

SZÓJÁN ELŐFORDULÓ *PHOMA*-SZERŰ GOMBÁK FILOGENETIKAI VIZSGÁLATA

Irinyi László – Kövics György – Sándor Erzsébet
Debreceni Egyetem, Agrár-és Műszaki Tudományok Centruma,
Növényvédelmi Tanszék,
Debrecen

Összefoglalás

Vizsgálataink során a szóján (*Glycine max*) előforduló *Phoma*-szerű gombák molekuláris taxonómiai vizsgálatát végeztük el genetikai markerek szekvenciáinak elemzésével. A szóján előforduló, szimptomatológiai és morfológiai hasonlóságuk miatt egymástól alig megkülönböztethető *Phoma*-szerű fajok (*Phoma pinodella*, *Phoma sojicola*, *Phyllosticta sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*) taxonómiája terén a mai napig nagy a bizonytalanság.

Vizsgálatainkhoz olyan filogenetikai markert kerestünk, amely már megbízhatónak bizonyult mind a fajok közötti, mind a fajon belüli csoportok elkülönítésére más gombataxonoknál. Ezek közül választásunk az élővilágban erősen konzervatív, translációs elongációs faktort kódoló génre (*tef1*) esett, melynek intron régiója, az rDNS-ben található (Internal Transcribed Spacer=ITS) szekvenciák mellett az egyik leggyakrabban alkalmazott alternatív filogenetikai marker.

Vizsgálatainkban a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Tanszékén található törzsgyűjteményből 11 *Phoma* faj 24 izolátumát, köztük a szóján előforduló három faj hét izolátumát vizsgáltuk. Először minden egyes faj morfológiai és élettani jellegzetességeik alapján azonosítottunk, majd elvégeztük a molekuláris vizsgálatokat.

Mind az ITS, mind *tef1* régiók parsimony típusú filogenetikai elemzése során azt az eredményt kaptuk, hogy az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba, a *Phoma sojicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött.

Bevezetés

A Coelomycetes osztályba tartozó *Phoma* genus világszerte elterjedt, többségében fitopatogén, opportunista parazita vagy szaprofiton életmódot folytató fajokat foglal magába. Napjainkig mintegy 2000 *Phoma* faj azonosítottak világszerte (Boerema és mtsai, 2004).

Napjainkig a *Phoma* fajok rendszerezése a többi gombacsoporthoz hasonlóan nagyrészt 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* és *in vitro* körülmények között stabil rendszertani bélyegek alapján rendszerezni a *Phoma* fajokat, amelyeket standardizált körülmények között vizsgált telepjellemzőkkel egészítettek ki. Fontosnak találták a piknídium falának szerkezetét, valamint azt, hogy a piknídium rendelkezik-e sertével (setae). A genus fajainál a piknídium morfológiája bizonyult a legfontosabb hasznosítható bélyegnek az egyes szekciók elkülönítésénél. A piknídiumok rendszerint csupaszok, de esetenként a serték (setae) jelenléte és a piknídiumfal morfológiája szintén taxonómiai jelleggel bír. Ugyancsak taxonómiai jelentőséget tulajdonítanak a dictyoclamidospóra meglétének is. Tekintettel arra, hogy a piknídiumok és a konídiumok nagysága és alakja változó a tenyésztési jellemzők nélkülözhetetlennel bizonyultak a fajok vagy fajon belüli taxonok elkülönítésében. Néhány másodlagos anyagcseretermék szintén specifikus tulajdonság lehet egy fajra nézve. Jellegzetes mintázatú kristályképződés vagy kémiai reakcióval (NaOH teszt) kimutatható pigmentképzés („E” metabolit) segítik a gyors azonosítást (van der Aa és mtsai, 1990; Noordeloos és mtsai, 1993). A jelenséghez szükséges mutációs történések minimum számát minden egyes lehetséges törzsfára megadja és azok közül kiválasztja azokat, amely a legkevesebb mutációs változást tartalmazzák. Ezek a fák lesznek a legoptimálisabbak

A '90-es évek közepén a molekuláris biológia és a biokémia fejlődésének köszönhetően izoenzimeket (fehérje polimorfizmus) próbáltak meg molekuláris markerként használni a *Phoma* genusban, hogy elkülönítsék a morfológiailag azonos megjelenésű, de feltételezhetően eltérő fajhoz tartozó izolátumokat (Monte és mtsai, 1990, 1991; Kövics és de Gruyter, 1995; Saniewska és Prus-Glowacki, 1998; Kövics, 2004).

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

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

A filogenetikai célú szekvencia összehasonlítás nagyrészt olyan genom szakaszok vizsgálatán alapul, amelyek minden élőlényben előfordulnak, és

meglehetősen konzervatívak maradnak az evolúció során, mint pl. a riboszómális géneket kódoló szekvenciák. Ezek közül nagyon sok tudományos munka alapszik az úgynevezett ITS (Internal Transcribed Spacer) régió vizsgálatán, annak köszönhetően, hogy ennek a régiónak a nukleinsav sorrendje nagy variabilitást mutat más régiókhöz képest, így alkalmas mind a fajon belüli, mind a fajok közötti filogenetikai kapcsolatok felderítésére. Lutzoni és mtsai (2004) szerint a gombák körében végzett filogenetikai vizsgálatok 83,9%-a a riboszómális géneket kódoló tandem szekvenciák vizsgálatán alapult. A molekuláris biológiában újabb és újabb géneket (markereket) írnak le, amelyek tulajdonságaikból adódóan alkalmasak lehetnek filogenetikai kapcsolatok elemzésére.

Az alábbiakban a szóján (*Glycine max*) előforduló *Phoma*-szerű fajok molekuláris taxonómiáját kívánjuk tárgyalni nukleinsav szekvenciák alapján, mivel a szóján előforduló, szimptomatológiai és morfológiai hasonlóságuk miatt egymástól alig megkülönböztethető *Phoma*-szerű fajok taxonómiája terén meglehetősen nagy a bizonytalanság. Vizsgálatunk során a következő szóján előforduló fajokat vizsgáltuk morfológiai tulajdonságok és molekuláris módszerek segítségével.

Phoma pinodella

A gombát először L.K.Jones írta le 1927-ben *Ascochyta pinodella* néven. A faj taxonómiai korrekciójára Morgan Jones és Burch (1987) vállalkoztak. Szinonimjai között található a ma is előforduló *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L.K. Jones) Boerema (Boerema és mtsai, 1965) név. A feltehetően kozmopolita faj a *Pisum sativum*, *Trifolium pratense* és más pillangós virágúakon károsít, a vöröshere szárfeketedésének, valamint borsó szártőrothadás és levélfoltosság betegségének az előidézője. Gyakran izolálható más családokba tartozó növényekről is (Noordeloos és mtsai, 1993).

Noll (1939) Németországban a Fabaceae fajok szártőrothadás és hervadás betegségét vizsgálva három *Ascochyta pinodella* (= *Phoma pinodella*) izolátumot nyert borsó, lóbab és szója növényekről, melyek mindhárom növényre egyaránt patogének voltak.

A *Phoma pinodella* szóján való hazai károsításáról egy magkórtani vizsgálat alkalmával regisztrált kismérvű előfordulásától eltekintve (Simay, 1992) nincsenek megbízható adatok.

Phoma sojicola

A szóján előforduló, általában vetőmaggal terjedő, levél- és hüvelyfoltosságot, valamint szártőrothadást és hervadás betegségét vizsgálva Kövics és mtsai (1999) írta le a fajt először a Mycological Research-ben. Patogenitási tesztekben, a szóján előforduló különböző

Phoma (*P. exigua* var. *exigua*, *P. pinodella*, *Phyllosticta sojicola*) fajok által okozott tünetek nagyban hasonlóak a *Phoma sojicola* szóján előidézett tüneteikhez (Kövics és mtsai, 1999). A morfológiai jegyei alapján a fajt a *Phoma* genuson belül a *Phoma* section *Phyllostictoides* csoportba lehet elhelyezni. A faj morfológiai tulajdonságai alapján erősen hasonlít a *Phoma pinodella* fajhoz, bár az utóbbi több piknidiumot képez, illetve egyes izolátumoknál kristályképződés is megfigyelhető (Noordeloos és mtsai, 1993). Azonban a *Phoma pinodella* szóján való előfordulásáról a szakirodalom csak kevés adattal rendelkezik. Noll (1939) 3 olyan *Phoma pinodella* fajt izolált, borsóról, disznóbabról (*Faba vulgaris*) és szójáról, amelyek a szójára patogénnek bizonyultak. A *Phoma sojicola* fajt a *Phoma exigua* var. *exigua* fajtól a következők alapján lehet elkülöníteni: a *Phoma sojicola* klamidospórákat képez, a telep növekedése szabályos, illetve a NaOH teszt negatív. A Kövics és mtsai (1995) által végzett α -észteráz izoenzim vizsgálatok szintén alátámasztják a *Phoma sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* morfológiai alapon meglévő elkülönülésüket.

***Phyllosticta sojicola* Massolongo teleomorf: *Pleosphaerulina* (= *Pringsheima*, fide von Arx & Mueller) *sojicola* Miura**

A fillosztiktás rák és levéltőfoltosság első leírója *Phyllosticta sojaecola*-ként Massalongo (1900) volt. A *Phyllosticta glycinea* (mint a „*P. glycineum*”) Tehon-Daniels (1927) gomba a *P. sojicola* szinonimjának tekinthető (Farr és mtsai, 1989; Sinclair és Backman, 1989). Hara (1930) a *Phyllosticta sojicola* („*sojaecola*”) Massal.-teleomorfjának tekinti a *Pleosphaerulina sojicola* („*sojaecola*”) (Massal.) Miura (1921)-t. Kurata (1960) vizsgálatai szerint azonban nem volt egészen nyilvánvaló, hogy ez a gomba a *Pleosphaerulina sojicola* anamorfja. A *Pleosphaerulina sojicola* első auktora, valamint helyes névhasználata sem teljesen tisztázott, ugyanis Hara (1930) a „*Pleosphaerulina sojaecola*” (Massal.) „Miura” formát, Kurata (1960) pedig a „*Pleosphaerulina sojaecola* „Miura”-t használja. Minthogy az eredeti leírás számunkra nem volt hozzáférhető, ezért jelen munkánkban a szerzői prioritás kérdése nem válaszolható meg. A szakirodalom az auktor névhasználat tekintetében is megosztott: az előbbi formát használják pl. Sinclair és Shurtleff (1975); Sinclair és Backman (1989), az utóbbit Farr és mtsai (1989). A van der Aa (1973) szerinti *Phyllosticta* genus koncepcióban a *Phyllosticta* anamorf genus tagjai (amennyiben van teleomorfjuk) a *Guignardia* Viala & Ravaz (1982), tömlősgomba genusba tartoznak, amennyiben az életciklusuk spermáciumos (mikrokonídiumos) formát is magába foglal, úgy azok a *Leptodothiorella* Höhnelt *sensu* Sydow ex van der Aa nemzetség tagjai. Von Arx és Müller (1975) a kettősfalú (bitunicatus) Ascomycetes revízióját szolgáló monográfiájukban a *Pleosphaerulina* Pass. (1981) genus névvel szemben a

Pringsheimia Schulzer (1866) prioritását ismerik el (a *Phyllosticta sojicola* faj revíziójára azonban még nem került sor). A gomba teleomorfi alakjának névhasználata tekintetében még a *Pleosphaerulina* tekinthető széleskörben alkalmazottnak. Kövis és mtsai (1999) szerint a szója levelén előforduló és azt megbetegítő *Phyllosticta sojicola* (Massalongo, 1900) morfológiai, patogenitási, illetve izoenzim vizsgálatok alapján megegyezik a *Phoma* genuson belül található több növényen is előforduló *Phoma exigua* var. *exigua*.

***Phoma exigua* Desm. var. *exigua* (syn.: *Ascochyta phaseolorum* Saccardo)**

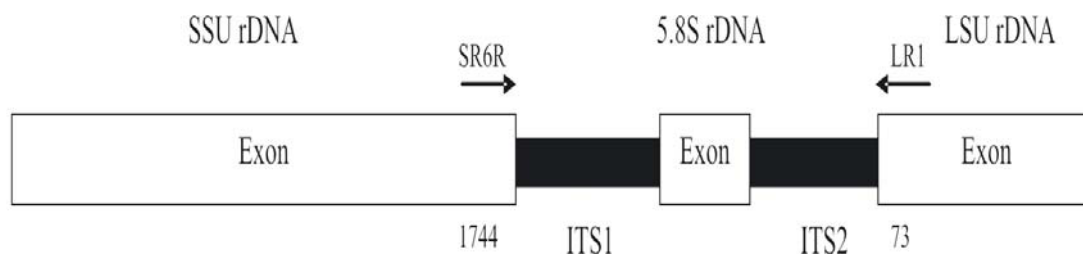
Az *Ascochyta phaseolorum* Saccardo (= *Phoma exigua* var. *exigua*) előfordulását a szóján Tanganyikában (Wallace és Wallace, 1947, 1949; Riley, 1960), Japánban (Sawada, 1958), Taiwan-on (Sawada, 1959) és Zambiában (Javid és Ashraf, 1978) észlelték. Az *Ascochyta phaseolorum*-ot a *Phaseolus lunatus* L.-on az USA-ba először 1929-ben Sprague találta meg. Később Crossan (1953, 1958) kimutatta, hogy azok az izolátumok, melyek a babról származtak morfológiailag, fiziológiailag és patológiailag hasonlóak azokhoz az izolátumokhoz, melyeket egyéb növényekről, pl. szójáról (*Glycine max*), tehénborsóról (*Gossypium hirsutum*), mályvarózsáról (*Malva* sp.), dohányról (*Nicotina tabacum*), paradicsomról (*Lycopersicon esculentum*) és padlizsánról (*Solanum melongena*) izoláltak. Alcorn (1968) Ausztráliából beszámolt arról, hogy az *Ascochyta phaseolorum* széles gazdanövény-körben károsít: 14 család 48 növényfaján; továbbá 12 fa mesterséges inokuláció során bizonyult fogékonyak. A *Phoma exigua* var. *exigua* olyan gyűjtőtaxon, amely háromszázat jóval meghaladó növénykórokozó fajt foglal magában és korábban önállóként írtak le (Boerema és Höweler, 1967, Boerema 1972, Boerema és Dorenbosch, 1973, Boerema és mtsai, 1993).

Molekuláris taxonómiai vizsgálatainkba az ITS régió mellett a más élőlény csoportok mellett a gombáknál is eredményesen használt transzlációs elongációs faktort kódoló gén (*tefl*) nagy intronját tartalmazó szakaszát használtuk a szóján előforduló *Phoma*-szerű fajok közötti filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára.

Filogenetikai kapcsolatok feltárására a riboszómális géneket kódoló szekvenciák (rDNS) az egyik leggyakrabban használt molekuláris markerek (Avisé, 2004). Ezek közül is különösen azok, amelyek gyakorlatilag azonos szekvenciájú tandem másolatként vannak jelen a genomban. Minden egyes másolat rendelkezik kódoló és nem kódoló régiókkal. A kódoló régiókhöz tartozik a 18S, 5.8S, és 28S alegységeket kódoló gének (Gerbi, 1985), amelyek sokkal kevésbé változékonyak mint a nem kódoló szakaszok. Ez

utóbbiak lehetnek átíródóak, mint az Internal Transcribed Spacer 1 és 2, valamint olyan régiók, amelyek nem íródnak át (Intergenic Spacer vagy Non Transcribed Spacer 1 és 2). Mivel a kódoló régiók evolúciósan erősen konzerváltak, az évmilliók alatt alig változó szakaszok, ezért főleg magasabb taxonok rokonsági viszonyainak megállapítására használják (Hills és Dixon, 1990). A két ITS régiót, evolúciós mércével mérve viszonylag gyorsan változó tulajdonságaiból adódóan, többségében alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok vizsgálatánál használják mint például közel rokon fajok vagy populációk egymástól való elkülönítésére gombáknál, növényeknél és állatoknál egyaránt (Baldwin, 1992; Schlötterer és mtsai, 1994; Mai és Coleman, 1997; Weekers és mtsai, 2001; Oliverio és mtsai, 2002; Chen és mtsai, 2000, 2002).

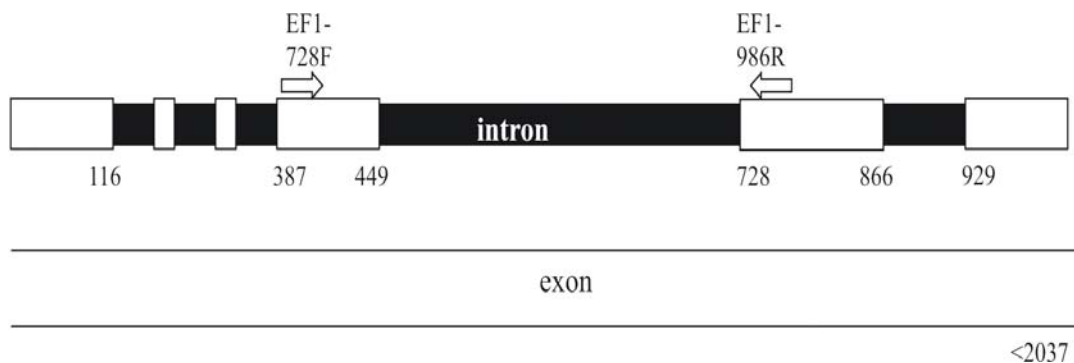
Vizsgálatunkhoz az rDNS régió egy olyan szakaszát választottuk, amely tartalmazza a ITS 1 és 2, valamint az 5,8 rDNS egy részét (1. ábra).



1. ábra: az ITS régió sematikus vázlatja, valamint a PCR reakcióban használt primerek helyzete (White és mtsai nyomán, 1990)

A „translation elongation factor 1 subunit alpha” (EF-1 α) fehérje a sejten belül a citoszólban található. Eukariótáknál és Archaea baktériumoknál a fehérjeszintézis folyamatában elsődleges funkciója, hogy katalizálja a GTP függő aminoacil-tRNS komplex felbomlását (Moldave, 1985). Az EF-1 α fehérje, és így a fehérjét kódoló gén is erősen konzervált az élővilágban, ami alkalmassá teszi a filogenetikai vizsgálatokra (Roger és mtsai, 1999). A 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 (2. ábra).

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



2. ábra: *tef1* gén sematikus vázlata, valamint a PCR reakcióban használt primerek helyzete (Druzhinina és Kubicek, 2005 nyomán)

Anyag és módszer

Vizsgálatainkban a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Tanszékén található törzsgyűjteményből 25 *Phoma* faj, köztük a szóján előforduló 7 faj izolátumát vizsgáltuk (1. táblázat). Minden egyes fajt morfológiai és élettani jellegzetességeik alapján azonosítottunk a Boerema és mtsai (2004) által közreadott *Phoma* monográfia alapján.

Morfológiai vizsgálatok

A *Phoma* fajok taxonómiájának elfogadott koncepciója in vivo és in vitro stabil morfológiai és tenyésztési paraméterek standardizált feltételek közötti jellemzésen alapul (van der Aa és mtsai, 1990). Morfológiai vizsgálatainkhoz 5 mm átmérőjű micélium korongokat vágunk ki a telepek aktív növekedésű széleiből és Petri csészékben lévő táptalaj közepére helyeztük. A vizsgált táptalajok a következők voltak: Maláta kivonat agar (malt extract agar, MA), amely 40 g malt extract és 20 g agart tartalmaz egy liter desztillált vízben. Zabliszt agar (Oatmeal agar, OA), amely 20 g zabpehely 0,5 l desztillált vízben való felfőzésével, sajtkenőn való átszűréssel, 1 l-re történő deszt. víz feltöltéssel és 20 g agar hozzáadásával készül. Egy hétig sötétben, 20°C hőmérsékleten történő inkubálás után megmértük a telep átmérőket. Rayner (1970) színskálájának megfelelően a micélium szövetek színét, valamint a tenyészet fonáki részének a színét

feljegyeztük. Továbbá egyéb morfológiai jellemzőket is (a telep alakja, szektorképzés, légmicélium jellege) feljegyeztünk. Ezt követően a Petri csészéket a piknídium képződését elősegítő 13 órás NUV (black light fluorescent lamp) megvilágítású, 11 órás sötét periódusú ciklikus inkubálásnak tettük ki. Két hét elteltével a telepek jellemzőit ismét feljegyeztük és három hét után tanulmányoztuk a piknídiumok, konídiumok és egyéb struktúrák (pl. klamidospórák) morfológiáját, továbbá mikroszkópi méréseket végeztünk.

Molekuláris vizsgálatok

Az izolátumokat 50 ml folyékony maláta tápoldatban tenyésztettük 48 órán keresztül, 100 ml-es Erlenmayer lombikban, sötétben, rázatva (125 rpm). A sejteket dörzsmozsár segítségével, folyékony nitrogén jelenlétében tártuk fel, majd genomi DNS-t izoláltunk E.Z.N.A.[®] Fungal DNA Isolation Kit (Omega Bio-tek Inc., USA) alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. A ITS fragment felszaporításához az SR6R és LR1 primerpárt (White és mtsai, 1990), míg a *tefl* fragment amplifikálásához az EF1-728F és EF1-986R primerpárt használtuk (Druzhinina és Kubicek, 2005). A tisztított PCR termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany végezte. A szekvenciák deponálási folyamatban vannak.

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 analízist a PAUP*4.0b (Swofford, 2002) program segítségével végeztük, parsimony-típusú analízist végezve (Kluge és Farris, 1969; Farris, 1970; Fitch, 197), heurisztikus keresést alkalmazva, ami a felrajzolható törzsfák közül megkeresi a legkevesebb bázisváltozást tükrözőt. A törzsfák készítésében külső csoportként további fajok *tefl* (2. táblázat) és ITS (3. táblázat) szekvenciáit is bevontuk. A törzsfák készítéséhez a TreeView (Page, 1966) programot használtuk. A felrajzolt törzsfát bootstrap analízissel (1000 ismétlés) ellenőriztük.

A filogenetikai analízisekbe külső szekvenciákat is bevontunk, hogy teljesebbé tegyük a törzsfákat. A szekvenciákat a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> honlapról töltöttük le. Az ITS szekvenciák elérhetőségeit az 1. táblázatban, a *tefl* szekvenciák elérhetőségei a 2. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat: kísérletbe bevont *Phoma* fajok listája

Fajnév	Izolátum kód		Gazdanövény
	Saját	Eredeti	
<i>Phoma pinodella</i>	D/035	?	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma pinodella</i>	D/082	?	<i>Pisum sativum</i>
<i>Phoma pinodella</i>	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/159	CBS 318.90	<i>Pisum sativum</i>
<i>Phoma sojicola</i>	D/056	PD97/2160	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma sojicola</i>	D/054	?	<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>exigua</i>	D/059	?	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	D/075	?	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	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> 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	?	<i>Glycine max</i>
<i>Phoma eupyrena</i>	D/058	CBS 375.91	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Phoma destructiva</i>	D/033	?	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Phoma 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	?	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Didymella rabiei</i>	D/160	CBS 581.83A	<i>Cicer arietinum</i>

2. táblázat: Az ITS fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfakészítésbe bevont fajok listája, valamint az ITS szekvenciájuknak hozzáférési száma

Fajnév (1)	Izolátum kód (2)	Hozzáférési szám (3)
<i>Phoma pinodella</i>	VPRI 32177	DQ087402.1
<i>Phoma pinodella</i>	VPRI 32171	DQ087400.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831556.1
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831562.1
<i>Phoma glomerata</i>	?	AF126816.1
<i>Phoma exigua</i>	?	AY927784.1
<i>Phoma exigua</i> var. <i>populi</i>	CBS 100167	AF268189.1
<i>Phoma exigua</i>	CSL 20316964	AY550992.1
<i>Phoma exigua</i> var. <i>heteromorpha</i>	?	AY899262.1
<i>Phoma herbarum</i>	ATCC 12569	AY293803.1
<i>Phoma herbarum</i>	?	DQ132841.1
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	WAC 6693	AY831558.1
<i>Ascochyta</i> sp.	Georgia6	DQ383955.1
<i>Ascochyta pisi</i>	AP1	DQ383954.1
<i>Ascochyta lentis</i>	MU AL1	AY131201.1
<i>Didymella lentis</i>	AL1	DQ383953.1
<i>Didymella fabae</i>	AF1	DQ383952.1

3. táblázat: *tefl* fragmentek alapján készült filogenetikai törzsfakészítésbe külső csoportként bevont fajok listája, valamint a *tefl* szekvenciájuknak hozzáférési száma

Fajnév (1)	Izolátum kód (2)	Hozzáférési szám (3)
<i>Ascochyta pisi</i>	AP2	DQ386494.1
teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i> (Kaiser és mtsai, 1997)	SAT AL	AY831546.1
<i>Ascochyta fabae</i> f. sp. <i>viciae</i> (= <i>Ascochyta fabae</i>)	AV11	DQ386498.1
teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i>	AL1	DQ386493.1
teleomorf: <i>Didymella fabae</i> anamorf: <i>Ascochyta fabae</i> (Kaiser és mtsai, 1997)	AF1	DQ386492.1
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831542.1
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831545.1

Eredmények

Morfológiai vizsgálatok

A szóján előforduló *Phoma* fajok közül a következő fajokat és izolátumokat vizsgáltuk: *Phoma pinodella* (D/035), *Phoma sojicola* (D/047, D/054), *Phyllosticta sojicola* (D/050), *Phoma exigua* var. *exigua* (D/059, D/075, D/077). Az elvégzett morfológiai vizsgálatok alapján a *Phoma sojicola* és *Phoma pinodella* viszonylag jól elkülönül a *Phoma exigua* var. *exigua* és *Phyllosticta sojicola* fajtól azonban a *Phoma sojicola* és *Phoma pinodella*, valamint a *Phyllosticta sojicola* és *Phoma exigua* var. *exigua* között csekély morfológia különbség mutatkozik.

Phoma pinodella

Zabliszt agaron (OA): a növekedési ráta: 50-65 mm; a telep szabályos, egyenletes körvonallal rendelkezik; zöldes olíva, sárgás olíva vagy olíva színű, a szegélynél halványabb; sugárirányban határozottan sugaras; kevés légmicélummal rendelkezik; a telep fonáka rendszerint sötétebb olíva szürke. Maláta agaron (MA): a növekedési ráta: 52-55 mm; a telep közepén olíva vagy olíva szürke, a szegély halványabb; a sugárirányú fonalasság erősen kifejezett; a légmicélium vékony, szürkés, bársonyos; a telepfonák olíva szürke vagy fekete. Klamidospórák bőségesen képződnek, interkalárisak vagy terminálisak, magányosan, vagy láncokban keletkeznek, gömbölydedek vagy hengeres alakúak, méretük: 8-20 x 8-15 μm . Piknídiumok is bőségesen keletkeznek általában koncentrikus gyűrűkben, de a légmicéliumban és az agarban is szórtan elhelyezkedhetnek; fekete színűek, csupaszok, magányosan vagy csoportban fordulnak elő; gömbölyűek vagy szabálytalanok; ostiolummal rendelkeznek; 100-310 μm nagyságúak; a piknídiumok fala 4-6 rétegű pseudoparenchymatikus, szögletes sejtekből tevődik össze. A bőségen keletkező konídiumok egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, hyalinok vagy fehéres színűek, kerekded-ellipszoid alakúak; méretük nagyon variábilis: átlagosan 2,5-3 x 5-6 μm .

Phoma sojicola

Zabliszt agaron (OA): a növekedési ráta: 50-65 mm; a telep szabályos, fehéres vagy halvány olíva szürke, gyakran erős szürke olíva szegéllyel; a légmicélium gyengén fejlett, bársonyos szürke; telepfonák hasonló. Maláta agaron (MA): a növekedési ráta: 55-62 mm; a telep szabályos, szürkés olíva, zöldes olíva színű; a légmicélium halvány olíva szürke; a telep fonáka ólomszürke, acélszürke, zöldes olíva szegéllyel. A klamidospórák magányosan vagy láncokban keletkeznek, interkalárisak vagy terminálisak, vékony falúak, zöldes vagy szürke olíva színűek; gömbölydedek vagy

hengeresek; nagyságuk 7-8 x 8-16 μm . A piknídiumok elsősorban a telep széle mentén keletkeznek az agar felszínén vagy az agarba süppedve; sötétbarna vagy fekete színűek; vékonyfalúak; magányosak vagy komplexek; gömbölyű vagy szabálytalan alakúak. egy vagy több ostiolummal rendelkeznek; nagyságuk 80-250 μm . A konídiumok *in vitro* tenyészetben: elsősorban egysejtűek ritkán egy válaszfallal rendelkeznek, hyalinok, vékony sejtfallal rendelkeznek, méretük nagyon változó: 2,5-3,5 x 5,6-7,4 μm .

Phyllosticta sojicola

Zabliszt agaron (OA): a növekedési ráta: 63-67 mm; a telep szabályos, széle alig látható, hyalin vagy halvány okkersárga színű, fonáka hasonló; légmicéliuma nincs. Maláta agaron (MA): a növekedési ráta: 58-62 mm; a telep szabálytalan alakú; barnássárga vagy okkersárga színű, hyalin vagy fehér szegéllyel, a fonák hasonló; légmicélium hyalin vagy fehéres színű;

Piknídiumok az agarban elszórtan bőségesen keletkeznek; gömbölyűek és általában sörétbarna vagy fekete színűek; vékonyfalúak, néha papilláltak, ostiolummal rendelkeznek; méretük átlagosan: 110-140 μm . A konídiumok hyalinok, mindkét végükön lekerekítettek, közepén befűződők, gyakran szemcsék figyelhetők meg bennük; méretük átlagosan: 5,5 x 2,5 μm . Klamidospórák nem képződnek. A NaOH próba negatív és kristályképződés sem figyelhető meg.

Phoma exigua* var. *exigua

Zabliszt agaron (OA): a növekedési ráta: 55-75 mm, nagyon variábilis; a telep szabálytalan alakú, lapos és tömött; olíva szürke, olíva barna, a szegélynél fehér színű vagy hyalin; a telepek közepén található a bőségesen képződő légmicélium, ami fehér vagy olíva szürke színű, finomon pelyhes; a telep fonák része hasonló. Maláta agaron (MA): a növekedési ráta: 25-60 mm, nagyon változó; a telep szabálytalan alakú, jellegzetesen csipkézett vagy lebenyes; fehérestől olíva szürkéig - olíva barnáig, barnás sárga szegéllyel; a légmicélium fehéres, olíva szürke, gyapjas; a telep fonák része olíva szürke, olíva fekete. A piknídiumok ritkák, szórt elhelyezkedésűek, részben az agarba süppedtek; olíva vagy olíva fekete színűek, általában gömbölyűek, csupaszok; magányosak vagy komplexek; ostiolummal rendelkeznek; nagyságuk és alakjuk változatos. A konídiumok hyalinok; ovális ellipszoid alakúak; méretük nagyon változó, általában 2,5-3 x 5-6,5 μm átmérőjűek. Mivel a *Phoma exigua* var. *exigua* fajnál a növényen (*in vivo*) az egysejtű konídiumok mellett kétsejtűek is keletkeznek, ez hozzájárulhat a hagyományosan értelmezett *Ascochyta* és *Phoma* fajok összetévesztéséhez. Klamidospórák nem képződnek; a NaOH próba pozitív:

egy csepp NaOH felcseppentése után az agar kékes-zöld elszíneződése fokozatosan barnás vörössé válik. Kristályképződés nem figyelhető meg.

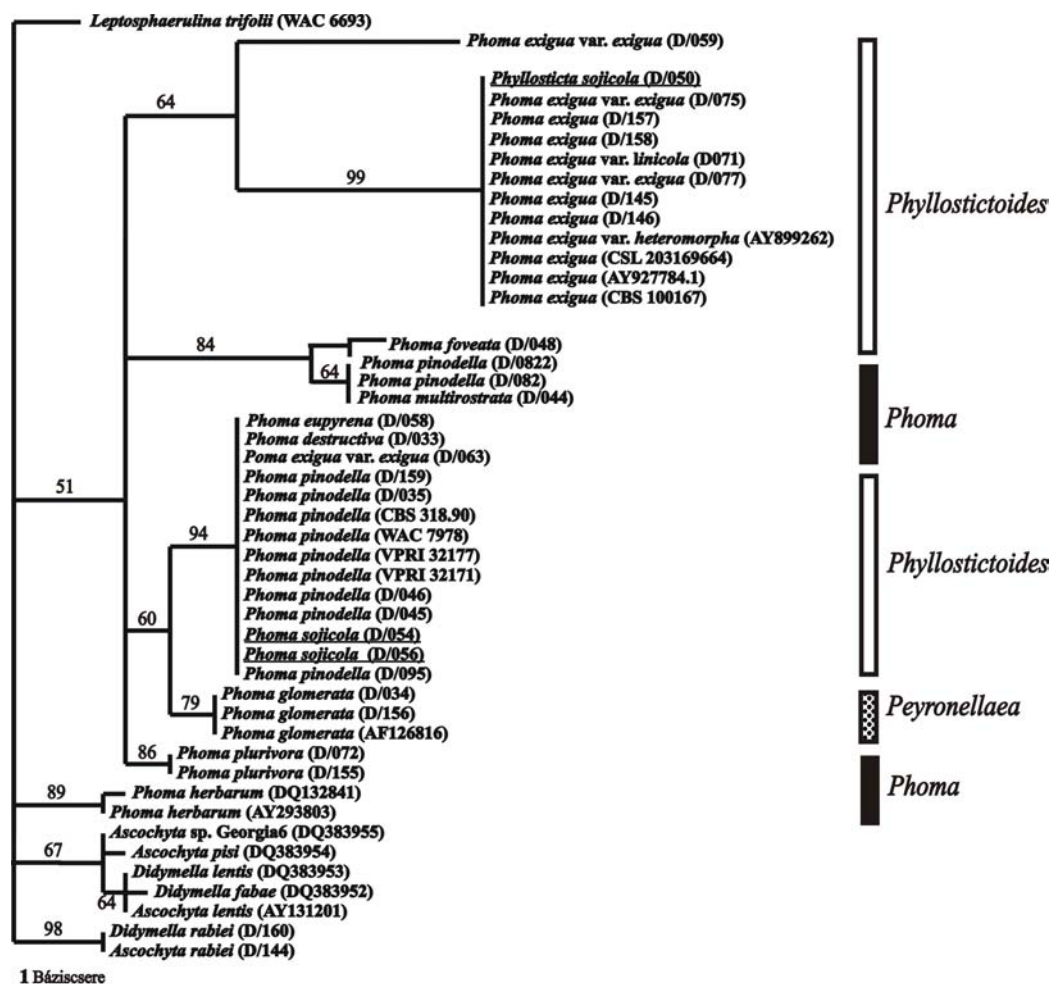
Molekuláris vizsgálatok

ITS fragment

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

A PCR reakció után a felszaporodott fragmentek szekvenálási eredményei alapján az elemzést parsimony-típusú analízissel, a PAUP*4.0b program (bootstrap=1000) alkalmazásával végeztük el.

Az ITS szekvenciák alapján kapott törzsfán (3. ábra) a *Phoma pinodella* és a *Phoma exigua* fajhoz tartozó izolátumok egymástól jól elhatárolódó csoportokat alkotnak.



3. ábra: Az ITS szekvenciák parsimony elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az elágazás valószínűségét jelölik, százalékban, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptunk. Jobb oldali oszlopok: a morfológiai, fenotípusos tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema és mtsai, 2004).

A közeli rokon *Ascochyta* nemzetségbe tartozó fajok elkülönülnek a vizsgált *Phoma* fajoktól.

Az elemzés során a különböz csekélynek bizonyult az egyes fajok között, mivel mindössze csak 23 bázishelyet tekintett informatívnak a.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) az ITS szekvencia 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 ITS szekvenciájuk gyakorlatilag teljesen azonos. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy a *Phoma sojicola* a *Phoma pinodella* egy a szóján előforduló patovarietasa.

Transzlációs elongációs faktor

A genomi DNS izolációját követően a PCR reakcióban a felhasznált primerekkel (EF1-728F és EF1-986R) egy 280-290 bp nagyságú, a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó szakasz amplifikálódott mindenegyik izolátum esetében. A PCR reakcióban melléktermék nem képződött, amely a primerek nagyfokú specifikusságát bizonyítja. A PCR reakció után a felszaporodott fragmentumok szekvenálási eredményei alapján az elemzést parsimony-típusú analízissel, a PAUP*4.0b program (bootstrap=1000) alkalmazásával végeztük el.

A *tefl* szekvencia elemzésével kapott törzsfá alapján (4. ábra) a vizsgált *Phoma* fajok egyértelműen elkülönültek a közel rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól. Mivel a *Phoma* és *Ascochyta* fajok elkülönítése morfológiai alapon gyakran nem könnyű feladat az *in vivo* különböző sejtszámú konídiummal rendelkező *Phoma* (pseudo-*Ascochyta*) fajok esetében, ez a molekuláris bélyeg további segítséget nyújthat a hovatartozás egyértelmű megállapításához.

A *Phoma pinodella* és a *Phoma exigua* fajhoz tartozó izolátumok egymástól jól elhatárolódó csoportokat alkotnak a *tefl* szekvencia alapján is.

Phyllosticta sojicola-ként deponált izolátum a *tefl* szekvencia alapján is a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba került. A *Phoma sojicola* pedig az ITS szekvenciához hasonlóan itt is a *Phoma pinodella* csoportba rendeződött.

Megvitatás

A vizsgált izolátumok morfológiai sajátosságai, bizonyos esetekben rendkívüli hasonlósága (a *Phoma pinodella* és *Phoma sojicola* között) megkérdőjelezheti a *Phoma sojicola* faji identitásának fenntartását vagy revíziójának szükségességét.

A DNS szekvencia analízise a *Phoma*-k esetében eddig csak kisebb csoportok elkülönítő vizsgálatára korlátozódott. Az ITS szekvenciákat használták fel a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára (Mendes és mtsai, 2003), illetve a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas és mtsai, 2005).

Az ITS szekvencia alkalmasnak bizonyult a *Phoma* fajok elkülönítésére a közeli rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól.

Az egy fajhoz tartozó izolátumok (*Phoma exigua* var. *exigua* és *Phoma pinodella*) egymástól jól elkülönült csoportokat alkotnak az ITS szekvenciák alapján.

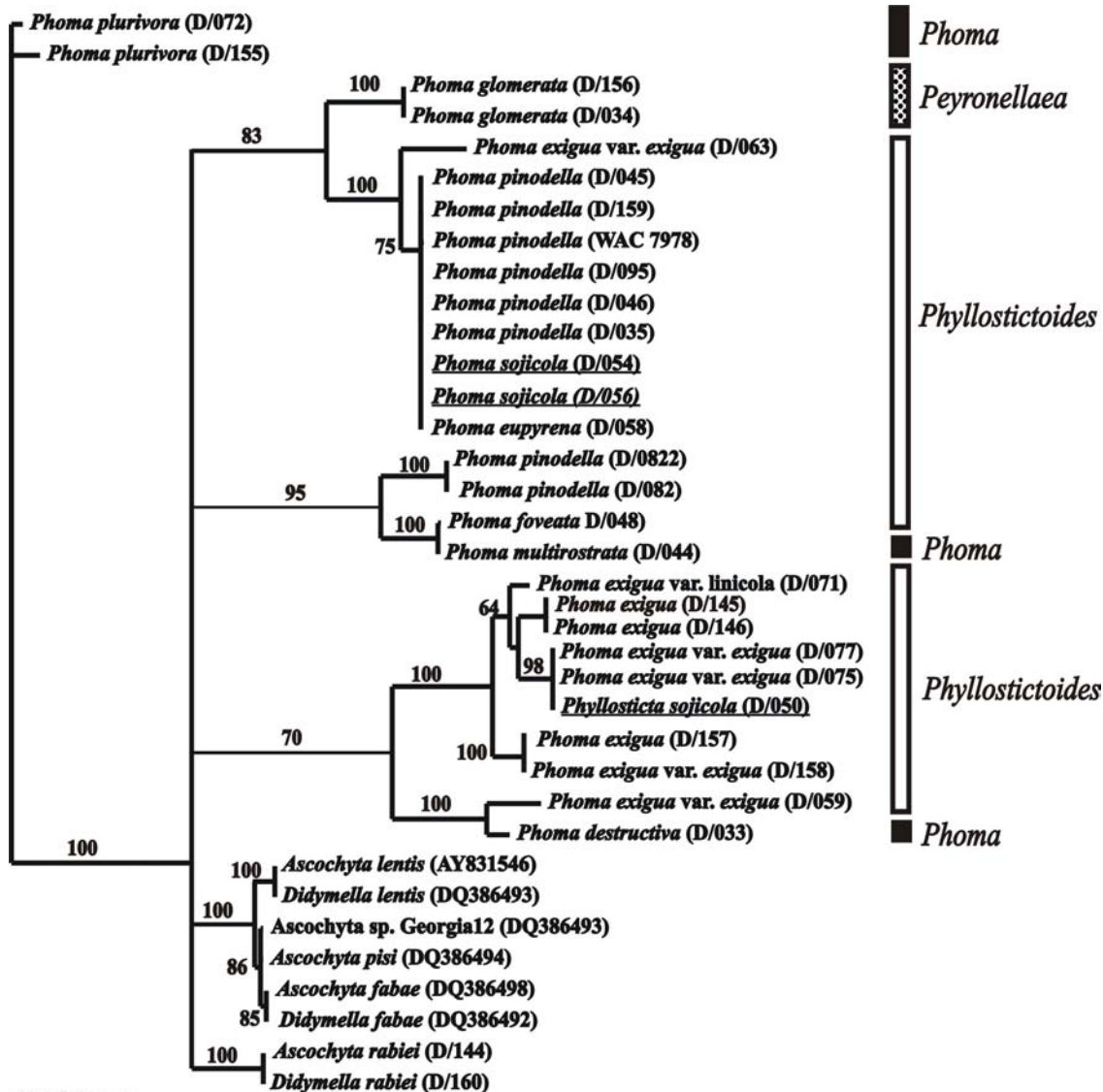
Vizsgálataink alapján a transzkripciós elongációs faktor 1 kódoló gén (*tefl*) nagy intron régióját tartalmazó DNS szakasza megfelelően használható a *Phoma* fajok elkülönítésére a közeli rokon *Ascochyta* fajoktól.

A *tefl* szekvencia, a többi fonalas gombához (Druzhinina és Kubicek, 2005) hasonlóan alkalmasnak látszik a *Phoma* fajok filogenetikai elemzésére.

A *tefl* szekvenciák elemzésekor hasonló filogenetikai törzsfát kapunk, mint az ITS szekvenciánál. A *Phoma pinodella* és *Phoma exigua* fajok izolátumai itt is egymástól jól elkülönülő csoportokat képeznek.

Az ITS és *tefl* szekvencia alapján a *Phyllosticta sojicola* a *Phoma exigua* csoportba, a *Phoma sojicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba került, mivel az ITS és a *tefl* szekvenciájuk is gyakorlatilag teljesen megegyezik.

Mind az ITS, mind *tefl* régiók parsimony típusú filogenetikai elemzése során azt tapasztaltuk, hogy az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum a *Phoma exigua* var. *exigua* csoportba, a *Phoma sojicola* pedig a *Phoma pinodella* csoportba rendezése indokolt, ami szükségessé teheti a nevezett taxonok helyzetének újragondolását.



4. ábra: a *tef1* szekvenciák parsimony elemzése alapján készített filogenetikai törzsfa.

A vonalakra írt számok az elágazás valószínűségét jelölik, százalékban, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptunk. Jobb oldali oszlopok: a morfológiai, fenotípusos tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema és mtsai, 2004).

Irodalom

- Aa, H.A. van der (1973): Studies in *Phyllosticta* I. Studies in Mycology 5: 1-110.
- Aa, H.A., van der, Noordeloos, M.E., de Gruyter, J. (1990): Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. Studies in Mycology 32: 3-19.
- Alcorn, J.L. (1968): Occurrence and host range of *Ascochyta phaseolorum* in Queensland. Australian Journal of Biological Sciences 21: 1143-1151.
- Arx, J.A. von, Müller, E. (1975): A re-evaluation of the bitunicate *Ascomycetes* with keys to families and genera. Studies in Mycology Baarn 9: 1-159.

- Awise, J.C. (2004): Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Underland, MA: Sinauer Associates
- Baldauf, S.L. and Doolittle, W.F. (1997): Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94: 12007-12012.
- Baldwin, B.G. (1992): Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. Molecular Phylogenetics and Evolution. 1: 3-16.
- 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.
- Boerema, G.H. (1972): *Ascochyta phaseolorum* synonymous with *Phoma exigua*. Short communication. Netherlands Journal of Plant Pathology 78: 113-115.
- Boerema, G.H., Dorenbosch, M.M.J. (1973): The *Phoma* and *Ascochyta* species described by Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit-rotting. CBS Studies in Mycology 3: 1-50.
- Boerema, G.H., Höweler, L.H. (1967): *Phoma exigua* Desm. And its varieties. Persoonia 5: 15-28.
- 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., 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 et al. (1993): Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Re-print of twelve papers (1992-1993) originally published in the Netherlands Journal of Plant Pathology, with cumulative index. Libri Botanici Vol. 10. IHW-Verlag.
- Boerema, G.H., de Gruyter, J., de Noordeloos, M.E., Hamers, M.E.C. (2004): *Phoma* identification manual. Differentiation of species and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing, CAB International Wallingford, Oxfordshire, UK.

- Chen, C.A., Yu, J.K., Wei, N.W. (2000): Strategies for amplification by polymerase chain reaction of the complete sequence of nuclear large subunit ribosomal RNA-encoding gene in corals. *Marine Biotechnology* 6: 558-570.
- Chen, C.A., Wallace, C.C., Wolstenholme, J. (2002): Analysis of mitochondrial 12S RNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 137-149.
- Crossan, D.F. (1953): Comparative studies of *Ascochyta* from okra, bean and cotton in North Carolina. Abstracts of papers accepted for presentation are the 45th Annual Meeting of the American Phytopathological Society Madison, Wisconsin, Sept. 7-10, 1953. *Phytopathology* 43: 469.
- Crossan, D.F. (1958): The relationships of seven species of *Ascochyta* occurring in the North Carolina. *Phytopathology* 48: 248-255.
- 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.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. (1989): Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 1-1252.
- Farris, J.S. (1970): Estimating phylogenetic trees from distances matrixes. *American Nature* 106: 645-668.
- Fitch, W. M. (1971): Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*: 20: 406-416.
- Gerbi, S.A. (1985): Evolution of ribosomal DNA. pp. 419-517. In: *Molecular evolutionary genetics*. Macintyre, R. J. (Ed.) Plenum, New York.
- Hara, K. (1930): *Pathologia agriculturalis plantarum*, ed. 2. Tokyo. 1-950. (*Mycosphaerella sojae* Hori. *Ascochyta sojae* Miura. 276-277.) (in Japanese).
- Hillis, D.M., Dixon, M.T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Javid, J., Ashraf, M. (1978): Some observations on soybean diseases in Manchurica. *Manchurica Agr.Expt.Sta.Rpt.* 45: 223.
- Jones, L.K. (1297): Studies of nature and control of blight, leaf and pod spot, and footrot of peas caused by species of *Ascochyta*. *Bulletin of the New York State Agricultural Experiment Station* 547.
- Kluge, A.G., Farris, J.S. (1969): Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18: 1-32.
- Kövics, G. and Gruyter, J. de (1995). Comparable esterase isozyme analysis of some *Phoma* species occur on soybean. (A szóján előforduló néhány *Phoma* faj észteráz izoenzim mintázatainak összehasonlító vizsgálata.)

- Proceedings of Debrecen Agricultural University (DATE Tudományos Közleményei) 31: 191-207.
- Kövics, G.J., Gruyter, J. de, 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.
- Kurata, H. (1960): Studies of the fungal diseases of soybean in Japan. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences*. Tokyo, Ser.C. (in Japanese with English Summary) 1-153.
- 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.
- Mai, J.C. and Coleman, A.W. (1997): The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* 44: 258-271.
- Massalongo, C. (1900): De Nunnulis Speciebus NOvis. *Mycromycetum Agri Veronensis*. *Attività Istituto Veneto di Scienze*. 59: 684-690.
- Mendes-Pereira, E., Balesdent, M.-H., Brun, H., Rouxel, T. (2003): Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycol. Res*. 107 (11): 1287-1304.
- Miura, M. (1921): Disease of the main agricultural crops of Manchuria. *So. Manchuria Railway Co.Agr.Expt.Sta.Bull*. 11: 1-56. (in Japanese, English Abstract, *Japan Journal Botany*. 1: 9. (1922).
- Moldave, K. (1985): Eukaryotic protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry* 54: 1109-1149.
- Monte, E., Bridge, P.D., Sutton, B.C. (1990): Physiological and biochemical studies in Coelomycetes. *Phoma*. *Studies in Mycology* 32: 21-28.
- Monte, E., Bridge, P.D., Sutton, B.C. (1991): An integrated approach to *Phoma* systematics. *Mycopathologia* 115: 89-103.
- Morgan-Jones, G., Burch, K.B. (1987): Studies on the genus *Phoma*. VIII. Concerning *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*. *Mycotaxon* 29: 477-487.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., Deerfield, D.W. II. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *Embnew. news* 4: 14.
- Noll, W. (1939): Studies on foot rot and wilt in Leguminosae. *Z. Pfl.krankheiten* 49: 385-431.

- Noordeloos, M.E., de Gruyter, J., van Eijk, G.W., Roeijmans, 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. *Mycological Research* 97: 1343-1350.
- Oliverio, M., Cervelli, M., Mariottini, P. (2002): ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 63-69.
- Page, R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Rayner, R.W. (1970): a mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, and British Mycological Society.
- Riley, E.A. (1960): A revised list of plant diseases in Tanganyika Territory. Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers 75: 18.
- Roger, A.J., Sandblom, O., Doolittle, W.F., Philippe, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryots. *Molecular Biology and Evolution* 16: 218-233.
- Saniewska, A, Prus-Glowacki, W. (1998): Mycelial growth, pathogenicity and electrophoretic characteristics of some enzymes among isolates of *Phoma narcissii* (Aderh.) Boerema, de Gruyter et Noordeloos from *Hippeastrum*, *Narcissus* and *Hymanocallis*. *Phytopathologica Polonica* 1998 (15): 5-13.
- Sawada, K. (1958): Researches on fungi in the Tohoku District of Japan. IV. Fungi Imperfecti. Tokyo Govt.For.Expt.Sta., Meguro, Bull. 105: 35-140.
- Sawada, K. (1959): Descriptive catalogue of Taiwan (Formosan) fungi. Part XI. National Taiwan University (Taipei) Coll.Agr.Spec.Bull. 8: 1-268.
- Schlötterer, C., Hauser, M., Haeseler, A. von, Tautz, D. (1994): Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 11: 513-522.
- Simay, E.I. (1992): Magvizsgálatok eredményei. XIX. – Néhány, a szója magpenészesedését okozó gomba. *Növényvédelem* 28 (4): 168-171.
- Sinclair, J.B., Backman, P.A. (1989): Compendium of soybean diseases. Third edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 1-106.
- Sinclair, J.B., Schurtleff, M.C. (1975): Compendium of soybean diseases. First edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 1-69.
- Sprague, R. (1929): Host range and life-history studies of some leguminous *Ascochytae*. *Phytopathology* 19: 917-932.
- Theon, L.R., Daniels, E.Y. (1927): Notes of parasitic fungi of Illinois III. *Mycologia* 19: 110-129.
- 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.
- Wallace, G.B., Wallace, M.M. (1947): Second supplement to the revised list of plant disease in Tanganyika Territory. Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers 26: 1-26.
- Wallace, G.B., Wallace, M.M. (1949): A list of plant diseases of economic importance in Tanganyika Territory. Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers 26: 4.
- Weekers, P.H.H., Jonckheere, F.J. de, Dumont, H.J. (2001): Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representative of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent west European zone. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 89-99.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: PCR protocols. A guide to methods and applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) Academic Press, New York.

PHYLOGENETIC STUDIES ON *PHOMA*-LIKE FUNGI OCCURRING ON SOYBEAN

L. Irinyi – G. J. Kövics – E. Sándor

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

Summary

In this study, we carried out phylogenetic studies analyzing sequences of genetic markers in the taxonomy of *Phoma*-like fungi. The *Phoma*-like species occurring on soybean are hard to identified because of their high morphological and symptomatic similarities.

We employed a part of the gene responsible for the synthesis of translation elongation factor 1 subunit alpha protein (*tefl*) containing both introns and exons and ITS region containing the internal transcribed spacer regions 1 and 2 and the 5.8S rDNA, as potential genetic markers to infer phylogenetic relationships among different *Phoma* taxa. Twenty-five different *Phoma* species were firstly characterised by morphologically, and then their ITS and *tefl* sequences were sequenced and analysed by parsimony method.

Both parsimony sequence analyses 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.