

مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت های ایرانی قارچ *Erysiphe betae*(Vanha) Weltzien عامل بیماری سفیدک سطحی چغندر با روش rDNA-RFLP
Study on genetic diversity of Iranian populations of
Erysiphe betae(Vanha) Weltzien causal agent of sugar beet powdery
mildew using rDNA-RFLP method

مهیار شیخ الاسلامی^۱، سید محمود اخوت^۱، قربانعلی حجارود^۱، عباس شریفی تهرانی^۱، مارتین زایدل^۲ و محمد جوان نیکخواه^۱

م. شیخ الاسلامی، س.م. اخوت، ق.ع. حجارود، ع. شریفی تهرانی، م. زایدل و م. جوان نیکخواه. ۱۳۸۳. مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت های ایرانی قارچ *Erysiphe betae*(Vanha) Weltzien عامل بیماری سفیدک سطحی چغندر با روش rDNA-RFLP. چغندرچند ۲۰(۲): ۱۵۹-۱۴۹

چکیده

در این مطالعه ۱۰۵ جدایه قارچ عامل سفیدک سطحی چغندرچند از مناطق مختلف کشور جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA از آسکوکارپها با استفاده از محلول پنج درصد Chelex100 انجام شد. نواحی فاصله ساز بین ژن های ریبوزومی به همراه قطعه ۵/۸ S توسط آغازگرهای ITS1 و ITS4 از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز تکثیر شده و روی آگارز ۱/۵ درصد ارزیابی گردیدند. محصول PCR تمام جدایه ها شامل یک قطعه با بزرگی ۶۴۵ جفت بازی بود. محصولات PCR به وسیله نه آنزیم برشی *EcoRI*, *RsaI*, *MspI*, *SacI*, *HaeIII*, *AluI*, *TaqI*, *HindIII*, *CfoI*, تفکیک گردیدند. نتایج نشان داد که فقط چهار آنزیم برشی *CfoI*, *HaeIII*, *AluI*, *MspI* دارای محل برش روی قطعه مزبور بودند. آنزیم *AluI* در دفعات مختلف باندهای متغیری پدید آورد و نتایج آن لحاظ نگردید. آنزیم *CfoI* بادو محل تشخیص سه قطعه با طول های ۱۸۵، ۲۸۰ و ۱۸۰ جفت باز را تولید کرد. محصول هضم آنزیم *MspI* چهار قطعه با بزرگی ۱۲۰، ۱۶۰، ۳۲۵ و ۴۰ جفت باز بود. آنزیم *HaeIII* پس از هضم محصولات PCR پنج قطعه با اندازه های ۷۵، ۱۸۰، ۳۲۵، ۴۰ و ۳۰ جفت باز تولید کرد. بین نقوش بانندی محصولات PCR و محصولات هضم آنزیمی هریک از آنزیم ها برای تمام جدایه های بررسی شده تفاوتی مشاهده نشد. نتایج نشان داد که جمعیت های ایرانی قارچ عامل سفیدک سطحی چغندر از یکنواختی بسیار بالایی برخوردار هستند.

واژه های کلیدی: بیماری سفیدک سطحی، تنوع ژنتیکی، جمعیت های ایرانی، چغندرچند، قارچ، rDNA-RFLP

آن‌ها بستگی دارد. پژوهش حاضر در راستای بررسی تنوع ژنتیکی بیمارگر برای اولین بار در دنیا انجام شد.

مواد و روش‌ها

۱- جمع‌آوری نمونه

نمونه‌ها از مناطق مختلف کشور در طی سال‌های ۱۳۸۰ و ۱۳۸۱ از استان‌های فارس (۱۴ نمونه)، اصفهان (۶ نمونه)، قزوین (۱۲ نمونه)، کرمان (۳ نمونه)، کرمانشاه (۸ نمونه)، آذربایجان غربی (۱۵ نمونه)، اردبیل (۵ نمونه)، سمنان (۳ نمونه)، مرکزی (۳ نمونه)، لرستان (۵ نمونه)، تهران (۴ نمونه)، کهگیلویه و بویراحمد (۴ نمونه)، خراسان (۸ نمونه)، همدان (۷ نمونه) و خوزستان (۸ نمونه) جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها شامل برگ‌های واجد آسکوکارپ بودند که عـمدتاً از بـوتـه‌های چغـندر قند هم چنین نمونه‌هایی از چغـندر لبـویی، چغندر علوفه‌ای و چغندر وحشی (*Beta vulgaris* subsp. *maritima*) با فواصل حداقل ۱۰ کیلومتر جمع‌آوری شدند که پس از خشک کردن داخل پاکت‌های کاغذی نگهداری شدند. هم چنین کنیدی از تعدادی از نمونه‌ها روی چغندرهای هشت هفته‌ای تک کلنی و تکثیر شدند و پس از فراوان‌سازی و جمع‌آوری، اسپورها لیوفیلیز شدند.

۲- استخراج DNA

استخراج DNA از آسکوکارپ‌ها براساس روش خداپرست (۱۳۸۰) انجام شد. براساس این روش قطعات برگ با اندازه تقریبی ۱×۱ سانتی‌متر ابتدا در

در جمعیت‌هایی از *Erysiphe cichoracearum* جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف نشانگر rDNA-RFLP تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. جدایه‌های *E. cichoracearum*، شش هاپلوتایپ معین را مشخص کردند که هر هاپلوتایپ اختصاص به یک میزبان یا یک مجموعه مرتبط از میزبان‌ها داشت (Zeller and Levy 1995). در بررسی ۲۸ جدایه از *Sphaerotheca fuliginea* با rDNA-RFLP و ۱۱ آنزیم محدود کننده تمام جدایه‌ها الگوی یکسانی را نشان دادند. هم چنین در روش RAPD-PCR استفاده از ۲۲ آغازگر پلی مورفیسم اندکی مشاهده شد و نتایج زیه کلاس-تر براساس اطلاعات حاصل از RAPD قادر به تشخیص جمعیت‌های درون گونه‌ای در *S. fuliginea* نبود (Bardin et al. 1997). مطالعه ۴۱ جدایه

E. cichoracearum با استفاده از rDNA-RFLP سه هاپلوتایپ متفاوت را مشخص کرد. بررسی این جمعیت با نشانگر RAPD-PCR و ۱۶ آغازگر سه گروه مختلف را در جمعیت مورد مطالعه آشکار کرد که هاپلوتایپ‌ها هاپلوتایپ‌های rDNA-RFLP متفاوت کامل داشتند (Bardin et al. 1999). یکی از راه‌های موثر برای کنترل بیماری‌ها یافتن ارقام مقاوم است اما بدیهی است که موفقیت در تهیه ارقامی با مقاومت مطلوب و پایدار به شناخت کافی از ژنتیک بیمارگر و میزبان و تعامل

می-کروولیتربافر PCR ۱۰ غلظت-تی، ۰/۴ میکروول-یتر
 Mix dNTP حاوی ۲/۵ میلی مول از هر یک
 از Taq DNA Polymerase ، یک واحد ، ۱ ،
 میکروولیتتر (۲۵ پیکومول) از آغازگر بالا دست 5' ITS1
 (3' TCCGTAGGTGAACCTGCGG)، یک
 میکروولیتتر (۲۵ پیکومول) آغازگر پایین دست با
 توالی (3' TCCTCCGCTTATTGATATGC
 5' ITS4) و یک میکروولیتتر DNA قالب بود.

لول-ها پس از یک سانتیفریوژ
 ک-وت-اه-داخ-ل-دستگاه ترمو سایکلر بیومترا مدل
 (Tpersonal, Goetingen, Germany) قرار داده
 شد و سپس طبق دستورالعمل زیر چرخه PCR انجام
 شد.

چرخه های گرمایی شامل:

- ۱- مرحله واسرشتگی مقدماتی: ۵ دقیقه در 95°C
- ۲- مرحله واسرشت: ۱ دقیقه در 95°C
- ۳- مرحله اتصال: ۱ دقیقه در 52°C
- ۴- مرحله گسترش: ۲ دقیقه در 72°C
- ۵- مرحله گسترش نهایی: ۵ دقیقه در 72°C

و ۳۵ بار چرخه بین مراحل ۲-۴ بود. ارزیابی
 محصول PCR روی ژل آگ-ارز ۱/۵ درصد در
 سیستم بافری (Tris 89.1 mM, Boric Acid 88.9 mM, Na₂EDTA 50 Mm) 1X TBE
 و ژل سپس با اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در
 میلی لیتر رنگ آمیزی و وجود قطعه DNA تکثیر شده
 ردیابی شد.

ه مدت یک ثانیه قرار داده و روی
 دستمال کاغذی سترون خشک شد. پس از خشک
 کردن ابتدا یک عدد لام که قبلاً به مدت یک ساعت
 داخل اسید کلریدریک ۱۰ درصد قرار داشت شسته و
 سپس توسط شعله ضد عفونی سطحی شد. پس از سرد
 شدن لام تعداد ۵۰ عدد آسکوکارپ از لکه منفرد روی
 قطعه برگی برداشته و روی لام قرار داده شد و روی آن
 یک قطره الکل اتیلیک ۹۶ درصد ریخته شد. پس از
 تبخیر الکل لام سترون دیگری روی آن قرار داده شد و
 آسکوکارپها کاملاً له شدند. ذرات قارچی توسط سوزن
 سترون به لوله حاوی شلکس ۵ درصد منتقل شد.
 پس از ۱۰ ثانیه هم زدن روی شیکر این لوله ها داخل
 دستگاه ترمومیکسر (Thermomixer) به مدت نیم
 ساعت در دمای 56°C قرار داده شدند. پس از آن
 به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 95°C قرار داده و
 سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتیفریوژ
 شدند. سپس مایع رویی به یک لوله تمیز منتقل و برای
 مراحل بعدی در 20°C نگهداری شدند. برای
 استخراج DNA از کنیدی ها از روش مک درموت و
 همکاران (McDermott et al. 1994) و با استفاده از
 بافر CTAB انجام شد.

برای تکثیر قطعه DNA ریبوزومی از دو
 آغازگر ITS1 و ITS4 معرفی شده توسط وایت و
 همکاران (White et al. 1990) استفاده شد. واکنش
 PCR با حجم نهایی ۲۰ میکروولیتتر شامل ۱۴/۴
 میکرو لیتر آب مق-طر دو بار تقطیر، ۲

تأثیر آنزیم‌های برشگر روی محصول PCR

مجموع نه آنزیم استفاده شده چهار آنزیم *HaeIII, AluI, MspI* و *CfoI* دارای محل تشخیص و برش روی محصولات PCR بودند. آنزیم *AluI* در دفعات مختلف آزمایش نتایج متغیری داشت و به این دلیل از ادامه آزمایش با این آنزیم روی کل نمونه‌ها صرف نظر شد. محصول هضم آنزیم *CfoI* سه قطعه با بزرگی ۱۸۵، ۲۸۰ و ۱۸۰ بود (شکل ۲). آنزیم *MspI* با سه مکان تشخیص و برش روی محصول PCR تمام جدایه‌ها چهار قطعه با اندازه‌های ۱۲۰، ۱۶۰، ۳۲۵ و ۴۰ جفت باز تولید کرد (شکل ۳). س-ران-جام آنزیم *HaeIII* در چهار نقطه دارای توالی تشخیص و برش بود که در نتیجه هضم پنج قطعه به طول‌های ۴۰، ۷۵، ۱۸۰، ۳۲۵ و ۳۰ جفت بازی تولید شد (شکل ۴). سایر آنزیم‌ها فاقد توالی تشخیص بر روی محصول PCR تمام جدایه‌ها بودند. در سه مورد از ۱۰۵ نمونه، DNA حاصل از استخراج آن از کنیدی‌ها استفاده شد که نتایج حاصل از آن با نمونه‌های آسکوکارپ یکسان بود. در مجموع نتایجی که از تأثیر آنزیم‌های محدود کننده روی جدایه‌های مختلف به دست آمد حاکی از آن بود که بین جدایه‌های مناطق مختلف کشور و هم چنین میزبان‌های مختلف تفاوتی وجود ندارد و همگی در یک گروه جای می‌گیرند.

هضم محصول PCR جدایه‌ها توسط آنزیم‌های برشگر *HaeIII, AluI, TaqI, HindIII, CfoI, E* و *RsaI* و *coRI, MspI, SacI* پس از تهیه بافرهای رقیق‌کننده و نگه‌دارنده مقدار ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آنزیم‌ها با ۸/۵ میکرولیتر از بافر مخصوص هر آنزیم مخلوط گردید. واکنش‌های هضم شامل ۰/۸ میکرولیتر بافر هضم ویژه هر آنزیم، ۲ میکرولیتر بافر حاوی آنزیم برشی (۳ واحد) و ۵/۲ میکرولیتر محصول PCR از DNA ریبوزومی تکثیر شده بود. واکنش‌ها سپس به مدت یک ساعت در حمام آبی °C ۳۷ قرار گرفتند. ارزیابی محصولات هضم با افزودن بافر بارگذاری بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۷/۵ درصد در سیستم بافری 1X TBE انجام شد. رنگ‌آمیزی به مدت نیم ساعت در محلول اتیدیوم بر مایند (۰/۵ می-کروگ-رم در میلی لیتر) و به دنبال آن رنگبری در آب مقطر انجام شد و سپس توسط دستگاه Gel Documentation (Pharmacia Biotech) عکس‌برداری صورت گرفت. کلیه مواد، آنزیم‌ها و آغازگرها از شرکت Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany خریداری گردید.

نتایج

نتیجه واکنش PCR برای تمام جدایه‌ها تکثیر یک قطعه ۶۴۵ جفت بازی بود (شکل ۱). از

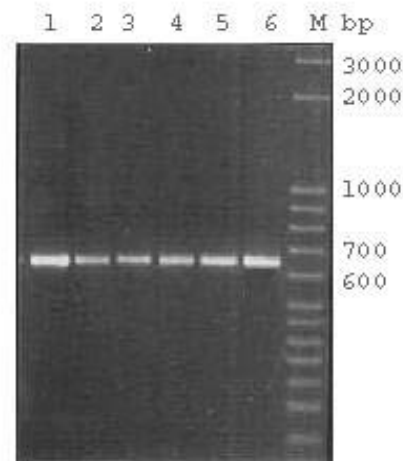
جدول ۱ فهرست و مشخصات جدایه های *E. betae* که در عنوان اشکال آمده است

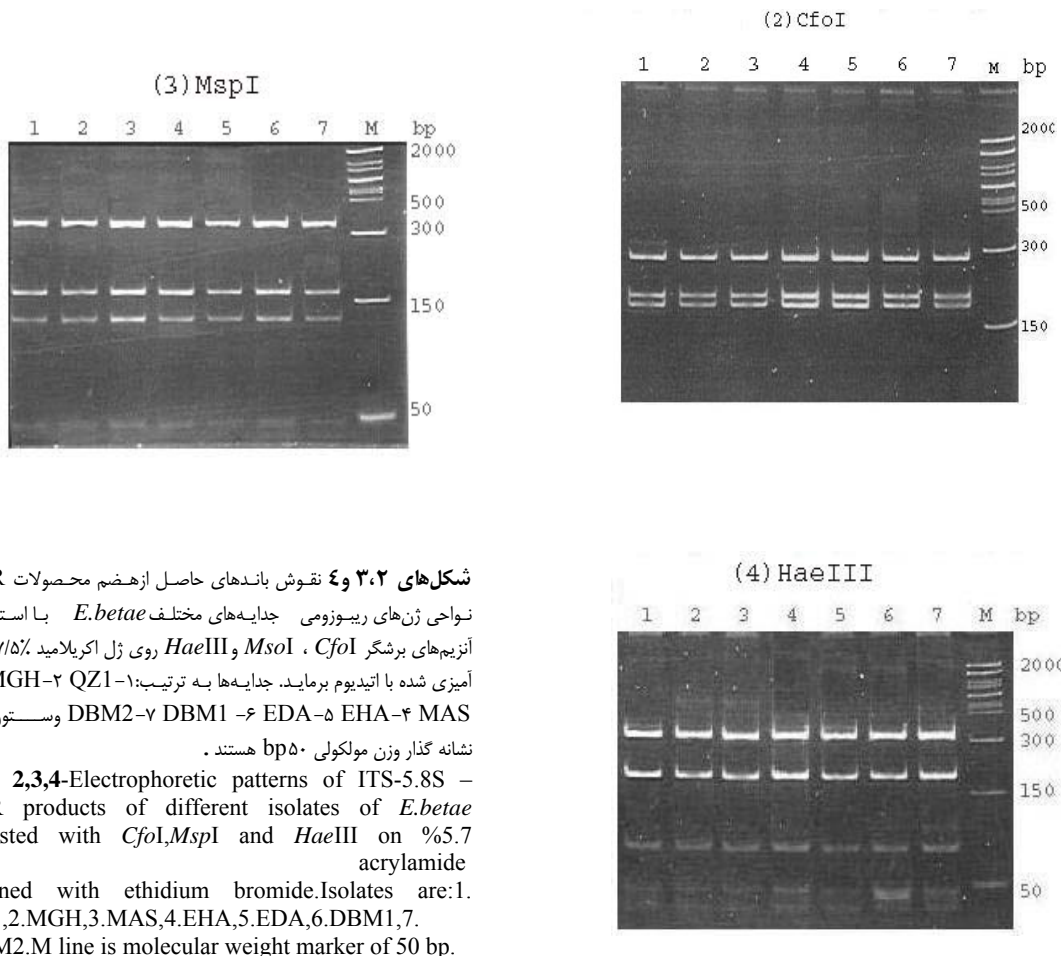
Table 1 List and specifications of *E. betae* isolates which included in the pictures

شماره Number	نام جدایه Name of Isolate	محل جمع آوری Location	سال جمع آوری Year	میزبان Host	منبع استخراج DNA Source of DNA
1	QZ1	قزوین	1381	Sugar beet چغندر قند	Ascocarp آسکوکارپ
2	MGH	اراک	1381	Sugar beet چغندر قند	Ascocarp آسکوکارپ
3	MAS	شازند	1381	Sugar beet چغندر قند	Ascocarp آسکوکارپ
4	EHA	اصفهان	1380	Sugar beet چغندر قند	Ascocarp آسکوکارپ
5	EDA	اصفهان	1381	چغندر علوفه ای Fodder beet	Ascocarp آسکوکارپ
6	DBM1	دزفول	1380	Wild beet چغندر وحشی	Ascocarp آسکوکارپ
7	DBM2	دزفول	1380	Wild beet چغندر وحشی	Ascocarp آسکوکارپ

شکل ۱- نمایش محصول PCR جدایه های مختلف *E. betae*، جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برمایند. جدایه ها به ترتیب: ۱-QZ1، ۲-MGH، ۳-MAS، ۴-EHA، ۵-EDA، ۶-DBM1 وستون M نشانه گذار وزن مولکولی ۵۰ bp هستند.

Figure 1. PCR product of different isolates of *E. betae* on agarose 1.5% stained with ethidium bromide. Isolates are: 1-QZ1, 2-MGH, 3-MAS, 4-EHA, 5-EDA, 6-DBM1. M line is weight marker of 50bp.





شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نقوش باندهای حاصل از هضم محصولات PCR نواحی ژن‌های ریبوزومی جدایه‌های مختلف *E. betae* با استفاده از آنزیم‌های برشگر *CfoI*، *MsoI* و *HaeIII* روی ژل اکریلامید ۷/۵٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برآید. جدایه‌ها به ترتیب: ۱-QZ1-۲-MGH-۳-MAS-۴-EHA-۵-EDA-۶-DBM1-۷-DBM2 و ستون M نشانه گذار وزن مولکولی ۵۰ bp هستند.

Fig. 2,3,4-Electrophoretic patterns of ITS-5.8S – PCR products of different isolates of *E. betae* digested with *CfoI*, *MspI* and *HaeIII* on %5.7 acrylamide, stained with ethidium bromide. Isolates are: 1. QZ1, 2. MGH, 3. MAS, 4. EHA, 5. EDA, 6. DBM1, 7. DBM2. M line is molecular weight marker of 50 bp.

بحث

از روش‌های RAPD-PCR و rDNA-RFLP به میزان ۱۰ درصد تخمین زده شد که این تنوع اندک نشان دهنده رابطه ژنتیکی بسیار نزدیک جدایه‌ها است، اگرچه این جدایه‌ها متعلق به نواحی بسیار دور از یکدیگر بوده‌اند (Bardin et al. 1997). نتایج تحقیق حاضر می‌تواند درک بهتری از اکولوژی *E. betae* ارائه کند. نتایج بررسی نقش آسکوسپورها در جوانه‌زنی و بیم‌اری-زایی در تـحقیقات مختلف حاکی از عدم توانایی این اسپورها در بقای قارچ بوده است (شیخ‌الاسلامی و همکاران، مطالب منتشر نشده)؛

در این تحقیق تفاوتی در ناحیه ITS جدایه‌های مختلف *E. betae* مشاهده نشد، اگرچه جدایه‌ها متعلق به نواحی جغرافیایی با فاصله بسیار دور بودند. چنین پدیده‌ای در قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی غیرمعمول نیست. دلایه و همکاران (Delyé et al. 1995) با استفاده از نشانگرهای RAPD و مدل ریاضی نی و لی (Nei and Lee 1979) بیش از ۹۵ درصد شباهت در میان ۱۳ جدایه *U. necator* مشاهده کردند. تنوع اللی در جمعیت‌های فرانسوی *S. fuliginea* با استفاده

بین می‌رود. در مورد میزبان، چغندر قند به عنوان یک محصول زراعی بسیار جوان و شاید جوان‌ترین عضو در بین محصولات مهم زراعی باشد که تنها حدود ۲۰۰ سال از عمر زراعی آن می‌گذرد، در عین حال که این زمان در ایران بیش از ۱۰۰ سال نیست. به این ترتیب می‌توان انتظار داشت که روابط میزبان و بیمارگر آن چنان که در مورد سایر محصولات نظیر گندم و جو و بیمارگرهایی نظیر زنگ یا سفیدک وجود دارد شکل نگرفته باشد، با عنایت به این نکته که نوع مقاومت در چغندر قند نسبت به بیماری سفیدک سطحی از نوع مقاومت افقی است و عملاً میزبان فشار انتخاب را به جمعیت بیمارگر وارد نمی‌کند تا آنرا وادار به پیدایش نژادهای جدید کند. با توجه به انگل اجباری بودن قارچ در صورتی که تغییر ژنتیکی در جمعیت قارچ روی دهد برای انتقال این واریاسیون‌ها به نسل بعد قارچ باید به تواند خود را روی گیاه در طول زمستان حفظ کند و چون در مناطق سردسیر که مکان‌های اصلی کشت چغندر قند به شمار می‌روند میزبان پایا برای قارچ وجود ندارد این واریاسیون‌های احتمالی از بین می‌روند.

(Minassian 1967; Mamluk and Weltzien 1973) و بنابراین امکان تغییرپذیری ژنتیکی قارچ از طریق فرم جنسی از بین می‌رود. هم چنین کنیدی و میسلیم‌های قارچ نمی‌توانند در فاصله زمانی طولانی بین برداشت و شروع بیماری در سال بعد بقای قارچ را تأمین کنند (شیخ الاسلامی و همکاران، مطالب منتشر نشده). علاوه بر این با توجه به فعالیت انحصاری *E. betae* روی جنس بتا، در مناطق سردسیر و معتدل میزبان پایا برای نگه‌داری قارچ در شرایط زمستان وجود ندارد. بنابراین تنها راه شروع بیماری در مناطق سردسیر و معتدل بایستی اسپورهای غیر جنسی باشند که از فواصل دور توسط باد به این مناطق منتقل می‌شوند. اگرچه این موضوع توسط دراندروسکی (Drandarewski 1978) و راپل و همکاران (Ruppel et al. 1975) مشاهده شده است اما تأیید آن در ایران نیازمند تحقیقات بیشتر است. در صورتی که این فرضیه درست باشد هر ساله کنیدی‌ها از مناطق محدودی سرچشمه می‌گیرند و به این ترتیب عملاً امکان پیدایش جدایه‌های جغرافیایی از

References

منابع مورد استفاده

- احمدی نژاد، ا. ۱۳۵۲. مطالعاتی در مورد سفیدک سطحی چغندر قند. بیماری‌های گیاهی، جلد ۹، شماره ۲، صفحه ۲۵-۲۰.
- خداپرست، س. ا. ۱۳۸۰. تحقیق در زمینه رده‌بندی و شناسایی قارچ‌های تیره *Erysiphaceae* در استان گیلان. رساله دکتری بیماری شناسی. گروه گیاهپزشکی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران. ۲۰۴ صفحه.
- Aanen DK, Kuiper TW, Hoekstra RF (2001) A widely distributed DNA polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma velutipes*. Mycological Research. 105 (3):284-290
- Bailey KL, McNiell BH (1983) Virulence of *Erysiphe graminis* f.sp.*tritici* in southern Ontario in relation to vertical genes for resistance in winter wheat. Canadian Journal of Plant Pathology 5:148-153
- Bardin M, Nicot PC, Normand P, Lemaire JM (1997) Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. European Journal of Plant Pathology 103:545-554
- Bardin M, Carlier J, Nicot C (1999) Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. Plant Pathology 48:531-540
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW (1991) Fungal molecular systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 22: 525-564
- Delyé C, Laigret MF, Corio – Costet F (1995) A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. Exp. Mycol. 19:234-237
- Delyé C, Laigret MF and Corio – Costet F (1997) RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. Phytopathology 87:670-677
- Drandarewski CA (1978) powdery mildews of beet crops, in: The Powdery Mildews. DM Spencer, ed. Academic Press, London. 565 pp

- Harrington TC, Steimel J, Workneh F, Yang XB (2000) Molecular identification of fungi associated with vascular discoloration of soybean in the north central United States. *Plant Disease*. 84:83-89
- Leijerstom B (1965) Studies on powdery mildew on wheat in Sweden II. Physiological races in Scandinavia in 1962 and 1963 and the resistance in a number of wheats to Scandinavian races. *Staten Vaxskyddasazst. Medd.* 13:171-183
- Leijerstom B (1972) Studies on powdery mildew on wheat in Sweden III. Variability of virulence in *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* due to gene recombination and mutation. *Staten Vaxskyddasazst. Medd.* 15:231-248
- Mamluk OF, Weltzien HC (1973) Untersuchungen uber die Hauptfruchtform des echten Rubenmehltaus *Erysiphe betae* (Vanha) Weltzien. III Die Ascosporen. *Phytopathologische Zeitschrift*: 78 (1):42-56
- Martines JW, Seaman WL, Atkinson TG (1984) Diseases of Field Crops of Canada. The Canadian Phytopathological Society. 160pp
- McDermott JM, Brandle U, Dutly F, Haemmerli UA, Keller S, Muller KE, Wolfe MS (1994) Genetic variation in powdery mildew of barley: Development of RAPD, SCAR, and VNTR markers. *Phytopathology* 84:1316-1321
- Minassian V (1967) Fungicidal control of *Erysiphe betae* (Vanha) Welt. Master Thesis. Am. Univ. Beirut, Fac. Agric. 76pp
- Nei M, Lee WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76:5269-5273
- O'dell M, Wolfe MS, Flavell RB, Simpson CG, Summers RW (1989) Molecular variation in population of *Erysiphe graminis* on barley, oat and rye. *Plant Pathology* 38:340-351
- Ruppel EG, Hill FJ, Mumford E (1975) Epidemiological observation on the sugar beet powdery mildew, epiphytotic in western U.S.A. *Plant Disease Reporter* 59:283-285

- Sato S, Takamatsu S, Yamamoto Y (1997) Taxonomical study of *Microsphaera pulchra* on *Cornus* spp. Based on morphological characters and PCR-RFLP analysis of the rDNA region. ICCP98 Number 2.2.37
<http://www.bspp.org.uk/iccp98/2.2/37.html>
- Vaňha J (1903) Eine neue blattkrankheit der rübe ,der echte mehltau der rübe ,*Microsphaera betae*. Z. Zuckerindustrie Böhmen 27:180
- Weltzien HC (1963) *Erysiphe betae* (Vanha) comb. nov., the powdery mildew of beets. Phytopathologische Zeitschrift 47:123-128
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR-protocols: A Guide to Methods and Applications. PP 315-322
- Wolfe MS (1967) Physiologic specialization of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* in the United Kingdom, 1964-5. Transactions of The British Mycological Society 50:631-640
- Zeller KA and Levy M (1995) Intraspecific differentiation in the powdery mildew *Erysiphe cichoracearum* determined with rDNA RFLPs. Molecular Ecology 4:277-283