

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

***PHOMA-SZERŰ GOMBÁK
TAXONÓMIÁJÁNAK
KONVENCIONÁLIS ÉS
MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI
ÖSSZEHASONLÍTÁSA***

Irinyi László Miklós

Témavezetők: dr. Sándor Erzsébet és dr. Kövics György



**DEBRECENI EGYETEM
Kerpely Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2009

A doktori értekezés előzményei

A növénybetegségek előidézésének többségéért kórokozó gombák a felelősek. Ezek jelenlegi leírt fajszáma közel hetvenötezer, amely a ténylegesen létező, becsült gombafajok számának csupán hét százaléka. Ily módon a gombák biológiai diverzitásának megismerésében még számos feladat áll a mikológusok előtt – a tradicionális eszköztár mellett pedig újabb és újabb technikák segítségével teszi lehetővé a filogenetikai összefüggések feltárását, esetenként az eddig kialakított rendszerek alapos átalakításával a – genetikai szintű megismerés tükrében. Eredményeinkkel egy bonyolult és nehezen azonosítható gombacsoport, a mintegy ötezer fajt magába foglaló *Phoma*-szerű mikroszkopikus gombák (*Phyllosticta*, *Phoma*, *Ascochyta*, *Diplodina* stb.) filogenetikai jellemzéséhez járulunk hozzá tradicionális molekuláris eszközök segítségével.

A Coelomycetes osztályba tartozó *Phoma* genus világszerte elterjedt, többségében fitopatogén, opportunista parazita vagy szaprofiton életmódot folytató fajt tartalmaz. A *Phoma* genus története több mint 130 évre nyúlik vissza. A 19. században és a 20. század első felében P. Saccardo rendszerének alapján több ezer fajt írtak le azon nem-sztromatikus piknídiumos gombák körében, amelyek színtelen (hialin), válaszfal nélküli konídiumokat képeznek. Ebben a koncepcióban a *Phoma*-szerű piknídiumos gombák osztályozásában jelentős hangsúlyt kapott a gazdanövény-specifikusság, a szubsztrátumelv szigorú alkalmazása, és a konídiumban a válaszfal megléte vagy hiánya. Általában a *Phoma* besorolást alkalmazták azokra a fajokra, amelyek színtelen, egysejtű konídiumokat képeztek, és a növények szárain és vesszein növekedtek. Természetesen sok *Phoma*-szerű gomba fordul elő a leveleken, vesszőkön és száron egyaránt. Napjainkig mintegy kétezer *Phoma* fajt írtak le, ami valószínűleg annak a ténynek köszönhető, hogy ezek a gombák az egyik legszélesebb körben elterjedt mikroorganizmusok; számos ökológiai niche-ben előfordulnak. A *Phoma* nemzetségen belül morfológiai alapon jelenleg 10 *Phoma* szekciót tartanak számon, melyek közül néhány mesterséges, míg mások természetes egységet alkotnak.

A morfológiai alapú fajmeghatározásnak azonban gyakori gyengesége, hogy az egy fajba sorolt izolátumokról a genetikai vizsgálatok alapján bebizonyosodik, hogy valójában nem is egy fajba tartoznak. Mivel a *Phoma* fajok többsége nem szaporodik ivaros úton, csak ivartalanul, ezért a *biológiai faj* kategória meglehetősen korlátozottan alkalmazható erre a genusra. A *morfológiai fajmegközelítés* a fentebb említett okok miatt nem ad mindig megbízható eredményt, ezért indokolt a molekuláris taxonómiai vizsgálatokon alapuló, *filogenetikai fajkonceptió* alkalmazás a genus-on belül. Eddig a

különböző molekuláris markerek szekvenciaanalízise a *Phoma* fajoknál alig került alkalmazásra, eddig csak kisebb csoportok elkülönítő vizsgálatára korlátozódott ezért vizsgáltunk célja volt olyan filogenetikai markerek keresése és alkalmazása, amelyek alkalmasak faji szintű – különösen a tradicionálisan nehezen kezelhető fajoknál – a rokonsági viszonyok feltérképezésére a *Phoma* genus-on belül.

Molekuláris taxonómiai vizsgálatainkhoz három olyan markert választottunk (*tefl*, ITS, β -*tubulin*), amelyek szakirodalmi adatok alapján korábban már alkalmasnak bizonyultak filogenetikai kapcsolatok tanulmányozására a gombák körében. A „translation elongation factor 1 subunit alpha” (EF-1 α) fehérjét kódoló *tefl* gén minden élő szervezetben megtalálható, csak egy kópiában van jelen a genomban és fajok közötti és fajon belüli rendszertani kapcsolatok felderítésére egyaránt alkalmas. Az ITS-régiók (Internal Transcribed Spacer) a filogenetikai vizsgálatokhoz már hosszú ideje a legszélesebb körben használt konzervatív genetikai markerek. A tubulin fehérje egyik alegységének kódolásáért felelős β -*tublin* gén egyre nagyobb figyelmet kap különböző taxonok közötti evolúciós rokonsági kapcsolatok elemzése során, evolúciósan egymáshoz közel és távol elhelyezkedő taxonok esetében egyaránt. Voigt *et al.* (2005) egyéb gének, köztük az ITS-szekvenciák mellett a β -*tubulin* gént is alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára, valamint Fatehi *et al.* (2003) az *Ascochyta pinodes* komplex taxonómiai vizsgálatokor.

Filogenetikai vizsgálatok során célszerű egyszerre több gént vizsgálni, mivel a GCPSR (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition) „közös származáson alapuló fajelismerés” elmélet szerint (Taylor *et al.*, 2000) több gén használatakor pontosabb és megbízhatóbb eredményt kapunk az egyes taxonok közötti filogenetikai kapcsolatokra.

Vizsgálataink további célja volt a különböző karakter (nukleotid) alapú filogenetikai módszerek (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian methods) alkalmazása, értékelése és azok egymással történő részletes összehasonlítása.

A pillangósvirágú növények egymástól alig megkülönböztethető *Phoma*-szerű fajainak (*Phoma pinodella*, *Phoma sojicola*, *Phyllosticta sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*) taxonómiája terén a mai napig nagy a bizonytalanság, ami indokolttá teszi a fajok tradicionális morfológiai összehasonlítása mellett azok molekuláris taxonómiai vizsgálatát.

Az értekezés célkitűzései

A *Phoma*-szerű gombák taxonómiájának konvencionális és molekuláris biológiai összehasonlításával kapcsolatos kutatómunkámat a következő célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. Különböző izolátumok részletes, tradicionális morfológiai vizsgálata és azonosítása a *Phoma* fajok taxonómiájának elfogadott koncepciója szerint.
2. Molekuláris taxonómiai vizsgálatokra alkalmas filogenetikai markerek keresése, melyek megfelelők lehetnek a vizsgált *Phoma*-szerű fajok – különös tekintettel a konvencionálisan nehezen kezelhető fajok – elkülönítésére.
3. Faji szintű filogenetikai vizsgálatok, valamint rokonsági viszonyok megállapítása a *Phoma* genus néhány taxonja között.
4. Karakter (nukleotid) alapú filogenetikai vizsgálati módszerek (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian methods) alkalmazása, értékelése, és az egymással történő összehasonlításuk a *Phoma*-szerű gombák jellemzésében.
5. A szóján betegséget okozó *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch és közeli rokon *Phoma sojicola* (Abramov) Kövics et al. taxonómiai hovatartozásának felülvizsgálata, esetleges újraértelmezése molekuláris összefüggések feltárása alapján.
6. Szóján sporadikusan károsító, eredetileg *Phyllosticta sojicola* Massolongo faj rendszertani helyzetének tisztázása filogenetikai markerek analízisének felhasználásával.

Anyag és módszer

Morfológiai vizsgálatok

Munkánk során kilenc, különböző forrásból származó *Phoma*-szerű taxon huszonekét izolátumát vizsgáltuk morfológiai és molekuláris bélyegek összehasonlításával (1. táblázat). A *Phoma* fajok taxonómiájának elfogadott koncepciója *in vivo* és *in vitro* stabil morfológiai és tenyésztési paraméterek standardizált feltételek melletti jellemzésén alapul (Boerema *et al.* 2004).

Morfológiai vizsgálatainkhoz 5 mm átmérőjű micéliumkorongokat vágunk ki a telepek aktív növekedésű széleiből és Petri-csészékben lévő táptalaj közepére helyeztük. A vizsgálatunkat malátakivonat agaron (MA) és zabliszt agaron (OA) végeztük.

Egy hétig sötétben, 20 °C hőmérsékleten történő inkubálást követően megmértük a telepátmérőket, továbbá feljegyeztük a micéliumszövedék, valamint a tenyészet felszíni és fonáki részének a színét, Rayner (1970) színskálájának megfelelően. Regisztráltuk az egyéb morfológiai jellemzőket is (a telep alakja, szektorképzés, légmicélium jellege). Ezt követően a 9 cm átmérőjű Petri-csészéket a piknídium képződését elősegítő 13 órás NUV (near ultraviolet blacklight fluorescent lamp) ultraibolya közeli megvilágítású, 11 órás sötét periódusú ciklikusokkal inkubáltuk.

Két hét elteltével ismét feljegyeztük a telepek jellemzőit. A harmadik héten megvizsgáltuk a piknídiumok, konídiumok és egyéb képletek (pl. klamidospórák) morfológiáját, és mikroszkópi méréseket végeztünk. A konídiumok méretét olajimmerziós objektívvel, 1250x-es nagyítás mellett 30 mérés alapján határoztuk meg.

1. táblázat A vizsgálatokba bevont *Phoma*-szerű fajok és izolátumok listája

Izolátum száma	Alternatív izolátum szám	Fajnév	Gazdanövény	Izolálás helye	Gyűjtötte	GenBank hozzáférési számok (*)		
						<i>Tef1</i> ^b	ITS ^c	β -tubulin ^d
D/035	BT-15	<i>Phoma pinodella</i>	<i>Glycine max</i>	Hungary	Walcz I.	EU543973	EU573015	EU541416
D/045	PD 82/550	<i>P. pinodella</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Hungary	Kövics G.J.	EU543971	EU573025	EU541417
D/046	PD 77/165 MYA-411	<i>P. pinodella</i>	<i>Pisum sativum</i>	Hungary	Kövics G.J.	EU543972	EU573024	EU541419
D/095	N.A.	<i>P. pinodella</i>	<i>P. sativum</i>	Hungary	Gergely L.	EU543970	EU573027	EU541418
D/159	CBS 318.90 PD 81/729	<i>P. pinodella</i>	<i>P. sativum</i>	Netherlands	M.E. Noordeloos	EU595355	EU573028	EU595352
D/054	MYA-406	<i>P. sojicola</i>	<i>G. max</i>	Hungary	Kövics G.J.	EU543974	EU573023	EU541434
D/056	CBS 567.97 PD 97/2160	<i>P. sojicola</i>	<i>G. max</i>	Hungary	Kövics G.J.	EU543976	EU573026	EU541433
D/050	CBS 301.39	<i>Phyllosticta sojicola</i>	<i>G. max</i>	Germany	K. Böning	EU595356	EU573029	EU595357
D/075	N.A.	<i>Phoma. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>G. max</i>	Poland	Kövics G.J.	EU543982	EU555533	EU541421
D/077	N.A.	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>G. max</i>	Poland	Kövics G.J.	EU543983	EU573010	EU541422
D/063	Ph 58 MYA-408	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	Poland	J. Marcinkowska	EU543975	EU573012	EU541420
D/145	N.A.	<i>P. exigua</i>	<i>Althaea officinalis</i>	Hungary	Nagy G.	-	EU573011	EU541425
D/146	N.A.	<i>P. exigua</i>	<i>Althaea rosae</i>	Hungary	Nagy G.	EU543984	EU573013	EU541427
D/158	ICMP 15330	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>Agapanthus</i> sp.	New Zealand	M. Braithwaite	EU543981	EU573008	EU541428
D/157	ICMP 13336	<i>P. exigua</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	New Zealand	P.G. Broadhurst	EU543980	EU573007	EU541429
D/071	PD 86/73	<i>P. exigua</i> var. <i>linicola</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	Hungary	Kövics G.J.	EU543979	EU573009	EU541423
D/072	PD 75/907	<i>P. plurivora</i>	<i>Medicago sativa</i>	Australia	J. de Gruyter	EU552929	EU573018	EU552932
D/155	ICMP 6875	<i>P. plurivora</i>	<i>Pennisetum clandestinum</i>	New Zealand	P.R. Johnston	EU552930	EU573019	EU552931
D/034	AI-416	<i>P. glomerata</i>	<i>G. max</i>	Hungary	Kövics G.J.	EU543969	EU573016	EU541424
D/156	ICMP 15788	<i>P. glomerata</i>	<i>Yucca</i> sp.	New Zealand	C.F. Hill	EU543968	EU573017	EU541426
D/048	PD 76/1021	<i>P. foveata</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	Netherlands	G. H. Boerema	EU543985	EU573021	EU541431
D/044	PD 77/508	<i>P. multirostrata</i>	<i>Phylodendron</i> sp.	Netherlands	G. H. Boerema	EU543986	EU573022	EU541430
D/144	N.A.	<i>Ascochyta rabiei</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Australia	N.A.	EU595354	EU595358	EU595353
D/160	CBS 581.83A	<i>Didymella rabiei</i>	<i>C. arietinum</i>	Syria	H.A. van der Aa	EU543978	EU573020	EU541432

AI=Agrobotanikai Intézet, Tápiószéle

BT=Pannon Egyetem, Takarmánytermesztési Kutató Intézet, Iregszemcse-Bicsérd

CBS=Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia;

D=Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság Tudományi Kar, Növényvédelmi Tanszék

ICMP=International Collection of Microorganisms from Plants, Új-Zéland

MYA=American Type Culture Collection, USA.

N.A. = Nincs adat

PD=Plantenziektenkundige Dienst (Holland Növényvédelmi Szolgálat) Wageningen, Hollandia

^a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hozzáférési számok

^b transzlációs elongációs faktort kódoló gén (*tef1*), részleges szekvencia

^c 18S riboszómális RNS gén, részleges szekvencia; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboszómális RNS, internal transcribed spacer 2, teljes szekvencia, valamint 26S riboszómális RNS gén részleges szekvencia

^d β -tubulin kódoló gén, részleges szekvencia

Molekuláris vizsgálatok

DNS-izolálás

Az izolátumokat 50 ml malátakivonat tápoldatban tenyésztettük 48 órán keresztül, 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban, sötétben, rázatva (125 rpm). A sejteket dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben fagyasztva tártuk fel, majd genomi DNS-t izoláltunk. A DNS izolálását a Fungal DNA Kit (Omega, D1090) alkalmazásával végeztük a gyári protokollt követve.

Polimeráz-láncreakción (PCR) alapuló vizsgálatok

A 50 μ l PCR elegy 25 μ l 2X PCR Master-et Mix (Fermentas, K0171), 2 μ l genomi DNS-t (0,5–1 μ g), 2–2 μ l forward és reverse primert (10 pmol/ μ l), 19 μ l steril, nukleázmentes vizet (Fermentas, #R0581) tartalmazott. A PCR körülményeit mindhárom esetben az alábbiak szerint állítottuk be: első lépésként kezdeti denaturálás történt 95 °C-on, 3 percen át, amit 5 cikluson keresztül további denaturálás követett 95 °C-on, 1 percig, majd a primerkötődés (*annelláció*) a megfelelő hőmérsékleten 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen át. Ezt követte 25 cikluson keresztül a denaturálás 95 °C-on, 1 percig, majd az annelláció adott hőmérsékleten 1 percig, végül pedig a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen keresztül. Befejezésül egy 15 perces polimerizáció következett 72 °C-on.

A *transzlációs elongációs faktor* esetében a DNS-felszaporításhoz (amplifikáláshoz) használt indító szekvencia (primer)-pár az EF1-728F, valamint az EF1-986R (Druzhinina és Kubicek, 2005) volt. A reakcióban 56 °C-os annellációs hőmérsékletet alkalmaztunk. Az *ITS-fragmentum* felszaporításához a következő primerpárt használtuk: SR6R és az LR1 (White *et al.*, 1990). A PCR-ben az annelláció 50 °C-on történt. A *β -tubulin* fragmentum felszaporításához a Bt2a és a Bt2b (Glass és Donaldson, 1995) primerpárt használtuk és az annellációs hőmérséklet 58 °C volt. A PCR-t az MWG Biotech Inc. Primus 25 (Milton Keynes, UK) típusú készülékével végeztük. A termékek tisztítását a Millipore cég Microcon Centrifugal Filter Devices termékei közül az YM-100 (Millipore, 42413) típusúval végeztük. A felszaporított és tisztított PCR-termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany cég végezte térítéses megbízással. A szekvenálás megbízhatóságát az ISO nemzetközi minőségbiztosítási szabvány (DIN EN ISO 9001:2000) garantálja.

Filogenetikai analízisek

A különböző elemzéseket egy Intel Pentium 4 CPU 2,4 GHz teljesítményű és 1 GB RAM memóriájú számítógépen végeztük. A szekvenciákat a ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997) program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol szükséges volt. Az evolúciós modellek kiválasztásához a Modeltest programot használtuk (Posada és Grandall, 1998). Ezt követően a filogenetikai analíziseket a Paup*4.0b (Swofford, 2002), illetve a MrBayes (Huelsenbeck, 2000) program alkalmazásával végeztük el.

Eredmények

Morfológiai eredmények

A tenyészetek morfológiai tulajdonságai között kétféle táptalajon kialakuló sajátosságokat öt *Phoma pinodella* (D/035, CBS 318.90, D/095, PD82/550, PD 77/165), két *Phoma sojicola* (D/054, CBS 567.97), három *Phoma exigua* var. *exigua* (D/075, D/077, Ph 58), egy *Phyllosticta sojicola* (D/050) és egy *Phoma exigua* var. *linicola* (D/071) izolátumnál figyeltük meg.

A *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch és a *Phoma sojicola* (Abramov) Kövics *et al.* izolátumok morfológiai tulajdonságai erősen hasonlítottak egymásra, illetve az egyes jellegek nagyfokú változatossága miatt átfedéseket tapasztaltunk. Egyes izolátumok telepjellemzői nagyon variábilisnak bizonyultak még standardizált körülmények között is. Előfordult, hogy egy izolátum (*P. pinodella* PD77/165) azonos telepéről, azonos időben, azonos táptalajra leoltott tenyészet, teljesen azonos körülmények között is eltérő telepmorfológiát mutatott. Más izolátumok esetében is megfigyeltük, hogy a telepmorfológiai jellemzők nagyon változóak. Többszöri átoltást követően a morfológiai bélyegek változását is megfigyeltük. A *Phoma pinodella* fajra jellemző tulajdonságként ismertetett kristályképződést (Noordeloos *et al.*, 1993; Boerema *et al.*, 2004) nem tapasztaltunk egyik izolátumnál sem, amely annak tulajdonítható, hogy a gomba ideiglenesen elveszítheti ezt a tulajdonságát a táptalajon végzett többszöri átoltás során.

Hasonló morfológiai hasonlóságot találtunk a *Phyllosticta sojicola* Massolongo és a *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* (syn.: *Ascochyta phaseolorum* Saccardo) faj izolátumai között is. Az egyetlen különbséget az „E-metabolit” teremelésében tapasztaltunk, mely a *Phoma exigua* var. *exigua* karakterisztikus bélyege.

A *P. exigua* var. *exigua* (Ph 58) (Kövics *et al.*, 1999) izolátumának morfológiai bélyegeken alapuló taxonómiai helyzetét is bizonytalannak találtuk. A telep morfológia, piknidium és konídium karakterisztikája alapján az izolátum erősen hasonlít a *P. pinodella* izolátumokhoz. Továbbá a Ph 58 izolátum bőségesen képez klamidospórákat, mely a *P. pinodella* fajra jellemző tulajdonság. Jelentős eltérést itt is a NaOH-próbánál tapasztaltunk, mivel az izolátum a *P. exigua* var. *exigua* fajokra jellemző pozitív reakciót mutatta. A *P. pinodella* izolátumainak NaOH-próbája azonban minden esetben negatív volt.

Molekuláris eredmények

A tefl szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák

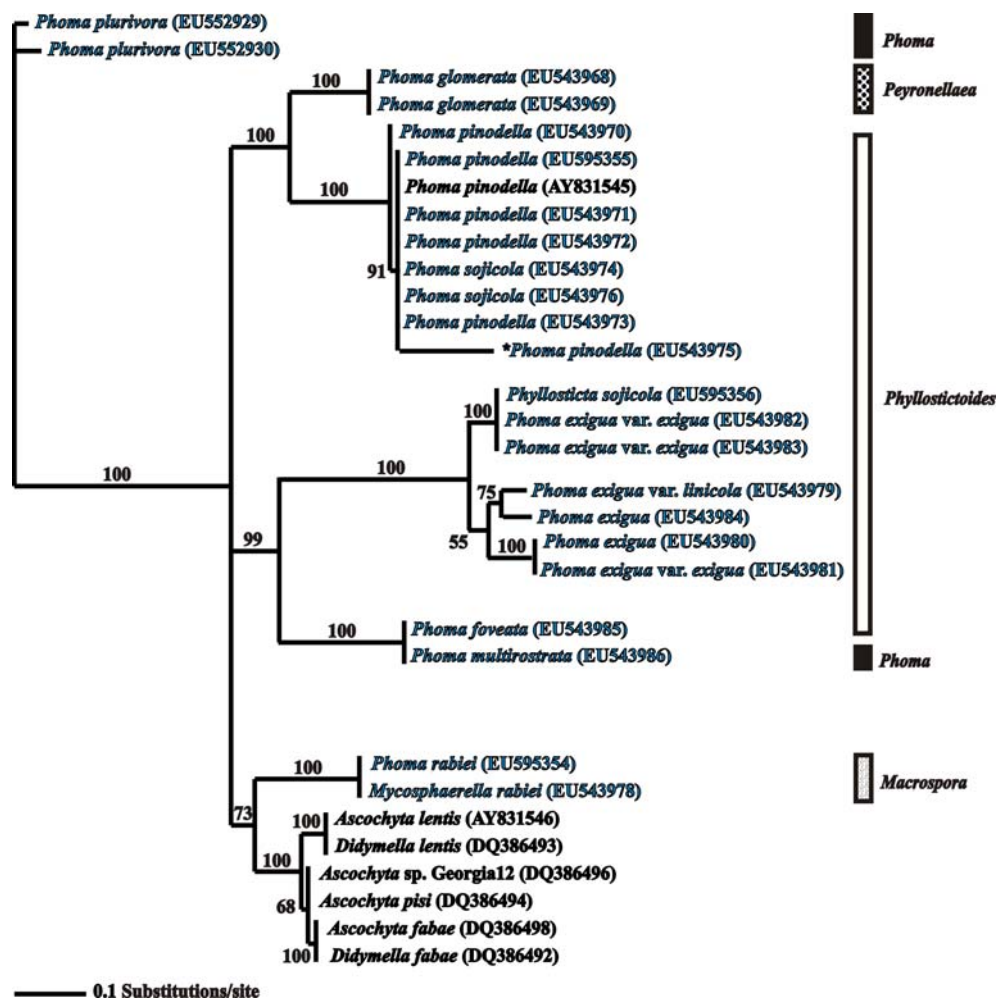
A *tefl* szekvenciák karakteralapú filogenetikai módszerek (Bayesian methods, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood) analízisével készített törzsfái (1., 2. és 3. ábrák) nagyban hasonlítanak egymásra. A *Phoma* fajok izolátumainak egy része (*P. pinodella*, *P. exigua*, *P. plurivora*, *P. destructiva*, *P. glomerata*) egyértelműen elkülöníthetők a *tefl* szekvencia segítségével a többi vizsgált *Phoma* fajtól. Más részük fajcsoportot alkot a *tefl* szekvenciák alapján: a *P. pinodella* és a *P. exigua* fajhoz tartozó izolátumok egymástól jól elhatárolódó csoportokat (cluster) alkotnak. Nem különíthetők el azonban egymástól a *P. foveata* és *P. multirostrata* fajok izolátumai. Ezek esetében felmerülhet a téves identifikáció lehetősége a depozitőr részéről.

A több izolátummal is képviselt fajok mind egy-egy különálló csoportba kerültek az elemzés során (*P. pinodella*, *P. exigua*, *P. glomerata*, *P. plurivora*), ami megerősíti a *tefl* szekvencia alkalmasságát molekuláris taxonómiai vizsgálatokra a *Phoma* fajok elkülönítése céljából. A *Phoma* taxán kívül az *Ascochyta* nemzetségbe tartozó taxonokra is érvényes, hogy az egyes gombafajok (*Ascochyta lentis* / *Didymella lentis*) anamorf és telomorf alakjai is egy cluster-t alkotnak, amely szintén alátámasztja, hogy a *tefl* régió a *Phoma* és az *Ascochyta* genuson belül egyaránt alkalmas marker lehet filogenetikai vizsgálatokhoz. Az egyes taxonok közötti távolságok elegendően nagyok, eltérőnek bizonyultak ahhoz, hogy az eredményeket, vagyis a filogenetikai törzsfát jól megalapozottnak tekintsük.

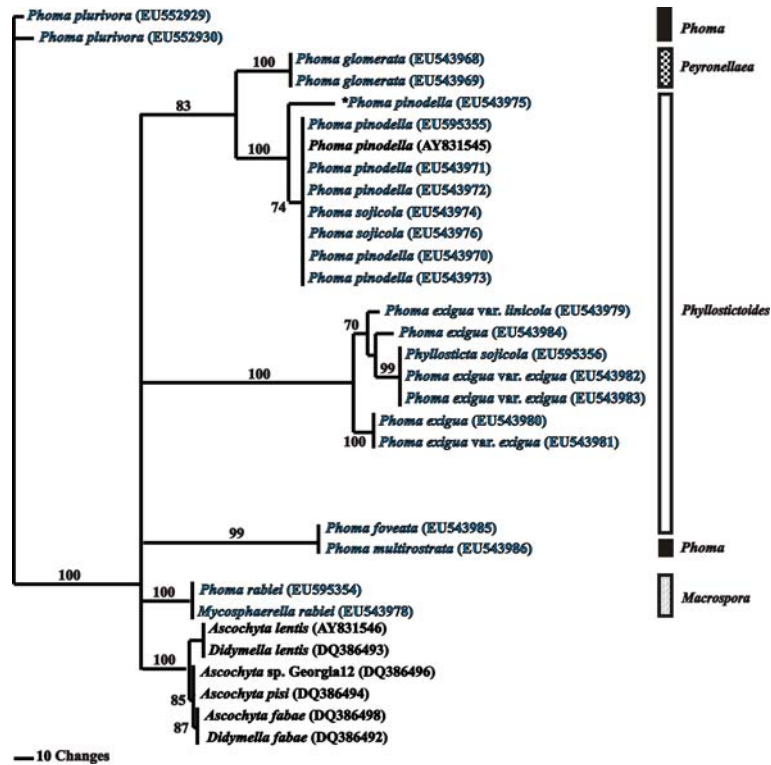
A *P. sojicola* izolátumai (MYA-406, EU543974 és PD 97/2160, EU543976) a *P. pinodella* csoportba kerültek az elemzés során, mivel az *tefl* szekvenciájuk gyakorlatilag teljesen azonos.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként, egy '30-as évek végi járványt követően deponált izolátum (CBS 301.39, EU595356) a *tefl* szekvencia alapján a *P. exigua* var. *exigua* csoportba került. Újabb izolátumok vizsgálatára – tekintettel a ritka előfordulására és autentikus izolátumok törzsgyűjteményi hiányára tekintettel – nem kerülhetett sor.

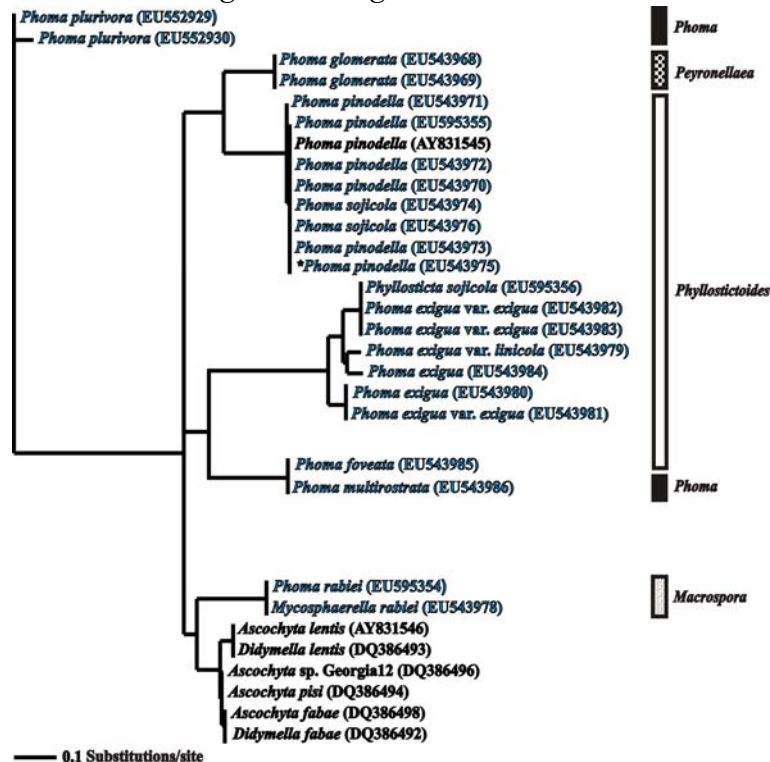
Az elemzések során a magas bootstrap és Bayesian utólagos valószínűségi értékek alátámasztották az egyes csoportok elkülönülésének megbízhatóságát, ezzel is alátámasztva a filogenetikai törzsfá összefüggéseinek valódiságát.



1. ábra A *tefl* szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az egyes elágazások Bayesian-féle utólagos valószínűség értékeknek felelnek meg. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tényészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'



2. ábra A *tefl* szekvenciák Parsimony elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az elágazás valószínűségét jelölik, százalékban, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptunk. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'



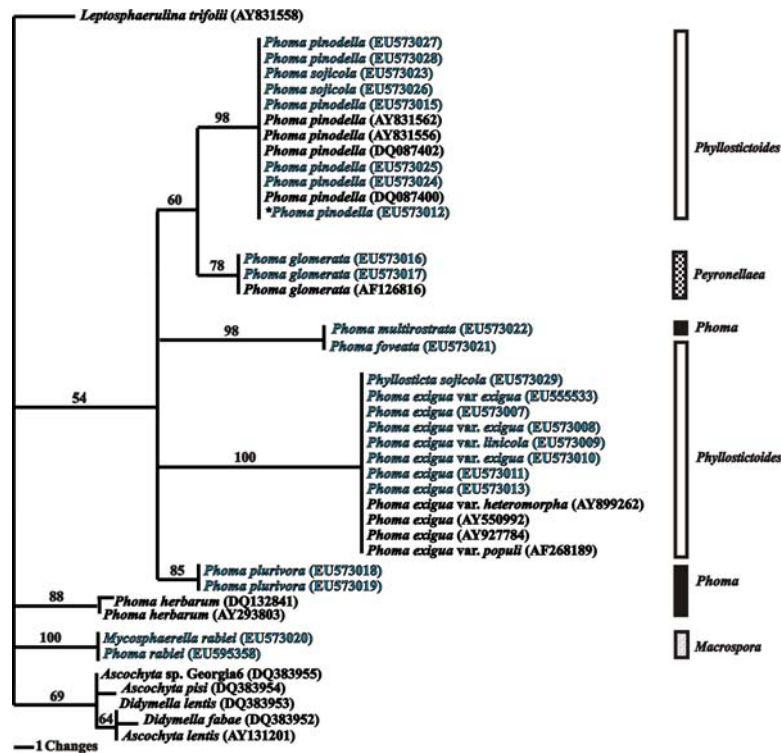
3. ábra A *tefl* szekvenciák Maximum Likelihood elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'

Az ITS-szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák

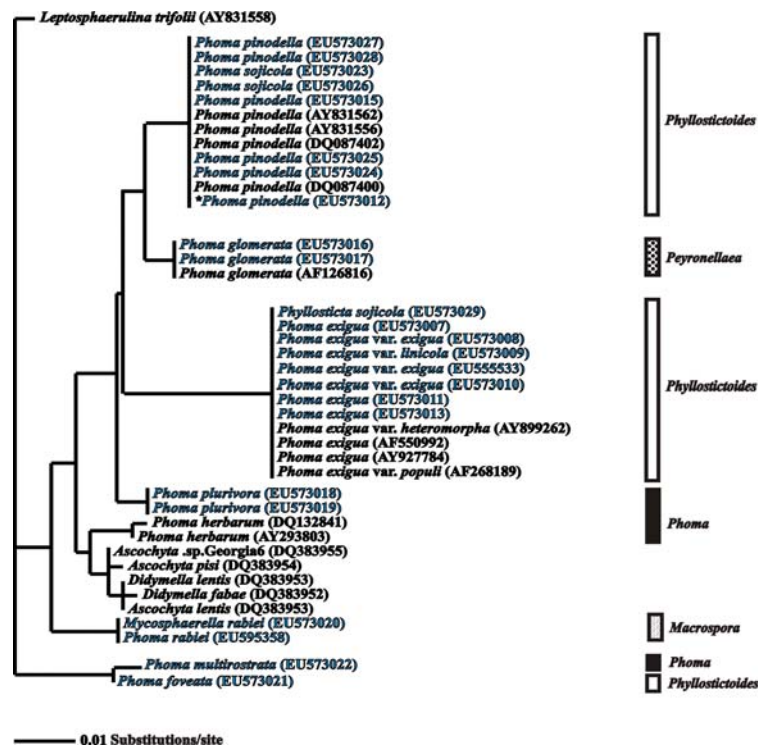
Az ITS-régió filogenetikai elemzésekor létrehozott törzsfák nagyban hasonlítanak a *tefl* szekvenciák alapján készült törzsfákhoz (4., 5. és 6. ábrák). Az ITS-régiók szekvenciáin alapuló törzsfákon a *Phoma* taxonok különálló csoportokat alkotnak, azonban az egyes taxonok közötti távolságok (bázisok közötti különbség, elágazások hossza) nem bizonyultak kellően eltérőnek ahhoz, hogy az eredmények alapján a filogenetikai törzsfát jól megalapozottnak tekinthessük. A Parsimony elemzés során a program 454 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 417-et konstansnak, 32 karaktert informatívnak tekintett, és csak 5-öt becsült nem-informatívnak. A különbség tehát a *Phoma* és *Ascochyta* fajok izolátumai között nem volt jelentős, ez megkérdőjelezi, hogy a választott ITS-régió elégséges-e a taxonok megalapozott szétválasztásához. A *Phoma* és *Ascochyta* fajok alkotta csoportok bootstrap értékei alacsonynak bizonyultak (54–69), ezért nem lehet megbízható következtetést tenni a két csoport egymáshoz viszonyított filogenetikai kapcsolatára. Ezzel szemben a két csoport Bayesian utólagos valószínűségi (93–99) értékei magasabbnak bizonyultak a bootstrap értékeknél. A több izolátummal is képviselt fajok mindhárom elemzés során azonos clustert alkotnak (*P. pinodella*, *P. exigua*, *P. glomerata*, *P. plurivora*), és a magas bootstrap értékek alátámasztották az egyes csoportok elkülönülésének megbízhatóságát, ezzel is alátámasztva a filogenetikai törzsfa összefüggéseinek valódiságát. A törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella*) 100% és 98% bootstrap, valamint Bayesian értékei megerősítik, hogy a két csoport az ITS-szekvencia alapján elkülöníthető egymástól és a többi taxontól is. A taxa közötti távolságok (az elágazások hossza), valamint a további bootstrap és Bayesian értékek is elegendőnek bizonyultak egymástól a megbízhatóság alátámasztására.

A *P. sojicola* izolátumok (MYA-406, EU573023 és PD 97/2160, EU573026) a *P. pinodella* csoportba kerültek, mivel az ITS-szekvenciájuk is gyakorlatilag megegyező.

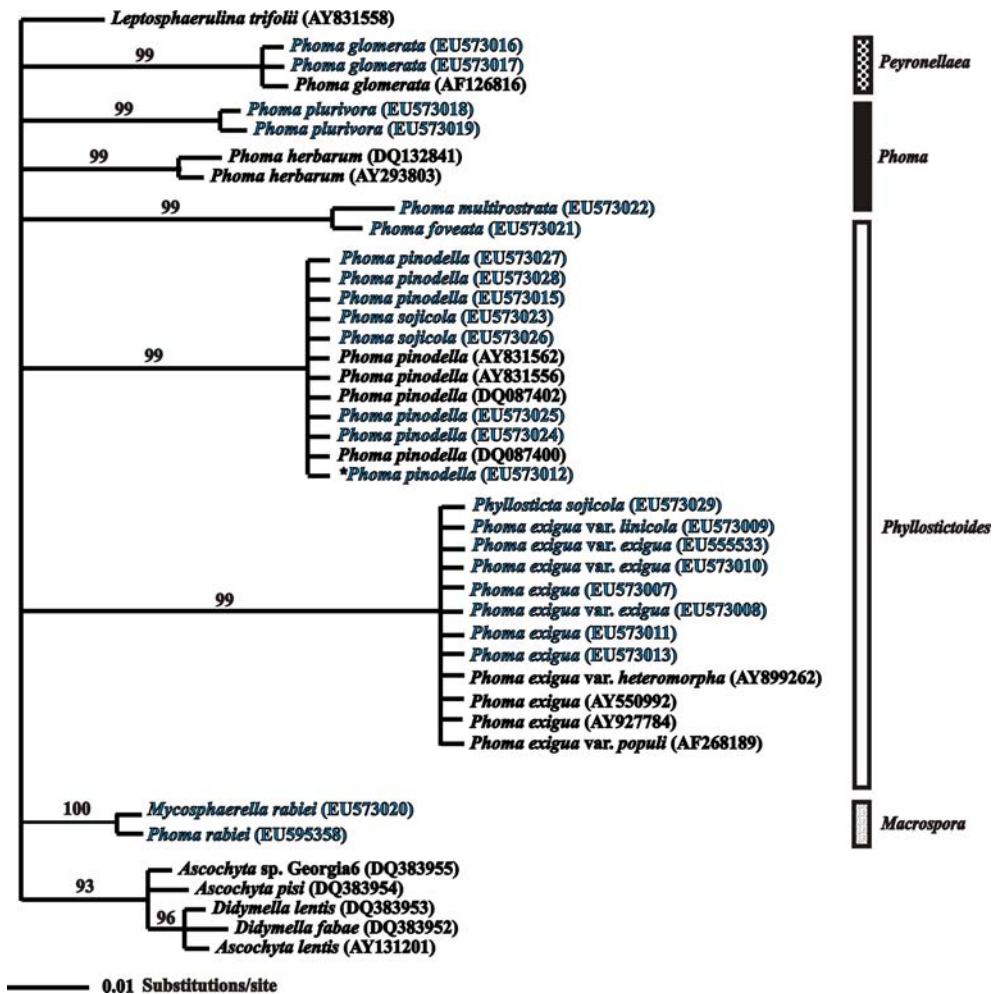
Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU573029) a különböző elemzésekkel létrehozott törzsfákon a *P. exigua* var. *exigua* clusterbe került.



4. 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. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'



5. ábra Az ITS-szekvenciák Maximum Likelihood elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (D/063) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'



6. ábra Az ITS-szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az egyes elágazások Bayesian-féle utólagos valószínűség értékeknek felelnek meg. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tényészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'

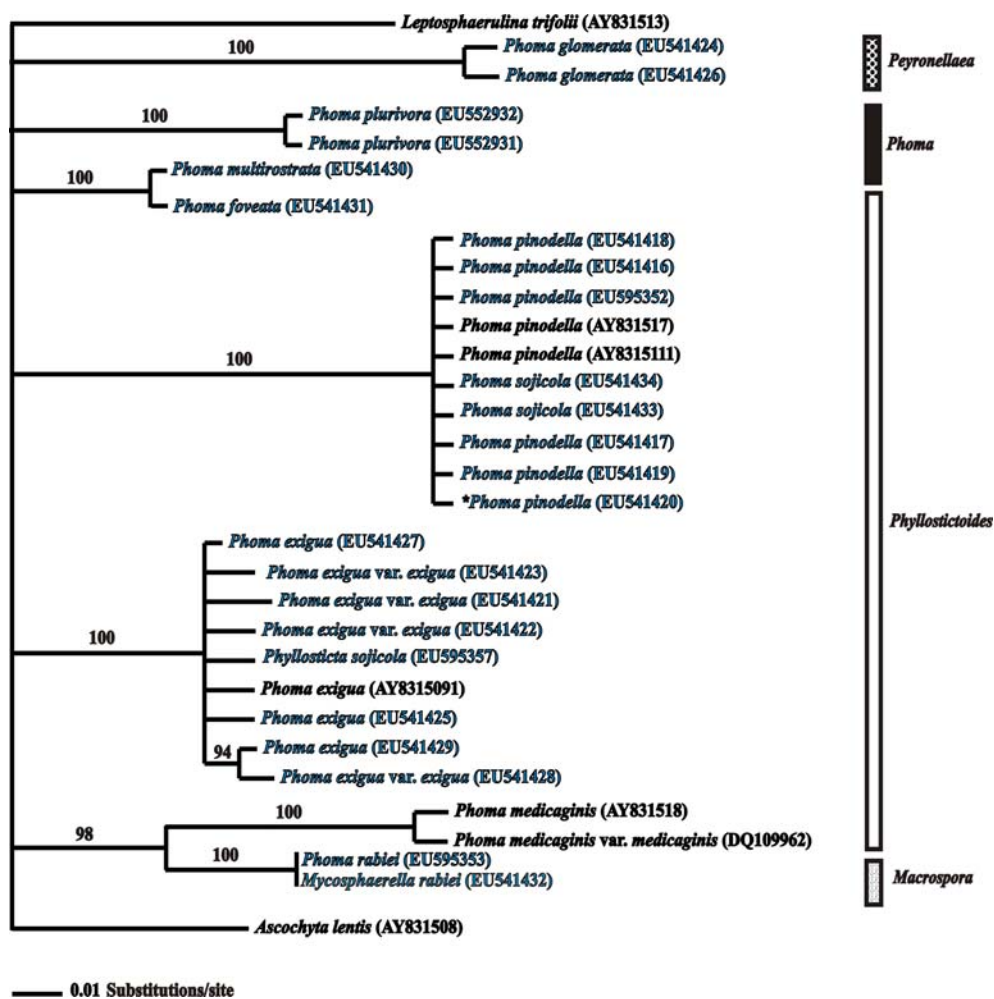
A β -tubulin szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák

A β -tubulin régió filogenetikai elemzésével létrehozott törzsfák (7., 8. és 9. ábrák) lényegiekben hasonlóak a *tefl* és ITS-régiók alapján készített törzsfákhoz. A program a Parsimony elemzéskor 298 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 229 karaktert konstansnak, 20 karaktert informatívnak tekintett és 49 karaktert becsült nem-informatívnak. Így az ITS-régióhoz hasonlóan a β -tubulin régiónál is viszonylag kevés bázishelyet fogadott el a program informatívnak az elemzés során, amely szintén megkérdőjelezi, hogy a választott β -tubulin régió elégséges-e a taxonok megalapozott szétválasztásához, illetve a köztük lévő filogenetikai viszonyok és távolságok megállapításához. A több izolátummal is képviselt fajok ez esetben is mind azonos csoportba kerültek az elemzés során (*P. pinodella*, *P. exigua*, *P. glomerata*, *P. plurivora*). A magas bootstrap értékek alátámasztják az egyes elágazások helyének a valószínűségét, ezzel

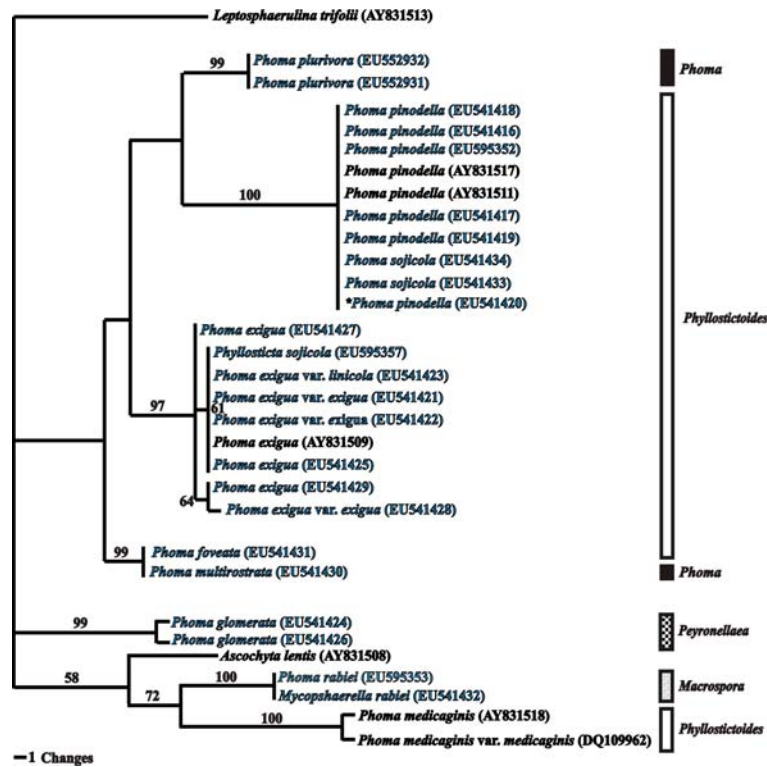
valószínűsítve a filogenetikai törzsfá lehetséges kapcsolatait. A törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella*) 97% és 100% bootstrap, illetve Bayesian értékekkel megerősítve azt jelenti, hogy a két csoport a β -tubulin szekvencia alapján is nagy bizonyossággal különül el egymástól, valamint a többi taxontól, annak ellenére, hogy a köztük lévő báziskülönbség nem jelentős.

A *Phoma sojicola* izolátumok (MYA-406, EU541434 és PD 97/2160, 541433) β -tubulin szekvencia összehasonlításai alapján szintén a *P. pinodella* csoportba került, mivel a β -tubulin szekvenciájuk megegyezik.

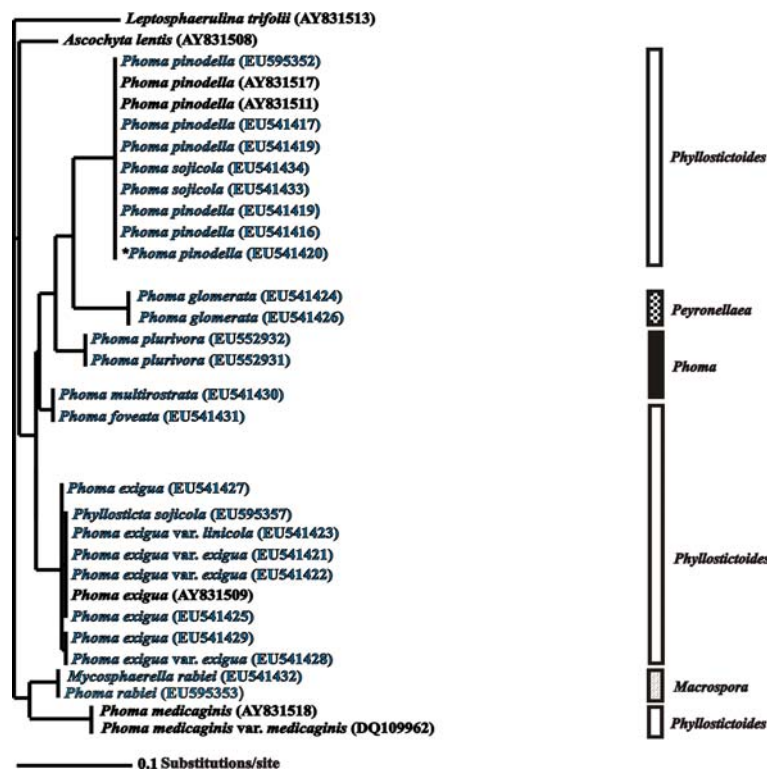
A *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU595357) a β -tubulin régió alapján is a *P. exigua* csoport tagja.



7. ábra A β -tubulin szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az egyes elágazások Bayesian-féle utólagos valószínűség értékeknek felelnek meg. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'



8. ábra A β -tubulin szekvenciák Parsimony elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az elágazás valószínűségét jelölik, százalékban, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptunk. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'



9. ábra A β -tubulin szekvenciák Maximum Likelihood elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). **P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció mint '*P. exigua* var. *exigua*'

Következtetések, javaslatok

A *Phoma* genus fajainak taxonómiai helyzete a mai napig távolról sem teljes tisztázott, és számos bizonytalanságot rejt magában. Egyre világosabbá válik, hogy a fajok valódi rokonsági összefüggéseire esetenként még a legösszetettebb morfológiai vizsgálatok sem adnak egyértelműen megbízható eredményt.

Vizsgálataink során kilenc, különböző forrásból származó *Phoma*-szerű taxon huszonkét izolátumát (1. táblázat) hasonlítottuk össze konvencionális morfológiai és molekuláris bélyegek alapján. A morfológiai vizsgálatainkat a *Phoma* fajok taxonómiájának elfogadott koncepciója szerint végeztük (Boerema *et al.*, 2004). Az egyes izolátumok fontosabb tulajdonságait jellemzőit (a telepnövekedés intenzitása, az agaron fejlődő telep felszínének és fonákjának színe, alakja, mérete, szekcióképzés, légmicéliumképzés) maláta és zabliszt agarokon jellemeztük. Ezek mellett egyéb morfológiai jellemzőket is feljegyeztünk (légmicélium megléte, szektorképzés, piknídium alakja, mérete, osztióluma, klamidospóráképzés, a konídium színe, alakja, szeptáltsága, méretei). Míg egyes izolátumok esetében a morfológiai alapon történő azonosítás egyértelműnek bizonyult, más izolátumoknál viszont bizonytalansággal terhelt, egyes tulajdonságok (például a telep mérete, színe, alakja, illetve a piknídiumok és konídiumok mérete) gyakori átfedése miatt nem lehetett kétséget kizáróan elkülöníteni az egyes taxonokat). Még standardizált körülmények között is előfordult, hogy egy izolátum (*P. pinodella* PD77/165) azonos telepéről, azonos időben, azonos táptalajra leoltott tenyészei, mindenben egyező körülmények között is eltérő telepmorfológiát mutattak. Más izolátumok esetében ugyancsak azt tapasztaltuk, hogy a telepmorfológiai jellemzők nagyon változóak. Megfigyeltük továbbá, hogy a bélyegek megváltoztak a tenyészetek többszöri passzálását követően.

A *Phoma sojicola* (Abramov) Kövics *et al.* morfológiai jellemzői alapján erősen hasonlít a *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch fajhoz. Kövics *et al.* (1999) szerint azonban a két faj között mégis található jellegzetes különbségek a telepmorfológia, piknídium és kristályképződés terén. A *Phoma pinodella* könnyen képezett kristályokat maláta agaron egy hetes tenyésztést követően, amíg ez a képesség a *P. sojicola* esetében hiányzott. A saját vizsgálataink során azonban nem sikerült kimutatnunk egyik faj izolátumainál sem a kristályképződést. Boerema *et al.* (2004) szerint a kristályképződés az egyes *Phoma pinodella* izolátumoknál esetleges, illetve a táptalajon végzett többszöri átoltások során a gomba ideiglenesen vagy véglegesen elveszítheti ezt a tulajdonságát. Jelen vizsgálatainkban mindkét faj telepmorfológiája nagymértékben hasonlított egymásra, illetve nem találtunk markáns, jellemzően elkülönítő bélyeget. A telepek színe az ismétlések során –

még ugyanazon izolátum esetében, azonos körülmények között is – nagyon variábilisnak bizonyult. A piknídiumok és konídiumok alakja és nagysága szintén hasonló változatosságot mutatott. A változatosságuk oly mértékű volt, ami alapján nem lehetett a két fajt egyértelműen megkülönböztetni.

Hasonló nehézségekbe ütközött a *Phyllosticta sojicola* Massalongo és a *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* fajok izolátumainak egymástól történő elkülönítése is. Kövics *et al.* (1999) már utaltak rá, hogy a két faj feltételezhetően azonos. A morfológiai bélyegeket vizsgálva megállapítható, hogy sem telepmorfológiában, sem a piknídiumok, illetve konídiumok alakjában és méreteiben nem tapasztalható jelentős eltérés, illetve nagy az izolátumok variabilitása. Egyedül az „E-metabolit” kimutatásában találtunk jelentős, következetes eltérést. A *P. exigua* var. *exigua* izolátumainak a NaOH-próbája pozitív, amíg a *Phyllosticta sojicola* esetében negatív. E különbség oka azonban lehetséges egyszerű mutáció következménye is, amely előidézheti a pozitív NaOH-próbáért felelős „E-metabolit” anyagcseretermék hiányát valamely izolátumnál, különösen a közel 70 éves tartós tárolás (1939-től) és ismeretlen számú átoltást követően. Újabb izolátum azonban – tekintettel a kórokozó ritka fellépésére – nem állt rendelkezésre.

A *P. exigua* var. *exigua* Ph 58 izolátumának morfológiai bélyegeken alapuló taxonómiai helyzetét is bizonytalannak találtuk. A telepmorfológia, piknídium és konídium karakterisztikája alapján az izolátum erősen hasonlított a *P. pinodella* izolátumokhoz. Továbbá a Ph 58 izolátum bőségesen képezett klamidospórákat, mely a *P. pinodella* fajra jellemző tulajdonság. Jelentős eltérést itt is a NaOH-próbánál tapasztaltunk, mivel az izolátum a *P. exigua* var. *exigua* fajokra jellemző pozitív reakciót mutatott. A *P. pinodella* izolátumainak NaOH-próbája azonban minden esetben negatív volt. A molekuláris biológia elemzések során mindhárom marker esetében az izolátum a *P. pinodella* csoportba került. A morfológiai és molekulárisbiológiai eredmények ismeretében joggal feltételezhetjük az izolátumot deponáló személy téves identifikációját.

A *Phoma* genuson belül napjainkig még csak korlátozott számban használtak molekuláris módszereket taxonómiai kérdések tisztázására, más gombafajok esetében azonban már sikeresen alkalmazták ezeket (Taylor *et al.*, 2000). A *filogenetikai fajkoncepció* érvényesítése napjainkig még csak kevés fajra, fajkomplexre terjedt ki a *Phoma* genuson belül.

Munkánk során először próbáltunk meg olyan filogenetikai markereket találni a *Phoma* genuson belül, amelyek alkalmasak lehetnek a fajok – különösen a tradicionálisan nehezen értelmezhető – elkülönítésére. Vizsgálatainkhoz három molekuláris markert választottunk (*tefl*, ITS, β -*tubulin*), amelyek szakirodalmi adatok szerint korábban már sikerrel

alkalmaztak filogenetikai kapcsolatok tanulmányozására több élőlény csoportban, köztük a gombák országában (Fungi) is. A *tefl* gént korábban még nem használták fel filogenetikai rokonságvizsgálati céllal a *Phoma* nemzetség fajainál, jóllehet más gomba taxonoknál már bizonyította alkalmasságát rendszertani kapcsolatok feltérképezésére. Az ITS-régiók evolúciós mércével mérve viszonylag gyorsan változnak. Számos tanulmány alátámasztja, hogy az ITS-régiók alkalmasak rokonsági kapcsolatok vizsgálatára a gombák körében. Az ITS-szekvenciák elemzése a *Phoma* genus-on belül eddig csak kisebb csoportok elkülönítő vizsgálatára korlátozódott. Az ITS-szekvenciákat alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* fajkomplex) vizsgálatára (Mendes-Pereira *et al.*, 2003), a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas *et al.*, 2005), valamint az *Ascochyta pinodes*-komplex taxonómiai vizsgálatára (Fatehi *et al.*, 2003).

A β -*tubulin* gént szintén többen alkalmazták már gombák rendszertani kapcsolatainak feltárására (Baldauf *et al.*, 2000; Yli-Mattila *et al.*, 2004), azonban a *Phoma* genuson belül erre kevés irodalmi utalás van. Voigt *et al.* (2005) a β -*tubulin* gént is felhasználták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* fajkomplex) vizsgálatokor az ITS-régiók mellett.

Az általunk megvizsgált filogenetikai markerek (*tefl*, ITS, β -*tubulin*) mindegyike alkalmasnak bizonyult faji szintű rokonsági kapcsolatok vizsgálatára a *Phoma* genus-ban. Ezek közül a *tefl* gén tűnik a legmegbízhatóbbnak. A több izolátummal képviselt fajok mind azonos csoportba kerültek (*P. pinodella*, *P. exigua*, *P. glomerata*, *P. plurivora*), mely megerősíti a vizsgált filogenetikai markerek alkalmasságát a *Phoma* nemzetségen belül. Mivel a *Phoma* és *Ascochyta* fajok elkülönítése gyakran nem könnyű feladat az *in vivo* különböző sejtszámú konídiumokat képző *Phoma* (pseudo-*Ascochyta*) fajok esetében (Fatehi *et al.*, 2003), ez a molekuláris bélyegek azonban további segítséget nyújthatnak a hovatartozás egyértelmű megállapításához.

Az egyes szekvenciák karakteralapú filogenetikai elemzéssel (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian methods) létrehozott filogenetikai törzsfák alapján a *Phoma* fajok egyértelműen elkülöníthetők voltak egymástól, illetve a közeli rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól. A három filogenetikai módszer előnyeit és hátrányait összehasonlítva a következő megállapításokat tehetjük: az elemzéseknél az egyik leggyakrabban figyelembe vett szempont a gyorsaság, amely a Maximum Parsimony (MP) módszer nagy erőssége; hátránya viszont, hogy nem kínálja fel evolúciós modell megválasztásának a lehetőségét, szemben a másik két módszerrel. A Maximum Likelihood (ML)

elemzéssel kapott eredmény talán a legpontosabb és legmegbízhatóbb, ugyanis ez minden lehetséges mutációs eseményt számításba vesz, amelyek a vizsgált adatokat eredményezhették, így ez közelíti meg legjobban a valódi evolúciós változásokat, melynek azonban az „ára” a számítás időigényessége. A mi adathalmazunkkal ez sokkal több időt vett igénybe mint a másik két módszer, továbbá a bootstrap analízist el sem tudtuk végezni a számítógépes háttér korlátozottsága miatt, mivel a számítás több napot meghaladó időigényt jelentene. Tapasztalataink alapján a karakteralapú filogenetikai módszerek közül a Bayesian módszer tűnik a legjobb választásnak megbízhatósága és viszonylag egyszerű kezelhetősége miatt, bár hangsúlyozni kell, hogy a másik két módszer egyaránt alkalmas a korrekt faji szintű összefüggés-elemzések elvégzéséhez a *Phoma* genus-ban.

Az értekezés új tudományos eredményei

1. Munkánk során kilenc *Phoma*-szerű taxon huszonkét izolátumát vizsgáltuk morfológiai és molekuláris bélyegek összehasonlításával, ezek rendszertani helyzetét részben megerősítettük, részben újrendszerezésükhöz járultunk hozzá.
2. A *Phoma* fajok molekuláris jellemzők alapján egyértelműen elkülöníthetők voltak a közeli rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól. Mivel a *Phoma* és *Ascochyta* fajok elkülönítése morfológiai alapon esetenként bizonytalan, a molekuláris jellemzők („ujjlenyomat”) további segítséget nyújtanak a hovatartozás egyértelmű megállapításához.
3. Három olyan filogenetikai markert használtunk (*tefl*, ITS, β -*tubulin*), melyek alkalmasnak bizonyultak faji szintű rokonsági kapcsolatok vizsgálatára a *Phoma* genus-ban. Ezek közül a *tefl* gén, melyet korábban még nem alkalmaztak filogenetikai rokonságvizsgálati céllal a *Phoma* genuson belül, bizonyult a legmegbízhatóbbnak.
4. A *Phoma sojicola* – erőteljes morfológiai hasonlóság mellett – a *tefl*, ITS és β -*tubulin* szekvenciák alapján a *P. pinodella*-val teljesen azonos. A pillangósvirágú növényeken, így a szóján is betegséget okozó *Phoma sojicola* (Abramov) Kövics et al. (basonym: *Ascochyta sojicola* Abramov, mint „*sojaecola*”) faj, amelynek új kombinációkénti (comb. nov.) leírására 1999-ben került sor (Kövics et al., 1999) taxonómiai helyzetének újraértelmezésére került sor a molekuláris összehasonlító adatok eredményeinek ismeretében. A reprezentatív tenyészetek (PD98/1135, PD97/2160) morfológiai hasonlósága a *P. pinodella* fajjal nyilvánvaló, ugyanakkor a csekély fiziológiai különbség („E-metabolit” termelése a *P. sojicola*-nál, illetve ennek hiánya a *P. pinodella*-nál) – a molekuláris

markerek azonosságának tükrében – nem indokolja a *P. sojicola* taxon önálló fenntartását (Irinyi *et al.*, 2009). Javasoljuk tehát a *P. sojicola* szinonim névként történő alkalmazását a *P. pinodella* részeként.

5. Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált, Németországban a '30-as évek végén járványt okozó betegség egyetlen élő, hozzáférhető izolátuma (CBS 301.39) a filogenetikai markerek alapján a *Phoma exigua* var. *exigua* csoporthoz tartozik. A variábilis morfológia sajátságok mellett a molekuláris adatok alapján a *Phyllosticta sojicola* Massal. megegyező a *Phoma exigua* var. *exigua* fajjal, ezért javasoljuk a *Phyllosticta sojicola* fajnév új kombinációként való használatát a *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* szinonimjaként.
6. A molekuláris génbank (GenBank) adatbázisát kilenc *Phoma*-szerű faj 22 db izolátumának *tefl*, ITS, valamint β -*tubulin* szekvenciájával gyarapítottuk.
7. Hozzájárultunk ahhoz, hogy a pillangósvirágú növényeken károsító, tünettanilag megegyező betegségek kóroktanát tisztázzuk. Károsíthat – mások mellett – a:
Phoma exigua Desm. var. *exigua* (új szinonim: *Phyllosticta sojicola* Massal.);
Phoma pinodella (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch (új szinonimok: *Phoma sojicola* Kövics *et al.*, *Ascochyta sojicola* Abramov).

Összefoglalás

Munkánk során kilenc *Phoma*-szerű taxon huszonkét izolátumát vizsgáltuk morfológiai és molekuláris bélyegek összehasonlításával. A törzseket részletesen tanulmányoztuk és azonosítottuk a *Phoma* fajok taxonómiájának elfogadott koncepciója szerint, amely *in vitro* stabil alaktani és tenyésztési paraméterek standardizált feltételek melletti jellemzésén alapul.

A pillangósvirágú növényeken (Fabaceae), így a szóján (*Glycine max*) is, számos hasonló betegséget okozó, *Phoma*-szerű faj (*Phoma pinodella*, *Phoma sojicola*, *Phyllosticta sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*) fordul elő. Ezen fajok a morfológiai és szimptomatológiai bélyegek alapján egymástól alig megkülönböztethetőek, ami miatt taxonómiájukban a mai napig nagy a bizonytalanság. Az átfedő alaktani bélyegek indokoltá teszik a fajok molekuláris taxonómiai vizsgálatát.

A *Phoma sojicola* (Abramov) Kövics et al. morfológiai jellemzői alapján erősen hasonlít a *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch fajhoz. Kövics et al. (1999) a két faj között mégis jellegzetes morfológiai különbséget találtak a telepmorfológia, piknidiumképzés és kristályképződés terén. A saját jelenlegi vizsgálataink során azonban nem sikerült kimutatnunk egyik faj izolátumainál sem a kristályképződést, mely annak lehet következménye, hogy a gomba elveszítheti ezt a tulajdonságát a táptalajon végzett többszöri átoltás során.

Molekuláris analíziseinkben olyan filogenetikai markereket alkalmaztunk (*tefl*, ITS, β -*tubulin*), melyek megfelelőnek bizonyultak a faji szintű rokonsági kapcsolatok vizsgálatára a *Phoma* genus izolátumainál. Ezek között a *tefl* gén – melyet korábban még nem hasonlóak filogenetikai rokonságvizsgálati céllal ezen csoportban – bizonyult a legmegbízhatóbbnak.

A *Phoma* fajokat molekuláris markerekkel sikerült egyértelműen elkülöníteni a közeli rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól. Mivel a *Phoma* (és *Ascochyta*) fajok elkülönítése morfológiai alapon gyakran nem könnyű feladat, különösen az *in vivo* különböző sejtszámú konídiumokat termelő *Phoma* (pseudo-*Ascochyta*) fajok esetében, ezek a molekuláris jellemzők további segítséget nyújthatnak a faji hovatartozás egyértelmű megállapításához.

A több izolátummal képviselt fajok mind egy csoportba kerültek (*P. pinodella*, *P. exigua*, *P. glomerata*, *P. plurivora*), amely megerősíti a markerek alkalmasságát nemcsak a fajon belüli izolátumok vagy fajkomplexek összehasonlítására, hanem az egyes fajok elkülönítésére is a *Phoma* genus-ban.

Munkánk során három különböző nukleotidalapú filogenetikai módszert alkalmaztunk (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian methods) az egyes markerek összehasonlításában, egyenként megvizsgálva azok előnyeit

és hátrányait. Tapasztalataink alapján a karakteralapú filogenetikai módszerek közül a Bayesian módszer tűnik a legmegfelelőbb választásnak megbízhatósága és viszonylag egyszerű kezelhetősége miatt.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39) a molekuláris markerek alapján a *Phoma exigua* var. *exigua* csoport tagjaival mutat azonosságot, továbbá a morfológiai hasonlóságokat is figyelembe véve javasoljuk a *Phyllosticta sojicola* Massal. fajnév szinonimként való használatát a *P. exigua* Desm. var. *exigua* fajhoz tartozóan.

A vizsgált *Phoma sojicola* izolátumok a *P. pinodella* csoportba rendeződtek, mivel a *tefl*, ITS és β -*tubulin* szekvenciájuk gyakorlatilag teljesen azonos volt. A szóján betegséget okozó *Phoma sojicola* (syn.: *Ascochyta sojicola*) faj, amelynek új kombinációkénti (comb. nov.) leírására 1999-ben került sor, taxonómiai helyzetének újraértelmezését tartottuk szükségesnek a molekuláris összehasonlító adatok eredményeinek ismeretében. A reprezentatív tenyészetek (PD98/1135, PD97/2160) morfológiai hasonlósága a *P. pinodella* fajjal nyilvánvaló, ugyanakkor a fiziológiai különbség („E-metabolit” termelés a *P. sojicola*-nál, illetve ennek hiánya a *P. pinodella*-nál) – a molekuláris markerek azonosságának tükrében – nem indokolja a *P. sojicola* taxon önálló fenntartását (Irinnyi *et al.*, 2009). Javasoltuk tehát a *P. sojicola* (Abramov) Kövics *et al.* szinonim elnevezéskénti alkalmazását a *P. pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch faj részeként.

Irodalom

- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W. F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290: 972-977.
- 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., 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.
- Druzhinina, I., Kubicek, C.P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species cluster? *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6B (2): 100-112.
- Fatehi, J., Bridge, P.D., Punithalingam, E. (2003). Molecular relatedness within the “*Ascochyta pinodes*”-complex. *Mycopathologia* 156: 317-327.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 1323-1330.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Irinyi L., Kövics, G.J., Sándor, E. (2009). Taxonomic re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi. *Mycological Research* 113: 249-260.
- Kövics, G.J., de Gruyter, J., van der Aa, H.A. (1999). *Phoma sojicola* comb. nov. and other hyaline-spored coelomycetes pathogenic on soybean. *Mycological Research* 103: 1065-1070.
- Mendes-Pereira, E., Balesdent, M.-H., Brun, H., Rouxel, T. (2003). Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycological Research* 107: 1287-1304.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., Deerfield, D.W. II. (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, Embnew. *News* 4: 14.
- Noordeloos, M.E., de Gruyter, J., Eijk, G.W., van, 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.
- Posada, D., Grandall K.A. (1998). Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

- Rayner, R.W. (1970). A mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, and British Mycological Society.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21-32.
- 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.
- Voigt, K., Cozijnsen, A. J., Kroymann, J., Pöggeler, S., Howlett, B.J. (2005). Phylogenetic relationships between members of the crucifer pathogenic *Leptosphaeria maculans* species complex as shown by mating type (MAT1-2), actin and β -tubulin sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 541-557.
- 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, Inc., New York.
- Yli-Mattila, T., Mach, R.L., Alekhina, I.A., Bulat, S.A., Koskinen, S., Kullnig-Gradinger, C.M., Kubicek, C.P., Klemsdal, S.S. (2004). Phylogenetic relationships of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, β -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology* 95: 267-285.

Irinyi László publikációi az értekezés témakörében

Folyóiratban megjelent lektorált közlemények idegen nyelven:

Irinyi, L. – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2009). Taxonomic re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi. *Mycological Research* 113: 249-260.

Impakt faktor: 1.861

Irinyi, L. – Sándor, E. (2008). Bayesian inference in the phylogeny of *Phoma* taxons. *Cereal Research Communications* 36: 1061-1064.

Impakt faktor: 1.190

Könyvfejezet idegen nyelven:

Irinyi, L. – Gade, A.K. – Kövics, G.J. – Rai, M.K. – Sándor, E. (2009). Morphology and Molecular Biology of *Phoma*. pp. 171-204. In: *Current advances in molecular mycology*. Gherbawy, Y., Mach, R.L., Rai, M.K. (Eds.) Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.

Folyóiratban megjelent lektorált közlemények magyar nyelven:

Irinyi, L. – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2008). *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálata maximum likelihood analízissel. *Agrártudományi Közlemények* 2008/30: 37-46.

Irinyi, L. – Kövics, G.J. – El-Naggar, M. – Sándor, E. (2007). *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálata. *Agrártudományi Közlemények, Különszám* 2007/26: 100-107.

Egyéb lektorált közlemények:

Irinyi, L., Kövics, G.J., Sándor, E. (2009). *Phoma*-szerű gombák filogenetikai vizsgálata Bayesian analízissel. 70-76. pp. in: XIX. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2009. február 4-6. Pannon Egyetem, Keszthely.

Irinyi, L. – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2008). Phylogenetic estimation of *Phoma*-like fungus by Bayesian approaches. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55: 199.

Irinyi, L. – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2008). Szóján előforduló *Phoma*-szerű gombák filogenetikai vizsgálata Bayesian módszerrel. 78-97. pp. in: Kövics Gy.J. – Dávid I. /szerk./ (2008): 13. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum. Előadások – Proceedings. Debrecen, 2008. október 15-16. Debreceni Egyetem, Debrecen.

- Irinyi, L.** – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2008). Bayesian módszer alkalmazása a *Phoma* taxonok filogenetikai vizsgálatában. 4-12. pp. in: XVIII. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2008. január 30.-február 1. Pannon Egyetem, Keszthely.
- Irinyi, L.** – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2007). A phylogenetic study on different *Phoma* species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54: 51.
- Irinyi, L.** – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2007). Szóján előforduló *Phoma*-szerű gombák filogenetikai vizsgálata. 107-127. pp. in: Kövics Gy.J. - Dávid I. /szerk./ (2007): 12. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum. Előadások – Proceedings. Debrecen, 2007. október 17-18. Debreceni Egyetem, Debrecen.
- Irinyi, L.** – Kövics, G.J. – Rai, M.K. – Sándor, E. (2006). Studies of evolutionary relationships of *Phoma* species based on phylogenetic markers. pp. 99-113. In: 4th International Plant Protection Symposium at Debrecen University, Recent Developments of IPM. Proceedings. Kövics, G.J. – Dávid, I. (Eds.). Debrecen University Centre for Agricultural Science, Faculty of Agriculture. 18-19 October, 2006, Debrecen.
- Irinyi, L.** – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2006). New phylogenetic marker for the classification of *Phoma* species. The 4th International Symposium „Natural resources and sustainable development”. (Ed.: M.T. Teodor). University of Oradea, Oradea 10-11 October, 2006. 253-260.
- Irinyi, L.** – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2006). A study of the utility of translation elongation factor 1 as a phylogenetic marker for *Phoma* genus. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 53: 279-280.
- Irinyi, L.** – Kövics, G.J. – Sándor, E. (2006). Classification of *Phoma* species using new phylogenetic marker. *Analele Universității Din Oradea, Fascicula Agricultură – Horticultură*, Editura Universității Din Oradea, Volume XII, Anul 12: 91-97.
- Deshmukh, P. – Rai, M.K. – Kövics, G.J. – **Irinyi, L.** – Sándor, E. (2006). *Phoma* – Can these fungi be used as biocontrol agents and sources of secondary metabolites? (A review). pp. 224-232. In: 4th International Plant Protection Symposium at Debrecen University, Recent Developments of IPM. Proceedings. Kövics, G.J. – Dávid, I. (Eds.). Debrecen University Centre for Agricultural Science, Faculty of Agriculture. 18-19 October, 2006, Debrecen.