Acanthophyllum</i> sp.	Karaj	AB128924
<i>E. cichoracearum</i>	<i>Cichorium intybus</i>	Gilan	AB077695
<i>E. cichoracearum</i>	<i>Tragopogon</i> sp.	Esfahan	AB077694
<i>E. circaeae</i>	<i>Circaea lutetiana</i>	Gilan	AB104517
<i>E. convolvuli</i>	<i>Convolvulus arvensis</i>	Gilan	AB104518
<i>E. galii</i>	<i>Phuopsis stylosa</i>	Gilan	AB104525
<i>E. heraclei</i>	<i>Pimpinella affinis</i>	Gilan	AB104513
<i>E. heraclei</i>	<i>Torilis cf. leptophylla</i>	Gilan	AB104514
<i>E. heraclei</i>	<i>Bifora testiculata</i>	Gilan	AB104464
<i>E. heraclei</i>	<i>Conium maculatum</i>	Gilan	AB104510
<i>E. heraclei</i>	<i>Daucus carota</i>	Gilan	AB104511
<i>E. heraclei</i>	<i>Eringium caucasicum</i>	Gilan	AB104512
<i>E. orontii</i>	<i>Cucurbita</i> sp.	Gilan	AB077696
<i>E. orontii</i>	<i>Valerianella cf. uncinata</i>	Gilan	AB077693
<i>E. pisi</i>	<i>Medicago sativa</i>	Gilan	AB104519
<i>E. Polygoni</i>	<i>Polygonum</i> sp.	Gilan	AB104522
<i>E. urticae</i>	<i>Urtica dioica</i>	Gilan	AB104524
<i>Microsphaera alhagi</i>	<i>Alhagi</i> sp.	Gilan	AB104463
<i>M. astragali</i>	<i>Astragalus</i> sp.	Gilan	AB104515
<i>M. multappendicis</i>	<i>Berberis vulgaris</i>	Gilan	AB104520
<i>M. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Gilan	AB104521
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Peganum harmala</i>	Gilan	AB045149
<i>Leveillula</i> sp.	<i>Chondrilla juncea</i>	Gilan	AB045109

استفاده گردید (هیراتا و تاکاماتسو ۱۹۹۶). PCR اول با استفاده از ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده و به روش هیراتا و تاکاماتسو (۱۹۹۶) انجام شد. محصول PCR اولیه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۲۵ دقیقه الکتروفورز شد و پس از تشکیل باندهای واضح و حصول اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر، PCR دوم به کمک آغازگرهای ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') و P3 و یک میکرولیتر از DNA به دست آمده در اولین PCR و در شرایط مشابه واکنش PCR اول انجام گردید.

توالی یابی DNA

در این مطالعه برای تعیین توالی مستقیم ژن‌ها از دستگاه "Applied Biosystem 373A DNA sequencer (Applied Biosystems U.S.A.)" استفاده شد. واکنش‌های PCR مربوط به توالی یابی با استفاده از کیت Prism Dye Terminator cycle sequencing Ready reaction kit (Applied Biosystems) و با استفاده از آغازگرهای ITS1 (5'-TCA ACA ACG GAT CTC TTG GC-3') و ITS4 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3') (White *et al.* 1990) انجام شد.

تجزیه و تحلیل اطلاعات

با توجه به اینکه در این مطالعه بازهای رشته DNA به عنوان صفت ویژه (character) در نظر گرفته شده‌اند، جدول ماتریس داده‌ها با توجه به نام هر نمونه و توالی بازهای شناسایی شده تهیه شد. همچنین دو گونه *Leveillula* به عنوان گروه خارجی مورد استفاده قرار گرفتند. سپس این جدول با استفاده از نرم افزار Clustal V (Higgins *et al.* 1992) تنظیم گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و آنالیز فیلوژنتیک از دو روش Maximum parsimony و Distance استفاده شده است. در روش Distance، روش Neighbour-Joining و پارامتر دوم کیمورا مورد استفاده قرار گرفت (Kimura 1980).

روش‌های Parsimony و Distance به کمک نرم افزار PAUP V.4.0 (Sawford 2000) انجام شده‌اند. طول کلادوگرام، ضریب پایداری آن (Consistency Index)، نیز به وسیله PAUP محاسبه شده است. ضریب سازگاری متعادل شده و ضریب گروه پذیری نیز به وسیله PAUP محاسبه شده است. همچنین در کلادوگرام‌های به دست آمده، میزان قدرت و پایداری هر گروه به وسیله آنالیز Bootstrap (Felsenstein 1985) محاسبه گردیده است.

نتیجه

میزان تنوع ژنتیکی بین تاکسون‌ها
نتایج حاصل از مقایسه توالی ITS، برای تاکسون‌های مورد مطالعه در جدول ۲ و ۳ آمده است. بر اساس این نتایج بین گونه‌های جنس *Erysiphe* s.l. به میزان ۰.۲ تا ۲۲/۴ درصد تفاوت در توالی ناحیه ITS مشاهده شد. *E. galii* (نماینده *E. sect. Galeopsidis*) ۱۷/۳ تا ۲۲/۴ درصد تفاوت با سایر گونه‌های *Erysiphe* s.l. نشان داد. همچنین گونه‌های *E. cichoracearum* و *E. orontii* (به عنوان نماینده *E. sect. Golovinomyces*) تفاوت بالایی به میزان ۱۷/۳ تا ۲۱/۸ درصد با سایر گونه‌های *Erysiphe* s.l. نشان دادند. این درحالی است که گونه‌های مورد مطالعه *Microsphaera* نسبتاً تفاوت اندکی با گونه‌های *E. sect. Erysiphe* نشان دادند (۲- ۸/۷ درصد). با این وجود تفاوت *Microsphaera* با دو بخش دیگر جنس *Erysiphe* بسیار بالا می‌باشد (۱۹/۴-۲۱/۷ درصد).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

شکل ۱ کلادوگرام اجماعی حاصل از چهار درخت تکاملی را نشان می‌دهد که با روش پارسیمونی به دست آمده است. با روش Neighbour-Joining نیز کلادوگرام مشابهی به دست آمد (شکل نشان داده نشده است). بر اساس این کلادوگرام‌ها، آرایه‌های مورد مطالعه به سه گروه تقسیم می‌شوند. گونه‌های *E. sect. Erysiphe* و *Microsphaera* در یک گروه قرار می‌گیرند که به میزان ۱۰۰ درصد با هر دو روش مورد تایید قرار می‌گیرند. گروه دوم شامل آرایه‌های مربوط به *E. sect. Golovinomyces* است. همان‌طور که از شکل مشخص است گروه سوم در برگرفته *E. sect. Galeopsidis* است که در کنار گروه اول قرار می‌گیرد.

بحث

همان‌طور که از جدول ۲ معلوم است تفاوت ژنتیکی بین گونه‌های *Erysiphe* *Braun* و *Microsphaera* که در گروه یک قرار می‌گیرند اغلب کمتر از دو درصد است. مهمترین صفت مرفولوژیکی مشترک در این گروه تولید آنامورف از تیپ *Pseudoidium* است، به این معنی که همه اعضای این گروه کنیدیوم‌های منفرد روی کنیدیوفور تولید می‌کنند (Cook et al. 1997). از طرف دیگر مهمترین صفتی که *Erysiphe* *Braun* و *Microsphaera* را از یکدیگر متمایز می‌سازد، شکل زواید روی آسکوکارپ و نحوه انشعاب آنها است که اولین بار توسط لویه تشخیص داده شد و بر اساس آن تفکیک این جنس‌ها پایه‌ریزی شد و متعاقباً قارچ‌شناسان دیگر نیز از آن پیروی کرده‌اند. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، اگر گونه‌هایی با بیشترین تفاوت در شکل زواید در نظر گرفته شوند، به سهولت

Table 2. Matrix of percentage distance among ITS region from 19 *Erysiphe* slat. species

species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
<i>E. heraclei Pimpinella</i>																			
<i>E. heraclei Daucus</i>	0.4																		
<i>E. heraclei Torilis</i>	0.2	0.2																	
<i>E. heraclei Bifora</i>	0.4	0.4	0.2																
<i>E. heraclei Conium</i>	0.7	0.7	0.5	0.7															
<i>E. heraclei Eryngium</i>	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9														
<i>E. Polygoni</i>	1.8	1.8	1.6	1.8	1.8	2.0													
<i>E. bibruti</i>	1.3	1.3	1.1	1.8	1.6	1.1	1.6												
<i>E. betae</i>	2.9	2.9	2.7	2.5	2.5	2.9	3.4	2.9											
<i>E. convolvuli</i>	6.3	6.3	6.1	5.9	6.3	6.6	7.2	6.5	5.2										
<i>E. aquilegiae</i>	5.8	5.8	5.6	5.8	5.4	5.4	5.8	5.5	4.4	7.4									
<i>E. cirsiaeae</i>	6.0	6.0	5.8	6.0	5.6	5.6	6.0	5.6	4.5	0.5									
<i>E. pisti</i>	7.7	7.7	7.5	7.7	7.9	7.5	8.5	7.8	8.3	10.2	6.6								
<i>E. urticae</i>	7.4	7.4	7.2	7.4	7.9	7.8	8.3	7.3	7.8	9.8	8.3	8.5							
<i>E. galii</i>	20.5	20.5	20.5	20.3	20.0	20.7	20.7	19.8	19.5	22.4	20.3	20.3	22.0						
<i>E. cichoi Cichorium</i>	19.5	19.5	19.7	19.5	19.9	19.9	19.9	19.9	19.6	21.8	20.1	20.1	20.7	17.6					
<i>E. cicho Tragopogon</i>	19.1	19.1	19.3	19.1	18.9	19.5	19.5	19.3	19.0	21.2	19.3	19.3	19.8	18.9	17.6				
<i>E. oronithi Cicurbita</i>	19.7	19.7	18.9	18.7	18.5	19.1	19.1	18.9	18.7	20.8	18.9	18.9	19.4	18.5	17.3	2.8			
<i>E. oronithi Valerianella</i>	18.7	18.7	18.9	18.7	18.5	19.1	19.9	18.9	18.7	20.4	18.9	18.9	19.6	18.7	17.3	1.2	1.6		
																		0.8	

جدول ۳- ماتریس تفاوت (به درصد) در ناحیه ITS دی آن آر بیوزومی بین ۱۲ گونه *Erysiphe* و چهار گونه *Microsphaera*

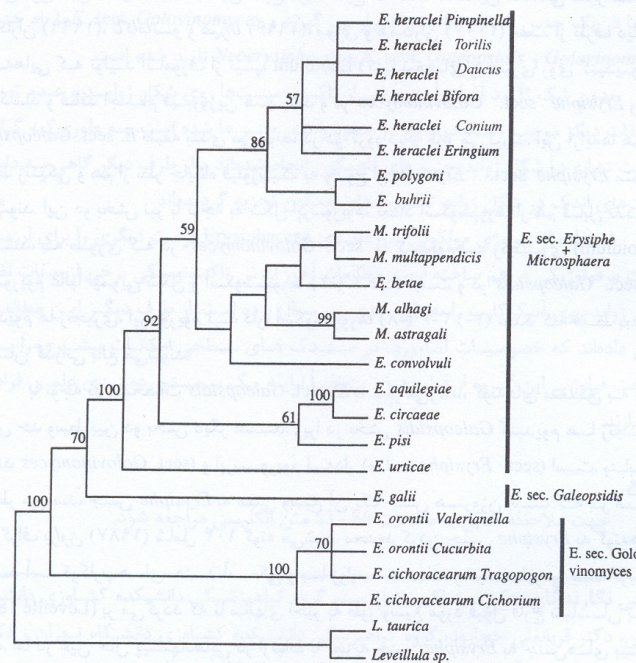
Table 3. Matrix of percentage sequence divergence among ITS region from 12 *Erysiphe* and 4 *Microsphaera* species

species	<i>M. trifolii</i>	<i>M. multappendicis</i>	<i>M. alhagi</i>	<i>M. astragali</i>
<i>E. heraclei daucus</i>	4.00	4.10	3.60	3.20
<i>E. polygoni</i>	4.30	4.70	4.00	3.60
<i>E. buhrii</i>	3.80	3.90	3.40	3.10
<i>E. betae</i>	2.50	2.30	2.50	2.00
<i>E. convolvuli</i>	6.50	6.10	6.10	5.60
<i>E. aquilegiae</i>	5.30	5.50	5.50	5.10
<i>E. circaeae</i>	5.50	5.60	5.70	5.30
<i>E. pisi</i>	7.90	8.70	8.00	7.80
<i>E. urticae</i>	8.00	8.70	8.40	8.00
<i>E. galii</i>	20.30	21.40	20.50	20.60
<i>E. cichoracearum</i>	20.30	21.70	20.50	20.40
<i>E. orontii Valeraniella</i>	19.30	20.70	19.60	19.40

می‌توان این جنس‌ها را از هم تفکیک کرد. اما وجود گونه‌هایی که به لحاظ شکل زواید حالت حد وسط بین *Erysiphe* و *Microsphaera* دارند، تشخیص مرز بین این جنس‌ها را به سختی امکان پذیر می‌سازد. به عنوان مثال، *Microsphaera trifolii* تولید زواید ساده می‌کند که ممکن است بعضی از آنها در اواخر فصل حالت دو شاخه‌ای پیدا کنند و یا در گونه *E. convolvuli* زواید با انشعابات دو شاخه‌ای تولید می‌شوند. وجود چنین تاکسون‌هایی عامل اصلی اختلاف نظر در بین تاکسونومیست‌ها در ارتباط با این جنس‌ها بوده است. به طوری که بعضی از قارچ شناسان گونه‌های حدوسط بین *Erysiphe* و *Microsphaera* را داخل یک بخش (section) به نام *Trichocladia* قرار داده‌اند (نقل از Braun 1981).

نی‌جر (Neger 1901) این بخش را به سطح جنس ارتقاء داده است. برخی از قارچ شناسان نظیر بلومر (Blumer 1967)، براون (۱۹۸۱)، بوسه‌وینکل (Boesewinkel 1980) و ژنگ و چن (Zheng & Chen 1981) این بخش را جزو جنس *Erysiphe* دانسته‌اند، در حالی که بعضی دیگر (Braun 1987, Speer 1978) آن را در جنس *Microsphaera* طبقه‌بندی کرده‌اند.

همان‌طور که از شکل یک مشخص است، براساس آنالیز فیلوژنتیک مبتنی بر rDNA گونه‌های *Erysiphe* sect. *Erysiphe* و *Microsphaera* هرگز گروه‌های مونوفیلتیک جداگانه‌ای تشکیل ندادند، به طوری که سه گونه از *Microsphaera* جایگاه‌های متفاوتی در کنار گونه‌های *Erysiphe* اشغال کرده‌اند.



شکل ۱- کلادوگرام اجماعی حاصل از آنالیز توالی نوکلئوتیدیهای ناحیه ITS₁-5.8s-ITS₂ که با روش Maximum parsimony به دست آمده است. طول آن برابر ۵۰۶ و ضریب سازگاری ۰/۷۹، ضریب گروه پذیری ۰/۸۴، ضریب سازگاری متعادل شده ۰/۶۷ است. اعداد بالای شاخهها نتایج آنالیز Bootstrap را نشان می‌دهند.

Fig.1. A strict consensus of 4 equally parsimonious trees. The numbers above the branches indicate bootstrap values based on 1000 replications. The tree length is 506, the consistency index (CI) is 0.79, the retention index (RI) is 0.84 and the rescaled consistency index (RC) is 0.67.

بنابراین به نظر می‌رسد، نه تنها از لحاظ مورفولوژیکی بلکه به لحاظ مولکولی نیز دو جنس فوق قابل تفکیک نیستند. این نتایج موید نتایج مطالعات محققین مختلفی نظیر سینز و همکاران (۱۹۹۹)، تاکاماتسو و هیراتا (۱۹۹۶)، موری و همکاران (۲۰۰۰) است. از طرف دیگر، آرایه‌هایی که تولید آنامورف از تیپ *Euoidium* (کنیدیوم‌های زنجیری روی کنیدیوفور) می‌کنند و فاقد اجسام فیبروزین هستند و در *Erysiphe sect. Golovinomyces* و یا *E. sect. Galeopsidis* طبقه بندی می‌شوند، در دو گروه دیگر قرار می‌گیرند. این آرایه‌ها هم به لحاظ ژنتیکی و هم از نظر جایگاه فیلوژنتیک به وضوح از *Erysiphe sect. Erysiphe* متمایز می‌شوند. این دو بخش نیز با توجه به شکل آپرسوریوم، تعداد آسکوسپورها از هم قابل تفکیک هستند، به طوری که در *E. sect. Golovinomyces* کنیدیوم‌ها زنجیری (*euoidium*)، آپرسوریوم غالباً لیمویی شکل و آسکوسپورها (۴-۲) عدد است و در *E. sect. Galeopsidis* کنیدیوم‌ها زنجیری، آپرسوریوم لبه دار، آسکوسپورها (۸-۶-۳) عدد که فقط بعد از زمستان گذرانی بالغ می‌شوند.

با توجه به مشخصات *E. sect. Galeopsidis* به نظر می‌رسد، گونه‌های متعلق به این بخش حد وسط بین دو بخش دیگر هستند. زیرا در بخش *Galeopsidis* کنیدیوم‌ها زنجیری (مانند *Golovinomyces sect.*) و آپرسوریوم لبه‌دار (مانند *Erysiphe sect.*) است. بنابراین به نظر می‌رسد، جنس *Erysiphe* به معنی وسیع آن یک جنس هتروژن است که بر اساس مونوگراف براون (۱۹۸۷) شامل ۱۰۴ گونه می‌شود. محدود کردن جنس *Erysiphe* به گونه‌هایی واجد آسکوکارپ‌های چند آسکی و با زواید ساده و میسلیمیومی به لویه (Léveillé 1851) بر می‌گردد که تا سالهای اخیر به طور وسیع مورد قبول قارچ‌شناسان بوده است. اما در عین حال پیشنهادهایی در ارتباط با تجزیه جنس *Erysiphe* به جنس‌های بیشتر وجود داشته است و حتی سابقه طولانی دارد.

گلووین (Golovin 1958) گونه‌هایی از جنس *Erysiphe* که دارای آنامورف از تیپ *Pseudoidium* هستند را به سطح جنس *Linkomyces* Gol. ارتقاء داد که هرگز مورد توجه واقع نشد. ساوادا (Sawada 1959) به دلیل مشابهی جنس *Ischnochaeta* Saw. را برای گونه‌هایی با آنامورف *Pseudoidium* پذیرفت. هلیوتا (Heluta 1988) *E. sect. Golovinomyces* را به سطح جنس *Golovinomyces* ارتقاء داد و گونه‌های *E. sect. Galeopsidis* را نیز در این جنس طبقه‌بندی کرد.

نتایج حاصل از بررسی‌های اخیر بار دیگر نشان می‌دهد که *Erysiphe s. lat.* به لحاظ فیلوژنتیک یک تاکسون پلی‌فیلتیک است و عملاً گونه‌های متعلق به این جنس گروه‌های مونوفیلتیک جداگانه‌ای تشکیل می‌دهند. از طرف دیگر سه بخش *Erysiphe* به لحاظ مورفولوژیکی نیز از یکدیگر قابل تفکیک هستند. از اینرو نتایج این مطالعه موید سیستم

رده بندی براون و تاکاماتسو (Braun & Takamatsu 2000) است که در آن کلیه آرایه های واجد کنیدیوم های منفرد شامل *Uncinula Erysiphe Microsphaera* و جنس های نزدیک به آنها در یک جنس به نام *Erysiphe* قرار می گیرند و *E. sect. Golovinomyces* با نام جنس *Golovinomyces* و *E. sect. Galeopsidis* با نام *Neoerysiphe* تایید شده است. بدون شک تأکید اغراق آمیز برخی از تاکسونومیست ها روی شکل زواید و عدم توجه به صفات دیگر موجب نابسامانی هایی در حدود و ثغور جنس ها شده است، به طوری که گاهی به علت تشابه در شکل زواید جنس های ناهمگون ایجاد شده اند و از طرف دیگر گاهی به دلیل تفاوت های اندک در شکل زواید تاکسون های همگون تجزیه گردیده اند. استفاده از بیولوژی مولکولی در رده بندی *Erysiphaceae* فرصت دیگری را برای ارزیابی صفات مرفولوژیکی فراهم ساخته است. مطالعات اخیر ارزش تاکسونومیککی برخی از صفات نظیر شکل زواید روی آسکوکارپ را به طور جدی زیر سوال برده است. از طرف دیگر این مطالعات نشان داده اند که خصوصیات آنامورف در سفیدک های سطحی امکانات بیشتری را برای شناخت فیلوژنی این گروه از قارچ ها و متعاقباً آرایه یک سیستم رده بندی علمی فراهم می سازند.

منابع

جهت ملاحظه منابع به صفحات 86 - 83 متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: دکترسید اکبر خداپرست، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، دکتر قربانعلی حجارود، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و دکتر سوسومو تاکاماتسو، آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه میه، ژاپن.

**PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN
IRANIAN ISOLATES OF *MICROSPHAERA* AND
ERYSIPHE S. LAT. BASED ON rDNA INTERNAL
TRANSCRIBED SPACERS SEQUENCES**

S.A. KHODAPARAST¹, Gh.A. HEDJAROUDE and S. TAKAMATSU

Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Gilan University, Rasht;
Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran
and Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Bioresources, Mie University, Japan

Accepted 09.11.2003

Received 25.02.2003

Abstract

To study the phylogenetic relationships between *Erysiphe* s. lat. and *Microsphaera*, the nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rDNA including 5.8S rDNA gene were determined for 23 taxa. The results showed that *Erysiphe* section *Erysiphe* and *Microsphaera* are closely related and clustered together with strong bootstrap support (100%). All of taxa belonging to this group produce conidia singly. Whereas, these genera are distinguished by the morphology of appendages which is dichotomously branched in *Microsphaera* and mycelioid in *Erysiphe*. *Erysiphe* sect. *Golovinomyces* and *Erysiphe* sect. *Galeopsidis*, both of which are well characterized by conidia produced in chains, formed two different groups. The percentages of sequence divergence ranged from 2 to 7.8% between *Microsphaera* and *Erysiphe* sect. *Erysiphe*. In contrast, there was high diversity between *E*. sect. *Erysiphe* and two other *Erysiphe* sections (18.5-22.4%). Moreover, divergence between *E*. sect. *Golovinomyces* and *Erysiphe* sect. *Galeopsidis* was also high (17.3-18.7%), which is similar to those between distantly related genera.

1. Corresponding author

These results show that *Erysiphe* sect. *Erysiphe* is closely related to *Microsphaera* more than to two other sections of *Erysiphe*.

Key words: *Erysiphe*, *Microsphaera*, Phylogeny, Powdery mildew, rDNA sequences

Introduction

The fungi belonging to the traditional genera *Erysiphe* and *Microsphaera* are important plant pathogens which obligately parasitize a wide range of plant species, and belong to the family Erysiphaceae (Ascomycota: Erysiphales). These genera are distinguished from one another by the morphology of appendages which is dichotomously branched in *Microsphaera* and mycelioid in *Erysiphe*. However, there are several species having intermediate appearance of appendages, which have been regarded as intermediates between *Erysiphe* and *Microsphaera*. BRAUN (1981) divided *Erysiphe* s. lat. into three sections based on the anamorphic features, i.e., section *Erysiphe* (conidia produced singly and lobed appressoria), section *Golovinomyces* (conidia produced in chains and nipple-shaped appressoria), and section *Galeopsidis* (conidia produced in chains and lobed appressoria). Section *Galeopsidis* has been regarded as an intermediate between sections *Erysiphe* and *Golovinomyces* by some authors (BRAUN 1987). There have been some debates on the identity of *Erysiphe* s. lat. as a single genus. Some authors split *Erysiphe* into at least two genera. On the other hand, *Microsphaera*, which produces conidia singly and has lobed appressoria, has been considered to be closely related to *Erysiphe* section *Erysiphe* (BRAUN 1981, 1987). The rDNA diversity has recently been used for phylogenetic analysis of several powdery mildew fungi including *Erysiphe* and *Microsphaera* (HIRATA and TAKAMATSU 1996, SAENZ and TAYLOR 1999, TAKAMATSU *et al.* 1999). According to these studies, *Erysiphe* s. lat. does not form a monophyletic group and *E.* section *Erysiphe* clusters with the genus *Microsphaera*. In this study, phylogenetic relationships between these fungi based on rDNA ITS sequences using Iranian isolates are reinvestigated.

Material and methods

Sample sources:

A total of 23 Iranian powdery mildew isolates were sequenced in this study, with two outgroup species from the genus *Leveillula*. Fungi used in this study, their original hosts, localities and accession number of the nucleotide sequence data bases (DDBJ, EMBL, and GenBank) are given in Table 1.

DNA extraction and PCR amplification:

Whole cell DNA was isolated from cleistothecia or mycelia using the Chelex method (HIRATA & TAKAMATSU 1996). About 25 cleistothecia or a piece of mycelia were added to 300 µl of 5% Chelex (Bio-Rad) in a 1.5 ml microcentrifuge tube and incubated at 56°C for several hours. Then the tubes were incubated in a boiling water bath for 8 minutes. The extract was mixed vigorously and incubated in boiling water bath again. After mixing, the Chelex solution was centrifuged at 15000 g for 5 min. 10 µl of supernatant were used as template DNA for first polymerase chain reaction (PCR). The region spanning ITS1, 5.8S and ITS2 of the rDNA was amplified twice by the PCR using nested primer sets. The primer pairs viz., ITS5/P3 and ITS1/P3 were used for first and second PCR amplifications, respectively (HIRATA & TAKAMATSU 1996).

DNA sequencing:

Whole cell DNA was extracted from cleistothecia or mycelia using the Chelex method (HIRATA & TAKAMATSU 1996). The region spanning ITS1, 5.8S and ITS2 of the rDNA was amplified twice by the PCR using nested primer sets. The primer pairs viz., ITS5/P3 and ITS1/P3 were used for first and second PCR amplifications, respectively (HIRATA & TAKAMATSU 1996). Nucleotide sequences of the PCR products were obtained for both strands using direct sequencing in an Applied Biosystems 373A sequencer. The sequence reactions were conducted using the Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) following the manufacture's instruction. The primers, ITS1, T4, T3 (HIRATA & TAKAMATSU 1996) and ITS4 (WHITE *et al.* 1990) were used for the sequencing in both directions.

Data analysis:

The obtained sequences were initially aligned using the Clustal V package (HIGGINS *et al.* 1992). The data were analyzed using the parsimony and distance methods by PAUP v.4.0b4a (SWOFFORD 2000). In distance method, a neighbour-joining (NJ) tree was obtained using Kimura's two-parameter distance (KIMURA 1980). The most parsimonious (MP) trees were found with a heuristic search. All nucleotide substitutions were equally weighted and unordered. Alignment gaps were treated as missing information. The strength of the internal branches from the resulting trees were tested by bootstrap analysis (FELSENSTEIN 1985) using 1000 replications.

Results

Divergence between ITS1-5.8 S-ITS2 sequences:

Pair-wise percentages of sequence divergence of the ITS-5.8S-ITS2 region were calculated using PAUP for 23 isolates (Tables 2, 3). Within *Erysiphe* s. lat. species, the sequence divergence between pairs of taxa ranged 0.20 to 22.40%. *E. galii* (representative of *E. sect. Galeopsidis*) showed 17.30% to 22.40% sequence divergence when compared with all of other *Erysiphe* species. *Erysiphe cichoracearum* and *E. orontii* (representatives of *E. sect. Golovinomyces*) were also highly divergent compared with all of the other *Erysiphe* species (17.30 % - 21.80 %). The sequence divergence between *Microsphaera* and *E. sect. Erysiphe* was 2.00%-8.70% which is similar to those within respective genera, whereas *Microsphaera* showed high sequence divergence with *E. sect. Galeopsidis* and *E. sect. Golovinomyces* (19.40%-21.70%).

Phylogenetic analysis:

Figure 1 shows a strict consensus tree of four equally parsimonious trees obtained by the maximum parsimony (MP) method using PAUP v.4.0b4a. A similar tree topology was obtained by the neighbor-joining method (Data not shown here).

Discussion

The present result indicated that *E. sect. Erysiphe* and *Microsphaera* form a clade with strong support (100%) of bootstrap analysis. All taxa of this group share an anamorph belonging to *Oidium* subgenus *Pseudoidium* (COOK *et al.*, 1997) which produces conidia singly. Moreover, *Microsphaera* and *E. sect. Erysiphe* link with some morphologically intermediate species. All of these evidences clearly indicate that *Microsphaera* and *E. sect. Erysiphe* are closely related to each other and cannot be separated into independent lineages. *E. galii* (*E. sect. Galeopsidis*) occupied basal position to the *Microsphaera-E. sect. Erysiphe* group with 70% bootstrap value in MP method. *E. cichoracearum* and *E. orontii* (both from *E. sect. Golovinomyces*) formed a separate group supported with 100% bootstrap value in MP method. As stated above, BRAUN (1981) divided the genus *Erysiphe* into three sections. In a recent taxonomic treatment of powdery mildew, BRAUN & TAKAMATSU (2000) accepted two genera, i.e., *Golovinomyces* and *Neoerysiphe* for *E. section Golovinomyces* and *E. section Galeopsidis*, respectively. Moreover, they considered *Microsphaera* and some other closely related genera could be congeneric with *E. section Erysiphe*. The present analysis well coincides with the results of some authors (SAENZ & TAYLOR 1999, TAKAMATSU *et al.* 1999) showing that the three *Erysiphe* sections are phylogenetically distantly related to each other.

To look at the figure and tables, please refer to the Persian text (pages: ۹۳-۱۰۳).

References

- BLUMER, S. 1967. Echte Mehltaupize (Erysiphaceae). Jena.
- BOESEWINKEL, H.J. 1980. The morphology of the imperfect states of powdery mildew (Erysiphaceae). *The Botanical Review* 46 (2): 167-223.
- BRAUN, U. 1981. Taxonomic studies in the genus *Erysiphe* I. Generic delimitation and position in the system of the Erysiphaceae. *Nova Hedwegia* 34: 679-719.
- BRAUN, U. 1987. A monograph of the Erysiphaceae (powdery mildews). Beiheftezur, *Nova Hedwegia* 89: 1-700.

- BRAUN, U. and TAKAMATSU, S. 2000. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysiphaceae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences – Some taxonomic consequences. *Schlechtendalia* 4: 1-33.
- CANDOLLE de, A.P. 1815. *Flora française* in Lamark and de Candolle, Paris (cf. Braun 1987).
- COOK, R.T.A., INMAN, A.J. and BILLINGS, C. 1997. Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. *Mycological Research* 101 (8): 975-1002.
- DELYE, C., LAIGRET, F. and CORIO-COSTET, M.F. 1997. RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathology* 87: 670-677.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- GABRIEL, D.W. and ELLINGBOE, A.H. 1982. Polypeptide mapping by two dimensional electrophoresis and polygenetic variation in field isolates and induced mutants of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 72: 1496-1499.
- GOLOVIN, P.N. 1958. *Obsor rodov semejstva erysiphaceae*. *Sborn. Rabot. Inst. Prikl. Zool. I fitop.* 5:101-139 (cf. Braun 1987).
- HELUTA, V.P. 1988. New taxonomic combination in the family Erysiphaceae. *Ukr. Bot. J.* 45(5): 62-63 (In Russian with English summary).
- HIGGINS, D.G., BLEABY A.J. and FUCHS, R. 1992. Clustal V. improved software for multiple sequence alignment. *Computer application in the Bioscience* 8:189-191.
- HIRATA, T. and TAKAMATSU, S. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37: 265-270.

- LEVEILLE, J.H. 1851. Organisation et disposition methodique des species qui composent le genre *Erysiphe*. Ann. Sci. Nat. Bot., ser. 15: 109-179 (cf. Braun 1987).
- MORI, Y., SATO, Y. and TAKAMATSU, S. 2000). Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. Mycologia 92: 74-93.
- NEGER, F.W. 1901. Beitrage zu Biologie der Erysiphaceen. Flora 88: 333-370 (cf. Braun 1987).
- O'DELL, M., WOLFE, M.S., FLAVELL, R.B., SIMPSON, C.G. and SUMMERS, R.W. 1989. Molecular variation in population of *Erysiphe graminis* on barley, oats and rye. Plant pathology 38: 340-351.
- SAENZ, G.S., TAYLOR, J.W. and GARGAS, A. 1994. 18S rRNA gene sequences and supraordinal classification of the Erysiphales. Mycologia 86: 212-216.
- SAENZ, G.S. and TAYLOR, J.W. 1999. Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. Can. J. Bot. 77: 150-169.
- SAWADA, K. 1959. Descriptive catalogue of Formosan fungi XI. Spec. publ. Coll. Agr. Nat. Taiwan Univ. 8:1-268 (cf. Braun 1987).
- SPEER, E.O. 1978. Untersuchungen zur Morphologie und Systematik der Erysiphaceen III. Die Sektion *Trichocladia* und ihre Typusart *Microsphaera tortilis* (Wallr. ex Fr.) Speer comb. nov. Sydowia 31: 247-250.
- SWOFFORD, D.L. 2000. Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods (PAUP Version 4). Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois, U.S.A.
- TAKAMATSU, S., HIRATA T. and SATO Y. 1998 Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphales) Mycoscience 39: 441-453.
- TAKAMATSU, S.T., HIRATA, T., SATO, Y. and NOMURA, Y. 1999. Phylogenetic relationships of *Microsphaera* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. Mycoscience 40: 259-268.

- TORP, J. and ANDERSEN, B. 1982. Two-dimensional electrophoresis of protein from culture of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Plant Pathology* 21: 151-160.
- WALSH, P.S., MELTZEGGER, D.A. and HIGUCHI, R. 1991. Chelax 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechnique* 10: 506-513.
- WHITE, T.J., BRUNS, T.D., LEE, S. and TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetic. pp. 315-322. *In*: Innis, M.A., Cleland, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- ZELLER, K.A. and LEVY, M. 1995. Intraspecies differentiation in the powdery mildew *Erysiphe cichoracearum* determined with rDNA RFLPs. *Molecular Ecology* 4: 277-283.
- ZHENG, R.Y. and CHEN, G.Q. 1981. The genus *Erysiphe* in China. *Sydowia* 34: 214-327.

Addresses of the authors: Dr. S.A. KHODAPARAST*, Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Gilan University, Rasht, Iran; Dr. Gh.A. HEDJAROUDE, Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Tehran University, Iran and Dr. S. TAKAMATSU, Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Bioresources, Mie University, Japan.

*E-mail: khodaparast@Guilan.ac.ir