

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

***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 betétlapja**

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
az agrártudományok tudományágban

Írta: Irinyi László Miklós okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán doktori iskolája  
(földhasználat és területfejlesztés doktori programja) keretében

Témavezetők: dr. Sándor Erzsébet és dr. Kövics György

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:	Prof. dr. Sinóros-Szabó Botond	DSc
Tagok:	Prof. dr. Kátai János	CSc
	Dr. Percze Attila	PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2008. június 4.

Az értekezés bírálói:

	Név	Tud. fokozat
	Prof. dr. Sipiczki Mátyás	DSc
	Prof. dr. Érsek Tibor	DSc

A bírálóbizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
elnök	Prof. dr. Szarukán István	CSc	
tagjai:	Prof. dr. Virányi Ferenc	DSc	
	Prof. dr. Kátai János	CSc	
	Dr. Nagy Géza	PhD	
titkár:	Dr. habil. Radócz László	CSc	

Az értekezés védésének időpontja: 2009. ....

# Tartalomjegyzék

Bevezetés .....	3
1. Irodalmi áttekintés .....	7
1.1. A faj, mint rendszertani kategória a gombák körében .....	7
1.2. Fajfogalmak .....	9
1.3. Molekuláris taxonómiai módszerek a gombarendszertanban .....	16
1.4. A mitospórás gombák .....	22
1.5. A <i>Phoma</i> Saccardo (1880) nom. cons. genus története, rendszertani helyzete ...	23
1.5.1. Történeti áttekintés .....	23
1.5.2. A <i>Phoma</i> genus és szekciói .....	26
1.5.3. Új perspektívák a genus taxonómiájában .....	29
1.5.4. A <i>Phoma</i> genus és a molekuláris filogenetika .....	30
1.6. A pillangósvirágú növényeken károsító, egyes <i>Phoma</i> -szerű fajok taxonómiai kérdései .....	31
1.7. Az <i>Ascochyta</i> nemzetség .....	36
1.8. Filogenetikai kapcsolatok vizsgálata .....	37
1.9. Filogenetikai markerként használt szekvenciák .....	50
2. Anyag és módszer .....	55
2.1. Morfológiai vizsgálatok .....	55
2.2. Molekuláris vizsgálatok .....	57
2.3. Filogenetikai analízisek .....	58
2.3.1. A filogenetikai elemzésekhez használt programok .....	59
2.3.2. Maximum Likelihood analízis .....	61
2.3.3. Parsimony analízis .....	61
2.3.4. Bayesian analízis .....	62
3. Eredmények .....	65
3.1. Morfológiai vizsgálatok .....	65
3.1.1. A <i>Phoma pinodella</i> D/035 izolátumának morfológiája .....	65
3.1.2. A <i>Phoma pinodella</i> CBS 318.90 izolátumának morfológiája .....	66
3.1.3. A <i>Phoma pinodella</i> D/095 izolátumának morfológiája .....	68
3.1.4. A <i>Phoma pinodella</i> PD 82/550 izolátumának morfológiája .....	70
3.1.5. A <i>Phoma pinodella</i> PD 77/165 izolátumának morfológiája .....	71
3.1.6. A <i>Phoma sojicola</i> PD98/1135 izolátumának morfológiája .....	73
3.1.7. A <i>Phoma sojicola</i> PD 97/2160 izolátumának morfológiája .....	75
3.1.8. A <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> D/075 izolátumának morfológiája .....	76
3.1.9. A <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> D/077 izolátumának morfológiája .....	78
3.1.10. A <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> Ph 58 izolátumának morfológiája .....	80
3.1.11. A <i>Phoma exigua</i> var. <i>linicola</i> D/071 izolátumának morfológiája .....	81
3.1.12. A <i>Phyllosticta sojicola</i> D/050 izolátumának morfológiája .....	83
3.2. Molekuláris vizsgálatok .....	85
3.3. Genomi DNS izolációja .....	85
3.4. DNS-szakaszok felszaporítása PCR-rel .....	85
3.5. Szekvenciarendezés .....	86
3.3. Filogenetikai elemzések .....	88
3.3.1. A <i>tefl</i> szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák .....	88
3.3.2. Az ITS-szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák .....	93
3.3.3. $\beta$ - <i>tubulin</i> szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák .....	98
4. Következtetések, javaslatok .....	106
5. Új eredmények .....	112

6. Összefoglalás .....	114
7. Summary .....	116
8. Irodalom .....	118
9. Mellékletek .....	136
10. Köszönetnyilvánítás.....	146
11. Irinyi László publikációi az értekezés témakörében.....	147
12. Nyilatkozatok.....	149

## Bevezetés

A kórokozó gombák a növénybetegségek előidézésének 40–60%-áért felelősek. Ezek jelenlegi leírt fajszáma közel hetvenötezer, amely a ténylegesen létező, becsült gombafajok számának csupán hét százaléka (Rosmann, 1994; Kirk *et al.*, 2008). Ily módon a gombák biológiai diverzitásának megismerésében még számos feladat áll a mikológusok előtt – a tradicionális eszköztár pedig újabb és újabb technikák segítségével lehetővé teszi a filogenetikai összefüggések feltárását, esetenként az eddig kialakított rendszerek átalakításával – a genetikai szintű megismerés tükrében. A közelmúltban olyan gombacsoportok rendszerezését is új alapokra helyezték, mint a lisztharmatok (Braun és Takamatsu, 2000). 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 molekuláris eszközök segítségével.

A Coelomycetes osztályba tartozó *Phoma* genus világszerte elterjedt, többségében fitopatogén, opportunista parazita vagy szaprofiton életmódot folytató fajokat tartalmaz. A *Phoma* genus története több mint 130 évre nyúlik vissza. A 19. században és a 20. század első felében 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. Valójában 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 kilenc szekciót tartanak számon (Boerema *et al.*, 2004), melyek közül néhány mesterséges, míg mások természetes egységet alkotnak.

A gombataxonómiában jelenleg három elfogadott fajfogalom-megközelítés van elterjedve: a morfológiai, a biológiai és a filogenetikai. A *morfológiai faj*-koncepció az egyes gombafajok morfológiai megjelenését, bélyegeit veszi alapul, és ennek alapján rendszerezi őket. A *biológiai faj*-koncepció szerint azon populációk tartoznak egy fajba,

amelyek egymással szexuális úton szaporodási közösséget alkotnak. Ennek ellenére nagyon sok aszexuálisan szaporodó gombafaj, beleértve a *Phoma* genus tagjait is, meglepően nagy genetikai variabilitású. A legújabb, a *filogenetikai faj*-koncepció bizonyos nukleinsav-szekvenciák változatosságát (DNS-polimorfizmus) alapul véve próbálja meghatározni a különbségeket vagy azonosságokat, illetve rokonsági viszonyokat az izolátumok között.

A *Phoma*-fajok rendszerezésében, hasonlóan a gombafajok többségéhez egészen napjainkig a régebbi, tradicionálisnak tekintett *morfológiai* alapú, esetenként a *biológiai faj*-koncepciót követték. Az egyes *Phoma*-fajokat mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között stabil morfológiai, fenotípusos és fiziológiai bélyegek alapján rendszerezik, amelyeket standardizált körülmények között vizsgált telepjellemzőkkel egészítenek ki. A morfológiai alapú fajmeghatározásnak gyakori gyengesége, hogy az egy fajba sorolt izolátumokról a genetikai vizsgálatok alapján bebizonyosodhat, hogy valójában nem is egy faj tagjai. Mivel a *Phoma* fajok többsége nem szaporodik ivaros úton, csak ivartalanul, ezért a *biológiai faj*-kategória meglehetősen korlátozottan alkalmazható erre a genusra. A *morfológia faj*-megközelítés a fentebb említett okok miatt nem ad mindig megbízható eredményt, ezért indokolt a molekuláris taxonómiai vizsgálatokon alapuló, *filogenetikai faj*-koncepció alkalmazása a genus-on belül.

Napjainkban a filogenetikai kapcsolatok elemzésének középpontjában a DNS-polimorfizmus áll, mely bizonyos gének (markerek) nukleinsav-sorrendjének változatosságán alapszik. Jelenlegi ismereteink alapján a DNS-szekvencia elemzése (molekuláris taxonómia) tűnik a legalkalmasabb módszernek a gombák törzsféjlődésének, rokonsági viszonyainak vizsgálatára. A molekuláris taxonómiai vizsgálatok már számos lényeges változást iniciáltak a gombák filogenetikai rendszertanában. Számos gombafajnál sikeresen alkalmazták a filogenetikai fajelismerést, és így különítették el olyan fajokat, amelyeket előzőleg sem morfológiailag, sem biológiailag nem tudtak elkülöníteni. Ezidáig a különböző molekuláris markerek szekvenciaanalízise a *Phoma*-fajoknál alig került alkalmazásra, csupán kisebb csoportok elkülönítő vizsgálatára korlátozódott. Ezért vizsgálataink célja olyan filogenetikai markerek keresése és alkalmazása volt, amelyek alkalmasak a faji szintű – különösen a tradicionálisan nehezen kezelhető fajok esetében – rokonsági viszonyok feltérképezésére a *Phoma* genuson belül.

A filogenetikai vizsgálatainkhoz más gombacsoportoknál már használt, és többé-kevésbé megbízhatónak bizonyult molekuláris markerek szekvenciaanalízisét

választottuk. A filogenetikai célú szekvenciaösszehasonlítás nagyrészt olyan genom szakaszok vizsgálatán alapul, amelyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak maradnak az evolúció során.

A molekuláris taxonómiai vizsgálatainkhoz három olyan markert választottunk (*tefl*, ITS,  *$\beta$ -tubulin*), amelyek szakirodalmi adatok alapján korábban már alkalmasnak bizonyultak filogenetikai kapcsolatok tanulmányozására a gombák körében. A filogenetikai vizsgálatok során célszerű egyszerre több gént vizsgálni, mivel a *közös származáson alapuló fajelismerés* (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition = GCPSR) elmélet szerint több gén elemzésekor pontosabb és megbízhatóbb eredményt kapunk az egyes taxonok közötti filogenetikai kapcsolatokra.

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

Pillangósvirágú növények körében (Fabaceae), így a szóján is (*Glycine max*) 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, ami indokoltá teszi ezen fajok, izolátumok molekuláris taxonómiai komparatív vizsgálatát.

A *Phoma*-szerű gombák taxonómiájának konvencionális és molekuláris biológiai összehasonlításával kapcsolatos kutatómunkámat a következő célkitűzések szerint állítottam össze és végeztem el:

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 method) 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 alapon.
6. Szóján (*Glycine max*) előforduló, eredetileg *Phyllosticta sojicola* Massolongo-ként deponált izolátum rendszertani helyzetének tisztázása filogenetikai markerek analízisével.



# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1. A faj, mint rendszertani kategória a gombák körében

A faj problematikája lényegében azt a kérdést érinti, hogy mi jelent a faji hovatartozás, mit is értünk az alatt, hogy egy gombatorzs mondjuk *Phoma pinodella*-nak számít. A gond az ilyen egyszerűnek látszó kérdésekkel az, hogy a tüzetesebb vizsgálatok szerint – bár nap mint nap használunk fajneveket – azok szabatos megválaszolása korántsem egyszerű. Lényegében egy több ezer éves filozófiai problémával kell szembenéznünk. Vajon miben és milyen mértékben kell hasonlítaniuk az egy fajba tartozó egyedeknek? És ha igen, miben és milyen mértékben? Makrostrukturális (morfológiai) vagy mikrostrukturális (genetikai) tulajdonságaikban?

Az *esszencialista* (lényegre törő) *gondolkodás* szerint természeti identitások csoportjaiba (natural kind), ún. természetes fajok körébe olyan biológiai egyedek tartoznak, amelyek lényegi (szubsztanciális) hasonlóságot mutatnak egymással. A definícióhoz elvileg minden esetben megadhatjuk a tulajdonságoknak egy olyan csoportját, amik alapján egyértelműen eldönthetjük, hogy egy adott individuális entitás része-e az így meghatározott kategóriának (természetes fajnak) vagy sem. A biológián belül az *esszencialista szemlélet* azt vallja, hogy két, egymáshoz lényegileg hasonlító egyed ugyanabba a fajba (sepecies) tartozik. A fajok definíciója pedig azoknak a tulajdonságjegyeknek a meghatározását jelenti, amik ezt a lényegi hasonlóságot biztosítják. Az esszencialista szemlélet Arisztotelész (384-322) és Platón (428-348) munkáira és a munkáik által kiváltott hatásokra vezethető vissza. Az irányzat későbbi legjelentősebb képviselője Linné (1707-1778) volt, akinek fajfogalma és gyakorlatilag mindmáig használatos nevezéktana az arisztoteléliánus eredetű esszencializmust tükrözi. Ezzel az elmélettel áll szemben a Lamarck (1774-1829) és Darwin (1809-1882) által kidolgozott *evolúciós elmélet*, mely az mondja, ha a fajoknak nevezett természetes csoportosulások állandó változáson mennek keresztül, akkor nem építhető ki egy határozott (definitív) taxonómia (ami a fajok pontos lényegmeghatározásán alapulna), ennek hiányában pedig – véli Lamarck – semmi indok nincs arra, hogy a fajok reális létezéséről beszéljünk. Darwin (1859) a következőt állítja: „A fajokat úgy kell kezelni, (...) mint a kényelem kedvéért alkotott, pusztán mesterséges kombinációkat.”

A *biológiai rendszerezés* (taxonómia) alapjait a legutóbbi időkig az élőlények hasonlóságára építő osztályozás (esszencializmus) jelentette. Szemben a darwinizmus szellemével, ebben sokkal inkább összhangban van az elemeket egységes rendszerbe szervező természeti folyamat. Azonban fontos kihangsúlyozni, hogy az evolúciós szemlélet nem zárja ki automatikusan a lényegi alapon működtetett rendszerezést.

Az esszencialista elméletnek két fő gyenge pontja van: (1) testvérfajok (hasonló morfológiai tulajdonságok különböző fajoknál), és (2) politipikus fajok (jelentős morfológiai eltérések egy fajon belüli kezelése).

Hull és Ruse (1998), valamint Ghiselin (1995), evolúcióbiológusok (Lamarck és Darwin követői) felismerésének nagyszerűsége abban áll, hogy a fajok meghatározását egy filozófiai lépéssel szabadították ki az esszencializmus szorításából. A darwiniánus megközelítést a fajok meghatározásának alapjává tették, e rendszerezés alapjául szolgáló természeti folyamatot pedig a leszármazásban határozták meg. A koncepció valójában nagyon egyszerű. Lényegében arról van szó, hogy Hull és Ghiselin azt javasolják, a fajokat ne természeti fajoknak, hanem individuumoknak tekintsük (*individualista elmélet*). Amennyiben a fajokat individuumoknak tekintjük, ahhoz, hogy két egyedet ugyanabba a fajba soroljunk, nem szükséges, hogy azok hasonlítsanak egymáshoz. Az egy fajhoz tartozás kritériumát a Hull–Ghiselin-féle individualitás-tézis a leszármazásban látja. Vagyis egy adott fajt az tart össze, hogy a részek között létezik egy bizonyos oksági vagy rész-egész viszony, ami biztosítja a faj identitását. Ghiselin munkáiban (1995, 1997) azt javasolja, hogy a fajok tagjai helyett fajok részéről beszéljünk, a fajok neve pedig nem köznévvé, hanem tulajdonnévvé lesz. A fajok ugyanúgy egyszerűek, mint például egy emberi személyiség, hiába jönne létre egy ahhoz tökéletesen hasonló másik egyed, az semmiképp sem lenne ugyanaz a személy. Az individualista fajfogalom szerint a morfológiai hasonlóságot mutató egyedek nem feltétlenül tartoznak egy fajba, míg morfológiailag jelentősen eltérő egyedek is tartozhatnak ugyanabba a fajba. Az individualista elmélet támogatói szerint a fajoknak ugyanúgy van születésük és haláluk, mint például egy organizmusnak. E szerint a fajok fejlődésük során jelentős változásokon mehetnek át anélkül, hogy új faj létrejöttéről beszélhetnénk.

Az esszencialista tézis egyik alternatívája, hogy a természeti fajok meghatározását nem morfológiai jellemzőkre, hanem mikrostrukturális tulajdonságokra igyekszik alapozni. Ezen alternatíva szerint a genetikai állomány és a közös genetikai leszármazás definiálna egy fajt. Az individualisták azonban elutasítják ezt az alternatívát is,

mondván, hogy végső soron ezeknél is a hasonlóság az, amire a meghatározás épül, és így a biológiai evolúció (tehát a leszármazási elv) nem játszik meghatározó szerepet a fajok mikrostrukturális definíciójában.

Ernst W. Mayr evolúcióbiológus, 1942-es könyvében kidolgozta az ún. *biológiai fajfogalmat*, amit a következőképpen definiált: „A fajok a természetes populációk olyan aktuálisan vagy potenciálisan kereszteződő csoportjai, amik reprodukcióban izoláltak más ilyen csoportoktól.” Mayr tehát a reprodukcióban látja a faj meghatározását, ami feltételezi az egyes csoportok különálló evolúcióját. A biológiai fajfogalomnak a sebezhetősége két ponton mutatkozik: a tézis nem tud választ adni a természetben létrejövő fertilis hibridek keletkezésére, valamint sokat vitatott hiányossága, hogy nem alkalmazható aszexuális úton szaporodó élőlényekre. Így az értekezésemben tárgyalt *Phoma* genusra sem alkalmazható. Mindamellettt azt is észre kell venni, hogy a biológiai fajfogalom nem individualista.

Az eredeti Hull–Ghiselin-konceptió egyik legkövetkezetesebb alternatíváját talán az ún. *kladisztikus fajfogalom* jelenti, melynek lényege, hogy a fajokat szigorúan két speciációs esemény közötti monofiletikus leszármazási ágban határozza meg, és elveti a morfológiai mikro- vagy makrostrukturák szerepét a meghatározásban. A kladista fajfogalom mellett, hogy radikálisan antiesszencialista és a fajokat individuális entitásoknak tekinti, ugyancsak beleütközik a vegetatív szaporodás problémájába és ezzel az individualitásról alkotott fogalomba. Hull és Ghiselin ezt a problémát azzal próbálja feloldani, hogy számukra a fajok az organizmusokhoz hasonló individuális entitások, és ahogy egy organizmus identitását, azaz meghatározó belső szerveződését sem csorbítja az, ha eltűnnek vagy kicserélődnek egyes összetevői, úgy a fajok entitását sem csorbítja, ha elpusztul néhány egyed.

## **1.2. Fajfogalmak**

A fajról alkotott elméletek hosszú idő óta állnak a taxonómusok figyelmének a központjában, és szolgálnak alapul, vagy szolgáltatnak alapot a tudós társadalom egyfajta állandó megosztottságára a fajfogalom értelmezése körül. De mi is valójában a faj? Általánosságban elmondható, hogy a faj a rendszerezés alapegysége, vagyis alapvető rendszertani egység (taxon). A faj a vizsgált élőlényeknek a rendszertani hierarchiában a legalacsonyabb és legfontosabb rangja.

A mikológiában sem létezik egy általánosan, mindenki által elfogadott fajfogalom. Az ivartalan szaporodás gyakorisága, valamint a hifaasztomózisok (paraszexuális kapcsolat) megnehezítik a fajmeghatározást. A gombamicélium látszólag egy élettani és ökológia egység, pedig valójában egy „genetikai mozaik”. Emiatt nem mindig egyszerű különbséget tenni az egyed és a populáció között, ami gyakran zavaró tényező a genetikai vizsgálatokban. Ezért is fordulhat elő, hogy szinte megszámlálhatatlan, jelenleg mennyi fajfogalom létezik. Ezek gyakran azt eredményezik, hogy egyes szerzők adott élőlénycsoportokat jelentősen eltérően ítélnék meg (Mallet és Willmot, 2003). Mayden (1997) több mint 20 fajfogalmat különböztet meg könyvében, melyet két nagy csoportba foglal: *elméleti* (theoretical) és *gyakorlati* (operational) fogalmak. A gyakorlatinak, amely jóval több fajfogalmat foglal magában, nagy előnye az elméletivel szemben, hogy jól használható egyes fajok azonosítására. Mayden (ibid.) ugyanakkor csak egy elméleti fajfogalomra tér ki: az *evolúciós* fajfogalomra (Evolutionary Species Concept = ESC), jóllehet számos más elméleti fajfogalom létezik még rajta kívül: a teremtéselmélettől a fentebb tárgyalt darwini evolúcióig. Az ESC a következőképpen definiálja a fajt: egy populáció leszármazottjainak azon egyedei, melyek jól elkülönülnek a másik populáció leszármazottjaitól, és amelyek rendelkeznek saját evolúciós iránnyal és pályával (Wiley, 1978).

Napjainkban a leggyakrabban vitatott 3 gyakorlati fajfogalom: a *morfológiai* (Morphological Species Concept = MSC), a *biológiai* (Biological Species Concept = BSC) és az egyik legújabb: a *filogenetikai* (Phylogenetic Species Concept = PSC). Mayden (ibid.) az evolúciós fajfogalomhoz képest másodlagosan tekint erre a három koncepcióra. Kompatibilisak vele abban az értelemben, hogy mindhárom fajfogalom evolúciós fajokat próbál elismerni (Avice és Wollenberg, 1997). Az ESC azonban nem alkalmas fajok azonosítására, mivel nem rendelkezik elkülönítési kritériumokkal. A másodlagos, gyakorlati fajfogalmak (MSC, BSC, PSC) azonban rendelkeznek azon kritériumokkal, amelyben a vizsgált egyedet az ismert rendszertani egységek valamelyikébe besorolják, így amikor egy faj azonosításáról van szó, ezekhez a fajfogalmakhoz fordulhatunk segítségért. Ennek megfelelően, hogy hangsúlyozzák az elméleti és gyakorlati fajfogalmak közötti különbséget, gyakran használják a „elismerés” vagy „fajazonosítás” szót („species recognition”) a gyakorlati fajfogalmakra, a „fogalom” („concept”) szó helyett, amelyet csak az elméleti fajfogalmakra használnak.

Napjainkban a gombák körében – más csoportokhoz hasonlóan – a leginkább elterjedt és használt fajmeghatározási módszer a tradicionálisnak tekintett morfológiai alapú fajelismerés (MSR), esetenként kibővítve a biológiai alapúval (BSR). A közel hetvenötezer leírt gombafajt – néhány kivételtől eltekintve – morfológiai jegyek alapján, leggyakrabban az ivaros és ivartalan szaporítóképletek mikroszkópos vizsgálata (Hawksworth *et al.*, 1995), vagy egyéb fenotípusos bélyegek alapján jellemezték. Ilyen fenotípusos tulajdonság lehet a növekedésbeli különbség különböző hőmérséklet és páratartalom mellett (Pitt, 1979); vagy különböző anyagcseretermékek (Frisvad és Filtenborg, 1990), illetve pigmentek termelése (Besl és Bresinsky, 1997). Az MSR-ben elsődleges és másodlagos morfológiai bélyegeket lehet megkülönböztetni: az elsődlegesek közé tartozik a spóráképző micélium (sporofór) felépítése (pl. fialid, blasztikus), a spóráképzés módja, a spóra típusa, nagysága, alakja, a válaszfalak száma, a spórák lefűződésének a módja, a spórafüggelékek megléte vagy hiánya. A másodlagos bélyegek közé tartoznak a növekedéssel és annak mértékével összefüggő tényezők, mint a hőmérséklet, a táptalaj, a tenyészet színe, alakja, a telep felépítése. Mivel a morfológiai bélyegeket erősen befolyásolják a különböző környezeti feltételek, ezért fontos követelmény, hogy a vizsgálatok szigorúan meghatározott, standard környezeti körülmények között történjenek. A különféle élettani jellemzőket abban az esetben vizsgálják, amikor kevés morfológiai bélyeg áll rendelkezésre a vizsgált egyed határozásához. Az MSR nagy előnye, hogy mivel eddig minden leírt gombfajra alkalmazták, könnyen fel lehet használni különböző taxonok identifikálására, a már meglévő adatok felhasználásával, egyszerű összehasonlítás segítségével. A morfológiai alapú faji meghatározás alapvető fontosságú a gombák azonosításában, sok esetben azonban változékonyságuk és az átmeneti formák előfordulása nem teszi lehetővé a fajok megbízható meghatározását. Gyakran előfordul, hogy a morfológiai alapon egy fajba sorolt izolátumokról biológiai és filogenetikai kritériumokat alkalmazva bebizonyosodik, hogy valójában nem azonos faj tagjai. Klasszikusnak mondható példa az *Armillaria mellea sensu lato* esete, melyről kiderült, hogy a korábban egy fajnak vélt egysége BSR alapján több mint egy tucat párosodási típust foglal magába (Korhonen, 1978; Anderson és Ullrich, 1979; Anderson és Stasovski, 1992). Egy másik tanulmány a PSR alapján számolt be a *Lentinula edodes* (shiitake-gomba) szegregációjáról, mint ahogyan arról az MSR vagy BSR fajelismerési rendszer szerint korábban már beszámoltak (Hibbett *et al.*, 1995). A közelmúltban klinikailag fontos gombafajokból (*Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*

*neoformans*, *Aspergillus fumigatus* és *A. flavus*) különítettek el több fajt PSR módszerek alkalmazásával (Taylor *et al.*, 1999).

A Mayr (1942) által kidolgozott *biológiai fajfogalom* (BSC) és *fajelismerés* (BSR) előkelő helyet foglal el a mikológiában. A BSC a fajt egy valóságos vagy lehetséges kereszteződéssel létrejött populációegyüttesnek tekinti, amely belső reprodukív korlátok mentén izolálódik. Érdekesség, hogy Mayr-t több, mint másfél évtizeddel megelőzően, Shear és Dodge (1927) már beszámolt róla, hogy a morfológiailag azonos *Neurospora sitophila* (régai nevének: *Monilia sitophila*) 3 különböző párosodási típusú törzset foglal magába, ezek a: *Neurospora crassa*, *N. sitophila* és *N. tetrasperma*. 1987-ben Brasier már több mint 40 olyan gombafajt tudott felsorolni, ahol egy morfológiailag azonosított faj több biológiai fajt foglalt magába. A gombáknál a BSR-t egymással kompatibilis párosodási csoportok azonosítására használják ami egyes gombáknál, ahol az MSR alapján nem lehet fajokat elismerni – egyenlő a fajkritériummal. Azonban a párosodási tesztek kivitelezhetetlenek olyan csoportoknál, amelyeknek nincsenek ivaros meiosporái. Ez egy komoly hiányossága a BSR-nek, mivel a gombák mintegy 20%-a nem képez meiosporát, azaz szexuális úton nem képes szaporodni (Reynolds és Taylor, 1993). Más gombák viszont homothallikusak, így másik partner nélkül is képesek meiosporát termelni. Sok esetben a gombáknál az is nehezíti a BSR alkalmazását, hogy a párosodást és annak eredményét nehéz kimutatni, továbbá nehéz eldönteni, hogy a létrejött hibrid sterilis vagy termékeny. Ugyancsak problémásak azok a gombafajok (pl. rozsda, lisztharmat), amelyek nem tenyésztethetők mesterséges körülmények között (obligát paraziták). Azonban egy másik probléma is felmerül a biológiai fajfogalommal és -elismeréssel. Vilgalys és Sun (1994) a *Pleurotus ostreatus* fajkomplexet vizsgálták. Nyolc biológiaiilag elkülöníthető csoportot azonosítottak riboszomális RNS gének (rDNS) vizsgálatával a fajkomplexen belül. Azt találták, hogy három olyan biológia faj volt a csoportban, amely egynél több filogenetikai fajt tartalmazott, és minden esetben a filogenetikai fajok földrajzilag egy másik kontinensről származtak. Amit a biológiai fajfogalom szerint három fajnak értelmeztek, az a filogenetikai fajfogalom szerint kilenc fajnak felelt meg. A különbség nem csupán elméleti, mivel a filogenetikai fajok genetikai és földrajzi izolációt egyaránt mutattak. Amint azt Petersen és Hughes (1999) megjegyezte „ezek a fajok a természetben sosem cserélnek géneket, bár potenciálisan képesek rá”.

A filogenetikai fajfogalom alapvetően Nelson és Platnick (1981) elméletén alapszik melyet Cracraft (1983), Nixon és Wheeler (1990), valamint Davis és Nixon (1992)

kibővített. Nixon és Wheeler (1990) szerint „a faj a populáció azon legkisebb egysége (szexuális szaporodás) vagy leszármazottai (aszexuális szaporodás), amelyek egyedi tulajdonságkombinációkkal azonosíthatóak, az egymással összehasonlítható egyedekben”. Az elmélet szerint a faj valamilyen állandó jelleggel rendelkező, legkisebb azonosítható egység. Az elmélet elveti a monofiletikus és parafiletikus kifejezéseket. Módszertanilag a populációk az elemzések alapvető egységei. A filogenetikai kapcsolatok elemzésének (PSR) középpontjában napjainkban a DNS-polimorfizmus áll, mely bizonyos gének (markerek) nukleinsav-sorrendjének változatosságán alapszik. Jelenlegi ismereteink alapján a DNS-szekvenciaelemzés (molekuláris taxonómia) tűnik a legalkalmasabb módszernek a gombák törzsfajlásának, rokonsági viszonyainak vizsgálatára. A molekuláris taxonómiai vizsgálatok már számos lényeges változást eszközöltek a gombák filogenetikai rendszertanában. A szekvencia adatok korszerű, számítógépes feldolgozása, molekuláris törzsfák készítése új lehetőségeket nyújt a mikológusoknak a rendszertani összefüggések filogenetikai felülvizsgálatára.

Kezdetben a kódoló DNS-szekvenciák indirekt vizsgálatát, a fehérjepolimorfizmust alkalmazták. Ezt a *Phoma* genusban is megpróbálták molekuláris markerként használni a '90-es évek közepén, hogy elkülönítsék a morfológiailag hasonló megjelenésű, de feltételezhetően eltérő fajhoz tartozó izolátumokat (Kövics és Gruyter, 1995). A DNS-polimorfizmusnak azonban három nagy előnye van a a fehérjepolimorfizmussal szemben: az első, hogy a szekvenciaváltozás már a DNS szintjén kimutatható; a második előny, hogy DNS szinten sokkal nagyobb valószínűséggel történnek evolúciós változások, amelyek nem biztos, hogy fehérje szinten is kifejeződnek; és végül ehhez kapcsolódik a harmadik előny is, hogy ezen változások nincsenek szelekciós nyomásnak kitéve, így azok hosszabb távon képesek fennmaradni a genomban. Azonban a DNS-polimorfizmus vizsgálatnak is megvannak a maga nehézségei, és kellő óvatossággal kell értékelni az eredményeket. Gyakran előfordul ugyanis, hogy a vizsgált gén vagy DNS-szakasz polimorf egy adott fajon belül, vagy az ellenkezője is bekövetkezhet, hogy ugyanaz a szakasz egyaránt megtalálható két külön egyedben is. Hogy elkerüljük az ilyen típusú hibákat, célszerű több gén vagy DNS-szakasz genealógiáját megvizsgálni a filogenetikai kapcsolatok feltárása során. Mayden (ibid.) ezt a fajta filogenetikai fajfogalmat *közös leszármazás elméletnek* hívja (Genealogical Concordance Concept = GCC). Az elméleten alapuló fajelismerési rendszer pedig az előzőekhez hasonlóan a *közös származáson alapuló fajelismerés* (Genealogical

Concordance Phylogenetic Species Recognition = GCPSR) nevet viseli (Taylor *et al.*, 2000). A rendszer lényegét és megbízhatóságát jelenti, hogy mindig több gént vizsgál a rokonsági kapcsolatok elemzésekor.

A GCPSR alkalmazására napjainkban már számos példa található a gombák köréből a szakirodalomban. A *Gibberella fujikuroi* fajkomplex analízisére O'Donell *et al.* (1998) a  $\beta$ -*tubulin* gént választották nagyszámú izolátumuk vizsgálatához. Először csoportokba rendezték az izolátumokat, majd az egyes csoportok típusizolátumát további két nukleotidszekvencia használatával tovább elemezték. A három gén alapján elvégzett filogenetikai analízis 45 változatot tárt fel a fajkomplexeen belül, amelyből 23 új volt a tudomány számára. Ezek közül korábban hatot biológia fajként azonosítottak párosodási tesztekkel (Hsieh *et al.*, 1977; Leslie, 1995). A biológiai és a filogenetikai faj elkülönítése minden esetben azonos volt. Ez azt mutatja, hogy a PSR ugyanazt az információt szolgáltatja, mint a BSR. A BSR-el azért nem voltak képesek több fajt azonosítani, mivel azok nem párosodtak egymással a tenyészetekben. Bár a későbbiek során megtalálták a jellegzetes morfológiai bélyegeket is az egyes fajoknál (Nirenberg és O'Donell, 1998), előzőleg azonban nem tudták megkülönböztetni a 23 változatot morfológiai alapon. Ebben az esetben a filogenetikai fajelismerés már előre jelezte a morfológiai alapon meglévő kisebb különbségeket, amit végül meg is találtak. Vannak esetek, amikor a fajokat morfológiai alapon nem lehet elkülöníteni, ugyanakkor filogenetikai alapon releváns különbségek mutatkoznak. Számos más gombafajnál is sikeresen alkalmazták a filogenetikai fajelismerést, és így különítették el olyan fajokat, amelyeknél előzőleg sem morfológiailag, sem biológiailag nem tudtak különbséget tenni; pl. *Candida albicans* (Sullivan *et al.*, 1995), *Lentinula lateritia* (Hibbett *et al.*, 1995), *Botryotinia fuckeliana* (Giraud *et al.*, 1997), *Aspergillus flavus* (Geiser *et al.*, 1998), *Filobasidiella neoformans* (Franzot *et al.*, 1999).

Azonban a filogenetikai fajfogalmat és -elismerést is megfelelő kritikai óvatossággal kell kezelni, mivel számos bizonytalansági tényező van, amelyek miatt sokszor valótlán eredményt kaphatunk az elemzések során. Ilyen bizonytalansági faktor, hogy a DNS-polimorfizmust milyen mértéktől tekintjük egy adott fajt meghatározó, specifikus tulajdonságnak. Elegendő-e, ha egy jellemző tulajdonságot vagy gént használunk a fajok elkülönítésére, vagy jóval komplexebben kell megvizsgálni a dolgot, és egyszerre több tulajdonságot, illetve gént kell bevonni az elemzésekbe, és azok alapján feltárni a filogenetikai kapcsolatokat? Ugyancsak kérdéses, hogy a genetikai markerek nagyfokú polimorfizmusa nem emeli-e meg indokolatlanul a fajok számát (Mayden, 1997)?



Kérdés tehát az, hogy mikortól mondhatjuk, hogy egy adott egyed oly mértékben különbözik a másik egyedtől, hogy indokolt egy új filogenetikai faj bevezetése, vagy csupán egy fajon belüli genetikai változékonyságról van szó? Mint látható, itt ismét beleütközünk az esszencialista és kladisztikus fajfogalom által tárgyalt problémakörbe. Hasonló problémába ütközünk akkor is, amikor különböző filogenetikai fajok ugyanazt az allélt hordozzák egy polimorf lokuszon. Ebben az esetben hogyan lehet elkülöníteni őket egymástól? Ezt a problémakört először Doyle vizsgálta (1995, 1997). Más szerzők (Harrington és Rizzo, 1999) úgy gondolják, hogy egy filogenetikai faj-elkülönítés csak akkor alkalmazható, ha az egyedben a DNS-polimorfizmus már fenotípusosan is megjelenik. Ugyanis gyakran előfordul, hogy a DNS szintjén bekövetkező változások (genetikai izoláció) nem feltétlenül jelentkezik azonnal fenotípusos jellegek változásában, jóllehet idővel meg kell, hogy jelenjenek, hacsak nem egy olyan génről van szó, amely nem okoz könnyen érzékelhető morfológiai vagy egyéb élettani változásokat. Itt szembesülünk azzal a kérdéssel, hogy milyen géneket szelektáljunk a filogenetikai vizsgálatokhoz? A filogenetikai célú szekvenciaösszehasonlítás nagyrészt olyan genomszakaszok vizsgálatán alapul, amelyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak maradnak az evolúció során, mint pl. a riboszómális géneket kódoló szekvenciák, a transzlációs elongációs alfa fehérjét kódoló, vagy a tubulin fehérjét kódoló gének. A *Gibberella*, *Candida* és *Aspergillus* nemzetségekben leírt filogenetikai fajok esetében mindenhol találtak fenotípusos, illetve patogenitásbeni különbségeket is. Azonban a *Coccidioides* nemzetségben úgy írtak le pl. két filogenetikai fajt, hogy sem morfológiai, sem fiziológiai különbséget nem találtak. Ugyanakkor különbséget fedeztek fel egyes fehérjék aminosav sorrendjén (Koufopanou *et al.*, 1997), mely ugyan megváltoztatja a fehérjék elsődleges szerkezetét, de nem bizonyított, hogy a fehérje funkcióját is megváltoztatná. Ugyanakkor az sem kizárt, hogy olyan, eddig még nem ismert morfológiai vagy fiziológiai különbség lehet a két *Coccidioides* filogenetikai faj között, melyek felfedezése még várat magára.

A különféle fajelméleteknek köszönhetően változik a gombák sokszínűségéről alkotott képünk is. Az eddig leírt mintegy hetvenötezer gombafajt főleg a morfológiai és biológiai fajelismerést alkalmazva írták le. A filogenetikai fajelismerés csak az utóbbi két évtizedben került előtérbe a molekuláris biológia és a biokémia folyamatos fejlődésének köszönhetően. Egyes mikotaxonómusok a gombák fajgazdagságát mintegy másfél millióra teszik (Hawksworth, 1991, 2001; Hawksworth *et al.*, 1995). Ugyanakkor más szerzők még ezt a számot is mélyen alábecsültnek tartják (Hywel-

Jones, 1993; Fröhlich és Hyde, 1999; Arnold *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2002; Persoh, 2002). A becslések közötti különbségek egyik meghatározó kérdése az lehet, hogy az eddig morfológiailag azonosnak gondolt fajok között vajon mennyi filogenetikai faj található?

### ***1.3. Molekuláris taxonómiai módszerek a gombarendszertanban***

#### ***Elektroforetikus mintázatok összehasonlítása***

A gomba sejtekből különböző technikák alkalmazásával kivont fehérjéket általában elektroforézissel választják el, és az így kapott fehérjemintázatokat vizsgálják. Az elválasztás alapja nagyrészt molekulatömeg alapján történik, mely lehetőséget nyújt különböző fajok, törzsek azonos enzimjei esetében az eltérő izoenzim-mintázatok összehasonlítására. Az izoenzimek elkülönítésére leggyakrabban használt módszerek a keményítőgélelektroforézis, a poliakrilamidgél-elektroforézis (PAGE) és a cellulózacetátgél-elektroforézis (CAE).

#### ***DNS-DNS hibridizáció***

A gomba genom relatíve kis méretének, valamint annak a ténynek köszönhetően, hogy a repetitív szekvenciák aránya sokkal kisebb, mint a növényeknél vagy állatoknál, kezdetben ideális választásnak tűnt a DNS-hibridizációt alkalmazni a filogenetikai kapcsolatok tanulmányozása céljából. A módszer lehetővé teszi, hogy a teljes nukleotid bázissorrend meghatározása nélkül is bizonyítható legyen két DNS-minta hasonlóságának vagy különbözőségének a mértéke. A vizsgálatok többsége inkább a teljes genomi DNS-ek közötti kereszthibridizációk arányára, mintsem a hibridek hőmérséklet-stabilitására fókuszált. Az eredmények azonban nem bizonyultak ígéretesnek a taxonómusok számára, mivel a hibridizációs arány egymáshoz közelálló fajok esetében többségében nagyon alacsony volt, sokszor kevesebb mint 20%. Ugyanakkor ez az arány azonos biológiai fajon belül található különböző egyedek között magasabb mint 90%-nak bizonyult. A pontos magyarázata egyelőre még nem ismert annak, miért található ilyen mértékű különbség a genomi DNS hibridizációs arányában egymáshoz közelálló fajok esetében, mindenesetre a módszer nem alkalmazható filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára (Kurtzman, 1983; Jahnke és Bahnweg, 1986).

### ***Restriktációs fragmentum-hossz-polimorfizmus analízis***

Az RFLP (Restriction fragment length polymorphism) technikát a nukleinsavak bázissorrendjében meglévő különbségek kimutatására kiterjedten használják. A módszer lényege, hogy hasító, ún. restriktációs enzimekkel (speciális endonukleázokkal) feldarabolják a genomot, majd az így keletkezett DNS-fragmentumokat gélelektroforézist alkalmazva, méret szerint elválasztják. A végeredmény egy ún. restriktációs mintázat, melyet két módon lehet értékelni: (1) az RFLP-vel amikor is az egyes fragmentumok hosszát veszik figyelembe és próbálnak meg következtetéseket levonni; (2) a „mapping” (térképezési) eljárással, amikor is a fragmentum-mintázat alapján próbálnak felállítani egy restriktációs enzimtérképet. Mindkét módszer lényege, hogy a restriktációs fragmentum-mintázatból, illetve a restriktációs enzimtérképből következtetnek az evolúciós változásokra, illetve próbálnak rokonsági kapcsolatokat feltárni. Az RFLP-mintázatok használhatók dendogram készítésére, amely alkalmas fajon belüli, illetve fajok közötti rokonsági kapcsolatok kimutatására. A módszert a legkülönbözőbb élőlényeknél alkalmazták már sikeresen filogenetikai elemzésekre (Michelmore és Hulbert, 1987; Bruns *et al.*, 1991). Az RFLP-analízis gyorsan és viszonylag olcsón kivitelezhető, ugyanakkor kérdőjelek merülnek fel a módszer megbízhatóságával kapcsolatban. A legnagyobb bizonytalanságot a gombák körében gyakran előforduló olyan mutációk jelentik, amelyek megváltoztatják a fragmentum hosszát (length mutation), megnehezítve így azok összehasonlíthatóságát. Másik probléma, hogy akár egyetlen nukleotidváltozás (pontmutáció) is gyakran eredményezhet indokolatlanul magas fragmentumszámot vagy változtatja meg a restriktációs enzimtérképet. RFLP-analízis céljából gyakran választanak ki bizonyos specifikus régiókat a genomból, mint a mitokondriális DNS-t (mtDNS), vagy a sejtmagban található riboszomális RNS géneket (rDNS) (Avisé, 2004), amelyeket polimeráz-lánreakcióban (PCR-ben) felszaporítanak, és ezt követően végzik el az analízist. A módszer a PCR-RFLP-analízis nevet kapta. A gombáknál más élőlényekhez hasonlóan a taxonómusok a '90-es évek közepén széles körben alkalmazták ezt a módszert (Chen, 1992; Liu és Sinclair, 1992; Bernier *et al.*, 1994; Bunyard *et al.*, 1994, 1996; Hopple és Vilgalys, 1994; Appel és Gordon, 1995; Donaldson *et al.*, 1995; Erland, 1995; Harrington és Wingfield, 1995; Sappal *et al.*, 1995; Buscot *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 1996; Edel *et al.*, 1996; Guillemaud *et al.*, 1996; Waalwijk *et al.*, 1996; Leal *et al.*, 1997). Az mtDNS RFLP-analízise az egyik legelterjedtebb a

gombataxonómiában, mivel az mtDNS viszonylag könnyen tisztítható és nagy kópiaszámban fordul elő a genomban. Egyes szerzők a gombákban gyakran előforduló plazmidokat is felhasználták restrikcióenzim-analízisekhez, de nagy hátrányuk, hogy előfordulásuk nem univerzális a gombák körében, és a szekvenciájuk sem elegendően konzervatív, továbbá a plazmidok horizontális átvitelét is megfigyelték (May és Taylor, 1989; Collins és Saville, 1990). A DNS-ujjlenyomat készítéséhez a genomi DNS restrikciós fragmentumaihoz radiokativan jelölt szintetikus oligonukleotidokat kapcsolnak. A módszer nagy hátránya azonban, hogy egyrészt restrikciós endonukleázokat, másrészt izotóptechnikát kell alkalmazni.

### ***Elektroforetikus kariotipizálás***

A kariotípus-vizsgálatok a kromoszómák nagyságának, alakjának megismerésére irányulnak, amelyek lehetővé teszik a taxonómiai célú összehasonlítást. A gombáknál az így kapott eredmény azonban sok esetben bizonytalan, aminek fő okaként említhető, hogy a gomba kromoszómák általában lényegesen kisebbek, mint a növények és állatok kromoszómái. További nehézséget jelent a meiózis hiánya, illetve ritka előfordulása egy sor gombacsoportban, hiszen a kromoszómák a meiózis állapotában lévő sejtekben figyelhetők meg a legjobban. Napjainkban három alapvető módszer létezik a kariotípus meghatározására: hagyományos fénymikroszkópos vizsgálatok, elektronmikroszkópia, és az elektroforetikus kariotipizálás. Az utóbbit molekuláris vagy fizikai kariotípus-analízisnek is szokták nevezni, és különböző változatai vannak. Leggyakrabban a pulzáló mezejű gélelektroforézis (Pulsed Field Gel Electrophoresis) ún. CHEF módszerét (Contour-Clamped Homogenous Electric Field) alkalmazzák. Ennek lényege, hogy az elektromos mező irányát meghatározott időprogram szerint változtatják. A vizsgálat eredményeként a kromoszómák és a nagyobb méretű DNS-molekulák határozott sávokba rendeződnek, mérettartomány szerint.

### ***Polimeráz-lánreakció (PCR)***

A PCR (Polymerase Chain Reaction) technika alkalmazásával (a folyamat kidolgozásért Kary Mullis-t Nobel díjjal honorálták 1993-ban) specifikus régiók szaporíthatók fel a genomból (amplikonok), melyek aztán tovább vizsgálhatók, pl. agaróz gélelektroforézissel szétválaszthatók egymástól. A PCR-ujjlenyomat-technikák során a primerek (indítoszekvenciák) bázissorrendjétől, nagyságától függően faj-, változat stb. specifikus DNS-mintázatokat lehet létrehozni, melyek segítségével a vizsgált egyedek

azonosíthatók. Egyéb speciális PCR-módszerek is léteznek, mint pl. a PCR-RFLP, amikor is az amplikont különböző restrikciós enzimekkel emésztik, így egyesítve a PCR- és az RFLP-analízis előnyeit.

### ***RAPD***

A RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) és AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) módszert Williams *et al.* (1990), míg az AP-PCR módszert Welsh és McClelland (1990) használták először filogenetikai célú vizsgálatokhoz. Mindkét módszer egyszerű, gyors és olcsó a genetikai polimorfizmusok kimutatásához. Ezen technikákat elsősorban az egy fajhoz tartozó, különböző izolátumok genetikai variabilitásának megállapításához alkalmazzák (Goodwin és Annis, 1991; Cooke *et al.*, 1996; Hseu *et al.*, 1996; Boyd és Carris, 1997; Jeng *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1997). A módszerek kivitelezésénél nagyon fontos, hogy a polimeráz-lánreakció körülményei szigorúan azonosak legyenek a reprodukálhatóság érdekében. Az egyes fragmentum mintázatokat ugyanis erősen befolyásolják a reakcióelegy  $Mg^{2+}$ , DNS-polimeráz, primer és a templát-DNS koncentrációja, valamint a reakció anellációs hőmérséklete (Bruns *et al.*, 1991).

### ***Szekvenciaelemzés***

Napjainkban a filogenetikai vizsgálatokhoz az egyes élőlényeknél, így a gombák körében is, elsősorban a DNS-szekvenciák elemzése ígérkezik a legmegbízhatóbbnak. A módszer lényege, hogy a genomból PCR-ben felszaporítanak olyan kódoló vagy nem-kódoló DNS-szakaszokat, amelyek alkalmasak taxonok közötti rokonsági kapcsolatok vizsgálatára, majd meghatározzák azok szekvenciáját (nukleotid-sorrendjét). Ezen gének lehetnek olyan fehérjéket kódoló gének, amelyek előfordulnak minden élőlényben és konzervatívak maradtak az evolúció során, és származhatnak a mitokondriumból vagy a sejtmagból. Evolúciós célú szekvenciavizsgálatokban nagyon sok múlik a vizsgálni kívánt megfelelő DNS-szakasz kiválasztásán, ezért számos olyan tényező van, amelyet figyelembe kell venni (Irwin és Wilson, 1991): (1) a DNS-régióknak megfelelő tulajdonsággal kell rendelkeznie ahhoz, hogy a vizsgálni kívánt taxonok között elfogadható különbséget tudjanak tenni. Általában olyan szakaszokat választanak ki, amelyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak maradtak az evolúció során, ugyanakkor elegendő variábilis régiói

legyenek a vizsgálni kívánt taxonok filogenetikai kapcsolatainak vizsgálatához; (2) az ideális DNS-régió egy példányban található a genomban, vagy ha több másolatban is előfordul, akkor a másolatoknak ugyanazon őstől kell származnia (pl. rDNS, mtDNS); (3) a DNS-régióknak lehetőleg ugyanazt a funkciót kell betöltenie minden taxonban, hogy a régióban bekövetkező evolúciós változások ne legyenek kitéve a természetes szelekciós nyomásnak. A fenti követelményeknek eleget téve a filogenetikai tanulmányokban az egyik leggyakrabban alkalmazott szekvencia a riboszómális RNS géneket kódoló (rDNS) szakaszok, melyek minden élőlényben előfordulnak, és meglehetősen konzervatívak, ugyanakkor az egyes régiókban elegendő variabilitással rendelkeznek a különböző rokonsági kapcsolatok vizsgálatához. Lutzoni *et al.* (2004) szerint a gombák körében végzett filogenetikai vizsgálatok 83,9%-a riboszómális géneket kódoló (rDNS) tandem szekvenciák vizsgálatán alapult.

### ***Mitokondriumból és sejtmagból származó rDNS***

Az eukarióta szervezetek magi (nukleáris) rRNS-t kódoló génjei (rDNS) gyakorlatilag azonos szekvenciájú tandem másolatként vannak jelen a genomban (egyenként 8–12 kb nagyságban). Minden egyes másolat rendelkezik kódoló és nem-kódoló régiókkal. A kódoló régiókhoz tartozik a 18S (Small Subunit, SSU), az 5,8S, és a 28S (Large Subunit, LSU), valamint az 5S riboszóma-alegységeket kódoló gének (Gerbi, 1985), amelyek sokkal kevésbé változékonyak, mint a nem-kódoló szakaszok. Mivel ezek a gének kis variabilitást mutatnak az evolúció során az egymáshoz közeli taxonok között, ezért ezeket elsősorban az egymástól távol álló taxonok rokonsági viszonyainak megállapításhoz használják (Jorgensen és Cluster, 1988; Bruns *et al.*, 1991; Hillis és Dixon 1991; Illingworth *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1999). Az eukarióta szervezetek rDNS-génjeinek részletes tanulmányozásakor kiderült, hogy egyes kódoló szakaszok erősen konzervatívak, más szakaszok (nem-kódolók) pedig inkább variábilisak. Ez utóbbiak lehetnek átírtak, mint az Internal Transcribed Spacer 1 és 2, valamint olyan régiók, amelyek nem íródnak át (Intergenic Spacer 1 és 2). Jelenleg a gombák körében többféle primerpár áll rendelkezésre, a különböző régiók specifikus felszaporítására (White *et al.*, 1990). A vizsgálandó régiók megfelelő kiválasztásával eredményesen vizsgálhatók az egyes taxonok közötti rokonsági kapcsolatok, legyenek azok egymáshoz közel vagy távol állóak.

### ***Fehérjéket kódoló gének***

Olyan fehérjéket kódoló génekről van szó, amelyek minden élőlényben előfordulnak és meglehetősen konzervatívak maradtak az evolúció során, így alkalmasak a filogenetikai célú vizsgálatokhoz. Ezen gének közé tartoznak többek között a translation elongation factor 1 subunit alpha (EF-1 $\alpha$ ) fehérjét kódoló gén, a *tefl* (Hasegawa *et al.*, 1993; Baldauf és Palmer, 1993; Nordnes *et al.*, 1994; Shearer, 1995; Cox *et al.*, 1995; Wery *et al.*, 1996), az aktin fehérjéket kódoló gének (Baldauf és Palmer, 1993; Fletcher *et al.*, 1994), a  $\beta$ -*tubulin* fehérjék kódolásáért felelős gének (Baldauf és Palmer, 1993; Edlind *et al.*, 1996), valamint a glicerin-aldehid 3-foszfát fehérjét kódoló gének (Martin *et al.*, 1993).

#### ***1.4. A mitospórás gombák***

A mitospórás gombák (Deuteromycota) közé azok a gombafajok tartoznak, melyek csak aszexuálisan képesek szaporodni (mitotikus holomorfok), illetve azok, amelyeknek még nem fedezték fel szexuális (teleomorf) alakjukat. Mivel nem tükrözik a természetes rokonsági viszonyokat, ezért csak mesterséges csoportosításuk lehetséges. A legtöbb ide sorolt faj az aszkuszos gombák, néhány pedig a bazídiumos gombák anamorfja. A mitospórás gombák rendszerezésében további nehézséget jelent, hogy egyrészt egy izolátumnak többféle aszexuális spóratípusa is lehet, vagyis egy teleomorf alakhoz több anamorf is tartozhat, másrészt távoli rokonságban lévő gombák is igen hasonló konídiumos formát hozhatnak létre.

A Deuteromycota első, jól használható taxonómiai felosztása Saccardo (1889) nevéhez kapcsolható. Rendszerezésének alapját a konídiumok alakja, szeptálsága és színe, valamint a konídiumos termőtestek típusa képezte. Azonban ezek a tulajdonságok gyakran instabilak, mivel a konídiumok morfológiai sajátosságai a környezeti feltételektől függően erősen változhatnak. A rendszer ellentmondásai ezért problémákat okozhatnak egyes taxonok határozásában. A modernebb, Hughes (1953) nevéhez köthető rendszertani felosztás a konídiumok keletkezésének módját (pl. blasztikus, tallikus) tekinti elsődleges szempontnak a mitospórás gombáknál. A két fő típusnak számos altípusa ismert, melyet Sutton (1977, 1980) és Cole (1986) írtak le. Jelenleg a szakirodalomban Ainsworth (1966) javaslata alapján általánosan elfogadottá vált az ivaros spóraalakot nem képező gombák három osztályba sorolása:

Coelomycetes: azon gombák tartoznak ide, amelyek konídiumaikat áltermőtestben (konídiomata) képezik, s ezek jórészt megfelelnek a piknídiumoknak (Saccardo: Sphaeropsidales), acervuluszoknak (Saccardo: Melanconiales), továbbá olyan, sztromatikus alapú képleteknek (pl. sporodochium), amelyek a Saccardo-féle rendszerben a Moniliales rend egyes nemzetségeinél jellemzőek (pl. Tubercularia).

Hyphomycetes: konídiumaikat termőtest nélküli tartókon képező fajok (Saccardo: Moniliales) osztálya.

Agonomycetes: az anamorfként még ivartalan spóraalakkal sem rendelkező gombák (Saccardo: Myceliales, *Mycelia sterilia*) csoportja.

Érdekesség, hogy Webster (1986) a Deuteromycota gombák felosztását a fajok ökológiája alapján végezte el. Ennek megfelelően megkülönböztet vízben élő, ragadozó, rovarokhoz társuló, talajban élő, gombaparazita, állati és növényi kórokozó fajokat.



## ***1.5. A Phoma Saccardo (1880) nom. cons. genus története, rendszertani helyzete***

### **1.5.1. Történeti áttekintés**

A *Phoma* genus története mintegy 130 évre nyúlik vissza. A 19. században és a 20. század első felében Saccardo rendszerének alapján több ezer fajt írtak le azon nem-sztromatikus piknidiomos gombák körében, amelyek színtelen (hialin), válaszfal nélküli (egysejtű) konídiumokat képeznek. Ebben a koncepcióban jelentős hangsúlyt kapott a *Phoma*-szerű piknidiomos gombák osztályozásánál a gazdanövény-specifikusság, a szubsztrátumelvi szigorú alkalmazása, valamint a konídiumban a válaszfal megléte vagy hiánya. Általában a *Phoma* besorolást alkalmazták azokra a fajokra, amelyek színtelen, egysejtű konídiumokat képeznek és a növények szárain és vesszein növekedtek. A *Phyllosticta* genusba kerültek a morfológiailag hasonló, de a leveleken növekvő gombák. A kétsejtű, hialin konídiumú fajok, melyek a szárakon és vesszőkön nőttek a *Diplodina* genusba, míg a hasonló, leveleken növény fajok az *Ascochyta* genusba lettek besorolva. Természetesen sok *Phoma*-szerű gomba fordul elő a leveleken, vesszőkön és szárakon egyaránt. Sok esetben a piknidiomban egysejtű és kétsejtű konídiumok is megtalálhatók. 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 (Boerema, 1964; Sutton, 1980). Ez a kaotikus helyzet oda vezetett, hogy különböző *Phoma*-szerű gombáknak mind a négy genusban vannak szinonimjai (van der Aa és van Kesteren, 1971; Boerema és Dorenbosch, 1973). Az első modern tanulmányt a *Phoma*-szerű fajokkal Wollenweber és Hochapfel (1936), valamint Dennis (1946) végezték *in vitro* tulajdonságokat tanulmányozva. Ez a Saccardo-féle koncepció újragondolása és kiegészítése volt, pontosabb és részletes fajleírásokkal.

Az 1960-as évek eleje óta Boerema és munkatársai, később Morgan-Jones és munkatársai kibővítették a fenti koncepciókat egy szélesebb gazdanövény-spektrumú, sokkal nagyobb számú *Phoma* taxonra (Boerema és Höweler, 1967; Dorenbosch, 1970; Boerema és Dorenbosch, 1973; Boerema 1976; Boerema *et al.*, 1977; Boerema és van Kesteren, 1981; Morgan-Jones és White, 1983; Morgan-Jones és Burch, 1987a,b; 1988a,b; White és Morgan-Jones, 1987a,b; Morgan Jones, 1988). Ezek a szerzők az addig korlátozottan rendelkezésre álló, hagyományos morfológiai kritériumokon túl új

szempontokat vezettek be a rendszerezésbe, mint a mellékpórák formája (ide értve a szkleróciumot és klamidospórát is), a konídiumok szeptáltóságának az előfordulása, a telepek növekedési sebességének legalább három különböző szilárd táptalajon történő vizsgálata (zabliszt, malátakivonat, meggykivonat agar), kristályképzés *in vitro* körülmények között, másodlagos metabolitok termelése („E-metabolit”), valamint pigmenttermelés, és ezeknek a színváltozása NaOH hatására.

A *Phoma* típusú fajok részletes tanulmányozása során (Boerema, 1964; Boerema és Bollen, 1975) számos fajt és fajcsoportot írtak le, különös tekintettel patogenitásukra és ökológiai tulajdonságaikra (Boerema *et al.*, 1965a, 1968, 1971, 1973, 1977, 1981a; Boerema és Höweler, 1967; Boerema és van Kesteren, 1964, 1981; Dorenbosch, 1970, Boerema, 1970, 1972, 1976, 1984, 1985, 1986, 1993; Boerema és Dorenbosch, 1970, 1973; va der Aa és van Kesteren, 1971, 1979; Tóth és Kövics, 1978; Boerema és Loerakker, 1981, 1985; Morgan-Jones és White, 1983; Morgan-Jones és Burch, 1987a,b, 1988a,b; White és Morgan-Jones 1987a,b; Morgan-Jones, 1988; Gruyter és Noordeloos, 1992; Gruyter *et al.*, 1993; Kövics *et al.*, 1999).

1973-ban van der Aa először vizsgálta felül a *Phyllosticta* genust, a több ezer leírt faj közül azonban csak 7% illett bele a módosított genus koncepciójába. A *Phyllosticta*-k főként egysejtű konídiumait nyálkaburok veszi körül, illetve a konídiumoknak nyálka függeléke van, de ez csak friss tenyészetekben tanulmányozható, herbáriumi anyagok vizsgálatára nem alkalmas; így a korábban *Phyllosticta*-ként identifikált faj reklaszifikációja csak élő tenyészetek esetében lehetséges. Végül a fajok körülbelül 50%-át rendszertanilag a *Phoma*, 20%-át az *Asteromella* és 5%-át a *Phomopsis* genusba kellett átcsoportosítani. A fennmaradó 18% a más Coelomycetes (Sphaeropsidales, Melanconiales), a Hyphomycetes (Moniliales) vagy az Ascomycota taxonokba került átsorolásra. A *Phyllosticta* genus legújabb monográfiája 2002-ben (van deAa és Vanev, 2002) egy tucat taxonómiai újítást vezetett be a *Phyllosticta* genusban. Sok fajt áthelyeztek az *Aposphaeria*, *Ascochyta*, *Asteromella*, *Cleistophoma*, *Coleophoma*, *Fusicococcum*, *Microphaeropsis*, *Phoma* és *Phomopsis* genusokba.

Boerema és munkatársai (1965a, 1968, 1971, 1973, 1977, 1981a) mellőzték a gazdanövény vagy szubsztrátum specifikálását, mint a *Phoma* fajok elsődleges rendszertani kritériumát, és megpróbálták azokat mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között, stabil morfológiai bélyegek alapján rendszerezni. Standardizált körülmények között vizsgált telepjellemzőket adtak meg, fontosnak találták a piknídium falának szerkezetét, valamint azt, hogy a piknídium rendelkezik-e sertével (seta). A

genus fajainál a piknídium morfológiája bizonyult a legfontosabb hasznosítható bélyegnek az egyes szekcióba rendezésnél. A konídiumok háromrétegű válaszfallal fűződnek le, és főként egysejtűek, bár másodlagos szeptálság előfordulhat, különösen *in vivo* (0–95%) (ezek a „*pseudo-Ascochyta*”-k<sup>1</sup>). Normál laboratóriumi körülmények között (*in vitro*) azonban a konídiumok többsége egysejtű marad. A *Phoma* fajok fialid típusú konídiumképzést mutatnak (Boerema, 1965). Az első konídium a differenciálatlan anyasejt papillált kiemelkedésén belül keletkezik. Egy konídium lefűződése során a papilla alapi része, mint gallérocska (colarette) visszamarad az alapi sejten. Ezt a fajta konidiogenezis, amelyet Boerema (1965) úgy nevezett, hogy „monopoláris ismétlődő rügyezés” a konídiumkezdemény fala csaknem rögtön létrehozza a végső megvastagodást. Ugyancsak taxonómiai jelentőséget tulajdonítanak a diktioklamidospóra meglétének is. Tekintettel arra, hogy a piknídiumok és a konídiumok nagysága és alakja változó, a tenyésztési jellemzők nélkülözhetetlenek bizonyultak a fajok vagy fajon belüli taxonok elkülönítésében. Az elkülönítésre a piknídiumok és konídiumok alakja és mérete, valamint a telepjellemzők bizonyultak meghatározónak. Kisebb súllyal a gazdanövényt, szubsztrátumot és a patogenitási jellemzőket is felhasználják az indentifikáció során, bár a *Phoma* fajok gazdanövényen való meghatározása ritkán megbízható (Kövics, 1995). Néhány másodlagos anyagcseretermék szintén specifikus tulajdonság lehet egy fajra nézve. Jellegzetes mintázatú kristályképződés vagy kémiai reakcióval (NaOH-teszt) kimutatható pigmentképzés (ún. „E-metabolit”<sup>2</sup>) segítik a gyors azonosítást (van der Aa *et al.*, 1990; Noordeloos *et al.*, 1993).

Az eddig leírt *Phoma*-szerű „fajok” (Sutton, 1980) között nagyszámban vannak olyanok, amelyek morfológiailag azonosak a sok-tápnövényű (plurivorous) *Phoma* fajokkal, ami azt jelenti, hogy ebben a genusban leírt fajok száma sokkal kisebb, mint ahogy azt számos szakirodalmi közlés mutatja. Identifikációjuk csak ideiglenes lehet mindaddig, amíg jellemvonásaikat *in vitro* meg nem adják (van der Aa *et al.*, 1990), és csak összehasonlító morfológiai vizsgálatok oldhatják meg a *Phoma* fajok bonyolult nomenklátúra és szinonimitási problémáit.

Napjainkban egyre világosabbá válik, hogy esetenként még a legösszetettebb morfológiai vizsgálatok sem adnak mindig megbízható eredményt. A molekuláris

---

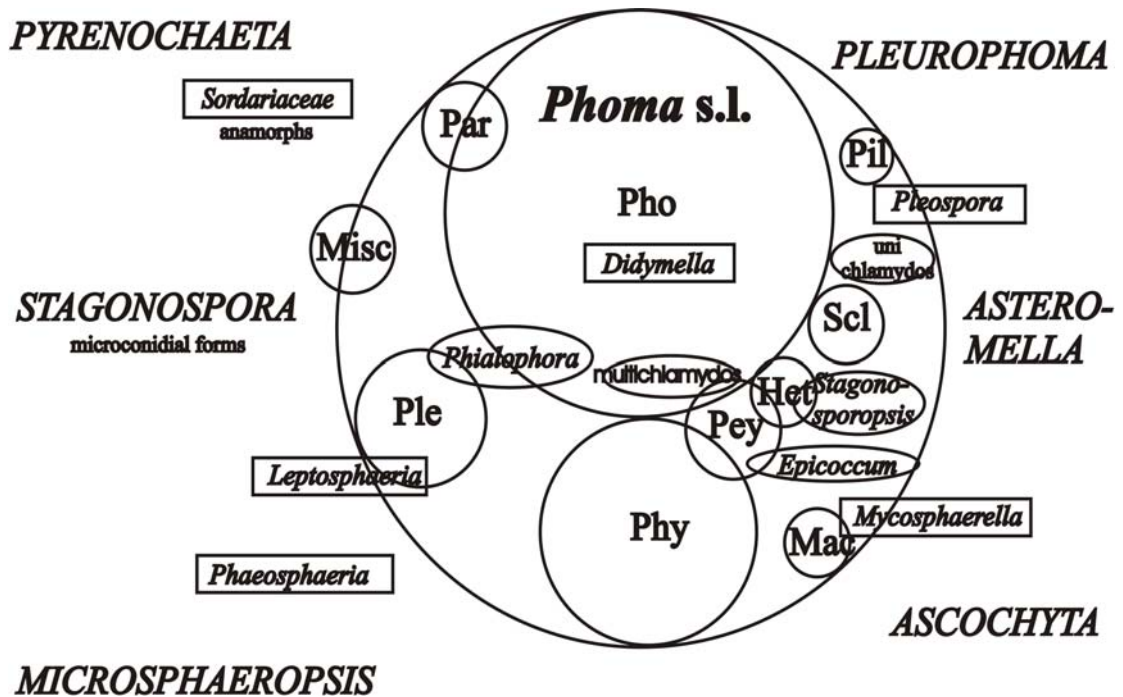
<sup>1</sup> A valódi *Ascochyta*-k konídiumainak szeptálsága a konidiogenezis esszenciális része, míg egyes *Phoma*-knál (ún. „*pseudo-Ascochyta*-k”) ez másodlagosan következhet be.

<sup>2</sup> Nevét a *P. exigua* var. *exigua* pozitív reakciójáról kapta.

biológia módszereivel már más *Phoma* genushoz közel álló gombataxonban is bebizonyosodott, hogy két külön „fajnak” vélt izolátum valójában egyazon faj, csak némi morfológiai változékonysággal; vagy ellenkezőleg: egy fajnak vélt izolátumok valójában két külön fajt takarnak (Fatehi *et al.*, 2003; Peever *et al.*, 2007). A mintegy 200 valódi *Phoma* taxon 2 nagy csoportba különíthető: sok-tápnövényű („plurivorous”) gombákra, melyek (a) többségében szaprofitonok vagy opportunisták (gyengültségi paraziták), főleg az eurázsiai régióban, de esetenként a világ más tájain is előfordulnak; és (b) a természetett növényekre patogének (van der Aa *et al.*, 1990). Az elmúlt évtizedben több olyan publikációsorozat is megjelent a Persoonia és Mycotaxon folyóiratban a holland kutatócsoport 40 éves munkájának összefoglalásaként (Gruyter és Noordeloos, 1992; Boerema, 1993, 1997; Boerema *et al.*, 1994, 1996, 1997, 1999; Gruyter, 2002; Gruyter és Boerema, 2002; Gruyter *et al.*, 1993, 1998, 2002; Boerema és Gruyter, 1998, 1999; van der Aa *et al.*, 2000), melyek egy *Phoma*-monográfia megjelenését készítették elő. Végül a *Phoma*-monográfia 2004-ben jelent meg (Boerema *et al.*, 2004) 223 faj leírásával és 1146 szinonim név helyreigazításával a Coelomycetes csoporton belül. A *Phoma* Saccardo genus lektotípus fajának a mindenütt megtalálható, szaprofiton *Phoma herbarum* Westend.-et választották a nyolcadik nemzetközi botanikai kongresszuson Párizsban, 1954-ben (cit. Boerema *et al.*, 2004).

### 1.5.2. A *Phoma* genus és szekciói

A *Phoma* nemzetségen belül számos szekciót különítenek el. Az egyes szekcióknál a piknídiumok morfológiáját veszik alapul. Jelenleg kilenc *Phoma* szekciót tartanak számon, melyek közül néhány mesterséges, míg mások természetes egységet alkotnak (Boerema, 1985; van der Aa *et al.*, 1990; Boerema *et al.*, 2004). A nagy heterogenitás ellenére minden szekció egy közös tulajdonság alapján rendeződik: *in vitro*, színtelen 1 sejtű konídiumokat képeznek a piknídiumokban. Az egyes szekciók sematikus rajza a 1. ábrán látható. A leggyakoribb szekciók sajátosságait van der Aa *et al.* írták le 1990-ben. A legjelentősebb szekciók, melyek a *Phoma* monográfia részét is képezik a következők: *Phoma sensu stricto* (68 taxa), *Peyronellaea* (16 taxa), *Plenodomus* (32 taxa), *Heterospora* (17 taxa), *Macrospora* (9 taxa), *Phyllostictoides* (12 taxa) és *Sclerophomella* (13 taxa) (Gruyter és Noordeloos, 1992; Boerema, 1993, 1997; Gruyter, 2002; Gruyter és Boerema, 2002; Gruyter *et al.*, 1993, 1998, 2002; Boerema *et al.*, 1994, 1996, 1997, 1999; Boerema és Gruyter, 1998, 1999; van der Aa *et al.*, 2000).



**1. ábra** A *Phoma* genus morfológiai alapon elkülönített szekcióinak vázlatos rajza. Rövidítések: Pho = *Phoma*, Par = *Paraphoma*, Pey = *Peyronellaea*, Phy = *Phyllostictoides*, Scl = *Sclerophomella*, Ple = *Plenodomus*, Mac = *Macrospora*, Pil = *Pilosa*, Het = *Heterospora*, Misc = *Miscellaneous* (vegyes csoport). Az egyes körök átmérője az egyes szekciókba tartozó relatív fajszámot, az elrendezésük, egymást érintésük és átfedésük pedig a szekciók hasonlóságát jelképezik. (14 taxon, Boerema *et al.*, 2004). A téglalapok a teleomorf kapcsolatokat jelzik, körülöttük a *Phoma*-közeli genusok találhatóak.

### ***Phoma* Sacc. sect. *Phoma***

A szekciót automatikusan hozták létre (autonym) a *Phoma* sect. *Plenodomus* elkülönítésével (Boerema *et al.*, 1981a). Részletes monográfiai leírást publikáltak a szekció fajairól Gruyter és Noordeloos (1992), valamint Gruyter *et al.* (1993) a *Persoonia*-ban. Típusfaj: *Phoma herbarum* Westend. A piknídiumok magányosak vagy csoportosan képződnek, vékonyfalúak, simák. A konídiumok mindig egysejtűek, mind *in vivo*, mind *in vitro*. A klamidospórák, ha vannak, egysejtűek. Teleomorf alakjuk többségében nem ismert, amennyiben van, úgy a *Didymella*-hoz tartozik.

### ***Phoma* Sacc. sect. *Phyllostictoides* (Zherbele) Boerema**

A szekció leírását Boerema közölte a *Mycotaxon*-ban (1997). Típusfaj: *Phoma exigua* Desm. var. *exigua*. A piknídiumok magányosak vagy csoportosan képződnek, vékonyfalúak, simák. A konídiumok *in vitro* főleg egysejtűek, de mindig előfordul 2–3 sejtű konídium is (*in vivo* 5–95%-ban lehetnek szeptáltak). Klamidospórák, ha vannak, egysejtűek. Teleomorf, ha ismert, a *Didymella*-hoz tartozik.

***Phoma* Sacc. sect. *Peyronellaea* (Goid.ex Togliani) Boerema**

A szekcióról készült összeállítást van der Aa *et al.* publikálták a *Studies in Mycology*-ban (1990). Típusfaj: *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweber & Hochapfel (syn.: *Peyronellaea glomerata*). A piknídiumok magányosak vagy csoportosan keletkeznek, vékonyfalúak, simák. A konídiumok válszfal nélküliek, azonban néha kevés kétsejtű előfordul. A klamidospórák zömükben többsejtűek, azonban néha egysejtű klamidospórák is képződnek. Teleomorfi alakjuk nem ismert.

***Phoma* Sacc. sect. *Plenodomus* (Preuss) Boerema *et al.***

A szekcióról a *Persoonia* folyóiratban megjelent összeállítást Boerema *et al.* (1994) publikálták. Típusfaj: *Phoma lingam* (Tode: Fr.) Desm. (syn.: *Plenodomus lingam*). A piknídiumok vastag, szkleroplektenhimatikus falúak, de előfordulhat *in vivo* és/vagy *in vitro* sima, néha vékonyfalú piknídium is. A konídiumok válszfal nélküliek, néha kevés kétsejtű is előfordul. Klamidospórák nincsenek. Teleomorfiuk a *Leptosphaeria*-hoz tartozik.

***Phoma* Sacc. sect. *Paraphoma* (Morgan-Jones & White) Boerema**

A szekciót van der Aa *et al.* írták le a *Studies in Mycology*-ban (1990). Típusfaj: *Phoma radicina* (McAlpine) Boerema (syn.: *Paraphoma radicina*). A piknídiumok vékonyfalúak, micélium-függelékkel vagy sertékkal rendelkeznek. A konídiumok egysejtűek, mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között. Klamidospórák, amennyiben előfordulnak, egysejtűek. Teleomorfi alakjuk nem ismert.

***Phoma* Sacc. sect. *Sclerophomella* Boerema**

A szekcióról a *Mycotaxon*-ban folyóiratban megjelent közlemény Boerema (1997) munkája. Típusfaj: *Phoma complanata* (Tode: Fr.) Desm. A piknídiumok vastagfalúak, későn nyílnak fel (osztóólum helyett pórusal). *In vivo* a piknídiumok hasonlítanak a *Plenodomus* szekcióban található *Phoma*-fajok piknídiumához. A konídiumok *in vitro* mindig egysejtűek. Klamidospórák, ha előfordulnak, egysejtűek és interkaláris láncokba rendeződnek. Teleomorfiuk a *Didymella*-hoz tartozik.

### ***Phoma* Sacc. sect. *Heterospora* Boerema et al.**

A szekcióról a *Persoonia*-ban megjelent monográfia Boerema, Gruyter és Noordeloos munkája (1997). Típusfaj: *Phoma heteromorphospora* Aa & Kesteren. A piknidiumok egyszerűek vagy összetettek, vékonyfalúak és simák, hasonlóan a *Phoma* sect. *Phoma* szekcióhoz, esetenként micélium-függelékkel rendelkezhet. *In vivo* kicsi (mikro-) és nagyméretű (makro-) konídiumok egyaránt előfordulnak, ellenben *in vitro* a kisebb méretű konídiumok vannak többségben és csak néhány nagyméretű konídium található. A szekciót leggyakrabban az *in vitro* többségben termelődő mikrokonídiumok jelenlétével azonosítják.

#### **1.5.3. Új perspektívák a genus taxonómiájában**

Néhány anyagcseretermék, mint pl. az „E-metabolit” termelés rendszertani bélyeg lehet egyes *Phoma* fajokban (van der Aa *et al.*, 1990; Noordeloos *et al.*, 1993). Ugyancsak fontos és megbízható szerepe lehet egyes fajok gyors azonosításában a különböző kristályok, pigmentek képzésének *in vitro*, és azok bizonyos kémiai anyagokkal adott reakciója, mint pl. a NaOH-teszt (Dorenbosch, 1970; van der Aa *et al.*, 1990; Noordeloos *et al.*, 1993). A malátakivonat agar (MA) táptalajban több hét elteltével képződő kristályok kémiai szerkezete ugyancsak rendszertani bélyeg lehet egy-egy fajra nézve. Például a *Phoma pinodella* kirstályát két kémiai vegyület építi fel: a pinodellalide A és pinodellalide B (Noordeloos *et al.*, 1993). Monte *et al.* (1990, 1991) számos olyan biokémiai módszert dolgoztak ki a *Phoma* genusra, melyek korábban már hasznosnak bizonyultak más csoportok, mint pl. baktériumok, élesztőgombák rendszertani viszonyainak tanulmányozásánál. Az új módszereket a hagyományos morfológiai vizsgálatok kiegészítőjeként használták az egyes fajok rendszerezésére.

A '90-es évek közepén a molekuláris biológia és a biokémia fejlődésének köszönhetően izoenzimeket (fehérjepolimorfizmus), például az észteráz izoenzimet próbáltak meg molekuláris markerként használni a *Phoma* genusban, hogy elkülönítsék a morfológiailag hasonló megjelenésű, de feltételezhetően eltérő fajhoz tartozó izolátumokat (Monte *et al.*, 1990, 1991; Kövics és Gruyter, 1995; Saniewska és Prus-Glowacki, 1998; Kövics, 2004). A más gombacsoportokhoz már használt, és többé-kevésbé megbízható molekuláris markerek szekvenenciaanalízise a *Phoma* fajok körében napjainkig alig került alkalmazásra (Mendes-Pereira *et al.*; Balmas *et al.*, 2005; Voigt *et al.*, 2005; Irinyi *et al.* 2009).

#### 1.5.4. A *Phoma* genus és a molekuláris filogenetika

A tradicionális és a molekuláris mikológiában több út is lehetséges az egyes gombafajok identifikálására, kezdve a morfológiai bélyegekkel, az élettani és biokémiai funkciókon át egészen a legmodernebbnek tekintett módszerig: a nukleinsav-szekvenciák összehasonlító elemzéséig. A legújabb, *filogenetikai fajkoncepció* bizonyos nukleinsav-szekvenciák változatosságát (DNS-polimorfizmus) alapul véve próbálja meghatározni a különbségeket vagy azonosságokat az izolátumok között. Harrington és Rizzo (1999) szerint filogenetikai szempontból azonos fajnak tekintendő a populáció azon legkisebb egysége, amely bizonyíthatóan egy közös őstől származik, és valamilyen egyedi, jól diagnosztizálható fenotípusos jelleggel bír.

A gombafajok többségében, így a *Phoma* fajok rendszerezésében is egészen napjainkig a régebbi, tradicionálisnak tekintett morfológiai alapú, esetenként a *biológiai fajkoncepciót* követték. A morfológiai alapú fajmeghatározásnak 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* kategóriája meglehetősen korlátozottan alkalmazható erre a genusra. A *morfológia faj* alapú megközelítés viszont, a fentebb említett okok miatt, nem ad mindig megbízható eredményt.

A molekuláris biológia rohamos fejlődésének köszönhetően elérhetővé vált a taxonómusok számára a filogenetikai összefüggések feltárása. Taylor *et al.* (2000) szerint a filogenetikai módszerek hamarosan széles körben elterjednek és népszerűvé válnak a taxonómiával foglalkozó mikológusok körében, mivel egyaránt alkalmazhatók ivaros és ivartalanul szaporodó fajokra is. Egyre inkább teret nyertek a DNS-polimorfizmusra irányuló vizsgálatok a filogenetikai céllal történő elemzésekben.

Az ITS-szekvenciákat használták fel a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára (Mendes-Pereira *et al.*, 2003), illetve a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas *et al.*, 2005). Voigt *et al.* (2005) az ITS-szekvenciák mellett egyéb gének, köztük a  $\beta$ -*tubulin* gént alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* fajkomplexének) vizsgálatára, valamint Fatehi *et al.* (2003) az „*Ascochyta pinodes* komplex” taxonómiai vizsgálatokor. Landvik *et al.* (2001) a  $\beta$ -*tubulin* fehérjét alkotó aminosavak szekvenciájának egy részét próbálta használni magasabb rendű taxonok elkülönítésére az Ascomycota csoporton



belül. Arra a következtetésre jutottak, hogy a  $\beta$ -*tubulin* gén kevésbé alkalmas magasabb szintű rendszertani kapcsolatok elemzésére, mint más gének. Nukleotid szinten azonban a  $\beta$ -*tubulin* gén informatívnak bizonyult az Ascomycota csoportnál alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok elkülönítésénél (Jong *et al.*, 2001; O'Donnell *et al.*, 1998; Schoch *et al.*, 2001). A *tefl* és  $\beta$ -*tubulin* szekvenciákat *Phoma* fajok filogenetikai vizsgálatának céljából ez idáig még nem alkalmazták.

### ***1.6. A pillangósvirágú nyövényeken károsító, egyes Phoma-szerű fajok taxonómiai kérdései***

Különböző hialin spórájú, piknídiumos gombák okozhatnak hasonló tünetű levél- és hüvelyfoltosságot szóján (*Glycine max*). Különböző herbárium anyagok és patogenitási tesztek azt mutatták, hogy létezik egy *Phoma* faj, amely a szójára specifikusan patogén. Ezt a fajt korábban Abramov (1931) *Ascochyta sojicola*-ként (mint *A. „sajaecola”*) írta le, és a leírás alapján a faj nagyban hasonlít a szóján ugyancsak előforduló másik két *Phoma* fajhoz: a *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* (Wallace és Wallace, 1947, 1949) és a *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & Burch (Noll, 1939) gombákhoz. Egy harmadik gombafaj, a *Phyllosticta sojicola* Massalongo (1900) ugyancsak a fenti gombákhoz hasonló tüneteket idéző szóján (Böning, 1939; Walters és Martin, 1981). A helyzet azonban még tovább komplikálódik azzal, hogy egyéb *Ascochyta* és *Phoma* fajokat egyaránt azonosították szóján. Mivel ezeket a gombákat egymástól nagyrészt csak *in vitro* lehet elkülöníteni (van der Aa *et al.*, 1990), ezért a szakirodalomban róluk található adatok is nagyon ellentmondásosak.

#### ***Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch**

A gombát először L.K. Jones írta le 1927-ben *Ascochyta pinodella* néven. A faj taxonómiai korrekciójára Morgan-Jones és Burch (1987a) vállalkoztak. Szinonimjai között található a ma is gyakran előforduló *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L.K. Jones) Boerema (Boerema *et al.*, 1965b) név. A feltehetően kozmopolita faj a *Pisum sativum*, *Trifolium pratense* és más pillangósvirágúakon károsít, a vöröshere szárfeketedésének, valamint a borsó szártőrothadásának és levélfoltosságának az előidézője. Gyakran izolálható más családokba tartozó növényekről is (Noordeloos *et al.*, 1993). Noll (1939) Németországban a Fabaceae fajok szártőrothadását és hervadását 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.

*Maláta agaron (malt-extract agar, MA)* a 7. napon mért növekedési ráta: 52–55 mm, a telep alakja szabályos, színe közepén olíva vagy olíva-szürke, a szegélynél halványabb. A sugárirányú fonalasság kifejezett. A légmicélium vékony, bársonyos, színe szürkés. A tenyészet fonáki színe olíva-szürke vagy fekete.

*Zabliszt agaron (oatmeal agar, OA)* a növekedési ráta: 50–65 mm, a telep alakja szabályos, egyenletes körvonallal rendelkezik. A telep színe zöldes-olíva, sárgás-olíva vagy olíva, a szegélynél enyhén halványabb. A telep határozottan sugaras, kevés légmicéliummal rendelkezik. A telep fonáki színe rendszerint sötétebb olíva-szürke.

Klamidospórák bőségesen képződnek, interkalárisan vagy terminálisan, magányosan vagy láncokban rendezve. Gömbölydedek vagy hengeresek, méretük: 8–20 x 8–15 µm.

Piknídiumok is bőségesen képződnek, általában koncentrikus gyűrűkben, de elszórtan a légmicéliumban és az agarban is elhelyezkedhetnek. Színük fekete, felszínük csupasz, magányosak vagy csoportosan fordulnak elő. Alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan. Rendelkezik osztiólummal, méretük 100–310 µm. A piknídiumok fala 4–6 rétegű pszeudoparenchimatikus, szögletes sejtekből áll.

A bőségen keletkező konídiumok egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, hialinok vagy fehéres színűek, kerekded-ellipszoid alakúak; méretük nagyon változó: átlagosan 5–6 x 2,5–3 µm. A fajt gyakran összekeverik a *Didymella pinodes* (anam. *Ascochyta pinodes*) gombával, amely mind *in vivo*, mind *in vitro* zömében válaszfalú konídiumokat képez.

### ***Phoma sojicola* (Abramov) Kövics et al.**

A szóján (*Glycine max*) előforduló, általában vetőmaggal terjedő, levél- és hüvelyfoltosságot, valamint szártőrothadást és hervadás betegséget okozó *Ascochyta sojicola*-t először I.N. Abramov (1931) írta le (mint *A. „sojaecola”*) szójáról a Távolkeleten a gomba pontos latin leírásával és diagnózisával, így az a későbbi nevezéktani szabályok szerint is legitimnek volt tekinthető (basonym), csupán az érvényes névképzési szabályoknak megfelelő, a species szóösszetétel képzésénél történt nyelvhelyességi korrekció („ae” helyett „i”) akceptálandó változás. Abramovval egyidőben Loukyanovits *et al.* (1931) is beszámoltak egy *Ascochyta* fajról Nyugat-Szibériából, amely feltehetően azonos lehetett az *Ascochyta sojicola*-val. Az *Ascochyta sojicola* Abramov súlyos kártételét Európában először Frandsen (1953) figyelte meg

Nyugat-Németországban, és izolátumát elhelyezte a CBS Collection Baarn, Hollandia gyűjteményében (CBS 113.53). Az „*A. sojaecola*” előfordulását jelezték Japánból (Ishiyama, 1936; Kurata, 1960; Endo, 1963), Belga-Kongóból (Hendricks, 1939), a korábbi Csehszlovákiából (Nováková-Pfeiferová, 1958, 1959; Ondrej, 1968), Jugoszláviából (Numic, 1962) és NDK-ból (Klinkowski *et al.*, 1966), Magyarországról (Tóthné Zahorecz, 1970; Szili, 1975, Tóth, 1976; Tóth és Kövics, 1978; Kövics, 1978a, b), Romániából (Rádulescu és Paulian, 1973; Bontea, 1985) valamint Lengyelországból (Pietkiewitz, 1959; Opiola, 1981; Marcinkowska *et al.*, 1982; Marcinkowska, 1984, 1985). A betegséget és a kórokozó morfológiai tulajdonságait vizsgálva az *Ascochyta sojicola* Abramov-ot új *Phoma* fajként először Kövics *et al.* (1999) írták le *Phoma sojicola*-ként a Mycological Research-ben. Patogenitási tesztekben a szóján előforduló különböző *Phoma*-szerű (*P. exigua* var. *exigua*, *P. pinodella*, *Phyllosticta sojicola*) fajok által okozott tünetek nagyban hasonlók a *Phoma sojicola* szóján előidézett tüneteihez (Kövics *et al.*, 1999). Utóbbit a morfológiai jegyei alapján a *Phoma* section *Phyllostictoides* csoportba lehet elhelyezni a *Phoma* genuson belül. A faj morfológiai tulajdonságai alapján erősen hasonlít a *Phoma pinodella*-hoz, bár a *P. sojicola* általában több piknidiumot képez, illetve egyes izolátumainál kristályképződés is megfigyelhető (Noordeloos *et al.*, 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 az NaOH-teszt negatív. A Kövics *et al.* (1995) által, az  $\alpha$ -észteráz izoenzimmel végzett vizsgálatok szintén alátámasztották a *Phoma sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* morfológiai alapon meglévő elkülönülését.

*Maláta agaron (MA)* a növekedési ráta: 55–62 mm a telep alakja szabályos, színe szürkés olíva, zöldes olíva. A légmicélium színe halvány-olíva-szürke; a telep fonáki nézete ólomszürke, acélszürke, zöldes-olíva szegéllyel.

*Zabliszt agaron (OA)* a növekedési ráta: 50–65 mm a telep alakja szabályos, színe fehéres vagy halvány-olíva-szürke, gyakran sötétszürke olíva szegéllyel. A légmicélium gyengén fejlett, színe bársonyos szürke. A tenyészet fonáki nézete hasonló megjelenésű.

A klamidospórák magányosak vagy láncokban, interkalárisan vagy terminálisan keletkeznek, vékony falúak, zöldes vagy szürke-olíva színűek. Alakjuk gömbölyű vagy hengeres, méretük 8–16 x 7–8  $\mu\text{m}$ .

A piknídiumok elsősorban a telep széle mentén és/vagy a szektorokban, az agar felszínén vagy az agarba süppedve képződnek. Színük sötétbarna vagy fekete, vékonyfalúak magányosak vagy csoportosan fordulnak elő. Alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan. Egy vagy több osztólum található, méretük 80–250 µm.

A konídiumok *in vitro* tenyésztésben: alakjuk ovális-ellipszoid, elsősorban egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, hialinok, vékony sejtfallal rendelkeznek, méretük nagyon változó: 5,6–7,4 x 2,5–3,5 µm.

***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-ban először 1929-ben Sprague találta meg. Később Crossan (1953, 1958) kimutatta, hogy azok az izolátumok, melyek a babról származtak, morfológiailag, fiziológiailag és patológiailag is hasonlóak azokhoz, melyeket egyéb növényekről, pl. szójáról (*Glycine max*), gyapotról (*Gossypium hirsutum*), mályvarózsáról (*Malva* sp.), dohányról (*Nicotiana tabacum*), paradicsomról (*Lycopersicum esculentum*) és padlizsánról (*Solanum melongena*) izoláltak. Alcorn (1968) Ausztráliából beszámolt arról, hogy az *Ascochyta phaseolorum* széles gazdanövénykörben: 14 család 48 növényfaján károsít; továbbá 12 faj mesterséges inokuláció során bizonyult fogékonyak. A *Phoma exigua* var. *exigua* olyan gyűjtőtaxon, amely háromszázat jóval meghaladó növénykórokozó fajt foglal magába, amelyeket korábban önálló fajokként írtak le (Boerema és Höweler, 1967, Boerema 1972, Boerema és Dorenbosch, 1973, Boerema *et al.*, 1981b, 1993).

*Maláta agaron (MA)* a növekedési ráta: 25–60 mm, nagyon változó, a telep szabálytalan alakú, jellegzetesen csipkézett vagy lebenyes, változó színű: a fehérestől olíva-szürkéig, olíva-barnáig, barnássárga szegéllyel. A légmicélium gyapjas, fehéres vagy olíva-szürke színű. A tenyészet fonáki színe olíva-szürke, olíva-fekete.

*Zabliszt agaron (OA)* a növekedési ráta: 55–75 mm, nagyon változó. A telep szabálytalan alakú, lapos és tömött; olíva-szürke, olíva-barna, a szegélynél fehér színű vagy hialin. A telepek közepén bőségesen képződik légmicélium, ami fehér vagy olíva-szürke színű, finoman pelyhes. A telep fonáki nézete hasonló.

A piknídiumok ritkák, szórtan helyezkednek el, részben az agarba süppednek, színük olíva vagy olíva-fekete, alakjuk általában gömbölyű, felszínük csupasz, magányosak

vagy csoportosan képződnek. Rendelkeznek osztiólummal, méretük és alakjuk változatos.

A konídiumok színe hialin, alakjuk ovális vagy ellipszoid, méretük nagyon változó, általában 5–6,5 x 2,5–3 µm. 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.

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

A fillosztiktás levélfoltosság első leírója („*Phyllosticta sojaecola*”) Massalongo (1900) volt. A *Phyllosticta glycinea* Tehon-Daniels (mint a „*P. glycineum*”) (1927) gomba a *P. sojicola* szinonimjának tekinthető (Farr *et al.*, 1989; Sinclair és Backman, 1989). Hara (1930) a *Phyllosticta sojicola* (*P. „sojaecola*”) Massal. teleomorfjának tekinti a *Pleosphaerulina sojicola* („*sojaecola*”) (Massal.) Miura (1921)-t. Kurata (1960) vizsgálatai szerint azonban nem egészen egyértelmű, hogy ez a gomba a *Pleosphaerulina sojicola*-nak az anamorfja. A *Pleosphaerulina sojicola*-nak sem az auktora, sem a helyes névhasználata bizonytalan, ugyanis Hara (1930) a „*Pleosphaerulina sojaecola*” (Massal.) „Miura” formát, Kurata (1960) pedig a „*Pleosphaerulina sojaecola* „Miura”-t használja. Minthogy az eredeti leírás és tenyészet számunkra nem volt hozzáférhető, ezért a szerzői prioritás kérdése nem válaszolható meg. A szakirodalom az auktornév használatában tekintetében is megosztott: az előbbi formát használják pl. Sinclair és Shurtleff (1975); Sinclair és Backman (1989), az utóbbit Farr *et al.* (1989). Van der Aa és Vanev (2002) szerinti *Phyllosticta* genus-konceptióban a *Phyllosticta* anamorf genus tagjai (amennyiben van teleomorfjuk) a *Guignardia* Viala & Ravaz (1982), tömlősgomba-genusba tartoznak, és amennyiben az életeiklusuk spermáciumos (mikrokonídiumos) formát is magában foglal, úgy azok a *Leptodothiorella* Höhnelt fide 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 és feltételezett teleomorfjának revíziójára eddig még nem került sor). A gomba teleomorf

alakjának névhasználata tekintetében még a *Pleosphaerulina* tekinthető ismertebbnek. Kövics *et al.* (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 elforduló *Phoma exigua* var. *exigua*-val.

*Maláta agaron (MA)* a növekedési ráta: 58–62 mm, a telep alakja általában szabálytalan, színe barnássárga vagy okkersárga, hialin vagy fehér szegéllyel, a telep fonáki nézete hasonló megjelenésű; a légmicélium színe hialin vagy fehér.

*Zabliszt agaron (OA)* a növekedési ráta: 63–67 mm, a telep alakja szabályos, széle alig látható, színe hialin vagy halvány okkersárga, a telep fonáki nézete hasonló megjelenésű. Légmicéliummal nem rendelkezik.

A piknidiumok bőségesen keletkeznek az agarban, elszórtan. Alakjuk gömbölyű és színük általában sötétbarna vagy fekete. Vékonyfalúak, néha papilláltak, osztiólummal rendelkeznek; méretük átlagosan: 110–140 µm.

A konídiumok hialinok, mindkét végükön lekerekítettek, közepén befűződők, gyakran szemcsék figyelhetők meg bennük, méretük átlagosan: 5,5 x 2,5 µm.

Klamidospórák nem képződnek. Az NaoH-próba negatív, kristályképződés nem figyelhető meg.

### **1.7. Az *Ascochyta* nemzetség**

Az *Ascochyta* genusba tartozó fajokat nagyon gyakran összetévesztik a *Phoma* genusba tartozókkal, mivel a morfológiai különbség a két csoport fajai között sok esetben minimális. A modern taxonómiai felfogás a *Phoma* esetében a gazdanövény vagy szubsztrátum szerepét, mint a fajok elkülönítésének elsődleges kritériumát elhagyta, s az egyes taxonokat *in vivo* és *in vitro* stabil morfológiai jegyek alapján osztályozza, gyakran standardizált *in vitro* körülmények mellett. Az *Ascochyta* és *Phoma* fajok közötti legfőbb különbség a konídiogenezisben, a konídiumok méretében és azok szeptáltóságában mutatkozik meg (Brewer és Boerema, 1965; Sutton és Sandhu, 1969; Boerema és Bollen, 1975). Azonban ezek a bélyegek gyakran nem megbízhatók, és ezért megkérdőjelezhetők (Punithalingam, 1979; Sutton, 1980; Buchanan, 1987). Az *Ascochyta* fajoknál a gazdanövényen való elhelyezkedés, a konídium mérete, a válaszfalak száma nem lényegiek. A *Phoma* és *Ascochyta* közötti konídiogenezisben

fellelhető apró különbségeket, valamint a konídium-válaszfal képződését rendkívül nehéz fénymikroszkópban megfigyelni. Egyes kutatók szerint (Punithalingam, 1979; Sutton, 1980; Buchanan, 1987) az *Ascochyta* és *Phoma* fajok konídiogén sejtjeit egyaránt fiatalnak kell tekinteni, míg mások szerint (Boerema és Bollen, 1975; Wang, 1990; Noordeloos *et al.*, 1993) az *Ascochyta* fajok konídiogén sejtjei annellidek. A *Phoma* fajoknál a konídium-válaszfalának – ha van ilyen – képzése másodlagos folyamat, amíg az *Ascochyta* fajokban a konídiumok szeptálsága esszenciális része a konídiumképződés folyamatának. Félrevezető lehet azonban, hogy az egyes *Phoma* fajok piknídiumai, amelyek *in vivo* keletkeznek, különböző százalékban tartalmazhatnak válaszfalú konídiumokat (emiattn ún. „pseudo-*Ascochyta*”-k), amíg agaros tenyészetben, normál laboratóriumi körülmények között (*in vitro*) főként egysejtű konídiumokat képeznek. A valódi *Ascochyta* fajok *in vivo* és *in vitro* egyaránt főként két- vagy többsejtű konídiumokat képeznek. A *Phoma* genuson belül elsősorban a *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* olyan gyűjtőtaxon, mely feltehetően több tucat *Ascochyta* fajt is magában foglal.

### **1.8. Filogenetikai kapcsolatok vizsgálata**

Először is vizsgáljuk meg, mi is az a filogénia, azaz leszármazástan! A filogénia azon eseménysorozatok összessége, amely magában foglalja egy adott faj vagy taxonómiai csoport evolúciós fejlődését. A filogenetika pedig a filogénia egyfajta tanulmányozása. A filogenetikai elemzések megbecsülik a taxon evolúciós rokonsági kapcsolatát bizonyos szervezetek egyes génjei közötti nukleotid- vagy a fehérjeszekvenciájuk alapján. Az elmélet alapvető feltételezése, hogy két szekvencia annál jobban elkülönül valamely közös őstől és egymástól, minél több változás, különbség található közöttük, vagyis feltételezi, hogy az evolúció mozgató rugója a mutáció. Az elmélet alapja az úgynevezett homológ helyek (nukleotidok vagy aminosavak) egymással történő összehasonlítása (pozicionális homológia), majd azok elemzése különböző filogenetikai módszerekkel. Ezért a vizsgálni kívánt homológ szekvenciákat úgy rendezik össze, párosítják egymással (*alignment*), hogy a homológ helyek oszlopokat formáljanak, vagyis megtalálják a köztük lévő nukleotid/aminosav különbségeket. Minél távolabbi az evolúciós rokonság a vizsgált szekvenciák között, annál nehezebb megtalálni a megfelelő összerendezést. A helyes összerendezés után különböző filogenetikai

módszerek (algoritmusok) állnak rendelkezésre a filogenetikai törzsfák elkészítésére. A filogenetikai törzsfák a gének és a törzsek közötti evolúciós kapcsolatok egyfajta ábrázolása, mely megmutatja, mely gének és taxonok állnak közel egymáshoz.

A gombák körében a filogenetika szó alatt különböző taxonok evolúciós fejlődését, valamint rokonsági kapcsolatainak a tanulmányozását értjük nukleotid-és aminosav-szekvenciájuk alapján. A gombáknál a filogenetika különös jelentőséggel bír, mivel ezeknél az evolúció során a különböző földtörténeti korszakokban nem, vagy csak nagyon kevés fosszilis maradvány maradt fent, amelyek segítenék az evolúcióbiológusok és taxonómusok munkáját az evolúciós kapcsolatok feltárása során, amíg az állatoknál és növényeknél ez lehetséges a rendelkezésre álló fosszilis maradványok tanulmányozásán keresztül.

A molekuláris biológia fejlődésével azonban lehetőség nyílt arra, hogy a mikroorganizmusok nukleinsav- illetve fehérjeszekvenciái alapján következtessünk az egyes taxonok közötti evolúciós kapcsolatokra, és feltárjuk az azok közötti rokonsági viszonyokat. Napjainkra a szekvenenciaelemzések kutatása az evolúciós törzsfák készítésének standard pontjává vált. A módszer lényege, hogy a gondosan kiválasztott nukleinsav- és fehérjeszekvenciák (filogenetikai markerek) evolúciós kronométerként szolgálnak, amelynél az evolúciós változások mérhetők. A módszer alapvető feltételezése, hogy a szekvenciákban bekövetkező változásokat mutációk okozzák, vagyis az evolúció mozgató rugója a mutáció. Ennek értelmében, ha két fajt összehasonlítunk szekvenciájuk alapján, egymáshoz viszonyított evolúciós távolságuk (a két szekvencia közötti különbség) arányos lesz a szekvenciákban végbement mutációk számával, mivel a két faj egy közös őstől származik. A szekvenciákat összehasonlító filogenetikai elemzések eredményeként egy filogenetikai törzsfát kapunk, amely adatokat szolgáltat a vizsgált szekvenciák egymáshoz viszonyított evolúciós kapcsolatairól.

### ***Filogenetikai módszerek***

Egy filogenetikai törzsfák szerkesztése nukleinsav-vagy fehérjeszekvenciák alapján nem teljesen egyértelmű, és nagyon ritkán van lehetőség annak ellenőrzésére, hogy a kapott eredmény megfelel-e a valóságnak. Összességében kijelenthető, hogy nincs hibátlan filogenetikai módszer törzsfák készítésére, habár sok módszer van használatban. A filogenetikai törzsfák elkészítésére fehérje- vagy nukleinsav-szekvenciák alapján



többféle módszer áll rendelkezésre, melyeket különböző számítógépes programok segítségével végezhetünk. Az elemzés eredményeként egy olyan filogenetikai törzsfát kapunk, amelynek az elágazásai a leginkább megközelítik a valóságot a feldolgozott adatok alapján. Minden egyes törzsfakészítő módszer a különböző szekvenciák (nukleinsav, fehérje) összerendezésével (*alignment*) kezdődik, amely annyit jelent, hogy a szekvenciák között meg kell találni a lehetséges legnagyobb hasonlóságot (homológiát). Gyakran szükség van inzerciókat (beillesztés) és deléciókat (törlés), illetve kihagyásokat (*gap*) alkalmazni, azonban mindig arra kell törekedni, hogy minimalizáljuk ezen változtatások számát. Ha az összerendezés megtörtént, következhet a törzsfa készítése. A filogenetikai törzsfának két alapeleme van: *csomópontok* (nodes) és *elágazások* (branches). Az elágazás az a vonal, ami összeköt két csomópontot. A csomópont lehet külső, ha az a törzsfa csúcán helyezkedik el és nem ágazik tovább, vagy lehet belső, amikor is két másik csomópontnak az őst képviseli.

Az evolúciós törzsfák létrehozásának módja két nagyobb csoportra osztható: az első a *karakteralapú*, amikor is olyan különálló tulajdonsághalmazok mátrixát vizsgálják, amelyek egy vagy több sajátosságot, illetve jelleget tulajdonítanak minden egyes taxonnak. Ezek közé tartoznak a különböző szekvenciák, vagy géncsaládok tagjai, de lehetséges morfológiai vagy fiziológiai tulajdonságokat is vizsgálni. A módszer az ugyanazon pozícióban található nukleotidbázisokat vagy aminosavakat veszi figyelembe, egymástól függetlenül az összehasonlítás során, minden egyes szekvenciában. A módszer alapvetően a szekvenciák közötti *hasonlóságot* vizsgálja.

A második a *távolságalapú* törzsfa, amikor az egyes taxonok közötti távolságok mátrixát vizsgálják páronként. Minden egyes távolság a két taxon közötti divergencia (mivel a két taxon közös őssel rendelkezik) becsült értékét fejezi ki. A törzsfakészítés során az analízis a távolságok alapján számított mátrixot veszi alapul. Két szekvencia közötti különbség egyenlő az egymáshoz képest különböző szekvenciahelyek száma, valamint összehasonlításban érintett szekvenciahelyek hányadosával. Az így kapott számot nevezik távolságértéknek, ami nem más, mint azon szekvenciahelyek aránya, amelyek különbséget mutatnak a két vizsgált szekvenciában az összerendezést követően. A módszer az előző típussal ellentétben az egyes szekvenciák közötti *különbséget* vizsgálja. A távolságalapú módszer nagy előnye, hogy sokkal kisebb a számítógépkapacitás igénye mint a karakteralapú módszernek, és ennek következtében sokkal gyorsabb is, mely fontos tényező, amikor sok taxont kívánunk egymással összehasonlítani. A leggyakrabban használt távolságalapú módszerek az UPGMA

(Unweighted Pair-Grouped Method with Arithmetic Mean) és az NJ (Neighbour Joining). Ezek között az utóbbi az egyik legnépszerűbb, legegyszerűbb, és viszonylag gyors algoritmus, amikor a szekvenciák közötti különbség csekély. Az NJ által létrehozott fa gyakran kiindulópontja a komplexebb, karakteralapú filogenetikai módszereknek, mint pl. a Maximum Likelihood. Egy filogenetikai törzsfá kereséshez szükség van egy standard felállításához, melyet a mai nyelv „optimális kritérium”-nak nevez.

A molekuláris filogenetikában a leggyakrabban használt módszerek a különálló tulajdonsághalmazok (karakterek) vizsgálatára épül: ezek közé tartoznak a Maximum Likelihood (legnagyobb valószínűség), a Parsimony és a Bayesian analízis. Alapvetően mindhárom módszer egymással párba állított és összerendezett nukleinsav- és aminosavszekvenciákkal dolgozik. Ugyanakkor előfordul, hogy a módszerek alkalmazásához különböző restriktív (hasító) helyek meglétéről vagy hiányáról, illetve génsorrendről táplálnak be adatokat. Fontos megjegyezni, hogy egy törzsfá nem mindig tükrözi a valószínű evolúciós viszonyokat, ugyanis két taxon nemcsak azért hasonlíthat egymásra, mert közös őstől származnak, hanem azért is, mert esetleg hasonló evolúciós nyomásnak voltak kitéve, vagy egyszerűen csak a véletlen okán. Ezért az ilyen filogenetikai törzsfákat ajánlatos mindig a megfelelő óvatossággal kezelni.

### ***Maximum Likelihood (ML) analízis***

A „likelihood” egy matematikai kifejezés, mely arányban áll a valószínűséggel, de az arány értéke tetszőlegesen megválasztott. Az ML egy parametrikus statisztikai módszer. A módszer az adatok elemzése során azt a törzsfát keresi, amely a legnagyobb valószínűségi értékkel rendelkezik (maximalizálja a hasonló adatok valószínűségét) a választott evolúciós modellnek megfelelően. Tehát a legvalószínűbb törzsfát keresi, amely leginkább közelíti a feltételezett valósághoz a választott adatok és modell alapján, és éppen ezért leggyakrabban csak egy törzsfát kapunk e módszerrel. A módszer nagy előnye, hogy lehetővé teszi a felhasználó számára az alkalmazni kívánt evolúciós modellnek a megválasztását. Hátrányai között említhető, hogy rendkívül időigényes. A vizsgálni kívánt szekvenciák számától és a számítógép kapacitásától függően az elemzés akár napokon-heteken keresztül is tarthat.

A Maximum Likelihood (maximális valószínűség) módszer a szekvenciarendezés során nyert adatokat arra használja, hogy meghatározza a szubsztitúciók valószínűségét, a négy nukleotid relatív gyakoriságát, valamint a tranzíciók és transzverziók különböző

valószínűségeit a választott evolúciós modellnek megfelelően (Felsenstein, 1981, 1982). Az adatok figyelembe vételével a módszer azt a törzsfát választja ki, amely maximalizálja az adatok helyes összerendezésének a valószínűségét a választott evolúciós modell keretein belül és a legnagyobb valószínűségi értékkel rendelkezik. A Maximum Likelihood analízis során a program megadja a választott evolúciós modell paramétereit és az elágazások hosszát minden egyes lehetséges törzsfára, majd a legnagyobb valószínűségértékkel rendelkező fát választja ki közülük. A Maximum Likelihood módszer szerint azt a magyarázatot kell választani, amely a kapott eredményt a legvalószínűbb jelenségként írja le. Az elemzés során a módszer az adatokat az összes lehetséges módon összehasonlítja, valamint értékeli a kapott paramétereket, ezért az ML elemzés során kapott eredmény talán a legpontosabb és legmegbízhatóbb a filogenetikai módszerek között. Elméletileg az algoritmus az egyes szekvenciák várt valószínűségét adja meg egy közös ősből, és ezen adatokból következtet a filogenetikai törzsfá felépítésének a valószínűségére. A valószínűséget az összes, ily módon alkotott lehetséges törzsfára kiszámítja, majd megadja a legvalószínűbb törzsfát. A módszer az úgynevezett „hill climbing” (hegymászás) algoritmust használja. Ennek az algoritmusnak az egyetlen hátránya, hogy a paraméterek számának a növekedésével egyre inkább megbízhatatlan, mivel minden esetben a paraméter maximális értékét keresi, valamint a számítási folyamat rendkívül időigényes. Fontos leszögezni, hogy a Likelihood nem annak a valószínűsége, hogy az elemzés során kapott törzsfá milyen valószínűséggel egyezik meg a valódi evolúciós törzsfával, hanem annak a valószínűsége, hogy a törzsfá milyen valószínűségben felel meg annak az adatnak, amit elemeztünk. Az ML analízis lényege, hogy azon adat valószínűsége, amely az adott törzsfát eredményezte, megegyezik azon törzsfá valószínűségével, amely az adatot eredményezte.

Számos szempontból az ML analízis a leginkább megfelelő, hiszen legpontosabb a filogenetikai kapcsolatok feltárására. A módszer ugyanis minden lehetséges mutációs lépést számításba vesz, amelyek a vizsgált adatokat eredményezhették. A Likelihood függvény hatékony és következetes módszerként ismeretes a statisztikában. A módszer legnagyobb előnyét az evolúciós modell megválasztásának a lehetősége, az eredmény pontossága és megbízhatósága adja. Hátrányaként említhető a nagy számítógépkapacitás, valamint a számítási folyamat időigénye.

A Maximum Likelihood analízis során az első lépés, az, hogy megtaláljuk az összehasonlítandó szekvenciák között a legnagyobb homológiát. Ezt követi egy

evolúciós modellnek a megválasztása, ami történhet manuálisan vagy egy rendelkezésre álló program (Modeltest) segítségével, mely jelentősen megkönnyíti a felhasználó dolgát. Az általunk is alkalmazott Paup\*4.0 programcsomagban az alapértelmezett evolúciós modell a HKY modell, mely egy tranzíció/transzverzió=2 rátával számol. Ezt a modellt azonban mindig kritikusán kell használni, mivel a legtöbb esetben ez a feltétel nem teljesül, és ennek következtében szükség lehet más evolúciós modell megválasztására.

### ***Maximum Parsimony (MP) analízis***

Annak ellenére, hogy a páronkénti távolságmeghatározó módszer volt az első, széles körben elterjedt módszer filogenetikai összefüggések megállapítására, a Maximum Parsimony analízis a leggyakrabban használt megközelítés maradt a filogenetikai törzsfák rajzolására az 1970-es évek elejétől egészen napjainkig. Ennek egyik legfontosabb oka az, hogy az MP analízis – amelyet legtöbbször csak Parsimony analízisként említenek – egy egyszerű megközelítés (nem parametrikus statisztikai módszer), mely rövid idő alatt elvégezhető, meglehetősen pontos és megbízható, karakteralapú filogenetikai módszer. A módszer elsősorban matematikai elméleteken alapszik, amelyeket nagy kapacitású számítógépen futó algoritmusok támogatnak. Annak ellenére, hogy a módszernek vannak bizonyos hiányosságai, a Parsimony analízis napjaink egyik legfontosabb és leghasznosabb módszere a filogenetikai törzsfák készítésére. Sokan úgy tartják, hogy a módszer filogenetikai szempontból a legjobb, hiszen az elmélet feltételezi, hogy az evolúció során ritkán következnek be evolúciós változások, továbbá, hogy az egyes evolúciós események a legkevesebb bázisváltozás (mutáció) hatását követik. Az analízis alapvető ötlete egyszerű: olyan törzsfát vagy törzsfák csoportját keresi, amely minimalizálja azon evolúciós változások (mutációk) összegét, amelyek az adatok megértéséhez szükségesek, pl. egy tulajdonság átalakulását egy másikba (Kluge és Farris, 1969; Farris, 1970; Fitch, 1971). A módszer tehát a lehetséges törzsfák közül azt választja ki, amely a legkevesebb valószínűsíthető mutációs lépéssel választja el egymástól a közös őstől származó taxonómiai csoportokat. A módszer alkalmazásának előfeltétele, hogy az összehasonlítandó taxonómiai csoportok rendelkezzenek egy bizonyos tulajdonsággal, amit egy közös őstől örököltek meg. A vizsgált evolúciós jelenséghez szükséges mutációs történések minimum számát minden egyes lehetséges törzsfára megadja, és azok közül választja ki

azokat, amelyek a legkevesebb mutációs változást tartalmazzák. Ezek a fák lesznek az optimálisak („parsimonious”) a vizsgált jelenségre. A Parsimony analízis a törzsfán az egyes elágazások hosszúságában optimalizálja az evolúciós változások számának az összegét. Az elágazások hosszúsága megegyezik az egyes szekvenciahelyeken bekövetkezett mutációs változások számának az összességével. Az evolúciós változások minimalizálásnak célja gyakran filozófiai okokra vezethető vissza, ami szerint: ha két elmélet egyaránt érvényes egy jelenség magyarázatára, akkor lehetőség szerint mindig az egyszerűbbet kell választani. A módszert gyakran társítják „a legegyszerűbb magyarázat a legjobb” kifejezéssel.

A Parsimony elemzés során létrejött filogenetikai törzsfák megjelenésükben hasonlítanak a távolság alapján kapott törzsfákhoz, bár az egyes elágazások sorrendje gyakran annak ellenére különbözik, hogy azonos a szekvenciahalmazból indultak ki. Bár a Parsimony módszer akkor a legmegbízhatóbb, amikor az evolúciós ráta lassú, vagyis a várható evolúciós változások száma alacsony, ugyanakkor tévesen állítják, hogy ez a Parsimony módszer alkalmazásának a feltétele lenne.

A Parsimony módszer nagy előnye a Maximum Likelihood módszerrel szemben, hogy kisebb a számítógépkapacitás igénye, és ennek megfelelően gyorsabb is. Sokak szerint a legjobb törzsfakészítő módszer, mivel alapértelmezett feltevése, hogy evolúciós változások ritkán történnek. A hátránya pedig, hogy a módszer nem kínálja fel az evolúciós modell megválasztásának a lehetőségét. A módszer feltételezi, hogy minden egyes változás egyenlő eséllyel következik be minden elágazásnál, amelynek a valóságban nagyon kicsi a realitása.

A Parsimony analízis során az első lépés – a többi törzsfakészítő módszerhez hasonlóan – a megfelelő szekvencia-összerendezés, vagyis megtalálni az összehasonlítandó szekvenciák között a legnagyobb homológiát. Ehhez különböző szekvenciarendező programokat hívhatunk segítségül, de a végső finomítást a mai napig is a szakember döntéseinek megfelelően szükséges elvégezni. Az összerendezés során a Parsimony analízis minden egyes szekvenciahelyet külön karakterként kezel, amelyek más-más jelentőséggel bírnak különböző taxonómiai csoportokban. Azonban nem minden karakter azonos jelentőségű a Parsimony törzsfák elkészítéséhez. Azon karaktereket, amelyek az összes összehasonlítani kívánt taxonban változás nélkül megtalálhatók, a módszer nem veszi figyelembe az elemzés során. Ugyanígy kezeli azon karaktereket is, amelyek az összes taxon közül csak az egyikben fordulnak elő. A

Parsimony módszer logikája azon alapul, hogy az összes szekvencia összeillesztése után a program hány különbséget számol az egyes szekvenciapárok között.

Különböző programcsomagok léteznek a szekvenciák összerendezésére, illetve a törzsfák elkészítésére, melyek közül a munkánk során a ClustalX, Genedoc, Paup\*4.0 és Treeview programokat használtuk. Az első két program a szekvenciák összerendezésére, az utóbbi két program pedig a törzsfák elkészítésére és megjelenítésére alkalmazható.

### ***Bayesian analízis***

A szekvenciák filogenetikai elemzéseit Bayesian módszerrel is elvégeztük. A Bayesian megközelítés a filogenetikában egy viszonylag új módszer, mely még csak most kezd széles körben elterjedni. A módszer az ún. utólagos megközelítésen, utólagos valószínűsége (posterior probability) alapuló statisztikai módszer: egy esemény becsült valószínűségét azután adja meg, hogy elvégezte a rendelkezésre álló adatok bizonyos elemzését. Egy szemléltető példa: a nap több mint 4 milliárd éve minden nap lenyugszik és felkel. Ha a nap ma is lenyugszik mennyi lesz a valószínűsége, hogy holnap ismét felkel? Nagyon nagy valószínűséggel a nap holnap ismét felkel, és az előzetes adatok ismeretében kijelenthető, annak a valószínűsége, hogy a nap nem kel fel holnap, roppant kicsi. Tehát ebben az esetben az előzetes adatok ismeretében készül becslés egy még be nem következett eseményre. Mivel az utólagos valószínűséget lehetetlen kiszámolni analitikusan, ezért a módszer egy szimulációs technikát alkalmaz. Az analízis a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmuson alapszik, mely egy randomizációs technika az eloszlás valószínűségének becslésére, arra az esetre, amikor kivitelezhetetlen (vagy csak nagyon nehezen kivitelezhető) lenne analitikusan az eloszlás meghatározása. A Bayesian módszer a statisztika egyik meghatározó módszerét képviseli. A legnépszerűbb internetes kereső oldal, a Google is az MCMC algoritmust használja a keresésre. Gyakran hangzik el a felszólítás a módszert kritizálók felé, hogy ha nem bíznak a Bayesian módszerben, akkor a Google keresőt sem kellene használniuk! A módszer nagy előnyét, aminek a Google is köszönheti a mai napig tartó töretlen sikertörténetét, a módszer megbízhatósága és gyorsasága jelenti.

A Bayesian módszernek a filogenetikában történő alkalmazása viszonylag újkeletű, bár egyre elterjedtebbé válik a tudományos világban számos előnye és egyszerű kezelhetősége miatt. A filogenetikában használt Bayesian algoritmus (Rannala és Yang,

1996; Mau és Newton, 1997; Mau *et al.*, 1999) hasonlít a Maximum Likelihood módszerhez abban a tekintetben, hogy a felhasználónak itt is lehetősége adódik megválasztani az alkalmazni kívánt evolúciós modellt, valamint abban, hogy ez a módszer is azokat a törzsfákat keresi, amelyek a leginkább megfelelnek a választott evolúciós modellnek, továbbá a kiindulási adathalmaznak (szekvencia-összerendezés).

Az ML azt az egy törzsfát keresi, amely maximalizálja a megfigyelt adatok valószínűségét, amelyek a törzsfát adták. A Bayesian módszer pedig azokat a törzsfákat keresi, amelyek maximalizálják azon törzsfák valószínűségét, amelyek az adatokat és az evolúciós modellt adták. Az optimális hipotézis az lesz, amely maximalizálja az utólagos valószínűséget. Egy hipotézis utólagos valószínűsége arányos a Likelihood értéknek a hipotézis előzetes valószínűségével kapott szorzatával. A különböző hipotézisek előzetes valószínűsége a kutató meggyőződését tükrözi a hipotézisről, mielőtt még láthatta volna az adatokat. A Bayesian módszer nemcsak sokkal gyorsabb, mint az ML analízis, de pontosabb is bizonyos szempontból, mivel lehetővé teszi a szekvenciaevolúció komplexebb modelljeinek alkalmazását. A módszer olyan modellek használatát is lehetővé teszi, amelyek ML analízissel egyáltalán nem, vagy csak nagyon nehezen kivitelezhetők. A módszer nagy előnyei között említhető, hogy az elemzés során nemcsak egy törzsfát kapunk, hanem az egyes elágazások megbízhatóságára is kapunk egyfajta becslést (utólagos valószínűségértékek) hasonlóan a bootstrap értékhez, így már nem szükséges külön bootstrap elemzést végezni. A módszer talán egyetlen hátrányaként említhető (ami akár előnye is lehet), hogy a felhasználó maga dönti el, milyen hosszan (hány generáción keresztül) akarja futtatni a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmust. Nincs pontos recept a helyes időtartam megválasztására, mivel az mintánként változik. Javasolható egy közepes időintervallumot megadni, ekkor az eredmény már elég megbízható, ugyanakkor a számítás belátható időn belül befejeződik. Nem célszerű túl hosszú elemzést választani, mivel egy pont után a számítás megbízhatósága nem változik jelentősen. Az elemzés során a végső eredmény nem függ egy vagy több speciális értéktől, mivel a módszer az összes lehetséges paramétert figyelembe veszi a számítás során. Amíg az ML által használt „hill-climbing” algoritmus a paraméterek számának a növekedésével egyre inkább megbízhatatlan, hiszen minden esetben a paraméter maximális értékét keresi, addig az MCMC algoritmus nem próbálja megtalálni minden egyes paraméternek a maximális értékét, azonban az összes paramétert figyelembe veszi. Az MCMC algoritmus a valószínűségek eloszlását közelíti meg.

## ***Karakteralapú módszerek összehasonlítása***

Az egyes módszerek közötti választás leginkább gyakorlati szempontú, és szubjektív döntés kérdése. Az egyik leggyakoribb szempont, amelyet figyelembe szoktak venni, a gyorsaság, amely jelentősen függ a számítógépünk teljesítményétől. Azonban ha a gyorsaság nem meghatározó tényező, a legtöbb érv a Bayesian módszer mellett szól, több ok miatt. Elsőként: valószínűtlennek tűnik a Parsimony módszer azon feltevése, hogy egy bizonyos evolúciós esemény a legkevesebb változás (mutáció) hatására következzen be. A feltevés az evolúciós folyamatok oly fokú „hatékonyságát” feltételezi, amely a valóságban nem nagy eséllyel következik be. Másodszor: a Bayesian módszer azonnal információt ad az egyes elágazások megbízhatóságáról, amíg az ML és MP módszernél ehhez külön el kell végezni a bootstrap analízist, mely az ML esetében rendkívül időigényes. Harmadszor: a Parsimony analízis – a Bayesian módszerrel ellentétben – nem teszi lehetővé az egyes elágazások hosszának a becslését. Negyedszer: a Bayesian módszer a ML módszerhez hasonlóan lehetővé teszi az evolúciós modell megválasztását, azonban az MP elemzésnél erre nincs lehetőség. A módszerek főbb sajátosságainak összehasonlítását az 1. táblázat tartalmazza.

**1. táblázat** Az egyes filogenetikai összehasonlító módszerek főbb sajátosságai

Módszer	Előnyök	Hátrányok	Szoftver
Maximum Parsimony	Nagyon gyors, több száz szekvencia elemzése során is. Megbízható, ha közel hasonló szekvenciákat hasonlítunk össze, és rövidek az elágazások.	Kevésbé megbízható az egymáshoz távolabb eső szekvenciák esetében, illetve ha lényeges eltérés van az egyes elágazások hosszában. Nincs lehetőség evolúciós modellek megválasztására.	Paup
Maximum Likelihood	A legpontosabb becslést szolgáltatja az adott evolúciós modellen belül. Lehetőséget ad evolúciós modellek megválasztására.	A számítógép kapacitásától függően az elemzés nagyon sok időt vesz igénybe (akár heteket, sőt hónapokat).	Paup
Bayesian módszer	Szoros kapcsolatban áll az ML módszerrel abban a tekintetben, hogy hasonlóan megbízható adatokat szolgáltat rövid időn belül, bootstrap analízis nélkül. Lehetőséget ad az evolúciós modellek megválasztására.	Nehéz megbecsülni a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmus, milyen hosszan, azaz hány generáción keresztül fusson, ami befolyásolhatja a végső eredményt.	MrBayes

## ***Bootstrapping***

Miután sikerült valamelyik módszerrel (ML, MP) egy filogenetikai törzsfát előállítani, szükséges azt is megvizsgálni, hogy a készítés során felhasznált adatok mennyire támogatják az elkészült filogenetikai elágazásokat a törzsfán belül, vagyis mennyire



megbízható az adott elágazás. Ennek több lehetséges módja van, de a leggyakrabban használt módszer a bootstrapping, melyet mi is alkalmaztunk a munkánk során. A módszer lényege, hogy a program a szekvenciarendezést követően az adatokból véletlenszerűen különböző másolatokat (pseudoreplicates) készít, melynek célja új adathalmazok (matrixok) létrehozása, amelyek mérete és tulajdonságai megegyeznek az eredetivel. A bootstrap újramintázás adatok cserélgetésével (x mintából véletlenszerűen kiválasztott y adatokkal, amely adatokat egymás után többször is kiválaszthat). Az így létrejött másolatokból szintén filogenetikai törzsfák készülnek. Ezt a folyamatot a módszer egymás után többször megismétli. Az ismétlések, vagyis a másolatok száma leggyakrabban 1000, de minimum 100-nak kívánatos lennie. A folyamat végén a kapott eredményeket a rendszer összegzi, ezáltal megbecsüli egy adott törzsfát és azok elágazásainak a megbízhatóságát. Egy elágazásnak a gyakorisága az összes másolat között, az elágazás bootstrap értéke. A bootstrapping megadja a törzsfák egyes elágazásainak a valószínűségét. Ha a bootstrap érték nagyobb, mint 95%, az azt mutatja, hogy a másolatok adatai nagymértékben alátámasztják az adott elágazást. Ha kevesebb mint 50%, az azt jelzi, hogy a másolatok nem erősítik meg az adott elágazást, így az nem kellően megbízható.

Mivel a Parsimony analízis viszonylag gyors módszer az adatok filogenetikai elemzésére, ezért a bootstrap analízis is észszerű időn belül elvégezhető. A Maximum Likelihood elemzés azonban már önmagában is nagyon időigényes. Az összehasonlítani kívánt taxonok számának és a számítógép teljesítményének a függvényében az elemzés napokat is igénybe vehet. Ennek megfelelően a bootstrap analízis is nagyon időigényes, és akár hónapokig is eltarthat. Így a felhasználó döntésén múlik, hogy alkalmaz-e a bootstrap elemzést vagy szükségszerűen eltekint tőle.

### ***Törzsfakereső módszerek***

A különböző filogenetikai módszerek (MP, ML) olyan törzsfát keresnek, amelyek bizonyos kritériumoknak a legjobban megfelelnek. Amikor az összehasonlítandó taxonok száma kevés, még kivitelezhető az összes lehetséges törzsfának a kiértékelése. Ezt a típust „exhaustive search”-nek (részletes keresés) nevezik, ami garantálja a kritériumoknak legmegfelelőbb törzsfák megtalálását, hiszen az összes lehetséges változatot figyelembe veszi az értékelésnél. Ez a módszer „branch-addition” (ág-hozzáadás) algoritmus szerint működik, ami azt jelenti, hogy az első három taxonból

létrehozza az egyetlen lehetséges háromtaxonos törzsfát, amely három elágazást tartalmaz. Ezután hozzáadja a negyedik taxonnak az elágazását – csatlakoztatva azt mind a három, már létező elágazás közé – létrehozva így három lehetséges négytaxonos törzsfát. A folyamat az ötödik taxon hozzáadásával folytatódik, amikor már tizenöt darab öttaxonos fa kombináció lehetséges. Azonban ha a taxonok száma meghaladja a tízet az „exhaustive search” csaknem kivitelezhetetlenné válik, hiszen a lehetséges törzsfák száma több mint 34 millió.

Ezért létezik egy alternatív algoritmus, a „branch-and-bound” (ág és kapcsolódás), amely garantálja a kritériumoknak legmegfelelőbb törzsfa megtalálását anélkül, hogy megalkotná az összes lehetséges törzsfát. Elsőként véletlenszerűen létrehoz egy háromtaxonos törzsfát és megbecsüli az értékét, melyet a továbbiakban viszonyítási pontként kezel. Nem keresi meg az összes lehetséges törzsfát a keresés minden szintjén: helyette csak egy fát hoz létre, melynek megadja a valószínűségét. Ha az alkalmazott kritérium a minimális evolúció, és az aktuális törzsfának jobb (alacsonyabb) az értéke, mint a kezdeti, véletlenszerűen létrehozott törzsfának, a keresés a következő szintre lép egy új elágazás hozzáadásával. Ha az aktuális törzsfának rosszabb (magasabb) értéke van, mint a véletlenszerűen kiválasztott törzsfának, a keresés elveti az összes elágazást, ami ebből ágazna el, mielőtt értékelné azokat. Ugyanis az innen elágazó lehetséges törzsfák csak rosszabb valószínűségi értékkel rendelkeznek, mint az elején véletlenszerűen kiválasztott törzsfa. Ha ez történik, a keresés visszaugrik egy szinttel, és folytatódik egy újabb elágazási pont keresésével. Amikor a lehetséges törzsfáknak a száma nagy, és túl lassú lenne megbecsülni az egyes törzsfák értékét a „branch-and-bound” algoritmussal, heurisztikus keresést alkalmaznak. A heurisztikus megközelítés lényegében egy „hill-climbing” (csúcs-kereső) algoritmus, amikor is egy kezdeti törzsfához különböző átrendeződéseket rendelnek, hogy pontosabbá tegyék azt. Többféle heurisztikus algoritmus létezik, melyek közül az egyik a „stepwise addition” (lépcsőfok hozzáadás) módszer. A „branch-and-bound” módszerhez hasonlóan a kiindulási pont itt is egy háromtaxonos törzsfa, melyhez hozzáadja a negyediket, hogy létrehozza a három lehetséges négytaxonos törzsfát. A két algoritmus között a következő lépésben van a különbség. Ugyanis a „stepwise addition” módszer a három lehetséges négytaxonos törzsfa közül, miután mindegyiknek kiszámítja az értékeit, csak egyet választ ki, amely a legjobb eredménnyel rendelkezik (a legrövidebb), és ehhez adja hozzá az ötödik taxont. Minden egyes új elágazás hozzáadása után a legrövidebb törzsfát választja ki, és ehhez adja tovább a következőt. Egy másik heurisztikus

megközelítés a „branch swapping”(ág-csere), mely az egyik leggyorsabb az előző keresések közül. Ennek egyik típusa a „tree bisection and reconnection” (fa kettévágás és újra összekapcsolás) stratégiájú újrendezés (TBR). A TBR az jelenti, hogy a törzsfát két részre bontják, majd ismét párosítják egy újabb elágazáson keresztül. A folyamat az összes lehetséges elágazást számításba veszi, majd kiválasztja közülük a legvalószínűbbet. A heurisztikus keresések nem garantálják a legmegfelelőbb törzsfá megtalálását, mivel az algoritmus mindig magában foglalja a választást két lehetőség között; az egyik: biztosan megtalálni a legmegfelelőbb törzsfát, illetve a másik: belátható időn belül találni megfelelő törzsfát.

### ***Evolúciós modellek***

Az élőlényekben történő evolúciós változások egyik magyarázata a mutáció, melyek a szelekciós nyomás következményeként vagy csupán a véletlennek köszönhetően fixálódnak a populációban. Ennek eredménye, hogy az egy közös őstől származó egyedek szekvenciái hasonlítanak egymáshoz. Az evolúciós törzsfák készítésekor feltétlenül figyelembe kell venni a mutációk értelmezésével foglalkozó és azt tárgyaló különböző evolúciós modelleket, mivel bizonyos folyamatok csak bizonyos evolúciós modellek alkalmazásával válnak értelmezhetővé. Amikor egy filogenetikai programot használunk evolúciós törzsfák készítésére és nem választunk egyet a különböző evolúciós modellek közül, akkor a program egy alapértelmezett modell szerint készíti el a filogenetikai törzsfát (HKY modell) (Hasewage *et al.*, 1985). A legegyszerűbb evolúciós modell az, amikor bármely nukleotid bármely nukleotidra történő kicserélődésének azonos az esélye. Ebben az esetben annak a valószínűsége, hogy egy bizonyos helyen található nukleotid az idő múlásával egy másik nukleotidra fog kicserélődni, csupán a pillanatnyi evolúciós változás értékétől (arányától) függ (pl. az az érték, amelyen a nukleotid kicserélődések [szubsztitúciók] történnek). A legegyszerűbb modell tehát egy paraméterrel, a szubsztitúció rátájával rendelkezik, és ennél fogva úgy is nevezik, hogy egyparáméteres vagy Jukes–Cantor-modell (Jukes és Cantor, 1968). Az egyparáméteres modell a legegyszerűbb evolúciós modell, de nem igazán realiztikus, mivel tudjuk, hogy nem minden változás történik azonos ráta szerint. Ennek ismeretében napjainkra 56 féle, különböző specifikus szubsztitúciós rátával és folyamattal rendelkező modellt dolgoztak ki. A legáltalánosabb modellben az egyes nukleotidgyakoriságoktól függően valamennyi szubsztitúció különböző rátával

következik be. További, gyakran használt speciális modellek még a „general nonreversible” (általános nem-visszaalakuló) modell, és a Kimura-féle kétparaméteres modell (Kimura, 1980), amely szerint a tranzíciók egyfajta, a transzverziók meg egy ettől eltérő rátával következnek be. Alternatív modell a Tavaré (1986) által kidolgozott „general time-reversible” (általános, idővel visszaalakuló) (GTR) sztohasztikus modell, mely hat különböző szubsztitúciós rátával dolgozik. A time-reversible modell szerint a szubsztitúció rátája annak, hogy egy nukleotid (i) egy másikra cserélődjön (j) ugyanannyi, mintha ellenkezőleg: j-ről i-re cserélődne a nukleotid. A PAUP\*4.0 programcsomagban elérhető, legösszetettebb és legteljesebb modell a GTR+I+ $\Gamma$  (six substitution-type general time-reversible model with some fraction of invariable sites and rates at variable sites following a gamma distribution).

A fentiek összefoglalásaként elmondható, hogy egy bizonyos szekvenciahalmaz alapján különböző törzsfák készíthetők számítógépes programok segítségével. A törzsfák elkészítése után a felhasználón múló szakmai feladat annak eldöntése, hogy a létrehozott törzsfák közül melyeket tekint megalapozottnak, melyek a legvalószínűbbek, és mely elágazások a legmegbízhatóbbak.

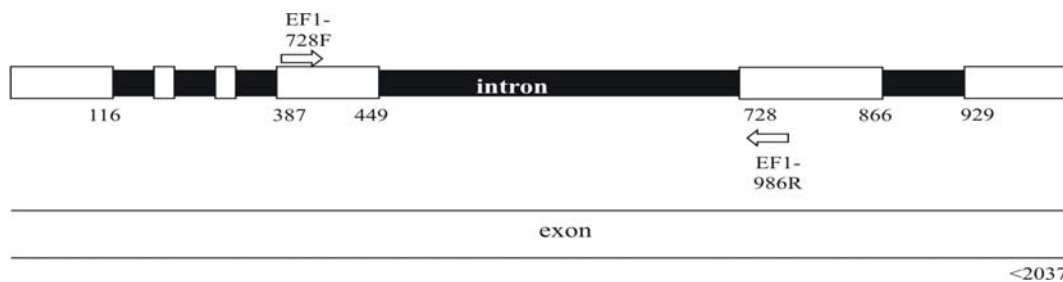
## ***1.9. Filogenetikai markerként használt szekvenciák***

### ***Transzlációs elongációs faktor alpha fehérjét kódoló gén (*tefl*)***

A „translation elongation factor 1 subunit alpha” (EF-1 $\alpha$ ) fehérje a sejten belül a citoszólban található. Eukaryota-knál és Archaea baktériumoknál a fehérjeszintézis folyamatában elsődleges funkciója, hogy katalizálja a GTP-függő aminoacil-tRNS komplex felbomlását és a riboszóma A helyére irányítsa azokat (Moldave, 1985). Azért is az EF-1 $\alpha$  fehérje a felelős, hogy a megfelelő tRNS a megfelelő mRNS-el kapcsolódjon össze, és ellenőrzi az átírás sebességét és hűségét (Merrick, 1992). Az EF-1 $\alpha$  fehérje, és így a fehérjét kódoló gén (*tefl*) is erősen konzervált az élővilágban, ami alkalmassá teszi a filogenetikai vizsgálatokra (Cho *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 1999; Roger *et al.*, 1999). A szekvenciák olyannyira konzerváltak, hogy még az egymástól legtávolabbi eukarióta fajok esetében is a hasonlóság 55 és 65% között van.

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 Roger *et al.* (1999) különböző

fajoknál (pl. *Mucor racemosus*, *Podospora anserina*), illetve Druzhinina és Kubicek (2005) *Trichoderma* fajoknál bizonyították. Knutsen *et al.* (2004) *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides* és *F. langsethiae* fajkomplex elkülönítésére, Skovgaard *et al.* (2002) a *Fusarium oxysporum* populációjának vizsgálatára használta a *tefl* gént. Tanabe *et al.* (2004) szerint a *tefl* gén alkalmazása nem megfelelő magasabbrendű filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára a gombák körében. A *tefl* alkalmazásának hátránya, hogy a fehérjét kódoló 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 fragmentumát választottuk (2. ábra).



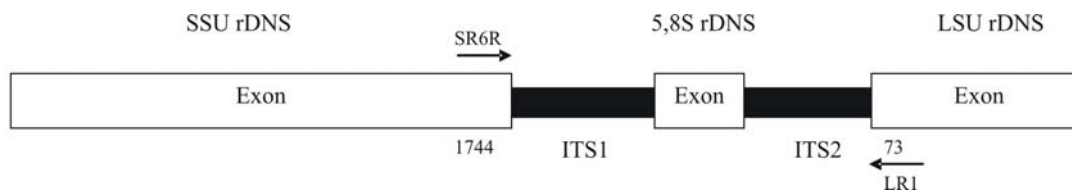
**2. ábra** A *tefl* gén sematikus vázlata, valamint a PCR-ben használt primerek helyzete (Druzhinina és Kubicek, 2005 nyomán)

### **Az ITS-régió a fonalas gombákban**

A filogenetikai vizsgálatokhoz már hosszú ideje a legszélesebb körben használt konzervatív régiók a sejtmagban és a mitokondriumban található riboszomális rDNS szekvenciákat kódoló gének (rDNS) (Moncalvo *et al.*, 2002; Avise, 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 régiókhoz tartoznak a 18S-t (vagy kis alegységet, Small Subunit, SSU), az 5,8S-t, valamint a 28S-t (nagy alegységet, Large Subunit, LSU), továbbá az 5S riboszóma alegységet *kódoló gének* (Gerbi, 1985). Ezek sokkal kevésbé variábilisak, mint a nem-kódoló szakaszok, melyek lehetnek átírtak, mint az ITS (Internal Transcribed Spacer) régiók vagy nem átíródó régiók, mint az IGS (Intergenic Spacer vagy régebbi nevén NTS [Non Transcribed Spacer]). Az ITS 1 és 2 az SSU, 5,8S és LSU alegységek között helyezkednek el, és azokkal egyetlen transzkripciós egységet alkotnak. Az IGS1 és 2 régiók az LSU, 5S és SSU alegységek között találhatóak (Gunderson *et al.*, 1987; Lane *et al.*, 1985). Gombákban az 5S alegység általában az rDNS génklaszteren kívül található, ezért csak egy IGS van az SSU és az LSU között (White *et al.*, 1990).

Az utóbbi években a mikológusok egyre szélesebb körben használják a fonalas gombáknál az rDNS-szekvenciákban talált variabilitást a taxonok közötti rokonsági viszonyok elemzésére. Népszerűségük egyik fő oka, hogy a szekvenálandó régió céltudatos megválasztásával megfelelő variabilitás kapható a taxonok közötti rokonsági viszonyok feltárásához: osztály, család, nemzetség, faj, sőt faj alatti szinteken is (Hillis és Dixon, 1991; Hibbet *et al.*, 1995; Lutzoni és Vilgalys, 1995; Moncalvo *et al.*, 1995; Nicholson, 1995; Hopple és Vilgalys, 1999; Pine *et al.*, 1999; Thon és Royse, 1999; Hibbett és Thorn, 2001; Binder és Hibbett, 2002). Ez azért lehetséges, mert az rDNS kódoló (LSU, SSU, 5,8S és 5S) és nem kódoló (ITS 1 és 2; IGS 1 és 2) eltérő evolúciós ráták szerint fejlődnek.

Mivel a kódoló régiók (LSU és SSU) evolúciósan erősen konzerváltak, és az évmilliók alatt alig változott szakaszok, ezért főleg egymástól távolabbi taxonok (osztály, rend, család, nemzetség) rokonsági viszonyainak megállapítására használják (Hillis és Dixon, 1991). Ezek közül fonalas gombáknál a filogenetikai vizsgálatokhoz leggyakrabban az LSU gént használják, annak is az 5' végét, amely nagyobb DNS-szekvenciavariabilitást, és így több filogenetikai információt hordoz, mint a gén többi, gyakorlatilag invariábilis része (White *et al.*, 1990). A változékony, nem-kódoló szakaszok (ITS és IGS) evolúciós mércével mérve viszonylag gyorsan változnak, ezért többségében alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok vizsgálatánál, például közeli rokon fajok vagy populációk egymástól való elkülönítésénél használják fonalas gombáknál, növényeknél és állatoknál (Jorgensen és Cluster, 1988; White *et al.*, 1990; Bruns *et al.*, 1991; Baldwin, 1992; O'Donnell, 1992; Ritland *et al.*, 1993; Hsiao *et al.*, 1994, 1995; Schlötterer *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1995; Mai és Coleman, 1997; Weekers *et al.*, 2001; Oliverio *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2000, 2002). Ezek közül az ITS-régiók a leggyakrabban szekvenált rDNS-szakaszok, és ennél fogva a filogenetikai analízisek mellett igen nagy szerepük van a faji azonosítást megkönnyítő szekvencia-adatbázisok kiépítésében. Számos taxonómai tanulmány bizonyítja, hogy az ITS-régiók alkalmasak filogenetikai rokonsági viszonyok megállapítására faji és nemzetség szinten egyaránt (Gardes és Bruns, 1993; Graser *et al.*, 1999; Shinohara *et al.*, 1999; Gottlieb és Lichtwardt, 2001; Nugent és Saville, 2004; Yli-Mattila *et al.*, 2004; Voglmayr és Yule, 2006). Vizsgálatunkhoz az rDNS-régió egy olyan szakaszát választottuk, amely tartalmazza a ITS 1 és 2, valamint az 5,8S rDNS-szekvenciát (3. ábra).



**3. ábra** Az ITS-régiók elhelyezkedésének sematikus vázlata, valamint a PCR-ben használt primerek helyzete (White *et al.* nyomán, 1990)

Az ITS-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* fajkomplex) vizsgálatára (Mendes Pereira *et al.*, 2003), illetve a *Phoma tracheiphila* izolátumok elkülönítésére (Balmas *et al.*, 2005). Fatehi *et al.* (2003) szintén ezt használta az „*Ascochyta pinodes* komplex” taxonómiai vizsgálatokor.

### ***A β-tubulin-gén***

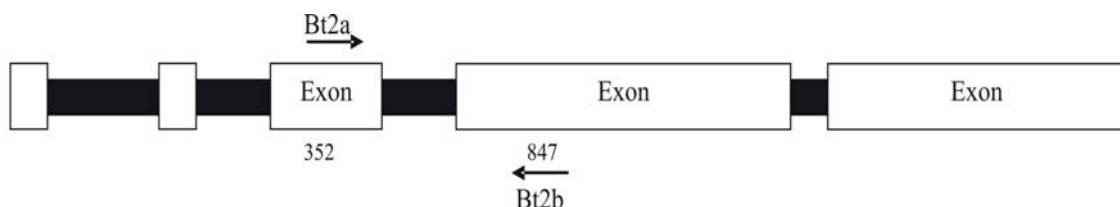
A tubulin fehérje létfontosságú szerepet játszik az eukarióta sejt felépítésében és működésében, hiszen a mikrotubulusok (melyek a citoskeletális rendszer alkotórészei) jórészt tubulinmolekulákból épülnek fel. A 445–449 aminosavból álló tubulin fehérjét egy 4–8 intront tartalmazó, kb. 1,8 kb nagyságú gén kódol.

A tubulinmolekulát több, szerkezetileg nagyon hasonló fehérje építi fel, amelyek ún. fehérjecsaládokba csoportosíthatók:  $\alpha$  (alpha)-,  $\beta$  (beta)-,  $\gamma$  (gamma)-,  $\delta$  (delta)-,  $\epsilon$  (epsilon)-,  $\zeta$  (zeta)-,  $\eta$  (eta)-tubulin (McKean *et al.*, 2001). A hét csoport közül az  $\alpha$  (alpha)- és a  $\beta$  (beta)-tubulin fordul elő a legnagyobb számban az eukarióta sejtben, mivel egymással heterodimert alkotva ezek a mikrotubulosok elsődleges építőkövei. Mivel minden eukarióta sejt tartalmaz mikrotubulusokat, így tubulin molekulákat is, ezért feltételezhető, hogy a tubulin eredete egyidejű az eukarióta szervezetek megjelenésével, ami mintegy 1,6 milliárd évvel ezelőtti időszakra tehető (Wang *et al.*, 1999). A közelmúltban azonban tubulinhomológ molekulát találtak baktériumokban is, mely az FtsZ nevet kapta (Ent *et al.*, 2001). Ez feltételezi, hogy a tubulinmolekula eredete az evolúció során a Prokariota és Eukariota fejlődési útvonal szétválása előtti időszakra tehető. Tehát a tubulinmolekula eredete meglehetősen visszanyúlik az időben, ugyanakkor meglepő módon azt tapasztaljuk, hogy az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin szekvenciái, különösen az N-terminális véget kódoló régióban, rendkívüli mértékben konzervatívak maradtak az evolúció során (Little *et al.*, 1981). A két fehérjét ( $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulint) kódoló gének szekvenciái 65–70% os hasonlóságot mutatnak, bármelyik eukarióta taxon között

(Baldauf *et al.*, 2000). Egyes ősi taxonoknál, mint pl. a kovamoszatok, a  $\beta$ -tubulin fehérjét kódoló gén szekvenciái között a különbség kisebb mint 2,8%, ami az aminosav-sorrendben nem is fejeződik ki (Armbrust és Galindo, 2000). Ez a magas fokú konzervativitás, illetve alacsony variabilitás a tubulint felépítő fehérjék kódoló génjeinek szekvenciáiban a tubulinnak a mikrotubulusok felépítésében betöltött funkcionális és strukturális szerepének köszönhető (Burns és Surridge, 1994).

A fentebb leírtaknak megfelelően a tubulint felépítő fehérjéket kódoló gének, különösképpen a  $\beta$ -tubulin gén, egyre nagyobb figyelmet kap különböző (evolúciósan egymáshoz közel és távol elhelyezkedő) taxonok közötti evolúciós rokonsági kapcsolatok elemzésében (Keeling és Doolittle, 1996; Baldauf *et al.*, 2000). A gént alkalmazták már filogenetikai vizsgálatokra egysejtűeknél, állatoknál, növényeknél és gombáknál egyaránt (Mages *et al.*, 1995; Keeling *et al.*, 1998; Schutze *et al.*, 1999; Ayliffe *et al.*, 2001, Edgcomb *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2004; Yli-Mattila *et al.*, 2004). Voigt *et al.* (2005) egyéb gének, köztük az ITS-szekvenciák mellett a  $\beta$ -tubulin gént is alkalmazták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* fajkomplex) vizsgálatára, hasonlóképpen Fatehi *et al.* (2003) az „*Ascochyta pinodes* komplex” taxonómiai vizsgálatokor.

Landvik *et al.* (2001) a  $\beta$ -tubulint alkotó aminosavak szekvenciájának egy részét próbálták ki magasabb rendű taxonok elkülönítésében az Ascomycota törzsön belül. Arra a következtetésre jutottak, hogy a  $\beta$ -tubulin gén kevésbé alkalmas magasabb szintű rendszertani kapcsolatok elemzésére, mint más gének, ugyanakkor a  $\beta$ -tubulin gén informatívnak bizonyult alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok elkülönítésében (Jong *et al.*, 2001; O'Donnell *et al.*, 1998; Schoch *et al.*, 2001). Vizsgálatunkhoz a  $\beta$ -tubulin gén olyan szakaszát választottuk (4. ábra), mely alkalmasnak bizonyult a taxonok közötti filogenetikai kapcsolatok feltárására fonalas gombák körében (Glass és Donaldson, 1995; O'Donnell és Cigelnik, 1997).



**4. ábra** A  $\beta$ -tubulin régió sematikus vázlata, valamint a PCR-ben használt primerek helyzete (Glass és Donaldson, 1995, valamint O'Donnell és Cigelnik, 1997 nyomán)



## 2. Anyag és módszer

### 2.1. Morfológiai vizsgálatok

Munkánk során kilenc, különböző forrásból származó *Phoma*-szerű taxon huszonkét izolátumát (2. táblázat) vizsgáltuk morfológiai és molekuláris bélyegek összehasonlításával. A *Phoma* fajok taxonómiájának elfogadott koncepciója *in vivo* és *in vitro* stabil morfológiai és tenyésztési paraméterek standardizált feltételek melletti jellemzésén alapul (van der Aa *et al.* 1990).

Morfológiai vizsgálatainkhoz 5 mm átmérőjű micéliumkorongokat vágunk ki a telepek aktív növekedésű széleiből és Petri-csészékben lévő táptalaj közepére helyeztük. A vizsgált táptalajok a következők voltak:

**Malátakivonat agar** (malt-extract agar, MA), amely 40 g malátakivonat (Oxoid) és 20 g agart tartalmaz egy liter desztillált vízben.

**Zabliszt agar** (Oatmeal agar, OA), amelyet 20 g zabpehely 0,5 l desztillált vízben való felfőzésével készítettünk, majd sajtkendőn való átszűrés után, desztillált vízzel 1 l-re egészítettünk ki, és 20 g agart adtunk hozzá.

Egy hétig sötétben, 20 °C hőmérsékleten történő inkubálást követően megmértük a telepátmérőket, továbbá feljegyeztük a micéliumszövedék színét, valamint a tenyészet felszíni és fonáki részének a színét Rayner (1970) színskálájának megfelelően. Feljegyeztük 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 (ultraibolya közeli, near ultraviolet) blacklight fluorescent lamp megvilágítású, 11 órás sötét periódusú ciklusokkal 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. A fényképeket Canon PowerShot A520 digitális kamerával készítettük.

2. 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> <sup>b</sup>	ITS <sup>c</sup>	<i>β-tubulin</i> <sup>d</sup>
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. Noordeoos	EU595355	EU573028	EU595352
D/054	MYA-406 PD98/1135	<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, Tápíószele

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

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

<sup>b</sup> transzlációs elongációs faktort kódoló gén (*tefl*), részleges szekvencia

<sup>c</sup> 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

<sup>d</sup> *β-tubulin* kódoló gén, részleges szekvencia

## **2.2. Molekuláris vizsgálatok**

### ***DNS-izolálás***

Az izolátumokat 50 ml malátakivonat-táplódatban 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 (1. melléklet).

### ***Polimeráz-láncreakción (PCR) alapuló vizsgálat***

A PCR-t 50 µl térfogatban végeztük, amely a következő összetevőket tartalmazta: 25 µl 2X PCR Master Mix (Fermentas, K0171), 2 µl genomi DNS (0,5–1 µg), 2–2 µl forward és reverse primer (10 pmol/µl), 19 µl steril, nukleázmentes víz (Fermentas, #R0581). A PCR körülményei az egyes fragmentumok felszaporítása során a következők voltak:

A *transzlációs elongációs faktor* esetében a DNS-felszaporításhoz használt indítószekvencia (primer)-pár az EF1-728F: 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' 20bp, valamint az EF1-986R: 5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3' 20bp (Druzhinina és Kubicek, 2005) volt. A reakció körülményeit 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) 56 °C-on, 1 percig, végül pedig a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen át. Ezután 25 cikluson keresztül denaturálás 95 °C-on, 1 percig, majd az annelláció 56 °C-on, 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen keresztül. Befejezésül egy 15 perces polimerizáció következett 72 °C-on.

Az *ITS-fragmentum* felszaporításához a következő primerpárt használtuk: SR6R: 5'-AAG TAG AAG TCG TAA CAA GG-3' (SSU) 23 bp; az LR1: 5'-GGT TGG TTT CTT TTC CT-3' (LSU) 17 bp (White *et al.*, 1990). A reakció körülményeit 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 az annelláció 50 °C-on, 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 50 °C-on, 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen keresztül. Végül egy 15 perces polimerizáció következett 72 °C-on.

A  $\beta$ -tubulin fragmentum felszaporításához a Bt2a: 5'GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3' 24bp és a Bt2b: 5'ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3' 24 bp (Glass és Donaldson, 1995) primerpárt használtuk. A reakció körülményeit 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 az annelláció 58 °C-on, 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen át. Ezt követte 25 cikluson keresztül denaturálás 95 °C-on, 1 percig, majd az annelláció 58 °C-on, 1 percig és a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen keresztül. Befejezésül egy 15 perces polimerizáció következett 72 °C-on.

A PCR-t az MWG Biotech Inc. Primus 25 (Milton Keynes, UK) típusú készülékével végeztük.

### ***A PCR-termék tisztítása és koncentrációja***

A termékek tisztítását a Millipore cég Microcon Centrifugal Filter Devices termékei közül az YM-100 (Millipore, 42413) típusúval végeztük (2. melléklet).

### ***DNS-szekvenálás***

A felszaporított és tisztított PCR-termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany cég végezte térítéses megbízással. Az általuk alkalmazott szekvenálás a Sanger-féle módszeren alapszik (Sanger *et al.*, 1977), és az ABI cég által fejlesztett gépekkel végzik. A szekvenálás megbízhatóságát az ISO nemzetközi minőségbiztosítási szabvány (DIN EN ISO 9001:2000) garantálja.

### ***2.3. 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.

### **2.3.1. A filogenetikai elemzésekhez használt programok**

Az utóbbi években számos programcsaládot fejlesztettek ki filogenetikai elemzések céljából. Ezek közül a munkánk során alkalmazottak rövid ismertetésére szorítkoztam.

#### ***ClustalX***

A program elsődlegesen egy többszörös szekvenciarendező funkcióval ellátott program, mely nagyszámú nukleotid- illetve fehérjeszekvenciákkal egyaránt képes dolgozni. A program által létrehozott fájlok könnyen felismerhetők egyéb törzsfakészítő programok számára. A program megalkotói Thompson *et al.* (1997) voltak. A ClustalX egy ingyenes program, mely bárki számára hozzáférhető az alábbi web címen: <http://www.uk.plbio.kvl.dk/bioinfo.htm>

#### ***Genedoc***

A program szintén egy többszörös szekvenciaszerkesztő és -rendező program, amely lehetővé teszi, hogy a különböző programok – köztük a ClustalX – által készített összerendezéseket manuálisan finomítani tudjuk. Erre azért van szükség, mert a felhasználó megfelelő szakismeret birtokában gyakran tovább tudja optimalizálni a programok által készített összerendezést, és így megtalálni a legnagyobb homológiát a szekvenciák között. A program, melyet Nicholas *et al.* alkottak 1997-ben, szintén ingyenesen hozzáférhető bárki számára: <http://www.uk.plbio.kvl.dk/bioinfo.htm>

#### ***TreeView***

Egy egyszerű program filogenetikai törzsfák rajzolására és nyomtatására, melyhez a különböző törzsfakészítő programok adatait használja. A program a legtöbb analízishez használt fájlformátumot kezeli (Nexus és Phylip). A program alkotója Page (1996). Ez a program is ingyenes és a következő weboldaltól tölthető le: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

### ***Paup\****

A Paup\*4.0 (Swofford, 2000) jelenleg az elsőszámú törzsfakészítő program. A program a ClustalX, illetve a Genedoc által készített adatfájlokból dolgozik és többféle filogenetikai elemzés, köztük az általunk kiválasztott Maximum Parsimony és Maximum Likelihood analízis, elvégzésére is alkalmas. A PAUP\* a NEXUS fájlformátumot kezeli mind bemenő, mind kimenő adatként. Egy viszonylag olcsó, bárki számára elérhető programról van szó, mely a Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts szellemi tulajdona. A program megrendelhető és megvásárolható a következő honlapon: <http://paup.csit.fsu.edu/>

### ***MrBayes***

A MrBayes (Huelsenbeck, 2000), egy ún. bayesian megközelítésen alapuló filogenetikai törzsfakészítő program. A legújabb verziója a 3.1, amely számos új kiegészítést és javítást tartalmaz az előző verziókhöz képest. A program a Nexus formátumot kezeli bemenő adatként és egyaránt telepíthető Macintosh, Windows, és UNIX rendszerek alatt. A program letölthető a következő honlapon: <http://mrbayes.scs.fsu.edu/>

### ***Modeltest***

Posada és Grandall (1998) által kifejlesztett program, mely megadja azt a nukleotidszubsztitúciós modellt (evolúciós modellt), amely a legjobban megfelel az elemezni kívánt adatnak. A program 56 evolúciós modell közül választ, és 3 különböző típusú modell-szelekciós kritériumot alkalmaz: Hierarchical Likelihood Ratio Tests (HLRTs), Akaike Information Criterion (AIC), és Bayesian Information Criterion (BIC). A program ingyenesen letölthető a következő honlapról: <http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>

### 2.3.2. Maximum Likelihood analízis

Az evolúciós modellek tesztelését a Modeltest v.3.7 (Posada és Grandall, 1998) programmal végeztük és az Akaike Information Criterium (AIC), valamint a Hierarchical Likelihood Ratio Test (HLRT) tesztekkel használtunk a modellek kiválasztásához. Mindhárom esetben az AIC szerint választottuk meg az evolúciós modelleket. A filogenetikai elemzést a Paup\*4.0b programmal végeztük.

Az ITS-fragmentum elemzéséhez a GTR+I evolúciós modellt választottuk a következő paraméterekkel: az egyes bázisok gyakorisága (A=0,2987, C=0,2158, G=0,2482, T=0,2373), a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=0,5286, A-G=3,9034, A-T=1,5164, C-G=0,2882, C-T=0,9530, G-T=1,000), azonos eloszlásúak, állandó bázishelyek aránya 0,8475. A *tef1*-fragmentum elemzésekor a TVM+I+ $\Gamma$  evolúciós modell került kiválasztásra, ahol az egyes bázisok gyakorisága (A=0,1858, C=0,3062, G=0,2337, T=0,2744), a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,9115, A-G=3,4463, A-T=1,8477, C-G=1,7686, C-T=3,4463, G-T=1,000), gamma eloszlásúak, melynek alakparamétere 2,9239, az állandó bázishelyek aránya 0,3076. A  *$\beta$ -tubulin* fragmentum elemzéséhez a GTR+ $\Gamma$  evolúciós modellt választottuk, ahol az egyes bázisok gyakorisága (A=0,1883, C=0,3027, G=0,2686, T=0,2404), a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,7611, A-G=3,7036, A-T=3,0483, C-G=0,5541, C-T=9,8991, G-T=1,000), gamma eloszlásúak, melynek alakparamétere 0,3759, az állandó bázishelyek aránya 0. A bootstrap analízist nem végeztük el, mivel az egyetlen fa esetében is több hónapba került volna az általunk használt számítógépes rendszernek. A törzsfák megrajzolásához a TreeView (Page, 1966) programot használtuk.

### 2.3.3. Parsimony analízis

A Parsimony típusú filogenetikai elemzést a Paup\*4.0b programmal végeztük. A keresés során „branch swapping” típusú heurisztikus, Tree Bisection and Reconnection (TBR) stratégiájú újrendezést (TBR) alkalmaztunk. A TBR az jelenti, hogy a törzsfát két részre bontják, amelyeket majd ismét párosítanak egy újabb elágazáson keresztül. A folyamat az összes lehetséges elágazást számításba veszi, majd kiválasztja közülük a legvalószínűbbet. Az elemzés során minden egyes karaktert azonos súllyal vettünk figyelembe, az összerendezésben szereplő kihagyásokat (gap-eket) pedig hiányzó adatként kezeltünk. A törzsfá stabilitását bootstrap analízissel ellenőriztük 1000

ismétlést alkalmazva. A törzsfák megrajzolásához a TreeView (Page, 1966) programot használtuk.

#### 2.3.4. Bayesian analízis

Az evolúciós modellek tesztelését a Modeltest v.3.7 (Posada és Grandall, 1998) programmal végeztük Bayesian Information Criterium (BIC) tesztet alkalmazva.

Az ITS-fragmentum elemzéséhez a *TrNef+I* evolúciós modellt választottuk a következő paraméterekkel: az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=4,8974, A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=0,9815, G-T=1,000), azonos eloszlásúak, állandó bázishelyek aránya 0,8497.

A *tefl* fragmentum elemzésekor a *TrNef+I+Γ* evolúciós modell került kiválasztásra, ahol az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=1,5807, A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=2,8067, G-T=1,000), gamma eloszlásúak, melynek alakparamétere 2,8788, az állandó bázishelyek aránya 0,3015.

A *β-tubulin* fragmentum elemzéséhez a *TrNef+I* evolúciós modellt választottuk, ahol az egyes bázisok gyakorisága egyenlő, a 6 lehetséges szubsztitúció paraméterei (A-C=1,000, A-G=2,3500, A-T=1,000, C-G=1,000, C-T=7,9886, G-T=1,000), gamma eloszlásúak, melynek alakparamétere 0,4090, az állandó bázishelyek aránya 0. Az MCMC (Larget és Simon, 1999; Mau *et al.*, 1999) algoritmust a MrBayes (Huelsenbeck és Ronquist, 2001) programmal végeztük. Az algoritmust egymillió generáción keresztül futtattuk és minden századik törzsfát mintavételeztük.

Az egyes filogenetikai analízisekbe külső elemekként további fajok *tefl* (3. táblázat), ITS (4. táblázat) és *β-tubulin* (5. táblázat) szekvenciáit is bevontuk a törzsfák teljesebbé tétele végett. A szekvenciákat a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> honlapról töltöttük le. A *Didymella fabae* az *Ascochyta fabae* a *Didymella lentis* pedig az *Ascochyta lentis* teleomorf alakja (Kaiser *et al.*, 1997). A törzsfák elkészítéséhez a TreeView (Page, 1966) programot alkalmaztuk, melyet utólag a CorelDraw rajzoló program segítségével tettünk szemléletesebbé.



**3. táblázat** A *tefl* fragmentumok alapján készült filogenetikai törzsfa készítésébe külső csoportként bevont fajok és izolátumok listája, valamint *tefl* szekvenciájuk hozzáférési száma

Fajnév	Izolátum kód	GenBank hozzáférési számok
teleomorf: <i>Didymella pisi</i> anamorf: <i>Ascochyta pisi</i> (Chilvers <i>et al.</i> , 2008)	AP2	DQ386494
teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i> (Kaiser <i>et al.</i> , 1997)	SAT AL	AY831546
<i>Ascochyta fabae</i> f. sp. <i>viciae</i> (= <i>Ascochyta fabae</i> )	AV11	DQ386498
teleomorf: <i>Didymella lentis</i> anamorf: <i>Ascochyta lentis</i>	AL1	DQ386493
teleomorf: <i>Didymella fabae</i> anamorf: <i>Ascochyta fabae</i> (Kaiser <i>et al.</i> , 1997)	AF1	DQ386492
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831545

**4. táblázat** Az ITS-fragmentumok alapján készült filogenetikai törzsfa készítésébe bevont fajok és izolátumok listája, valamint ITS-szekvenciájuk hozzáférési száma

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

**5. táblázat** A  $\beta$ -*tubulin* fragmentumok alapján készült filogenetikai törzsfák készítésébe bevont fajok és izolátumok listája, valamint  $\beta$ -*tubulin* szekvenciájuk hozzáférési száma

Fajnév	Izolátum kód	GenBank hozzáférési számok
<i>Phoma pinodella</i>	CBS 318.90	AY831517
<i>Phoma pinodella</i>	WAC 7978	AY831511
<i>Phoma exigua</i>	WAC 7988	AY831509
<i>Phoma medicaginis</i>	CBS 316.90	AY831518
<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i>	P3	DQ109962
<i>Ascochyta lentis</i>	SAT AL	AY831508
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	WAC 6693	AY831513

### 3. Eredmények

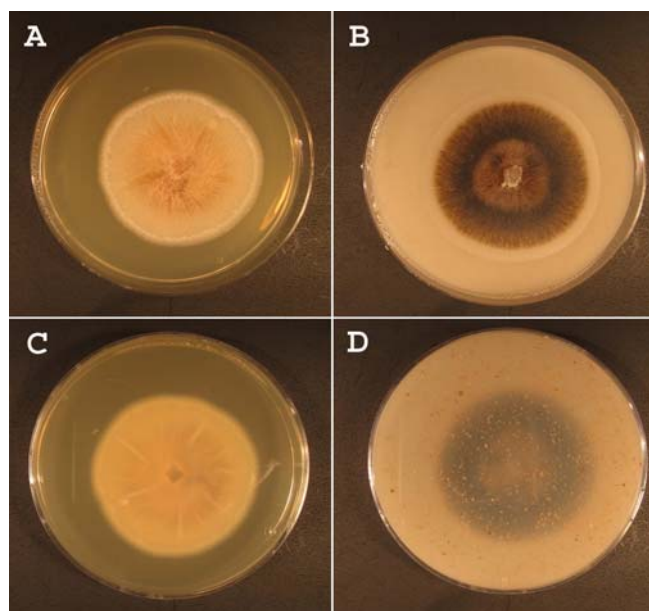
#### 3.1. Morfológiai vizsgálatok

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 figyeltünk meg.

##### 3.1.1. A *Phoma pinodella* D/035 izolátumának morfológiája

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 55–65 mm; a telep alakja szabályos, színe halványsárga-sárga, a szegély halványabb; a sugárirányú fonalasság kifejezett; a légmicélium vékony, szürkés, bársonyos; a telep fonáki nézete halványsárga-sárga (5/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 55–65 mm; a telep alakja szabályos, egyenletes körvonallal rendelkeznek; a telep színe közepen olíva, zöldes-olíva, a szegélynél halványabb; határozottan sugaras növekedésű; kevés légmicéliummal rendelkeznek; a telep fonáki nézete rendszerint sötét-olíva-szürke (5/B, D ábra).

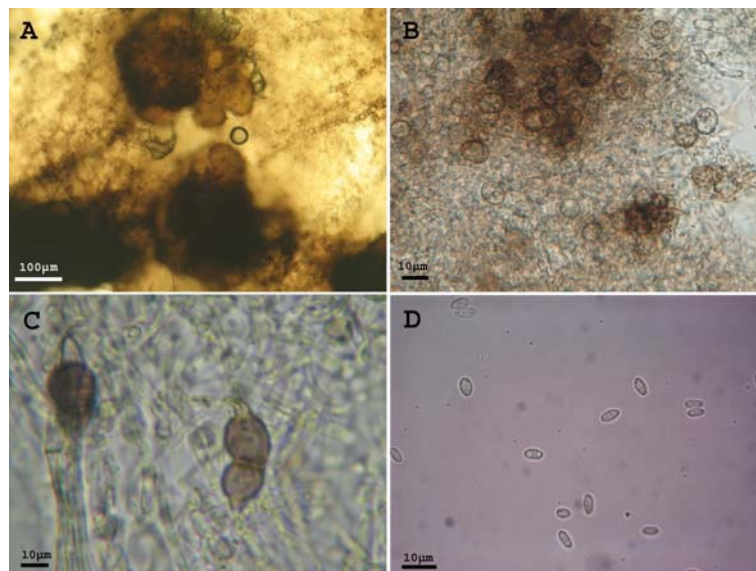


5. ábra A *Phoma pinodella* D/035 izolátumának tenyészetei malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

Piknídiumok is bőségesen képződnek; színük fekete, felszínük csupas�, magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan; osztiólummal rendelkeznek; 100–250  $\mu\text{m}$  nagyságúak; a piknídium fala 4–6 rétegű, pszeudoparenchimatikus, szögletes sejtekből áll (6/A ábra).

Klamidospórák bőségesek, magányosak vagy láncokat alkotnak, interkalárisan vagy terminálisan keletkeznek, alakjuk gömbölyű vagy hengeres, méretük: 10–20 x 10–20  $\mu\text{m}$  (6/B, C ábra).

A bőségesen keletkező konídiumok egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, színük hialin vagy fehéres, alakjuk kerekded-ellipszoid; méretük nagyon változatos: átlagosan 4,4–6,9 x 2,5–3,6  $\mu\text{m}$  (6/D ábra). A NaOH-próba negatív, és kristályképződést nem figyeltünk meg.

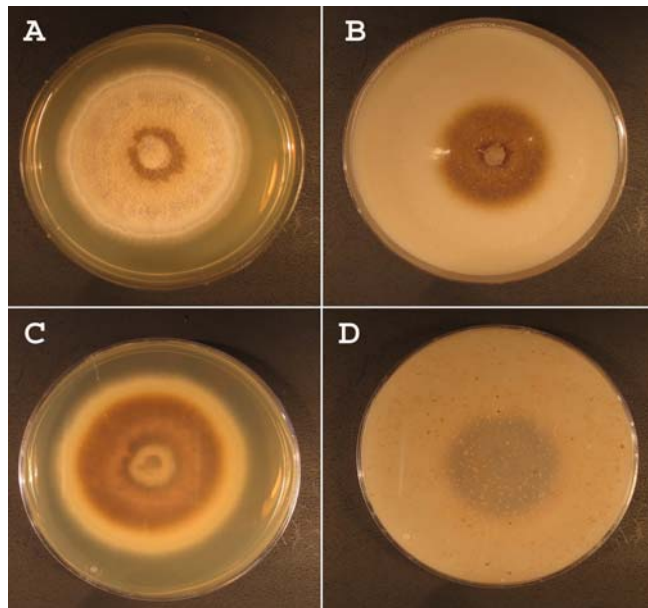


6. ábra A *Phoma pinodella* D/035 izolátumának (A) piknídiuma (obj.:10x), (B) klamidospóriái (obj.:10x, C obj.:40x) és konídiumai (D, obj.:100x)

### 3.1.2. A *Phoma pinodella* CBS 318.90 izolátumának morfológiája

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 52–55 mm; a telep alakja szabályos, színe közepen olíva vagy olíva-szürke, a szegély halványabb; a sugárirányú fonalasság kifejezett; a légmicélium vékony, szürkés, bársonyos; a telep fonáki nézete olíva (7/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 50–65 mm; a telep alakja szabályos, folytonos körvonallal rendelkezik; színe olíva-zöld, olíva-sárga vagy olíva színű, a szegélynél halványabb, sárgás; határozottan sugaras növekedésű; kevés légmicéliummal rendelkezik; a telep fonáki nézete rendszerint sötétebb olíva-szürke (7/B, D ábra).

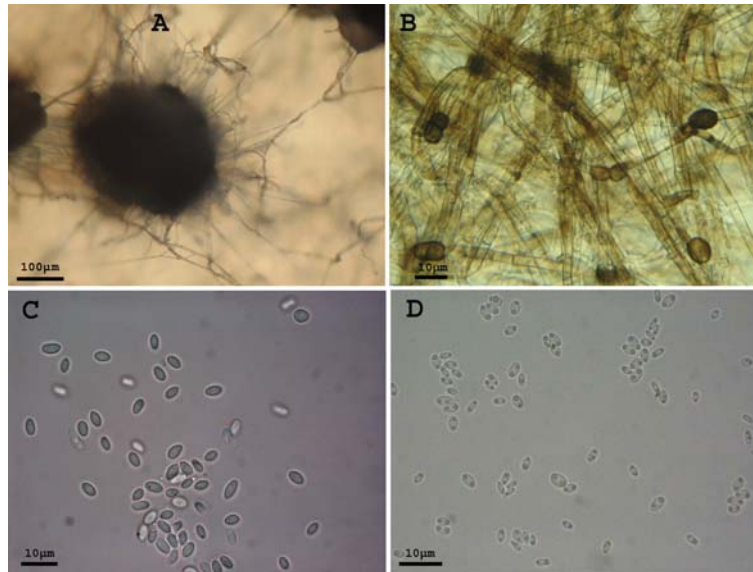


**7. ábra** A *Phoma pinodella* CBS 318.90 izolátumának tenyésztési malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

Piknídiumok bőségesen keletkeznek, általában koncentrikus gyűrűkben, de a légmicéliumban és az agarban elszórtan is megtalálhatók; színük fekete, felszínük csupasz, magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan; osztiólummal rendelkeznek; 100–300  $\mu\text{m}$  nagyságúak; a piknídiumok fala 4–6 rétegű, pszeudoparenchimatikus, szögletes sejtek építik fel (8/A ábra).

Klamidospórák bőségesen képződnek interkalárisan vagy terminálisan, magányosak vagy láncokban keletkeznek, alakjuk gömbölyű vagy hengeres, méretük: 8–20 x 8–15  $\mu\text{m}$  (8/B ábra).

A bőségesen keletkező konídiumok egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, színük hialin vagy fehér, alakjuk kerekded-ellipszoid; méretük nagyon változó: átlagosan 4,7–7,4 x 2,5–3,4  $\mu\text{m}$  (8/C, D ábra). A NaOH-próba negatív és kristályképződést nem figyeltünk meg.



**8. ábra** A *Phoma pinodella* CBS 318.90 izolátumának piknídiuma (A, obj.:10x), klamidospórái (B, obj.:16x) és konídiumai (C, D, obj.:100x)

### 3.1.3. A *Phoma pinodella* D/095 izolátumának morfológiája

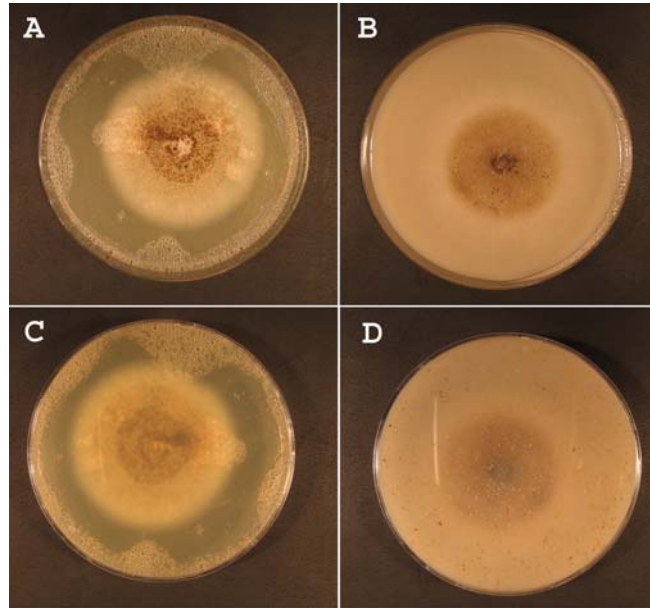
**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 52–55 mm; a telep közepén olíva vagy olíva-szürke, a szegély halványabb, fehéres színű; a sugárirányú fonalasság kifejezett; a légmicélium vékony, szürkés, bársonyos; a telep fonáki nézete olíva, olíva-sárga színű (9/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 50–60 mm; a telep szabályos, egyenletes körvonallal rendelkezik; olíva-sárga vagy olíva színű, a szegélynél halványabb; határozottan sugaras növekedésű; kevés légmicéliummal rendelkezik; a telep fonáki nézete olíva, olíva-szürke (9/B, D ábra).

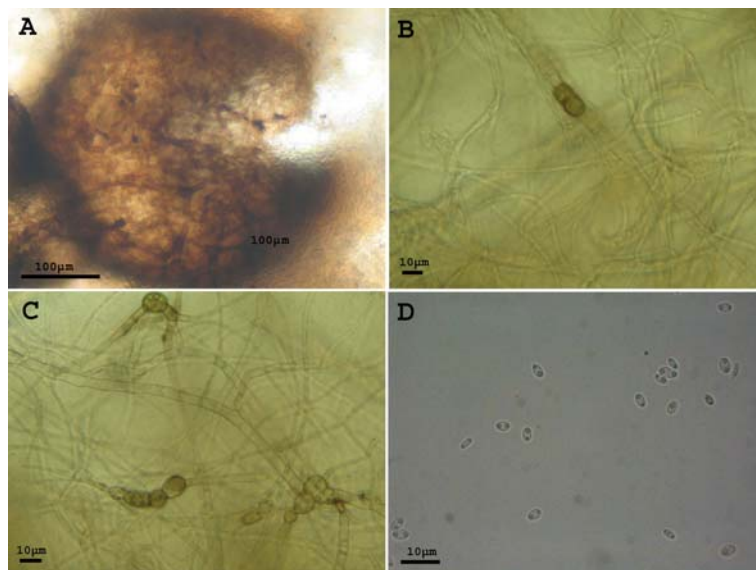
Piknídiumok nagy számban keletkeznek, általában koncentrikus gyűrűkben, de a légmicéliumban és az agarban elszórtan is képződnek; színük fekete, felszínük csupasz, magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan; osztóiólummal rendelkeznek; 100–275 µm nagyságúak; a piknídiumok fala 4–6 rétegű, pszeudoparenchimatikus, szögletes sejtek alkotják (10/A ábra).

Klamidospórák bőségesen képződnek interkalárisan vagy terminálisan, magányosak vagy láncokban keletkeznek, alakjuk gömbölyű vagy hengeres, méretük: 7–18 x 7–14 µm (10/B, C ábra).

A bőségesen keletkező konídiumok egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, színük hialin vagy fehér, alakjuk kerekded-ellipszoid; méretük rendkívül változó: átlagosan 4,6–7,3 x 2,4–3,7 µm (10/D ábra). A NaOH-próba negatív, és kristályképződést sem figyeltünk meg.



**9. ábra** A *Phoma pinodella* D/095 izolátumának tenyésztési malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

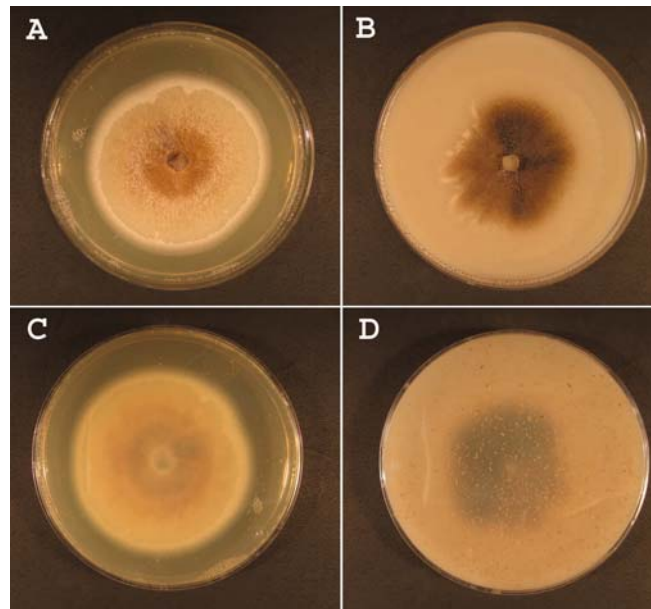


**10. ábra** A *Phoma pinodella* D/095 izolátumának piknidiuma (A, obj.:10x), klamidospórái (B, C, obj.:16x) és konídiumai (D, obj.:100x)

### 3.1.4. A *Phoma pinodella* PD 82/550 izolátumának morfológiája

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 56–62 mm; a telep alakja szabályos, színe közepesen sárgás, olíva-sárga, olíva-barna, a szegély halványabb, sárgás-fehér, fehér; a sugárirányú fonalasság kifejezett; a légmicélium vékony, szürkés, bársonyos; a telep fonáki nézete olíva-sárga (11/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 58–68 mm; a telep alakja szabályos, egyenletes körvonallal rendelkeznek; színe barnás-olíva vagy olíva, a szegélynél halványabb; határozottan sugaras növekedésű; kevés légmicéliummal rendelkezik; a telep fonáki nézete halvány olíva, olíva-szürke (11/B, D ábra).



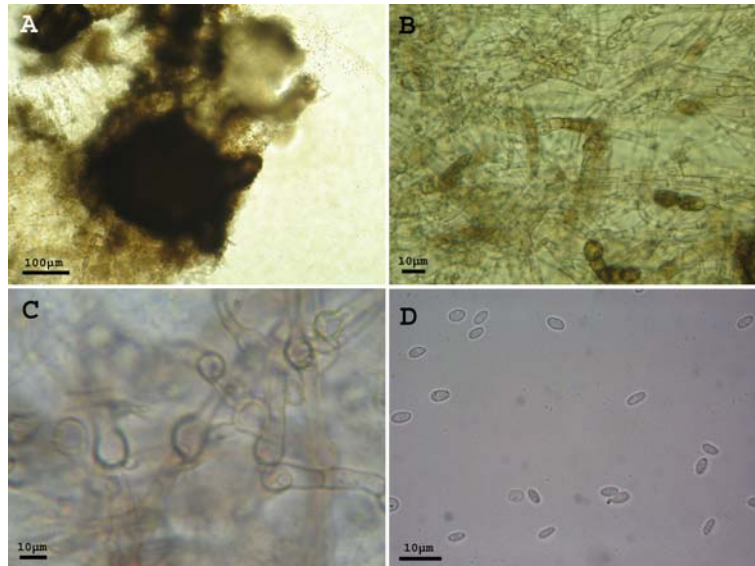
**11. ábra** A *Phoma pinodella* PD 82/550 izolátumának tenyésztési malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

Piknídiumok bőségesen keletkeznek, általában koncentrikus gyűrűkben, de a légmicéliumban és az agarban elszórtan is képződnek; színük fekete, felszínük csupasz, magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan; osztóólummal rendelkeznek; 100–290  $\mu\text{m}$  nagyságúak; a piknídiumok fala 4–6 rétegű, pseudoparenchimatikus, szögletes sejtek alkotják (12/A ábra).

Klamidospórák bőségesen képződnek interkalárisan vagy terminálisan, magányosak vagy láncokban keletkeznek, alakjuk gömbölyű vagy hengeres, méretük: 10–20 x 10–15  $\mu\text{m}$  (12/B, C ábra).



A bőségesen keletkező konídiumok egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, hialinok vagy fehéres színűek, alakjuk kerekded-ellipszoid; méretük nagyon variábilis: átlagosan 4,1–7,1 x 2,4–3,6  $\mu\text{m}$  (12/D ábra). A NaOH-próba negatív, és kristályképződést sem figyeltünk meg.

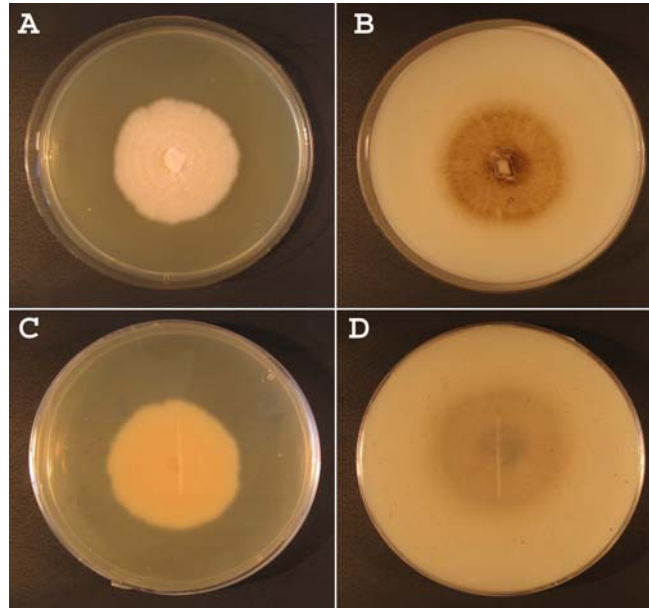


**12. ábra** A *Phoma pinodella* PD 82/550 izolátumának piknidiuma (A, obj.:10x), klamidospórái (B obj.:16x, C, obj.:40x) és konídiumai (D, obj.:100x)

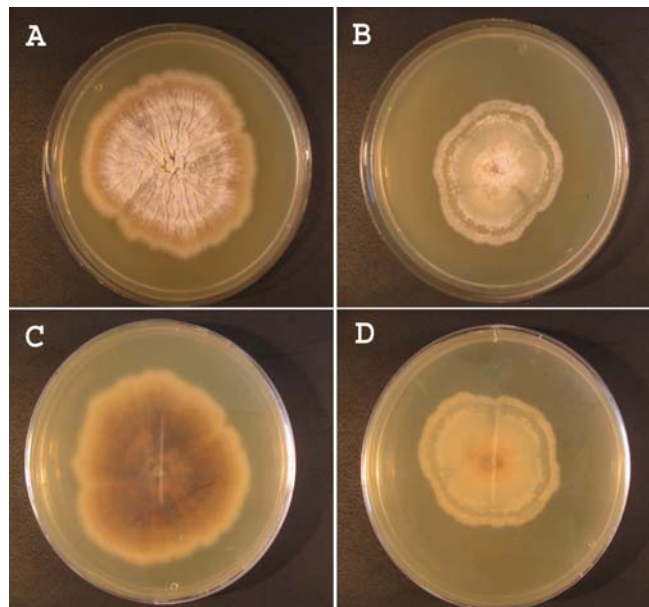
### 3.1.5. A *Phoma pinodella* PD 77/165 izolátumának morfológiája

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 50–55 mm; a telep alakja változatos megjelenésű: színe fehér, sárgás-fehér (13/A ábra), őzbarna, vagy barnás-sárga (14/A, B ábra), pelyhes szegéllyel (nagyon változatos); a sugárirányú fonalasság kifejezett; a légmicélium vékony, szürkés, bársonyos; a telep fonáki nézete szintén fehér (13/C ábra), barnás-fehér, a szélénél fehéredő (14/C ábra) esetenként barna gyűrűvel rendelkező (14/D ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 60–65 mm; a telep szabályos alakú, változatos megjelenésű, egyenletes körvonallal rendelkezik; színe olíva-zöld, olíva-sárga vagy olíva, a szegélynél halványabb; határozottan sugaras növekedésű; kevés légmicéliummal rendelkezik; a telep fonáki nézete halvány-olíva (13/B, D ábra).



**13. ábra** A *Phoma pinodella* PD 77/165 izolátumának tenyészteti malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

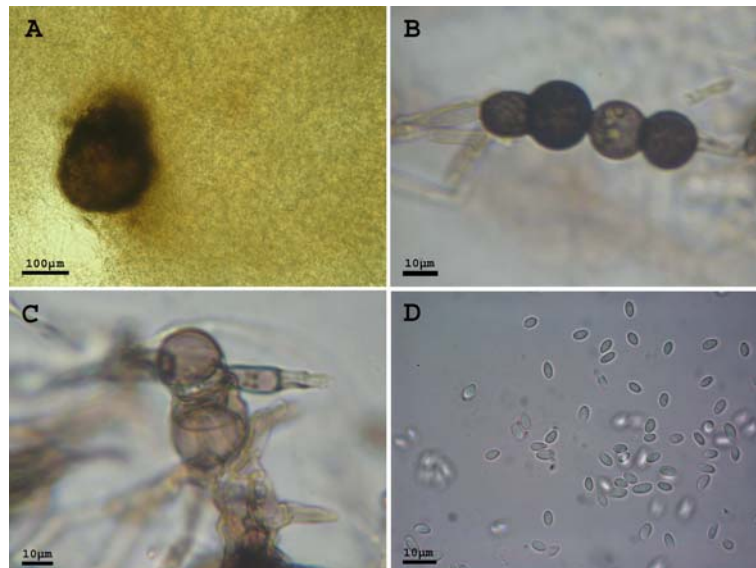


**14. ábra** A *Phoma pinodella* PD 77/165 izolátumának további 2 tenyésztete azonos körülmények között malátakivonat agar táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

Piknídiumok nagy számban keletkeznek általában koncentrikus gyűrűkben, de a légmicéliumban és az agarban elszórtan is elhelyezkedhetnek; fekete színűek, felszínük csupasz, magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan; rendelkeznek osztiólummal; 100–240  $\mu\text{m}$  nagyságúak; a piknídiumok fala 4–6 rétegű, pszeudoparenchimatikus, szögletes sejtekből áll (15/A ábra).

Klamidospórák bőségesen képződnek interkalárisan vagy terminálisan, magányosak vagy láncokat alkotnak, alakjuk gömbölyű vagy hengeres, méretük: 10–22 x 8–17  $\mu\text{m}$  (15/B, C ábra).

A bőségesen keletkező konídiumok egysejtűek, ritkán egy válaszfalúak, színük hialin vagy fehér, alakjuk kerekded-ellipszoid; méretük nagyon variábilis: átlagosan 4,2–6,7 x 2,5–3,4  $\mu\text{m}$  (15/D ábra). A NaOH-próba negatív, kristályképződést nem figyeltünk meg.

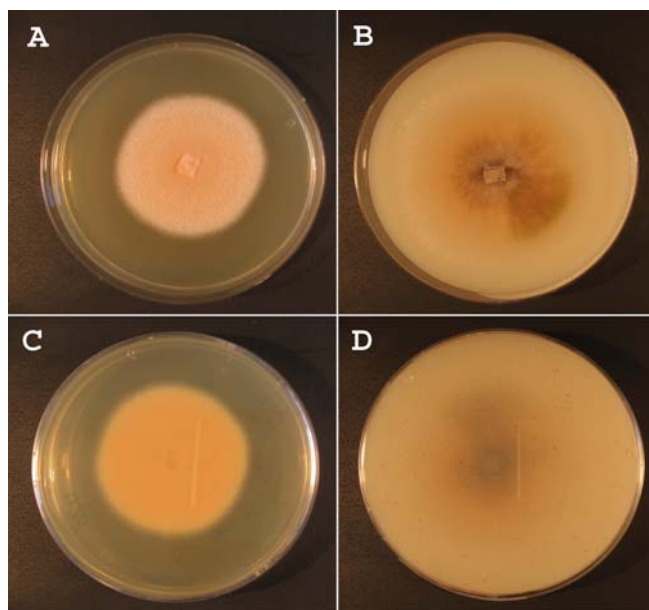


**15. ábra** A *Phoma pinodella* PD 77/165 izolátumának piknidiuma (A, obj.:10x), klamidospórái (B obj.:16x, C, obj.:40x) és konídiumai (D, obj.:100x)

### 3.1.6. A *Phoma sojicola* PD98/1135 izolátumának morfológiája

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 50–58 mm; a telep alakja szabályos, színe fehéres vagy szürkés-olíva, olíva-zöld; a légmicélium halvány olíva-szürke; a telep fonáki nézete fehéres, sárgás-fehér (16/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 55–70 mm; a telep alakja szabályos, színe fehéres vagy halvány olíva-szürke, olíva-zöld szektorokkal, gyakran erős szürke szegéllyel; a légmicélium gyengén fejlett, bársonyos szürke; a telep fonáki nézete hasonló (16/B, D ábra).

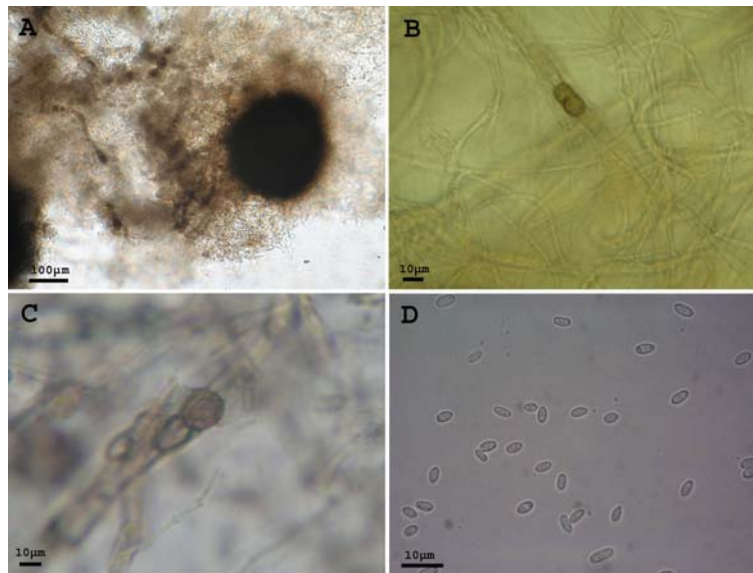


**16. ábra** A *Phoma sojaicola* PD98/1135 izolátumának tenyésztési maláta kivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

A piknidiumok elsősorban a telep széle mentén és/vagy a szektorokban képződnek az agar felszínén vagy az agarba süppedve; színük sötétbarna vagy fekete; vékonyfalúak, magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan; egy vagy több osztólummal rendelkeznek; nagyságuk 80–250  $\mu\text{m}$  (17/A ábra).

A klamidospórák magányosak vagy láncokban keletkeznek interkalárisan vagy terminálisan, vékony falúak, zöldes vagy szürke-olíva színűek; alakjuk gömbölyű vagy hengeres; nagyságuk 8–16 x 7–8  $\mu\text{m}$  (17/B, C ábra).

A konídiumok (*in vitro* tenyésztésben) alakja ovális-ellipszoid, elsősorban egysejtűek ritkán egy válaszfallal rendelkeznek, hialinok, vékony sejtfallal rendelkeznek, méretük nagyon változó: 5,2–7,2 x 2,0–3,5  $\mu\text{m}$  (17/D ábra). A NaOH-próba negatív, és kristályképződést nem figyeltünk meg.



17. ábra A *Phoma sojaicola* PD98/1135 izolátumának piknidiuma (A, obj.:10x) klamidospórái (B obj.:16x, C, obj.:40x) és konídiumai (D, obj.:100x)

### 3.1.7. A *Phoma sojaicola* PD 97/2160 izolátumának morfológiája

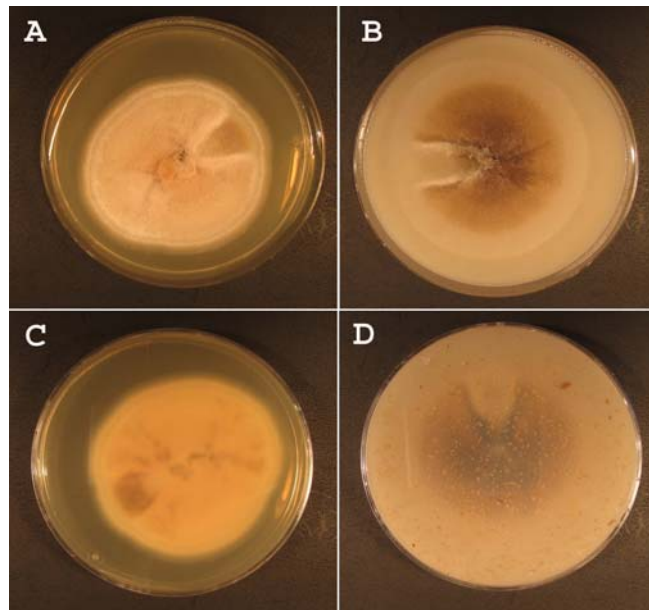
**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 55–65 mm; a telep alakja szabályos, olíva-szürke, olíva-zöld színű szektorokkal; a légmicélium halvány olíva-szürke; a telep fonáki nézete fehéres, sárgás-fehér vagy olíva-szürke (18/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 55–60 mm; a telep alakja szabályos, színük fehéres vagy halvány olíva-szürke, olíva, gyakran erős olíva-szürke szegéllyel; a légmicélium gyengén fejlett, bársonyos-szürke; a telep fonáki nézete hasonló (18/B, D ábra).

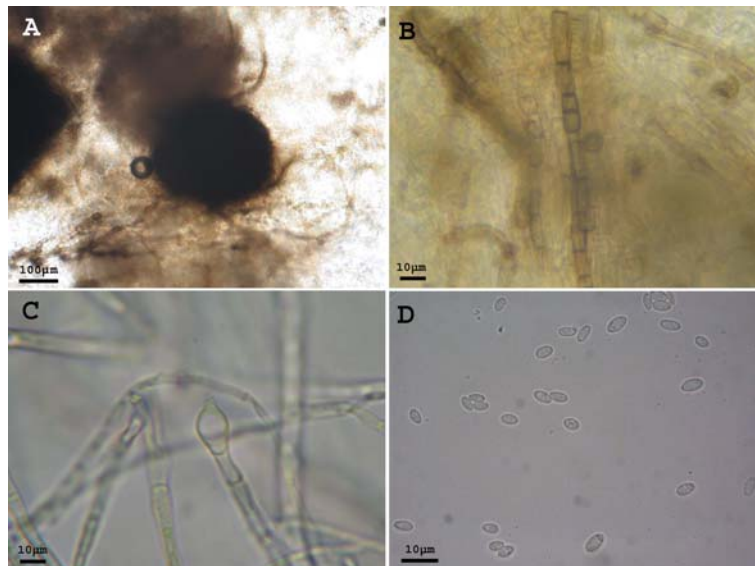
A piknidiumok elsősorban a telep széle mentén és/vagy a szektorokban képződnek az agar felszínén vagy az agarba süppedve; színük sötétbarna vagy fekete; vékonyfalúak; magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; alakjuk gömbölyű vagy szabálytalan; egy vagy több osztólummal rendelkeznek; nagyságuk 100–270 µm (19/A ábra).

A klamidospórák magányosak vagy láncokban keletkeznek interkalárisan vagy terminálisan, vékony falúak, olíva-szürke vagy olíva-zöld színűek; alakjuk gömbölyű vagy hengeres; nagyságuk 7–15 x 7–15 µm (19/B, C ábra).

A konídiumok (*in vitro* tenyészetben) alakja ovális-ellipszoid, elsősorban egysejtűek ritkán egy válaszfallal rendelkeznek, hialinok, vékony sejtfallal rendelkeznek, méretük nagyon változó: 4,8–8,1 x 2,0–3,3 µm (19/D ábra). A NaOH-próba negatív, és kristályképződést sem figyeltünk meg.



18. ábra A *Phoma sojaicola* PD 97/2160 izolátumának tenyészteti malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

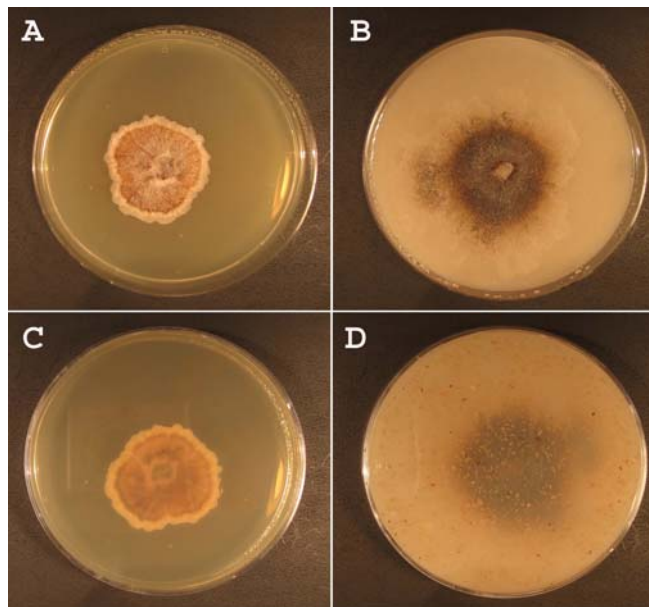


19. ábra A *Phoma sojaicola* PD 97/2160 izolátumának piknidiuma (A, obj.:10x) klamidospórái (B, obj.:16x, C, obj.:40x) és konídiumai (D, obj.:100x)

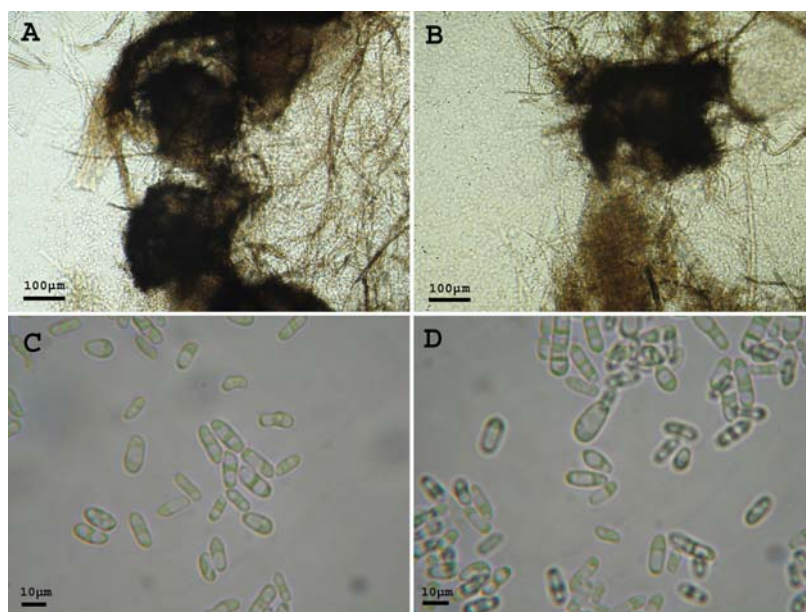
### 3.1.8. A *Phoma exigua* var. *exigua* D/075 izolátumának morfológiája

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 25–50 mm, nagyon változó; a telep alakja szabálytalan, jellegzetesen csipkézett vagy lebenyes; színe fehérestől olíva-szürkéig – olíva-barnáig változó, barnás-sárga szegéllyel; a légmicélium fehéres, olíva-szürke, gyapjas; a telep fonáki része olíva-szürke, olíva-barna (20/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 50–55 mm, nagyon változó; a telep szabálytalan alakú, lapos és tömött; olíva-szürke, olíva-barna, a szegéllynél fehér színű vagy hialin; a telepek közepén légmicélium képződik, melynek színe fehér vagy olíva-szürke, finomon pelyhes; a telep fonák része hasonló (20/B, D ábra).



**20. ábra** A *Phoma exigua* var. *exigua* D/075 izolátumának tenyészteti malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete



**21. ábra** A *Phoma exigua* var. *exigua* D/075 izolátumának piknidiuma (A, obj.:10x), osztióluma kiáramló spróatömeeggel (B, obj.:10x) és konidiumai (C, D, obj.:100x)

A piknídiumok ritkák, szórt elhelyezkedésűek, részben az agarba süppedtek; olíva vagy olíva-fekete színűek, általában gömbölyűek, csupaszok; magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; osztiólummal rendelkeznek; nagyságuk és alakjuk változatos, 75–150 µm (21/A, B ábra).

A konídiumok hialinok; ovális ellipszoid alakúak; általában egysejtűek, de előfordulnak kétsejtű konídiumok is; méretük nagyon változó, átmérőjük általában 6,5–11 x 2,5–3,5 µm (21/C, D ábra).

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.

### **3.1.9. A *Phoma exigua* var. *exigua* D/077 izolátumának morfológiája**

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 50–60 mm, nagyon változó; a telep alakja szabálytalan vagy szabályos, jellegzetesen csipkézett vagy lebenyes; színe fehérestől olíva szürkéig – olíva-barnáig változó, barnás-sárga szegéllyel; a légmicélium színe fehéres vagy olíva-szürke, gyapjas; a telep fonáki része olíva-szürke, fehér (22/A, C ábra).

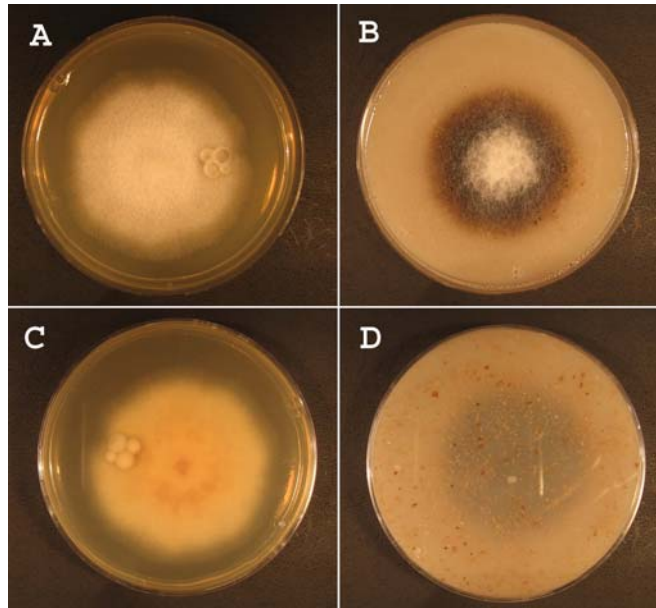
**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 55–70 mm, nagyon változó; a telep alakja szabályos, lapos és tömött; olíva-szürke, olíva-barna vagy olíva-fekete, a szegély színe fehér vagy hialin; a telepek közepén található, bőségesen képződő légmicélium színe fehér vagy olíva-szürke, finomon pelyhes; a telep fonáki része hasonló (22/B, D ábra).

A piknídiumok ritkák, szórt elhelyezkedésűek, részben az agarba süppedtek; színük olíva vagy olíva-fekete, alakjuk általában gömbölyű, felszínük csupasz; magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; osztiólummal rendelkeznek; nagyságuk és alakjuk változatos, 100–200 µm (23/A, B ábra).

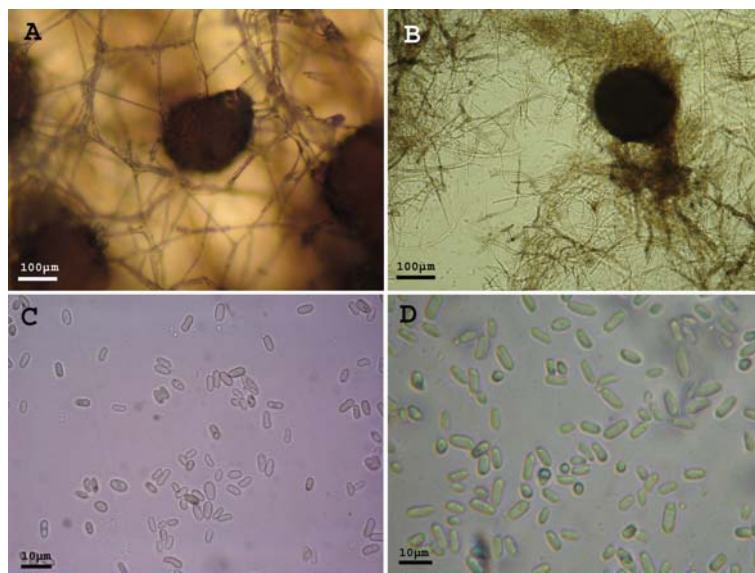
A konídiumok hialinok; ovális-ellipszoid alakúak; egysejtűek; méretük nagyon változó, átmérőjük általában 6,8–11,2 x 2,7–3,6 µm (23/C, D ábra).

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.





**22. ábra** A *Phoma exigua* var. *exigua* D/077 izolátumának tenyészeteti malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete



**23. ábra** A *Phoma exigua* var. *exigua* D/077 izolátumának piknidiuma (A, obj.:10x), osztióluma kiáramló spóratömeggel (B, obj.:40x) és konídiumai (C, D, obj.:100x)

### 3.1.10. A *Phoma exigua* var. *exigua* Ph 58 izolátumának morfológiája

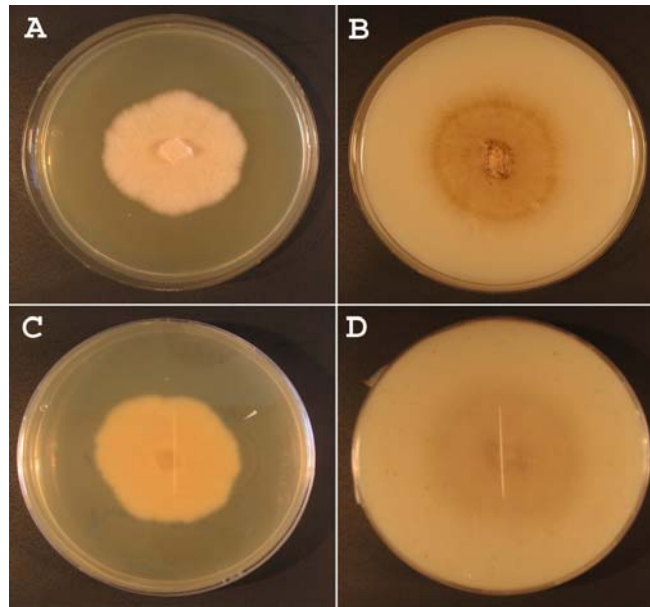
**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 45–55 mm, nagyon változó; a telep alakja szabályos; színe fehérestől olíva-szürkéig – olíva-barnáig változó, barnás-sárga szegéllyel; a légmicélium színe fehéres vagy olíva-szürke, gyapjas; a telep fonáki része olíva-szürke, olíva-sárga (24/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 55–65 mm, nagyon variábilis; a telep alakja szabályos, lapos és tömött; színe olíva-szürke, olíva-barna, a szegélynél fehér színű vagy hialin; a telepek közepén légmicélium képződik, melynek színe olíva-szürke vagy olíva-barna, finoman pelyhes; a telep fonáki része hasonló (24/B, D ábra).

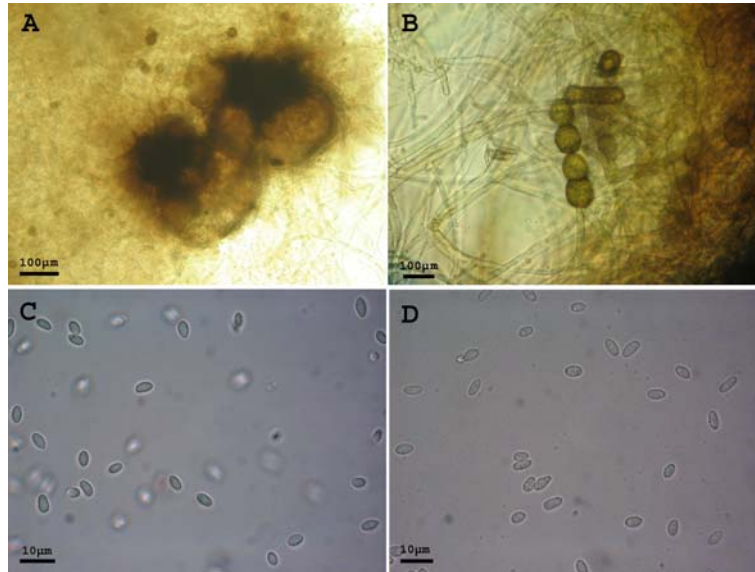
A piknidiumok ritkák, szórt elhelyezkedésűek, részben az agarba süppedtek; olíva vagy olíva-fekete színűek, alakjuk általában gömbölyű, felszínük csupasz; magányosan vagy csoportosan fordulnak elő; rendelkeznek osztiólummal; nagyságuk és alakjuk változatos, 90–150  $\mu\text{m}$  (25/A ábra).

Klamidospórák bőségesen képződnek, interkalárisan vagy terminálisan, magányosan vagy láncokban, alakjuk gömbölyű vagy hengeres, méretük: 10–15 x 7,5–12,5  $\mu\text{m}$  (25/B ábra). A konídiumok hialinok; alakjuk ovális-ellipszoid; egysejtűek; méretük nagyon változó, átlagos méretük 5–7,5 x 2,5–4,5  $\mu\text{m}$  (25/C, D ábra).

A NaOH-próba pozitív. Egy csepp NaOH felcseppentése után az agar kékes-zöld elszíneződése fokozatosan barnás-vörössé válik. Kristályképződés nem figyelhető meg.



**24. ábra** A *Phoma exigua* var. *exigua* Ph 58 izolátumának tenyészteti malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete



**25. ábra** A *Phoma exigua* var. *exigua* Ph 58 izolátumának piknídiumai (A, obj.:10x) klamidospórái (C, obj.: 40x) és konídiumai (C, D, obj.:100x)

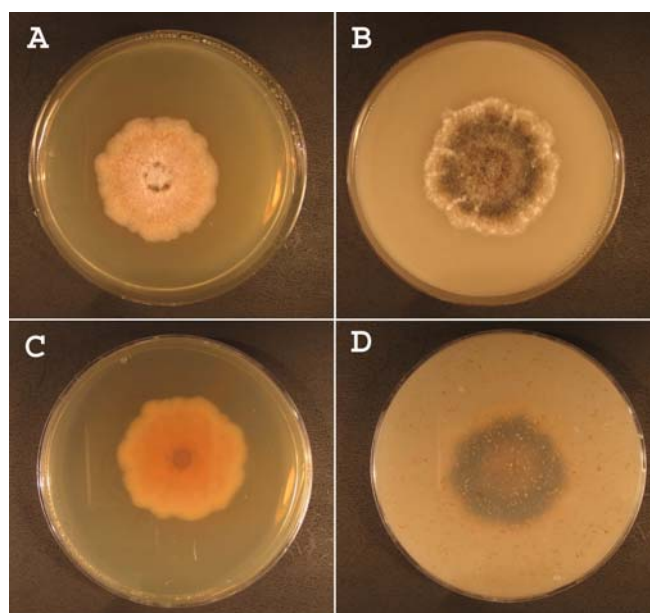
### 3.1.11. A *Phoma exigua* var. *linicola* D/071 izolátumának morfológiája

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 35–40 mm, nagyon változó; a telep alakja szabálytalan, jellegzetesen csipkézett vagy lebenyes; színe fehérestől olíva-szürkéig – olíva-barnáig változó, barnás-sárga szegéllyel; a légmicélium színe fehéres, olíva-szürke, gyapjas; a telep fonáki része olíva-szürke, olíva-barna (26/A, C ábra).

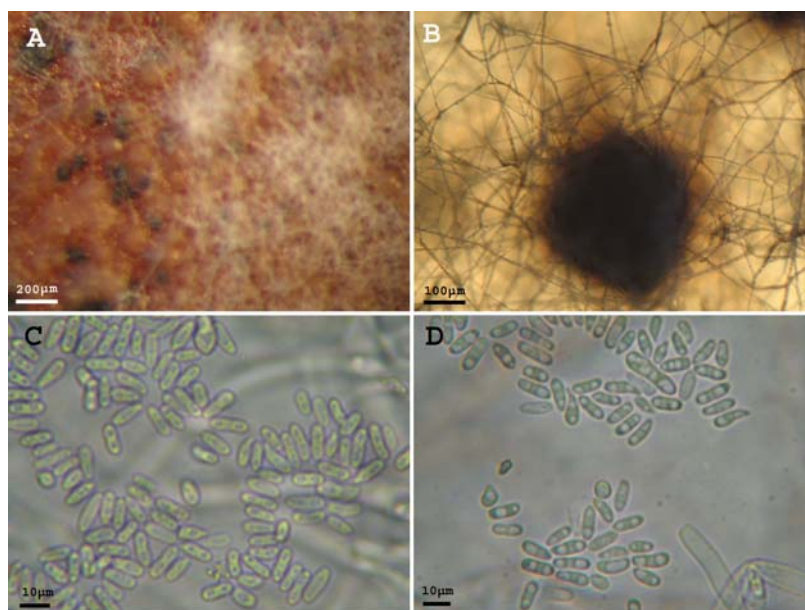
**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 35–40 mm, nagyon változatos; a telep alakja szabálytalan, lapos és tömött; színe olíva-szürke, olíva-barna, a szegélynél fehér vagy olíva-szürke; a telepek közepén képződő légmicélium, olíva-szürke vagy olíva-barna színű, finomon pelyhes; a telep fonáki része hasonló (26/B, D ábra). A piknídiumok ritkák, szórt elhelyezkedésűek, részben az agarba süppedtek; színük olíva vagy olíva-fekete, alakjuk általában gömbölyű, felszínük csupas; magányosak vagy csoportosan fordulnak elő; osztiólummal rendelkeznek; nagyságuk és alakjuk változatos, 75–125 μm (27/A, B ábra).

A konídiumok hialinok; alakjuk ovális-ellipszoid; méretük nagyon változó, átlagos méretük 7–12 x 3–4,2 μm, míg a kétsejtű, szeptált konídiumok mérete 10–15 x 4–5 μm (27/C, D ábra).

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.



26. ábra A *Phoma exigua* var. *linicola* D/071 izolátumának tenyésztési malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete

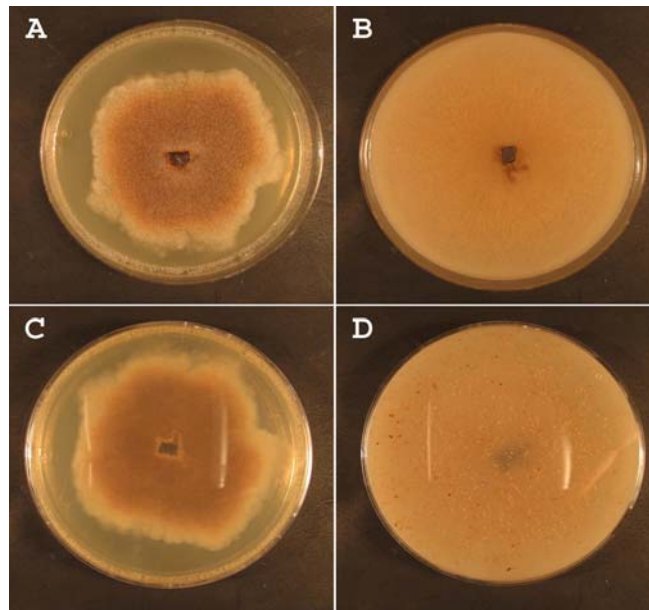


27. ábra A *Phoma exigua* var. *linicola* D/071 izolátumának piknidiumai (A, B, obj.:10x, ill., obj.:20x) és konídiumai (C, D, obj.:100x)

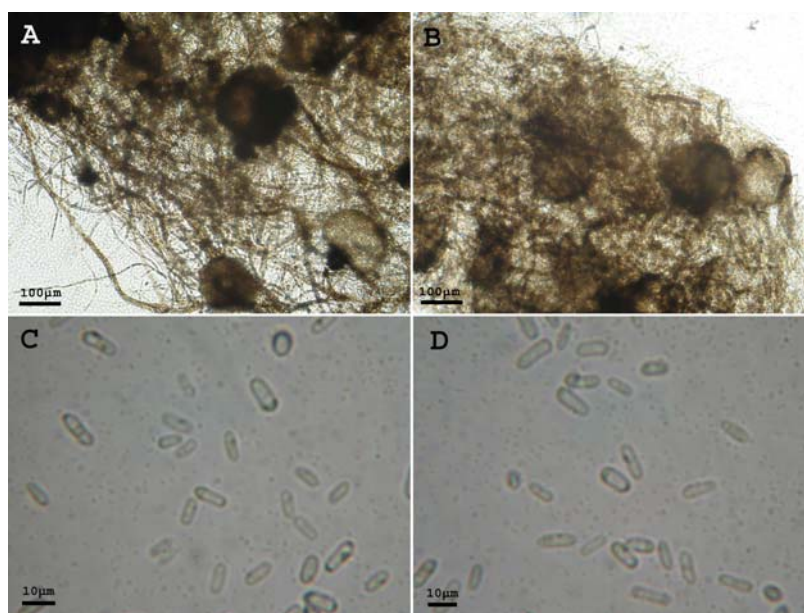
### 3.1.12. A *Phyllosticta sojicola* D/050 izolátumának morfológiája

**Malátakivonat agaron (MA):** a növekedési ráta: 58–62 mm; a telep alakja szabálytalan; barnás-sárga vagy okkersárga színű, hialin vagy fehér szegéllyel, a fonák hasonló; a légmicélium hialin vagy fehéres színű (28/A, C ábra).

**Zabliszt agaron (OA):** a növekedési ráta: 63–67 mm; a telep alakja szabályos, széle alig látható, színe hialin vagy halvány okkersárga, fonáki nézete hasonló; légmicéliuma nincs (28/B, D ábra).



**28. ábra** A *Phyllosticta sojicola* D/050 izolátumának tenyészteti malátakivonat agar (A, C) és zabliszt agar (B, D) táptalajon. A és B a telepek felülnézete, C és D a telepek fonáki nézete



**29. ábra** A *Phyllosticta sojicola* D/050 izolátumának piknidiumai (A, B, obj.:10x) és konídiumai (C, D, obj.:100x)

A piknídiumok az agarban bőségesen, elszórtan keletkeznek; alakjuk gömbölyű, színük általában sötétbarna vagy fekete; felszínük csupasz, vékonyfalúak, néha papilláltak, osztiólummal rendelkeznek; méretük átlagosan: 110–140 µm (29/A, B ábra).

A konídiumok hialinok, mindkét végükön lekerekítettek, közepén befűződők, gyakran szemcsék figyelhetők meg bennük; méretük átlagosan: 6,5–10 x 2,5–3,5 µm (29/C, D ábra). Klamidospórák nem képződnek. A NaOH-próba negatív, és kristályképződés sem figyelhető meg.

Az egyes vizsgálatba vont tenyészetek morfológiai sajátosságait a 6. táblázat adatai tartalmazzák. Az összeállítás a legjellemzőbb bélyegek és méretek alapján készült. Azoknál az izolátumoknál ahol a faji hovatartozás kérdéses (*Phoma sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua* Ph 58, *Phyllosticta sojicola*) az összehasonlításban az eredeti besorolást alkalmaztuk.

6. táblázat Az egyes *Phoma*-szerű fajok morfológiai jellemzőinek összehasonlítása

	Fajnév és izolátum	Piknídium	Konídium	Klamido spóra	Kristály képződés	NaOH teszt
I.	<i>Phoma pinodella</i> (D/035, PD 82/550, PD 77/165, D/095, CBS 318.90)	Felszínük csupasz, méretük: 100–300µm	Többségében válaszfal nélküliek, néha egy-két szeptum található, méretük: 4–8 x 2–3,5 µm	Egysejtű méretük: 8–20 x 7–20 µm	Nincs	Negatív
II.	<i>Phoma sojicola</i> (D/054, PD 97/2160)	Felszínük csupasz, méretük: 80–270 µm	Többségében válaszfal nélküliek, néha egy-két szeptum található, méretük: 6,5–12 x 2,5–5 µm	Egysejtű méretük 8–16 x 7–8 µm	Nincs	Negatív
III.	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> (D/075, D/077)	Felszínük csupasz, méretük: 75–200 µm	Többségében válaszfal nélküliek, néha egy-két szeptum található, méretük: 3–10 x 1,5–2,5 µm	Nem képződik	Nincs	Pozitív
IV.	<i>Phoma exigua</i> var. <i>linicola</i> (D/071)	Felszínük csupasz, méretük: 75–125 µm	Többségében válaszfal nélküliek, néha egy-két szeptum található, méretük: 7–12 x 3–4,2 µm	Nem képződik	Nincs	Pozitív
V.	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> (Ph 58)	Felszínük csupasz, méretük: 90–150 µm	Többségében válaszfal nélküliek, néha egy-két szeptum található, méretük: 5–7,5 x 2,5–4,5 µm	Egysejtű méretük: 10–15 x 7,5–12,5 µm	Nincs	Pozitív
VI.	<i>Phyllosticta sojicola</i> (D/050)	Felszínük csupasz, méretük: 110–140 µm	Többségében válaszfal nélküliek, néha egy-két szeptum található, méretük 6,5–10 x 2,5–3,5 µm	Nem képződik	Nincs	Negatív

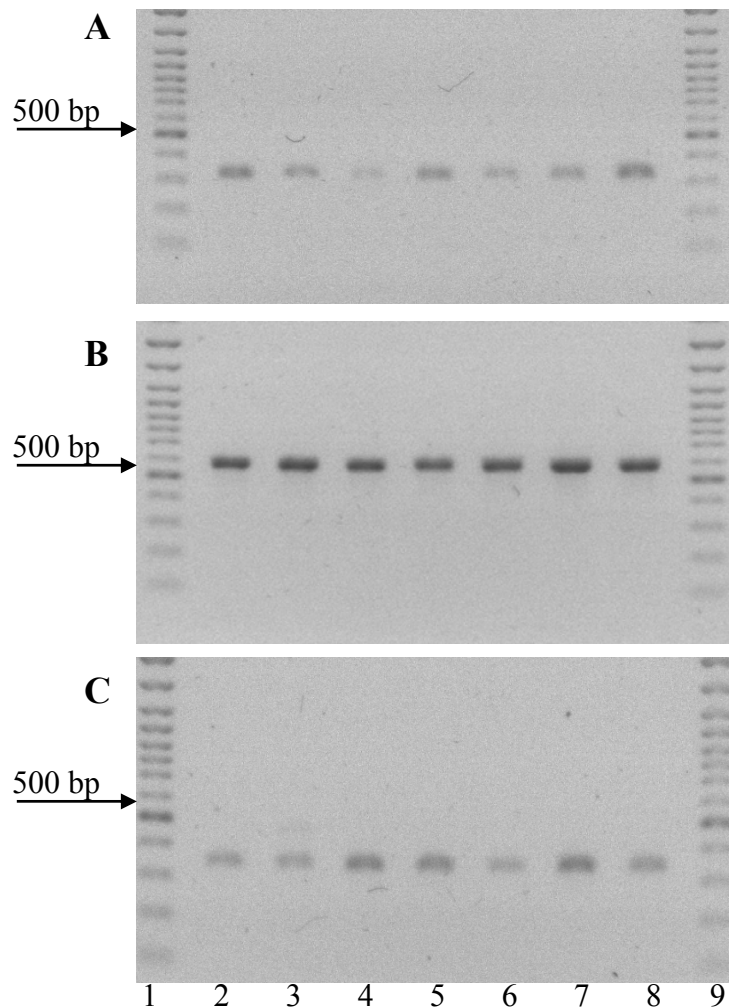
## 3.2. Molekuláris vizsgálatok

### 3.3. Genomi DNS izolációja

A genomi DNS izolálását a Fungal DNA Kit (Omega, D1090) alkalmazásával végeztük melynek eredményeként átlagban 100 ng/μl koncentrációjú DNS-oldat keletkezett.

### 3.4. DNS-szakaszok felszaporítása PCR-rel

A genomi DNS izolációját követően a PCR során a különböző primerpárokkal egy 280–290 bp hosszúságú, a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó szakasz (30/A ábra), egy 600 bp hosszúságú ITS-fragmentum (30/B ábra), illetve egy 300 bp hosszúságú *tubulin*-szakasz (30/C ábra) szaporodott fel mindegyik izolátum esetében. A PCR során melléktermékek nem képződtek, amely a primerek nagyfokú specifikusságát bizonyítják.



**30. ábra** A PCR során felszaporított DNS-szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés): *tefl*-szakaszok (A), ITS-szakaszok (B) és  $\beta$ -*tubulin*-szakaszok (C). 1. és 9. 100 bp DNS-létra (Fermentas, SM1153), 2. *Phoma pinodella* (D/035), 3. *Phoma pinodella* CBS 318.90 (D/159), 4. *Phoma pinodella* PD 82/550 (D/045), 5. *Phoma sojicola* (PD98/1135), 6. *Phoma sojicola* PD 97/2160 (D/056), 7. *Phoma exigua* var. *exigua* (D/075), 8. *Phyllosticta sojicola* (D/050)

### 3.5. Szekvenciarendezés

Az alábbiakban a *Phoma sojicola* PD98/1135 izolátumának *tefl*, ITS- és  $\beta$ -*tubulin* szekvenciája (31. ábra), valamint az egyes szekvenciák összerendezésének egy-egy részlete látható (32, 33, 34. ábra). 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 az – nyilvánvaló hibák miatt – szükséges volt.

#### ***Phoma sojicola* PD98/1135 izolátumának felszaporított *tefl* szekvenciája**

AGCGATACCCACATCTGCGCCCTTTTGTGCGAGGCGCCTCTTTTCGGGGCGG  
CTTATCGCACGAAGAGGGGCAATTTTGGTGGGGTTGTGCGAGCTTTTCGCGG  
ACTTGCCTAGCCTGCTTGC GGCACTCGCCAACCTTCAACACCATGCCCCAC  
ATTCACATTTTGCATCACAAGCACCATGACTTCCTCCACAGGCTGTGGCACT  
ATTGTGCGATTCTCACTAGTCTTCATAAAGCTAACAATCATTACAGGAAGCC  
GCCGAACCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACAGCT

#### ***Phoma sojicola* PD98/1135 izolátumának felszaporított ITS-szekvenciája (18S**

ribosomal RNS gén, rész szekvencia; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, teljes szekvencia; és 26S ribosomal RNS gén, rész szekvencia)

TGTATCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTT  
GTAGGCTTTGCCTGCTATCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTCGTTTCT  
CGGCGGGTTCGCCCGCCGATTGGACAATTTAAACCATTTGCAGTTGCAATCA  
GCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT  
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAG  
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCC  
ATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGT  
TGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGTAGACTCGCCTCAAACAATTGGCAGC  
CGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCATTCAGAACGA  
CGACGTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAA

#### ***Phoma sojicola* PD98/1135 izolátumának felszaporított $\beta$ -*tubulin* szekvenciája**

GGCGAGCATGGTCTCGACGGCTCCGGTGTCTACAATGGCACCTCGGACCTC  
CAGCTCGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTA TAGAAATGACACGC  
TTTCCTTGGACGGACTGCGAGTGCTGACCACTTCTAGGCCTCCGGCAACAAG  
TTCGTTCCCCGTGCCGTTCTTGTCGATTTGGAGCCTGGAACAATGGACGCCG  
TCCGCGCTGGCCCCTTCGGTCAGCTTTTCCGCCCGACAACCTTGTCTTTGGC  
CAGTCTGGTGTGTTAACA ACTGGGCCAAGGGTCACTAACCTGA

**31. ábra** A *Phoma sojicola* PD98/1135 izolátum specifikus génszakaszainak nukleinsav-szekvenciái (*tefl*, ITS és  $\beta$ -*tubulin*)





### 3.3. Filogenetikai elemzések

#### 3.3.1. A *tefl* szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák

##### A *tefl* szekvenciák Maximum Likelihood (ML) analízise

A *tefl* szekvenciák BLAST analízise nagy hasonlóságot mutatott a *Phoma* fajokkal közeli rokonságban álló *Ascochyta* fajok *tefl* szekvenciáival, amelyekből néhányat kiválasztva bevontunk az elemzéseinkbe. A nyilvános adatbázisban (GenBank) korábban nem volt megtalálható *Phoma* fajtól származó *tefl* szekvencia.

A *tefl* szekvenciák elemzésére először a Maximum Likelihood módszert próbáltuk meg, a PAUP\*4.0b program alkalmazásával. Az ML elemzést az Anyag és módszer fejezetben leírt evolúciós modellnek és paramétereknek megfelelően végeztük. A filogenetikai törzsfák készítésébe saját izolátumunk szekvenciaadatai mellett további *Ascochyta* és *Phoma* fajok *tefl* szekvenciáit is bevontuk, melyeket a génbanki adatbázisból töltöttünk le (3. táblázat).

A *tefl* szekvenciák ML analízisével készített törzsfája a 35. ábrán látható. A *Phoma* fajok izolátumainak egy része (*P. pinodella*, *P. exigua* var.-ok, *P. plurivora*, *P. destructiva*, *P. glomerata*) egyértelműen elkülöníthető 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. Ezen esetekben felmerülhet a téves faji meghatározás (identifikáció) a depozitőr részéről. Joyce Woudenberg, a hollandiai CBS munkatársa személyes közlés során (2009 június) megerősítette hogy az általunk vizsgált *P. foveata* fajnak hitt izolátum valójában egy *P. multirostrata* faj izolátuma.

A több izolátummal képviselt fajok mind azonos csoportokba kerültek az elemzés során (*P. pinodella*, *P. exigua* var.-ok, *P. glomerata*, *P. plurivora*), ami megerősíti a *tefl* szekvencia ML elemzéssel történő alkalmasságát a *Phoma* fajok elkülönítésére.

A *Phoma* taxonokon kívül az *Ascochyta* nemzetségbe tartozó taxonokra is érvényes, hogy az egyes gombafajok (*Ascochyta lentis* / *Didymella lentis* anamorf és teleomorf alakjai) ugyanazon cluster-t alkotják, amely szintén alátámasztja, hogy a *tefl* régió a *Phoma* és az *Ascochyta* genuson belül egyaránt alkalmas lehet markernek filogenetikai vizsgálatokhoz. Kaiser *et al.* (1997) szerint morfológiai bélyegek, patogenitási tesztek

és RAPD-mintázatuk alapján a lóbabról (*Vicia faba*) származó *Didymella fabae* (DQ386492) az *Ascochyta fabae* (DQ386498) teleomorf alakja, illetve a lencséről (*Lens culinaris*) származó *Didymella lentis* (DQ386493) az *Ascochyta lentis* (AY831546) teleomorf alakja.

Az egyes taxa közötti távolságok – a saját kérdéses izolátumainkra nézve – 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, mivel a *tefl* szekvenciáik gyakorlatilag megegyeznek azzal.

A *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU595356) a *tefl* szekvencia alapján a *P. exigua* csoportba került.

Az ML elemzés során a bootstrap analízis elvégzésére nem volt lehetőségünk, mivel az elemzés szekvenciánként több hetet vett volna igénybe a rendelkezésünkre álló számítógép kapacitással.

### **A *tefl* szekvenciák Parsimony analízise**

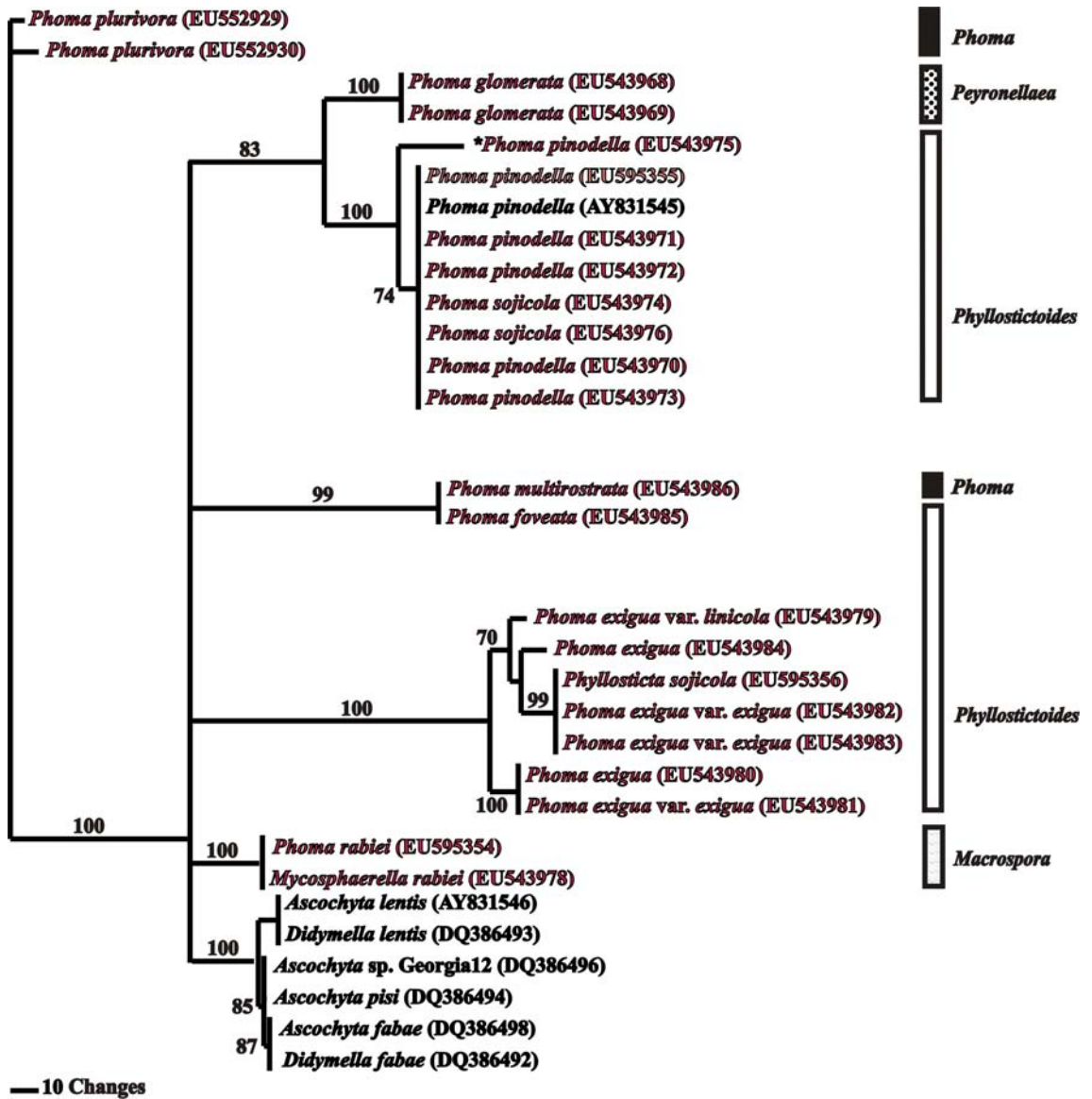
A Parsimony elemzés során, melyet szintén a PAUP\*4.0b programmal végeztünk, az ML analízishez nagyon hasonló eredményeket kaptunk (36. ábra). Az összevetés során a megbízhatóság igazolására bootstrap analízist is végeztünk. Az elemzés során a program 310 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 121 karaktert konstansnak, 173 karaktert informatívnak tekintett, és csak 16 karaktert becsült nem-informatívnak. Az informatív karakterek magas száma garantálja, hogy a *tefl* régió megbízhatóan alkalmazható az egyes *Phoma*, illetve *Ascochyta* taxonok egymástól való filogenetikai elkülönítésére.

A több izolátummal is képviselt fajok mind azonos cluster-be kerültek az elemzés során, ami megerősíti a *tefl* szekvencia alkalmasságát a *Phoma* fajok elkülönítésére.

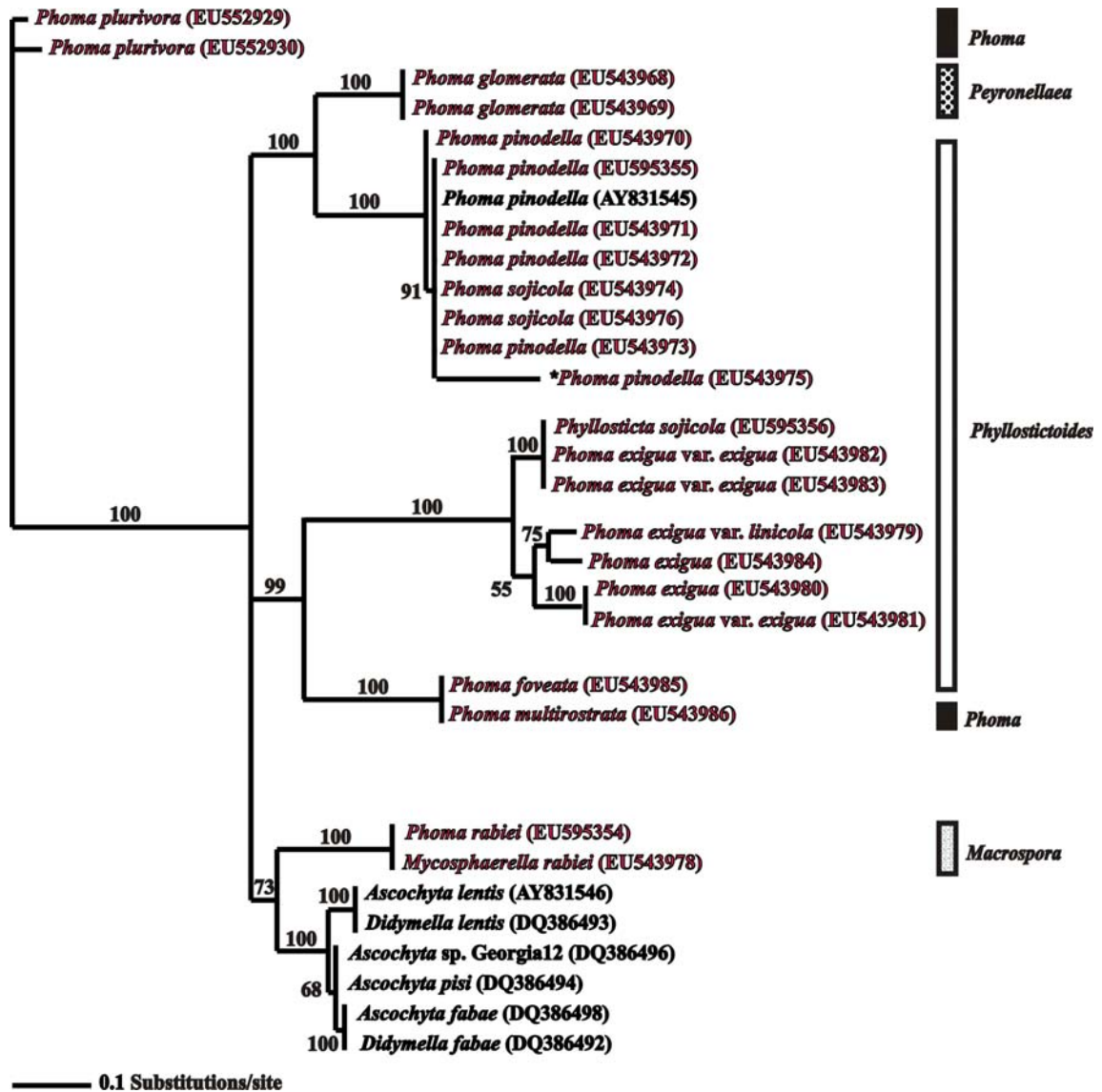
A bootstrap analízis során kapott magas bootstrap értékek megerősítették az egyes elágazások helyének a valószínűségét, ezzel alátámasztva a felrajzolt filogenetikai törzsfa helyességét.

A törzsfán belüli két nagy csoport elkülönülése (*P. exigua* és *P. pinodella*) egyaránt 100% bootstrap értékkel kerültek megerősítésre, ami azt jelenti, hogy a két csoport a *tefl* szekvencia alapján teljes bizonyossággal elkülönül egymástól, valamint a többi





36. 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). Az adtbázisból származó izolátumok fekete, a saját izolátumok piros színnel jelöltek. \**P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció, mint '*P. exigua* var. *exigua*'



37. 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 tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). Az adtbázisból származó izolátumok fekete, a saját izolátumok piros színnel jelöltek. \**P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció, mint '*P. exigua* var. *exigua*'

### A *tefl* szekvenciák Bayesian analízise

A *tefl* régió Bayesian módszerrel történő elemzése során, melyet a MrBayes programmal végeztünk, a kapott filogenetikai törzsfá (37. ábra) lényegében megegyezik az előző két módszer alapján kapott törzsfával. Az elemzést az Anyag és módszer fejezetben leírt evolúciós modell és paraméterek szerint, egymillió generáción keresztül végeztük.

Az elemzés során a bootstrap értékekkel szemben itt a Bayesian-féle utólagos valószínűségi értékekkel történt a megbízhatóság expressziója mely nagyon közeli a bootstrap értékeihez, gyakran matematikailag meg is egyezik azokkal.

Az előző két törzsfánál megállapítottak itt is elmondhatók: a törzsfán belüli két nagy cluster (*P. exigua* és *P. pinodella*) egyaránt 100% Bayesian-féle utólagos valószínűségi értékkel került megerősítésre, ami azt jelzi, hogy a két csoport a *tefl* szekvencia alapján teljes bizonyossággal elkülönül egymástól és a többi taxontól.

Az egyes taxonok közötti távolságok (az elágazások hossza), valamint a további magas Bayesian valószínűségi értékek is elegendőnek ítélték az egyes taxonok egymástól való megbízható elkülönítéséhez, továbbá az egymáshoz viszonyított filogenetikai kapcsolat megállapításához.

A *P. sojicola* izolátumai (MYA-406, EU543974 és PD 97/2160, EU543976) a *P. pinodella* cluster-be kerültek a Bayesian elemzés alapján is.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU595356) a *tefl* régió Bayesian módszerrel történő elemzése alapján a *P. exigua* var. *exigua* csoportba rendeződött.

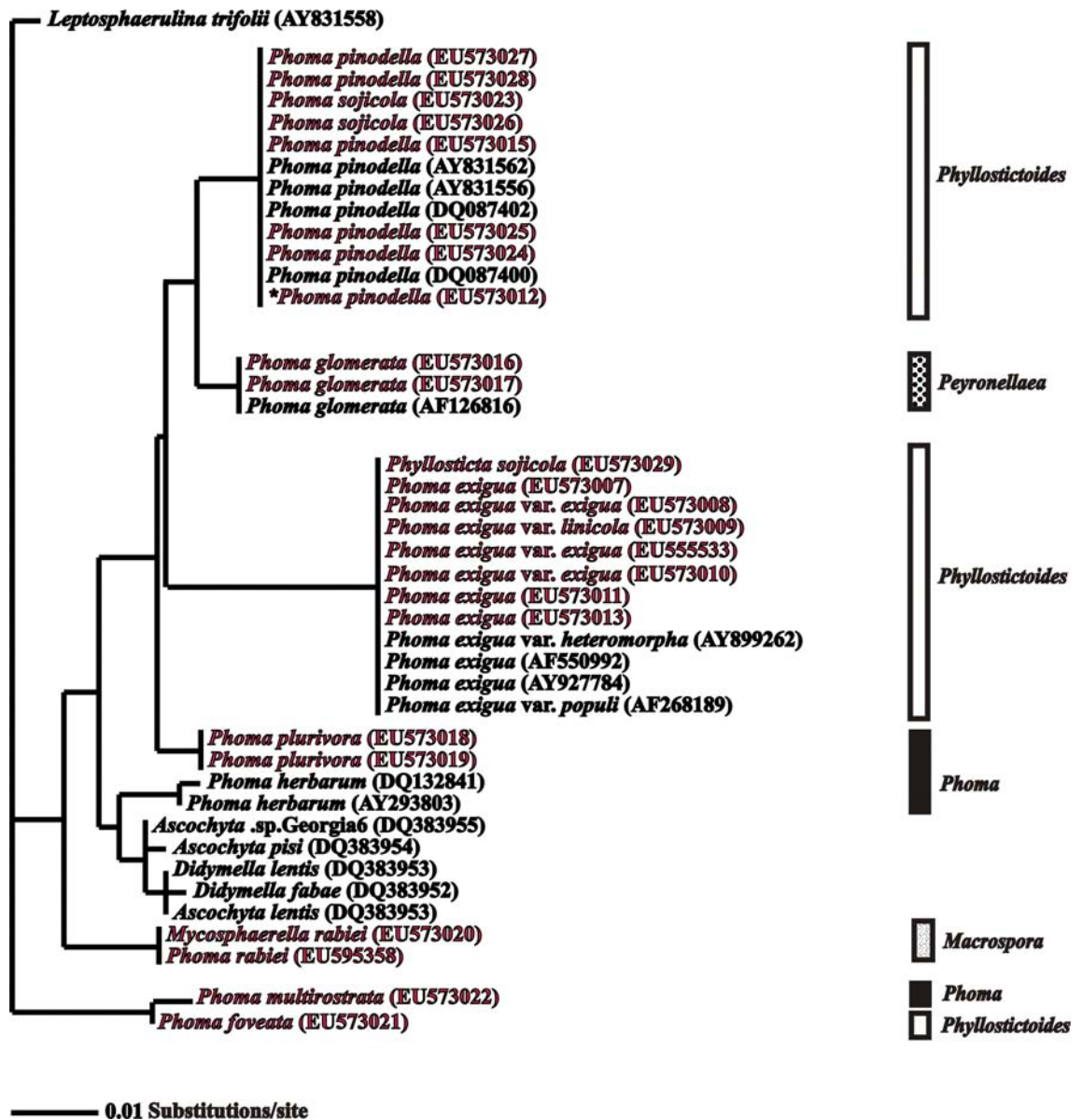
### **3.3.2. Az ITS-szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák**

#### **Az ITS-régiók Maximum Likelihood (ML) analízise**

Az ML elemzést az Anyag és módszer fejezetben leírt evolúciós modell és paraméterek szerint végeztük a PAUP\*4.0b program alkalmazásával. A filogenetikai törzsfa készítésébe a saját izolátumok szekvenciái mellett a GenBank adatbázisából további *Ascochyta* és *Phoma* fajok ITS-szekvenciáit is bevontuk (4. táblázat). Az ITS-régió filogenetikai elemzéseikhez külső viszonyítási elemnek a *Leptosphaerulina trifolii* faj egy izolátumát választottuk, mely a BLAST analízissel a legnagyobb hasonlóságot mutatta a *Phoma* fajok ITS-szekvenciáihoz. A megbízhatósági ellenőrzésre, a bootstrap analízis elvégzésére ez alkalommal sem volt lehetőségünk (az elemzés rendkívüli időigényes volta miatt, amely több hetet vett volna igénybe).

A három vizsgált filogenetikai marker közül az ITS-szekvenciáknál találtuk a legkisebb báziskülönbséget az egyes taxonok között, amely bizonytalanná teszi, hogy az ITS-régió vajon alkalmas-e a *Phoma* taxonok megbízható szétválasztására? A *Phoma* fajok izolátumainak egy része (*P. pinodella*, *P. exigua* var.-ok, *P. plurivora*, *P. glomerata*) egyértelműen elkülöníthetők az ITS-szekvencia ML elemzésének a

segítségével a többi vizsgált *Phoma* faj izolátumaitól (38. ábra). Más részük fajcsoportot alkot az ITS-szekvenciák alapján: a *P. pinodella* és a *P. exigua* fajhoz tartozó izolátumok egymástól jól elkülönülő csoportokat alkotnak. Nem választhatók el azonban egymástól a *P. foveata* és *P. multirostrata* izolátumok az ITS-szekvenciák alapján.



**38. 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). Az adtbázisból származó izolátumok fekete, a saját izolátumok piros színnel jelöltek. \**P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció, mint '*P. exigua* var. *exigua*'



Az ITS-szekvencia ML elemzése eredményeként a több izolátummal is képviselt fajok mind azonos csoportba kerültek (*P. pinodella*, *P. exigua* var.-ok, *P. glomerata*, *P. plurivora*), ami alapján az ITS-szekvencia ML elemzése számításba jöhet az egyes *Phoma* fajok elkülönítésénél, de más markerek megbízhatóbbnak látszanak. A *Phoma* fajokon kívül ez a megállapítás az *Ascochyta* nemzetség vizsgált fajaira is érvényes, hogy az egyes gombafajok (*Ascochyta lentis* / *Didymella lentis* anamorf / telomorf alakok) egy cluster-t alkotnak, amely az ITS-régiót alkalmassá teheti a *Phoma* és az *Ascochyta* genuson belül filogenetikai vizsgálatokra.

A *Phoma sojicola* izolátumai (MYA-406, EU573023 és PD 97/2160, EU573026) a *P. pinodella* csoportba kerültek, mivel az ITS-szekvenciájuk gyakorlatilag teljesen azonos.

A *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU573029) az ITS-szekvencia ML elemzése alapján a *P. exigua* csoport tagja.

### **Az ITS-régiók Parsimony analízise**

Az ITS-régió Parsimony elemzése során, melyet a PAUP\*4.0b programmal végeztünk, az ITS-régió ML analíziséhez nagyon hasonló eredményt kaptunk (39. ábra), azzal a különbséggel, hogy itt már sikerült elvégezni a bootstrap megbízhatósági analízist is. Az MP elemzés az Anyag és módszer fejezetben leírt evolúciós modell és paraméterek szerint történt.

Az ITS-régiók adatai alapján a *Phoma* taxonok különálló csoportokat alkotnak, azonban az egyes taxa közötti távolságok (bázisok közötti különbség, elágazások hossza) nem bizonyultak kellően eltérőnek ahhoz, hogy az eredmények alapján a filogenetikai törzsfát jól megalapozottnak tekinthessük.

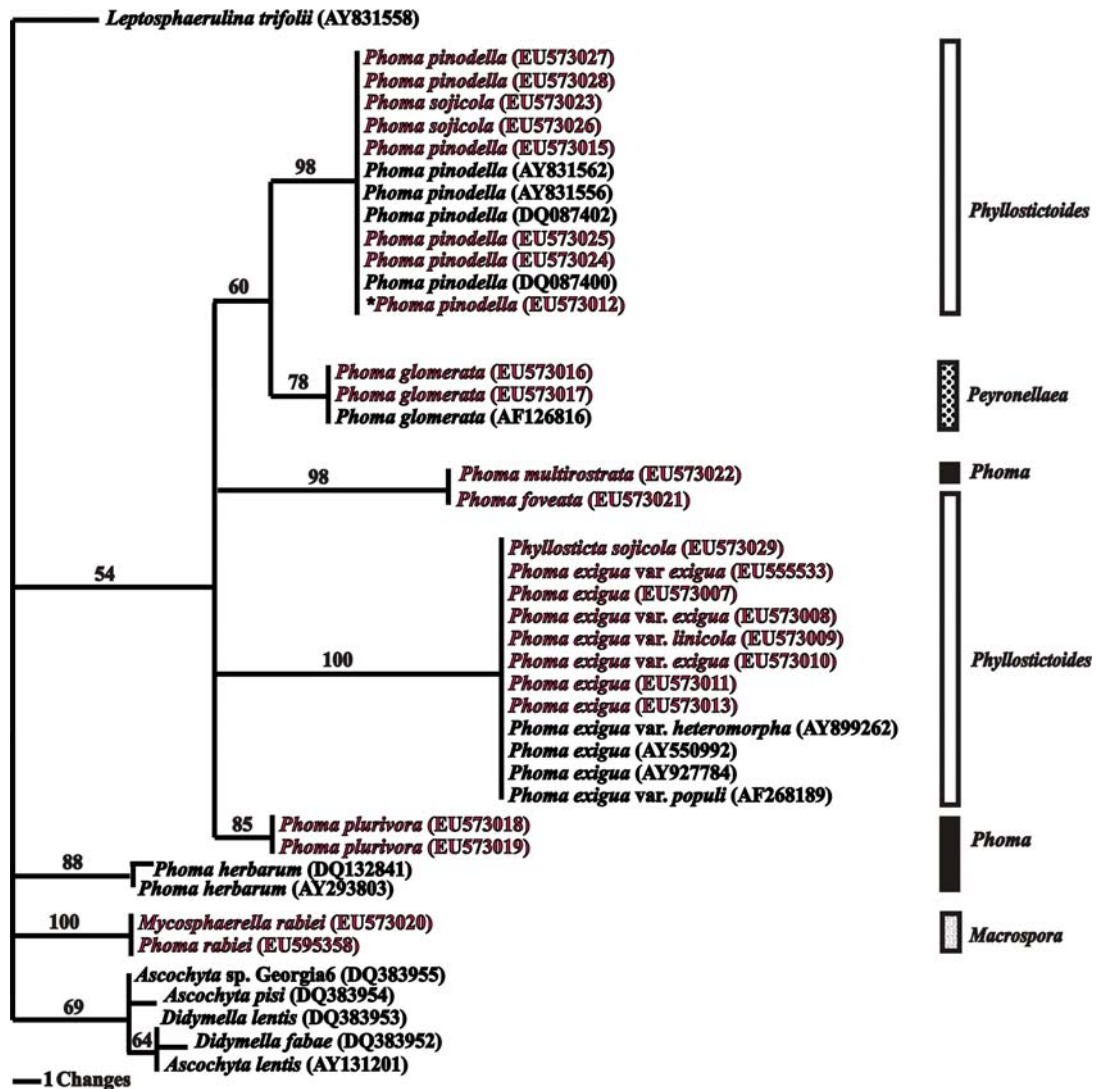
A program 454 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 417-et konstansnak, 32 karaktert informatívnak tekintett és csak 5-öt becsült nem-informatívnak. A különbség tehát a *Phoma* és *Ascochyta*, a *Leptosphaeria* és *Didymella* fajok izolátumai között nem volt jelentős, ez megkérdőjelezi, vajon a 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 megállapítást tenni a két csoport egymáshoz viszonyított filogenetikai kapcsolatára.

A több izolátummal képviselt fajok mind azonos csoportba kerültek (*P. pinodella*, *P. exigua* var.-ok, *P. glomerata*, *P. plurivora*), és a magas bootstrap értékek alátámasztották az egyes csoportok elkülönülésének megbízhatóságát, ezzel is alátámasztva a filogenetikai törzsfá ezen összefüggéseinek valódiságát.

A törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella*) 100% és 98% bootstrap értékei megerősítik, hogy a két csoport az ITS-szekvencia alapján elkülöníthető egymástól és a többi taxontól is.

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

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU573029) az ITS-régió Parsimony elemzése alapján szintén a *P. exigua* var. *exigua* csoportba került. Újabb izolátumok vizsgálatára – a ritka előfordulásra és autentikus izolátumok törzsgyűjteményi hiányára tekintettel – nem kerülhetett sor.



39. 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). Az adtbázisból származó izolátumok fekete, a saját izolátumok piros színnel jelöltek. \**P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció, mint '*P. exigua* var. *exigua*'

## Az ITS-régiók Bayesian analízise

Az ITS-régió Bayesian módszerrel történő elemzése során kapott filogenetikai törzsfá (40. ábra) kisebb eltérésekkel egyező az előző két módszer alapján kapott törzsfával (38–39. ábra). Az elemzést az Anyag és módszer fejezetben leírt evolúciós modell és paraméterek szerint végeztük, és az értékeket 250000 generáción keresztül vizsgáltuk. Ez alkalommal azért csökkentettük a generációk számát, mivel az összerendezés, illetve a Parsimony elemzés során is világosan látszott, hogy csak minimális báziskülönbség található az egyes szekvenciák között, így nem volt indokolt azt még több generáción keresztül vizsgálni. A Bayesian elemzés során utólagos valószínűségi mutatókat kaptunk, melynek értékei gyakran számtanilag megközelítik a bootstrap értékeket, habár néhányszor mégis eltérnek azoktól.

Az ITS-régiók elemzése kapcsán tett előbbi megállapításaink itt is helytállóak: a törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella* izolátumai) 99% Bayesian-féle utólagos valószínűségi értékei azt jelentik, hogy a két csoport az ITS-szekvencia alapján teljes bizonyossággal elkülönül egymástól, valamint a többi vizsgált *Phoma* taxától. A két csoport egymáshoz viszonyított helyzetére azonban az alacsony Bayesian értékek miatt nem lehet megbízható megállapítást tenni. Az egyes taxa közötti távolságok (báziskülönbség), valamint a további Bayesian-féle utólagos valószínűségi értékek ez alkalommal sem bizonyultak kétségen kívüli megbízhatónak. Az ITS-szekvenciák között ugyanis csekély szekvencia-különbséget tapasztaltunk, továbbá az utólagos valószínűség értékek alacsonynak bizonyultak több csoport esetében is.

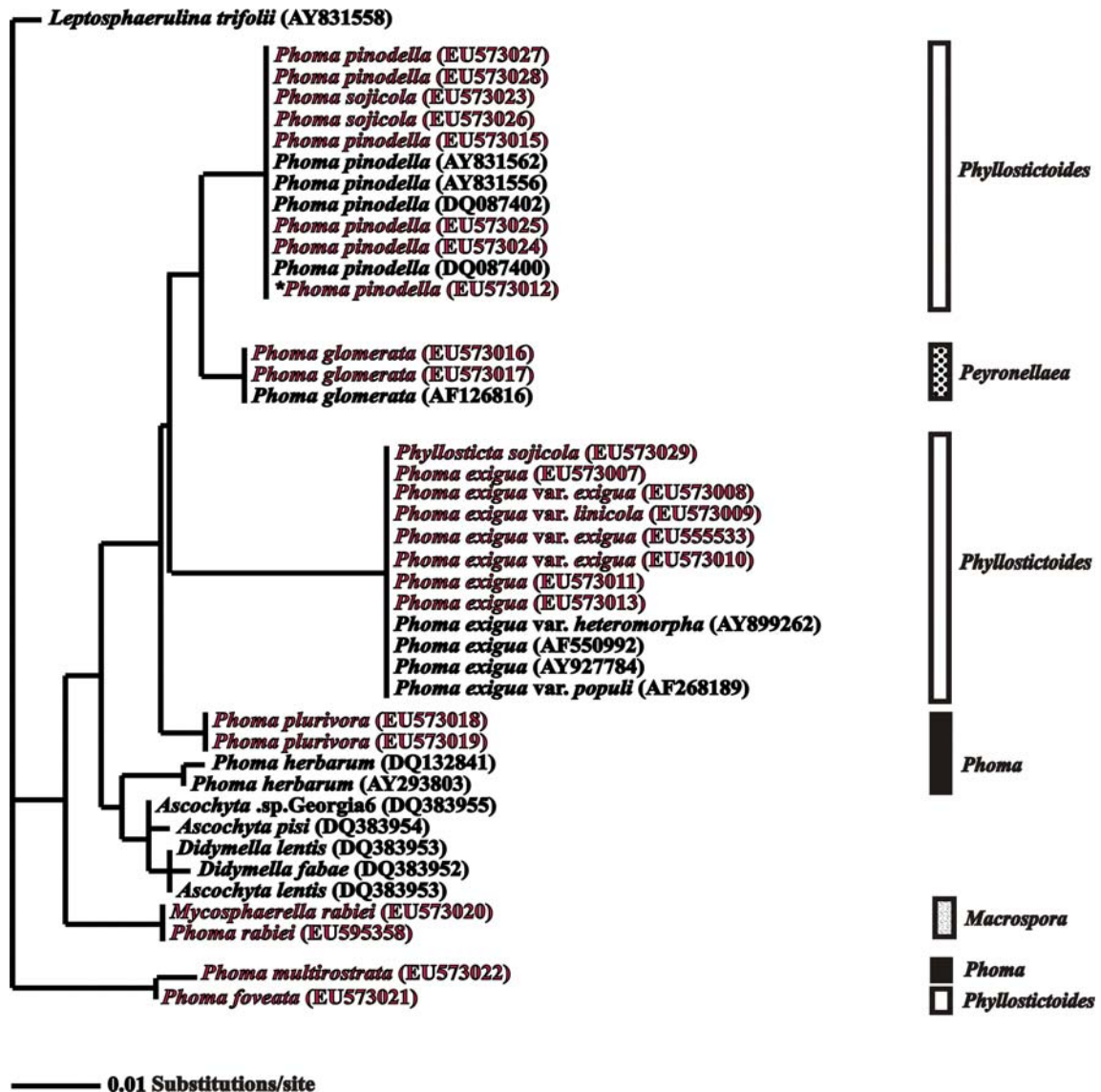
A törzsfá ugyancsak hasonló a *tefl* szekvencia elemzése során kapott törzsfához, és csak apróbb eltérések figyelhetők meg. Ilyen a két *P. glomerata* izolátum csoportja, melynek a *tefl* szekvenciák alapján számított Bayesian utólagos valószínűség értéke 100-nak, az ITS-szekvenciák alapján pedig csak 78-nak bizonyult. Hasonlóan alakult a *P. plurivora* izolátumok csoportja, melynek az utólagos valószínűség értéke *tefl* elemzéskor 100, ITS elemzéskor 85 volt.

A *P. sojicola* izolátumai (MYA-406, EU573023 és PD 97/2160, EU573026) a Bayesian elemzéssel is a *P. pinodella* cluster-be kerültek.

A *Phyllosticta sojicola* izolátuma (CBS 301.39, EU573029) az ITS-régió alapján is a *P. exigua* var. *exigua* csoport része.

A *P. foveata* / *P. multirostrata* hasonlósága valószínűsíti a téves faji besorolást. Joyce Woudenberg, a hollandiai CBS munkatársa személyes közlés során (2009 június)

megerősítette hogy az általunk vizsgált *P. foveata* fajnak hitt izolátum valójában egy *P. multirostrata* faj izolátuma.



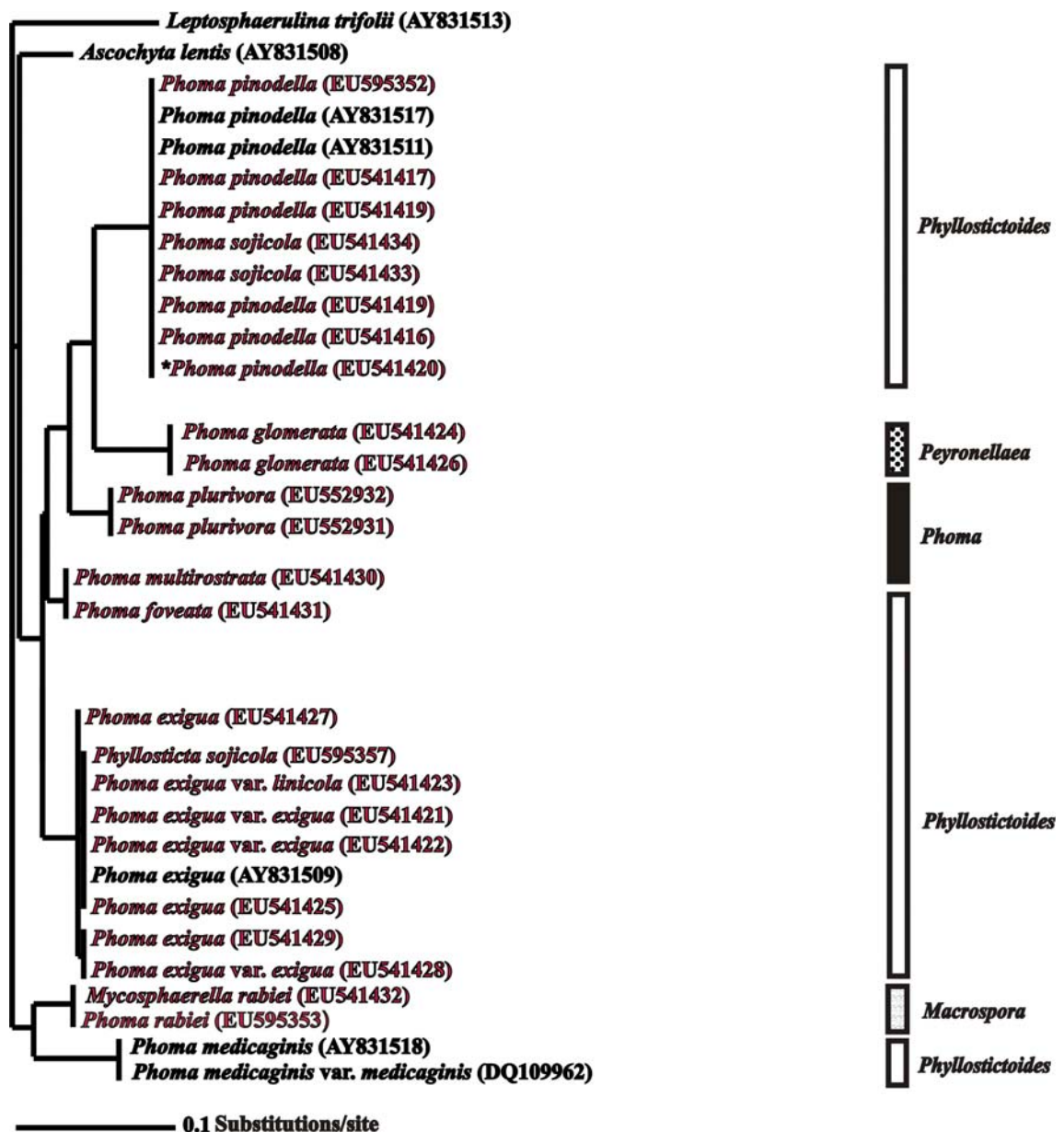
40. ábra Az ITS-szekvenciák Bayesian elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az egyes elágazások Bayesian-féle utólagos valószínűség értékeknek felelnek meg. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit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

### 3.3.3. $\beta$ -tubulin szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfák

#### A $\beta$ -tubulin régió Maximum Likelihood (ML) analízise

A  $\beta$ -tubulin régió ML elemzését követően a fentebb tárgyalt *tefl* és ITS-régióknál tapasztaltakhoz nagyon hasonló eredményt kaptunk (41. ábra). Az Anyag és módszer fejezetben ismertetett evolúciós modell alapján végeztük el az ML elemzést.

Távoleső összehasonlító izolátumként az ITS-régiónál már használt *Leptosphaerulina trifolii* faj szekvenciáját alkalmaztuk. A  $\beta$ -*tubulin* régió adatbázisából jóval kevesebb *Ascochyta*, illetve külső *Phoma* faj szekvenciáját tudunk bevonni a filogenetikai elemzésekbe, mivel az adatbankokban a vizsgálataink elkészültéig kevés fajról tettek közé a  $\beta$ -*tubulin* régiókról készített szekvenciákat.



41. ábra A  $\beta$ -*tubulin* szekvenciák Maximum Likelihood elemzése alapján készített filogenetikai törzsfa. A jobb oldali oszlopok: a morfológiai tenyészbélyegeken alapuló faji besorolás *Phoma* genuson belüli szekcióit jelzik (Boerema *et al.*, 2004). Az adtbázisból származó izolátumok fekete, a saját izolátumok piros színnel jelöltek. \**P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció, mint '*P. exigua* var. *exigua*'

Az egyes *Phoma* taxonok közötti távolságok ez alkalommal is kicsinek bizonyultak, mivel az egyes izolátumok  $\beta$ -*tubulin* régiója között nagyon kevés báziskülönbség

található az összerendezést követően. Ez a különbség ugyanakkor nagyobb volt, mint az ITS-régiónál, ahol a három vizsgált genomszakasz között a legkisebb szekvenciakülönbséget találtuk.

A több izolátummal is képviselt fajok mind azonos csoportba kerültek (*P. pinodella*, *P. exigua* var.-ok, *P. glomerata*, *P. plurivora*).

A *Phoma sojicola* izolátumai (MYA-406, EU541434 és PD 97/2160, 541433) a *P. pinodella* cluster-be kerültek a csoportosítás során, mivel a  $\beta$ -*tubulin* szekvenciájuk közel azonos.

A *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU595357) a *tefl* szekvencia alapján szintén a *P. exigua* var. *exigua* csoportba került.

### **A $\beta$ -*tubulin* régió Parsimony analízise**

A  $\beta$ -*tubulin* régió Parsimony elemzése során az ML analízishez nagyon hasonló eredményeket kaptunk (42. ábra) azzal a különbséggel, hogy itt már sikerült elvégezni a bootstrap próbát is. Az MP elemzést az Anyag és módszer fejezetben leírt evolúciós modell és paraméterek szerint végeztük.

A program 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  $\beta$ -*tubulin* régió is viszonylag kevés volt informatív, amely szintén megkérdőjelezi, hogy a választott  $\beta$ -*tubulin* régió elégséges-e a taxonok megalapozott szétválasztásához, illetve a köztük lévő filogenetikai viszonyok és távolságok megállapításához. Mivel az egyes  $\beta$ -*tubulin* szekvenciák között csekély a különbség, ezért az elemzés alapján nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy a vizsgált *Phoma* fajok monofiletikus eredetűek-e.

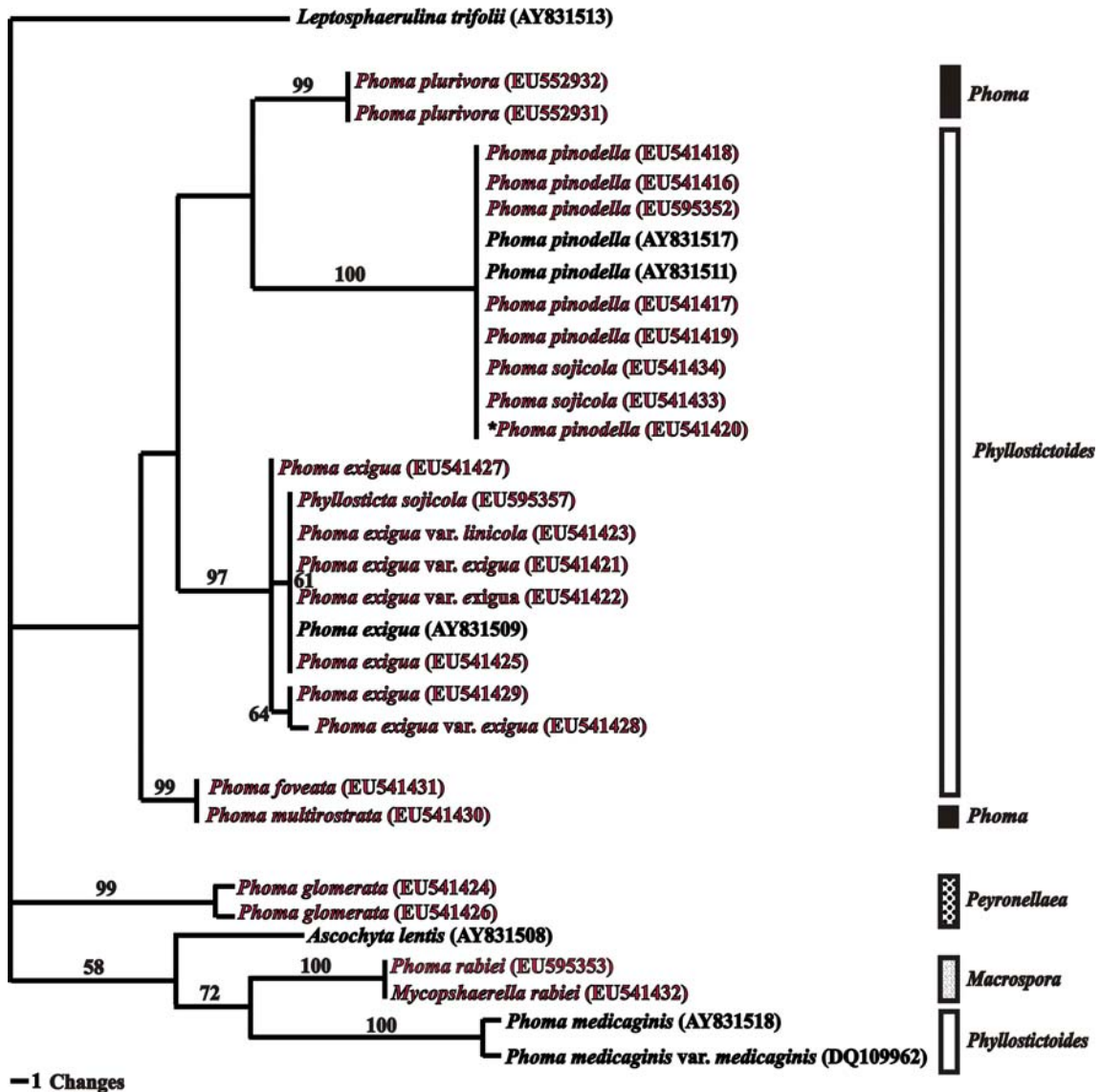
A több izolátummal is képviselt fajok mind azonos csoportba kerültek az elemzés során (*P. pinodella*, *P. exigua* var.-ok, *P. glomerata*, *P. plurivora*).

A magas bootstrap értékek megerősítették az egyes elágazások helyének a valószínűségét, ezzel alátámasztva a filogenetikai törzsfá valódiságát.

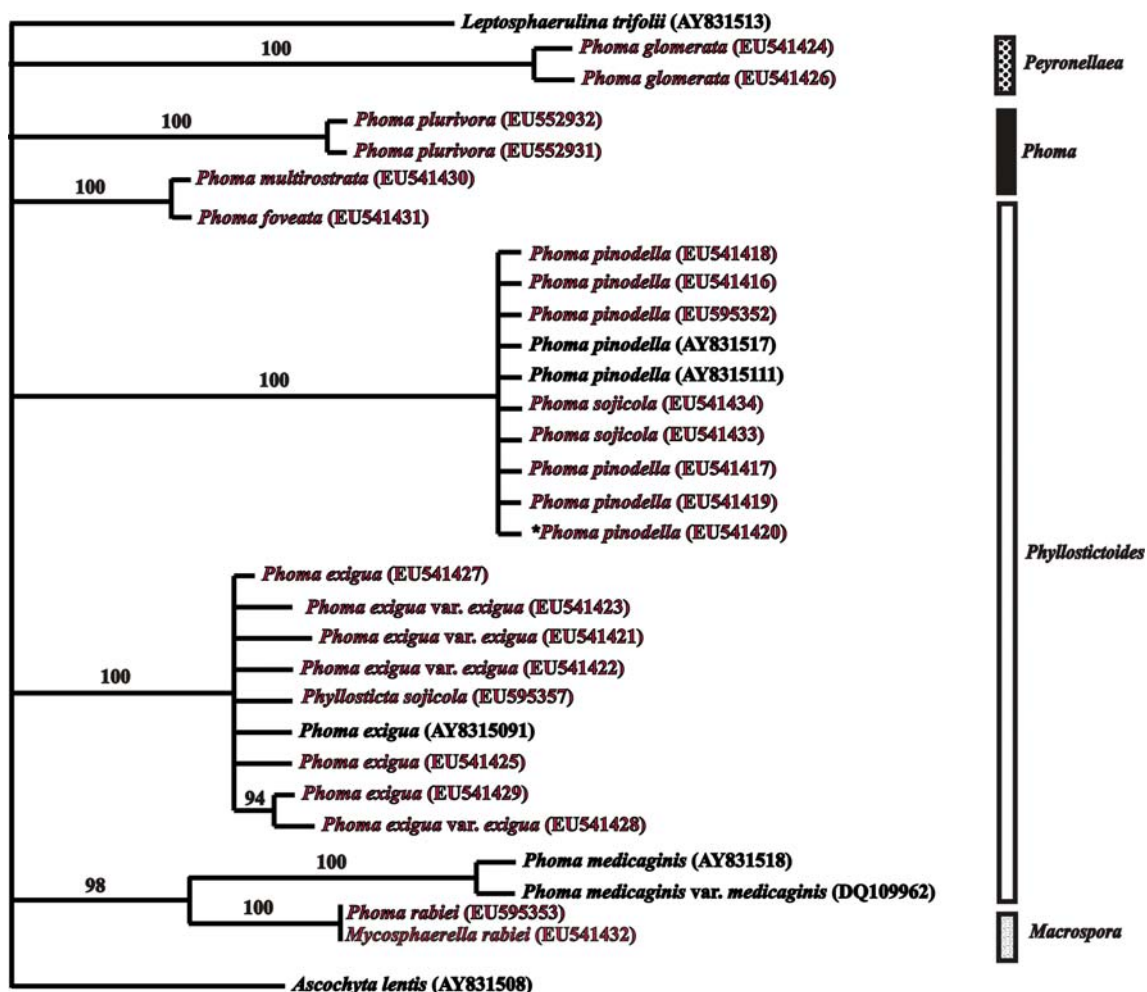
A törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella*) 97% és 100% bootstrap értékkel megerősítette, hogy a két csoport a  $\beta$ -*tubulin* szekvencia alapján nagy bizonyossággal elkülönül egymástól valamint a többi taxontól annak ellenére, hogy a köztük lévő báziskülönbség nem jelentős.

A *Phoma sojicola* izolátumai (MYA-406, EU541434 és PD 97/2160, 541433) ez alkalommal is a *P. pinodella* csoportba kerültek az elemzéssel, mivel a  $\beta$ -tubulin szekvenciájuk gyakorlatilag megegyezik.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU595357) a  $\beta$ -tubulin régió alapján is a *P. exigua* var. *exigua* csoportba került.



42. ábra A  $\beta$ -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). Az adtbázisból származó izolátumok fekete, a saját izolátumok piros színnel jelöltek. \**P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció, mint '*P. exigua* var. *exigua*'



— 0.01 Substitutions/site

43. ábra A  $\beta$ -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). Az adtbázisból származó izolátumok fekete, a saját izolátumok piros színnel jelöltek. \**P. pinodella* (Ph 58) téves identifikáció, mint '*P. exigua* var. *exigua*'

### A $\beta$ -tubulin régió Bayesian analízise

A  $\beta$ -tubulin régió Bayesian módszerrel történő analízis során felrajzolt filogenetikai törzsfá (43. ábra) erősen hasonlít az előző két módszer alapján kapott törzsfákhoz. Az elemzést az Anyag és módszer fejezetben leírt paraméterek szerint végeztük, és az értékeket egymillió generáción keresztül vizsgáltuk. Az elemzés során a bootstrap értékekkel szemben itt Bayesian-féle utólagos valószínűségeket kaptunk, melynek nagyon közelítenek a bootstrap értékekhez, gyakran azzal meg is egyezők.



Az összefüggések, amit az előző két törzsfánál is megállapítottunk, itt is helytállóak: a törzsfán belüli két nagy csoport (*P. exigua* és *P. pinodella*) egyaránt 100% Bayesian-féle utólagos valószínűségi értéke azt jelenti, hogy a két csoport a  $\beta$ -tubulin szekvencia alapján megbízható valószínűséggel különül el egymástól és a többi *Phoma* taxától. Az egyes izolátumok közötti távolságok azonban (az elágazások hossza, bázisok közötti különbség), valamint a többi Bayesian-féle utólagos valószínűségi érték (62) nem elég megbízható a kétséget kizáró elkülönítéshez és a filogenetikai távolság megállapításához.

A *P. sojicola* izolátumai (MYA-406, EU541434 és PD 97/2160, 541433) a *P. pinodella* cluster-be kerültek a Bayesian típusú elemzés során is.

Az eredetileg *Phyllosticta sojicola*-ként deponált izolátum (CBS 301.39, EU595357) a  $\beta$ -tubulin régió alapján a *P. exigua* var. *exigua* csoportba került. Újabb izolátumok vizsgálatára – a ritka előfordulásra és autentikus izolátumok törzsgyűjteményi hiányára tekintettel – nem kerülhetett sor.

### Az egyes filogenetikai módszerek összehasonlítása a *Phoma* taxonok elemzésében

A különböző *Phoma* taxonok filogenetikai elemzését 3 karaktertípusú módszerrel végeztük el: a Maximum Likelihood, a Maximum Parsimony és a Bayesian-féle elemzésekkel. Az eredményeket tekintve nem tapasztaltunk lényeges eltérést az egyes módszerek között, azonban érdemes figyelembe venni egyéb tényezőket is a módszer megválasztásakor. Elsőként vegyük figyelembe az egyik legfontosabb tényezőt: az elemzés gyorsaságát, a számítógépes programfutás időigényességét. Az alábbi 7. táblázatban az egyes módszerek időigényét hasonlítottuk össze.

7. táblázat A filogenetikai analízisek időigénye elemzési módszerek és markerek szerint

	Maximum Likelihood (ML)	Maximum Parsimony (MP)	Bayesian módszer
<i>tefl</i>	41 min 42 sec	0, 08 sec + 11 min 33 sec bootstrapping (1000 ismétlés)	77 min 42 sec
ITS	28 min 46 sec	0, 63 sec + 26 min 53 sec bootstrapping (1000 ismétlés)	51 min 15 sec
$\beta$ -tubulin	12 min 36 sec	0, 08 sec + 5 min 22 sec bootstrapping (1000 ismétlés)	40 min 34 sec

Az adatokból jól látható, hogy a filogenetikai elemzést a leggyorsabban az MP módszer végezte el, amit az ML, majd a Bayesian módszer követett. Fontos hangsúlyozni, hogy esetünkben az ML módszer csak azért volt gyorsabb, mint a Bayesian, mert nem végeztünk bootstrap elemzést, ami egyébként hetekig is eltartott volna a rendelkezésünkre álló számítógép teljesítménnyel. A sebesség mellett további tényezőket is érdemes tekintetbe venni. Ezek egyike a valószínűségi érték kiszámítása („bootstrapping”). Mind az ML, mind az MP analízis során kívánatos elvégezni a bootstrapping műveletet, amely megadja, hogy mennyire megbízhatók az egyes elágazások, mennyire állnak közel a valósághoz a törzsfán ábrázolt rokonsági kapcsolatok. A bootstrapping hátránya, hogy a számításhoz szükséges idő hosszú, különösképpen igaz ez a ML analízisre. Vizsgálatainkban az ML elemzés során azért is kénytelenek voltunk eltekinteni a bootstrapping alkalmazásától, mivel az a rendelkezésünkre álló számítógéppel hetekig tartott volna. Megpróbáltunk ugyan a  *$\beta$ -tubulin* szekvenciánál ezt elvégezni, de 1 hét alatt még 100 ismétlés sem fejeződött be. Az MP analízisnél azonban nagyon gyors volt a bootstrapping, amely a program eltérő típusú törzsfakeresési módszerének tulajdonítható.

A Bayesian analízis egyik legnagyobb előnye a másik két módszerrel szemben, hogy ennél nem szükséges külön bootstrap elemzést végezni, mivel a program az elemzés lefutását követően feltünteti az egyes elágazások utólagos valószínűségi értékeit. Az MP elemzésnek nagy hátránya, hogy nem ad lehetőséget az evolúciós modell kiválasztására, illetve kevésbé megbízható összefüggéseket szolgáltat, mint a másik két módszer, habár a mi esetünkben nem tapasztaltunk lényeges eltérést a törzsfákban. Óriási előnye viszont a gyorsasága. A három módszer közül az MP fejezte be leghamarabb a bootstrap próbákat is beleértve. A legmegbízhatóbb és legpontosabb törzsfát az ML elemzés szolgáltatja, mivel a program megadja a választott evolúciós modell paramétereit, és az elágazások hosszát az összes lehetséges törzsfára, majd a legnagyobb valószínűségi értékkel rendelkező fát választja ki közülük. Hátrányként említhető az elemzéshez szükséges idő hosszúsága, főleg a bootstrap próba időigénye.

Véleményem szerint a három módszer közül a *Bayesian-féle módszer tűnik a legjobb választásnak*, mivel egyszerre ötvözi az ML és MP analízis előnyeit, de azok hátrányai nélkül. Igaz, a Bayesian módszer nem szolgáltat olyan pontos, a valósághoz közelítő és megbízható eredményt, mint az ML, viszont *az elemzés nagyon gyors*, és az egyes elágazásokhoz azonnal *hozzárendeli* (a bootstrap-hez nagyon hasonló) *utólagos valószínűségi értékeket*. A Bayesian elemzés az MP analízishez képest lassabb, de annál

pontosabb és megbízhatóbb evolúciós törzsfát készít, ráadásul lehetőség nyílik az az evolúciós modellek megválasztására is. A Bayesian-féle módszer talán legkritikusabb pontja annak kiválasztása, hogy a Markov Chain Monte Carlo algoritmus mennyi generáción keresztül vizsgálja az adathalmazt, ám ezt – megfelelő jártasság megszerzését követően – meglehetősen biztonsággal lehet eldönteni.

## 4. Következtetések, javaslatok

Napjainkig mintegy ötezer *Phoma* és a *Phoma*-kal közeli rokonságban álló (*Phoma*-szerű) fajt írtak le morfológiai bélyegek alapján, azonban a 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. A molekuláris biológia módszereivel már több *Phoma* genushoz közelálló gombataxonban is bebizonyosodott, hogy két külön „fajnak” vélt izolátum valójában ugyanazon faj, csak némi morfológiai változékonysággal, vagy ellenkezőleg: azonos fajnak vélt izolátum valójában két különböző fajtakar (Fatehi *et al.*, 2003; Peever *et al.*, 2007).

A 19. században és a 20. század első felében Saccardo (1906) rendszerének alapján több ezer fajt írtak le a nem-sztromatikus piknídiumos gombák körében, amelyek szintelen (hialin), válaszfal nélküli konídiumokat képeznek. Ebben a koncepcióban jelentős hangsúlyt kapott a *Phoma*-szerű piknídiumos gombák rendszerezésénél a gazdanövény-specifikusság, a szubsztrátumelv szigorú alkalmazása, valamint a konídiumban a válaszfal megléte vagy hiánya. Általában a *Phoma* besorolást alkalmazták azokra a fajokra, amelyek szintelen, egysejtű konídiumokkal rendelkeztek, és a növények szárain és vesszein növekedtek. Ugyanakkor a levélen károsítókat a *Phyllosticta* genusba sorolták.

Boerema és munkatársai (1965, 1968, 1971, 1973, 1977, 1981) mellőzik a gazdanövény prioritásának hangsúlyozását, mint a *Phoma* fajok besorolásának elsődleges rendszertani kritériumát, és megpróbálták mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között megfigyelt stabil rendszertani bélyegek alapján rendszerezni a *Phoma* fajokat, amelyeket standardizált körülmények között vizsgált telepjellemzőkkel egészítettek ki. Határozáskor fontosnak tartják a telep alakját, színét, nagyságát, a piknídium és konídium alakját és méreteit, valamint a piknídium falának szerkezetét, illetve egyéb élettani jellemzőket, mint pl. az „E-metabolit” képzését. A genus fajainál a piknídium morfológiája bizonyult a legfontosabb hasznosítható bélyegnek az egyes szekciókba sorolásnál. A piknídiumok rendszerint csupaszok, de esetenként a serték

(setae) jelenléte, továbbá a piknídiumfal morfológiája szintén taxonómiai jelentőséggel bír.

A morfológiai vizsgálatainkat a *Phoma* fajok taxonómiájának elfogadott koncepciója szerint végeztük (Boerema *et al.*, 2004). Az egyes izolátumok fontosabb tulajdonságait (a telepnövekedés intenzitása, az agaron fejlődő telep felszínének és fonákjának színe, alakja, mérete, szekcióképzés) maláta és zabliszt agarokon jellemeztük. Ezek mellett egyéb morfológiai bélyegeket is feljegyeztünk (légmicélium megléte, szektorképzés, piknídium alakja, mérete, osztióluma, klamidospóra-képzés, 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 átfedései miatt nem lehetett kétséget kizáróan elkülöníteni az egyes taxonokat. Még standardizált körülmények között is előfordult, hogy egy izolátum (*Phoma pinodella* PD77/165) azonos telepéről, azonos időben, azonos táptalajra leoltott tenyészetei 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 találhatók 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* (syn.: *Ascochyta phaseolorum* Saccardo) fajok izolátumainak egymástól történő elkülönítése is. Kövics *et al.* (1999) a Mycological Research-ben megjelent cikkükben már utaltak rá, hogy a két faj feltételezhetően azonos. A morfológiai bélyegeket vizsgálva megállapítható, hogy sem telepmorfológiában, sem a piknidiumok, sem a 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 előidézhetheti a pozitív NaOH-reakcióért felelős „E-metabolit” anyagcseretermék hiányát valamely izolátumnál, különösen a közel 70 éves tartós tárolás (1939-től) és ismeretlen számú átoltást követően. Újabb izolátu azonban –tekintettel a kórokozó ritka fellépésére – nem állt rendelkezésünkre.

A *P. exigua* var. *exigua* Ph 58 izolátumának morfológiai bélyegeken alapuló taxonómiai helyzetét is bizonytalannak találtuk. A telepmorfológia, piknidium 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 biológiai elemzések során mindhárom marker esetében az izolátum a *P. pinodella* csoportba került. A morfológiai és molekuláris biológiai eredmények ismeretében joggal feltételezhetjük az izolátumot deponáló személy téves identifikációját.

A biológiai fajfogalom, mely egyes taxonok körében (Anderson és Stasovski, 1992; Anderson és Ullrich, 1979; Korhonen, 1978) eligazító megoldást jelent taxonómiai kérdésekben, a *Phoma* genus fajainak körében nem, vagy csak korlátozottan alkalmazható, mivel a genus-ba tartozó fajok többségének nem ismert a teleomorfa alakja.

A 20. század végén a molekuláris biológia rohamos fejlődésének köszönhetően új fajfogalom jelent meg a taxonómiában: a *filogenetikai* fajfogalom, mely középpontjában

napjainkban a DNS-polimorfizmus áll, bár korábban fehérje-polimorfizmus vizsgálattal is történtek próbálkozások. A '90-es évek közepén a biokémia és molekuláris biológia fejlődésével izoenzimek összehasonlító vizsgálatát (fehérjepolimorfizmus) alkalmazták molekuláris markerként a *Phoma* genusban is, hogy elkülönítsék a morfológiailag közeli, de feltételezhetően eltérő fajhoz tartozó izolátumokat (Kövics, 1995). A későbbiekben azonban a fehérjepolimorfizmus profil (zymogram) meghatározásokat egyre inkább a DNS-polimorfizmus vizsgálatok váltották fel a filogenetikai célú elemzésekben.

Jelenlegi ismereteink alapján a DNS-szekvencia elemzése (molekuláris taxonómia) tűnik a legalkalmasabb, és talán a legmegbízhatóbb módszernek a gombák törzsfajlásának, rokonsági viszonyainak vizsgálatára. A molekuláris taxonómiai vizsgálatok már eddig is számos lényeges változást eredményeztek a gombák filogenetikai rendszerének pontosításában. A szekvenciaadatok korszerű, számítógépes feldolgozása, törzsfák készítése új lehetőségeket nyújt a mikológusoknak a rendszertan megújítására. Harrington és Rizzo (1999) szerint filogenetikai szempontból azonos fajnak tekintendő a populáció azon legkisebb egysége, amely bizonyíthatóan egy közös őstől származik, és valamilyen egyedi, jól diagnosztizálható fenotípusos jelleggel rendelkezik.

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 fajkonceptió* érvényesítése napjainkig még csak kevés fajra, fajkomplexre terjedt ki a *Phoma* genuson belül (Voigt *et al.*, 2005; Fatehi *et al.*, 2003; Mendes-Pereira *et al.*, 2003; Balmas *et al.*, 2005).

A DNS-polimorfizmus alkalmazhatóságának is megvannak a maga korlátai, és kellő óvatossággal kell értékelni, interpretálni az eredményeket. Gyakran előfordul ugyanis, hogy a vizsgált gén vagy DNS-szakasz polimorf egy adott fajon belül, vagy az ellenkezője is tapasztalható: hogy ugyanaz a szakasz változatlanul megtalálható két külön fajban is. Hogy elkerüljük az ilyen típusú hibákat, célszerű több gén vagy DNS-szakasz genealógiáját megvizsgálni a filogenetikai kapcsolatok feltárása során. Maiden (1997) ezt a filogenetikai fajkonceptiót „közös leszármazás-elv”-nek hívja (Genealogical Concordance Concept=GCC). Az elmélet a „közös származáson alapuló fajelismerés” (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition=GCPSR)

nevet viseli. A rendszer lényege, és a megbízhatóságát növeli, hogy mindig több gént vizsgál a rokonsági kapcsolatok elemzésénél (Taylor *et al.*, 2000).

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,  $\beta$ -*tubulin*), amelyek szakirodalmi adatok szerint korábban már sikerrel alkalmaztak filogenetikai kapcsolatok tanulmányozására több élőlény csoportban, köztük a gombák országában (Fungi) is. Filogenetikai vizsgálatok során általában célszerű több gént vizsgálni, mivel a GCPSR elmélet szerint (Taylor *et al.*, 2000) több gén összehasonlításakor pontosabb és megbízhatóbb eredményt kapunk az egyes filogenetikai kapcsolatokra.

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: Druzhinina és Kubicek (2005) *Trichoderma* fajok, Knutsen *et al.* (2004) *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides* és *F. langsethiae* fajkomplex elkülönítésére használták sikerrel.

Az ITS-régiók evolúciós mércével mérve viszonylag gyorsan változóak. Számos tanulmány alátámasztja, hogy az ITS-régiók alkalmasak rokonsági kapcsolatok vizsgálatára a gombáknál (Yli-Mattila *et al.*, 2004; Voglmayr és Yule, 2006; Morocco és Fatehi, 2007; Pademsee *et al.*, 2008; Takamatsu *et al.*, 2008). Az ITS-szekvenciák elemzése a *Phoma* genus-on belül eddig csak kisebb csoportok elkülönítő vizsgálatára korlátozódott. Az ITS-szekvenciákat használták 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  $\beta$ -*tubulin* gént szintén többen alkalmazták már gombák rendszertani kapcsolatainak feltárására (Ayliffe *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2004; Yli-Mattila *et al.*, 2004), azonban a *Phoma* genuson belül erre kevés irodalmi utalás van. Voigt *et al.* (2005) a  $\beta$ -*tubulin* gént is felhasználták a *Phoma lingam* teleomorf alakjának (*Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* fajkomplex) vizsgálatokor az ITS-régiók mellett, továbbá Fatehi *et al.* (2003) is alkalmazta az „*Ascochyta pinodes*-komplex” taxonómiai elemzésére.



Az általunk megvizsgált filogenetikai markerek (*tefl*, ITS,  $\beta$ -*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 nemcsak a fajon belüli izolátumok (Mendes-Pereira *et al.*, 2003; Balmas *et al.*, 2005) vagy fajkomplexek (Fatehi *et al.*, 2003) vizsgálatára, hanem az egyes fajok elkülönítésére is a *Phoma* nemzetségen belül.

A vizsgált *Phoma* fajok egyértelműen elkülöníthetők voltak a közeli rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól: *Ascochyta rabiei* /teleomorf: *Didymella rabiei*/, *Ascochyta lentis* /teleomorf: *Didymella lentis*/. Mivel a *Phoma* és *Ascochyta* fajok elkülönítése gyakran nem könnyű feladat az *in vivo* különböző sejtszámú konídiummal rendelkező *Phoma* (pseudo-*Ascochyta*) fajok esetében (Fatehi *et al.*, 2003), ez a molekuláris bélyeg további segítséget nyújthat a hovatartozás egyértelmű megállapításához.

Az egyes szekvenciák karakteralapú filogenetikai elemzéssel (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian method) létrehozott filogenetikai törzsfák alapján a *Phoma* fajok egyértelműen elkülöníthetők voltak egymástól, illetve a közeli rokon *Ascochyta* nemzetség fajaitól. A különböző módszerekkel generált törzsfák nem tértek el lényegiekben egymástól, mely alátámasztja a módszerek külön-külön is fennálló megbízhatóságát. 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.

## 5. Új eredmények

1. Munkánk során kilenc *Phoma*-szerű taxon huszonkét izolátumát vizsgáltuk morfológiai és molekuláris bélyegek összehasonlításával, ezek rendszertani helyzetét részben megerősítettük, részben újrarendszerezésükhöz 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,  $\beta$ -*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  $\beta$ -*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 (Irinnyi 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* csoportba 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).

## 6. Összefoglalás

Munkánk során kilenc *Phoma*-szerű taxon huszonkét izolátumát hasonlítottuk össze morfológiai és molekuláris bélyegek alapján.

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, piknídiumképzés 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,  $\beta$ -*tubulin*), melyek megfelelőnek bizonyultak a faji szintű rokonsági kapcsolatok vizsgálatára a *Phoma* genus izolátumainál. Ezek között a *tefl* gén – melyet korábban még nem hasonlók filogenetikai rokonságvizsgálati céllal e gomba 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 képző *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.

Három különböző nukleotid-alapú filogenetikai módszert alkalmaztunk (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian method) 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  $\beta$ -*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, taxonómai 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 (Irinyi *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.

## 7. Summary

In our research we have studied twenty-two isolates of nine different *Phoma*-like species on the basis of morphological and molecular characters.

The isolates were characterized and identified morphologically in details, according to an accepted concept based on standardized *in vitro* physiological and morphological characters of *Phoma*-like species.

Different pathogenic *Phoma*-like species (*Phoma pinodella*, *Phoma sojicola*, *Phyllosticta sojicola*, *Phoma exigua* var. *exigua*) have been found on Fabaceae species, including soybean (*Glycine max*). Since these species are very similar to each other both symptomatically and morphologically, and strain-dependent variability it is hard to delimit them. Consequently, this has resulted in uncertainty and misidentification in their taxonomy. Therefore there is a need to develop additional rapid molecular methods to enable accurate identification.

*Phoma sojicola* (Abramov) Kövics et al. highly resembles morphologically to *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch. According to Kövics *et al.* (1999), there are profound morphological differences in cultural characteristics, pycnidia production and crystal formation between the two aforementioned species. However, in our studies, crystal formation was not observed in either of the species which can be attributed to that this feature may depend on cultural conditions and/or other factors (longevity of storage, temperature, number of transfer).

On the basis of morphological characters the *Phyllosticta sojicola* showed great similarity to *Phoma exigua* var. *exigua*. The sporadic incidence of *P. sojicola* on soybeans and the examination of living cultures makes its identification difficult.

We have selected phylogenetic markers (*tefl*, ITS,  $\beta$ -*tubulin*) that were suitable for phylogenetic studies and identification at species level within the *Phoma* genus. Phylogenetic studies of the two protein-encoding genes *tefl* and  $\beta$ -*tubulin*, together with the ITS sequences yielded consensual results. The highest resolution could be revealed by the analysis of *tefl* gene, whereas sequences of ITS and  $\beta$ -*tubulin* showed the lowest polymorphism among the examined *Phoma* species.

According to the phylogenetic trees based on molecular markers, the *Phoma* species were well separated from the closely related *Ascochyta* taxa: *Ascochyta rabiei* /teleomorph: *Didymella rabiei*/, *Ascochyta lentis* /teleomorph: *Didymella lentis*/. As the

identification of *Phoma* and *Ascochyta* genera based on morphological characteristics is often confusable, these new phylogenetic markers can be useful tools for mycologists to identify unknown species.

The species represented by more than one isolate were classified in the same subgroup (*P. pinodella*, *P. exigua*, *P. glomerata*, *P. plurivora*), which prove that the molecular sequences are well suited for delineating phylogenetic relationships within the *Phoma* genus.

For phylogenetic analysis, three different character-based methods were used (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian method) to evaluate their applicability of each marker. In our experience, the most suitable method seemed to be the Bayesian analysis due to its complexity, reliability and fastness.

Soybean pathogenic *P. sojicola* (syn.: *Ascochyta sojicola*) was described as a new combination (comb.nov.) in 1999 by Kövics *et al.* In our presented performed studies, the morphological differences were small and delimitation was made basically on the absence of crystal production on MA, in contrast to *P. pinodella*. However, this feature appears to be an unstable character, viz. in our experiments none of the isolates produced crystals. All phylogenetic relationship analyses classified *Phoma sojicola* in the same clades of *P. pinodella*. Based on the presented genealogical concordance phylogenetic species recognition and morphological results, we suggest the re-classification of *Phoma sojicola* (Abramov) Kövics *et al.* as synonymous with *P. pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch (Irianyi *et al.*, 2009).

The morphological characters of the *Phyllosticta sojicola* isolate (CBS 301.39, deposited by Böning in 1939) discussed in this study, together with its molecular features, proved that *Phyllosticta sojicola* Massal. is synonymous with *Phoma exigua* Desm. var. *exigua*. This supports our hypothesis based on examined type material, that *P. sojicola* on leaves of *Glycine max* (Massalongo, 1900) represents the plurivorous *P. exigua* var. *exigua*.

## 8. Irodalom

- Aa, H.A. van der (1973). Studies in *Phyllosticta* I. Studies in Mycology 5: 1-110.
- Aa, H.A. van der, van Kesteren, H.A. (1971). The identity of *Phyllosticta destructiva* Desm. and similar *Phoma*-like fungi described from Malvaceae and *Lycium halimifolium*. Acta Botanica Nederlandica 20: 552-563.
- Aa, H.A. van der, van Kesteren, H.A. (1979). Some pycnidial fungi occurring on *Atriplex* and *Chenopodium*. Persoonia 10: 267-276.
- Aa, H.A. van der, Vanev, S. (2002). A revision of the species described in *Phyllosticta*. CBS, Utrecht. pp. 510.
- Aa, H.A. van der, Boerema G.H., de Gruyter, J. (2000). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – VI.-1. Section *Phyllostictoides*: Characteristics and nomenclature of its type species *Phoma exigua*. Persoonia 17: 435-456.
- 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.
- Abramov, I.N. (1931). Gribnyje bolezni sojevich bobov na Dalnem Vostoke. Bolezni i vrediteli sojevich bobov na Dalnem Vostoke. Vladivostok. 84 pp. Sojevaja ascochyta – *Ascochyta sojaecola* sp.nov. 62-70. (Ref. Review of applied mycology. 11: 87-89., 1932.)
- Ainsworth, G.C. (1966). A general purpose classification of fungi. Bibliography of Systematic Mycology 1: 1-4.
- Alcorn, J.L. (1968). Occurrence and host range of *Ascochyta phaseolorum* in Queensland. Australian Journal of Biological Sciences 21: 1143-1151.
- Anderson, J.B., Stasovski, E. (1992). Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. Mycologia 84: 505-516.
- Anderson, J.B., Ullrich, R.C. (1979). Biological species of *Armillaria mellea* in North America. Mycologia 71: 402-414.
- Apple, D.J., Gordon, T.R. (1996). Relationships among pathogenic and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. Molecular Plant-Microbe Interactions 9: 125-138.
- Armbrust, E. V., Galindo, H. M. (2001). Rapid evolution of a sexual reproduction gene in centric diatoms of the genus *Thalassiosira*. Applied and Environmental Microbiology 67: 3501-3513.
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., Kursar, T.A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecology Letters 3: 267-274.
- Arx, J.A. von, Müller, E. (1975). A re-evaluation of the bitunicate *Ascomycetes* with keys to families and genera. Studies in Mycology 9: 1-159.
- Avise, J.C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Avise, J.C., Wollenberg, K. (1997). Phylogenetics and the origin of species. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94: 7748-7755.
- Ayliffe, M. A., Dodds, P. N., Lawrence, G. J. (2001). Characterisation of a *beta-tubulin* gene from *Melampsora lini* and comparison of fungal *beta-tubulin* genes. Mycological Research 105: 818-826.
- Baldauf, S.L., Doolittle, W.F. (1997). Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa): Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94: 12007-12012.



- Baldauf, S.L., Palmer, J.D. (1993). Animals and fungi are each others closest relatives- congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 11558-11562.
- 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.
- 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.
- Berbee, M.L., Taylor, J.W. (2001). Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. pp. 229-245. In: *The Mycota, Vol. 7B, Systematics and evolution*. McLaughlin, D.J, McLaughlin E.G., Lemke, P.A. (Eds.) Springer-Verlag, New York, USA.
- Bernier, L., Hamelin, R.C., Ouellette, G.B. (1994). Comparison of ribosomal DNA length and restriction site polymorphisms in *Gremmeniella* and *Ascocalyx* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1279-1286.
- Besl, H., Bresinsky, A. (1997). Chemosystematics of *Suillaceae* and *Gomphidiaceae* (suborder *Suillineae*). *Plant Systematics and Evolution* 206: 223-242.
- Binder, M., Hibbett, D.S. (2002). Higher-level phylogenetic relationships of *Homobasidiomycetes* (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 76-90.
- Boerema, G.H. (1964). *Phoma herbarum* Westend., type-species of the form-genus *Phoma* Sacc. *Persoonia* 3: 9-16.
- Boerema, G.H. (1965). Spore development in the form-genus *Phoma*. *Persoonia* 3: 413-417.
- Boerema, G.H. (1970). Additional notes on *Phoma herbarum*. *Persoonia* 6: 15-28.
- Boerema, G.H. (1972). *Ascochyta phaseolorum* synonymous with *Phoma exigua*. Short communication. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 78: 113-115.
- Boerema G.H. (1976). The *Phoma* species studied in culture by Dr. R.W.G. Dennis. *Transactions of British Mycological Society* 67: 289-319.
- Boerema G.H. (1984). Mycologisch-taxonomisch onderzoek. Echte *Ascochyta*-sorten (met hyaliene conidien) die pathogeen zijn voor *Papilionaceae*. *Ascochyta*'s met lichtbruine conidien die pathogeen zijn voor *Chenopodiaceae*. Verslagen en Mededelingen Plantenziektenkundige Dienst Wageningen 162: (Jaarb. 1983) 23-34.
- Boerema G.H. (1985). Mycologisch-taxonomisch onderzoek. Bodem-*Phoma*'s. Verslagen en Mededelingen plantenziektenkundige Dienst Wageningen 163: (Jaarb. 1984) 34-40.
- Boerema G.H. (1986). Mycologisch-taxonomisch onderzoek. Een subtropische bodemschimmel die zich ook thuis voelt in onze kassen. Verslagen en Mededelingen Plantenziektenkundige Dienst Wageningen 164: (Jaarb. 1985) 28-32.
- Boerema, G.H. (1993). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – II. Section *Peyronellaea*. *Persoonia* 15: 197-221.
- Boerema, G.H. (1993). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – V. Subdivision of the genus in sections. *Mycotaxon* 64: 321-333.
- Boerema, G.H. (1997). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – V. Subdivision of the genus in sections. *Mycotaxon* 64: 321-333.
- Boerema, G.H., Bollen, G.J. (1975). Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. *Persoonia* 8: 111-144.

- Boerema, G.H., Dorenbosch, M.M.J. (1970). On *Phoma macrostomum* Mont., an ubiquitous species on woody plants. *Persoonia* 6: 49-58.
- 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., de Gruyter, J. (1998). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – VII. Section *Sclerophomella*: Taxa with thick-walled pseudoparenchymatous pycnidia. *Persoonia* 17: 81-95.
- Boerema, G.H., de Gruyter, J. (1999). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – III. Supplement. Additional species of section *Plenodomus*. *Persoonia* 17: 273-280.
- Boerema G.H., Höweler, L.H. (1967). *Phoma exigua* Desm. and its varieties. *Persoonia* 5: 15-28.
- Boerema, G.H., van Kesteren, H.A. (1964). The nomenclature of two fungi parasiting *Brassica*. *Persoonia* 3: 17-28.
- 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., Loerakker, W.M. (1981). *Phoma piskorzii* (Petraik) comb. nov., the anamorph of *Leptosphaeria acuta* (Fuckel) P.Karst. *Persoonia* 11: 311-315.
- Boerema G.H., Loerakker, W.M. (1985). Notes on *Phoma* 2. *Transactions of British Mycological Society* 84: 289-302.
- Boerema G.H., Dorenbosch, M.M.J., van Kesteren, H.A. (1965a). Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea*. *Persoonia* 4: 47-68.
- Boerema, G.H., Dorenbosch, M.M.J., Leffring, L. (1965b). A comparative study of the black stem fungi on lucerne and red clover and the footrot fungus on pea. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 71: 79-89.
- 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, G.H., de Gruyter, J., van de Graf, P. (1999). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – IV. Supplement. An addition to section *Heterospora*: *Phoma schneiderae* spec. nov., synanamorph, *Stagonosporopsis lupini* (Boerema and R. Schneid.) comb. nov. *Persoonia* 17: 281-285.
- Boerema, G.H., de Gruyter, J., van Kesteren, H.A. (1994). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – III.-1. Section *Plenodomus*: Taxa often with a *Leptosphaeria* teleomorph. *Persoonia* 15: 431-487.
- Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. (1997). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – IV. Section *Heterospora*: Taxa with large sized conidial dimorphs, in vivo sometimes as *Stagonosporopsis* synanamorphs. *Persoonia* 16: 335-371.
- Boerema, G.H., Kesteren, H.A., van Loerakker, W.M. (1981a). Notes on *Phoma*. *Transactions of the British Mycological Society* 77: 61-74.
- Boerema G.H., Cruger, G., Gerlach, M., Nirenberg, H. (1981b). *Phoma exigua* var. *diversispora* and related fungi on *Phaseolus* beans. *Zeitschrift für*

- Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (Journal of Plant Disease and Protection) 88: 597-607.
- 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.
- Boerema, G.H., Loerakker, W.M., Hamers, Maria E.C. (1996). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – III.-2. Misapplications of type species name and the generic synonyms of section *Plenodomus* (Excluded species). *Persoonia* 16: 141-190.
- 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, Ehing, Germany pp. 1-370.
- Bontea, V. (1985). Ciuperci parazite si saprofite din România. Vol. I. Ed. Ac. Rep. Soc. Rom., Bucuresti pp. 1-376.
- Böning, K. (1938). *Phyllosticta*-Fleckenkrankheit der Sojabohne. *Prakt. Bl. Pflanzenb.* 16: 168-172.
- Boyd, M.L., Carris, L.M. (1997). Molecular relationships among varieties of the *Tilletia fusca* (*T. bromi*) complex and related species. *Mycological Research* 101: 269-277.
- Brasier, C.M. (1987). The dynamics of fungal speciation. pp. 231-260. In: *Evolutionary Biology of the Fungi*. Rayner, A.D.M., Brasier, C.M., Moore, D. (Eds.) Cambridge University Press, Cambridge.
- Braun, U., Takamatsu, S. (2000). Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (*Erysipheae*) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (*Cystothecaceae*) inferred from rDNA ITS sequences – some taxonomic consequences, *Schlechtendalia* 4: 1-33.
- Brewer, J.G., Boerema, G.H. (1965). Electron microscope observations on the development of pycnidiospores in *Phoma* and *Ascochyta* spp. *Proc. Konink. Neder. Akad. Wetenschappen, Series 68*: 86-97.
- Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- Buchanan, P.K. (1987). A reappraisal of *Ascochytulula* and *Ascochytellula* (Coelomycetes). *Mycological Papers* 156: 1-83.
- Bunyard, B.A., Nicholson, M.S., Royse, D.J. (1994). A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia* 86: 762-772.
- Bunyard, B.A., Nicholson, M.S., Royse, D.J. (1996). Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology* 20: 243-253.
- Burns, R.G., Surridge, C.D. (1994). Tubulin: conservation and structure. pp. 3–31. In: *Microtubules*. Hyams, J. S. & Lloyd, C. W. (Eds.) Wiley-Liss, New York.
- Buscot, F., Wipf, D., Battista, C.D., Munch, J.C., Botton, B., Martin, F. (1996). DNA polymorphism in morels: PCR-RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycological Research* 100: 63-71.
- Chen, W. (1992). Restriction fragment length polymorphism in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Phytophthora* species. *Phytopathology* 83: 1489-1497.
- 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.
- Chilvers, M.I., Rogers, J.D., Dugan, F.M., Stewart, J.E., Chen, W., Peever, T. (2009). *Didymella pisi* sp. nov., the teleomorph of *Ascochyta pisi*. *Mycological Research* 113: 391-400.
- Chiu, S.W., Ma, A.M., Lin, F.C., Moore, D. (1996). Genetic homogeneity of cultivated strains of shiitake (*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. *Mycological Research* 100: 1393-1399.
- Cho, S., Mitchell, A., Regier, J.C., Mitter, C., Poole, R.W., Friedlander, T.P., Zhao, S. (1995). A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1 alpha recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution* 12: 650-656.
- Cole, G.T. (1986). Models of cell differentiation in conidial fungi. *Microbiology Reviews* 50: 95-132.
- Collins, R.A., Saville, B.J., (1990). Independent transfer of mitochondrial chromosomes and plasmids during unstable vegetative fusion in *Neurospora*. *Nature* 345: 177-179.
- Cooke, D.E.L., Kennedy, D.M., Guy, D.C., Russel, J., Unkles, S.E., Duncan, J.M. (1996). Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycological Research* 100: 437-443.
- Cox, G.M., Rude, T.H., Dykstra, C.C., Perfect, J.R. (1995). The actin gene from *Cryptococcus neoformans*: structure and phylogenetic analysis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 33: 261-266.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1: 159-187.
- Crossan, D.F. (1953). Comparative studies of *Ascochyta* from okra, bean and cotton in North Carolina. Abstracts of papers accepted for presentation are the 45<sup>th</sup> 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.
- Darwin, C. (1859). *The Origin of Species by means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. Online version. Project Gutenberg(1999)  
<http://www.marxists.org/reference/archive/darwin/works/origins/index.htm>
- Davis, J.I., Nixon, K.C. (1992). Populations, genetic variations, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41: 421-435.
- Dennis, R.W.G. (1946). Notes on some British fungi ascribed to *Phoma* and related genera. *Transactions of British Mycological Society* 29: 11-42.
- Donaldson, G.C., Ball, L.A., Axelrood, P.E., Glass, N.L. (1995). Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes are useful in differentiating *Fusarium* species. *Mycological Research* 99: 179-187.
- Dorenbosch, M.M.J. (1970). Key to nine ubiquitous soil-borne *Phoma*-like fungi. *Persoonia* 6: 1-14.
- Doyle, J.J. (1995). The irrelevance of allele tree topologies for species delimitation, and a non-topological alternative. *Systematic Botany* 20: 574-588.
- Doyle, J.J. (1997). Trees within trees: Genes and species, molecules and morphology. *Systematic Botany* 46: 537-553.

- 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.
- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Alabouvette, C. (1996). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycological Research* 100: 179-187.
- Edgcomb, V. P., Roger, A. J., Simpson, A. G. B., Kysela, D. T., Sogin, M. L. (2001). Evolutionary relationships among “jakobid” flagellates as indicated by *alpha*- and *beta-tubulin* phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 18: 514-522.
- Edlind, T.D., Li, J., Visvesvara, G.S., Vodkin, M.H., McLaughlin, G.L., Katiyar, S.K. (1996). Phylogenetic analysis of *β-tubulin* sequences from a mitochondrial protozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 359-367.
- Endo, S. (1963). Protecting food crops from diseases. Tokyo 1-693. (in Japanese).
- Ent, F., van den, Amos, L.A., Löwe, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413: 39-44.
- Erland, S. (1995). Abundance of *Tylospora fibrillosa* ectomycorrhizas in a South Swedish spruce forest measured by RFLP analysis of the PCR-amplified rDNA ITS region. *Mycological Research* 99: 1425-1428.
- 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.
- Fatehi, J., Bridge, P.D., Punithalingam, E. (2003). Molecular relatedness within the “*Ascochyta pinodes*”-complex. *Mycopathologia* 156: 317-327.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17: 368-376.
- Felsenstein, J. (1982). Numerical methods for inferring evolutionary trees. *The Quarterly Review of Biology*. 57: 379-404.
- Fitch, W.M. (1971). Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Fletcher, L.D., McDowell, J.M., Tidwell, R.R., Meagher, R.B., Dykstra, C.C. (1994). Structure, expression and phylogenetic analysis of the gene encoding actin I in *Pneumocystis carinii*. *Genetics* 137: 743-750.
- Frandsen, N.O. (1953). *Ascochyta sajaecola* auf Sojabohne in Deutschland. *Phytophath. Z.* 20: 375-382.
- Franzot, S.P., Salkin, I.F., Casadevall, A. (1999). *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 838-840.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (1990). Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. pp. 373-384. In: *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. Samson, R.A., Pitt, J.I. (Eds.) Plenum Press, New York.
- Fröhlich, J., Hyde, K.D. (1999). Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodiversity and Conservation* 8: 977-1004.
- Gardes, M., Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycete-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Geiser, D.M., Pitt, J.I. Taylor, J.W. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 388-393.

- Gerbi, S.A. (1985). Evolution of ribosomal DNA. pp. 419-517. In: Molecular evolutionary genetics. Macintyre, R. J. (Ed.) Plenum, New York.
- Ghiselin, M.T. (1995). Darwin, Progress, and Economic Principles. *Evolution* 49: 1029-1037.
- Ghiselin, M.T. (1997). *Metaphysics and the Origin of Species*. Albany, NY: State University of New York Press.
- Gilbert, G.S., Ferrer, A., Carranza, J. (2002). Polypore fungal diversity and host density in a moist tropical forest. *Biodiversity and Conservation* 11: 947-957.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., Brygoo, Y. (1997). RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution* 14: 1177-1185.
- 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* 61: 1323-1330.
- Goodwin, A.E., Annis, S.L., (1991). Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2482-2486.
- Gottlieb, A.M., Lichtwardt, R.W. (2001). Molecular variation within and among species of Harpellales. *Mycologia* 93: 66-81.
- Graser, Y., El Fari, M., Vilgalys, R., Kujipers, A.F.A., De Hoog, G.S., Presber, W., Tietz, H.J. (1999). Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region *Medical Mycology* 37: 105-114.
- Gruyter, J. de (2002). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – IX. Section *Macrospora*. *Persoonia* 18: 85-102.
- Gruyter, J. de, Boerema, G.H. (2002). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – VIII. Section *Paraphoma*: Taxa with setose pycnidia. *Persoonia* 17: 541-561.
- Gruyter, J. de, Noordeloos, M.E. (1992). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – I.-1. Section *Phoma*: Taxa with very small conidia *in vitro*. *Persoonia* 15: 71-92.
- Gruyter, J. de, Boerema, G.H., van der Aa, H.A. (2002). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – VI-2. Section *Phyllostictoides*: Outline of its taxa. *Persoonia* 18: 1-53.
- Gruyter, J. de, Noordeloos, M.E., Boerema, G.H. (1993). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – I.-2. Section *Phoma*: Additional taxa with very small conidia and taxa with conidia up to 7µm long. *Persoonia* 15: 369-400.
- Gruyter, J. de, Noordeloos, M.E., Boerema, G.H. (1998). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – I.-3. Section *Phoma*: Taxa with conidia longer than 7 µm. *Persoonia* 16: 471-490.
- Guillemaud, T., Raymond, M., Callot, G., Cleyet-Marel, J.C., Fernandez, D. (1996). Variability of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA of a truffle species (*Tuber aestivum*). *Mycological Research* 100: 547-550.
- Gunderson, J.H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K., Sogin, M.L. (1987). Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 5823-5827.
- Hansen, K., LoBuglio, K.F., Pfister, D.H. (2004). Evolutionary relationships of the cup-fungus *Peziza* and Pezizaceae inferred from multiple nuclear genes: RPB2,  $\beta$ -tubulin, and LSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 1-23.

- Hara, K. (1930). *Pathologia agriculturalis plantarum*, ed. 2. Tokyo. 1-950. (*Mycosphaerella sojae* Hori. *Ascochyta sojae* Miura. 276-277.) (in Japanese).
- Harrington, F.A., Wingfield, B.D. (1995). A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* 87: 258-267.
- Harrington, T.C., Rizzo, D.M. (1999). Defining species in the fungi. pp. 43-70. In: *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. J.J. Worrall (Ed.) Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Hasewaga, M., Kishino, H., Yano, T., (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- Hasegawa, M. Hashimoto, T., Adachi, J., Iwabe, N. Miyata, T. (1993). Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of entamoeba that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *Journal of Molecular Evolution* 36: 380-388.
- Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P., Sutton, B., Pegler, D. (1995). *Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8th ed. CABI, Wallingford, UK.
- Hendricks, F.L. (1939). Observations phytopathologiques a la station de Mulungu on 1938. *Publications de l'Institut national pour l'étude agronomique du Congo Belge* 117-128. (Ref.: *Review of Applied Mycology* 19: 329-330. 1940.)
- Hibbett, D.S. Fukumasa-Nakai, Y., Tsuneda, A., Donoghue, M.J. (1995). Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 618-638.
- Hibbett, D.S., Thorn, R. G. (2001). *Basidiomycota: Homobasidiomycetes*. pp. 121-170. In: *The Mycota VII Part B, Systematics and Evolution*. Mclaughlin, D.J., Mclaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.) Springer-Verlag, Berlin.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Hopple, J.S., Jr., Vilgalys, R. (1994). Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA. *Mycologia* 86: 96-107.
- Hopple, J.S., Vilgalys, R. (1999). Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 1-19.
- Hseu, R.S., Wang, H.H., Wang, H.F., Moncalvo, J.M. (1996). Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1354-1363.
- Hsiao, C., Chatterton, N.J. Asay, K.H. Jensen K.B. (1994). Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome* 37: 112-120.
- Hsiao, C., Chatterton, N.J. Asay, K.H. Jensen K.B. (1995). Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, *Triticeae* (*Poaceae*), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences. *Genome* 38: 211-223.
- Hsieh, W.H., Simth, S.N., Snyder, W.C. (1977). Mating groups in *Fusarium monilliforme*. *Phytopathology* 67: 1041-1043.

- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Hughes, S.J. (1953). Conidiophores, conidia and classification. *Canadian Journal of Botany* 31: 577-659.
- Hull, D. L. and M. Ruse, eds., (1998). *The Philosophy of Biology*, Cambridge University Press, UK.
- Hywel-Jones, N. (1993). A systematic survey of insect fungi from natural tropical forest in Thailand. pp. 300-301. In: *Aspects of tropical mycology*. Isaac, S., Frankland, J.C., Watling, R., Whalley A.J.S. (Eds.) Cambridge University Press, UK.
- Illingworth, C.A., Andrews, J.H., Bibeau, C., Sogin, M.L. (1991). Phylogenetic placement of *Athelia bombacina*, *Aureobasidium pullulans*, and *Colletotrichum gloeosporioides* inferred from sequence comparisons of small-subunit ribosomal RNAs. *Experimental Mycology* 15: 65-75.
- Irinyi L., Kövics, G.J., Sándor, E. (2009). Taxonomic re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi. *Mycological Research* 113: 249-260.
- Irwin, D.M., Wilson, A.C. (1991). Limitations of molecular methods for establishing the phylogeny of mammals, with special reference to the position of elephants. In: *American Museum of Natural History Symposium on Mammalian Phylogeny*. Szalay, F.S., Novacek, M.J., McKenna, M.C. (Eds.) Springer-Verlag, New York, USA.
- Ishiyama, T. (1936). New or noteworthy fungi parasitic on agricultural plants in Southern Saghalien. *Transactions of the Sapporo National Historical Society* 14: 297-308.
- Jahnke, K.D., Bahnweg, G. (1986). Assessing natural relationships in basidiomycetes by DNA analysis. *Transactions of the British Mycological Society* 87: 175-191.
- Javid, J., Ashraf, M. (1978). Some observations on soybean diseases in Manchurica. *Manchurica Agr. Expt. Sta. Rpt.* 45: 223.
- Jeng, R.S., Dumas, M., Liu, F.H., Wang, C.L., Hubbes, M. (1997). DNA analysis of *Cylindrocladium floridanum* isolates from selected forest nurseries. *Mycological Research* 101: 285-291.
- Jones, L.K. (1927). 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.
- Jong, S.N., Lévesque, C.A., Verkley, G.J.M., Abeln, E.C.A., Rahe, J.E., Braun, P.G. (2001). Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the  $\beta$ -tubulin gene. *Mycological Research* 105: 658-669.
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D. (1988). Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1238-1247.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. pp. 21-123. In: *Mammalian protein metabolism* Munro, H. N. (ed.) Academic Press, New York.
- Kaiser, W.J., Wang, B.C., and Rogers, J.D. (1997): *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: host specificity, teleomorphs (*Didymella*), hybrid analysis, and taxonomic status. *Plant Disease* 81: 809-816.
- Keeling, P.J., Doolittle, W.F. (1996). Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1297-1305.



- Keeling, P.J., Deane, J.A., McFadden, G.I. (1998). The phylogenetic position of *alpha*- and *beta*-tubulins from the *Chlorarachnion* host and *Cercomonas* (Cercozoa). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 561-570.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*, 10<sup>th</sup> Edition, CABI, The Netherlands.
- Klinkowski, M., Mühle, E., Reinmuth, E. (1966). *Phytopathologie und Pflanzenschutz*. Band II. Akademie Verlag, Berlin. 474-476.
- Klooster, J.W. van't, Berg-Velthuis, G. van den, West, P. van, Govers, F. (2000). *tefl* a *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation factor 1 $\alpha$ . *Gene* 249: 145-151.
- Kluge, A.G., Farris, J.S. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18: 1-32.
- Knutsen, A.K., Torp, M., Holst-Jensen, A. (2004). Phylogenetic analyses of *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *International Journal of Food Microbiology* 95: 287-295.
- Korhonen, K. (1978). Intersterility and size in the *Armillaria mellea* complex. *Karstenia* 18: 31-42.
- Koufopanou, K., Burt, A., Taylor, J.W. (1997). Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 5478-5482.
- Kövics Gy. (1978a). Az *Ascochyta sojaecola* Abramov Magyarországon új szójabetegséget előidéző kórokozó megjelenése. *Tudományos Diákköri Dolgozat*, Debrecen 1-51.
- Kövics Gy. (1978b). Adatok a Magyarországon új szójabetegséget előidéző *Ascochyta sojaecola* Abramov gomba biológiájához. *Diplomadolgozat*, Debrecen 1-50.
- Kövics, G.J. (2004). New observations on etiology of pea *Ascochyta-Phoma* disease complex and  $\alpha$ -esterase isozymes of *Phoma pinodella*. (Újabb megfigyelések a borsó ragya betegségkomplex etiológiája és a *Phoma pinodella* faj összehasonlító  $\alpha$ -észteráz izozimjeinek vizsgálataiban.) pp. 127-137. In: *Integrated agronomy models in the agriculture of 21st century*. Plant production. Pepó, P.-Sárvári, M. (Eds.) Debrecen University Press, Debrecen.
- Kövics, G.J. (1995). Megjegyzések az *Ascochyta - Phoma - Phyllosticta* növénypatogén gombák taxonómiai kérdéseire. *Növényvédelem* 31: 307-315.
- Kövics, G. J. de Gruyter, J. (1995). A comparative study of esterase isozyme patterns of some *Phoma* species occur on soybean. *DATE Tudományos Közleményei (Bulletin of Debrecen Agricultural University)* 31: 191-207.
- 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.
- 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.
- Kurtzman, C.P., Phaff, H.J., Meyer, S.A. (1983). Nucleic acid relatedness among yeasts. pp. 139-166. In: *Yeast Generics Fundamental and Applied Aspects*. Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., Smith, A.R.W. (Eds.) Springer-Verlag, New York, USA.

- Landvik, S., Eriksson, O.E., Berbee, M.L. (2001). *Neolecta* – a fungal dinosaur? Evidence from  $\beta$ -tubulin amino acid sequences. *Mycologia* 93: 1151-1163.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 82: 6955-6959.
- Lang, B.F., O’Kelly, C., Nerad, T., Gray, M.W., Burger, G. (2002). The closest unicellular relative of animals. *Current Biology* 12: 1173-1178.
- Larget, B. Simon, D. (1999). Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 16: 750-759.
- Leal, S.C.M., Bertioli, D.J., Butt, T.M., Carder, J.H., Burrows, P.R., Peberdy, J.F. (1997). Amplification and restriction endonuclease digestion of the *Pr1* gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. *Mycological Research* 101: 257-265.
- Leslie, J.F. (1995). *Gibberella fujikuroi*: Available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany* 73: 282-291.
- Lewis, P.O. (1998). A genetic algorithm for maximum-likelihood phylogeny inference using nucleotide sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 15: 277-283.
- Little, M., Krauhs, E., Ponstingl, H. (1981). Tubulin sequence conservation. *BioSystems* 14: 239-246.
- Liu, Z.I., Sinclair, J.B. (1992). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology* 82: 778-787.
- Loukyanovitch, F.K., Lebedeva, L.A., Kizerietzky, V.A., Ermalayeva, O.I., Obolinsky, S.I. (1931). Vrediteli i bolezni selskohozjajstvennykh rastenij v rajone Turkestanosibirskoj zeleznoj dorogi. *Plant Protection Leningrad* 7: 349-360. Ref.: Review of *Applied Mycology* 11: 315-316. 1932.
- Lutzoni, F., Vilgalys, R. (1995). Integration of morphological and molecular data sets in estimating fungal phylogenies. *Canadian Journal of Botany* 73: 649-659.
- 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., Rossmann, 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.
- Mages, W., Cresnar, B., Harper, J. F., Brüderlein, M., Schmitt, R. (1995). *Volvox carteri* *alpha-2-tubulin*-encoding and *beta-2-tubulin*-encoding genes: regulatory signals and transcription. *Gene* 160: 47-54.
- 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.
- Mallet, J., Wilmott, K. (2003). Taxonomy: renaissance of Tower of Babel? *Trends in Ecology & Evolution* 18: 57-59.
- Marcinkowska, J. (1984). Methods of estimation of the pathogenicity of the fungus *Phoma exigua* var. *exigua*. *Acta Agrobotanica* 37: 141-155.
- Marcinkowska, J. (1985). Charakterystyka izolatow *Phoma exigua*. *Acta Mycologica* 21: 81-90.
- Marcinkowska, J., Tomala-Bednarek, J.W., Schollen-Berger, M. (1982). Soybean diseases in Poland. *Acta Agrobotanica* 35: 213-224.

- Martin, W., Brinkmann, H., Savonna, C., Cerff, R. (1993). Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: Eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydro-genase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 8692-8696.
- Massalongo, C. (1900). *De Nunnulis Speciebus Novis. Mycromycetum Agri Veronensis*. *Attività Istituto Veneto di Scienze*. 59: 684-690.
- Mau, B., Newton, M. (1997). Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *Journal of Computer and Graphics Statistical* 6: 122-131.
- Mau, B., Newton, M., Larget, B. (1999). Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* 55: 1-12.
- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P.A., Bridge, P.D., Riba, G. (1997). Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research* 101: 159-164.
- May, G., Taylor, J.W. (1989). Independent transfer of mitochondrial plasmids in *Neurospora crassa*. *Nature* 339: 320-322.
- Mayden, R.L. (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of species problem. pp. 381-424. In: *Species: The Units of Biodiversity*. Claridge, M.F., Dawah, H.A., Wilson, M.R. (Eds.) Chapman & Hall, London.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge (MA).
- McKean, P. G., Vaughan, S., Gull, K. (2001). The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science* 114: 2723-2733.
- 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.
- Merrick, W.C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological Reviews* 56: 291-315.
- Michelmore, R.W., Hulbert, S.H. (1987). Molecular markers for the genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 25: 383-404.
- Miura, M. (1921). Disease of the main agricultural crops of Manchuria. Co. Manchuria Railway Co. *Agr.Expt.Sta.Bull.* 11: 1-56. (in Japanese, English Abstract, *Japan Journal of Botany* 1: 9. 1922.)
- Moldave, K. (1985). Eukaryotic protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry* 54: 1109-1149.
- Moncalvo, J.M., Wang, H.H., Hseu, R.S. (1995). Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223-238.
- Moncalvo, J.M., Lutzoni, F.M., Rehner, S.A., Johnson J., Vilgalys, R. (2002). Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 49: 278-305.
- 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.
- Moreira, D., Le Guyader, H., Philippe, H. (1999). Unusually high evolutionary rate of the elongation factor-1  $\alpha$ -genes from the Ciliophora and its impact on the phylogeny of eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 234-245.
- Morgan-Jones, G. (1988). Studies in the genus *Phoma*. XIV. Concerning *Phoma herbarum* the type species, a widespread saprophyte. *Mycotaxon*: 29: 447-487.

- Morgan-Jones, G., Burch, K.B. (1987a). Studies in the genus *Phoma*. VIII. Concerning *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*. Mycotaxon 29: 477-487.
- Morgan-Jones, G., Burch, K.B. (1987b). Studies in the genus *Phoma*. IX. Concerning *Phoma jolyana*. Mycotaxon 30: 239-246.
- Morgan-Jones, G., Burch, K.B. (1988a). Studies in the genus *Phoma*. X. Concerning *Phoma eupyrena*, an ubiquitous, soilborne species. Mycotaxon 31: 427-434.
- Morgan-Jones, G., Burch, K.B. (1988b). Studies on the genus *Phoma*. VIII. Concerning *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*. Mycotaxon 29: 477-487.
- Morgan-Jones, G., White, J.F. (1983). Studies in the genus *Phoma*. I. *Phoma americana* sp. nov. Mycotaxon 16: 403-413.
- Morocko, I., Fatehi, J. (2007). Molecular characterization of strawberry pathogen *Gnomonia fragariae* and its genetic relatedness to other *Gnomonia* species and members of *Diaporthales*. Mycological Research 111: 603-614.
- Mullis, K.B. Process for amplifying nucleic acid sequences. U.S. Patent 4,683,202.
- Nelson, G., Platnick, N.I. (1981). Systematics and Biogeography: cladistics and vicariance. Columbia University Press, New York.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., Deerfield, D.W. II. (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, Embnew. News 4: 14.
- Nicholson, M.S. (1995). Restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA for mapping and phylogenetic inference of *Lentinula* species. Ph.D. Thesis, Pennsylvania State University, Dept. of Plant Pathology. pp. 109.
- Nirenberg, H.I., O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434-458.
- Nixon, K.C., Wheeler, Q.D. (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. Cladistics 6: 211-223.
- Noll, W. (1939). Studies on foot rot and wilt in Leguminosae. Z. Pfl.krankheiten und Pfl.schutz 49: 385-431.
- 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.
- Nordnes, S., Krauss, S., Johansen, T. (1994). cDNA sequence of zebrafish (*Brachydanio rerio*) translation elongation factor-1a: molecular phylogeny of eukaryotes based on elongation factor-1a protein sequences. Acta Biochimica et Biophysica 1219: 529-532.
- Nováková-Pfeiferová, J. (1958). Nová houbová choroba soji u nás. Preslia 30: 369.
- Nováková-Pfeiferová, J. (1959). Príspevek k poznání mykóz sóji v Československu. Rostlin-ná Vyroba Rocnik 5 32 (3): 431-436.
- Nugent, K.G., Saville, B.J. (2004). Forensic analysis of hallucinogenic fungi: a DNA-based approach. Forensic Science International 140: 147-157.
- Numic, R. (1962). Prilog poznavanju parazitne mikroflore bosanske posavine. Zastita Bilja 67/68: 141-146.
- O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). Current Genetics 22: 213-220.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution 7: 103-116.

- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.
- 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.
- Ondrej, M. (1968). Príspevek k poznání fytopatogenních hub rodu *Ascochyta* (Lib.) Sacc. Na leguminózách. *Biológia*, Bratisl. 23: 803-818.
- Opiola, P. (1981). Biologia grzyba *Ascochyta sojaecola* Abramov. Praca mgr 274. Kat. Fit. SGGW-AR:
- Padamsee, M., Matheny, P.B., Dentinger, B.T.M., McLaughlin, D. (2008). The mushroom family Psathyrellaceae: Evidence for large-scale polyphyly of the genus *Psathyrella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 415-429.
- Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Peever, T.L., Barve, M.P., Stone, L.J., Kaiser, W.J. (2007). Evolutionary relationships among *Ascochyta* species infecting wild and cultivated hosts in the legume tribes Cicereae and Vicereae. *Mycologia* 99: 59-77.
- Pei, M.H., Whelan, M.J., Halford, N.G., Royle D.J., (1997). Distinction between stem and leaf infecting forms of *Melampsora* rust on *Salix viminalis* using RAPD markers. *Mycological Research* 101: 7-10.
- Persoh, D. (2002). 555-Screening or lichenicolous fungi of *Usnea*. p. 169. In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Mycological Congress. Anonymous. (Ed.) IMC7, Oslo, Norway, 2002.
- Petersen, R.H., Hughes, K.W. (1999). Species and speciation in mushrooms. *Bioscience* 49: 440-452.
- Pietkiewicz, T.A. (1959). Z badan nad mikroflora nasion soi. *Rocz. Nauk. Pol.* 79: Ser. A-Roslinna 1077-1090.
- Pine, E.M., Hibbett, D.S., Donoghue, M.J. (1999). Phylogenetic relationships of cantharelloid and clavarioid Homobasidiomycetes based on mitochondrial and nuclear rDNA sequences. *Mycologia* 91: 944-963.
- Pitt, J.I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Posada, D., Grandall K.A. (1998). Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Punithalingam, E. (1979). Graminicolous *Ascochyta* species. *Mycological Papers* 142: 291-304.
- Rádulescu, E., Paulian, F.L. (1973). Protectia soiei impotriva bolilor si daunatorilor. *Probleme Agricole* 25: 57-63.
- Rannala, B., Yang, Z.H. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304-311.
- Rayner, R.W. (1970). A mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, and British Mycological Society.
- Reynolds, D.R., Taylor, J.W. (1993). The fungal holomorph: An overview. pp. 15-25. In: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Reynolds, D.R. and Taylor, J.W. (Eds.) CAB International, Wallingford, UK.
- Riley, E.A. (1960). A revised list of plant diseases in Tanganyika Territory. Commonwealth Mycological Institute, *Mycological Papers* 75: 18.

- Ritland, C.E., Ritland, K., Straus, N.A. (1993). Variation in the ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex. *Molecular Biology and Evolution* 10: 1273-1288.
- Roger, A.J., Sandblom, O., Doolittle, W.F., Philippe, H. (1999). An evaluation of elongation factor 1 $\alpha$  as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 218-233.
- Rossmann, A.Y. (1994). A strategy for an all-taxa inventory of fungal biodiversity. In: Peng, C.I., Chou, C.H. (eds) *Biodiversity and Terrestrial Ecosystems*. Monograph Series No 14, pp. 169–194. Taiwan, Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei.
- Saccardo, P.A. (1889). *Sylloge Fungorum Omnium Hucusque Cognitorum* Vol. VIII. *Discomycetae et Phymatosphaeriaceae*.
- Saccardo, P.A., Saccardo, D. (1906). *Sylloge Fungorum Omnium Hucusque Cognitorum* Vol. XVIII. Supplement Universale, Pars VII. *Discomycetae-Deuteromycetae*. 1-838.
- Sanger F., Micklen S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5463-5467.
- 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* 15: 5-13.
- Sappal, N.P., Jeng, R.S., Hubbes, M., Liu, F. (1995). Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species. *Genome* 38: 419-425.
- 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.
- Schoch, C.L., Crous, P.W., WingWeld, B.D., WingWeld, M.J. (2001). Phylogeny of *Calonectria* based on comparisons of  $\beta$ -tubulin DNA sequences. *Mycological Research* 105: 1045-1052.
- Schutze, J., Krasko, A., Custodio, M.R., Efremova, S.M., Muller, I.M., Muller, W.E.G. (1999). Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. *Proceedings of the Royal Society London*. B 266: 63-73.
- Shear, C.L., Dodge, B.O. (1927). Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. *Journal of Agricultural Research* 34: 1019-1042.
- Shearer, G. Jr. (1995). Cloning and analysis of cDNA encoding an elongation factor-1 $\alpha$  from the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Gene* 161: 119-123.
- Shinohara, M.L., LoBuglio, K., Rogers, S. (1999). Comparison of ribosomal DNA ITS regions among geographic isolates of *Cenococcum geophilum*. *Current Genetics* 35: 527-535.
- Simay E.I. (1992). Magvizsgálatok eredményei. XIX. – Néhány, a szója magpenészesedését okozó gomba. *Növényvédelem* 28: 168-171.
- Sinclair, J.B., Backman, P.A. (1989). *Compendium of soybean diseases*. Third edition. APS Press, St. Paul, Minesota, USA. 1-106.

- Sinclair, J.B., Schurtleff, M.C. (1975). Compendium of soybean diseases. First edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 1-69.
- Skovgaard, K., Bodker, L., Rosendahl, S. (2002). Population structure and pathogenicity of members of the *Fusarium oxysporum* complex isolated from soil and root necrosis of pea (*Pisum sativum* L.). FEMS Microbiology Ecology 42: 367-374.
- Sprague, R. (1929). Host range and life-history studies of some leguminous *Ascochytae*. Phytopathology 19: 917-932.
- Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Benett, D.E. Coleman, D.C. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 141: 1507-1521.
- Sutton, B.C. (1977). *Coelomycetes* VI. Nomenclature of generic names proposed for Coelomycetes. Mycological Papers 141: 1-253.
- Sutton, B.C. (1980). The Coelomycetes. CAB International Mycological Institute, Kew.
- Sutton, B.C., Sandhu, D.K. (1969). Electron microscopy of conidium development and secession in *Cryptosporiopsis* sp., *Phoma fumosa*, *Melenconium bicolor*, and *M. apiocarpum*. Canadian Journal of Botany 47: 745-749.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Szili M. (1975). A szója 1974. évi és a jövőben várható növényvédelmi problémái II. Baktériumok és gombák okozta megbetegedések. Növényvédelem 11: 545-551.
- Takamatsu, S., Inagaki, M., Niinomi, S., Khodaparast, S.A., Shin, H.D., Grigaliunaite, B., Havrylenko, M. (2008). Comprehensive molecular phylogenetic analysis and evolution of the genus *Phyllactinia* (Ascomycota: Erysiphales) and its allied genera. Mycological Research 112: 299-315.
- Tanabe, Y., Saikawa, M., Watanabe, M.M., Sugiyama, J. (2004). Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 $\alpha$  and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 438-449.
- Tavaré, L. (1986). Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences 17: 57-86.
- Taylor, J.W., Geiser, D.M., Burt, A., Koufopanou, V. (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying strain-typing. Clinical Microbiology Reviews 12: 126-146.
- 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.
- 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.
- Thon, M.R., Royse, D.J. (1999). Evidence for two independent lineages of shiitake of the Americas (*Lentinula boryana*) based on rDNA and  $\beta$ -tubulin genes sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 13: 520-524.
- Tóth O. (1976). A talaj optimális víz- és tápanyagellátásának együttes kutatása c. MÉM tárcaszintű kutatási megbízás teljesítéséről. In: Eredményösszefoglaló III/3.1971-1975: Debrecen 1-59.
- Tóth O., Kövics Gy. (1978). Az *Ascochyta sojaecola* Abramov szója kórokozó magyarországi megjelenése. Növényvédelem 14: 299-304.

- Tóthné Zahorecz E. (1970). Néhány, gazdaságilag jelentős növényparazita mikrogomba hazai előfordulása. *Növényvédelem* 6: 418-422.
- Vilgalys, R., Sun, B.L. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 4599-4603.
- Voglmayr, H., Yule, C.M. (2006). *Polyancora globosa* ge. sp. nov., an aeroaquatic fungus from Malaysian peat swamp forests. *Mycological Research* 110: 1242-1252.
- 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  $\beta$ -tubulin sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 541-557.
- Waalwijk, C., Baayen, R.P., de Koning, J.R.A., Gams, W. (1996). Ribosomal DNA analysis challenge the status *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia* 48: 90-104.
- Waalwijk, C., de Koning, J.R.A., Baayen, R.P., Gams, W. (1996). Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences of small subunit ribosomal RNA. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 33: 15-190.
- Wainright, P.O., Hinkle, G., Sogin, M.L., Stickel S.K. (1993). Monophyletic origins of the Metazoa: "an evolutionary link with fungi". *Science* 260: 340-342.
- 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.
- Walters, H.J., Martin, K.F. (1981). *Phyllosticta sojaecola* on pods of soybean in Arkansas. *Plant Disease* 65: 161-162.
- Wang, C.J.K. (1990). Ultrastructure of percurrently proliferating conidiogenous cells and classification. *Studies in Mycology* 32: 49-64.
- Wang, D.Y.-C., Kumar, S., Hedges, S.B. (1999). Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings of the Royal Society, London. B* 266: 163-171.
- Webster, J. (1986). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 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.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 18: 7213-7218.
- Wery, J., Dalderup, M.J.M., Linde, J.T., Boekhout, T., van Ooyen A.J.J. (1996). Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast* 12: 641-651.
- White, J.F., Morgan-Jones, G. (1987a). Studies in the genus *Phoma*. VI. Concerning *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Mycotaxon* 28: 241-248.
- White, J.F., Morgan-Jones, G. (1987b). Studies in the genus *Phoma*. VII. Concerning *Phoma glomerata*. *Mycotaxon* 28: 437-445.
- 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.
- Wiley, E.O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* 27: 17-26.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wollenweber, H.W., Hochapfel, H. (1936). Beiträge zur Kenntnis parasitärer und sporophytischer Pilze. I. *Phomopsis*, *Dendrophoma* und *Ascochyta* und ihre Beziehung zur Fruchtfäule. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 8: 561-605.
- Yan, Z.H., Rogers, S.O., Wang, C.J.K. (1995). Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. *Mycologia* 87: 72-83.
- 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*,  $\beta$ -*tubulin* sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology* 95: 267-285.

## 9. Mellékletek

### 1. Melléklet

#### *DNS izolálása Omega Fungal DNA Kit (D1090) alkalmazásával*

**1. lépés:** Adjunk a feltárt (folyékony nitrogén vagy Roche MagNA Lyser) mintához 600 µl FG1 puffert, és azonnal keverjük erősen össze, amíg egy homogenizált elegyet nem kapunk!

**2. lépés:** Inkubáljuk a mintát 65°C-on, 10 percen keresztül!

**3. lépés:** Adjunk a mintához 140 µl FG2 puffert és vortex-szel keverjük jól össze, majd centrifugáljuk az így kapott elegyet <10.000 G-n, 10 percig!

**4. lépés:** Óvatosan szívjuk le a felúszót egy tiszta centrifugacsőbe! Vigyázzunk, hogy sejttörmelék ne szívjunk fel! Adjunk a mintához 0,7-szeres mennyiségű izopropanolt, majd vortexeljük jól össze, hogy kicsapódjon a DNS!

Ez a lépés eltávolítja az elegyből a poliszacharidok többségét. Az izopropanol hozzáadása után nem szükséges további inkubáció. Általában mintegy 600 µl felúszót lehetséges leszívni (ez a minta természetétől függően változhat), amelyhez 420 µl izopropanolt szükséges hozzáadni.

**5. lépés:** Azonnal centrifugáljuk a mintát 10.000 G-n, 2 percig, hogy leülepedjen a DNS! A hosszabb centrifugálási idő nem javítja a kihozatalt.

**6. lépés:** Óvatosan szívjuk le, vagy öntsük le a felúszót úgy, hogy a pelletet ne kavargassuk fel! Fordítsuk meg a centrifugacsövet és helyezzük egy papírdarabra 1 percig, hogy az összes folyadékot eltávolítsuk a csőből! A DNS-üledék (pellet) teljes kiszáritása nem szükséges.

**7. lépés:** Adjunk 300 µl 65 °C-ra felmelegített steril vizet a pellethez és szuszpendáljuk fel benne! Egy rövid időtartalmú inkubáció 65 °C-on szükséges lehet, hogy növeljük a DNS oldódását a steril vízben. Adjunk a mintához 4 µl RNase-t és keverjük jól össze! További inkubáció nem szükséges az RNase-os kezeléshez.

**8. lépés:** Adjunk a mintához a 150 µl FG3 puffert, majd 300 µl abszolút etanolt és vortexeljük jól össze, amíg az elegy nem válik homogénné!

Az etanol hozzáadása után keletkezhet némi csapadék, de ez nem befolyásolja a DNS-izolálás további menetét.

**9. lépés:** Tegyük ez egész mintát a HiBind® DNA column-ra, amelyet előzőleg egy 2 ml-es centrifugacsőbe helyeztünk! Centrifugáljuk a mintát 10.000 G-n, 1 percig!

Dobjuk ki az átfolyót és a centrifugacsövet!

**10. lépés:** Tegyük az oszlopot egy tiszta 2 ml-es centrifugacsőbe, és pipetázzunk az oszlopra 750 µl Wash Buffer-t, amelyet előzőleg abszolút etanollal (96–100%) egészítettünk ki. Centrifugáljuk a mintát 10.000 G-n, 1 percig, majd dobjuk ki az átfolyót!

**11. lépés:** Ismételjük meg a 10. mosási lépést még egyszer! 750 µl Wash Buffer-el kiegészítve, 10.000 G-n, 1 percig, és ismét dobjuk ki az átfolyót!

**12. lépés:** Centrifugáljuk az oszlopot üresen, maximum sebességgel, 2 percig, hogy megszársítsuk a mintát! Ez a lépés nagyon fontos (hogy az összes etanolt eltávolítsuk a mintából), mivel az etanol további jelenléte zavarhatja a további munkákat.

**13. lépés:** Helyezzük az oszlopot egy tiszta 1,5 ml-es centrifugacsőbe! Tegyük a membránra 65 °C-ra felmelegített, 100 µl eluáló puffert vagy steril vizet, majd inkubáljuk az oszlopot szobahőmérsékleten 3–5 percig! Centrifugáljuk a mintát 10.000 G-n, 1 percig, hogy eluáljuk a DNS-t a membránról!

Kisebb mennyiségű elúciós puffer vagy víz jelentősen növelheti a DNS-koncentrációt, de a kihozatal (az összmennyiség) kevesebb lesz. Ugyanakkor 200 µl-nél többet használni az eluálásnál ugyancsak nem ajánlott.

**14. lépés:** Ismételjük meg a 13. lépést újabb 100 µl elúciós pufferrel vagy steril vízzel! Ezt egy másik 1,5 ml-es centrifugacsőben végezzük, hogy megtartsuk az első 100 µl magas DNS-koncentrációját!

Hogy megnöveljük a DNS-koncentrációját, az elúciós puffer vagy steril víz hozzáadása után inkubáljuk az oszlopot 60–70 °C-on, 5 percig!

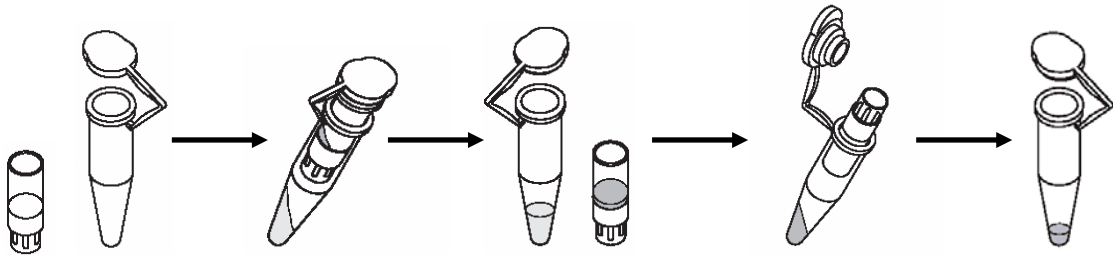
Az izolálás végén nyert DNS összmennyisége nagyon változó a kiindulási minta minőségétől és mennyiségétől függően. Általában 200 mg nedves tömegeből kiindulva 20–50 µg DNS-t lehet izolálni.

## ***2. Melléklet***

### *A PCR-termék tisztítása és koncentrálása*

A termékek tisztítását a Millipore cég Microcon Centrifugal Filter Devices termékei közül az YM-100 (Millipore, 42413) típusúval végeztük (43. ábra). A PCR terméket (50 µl) a filterre pipetáztuk, melyet egy 2 ml-es centrifugacsőbe helyeztünk, és 500 G-n centrifugáltuk 8 percig. Az átfolyót kidobtuk, majd a filtert megfordítva egy tiszta 2 ml-es centrifugacsőbe helyeztük, és 3 percig, 1000 G-n centrifugáltuk. Az így kapott

átfolyó, melynek mennyisége 5–10 µl (50 µl PCR elegyből) már a tisztított és koncentrált PCR-terméket tartalmazza.



44. ábra A PCR termék tisztítása és koncentrációja a Microcon YM-100 termék használatával

### 3. Melléklet

Általunk elhelyezett ITS hozzáférési számok (accession numbers) a GenBank adatbázisában (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

#### EU555533

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate D/075 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|189163921|gb|EU555533.1|[189163921]

#### EU573007

*Phoma exigua* isolate ICMP 13336 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402604|gb|EU573007.1|[190402604]

#### EU573008

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate ICMP 15330 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402605|gb|EU573008.1|[190402605]

#### EU573009

*Phoma exigua* var. *linicola* isolate D/071 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402606|gb|EU573009.1|[190402606]

#### EU573010

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate D/077 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402607|gb|EU573010.1|[190402607]

**EU573011**

*Phoma exigua* isolate D/145 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402608|gb|EU573011.1|[190402608]

**EU573012**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate Ph 58 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402609|gb|EU573012.1|[190402609]

**EU573013**

*Phoma exigua* isolate D/146 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402610|gb|EU573013.1|[190402610]

**EU573014**

*Phoma eupyrena* isolate CBS 375.91 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402611|gb|EU573014.1|[190402611]

**EU573015**

*Phoma pinodella* isolate D/035 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402612|gb|EU573015.1|[190402612]

**EU573016**

*Phoma glomerata* isolate D/034 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402613|gb|EU573016.1|[190402613]

**EU573017**

*Phoma glomerata* isolate ICMP 15788 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402614|gb|EU573017.1|[190402614]

**EU573018**

*Phoma plurivora* isolate D/072 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402615|gb|EU573018.1|[190402615]

**EU573020**

*Didymella rabiei* isolate CBS 581.83A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402617|gb|EU573020.1|[190402617]

**EU573019**

*Phoma plurivora* isolate ICMP 6875 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402616|gb|EU573019.1|[190402616]

**EU573021**

*Phoma foveata* isolate D/048 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402618|gb|EU573021.1|[190402618]

**EU573022**

*Phoma multirostrata* isolate D/044 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402619|gb|EU573022.1|[190402619]

**EU573023**

*Phoma sojicola* isolate D/054 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402620|gb|EU573023.1|[190402620]

**EU573024**

*Phoma pinodella* isolate D/046 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402621|gb|EU573024.1|[190402621]

**EU573025**

*Phoma pinodella* isolate D/045 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402622|gb|EU573025.1|[190402622]

**EU573026**

*Phoma sojicola* isolate CBS 567.97 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402623|gb|EU573026.1|[190402623]

**EU573027**

*Phoma pinodella* isolate D/095 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402624|gb|EU573027.1|[190402624]

**EU573028**

*Phoma pinodella* isolate CBS 318.90 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402625|gb|EU573028.1|[190402625]

**EU573029**

*Phyllosticta sojicola* isolate CBS 301.39 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|190402626|gb|EU573029.1|[190402626]

**EU595358**

*Didymella rabiei* isolate D/144 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
gi|192758049|gb|EU595358.1|[192758049]

*Átalunk elhelyezett tef1 hozzáférési számok a GenBank adatbázisában*

**EU543968**

*Phoma glomerata* isolate ICMP 15788 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031562|gb|EU543968.1|[189031562]

**EU543969**

*Phoma glomerata* isolate D/034 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031564|gb|EU543969.1|[189031564]

**EU543970**

*Phoma pinodella* isolate D/095 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031566|gb|EU543970.1|[189031566]

**EU543971**

*Phoma pinodella* isolate D/045 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031568|gb|EU543971.1|[189031568]

**EU543972**

*Phoma pinodella* isolate D/046 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031570|gb|EU543972.1|[189031570]

**EU543973**

*Phoma pinodella* isolate D/035 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031572|gb|EU543973.1|[189031572]

**EU543974**

*Phoma sojicola* isolate D/054 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031574|gb|EU543974.1|[189031574]

**EU543975**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate Ph 58 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031576|gb|EU543975.1|[189031576]

**EU543976**

*Phoma sojicola* isolate CBS 567.97 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031578|gb|EU543976.1|[189031578]

**EU543977**

*Phoma eupyrena* isolate CBS CBS 375.91 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031580|gb|EU543977.1|[189031580]

**EU543978**

*Didymella rabiei* isolate CBS 581.83A translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031582|gb|EU543978.1|[189031582]

**EU543979**

*Phoma exigua* var. *linicola* isolate D/071 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031584|gb|EU543979.1|[189031584]

**EU543980**

*Phoma exigua* isolate ICMP 13336 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031586|gb|EU543980.1|[189031586]

**EU543981**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate ICMP 15330 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031588|gb|EU543981.1|[189031588]

**EU543982**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate D/075 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031590|gb|EU543982.1|[189031590]

**EU543983**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate D/077 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031592|gb|EU543983.1|[189031592]



**EU543984**

*Phoma exigua* isolate D/146 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031594|gb|EU543984.1|[189031594]

**EU543985**

*Phoma foveata* isolate D/048 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031596|gb|EU543985.1|[189031596]

**EU543986**

*Phoma multirostrata* isolate D/044 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds  
gi|189031598|gb|EU543986.1|[189031598]

**EU552930**

*Phoma plurivora* isolate ICMP 6875 translation elongation factor 1 alpha gene, intron  
gi|189099242|gb|EU552930.1|[189099242]

**EU552929**

*Phoma plurivora* isolate D/072 translation elongation factor 1 alpha gene, intron  
gi|189099241|gb|EU552929.1|[189099241]

**EU595355**

*Phoma pinodella* isolate CBS 318.90 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds  
gi|192758043|gb|EU595355.1|[192758043]

**EU595356**

*Phyllosticta sojicola* isolate CBS 301.39 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds  
gi|192758045|gb|EU595356.1|[192758045]

**EU595354**

*Ascochyta rabiei* isolate D/144 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds  
gi|192758041|gb|EU595354.1|[192758041]

*Általunk elhelyezett  $\beta$ -tubulin hozzáférési számok a GenBank adatbázisában*

**EU541415**

*Phoma eupyrena* isolate CBS 375.91 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151476|gb|EU541415.1|[190151476]

**EU541416**

*Phoma pinodella* isolate D/035 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151478|gb|EU541416.1|[190151478]

**EU541417**

*Phoma pinodella* isolate D/045 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151480|gb|EU541417.1|[190151480]

**EU541418**

*Phoma pinodella* isolate D/095 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151482|gb|EU541418.1|[190151482]

**EU541419**

*Phoma pinodella* isolate D/046 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151484|gb|EU541419.1|[190151484]

**EU541420**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate Ph 58 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151486|gb|EU541420.1|[190151486]

**EU541421**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate D/075 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151488|gb|EU541421.1|[190151488]

**EU541422**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate D/077 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151490|gb|EU541422.1|[190151490]

**EU541423**

*Phoma exigua* var. *linicola* isolate D/071 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151492|gb|EU541423.1|[190151492]

**EU541424**

*Phoma glomerata* isolate D/034 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151494|gb|EU541424.1|[190151494]

**EU541425**

*Phoma exigua* isolate D/145 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151496|gb|EU541425.1|[190151496]

**EU541426**

*Phoma glomerata* isolate ICMP 15788 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151498|gb|EU541426.1|[190151498]

**EU541427**

*Phoma exigua* isolate D/146 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151500|gb|EU541427.1|[190151500]

**EU541428**

*Phoma exigua* var. *exigua* isolate ICMP 15330 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151502|gb|EU541428.1|[190151502]

**EU541429**

*Phoma exigua* isolate ICMP 13336 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151504|gb|EU541429.1|[190151504]

**EU541430**

*Phoma multirostrata* isolate D/044 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151506|gb|EU541430.1|[190151506]

**EU541431**

*Phoma foveata* isolate D/048 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151508|gb|EU541431.1|[190151508]

**EU541432**

*Didymella rabiei* isolate CBS 581.83A beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151510|gb|EU541432.1|[190151510]

**EU541433**

*Phoma sojicola* isolate CBS 567.97 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151512|gb|EU541433.1|[190151512]

**EU541434**

*Phoma sojicola* isolate D/054 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|190151514|gb|EU541434.1|[190151514]

**EU552931**

*Phoma plurivora* isolate ICMP 6875 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|189099237|gb|EU552931.1|[189099237]

**EU552932**

*Phoma plurivora* isolate D/072 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|189099239|gb|EU552932.1|[189099239]

**EU595352**

*Phoma pinodella* isolate CBS 318.90 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|192758037|gb|EU595352.1|[192758037]

**EU595357**

*Phyllosticta sojicola* isolate CBS 301.39 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|192758047|gb|EU595357.1|[192758047]

**EU595353**

*Ascochyta rabiei* isolate D/144 beta-tubulin gene, partial cds  
gi|192758039|gb|EU595353.1|[192758039]

## **10. Köszönetnyilvánítás**

Köszönetem fejezem ki konzulenseimnek **dr. habil. Kövics Györgynek** és **dr. habil. Sándor Erzsébetnek**, akik dolgozatom elkészítésének szakmai irányítójaként útmutatásaikkal, hasznos tanácsaikkal nagy segítséget nyújtottak számomra, valamint köszönetem fejezem ki a **Növényvédelmi Tanszék** minden munkatársának a munkámhoz nyújtott segítségéért.

**Dr. Fekete Erzsébet**, **Fekete Éva** és **dr. Karaffa Levente** hasznos tanácsaikkal és észrevételeikkel bátorították munkámat.

## 11. 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. – Sándor, E. (2007). Classification of *Phoma* species using new phylogenetic marker. *Analele Universității Din Oradea, Fascicula: Protectia Mediului*, Editura Universității Din Oradea, Volume XII, Anul 12: 63-69.
- 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: 4<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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.
- 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: 4<sup>th</sup> 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.

## 12. Nyilatkozatok

### NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Agrár-és Műszaki Tudományok Centrum Mezőgazdaságtudományi Karán a Kerpely Kálmán Doktori Iskola keretében készítettem el a Debreceni Egyetem AMTC MTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2009. július 24.

-----  
a jelölt aláírása

### NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy **Irinyi László Miklós** doktorjelölt 2004 - 2009 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal – irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom – javasoljuk.

Debrecen, 2009. július 24.

-----  
a témavezetők aláírása