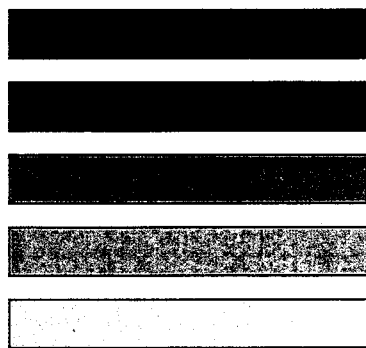


MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNY AGRÁRGAZDASÁGI MODELLEK

**Integrált agrárgazdasági modellek
a XXI. század mezőgazdaságában
Növénytermesztés**

Pepó Péter – Sárvári Mihály



Debreceni Egyetem ATC Mezőgazdaságtudományi Kar

**Debrecen
2004**

ÚJABB MEGFIGYELÉSEK A BORSÓ RAGYA BETEGSÉGKOMPLEX ETIOLÓGIÁJA ÉS A *PHOMA PINODELLA* FAJ ÖSSZEHASONLÍTÓ α -ÉSZTERÁZ IZOZIMJEINEK VIZSGÁLATAIBAN¹

KÖVICS GYÖRGY

Debreceni Egyetem ATC MTK

Növényvédelmi Tanszék

Bevezetés

A borsó ragya betegségkomplex előidézésében az *Ascochyta pisi* Lib. a leggyakoribb, mellette károsíthat egy másik *Ascochyta* faj (*A. pinodes* L.K. Jones, teleomorf: *Mycosphaerella pinodes* /Berk. & Bloxam/ Vestergem), valamint a *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones and Burch gomba a hazai borsótermesztésben. A közeli rokonságban lévő, vagy nagyon kicsi morfológiai különbséget mutató fajok elkülönítése tapasztalt patológusok számára is problémát jelent. Vizsgálataink során a pillangósokról (szója, borsó) izolálható *Phoma sojicola* és *P. pinodella* elkülönítésére a hagyományos mikroszkópi, morfológiai, fiziológiai módszerek mellett felhasználtuk az izozim (izoenzim) analízist is. A *Phoma sojicola* olyan faj, amely morfológiai tekintetben leginkább a *Phoma pinodella*-hoz áll a legközelebb, de néhány morfológiai és fiziológiai sajátosságuk, továbbá α -észteráz izozim aktivitásuk alapján is önálló fajoknak tekintendők, előbbi mint specifikusan a szója, utóbbi mint a szója és a borsó kórokozója.

A borsó integrált növényvédelmét megalapozó pathológiai, etiológiai és növénykórtani ellenállósági vizsgálatokat végeztünk a 2001-2003. években.

A borsó ragya gombás megbetegedései – a hazai szakirodalomban általánosan *Ascochyta*-fajokként ismert kórokozói – a korábbi évek száraz, aszályos időjárása, valamint a vetőmagcsávázás gyakorlata miatt jelentősen visszaszorultak.

Irodalmi áttekintés

A borsóragya betegségkomplex fajai között az *Ascochyta pisi* Lib. tekinthető hazánkban a leggyakoribbnak, amely tipikus levél- és hüvelyfoltosságot (ragya) okoz, és inkább minőségi-, mint mennyiségi veszteségek jelentkeznek kártétele nyomán. A másik *Ascochyta* faj (*A. pinodes* L.K. Jones, teleomorf: *Mycosphaerella pinodes* /Berk. & Bloxam/ Vestergem), valamint a borsó fómás szártő- és gyökérrothadását is okozó (*Phoma pinodella* /L.K. Jones/ Morgan-Jones and Burch) gomba eddig csak sporadikusan fordultak elő a hazai borsótermesztésben. Ez utóbbi kórokozót gyakran még ma is a szinoním néven (*Ascochyta pinodella* L.K. Jones) említik (Kövics 1994/a, 2000).

¹ „Takarmányborsó integrált növényvédelme, a fehérje takarmánybázis biztosítása” c. Széchenyi NKFP program 2001-2003. részprogramról

A *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & Burch a *Phoma* nemzetség Sect. *Phyllostictoides* (Zherbele ex Boerema) Boerema /1997/ szekciójának tagja. Magfertőző, talajlakó gomba, a borsó szártövi rothadásának és levélfoltosságának, a vöröshere feketeszárúság betegségének, valamint a szója levél- és hüvelyfoltosságának – a *Phoma sojicola* (Abramov) Kövics, de Gruyter & Aa és a *Phoma exigua* Desmaz. var. *exigua* mellett (Kövics et al., 1999) – előidézője. Számos más pillangósvirágú növényről, továbbá egyéb növénycsaládok fajairól is gyakran izolálják.

A *Phoma* genuson belüli fajok elkülönítésének eredeti kritériuma a konídiumtartó és a konídium morfológiáján, valamint a károsított gazdanövény együttes leírásán alapult. Néhány esetben a konídium ontogéniát is figyelembe vették, azonban ezt a tulajdonságot nehéz interpretálni, továbbá gyakran nem konzekvens eredményekhez vezethet (Boerema & Bollen, 1975, Monte & Garcia-Acha, 1988/a, Sutton & Sandhu, 1969). Néhány szerző fontosnak tart olyan jellemvonásokat is, mint a konídium-válaszfal képzése (Boerema & Dorenbosch, 1970), amely néha kapcsolatban áll a konídium csírázással (Monte & Garcia-Acha, 1988/b), ezt azonban faji szinten nehezen lehet összehasonlítani, mivel a konídiogén sejt különböző fejlettségű konídiumokat tartalmazhat. Boerema és Höweler (1967) javasolták olyan fiziológiai jellemzők bevezetését is a *Phoma* taxonómiába, mint a másodlagos metabolitok szekréciója (pl. "E" metabolit), meghatározott táptalajon történő kristályképzés és a telep-növekedési jellemzők, újabban pedig számos olyan fiziológiai és biokémiai vizsgálatot is elvégeztek, amelyek leginkább a baktériumok és élesztőgombák taxonómiájában használatosak (Monte et al., 1990, 1991).

A *Phoma pinodella* identifikálása stabil morfológiai jegyek alapján lehetséges, amelyeket burgonya-dextróz agaron (White és Morgan-Jones, 1987), illetve zabliszt, maláta és meggy agar összehasonlító *Phoma* táptalajokon, standardizált feltételek mellett lehet elvégezni (Dorenbosch, 1970; Noordeloos et al., 1993). A klamidospórák keletkezése, valamint maláta agar táptalajon történő jellegzetes faág-szerű (dendritic) kristályok keletkezése (pinodellalide A és B) fontos sajátossága a gombának (Kövics et al., 2003).

A közeli rokonságban lévő, vagy nagyon kicsi morfológiai különbséget mutató fajok elkülönítése tapasztalt patológusok számára is problémát jelent. Vizsgálataink során a hagyományos mikroszkópi, morfológiai, fiziológiai módszerek mellett felhasználtuk az izozim (izoenzim) analízist is. A gomba izozim vizsgálatokban a legelterjedtebben alkalmazott módszer az (α és/vagy β)-észteráz izozimek meghatározása. Az izozim egyike a növénykórtanban alkalmazott számos lehetőségnek, amely hatékony biokémiai módszer, különösen a fajok meghatározásában és elkülönítésében (Nygaard et al., 1989, Bonde et al., 1993, Arulappan, 1994).

A gél-elektroforézissel meghatározott α -észteráz izozim mintázat elősegítheti az egymáshoz közelálló tenyészbélyegeket mutató *P. pinodella* és közeli, rokon *Phoma* fajok elkülönítését (Kövics, 1994/b, Kövics és de Gruyter, 1995).

1999 és 2001-ben az OMMI egyik fajtakísérleti állomásán (Debrecen-Kismacs) a borsó fajtajelöltek fuzáriumos hervadással (*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*) szembeni ellenállóság vizsgálatára szolgáló monokultúras provokációs kísérletében lépett fel a fómás szártő- és gyökérrothadás fertőzés (a többségében hervadás-ellenálló genotípusokon) olyan mértékben, amely lehetővé tette a *Phoma pinodella*-val szembeni rezisztenciaviszonyok megállapítását. A többségében fuzáriumos hervadással szemben ellenálló borsófajták fómás szártő- és gyökérrothadás iránti fogékonyságában jelentős különbségeket tapasztaltunk (1,0-90,0 % közötti fertőzött tő %). A zöldborsó fajtajelöltek közül a Soma és a Belin (Bella) mutatta a legnagyobb ellenállóságot, míg a legfogékonyabbnak az Exzellenz, a Margó és a Tafila fajták bizonyultak. A szárazborsó fajtásorból a Cebeco 1166, 1463, 1471 és 1475 tűntek ki rezisztenciájukkal, ugyanakkor a legfogékonyabb genotípusok a Pyramide, a st. Luzsányi és a 614/98 fajtajelöltek voltak (Gergely et al., 1999).

Ezen vizsgálatokból származó, valamint korábbi hazai, holland és lengyel törzsgyűjteményi izolátumokkal végeztünk a faji diagnózist elősegítő α -észteráz izozim vizsgálatokat.

Anyag és módszer

Laboratóriumi izozim identifikáció

Izoláció

A *Phoma* fajok identifikálására általánosan elfogadott morfológiai és biokémiai módszert alkalmaztuk (Nordeloos et al., 1993) és megvizsgáltunk 18 piknidiomos gombaizolátumot, melyek a fertőzött borsó, szója, valamint más pillangós növényről származtak.

Telep morfológia

5 mm átmérőjű micélium korongokat vágunk ki, melyek az aktív növekedésű telepek széléből származtak, ráhelyeztük egy-egy Petri csésze különböző táptalajokat tartalmazó felületére. A táptalajok: zabliszt agar (oatmeal agar, OA: 20 g zabpehely 0,5 l csapvízben megfőzve, átszűrve és 1 l-re csapvízzel kiegészítve, 15 g Oxoid agar No.3 hozzáadásával), maláta agar (malt agar, MA: 40 g malt extract Oxoid L 39, 15 g Oxoid agar No.1, 1 l csapvízben) és meggy-extrakt agar (cherry decoction agar, CA: 300 ml meggy juice 500 g friss meggyből készítve, 1,3 l csapvíz, 27,5 g Oxoid agar No.3). Egy hétig sötétben, 20 °C-on végzett inkubáció után a telep átmérőjét megmértük és a micéliumszövedék (légmicélium és a telep) színét, valamint a tenyészet fonáki jellemzőit rögzítettük Rayner (1970) színskálájának felhasználásával. Egyéb morfológiai jellemzőket is (a telep alakja, légmicélium jellege, esetleges szektorképzés, jégkristály („ice-fern”) képzés) feljegyeztünk. Ezt követően a Petri csészéket a piknidium képződését elősegítő 13 órás NUV (black light fluorescent lamp, General Electric) megvilágítású, 11 órás sötét periódusú ciklikus inkubálásnak tettük ki. Két hét elteltével a telepek jellemzőit ismét

feljegyeztük és három hét után a piknídiumok, konídiumok és egyéb struktúrák (pl. klamidospórák) morfológiáját tanulmányoztuk és részletes rajzokat készítettünk, valamint mikroszkópi méréseket végeztünk. A konídiumok méretét 30 mérés alapján határoztuk meg, a statisztikai értékelés alapján meghatározott Q-értékek a konídiumok hosszúság - szélesség arányát tükrözték.

A poliakrilamid-gél-elektroforézis (PAGE) technika

Vizsgálatainkban a Pharmacia LKB Biotechnology AB, Sweden gyártmányú PhastSystem mikro-gél elektroforézis rendszerét alkalmaztuk a gomba α -észteráz izozim analízisben Arulappan (1994) módszere szerint.

A micélium előállítása és kinyerése

100 ml Subouraud-féle folyékony táptalajt töltöttünk 200 ml -es Erlenmeyer lombikokba, majd sterilizáltuk. A szilárd táptalajon (MA vagy CA) nőtt 3 - 4 napos tiszta tenyészetekről légmicélium darabkákat vittünk át a lombikokba. A lombikokat 25°C hőmérsékleten, sötétben, vízfürdős rázógépen (80 - 120 rpm) 5 - 7 napig inkubáltuk. Hosszabb ideig tartó inkubáció során már a vizsgálatot zavaró piknídium képződésére is számítani lehet. A tápfolyadék maradványait szűrőpapíron keresztül, vákuum infiltrációval lombikba gyűjtöttük. A szeparált és megmért micéliumot - 80°C hőmérsékleten az enzim extrakcióig tároltuk.

Enzim extrakció az elektroforézishez

A fagyasztott micéliumot az extrakciót megelőző éjszakára 4°C hőmérsékletű hűtőszekrénybe helyeztük, hogy felolvadjon. Az egész eljárás kontaminációval és magasabb hőmérséklettel szemben igen érzékeny, ezért elengedhetetlen, hogy a minták kezelését klinikai kesztyűben, darált jég között, előhűtött dörzscsészékkel, dörzsrudakkal, spatulákkal stb. végezzük. Finom kvarchomokot és pufferoldatot adtunk a mintákhoz és azokat a micélium sejteinek roncsolása és a gombaenzimek sejtekből való szabaddá tétele érdekében alaposan szétdörzsöltük, 10 perces centrifugálás (12 000 rpm) után a felülúszót steril pipettahegyekkel összegyűjtöttük.

PhastSystem eljárás és festés

A teljesen automatikusan programozott PhastSystem elektroforetikus készülék különböző izozimek meghatározására alkalmas. A minták előkészítése, a felhasználásra kész mikrogél (PhastGel gradient 8-25) valamint a puffer csíkok (PhastGel native buffer strips) gélagyra helyezése, továbbá a mintaátvivő applikátornak a tartójába történő felhelyezése után az elektroforézis elkezdhető (Richardson et al., 1986). A fehérjék nagyságuknak és töltésmennyiségüknek megfelelően különválnak a grádiens zónában. A festés és a szubsztrátum hozzáadása közvetlenül az elektroforézis befejeződése után történik. Az EDTA 0,03%, Fast Blue RR-salt 0,06% és az előzetesen 1 ml acetonban feloldott 0,04% α -naphthyl-acetate komponenseket 50 ml 100mM foszfát pufferben (pH 7,4) oldottuk fel (Karssen, 1991), s ebben mintegy 15 perc időtartamig, 37°C - on történt az expozíció. A gél megfestődése után a sávok további diffúziójának elkerülésére a fixáló oldatban (ecetsav:glicerol:tridesztillált víz = 10 : 8 : 82) elvégzett 5 perc időtartamú rögzítéssel az eljárás befejeződik. Ezt követően a zymogramot szobahőmérsékleten megszáritottuk és diakeretbe foglaltuk.

Az eredmények értékelése

A minták izoenzim sávmintázata (bands) különbözik azok genetikai jellemvonásainak megfelelően. Meghatározhatók az enzimek gélben való mozgásának relatív értékei (Rf), ahol

$$Rf = bc/bf$$

bc = egy adott sáv elmozdulási távolsága,

bf = a puffer elmozdulási távolsága (Gottlieb & Hepden, 1966).

Az adatok összehasonlításával meg lehet határozni egy-egy izolátum alapján - az izolátumok közötti variabilitás figyelembe vételével - az adott fajra adaptálható általános sávmintázatot. Az eljárás megfelelő nagyságú adatbázis és scanner alkalmazásával computerizálható.

Eredmények

A borsóról izolálható *Phoma* fajok identifikálása morfológiai vizsgálatokkal

A *Phoma sojicola* és a közeli rokonságban lévő *Phoma pinodella* kórokozók törzseit komplett morfológiai analízissel elemeztünk és összehasonlítottuk a rendelkezésre álló referencia izolátumokkal. A *Phoma pinodella* legitim rendszertani helyét az 1. ábra mutatja.

1. ábra

A *Phoma pinodella* modern taxonómiája

Ország: Fungi (gombák)	Törzs: Mitospórás gombák (Deuteromycota, konídiumos gombák) (<i>sensu</i> Hawksworth et al., 1995)
	Osztály: Coelomycetes
(<i>sensu</i> Ainsworth, 1963)	
[Rend: Sphaeropsidales (<i>sensu</i> Saccardo, 1878)]	Genus: <i>Phoma</i> Sacc. (1880)
	Szekció:
<i>Phyllostictoides</i> Zherbele ex Boerema (1997) Faj: <i>Phoma pinodella</i> (L.K. Jones)	szinonim:
Morgan-Jones & Burch (1987)	
<i>Ascochyta pinodella</i> L.K. Jones (1927)	
<i>Phoma trifolii</i> E.M. Johnson & Valteau (1933)	
<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> [L.K. Jones/ Boerema]	
apud	Boerema, Dorenbosch & Leffring (1965)

A *Phoma sojicola* önálló faj, amely nem azonos a *Phoma exigua* var. *exigua*-val, attól már morfológiai sajátosságai alapján is jól elkülöníthető. A *Phoma* ('*Ascochyta*') *sojicola* CBS 113.53 izolátuma morfológiailag különbözik a többitől. A morfológiai jellemzői részben hasonlítanak a *Phoma pinodella*-hoz, de a piknídiumok mérete és a csak egysejtű konídiumok gyakran kisebbek, továbbá nem fordul elő jégkristály képzés MA táptalajon.

A D/023 izolátumot (amely korábban *Ascochyta sojicola*-ként volt identifikálva a szójáról történt izolálás és a részletesebb morfológiai, biokémiai és izoenzim vizsgálatot megelőzően) átsoroltuk a *Phoma pinodella* fajba.

Szója magvakról három izolált tiszta tenyészetet készítettünk (D/053, D/054, D/056), melyek *Phoma sojicola*-ként kerültek identifikálásra. Ezek az izolátumok képezhetnek kétsejtű konídiumokat is és ezen izolátumok egyike egy alkalommal jégkristály képzést is mutatott.

A *Phoma sojicola* olyan faj, amely morfológiai tekintetben leginkább a *Phoma pinodella*-hoz áll a legközelebb, de attól karakteresen elkülönül. A *Phoma sojicola* végleges meghatározására és taxonómiai helyzetének tisztázására az eredeti herbáriumí növényanyag mintáinak megvizsgálása, részletes morfológiai és mesterséges inokulációs vizsgálatok elvégzése alapján került sor (Kövics et al., 1999).

A poliakrilamid-gél-elektroforézis (PAGE) vizsgálat eredményei

Az α -észteráz izoenzim vizsgálatok (melyek 6 sorozatban, 18 izolátummal történtek) azt mutatják, hogy az eljárás a *Phoma sojicola* és *P. pinodella* fajok elkülönítésére és jellemzésére megfelelően alkalmazhatók.

Különböző forrásokból származó (*Phaseolus*, *Pisum*, *Glycine*, *Triticum*) *Phoma pinodella*, valamint *Phoma sojicola* (*Glycine*) izolátumokat tanulmányoztunk (1. táblázat).

1. táblázat

A vizsgált izolátumok jellemzői

Faj	Izolátum	Gazdanövény	Ország	Izolálás
<i>Phoma</i> (syn.: <i>Asco-</i> <i>chyta</i>) <i>soji-</i> <i>cola</i>	D/053	<i>Glycine max</i> mag	H	1993
	D/054	<i>Glycine max</i> mag	H	1993
	D/056	<i>Glycine max</i> mag	H	1993
	CBS 113.53	<i>Glycine max</i>	D	1953
<i>Phoma</i> <i>pinodella</i>	D/023	<i>Glycine max</i>	H	1989
	D/082	<i>Pisum sativum</i> hüvely	...H	1994
	D/095	<i>Pisum sativum</i>	H	1999
	GA-98	<i>Pisum sativum</i>	PL	N.a.*
	GA-108/a	<i>Pisum sativum</i>	PL	N.a.*
	GA-108/b	<i>Pisum sativum</i> hüvely	PL	N.a.*
	PD 74/396	N.a.*	N.a.*	N.a.*
	PD 77/165	<i>Pisum sativum</i>	NL	1977
	PD 81/729	<i>Pisum sativum</i>	NL	1981
	PD 86/459	<i>Triticum aestivum</i>	...NL	1986
	Ph-5	<i>Pisum sativum</i>	PL	N.a.*
	Ph-14	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PL	N.a.*
	Ph-15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PL	N.a.*
	Ph-32	<i>Pisum sativum</i> szár	PL	N.a.*

* Nincs adat

A Phoma sojicola és a *Phoma pinodella* α -észteráz sávjai:

A *Phoma sojicola* és a *Phoma pinodella* α -észteráz izoenzim mintázatai (zymogram) alapján összehasonlító táblázatot készítettünk az identifikációs munka elősegítésére (2. táblázat).

2. táblázat

A *Phoma sojaicola* és a *Phoma pinodella* fajok α -észteráz izoenzim mintázatának összehasonlító értékei

Faj	Izolátum	Rf értékek									
		0,60	0,64	0,69	0,75	0,80	0,82	0,85	0,88	0,91	0,93
		-0,63	-0,67	-0,73	-0,79	-0,82	-0,85	-0,88	-0,91	-0,93	
<i>Phoma sojaicola</i>	D/053					+					
	D/054				+			+		+	
	D/056				+		+				
	CBS 113.53				+	+	+				
<i>Phoma pinodella</i>	D/023					+	+	+			
	D/082	+			+	+	+	+	+		
	D/095	+			+		+	+	+		
	GA-98				+			+	+		
	GA-108/a				+	+	+	+	+		
	GA-108/b				+	+	+	+	+		
	PD 74/396				+		+				
	PD 77/165	+			+		+		+		
	PD 81/729	+			+		+		+		
	Ph-5	+			+		+		+		
	Ph-14				+	+	+		+		
	Ph-15				+		+		+		
	Ph-32				+		+		+		

A *Phoma sojaicola* izolátumai az Rf 0,60-0,63 tartományban nem képeztek sávot, míg ez a tulajdonság a *Phoma pinodella* izolátumok között variábilis jellemvonás volt. A *P. sojaicola* és a *P. pinodella* az Rf 0,75-0,79 tartományban – a D/023 izolátum kivételével – valamennyi izolátumnál tartalmaztak α -észteráz izoenzim sávot. Az Rf 0,80-0,82; 0,82-0,85 és a 0,85-0,88 tartományban a mintázat előfordulása az izolátumtól függően változó tulajdonság. A *P. pinodella* az Rf 0,88-0,91 tartományban a PD 74/396 izolátum kivételével minden esetben, míg a *P. sojaicola* faj izolátumainál sohasem mutatta α -észteráz izozim jelenlétét. A *P. sojaicola* D/054 izolátumnál az Rf 0,91-0,93 tartományban sáv jelenléte volt detektálható.

A *Phoma sojaicola* CBS 113.53 izolátuma genetikailag meghatározott α -észteráz izoenzim összetétele és a saját *P. sojaicola* izolátumaink nyilvánvalóan különböznek a *Phoma pinodella*-étől, a táblázat hozzásegített azon izolátumok pontos meghatározásához is, melyeket azt megelőzően *Phoma (Ascochyta) sojaicola*-ként identifikáltak.

Összefoglalás

A *Phoma sojicola* és a *Phoma pinodella* fajok egymástól tenyészbélyegeik, morfológiai sajátosságaik, jégkristály-képzési jellemzőik alapján – a megbetegített szóján látható szimptomatológiai hasonlóságuk ellenére – egymástól jól elkülöníthetők. A *Phoma sojicola*, *Phoma pinodella* α -észteráz izozim vizsgálatok megerősítik a fajok közötti genetikai különbségeket. Az *Phoma sojicola* és a *Phoma pinodella* egymáshoz közelálló fajok, melyek néhány morfológiai és fiziológiai sajátosságuk, továbbá α -észteráz izozim aktivitásuk alapján is önálló fajoknak tekintendők, előbbi mint specifikusan a szója, utóbbi mint a szója és a borsó kórokozója.

Summary

Among the pea foliar diseases caused by *Ascochyta* and *Phoma* species occur frequently *Ascochyta pisi* Lib., *A. pinodes* L.K. Jones (teleomorph: *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Bloxam) Vestergén), and *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones and Burch in the Hungarian pea production. Delimitation of very closely related species, which have very small morphological differences, rather difficult even for experienced plant pathologists. During our studies for delimitation we used isolates of *Phoma sojicola* és *P. pinodella* from different papilionaceous plants (soybean, pea) by conventional microscopic, morphological and physiological methods, as well as isozyme analysis. *Phoma sojicola* is a species which morphologically resembles to *Phoma pinodella* but they can be considered independent species on the base of some morphological and physiological characters, moreover their α -esterase isozyme activities, the previous as a specific soybean and the latest both soybean and pea pathogens.

Irodalom

- Arulappan, F.X. (1994): Methodology of fungal isozyme analysis using the PhastSystem micro-gel electrophoresis. Versl.Meded.plziektenk.Dienst Wageningen, Annual Report 1993, Diagnostic Centre, Plant Protection Service Wageningen, Netherlands, No. 173 60-66. p.
- Boerema, G.H. & Bollen, G.J. (1975): Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. *Persoonia* 8 111-144. p.
- Boerema, G.H. & Dorenbosch, M.M.J. (1970): On *Phoma macrostomum* Mont., a ubiquitous species on woody plants. *Persoonia* 6 49-58. p.
- Boerema, G.H. & Höweler, L.H.(1967): *Phoma exigua* Desm. and its varieties. *Persoonia* 5 15-28. p.

- Monte, E., Bridge, P.D. & Sutton, B.C. (1991): An integrated approach to Phoma systematics. *Mycopathologia* 115 89-103. p.
- Noordeloos, M.E., de Gruyter, J., Eijk. G.W. & Roelijmans, H.J. (1993): Production of dendritic crystals in pure cultures of Phoma and Ascochyta and its value as a taxonomic character relative to morphology, pathology and cultural characteristics. *Mycol. Res.* 97 (11) 1343-1350. p.
- Nygaard, S.L., Elliott, C.K., Cannon, S.J. and Maxwell, D.P. (1989): Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology* 79: 773-780. p.
- Richardson, B.J., Baverstock, P.R. & Adams, M. (1986): Allozyme Electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Academic Press Inc., San Diego, California 92101.
- Sutton, B.C. & Sandhu, D.K. (1969): Electron microscopy of conidium development and secession in *Cryptosporiopsis* sp., *Phoma fumosa*, *Melanconium bicolor* and *M. apiocarpum*. *Can.J.Bot.* 47 745-749. p.
- White, J.F. & Morgan-Jones, G. (1987): Studies on the genus *Phoma*. VI. Concerning *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Mycotaxon* 28, 241-248.

- Bonde, M.R., Michales, J.A. & Peterson, G.L. (1993): The use of isozyme analysis for identification of plant pathogenic fungi. *Plant Disease* 77: 961-968. p.
- Dorenbosch, M.M.J. (1970): Key to nine ubiquitous soil-borne Phoma-like fungi. *Persoonia* 6 (1) 1-14.
- Gergely L. - Hertelendy P. - Kövics Gy. (1999): Zöld- és szárazborsófajták viselkedése a fómás szártő- és gyökérrothadással (*Phoma pinodella*) szemben. 4. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum Debrecen, 1999. november 3-4. 18.
- Gottlieb, D. & Hepden, P.M. (1966): The electrophoretic movement of proteins from various *Streptomyces* species as taxonomic criterion. *J.Gen.Microbiol.* 44: 65-107.p.
- Karssen, G. (1991): Enzym elektroforese mer wortel knobbel nematoden (genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887). Internal report of the Dutch Plant Protection Service, Wageningen, the Netherlands.
- Kövics Gy. (1995): Megjegyzések az *Ascochyta* - *Phoma* - *Phyllosticta* növénypatogén gombák taxonómiai kérdéseihöz. *Növényvédelem* 31 (7) 307-315.
- Kövics Gy. (2000): Növénybetegséget okozó gombák névtára. *Mezőgazda Kiadó, Budapest* 255 pp.
- Kövics Gy. - Gruyter, J. de (1995): A szóján előforduló néhány *Phoma* faj észteráz izoenzim mintázatának összehasonlító vizsgálata. *DATE Tudományos Közleményei* 31: 191-207.
- Kövics, G.J. - Gruyter, J.de - Aa, H.A. van der (1999): *Phoma sojaicola* comb. nov. and other hyaline-spored coelomycetes pathogenic on soybean. *Mycol. Res.* 103 (8) 1065-1070.
- Kövics, G.J. - Rai, M.K. - Pandey, A.K. (2003): Taxonomy and metabolite production of *Phoma* species. in: Rai, M.K. (ed.): *Current Trends in Mycological Research.* (in press)
- Kövics, Gy.J. (1994/a): Identification of *Phoma* and *Ascochyta* species pathogenic to pulses in Hungary. Final Report. Dutch Plant Protection Service, Diagnostics and Quarantine Department, Mycology Section, Wageningen, The Netherlands, (8 January - 31 March 1994) Co-operation in Science and Technology with Central and Eastern European Countries "Go West" Scholarship No. CIPA 3510PL926238. 12 pp.
- Kövics, Gy. (1994/b): Fungal esterase isozyme analysis in the taxonomy of soybean pathogen *Ascochyta* and *Phoma* species. *British-Hungarian Scientific Seminar, Debrecen, 29 November, 1994.*
- Monte, E. & Garcia-Acha, I. (1988/a): Conidiogenesis in *Phoma betae*. *Trans.Brit.mycol.Soc.* 90 659-662. p.
- Monte, E. & Garcia-Acha, I. (1988/b): Germination of *Phoma betae* conidia. *Trans.Brit.mycol.Soc.* 91 133-139. p.
- Monte, E., Bridge, P.D. & Sutton, B.C. (1990): Physiological and biochemical studies in *Coelomycetes*. *Phoma. Studies in Mycology* 32 21-28. p.