

Studia Universitatis  
Scientiarum Agriculturae  
Debreceniensis  
Tom. XXXI.

Scientific Publications of  
the Agricultural University  
of Debrecen  
vol. 31

A Debreceni  
Agrártudományi Egyetem

# **Tudományos Közleményei**

Debrecen, 1995

## A szóján előforduló néhány *Phoma* faj észteráz izoenzim mintázatainak összehasonlító vizsgálata

Kövics György\* - Gruyter, Johannes de

A szóján előforduló, szimptomatológiai hasonlóságuk miatt egymástól alig megkülönböztethető *Ascochyta* és *Phoma* fajok taxonómiája terén meglehetősen nagy a bizonytalanság. Néhány faj leírása kapcsán nem lelhető fel a típus tanulmányozását és taxonómiai helyzetének tisztázását lehetővé tevő herbáriumi (nem élő) vizsgálati anyag, másoknál a névhasználat nem felel meg az International Code of Botanical Nomenclature (1988) előírásainak [pl. *Ascochyta glycine* MIURA, (34), *Ascochyta sojae* MIURA, (35)].

Az *Ascochyta sojicola*-t először ABRAMOV (1) írta le szójáról (*Ascochyta sojaecola* néven) a Szovjetunió Távol-Keleti régiójából. Abramovval egyidőben LOUKYANOVITS *et al.* (28) beszámoltak egy *Ascochyta* fajról Nyugat-Szibériából, amely feltehetőleg azonos volt az *Ascochyta sojicola* - val. FRANDSEN (16) Európában először 1953-ban találta meg az *A. sojaecola* -t Nyugat-Németországban és elhelyezte annak élő állapotban megőrzött izolátumát a CBS Collection Baarn, Hollandia (CBS 113.53) gyűjteményben. Az *A. sojaecola* előfordulását Japánból (15, 22, 27), Belga Kongóból (21), a korábbi Csehszlovákiából (45, 46, 49), Jugoszláviából (47) és NDK-ből (25), Magyarországról (63,64), Romániából (54) valamint Lengyelországból (29, 30, 31, 51, 52) jelezték. A "The Index of Fungi" (62) a gombát mint "*A. sojicola* Abramoff" homonym-ot idézi Petrak's Lists, Suppl. 20 -t alapul véve. Az érvényes névképzési szabályok szerinti korrekció ellenére az "*A. sojaecola*" forma a szakirodalomban ma még általánosan használatos.

Frandsen megfigyelését (16) megelőzően és azt követően is számos, pontosan nem identifikált *Ascochyta spp.*-t találtak a szóján (10, 11, 14, 17, 20, 26, 33, 59).

Az *Ascochyta phaseolorum* Saccardo-t a szóján több országban megfigyelték (22, 55, 56, 57, 64, 65), az Egyesült Államokban először 1929-ben SPRAGUE (60) találta meg a *Phaseolus lunatus* - on. Később

\* A munka a szerző EU COST ösztöndíj támogatásával készült 1994-ben

CROSSAN (12, 13) kimutatta, hogy azok az izolátumok, melyek a babról származtak, morfológiailag, fiziológiailag és patológiailag hasonlóak azokhoz az izolátumokhoz, melyeket egyéb növényekről, pl. szójáról, tehénborsóról, gombórról (*Hibiscus esculentus*), gyapotról, mályvarózsáról, dohányról, paradicsomról és tojásgyümölcsről izoláltak. ALCORN (2) Ausztráliából beszámolt arról, hogy az *Ascochyta phaseolorum* széles gazdanövény-körben károsít: 14 család 48 növényfaján, továbbá 12 faj mesterséges inokuláció során bizonyult fogékonyak. 1972 óta, amikor BOEREMA (4) közölte, hogy az *Ascochyta phaseolorum* Sacc. a *Phoma exigua* Desm. szinonímjának tekintendő, széleskörű kutatás kezdődött a *Phoma* fajok taxonómiájának kutatása terén.

NAUMOVA és USPENSKAYA (42) összegezték az *Ascochyta sojicola* ("A. sojaecola") nevezéktanának történetét, rámutatva arra, hogy a patológusok és taxonómusok véleménye meglehetősen megosztott. Néhány szerző az *Ascochyta sojicola* Abramov-ot önálló fajnak tekinti (1, 8, 16, 27, 41, 42, 43, 46), míg mások úgy gondolják, hogy ez a faj az *Ascochyta phaseolorum* Saccardo (= *Phoma exigua* Desm. var. *exigua*) szinonímja (30, 31, 32, 40, 50, 67) anélkül, hogy a típusanyagot tanulmányozták volna. MARCINKOWSKA (30) 33 izolátumot vizsgált meg, melyek olyan beteg szójalevelekről, szárakról, gyökérnyakról és magvakról származtak, melyeket Lengyelország különböző pontjain termesztettek és úgy találta, hogy a gomba nem a szója specializált károsítója, hanem egy soktápnövényű, gyengültségi vagy sebbparazita, amely sokféle növényt képes megtámadni és ez azonos volt a *Phoma exigua* var. *exigua*-val. A Joanna Marcinkowska gyűjtötte - és szívességből átadott - szója leveleiről mi is az általa identifikált *Phoma exigua* var. *exigua*-t izoláltuk, ami természetesen nem erősíti meg az ő induktív konklúzióját a két faj azonosságára vonatkozóan.

Újabb, részletes taxonómiai vizsgálatok kimutatták, hogy az *Ascochyta sojicola* a *Phoma* genusba tartozik (= *Phoma sojicola*) és a szóján a *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* és a *Phoma sojicola* egyaránt előfordulhatnak hasonló, gyakran megkülönböztethetetlen szántóföldi tünetekkel (19).

A *Phoma* genuson belüli fajok elkülönítésének eredeti kritériuma a konídiumtartó és a konídium morfológiáján, valamint a károsított gazdanövény együttes leírásán alapult. Néhány esetben a konídium ontogéniát is figyelembe vették, azonban ezt a tulajdonságot nehéz

interpretálni, továbbá gyakran nem konzekvens eredményekhez vezethet (5, 38, 61). Néhány szerző fontosnak tart olyan jellemvonásokat is, mint a konídium-válaszfal képzése (6), amely néha kapcsolatban áll a konídium csírázással (39), ezt azonban faji szinten nehezen lehet összehasonlítani, mivel a konídiogén sejt különböző fejlettségű konídiumokat tartalmazhat. BOEREMA és HÖWELER (7) javasolták olyan fiziológiai jellemzők bevezetését is a *Phoma* taxonómiába, mint a másodlagos metabolitok szekréciója (pl. "E" metabolit), meghatározott táptalajon történő kristályképzés és a telep-növekedési jellemzők, újabban pedig számos olyan fiziológiai és biokémiai vizsgálatot is elvégeztek, amelyek leginkább a baktériumok és élesztőgombák taxonómiájában használatosak (36, 37).

A közeli rokonságban lévő, vagy nagyon kicsi morfológiai különbséget mutató fajok elkülönítése tapasztalt patológusok számára is problémát jelent. Vizsgálataink során a szójáról izolálható "*Ascochyta*" és *Phoma* fajok identifikálásánál a hagyományos mikroszkópi, morfológiai, fiziológiai módszerek mellett felhasználtuk az izoenzim analízist is, amely egy hatékony kiegészítő biokémiai technika a fajok identifikálásában (9, 48). A gomba izoenzim vizsgálatokban a legelterjedtebben alkalmazott módszer az ( $\alpha$  és/vagy  $\beta$ )-észteráz izoenzimek meghatározása.

## **Anyag és módszer**

### ***Izoláció:***

A *Phoma* fajok identifikálására általánosan elfogadott morfológiai és biokémiai módszert alkalmaztuk (44) és megvizsgáltunk több mint 30 piknídiumos gombaizolátumot, melyek a szója növényekről és magvakról származtak.

### ***Telep morfológia:***

5 mm átmérőjű micélium korongokat vágunk ki, melyek az aktív növekedésű telepek széléből származtak, ráhelyeztük egy-egy Petri csésze különböző táptalajokat tartalmazó felületére. A táptalajok: zabliszt agar (oatmeal agar, OA: 20 g zabpehely 0,5 l csapvízben megfőzve, átszűrve és 1 l-re csapvízzel kiegészítve, 15 g Oxoid agar No.3 hozzáadásával), maláta agar (malt agar, MA: 40 g malt extract Oxoid L 39, 15 g Oxoid agar No.1, 1 l csapvízben) és meggy-extrakt agar (cherry decoction agar, CA: 300 ml meggy juice 500 g friss meggyből készítve, 1,3 l csapvíz, 27,5 g Oxoid agar No.3). Egy hétig

sötétben, 20 °C-on végzett inkubáció után a telep átmérőjét megmértük és a micéliumszövetek (légmicélium és a telep) színét, valamint a tenyészet fonáki jellemzőit rögzítettük RAYNER (53) színskálájának felhasználásával. Egyéb morfológiai jellemzőket is (a telep alakja, légmicélium jellege, esetleges szektorképzés, jégkristály ("ice-fern") képzés) feljegyeztünk. Ezt követően a Petri csészéket a piknídium képződését elősegítő 13 órás NUV (black light fluorescent lamp, General Electric) megvilágítású, 11 órás sötét periódusú ciklikus inkubálásnak tettük ki. Két hét elteltével a telepek jellemzőit ismét feljegyeztük és három hét után a piknídiumok, konídiumok és egyéb struktúrák (pl. klamidospórák) morfológiáját tanulmányoztuk és részletes rajzokat készítettünk, valamint mikroszkópi méréseket végeztünk. A konídiumok méretét 30 mérés alapján határoztuk meg, a statisztikai értékelés alapján meghatározott Q-értékek a konídiumok hosszúság - szélesség arányát tükrözték.

#### **A poliakrilamid-gél-elektroforézis (PAGE) technika:**

Vizsgálatainkban a Pharmacia LKB Biotechnology AB, Sweden gyártmányú PhastSystem mikro-gél elektroforézis rendszerét alkalmaztuk a gomba  $\alpha$ -észteráz izoenzim analízisben ARULAPPAN (3) módszere szerint.

#### ***A micélium előállítása és kinyerése:***

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

#### ***Enzim extrakció az elektroforézishez:***

A fagyasztott micéliumot az extrakciót megelőző éjszakára 4 °C hőmérsékletű hűtőszekrénybe helyeztük, hogy felolvadjon. Az egész eljárás kontaminációval és magasabb hőmérséklettel szemben igen érzékeny, ezért elengedhetetlen, hogy a minták kezelését klinikai kesztyűben, darált jég között, előhűtött dörzscsészékkel, dörzsrudakkal,

spatulákkal stb. végezzük. Finom kvarchomokot és pufferoldatot adtunk a mintákhoz és azokat a micélium sejteinek roncsolása és a gombaenzimek sejtekből való szabaddá tétele érdekében alaposan szétdörzsöltük. 10 perces centrifugálás (12 000 rpm) után a felülúszót steril pipetta hegyekkel gyűjtöttük össze.

### ***PhastSystem eljárás és festés:***

A teljesen automatikusan programozott PhastSystem elektroforetikus készülék (55) különböző izoenzimek meghatározására alkalmas. A minták előkészítése, a felhasználásra kész mikrogél (PhastGel gradient 8-25) valamint a puffer csíkok (PhastGel native buffer strips) gélágyra helyezése, továbbá a mintaátvivő applikátornak a tartójába történő felhelyezése után az elektroforézis elkezdhető (55). A fehérjék nagyságuknak és töltésmennyiségüknek megfelelően különválnak a grádiens zónában. A festés és a szubsztrátum hozzáadása közvetlenül az elektroforézis befejeződése után történik. Az EDTA 0,03 %, Fast Blue RR-salt 0,06 % és az előzetesen 1 ml acetonban feloldott 0,04 %  $\alpha$ -naphthyl-acetate komponenseket 50 ml 100mM foszfát pufferben (pH 7,4) oldottuk fel (24), s ebben mintegy 15 perc időtartamig, 37 °C - on történt az expozíció. A gél megfestődése után a sávok további diffúziójának elkerülésére a fixáló oldatban (ecetsav:glicerol:tridesztillált víz = 10 : 8 : 82) elvégzett 5 perc időtartamú rögzítéssel az eljárás befejeződik. Ezt követően a zymogramot szobahőmérsékleten megszáritottuk és diakeretbe foglaltuk.

### ***Az eredmények értékelése:***

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

$$R_f = bc/bf$$

bc = egy adott sáv elmozdulási távolsága,

bf = a puffer elmozdulási távolsága (18).

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

## Eredmények

### *Szójáról izolálható Phoma fajok identifikálása:*

#### *Morfológiai vizsgálatok:*

A *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* és "Ascochyta" (= *Phoma*) *sojicola* kórokozók előfordulását tudtuk kimutatni szójáról, melyeket komplett morfológiai analízissel elemeztünk és összehasonlítottuk a rendelkezésre álló referencia izolátumokkal.

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

A D/023 izolátum *Ascochyta sojicola*-ként volt korábban identifikálva a szójáról történt izolálás és a részletesebb morfológiai, biokémiai és izoenzim vizsgálatot megelőzően, majd megállapítva azonosságát, átsoroltuk a *Phoma pinodella* fajba.

A *Phoma exigua* var. *exigua* és a *Phoma pinodella* szóján való előfordulása az első megfigyelés Magyarországon és még nem került publikálásra.

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

A *Phoma sojicola* olyan faj, amely morfológiai tekintetben leginkább a *Phoma pinodella*-hoz áll a legközelebb, de attól karakteresen elkülönül. A *Phoma sojicola* végleges meghatározására és taxonómiai helyzetének tisztázására az eredeti herbáriumi növényanyag mintáinak megvizsgálása, részletes morfológiai és mesterséges inokulációs vizsgálatok elvégzése alapján kerülhetett sor (19).

#### *A poliakrilamid-gél-elektroforézis (PAGE) vizsgálat eredményei:*

Az  $\alpha$ -észteráz izoenzim vizsgálatok (melyek 6 sorozatban, csaknem 50 izolátummal történtek) azt mutatják, hogy az eljárás az

*Ascochyta* és a *Phoma* fajok és varietások elkülönítésére és jellemzésére megfelelően alkalmazható.

Különböző forrásokból származó (talaj, *Phaseolus*, *Pisum*, *Glycine*) *Phoma pinodella* régebbi és új izolátumokat, továbbá két liofilizálással tárolt *Phoma* ("*Ascochyta*") *sojicola* izolátumot tanulmányoztunk (ez utóbbiak egyike az N.O. Frandsen-féle eredeti depozit (CBS, Baarn, Hollandia - CBS 113.53 gyűjteményi jellel nyílvántartott) izolátum (1. táblázat).

***A Phoma sojicola* és a *Phoma pinodella*  $\alpha$ -észteráz sávjai:**

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

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

A *Phoma sojicola* CBS 113.53 izolátuma genetikailag meghatározott  $\alpha$ -észteráz izoenzim összetétele és a saját friss izolátumaink nyilvánvalóan különböznek a *Phoma pinodella*-étól, a táblázat hozzásegített azon izolátumok pontos meghatározásához is, melyeket azt megelőzően *Ascochyta sojicola*-ként identifikáltak.



## A vizsgált izolátumok jellemzői

1. táblázat.

Faj	Izolátum	Gazdanövény	Ország	Izolálás
<i>Phoma</i>	D/053	<i>Glycine max</i> mag	H	1993
<i>(syn.: Ascochyta) sojicola</i>	D/054	<i>Glycine max</i> mag	H	1993
	D/056	<i>Glycine max</i> mag	H	1993
	CBS 113.53	<i>Glycine max</i>	D	1953
<i>Phoma pinodella</i>	D/023	<i>Glycine max</i>	H	1989
	GA-98	<i>Pisum sativum</i>	PL	N.a.*
	GA-108/a	<i>Pisum sativum</i>	PL	N.a.*
	GA-108/b	<i>Pisum sativum</i> hüvely	PL	N.a.*
	PD 74/396	N.a.*	N.a.*	N.a.*
	PD 77/165	<i>Pisum sativum</i>	NL	1977
	PD 81/729	<i>Pisum sativum</i>	NL	1981
	Ph-5	<i>Pisum sativum</i>	PL	N.a.*
	Ph-14	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PL	N.a.*
	Ph-15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PL	N.a.*
	Ph-32	<i>Pisum sativum</i> szár	PL	N.a.*
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	D/060	<i>Glycine max</i> mag	H	1993
	DR/01	<i>Glycine max</i> levél	H	1994
	DR/02	<i>Glycine max</i> levél	H	1994
	DR/03	<i>Glycine max</i> levél	H	1994
	L-27	<i>Glycine max</i> levél	PL	1981
	N-43	<i>Glycine max</i> mag	PL	1980
	P-29	<i>Glycine max</i> szár	PL	1979
	PD90/482	<i>Solanum tuberosum</i>	NL	1990
	Ph-1	<i>Glycine max</i>	PL	1990
	Ph-40	talaj	PL	N.a.*

\* Nincs adat

## A *Phoma sojicola* és a *Phoma pinodella* fajok $\alpha$ -észteráz izoenzim mintázatának összehasonlító értékei

2. táblázat.

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

### A *Phoma exigua* var. *exigua* $\alpha$ -észteráz izoenzimei:

Megfelelő  $\alpha$ -észteráz izoenzim összeállítást tudunk készíteni a *Phoma exigua* var. *exigua* morfológiai jellemzőinek kiegészítésére, amely a gomba 10 különböző izolátumának elemzésén alapul (3. táblázat).

A *Phoma exigua* var. *exigua*  $\alpha$ -észteráz izoenzim izolátumok közötti variabilitása meglehetősen nagy. Három izolátum-pár esetében (L-27/a/b; N-43/a/b és Ph-1/a/b) a megismételt futtatásnál nem kaptunk konzekvens adatokat; bizonyos mértékű intra-izolátumos variabilitás is megfigyelhető volt (1-3 hiányzó sáv). Karakteres  $\alpha$ -észteráz mintázat - néhány izolátum kivételtől eltekintve - figyelhető meg azonban az Rf 0,60-0,63; 0,75-0,79; 0,80-0,82; 0,82-0,85; és a 0,85-0,88 tartományokban (5 stabil  $\alpha$ -észteráz izoenzim sáv). A *Phoma exigua* var. *exigua* izolátumok harmadánál az Rf 0,91-0,93 tartományban is detektálható  $\alpha$ -észteráz izoenzim aktivitás.

## A *Phoma exigua* var. *exigua* $\alpha$ -észteráz izoenzim mintázata

3. táblázat.

Faj	Izolátum	Rf értékek								
		0,60- 0,63	0,64- 0,67	0,69- 0,73	0,75- 0,79	0,80- 0,82	0,82- 0,85	0,85- 0,88	0,88- 0,91	0,91- 0,93
<i>Phoma</i>	D/060	+			+	+	+	+		
<i>exigua</i>	DR/01				+	+	+	+		
var.	DR/02	+		+	+	+	+			
<i>exigua</i>	DR/03	+		+		+	+			
	L-27/a	+		+	+	+	+			
	L-27/b	+	+	+	+	+	+	+		+
	N-43/a	+			+	+				+
	N-43/b	+			+	+	+	+		+
	P-29	+	+	+		+	+	+	+	
	PD90/482		+		+	+	+	+	+	
	Ph-1/a				+	+	+	+		+
	Ph 1/b				+	+	+	+	+	
	Ph-40	+	+		+		+	+	+	

### Megvitatás

A *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* és a *Phoma sojicola* fajok egymástól tenyészbélyegeik, morfológiai sajátosságaik, jégkristályképzési jellemzőik alapján - a megbetegített szóján látható szimptomatológiai hasonlóságuk ellenére - egymástól jól elkülöníthetők. A *Phoma sojicola*, *Phoma pinodella*  $\alpha$ -észteráz izoenzim vizsgálatok megerősítik a fajok közötti genetikai különbözőségeket. Az *Phoma sojicola* és a *Phoma pinodella* egymáshoz közelálló fajok, melyek néhány morfológiai és fiziológiai sajátosságuk, továbbá  $\alpha$ -észteráz izoenzim aktivitásuk alapján is önálló fajoknak tekintendők.

A *Phoma exigua* var. *exigua* sem morfológiai tulajdonságai, sem  $\alpha$ -észteráz izoenzim vizsgálati alapján nem azonos a *Phoma sojicola* fajjal.

### Összefoglalás

A *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* és az 'Ascochyta' *sojicola* okozta betegség tüneteket tudtuk kimutatni szóján. Az izolátumokat komplett morfológiai analízissel elemeztük és összehasonlítottuk a rendelkezésre álló referencia izolátumokkal. A *Phoma exigua* var. *exigua* és a *Phoma pinodella* szóján való előfordulásáról ez az első közlés Magyarországon.

Szója magvokról három frissen izolált tiszta tenyészetet készítettünk, melyek az '*Ascochyta sojicola*' referencia izolátummal azonosíthatók, amely valójában egy *Phoma* genushoz tartozó faj.

Az izolátumok in vitro főként egyszettű, valamint kevés kétszettű konídiumot hoztak létre, továbbá az izolátumok közül az egyik faágszerű kristályokat képezett, amely tulajdonság a *Phoma pinodella* izolátumokra emlékeztet. Mindazonáltal az in vitro morfológiai tulajdonságok alapján arra lehet következtetni, hogy az '*Ascochyta sojicola*' egy különálló faj.

Az izolátumok in vitro morfológiai jellemvonásain alapuló identifikálás megerősítésére a gombaextraktumok kiegészítő  $\alpha$ -észteráz enzimanalízisét is elvégeztük. Az elektroforetikus izoenzim sávmintázat a mikroorganizmus genetikai jellemzőin alapul. Vizsgálatainkban a PhastSystem mikro-gél elektroforézis rendszerét (Pharmacia) alkalmaztuk. 26 *Phoma* izolátum  $\alpha$ -észteráz izoenzim mintázatát határoztuk meg. A 13 *Phoma exigua* var. *exigua* izolátum analízise 5 enzim-lókuszt adott, melyet mint kiegészítő jellemvonást lehet felhasználni az identifikálás során. A *Phoma pinodella* 11 különböző forrásból származó (talaj, *Phaseolus*, *Pisum*, *Glycine*) izolátumainak enzimprofiljából összehasonlító táblázatot állítottunk össze. A *Phoma sojicola* 4 izolátumának  $\alpha$ -észteráz zymogramja nyilvánvalóan különbözött a *Phoma pinodella*- és a *Phoma exigua* var. *exigua*-étól és megerősítette azon izolátumok pontos meghatározását, melyeket azt megelőzően '*Ascochyta sojicola*'-ként identifikáltak.

## Summary

### A comparative study of esterase isozyme patterns of some *Phoma* species occur on soybean

Occurrence of *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* and *Phoma sojicola* were detected on soybean, which were completely analyzed morphologically and compared with available reference isolates. We also obtained three fresh isolates from soybean seeds which were identical with *Phoma sojicola* (Abramov) De Gruyter & Kövics (syn: *Ascochyta sojicola*) isolate. These isolates contained also 2 celled conidia and one of these isolates once formed ice-fern crystals. The occurrence of *Phoma exigua* var. *exigua* and *Phoma pinodella* on soybean is the first observation in Hungary and it has not been published yet. Isozyme analysis is, among other numerous applications in plant pathology, a powerful biochemical technique, especially in species identification. Electrophoretic isozyme banding patterns are based on the genetic conditions of the microorganisms. To the confirmation of identity of pycnidial fungi isolated from soybean, which had been identified on the base of morphological data,

complementary  $\alpha$ -esterase isozyme analyses were made. We applied the PhastSystem micro-gel electrophoretic device (Pharmacia). The  $\alpha$ -esterase isozyme profiles were determined six times with almost 50 isolates and show that this method is suitable for delimitation of *Ascochyta* and *Phoma* species and varieties. *Phoma pinodella* isolates from different sources (soil, *Phaseolus*, *Pisum*, *Glycine*) and two lyophilized *Phoma sojicola* isolates were studied. On the base of the  $\alpha$ -esterase isozyme profiles of *Phoma pinodella* isolates a comparative table was made to promote identification. The  $\alpha$ -esterase zymogram of *Phoma sojicola* was obviously different from those of *Phoma pinodella*, and it helped us to make a proper identification of those isolates which had been determined as *Ascochyta sojicola* before.

Among  $\alpha$ -esterase isozyme bands of *Phoma exigua* var. *exigua* were 5 stable enzyme bands which could be used as additional feature for proper identification. Neither morphological features nor  $\alpha$ -esterase isozyme profiles of *Phoma exigua* var. *exigua* are not identical with those of *Phoma sojicola*.

---

## Irodalom

1. 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. p. Ref. Rev.Appl.Mycol. **11** 87-89., 1932
2. ALCORN, J.L. (1968): Occurrence and host range of *Ascochyta phaseolorum* in Queensland. *Aust.J.biol.Sci.* **21** 1143-1151. p.
3. ARULAPPAN, F.X. (1994): Methodology of fungal isozyme analysis using the PhastSystem micro-gel electrophoresis. *Versl. Meded. plziektenk. Dienst Wageningen, Annual Report 1993, Diagnostic Centre, Plant Protection Service Wageningen, Netherlands*, No. **173** 60-66. p.
4. BOEREMA, G.H.(1972): *Ascochyta phaseolorum* synonymous with *Phoma exigua*. Short communication. *Neth.J.Pl.Path.* **78** 113-115. p.
5. BOEREMA , G.H. & BOLLEN, G.J. (1975): Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*.. *Persoonia* **8** 111-144. p.
6. BOEREMA, G.H. & DORENBOSCH, M.M.J. (1970): On *Phoma macrostomum* Mont., a ubiquitous species on woody plants. *Persdonia* **6** 49-58. p.

7. BOEREMA, G.H. & HÖWELER, L.H.(1967): *Phoma exigua* Desm. and its varieties. *Persoonia* 5 15-28. p.
8. BONDARCEVA-MONTEVERDE, V.N. & VASSILJEVSKIY, N.I. (1940): K biologii i morfologii nektorich vidov *Ascochyta* na bobovich.(A contribution to the biology and morphology of some leguminous *Ascochytae*.) *Acta Instituti Botanici Acad.Sci.URSS. Ser II*, (Fasc.4.) 1938. *Trudi Bot.Inst.Akad.Nauk SSSR. Sporovije rastenija*, Moskva-Leningrad 345-376. p.
9. BONDE, M.R., MICHALES, J.A. & PETERSON, G.L. (1993): The use of isozyme analysis for identification of plant pathogenic fungi. *Plant Disease* 77: 961-968. p.
10. CIFFERI, R. (1927): Notae mycologicae et phytopathologicae. Serie II. No. 5. *Riv.Pat.Veg.* 17 209-294. p.
11. CONNERS, I.L. & SAVILLE, D.B.O.(1944): Twenty-third annual report of the *Canadian Plant Disease Survey*, 1943. 122. p.
12. 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-th Annual Meeting of the American Phytopathological Society Madison, Wisconsin, Sept. 7-10, 1953. *Phytopathology* 43 469. p.
13. CROSSAN, D.F. (1958): The relationship of seven species of *Ascochyta* occurring in North Carolina. *Phytopathology* 48 248-255. p.
14. DARPOUX, H. (1945): Contribution a l'études maladies des plantes oléagineuses en France. *Ann.des Épiphyties* 11 71-103. p.
15. ENDO, S. (1963): Protecting food crops from diseases . Tokyo 693. p. (in Japanese)
16. FRANDBSEN, N.O. (1953): *Ascochyta sojaecola* auf Sojabohne in Deutschland. *Phytopath.Z.* 20 (4) 375-382. p.
17. GARBOWSKI, L. & JURASZKOWNA, H. (1933): Diseases of useful plants in the period 1926 - 1930. *Rocznik Ochrony Roslin* Sect. A. 1 97-235. p.
18. GOTTLIEB, D. & HEPDEN, P.M. (1966): The electrophoretic movement of proteins from various *Streptomyces* species as taxonomic criterion. *J.Gen.Microbiol.* 44: 65-107.p.
19. GRUYTER, J. DE & KÖVICS, G.J. (1995): *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & Burch, and *Phoma sojicola* De Gruyter & Kövics nom.nov. pathogens occurring on soybean. *Mycological Research* (in press)

20. HARA, K. (1930): *Pathologia agriculturalis plantarum*. (in Japanese) Tokyo. 950 pp.
21. HENDRICKS, F.L. (1939): Observations phytopathologiques a la station de Mulungu on 1938. *Publ.Inst.Nat.Etude Agron. Congo Belge* 117-128. Ref.: *Rev.Appl.Mycol.* 19 329-330. p. 1940.
22. ISHIYAMA, T. (1936): New or noteworthy fungi parasitic on agricultural plants in Southern Saghalien. *Trans.Sapporo Nat.Hist.Soc.* 14 297-308. p.
23. AVAID, J. & ASHRAF, M. (1978): Some observations on soybean diseases in Zambia and occurrence of *Pyrenochaeta glycinis* on certain varieties. *Pl.Dis.Reptr.* 62 46-47. p.
24. KARSSSEN, G. (1991): Enzym elektroforese mer wortel knobbel nematoden (genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887). Internal report of the Dutch Plant Protection Service, Wageningen, the Netherlands.
25. KLINKOWSKI, M., MÜHLE, E. & REINMUTH, E. (1966): *Phytopathologie und Pflanzenschutz*. Band II. Akademie Verlag, Berlin. 474-476. p.
26. KOCH, L.W. & HILDEBRAND, A.A. (1944): Soybean diseases in Southwestern Ontario in 1943. *Canadian Plant Dis. Surv. Ann.Rpt.* 23 (1943) 29-32. p.
27. KURATA, H. (1960): Studies of the fungal diseases of soybean in Japan. *Bull.Nat.Inst.Agric.Sci.Tokyo, Ser.C.* (in Japanese with English summary) 1-153. p.
28. LOUKYANOVITSCH, F.K., LEBEDEVA, L.A., KIZERIETZKY, V.A., ERMALAYEVA, O.I. & OBOLINSKY, S.I. (1931): Vrediteli i bolezni selskohozjaistvennych rastenij v rajone Turkestanosibirskoj zeleznoj dorogi. *Plant Prot. Leningrad* 7 349-360. p. Ref. *Rev.Appl.Mycol.* 11 315-316. p. 1932.
29. MARCINKOWSKA, J., TOMALA-BEDNAREK, J.W. & SCHOLLENBERGER, M. (1982): Soybean diseases in Poland. *Acta Agrobotanica* 35 (2) 213-224. p.
30. MARCINKOWSKA, J. (1984): Methods of estimation of the pathogenicity of the fungus *Phoma exigua* var. *exigua*. *Acta Agrobotanica* 37 (2) 141-155. p.
31. MARCINKOWSKA, J. (1985): Charakterystyka izolatów *Phoma exigua*. *Acta Mycologica* 21 (1) 81-90. p.
32. MELNIK, V.A. (1977): *Opredelitel gribov roda Ascochyta* Lib. *Nauka, Leningrad* 246 pp.

33. MENGISTU, A. & SINCLAIR, J.B. (1979): Seedborne microorganisms of Ethiopian-grown soybean and chickpea seeds. *Plant Dis.Rep.* 63 616-619. p.
34. MIURA, M. (1926): Ideta, *Handb.Pl.Dis.Japan*, Suppl. II 682. p.
35. MIURA, M. (1928): Flora of Manchurica and East Mongolia, III Cryptogams, Fungi. *Industr.Contr.S.Manch. Rly* 27 443. p.
36. MONTE, E., BRIDGE, P.D. & SUTTON, B.C. (1990): Physiological and biochemical studies in Coelomycetes. *Phoma. Studies in Mycology* 32 21-28. p.
37. MONTE, E., BRIDGE, P.D. & SUTTON, B.C. (1991): An integrated approach to *Phoma* systematics. *Mycopathologia* 115 89-103. p.
38. MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. (1988a): Conidiogenesis in *Phoma betae*. *Trans.Brit.mycol.Soc.* 90 659-662. p.
39. MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. (1988b): Germination of *Phoma betae* conidia. *Trans.Brit.mycol.Soc.* 91 133-139. p.
40. NARITA, T. & ITO, H. (1973): The fungi identified to *Ascochyta phaseolorum* Sacc. in Hokkaido. I. *Rep. Soc. Pl. Prot. Nth. Japan* 24 (12) 6-13. p.
41. NAUMOVA, E.S. (1988): Vidovoj sostav gribov na soye b usloviyah voronezskoy oblasti. *Mikologiya i Fitopatologiya* 22 (3) 217-223. p.
42. NAUMOVA, E.S. & USPENSKAYA, G.D. (1988): Nomenklatura vzbuditelja askochytoza soi. *Mikologiya i Fitopatologiya* 22 (2) 105-111. p.
43. NAUMOVA, E.S. & USPENSKAYA, G.D. (1989): Vhutrividovoye raznoobraziye griba *Ascochyta sojaecola* Abramov ex Nelen. *Mikologiya i Fitopatologiya* 23 (6) 533-535. p.
44. NOORDELOOS, M.E., de GRUYTER, J., EIJK. G.W. & ROEIJMANS, H.J. (1993): Production of dendritic crystals in pure cultures of *Phoma* and *Ascochyta* and its value as a taxonomic character relative to morphology, pathology and cultural characteristics. *Mycol. Res.* 97 (11) 1343-1350. p.
45. NOVÁKOVÁ-PFEIFEROVÁ, J. (1958): Nová houbová choroba soji u nás. *Preslia* 30 369. p.(Abstr.)
46. NOVÁKOVÁ-PFEIFEROVÁ, J. (1959): Príspevek k poznání mykóz sóji v Československu. *Rostlinná Vyroba Rocnik* 5 32 (3) 431-436. p.
47. NUMIC, R. (1962): Prilog poznavanju parazitne mikroflóre bosanske posavine. *Zastita Bilja* 67/68 141-146. p.



48. NYGAARD, S.L., ELLIOTT, C.K., CANNON, S.J. AND MAXWELL, D.P. (1989): Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology* **79**: 773-780. p.
49. ONDREJ, M. (1968): Príspevek k poznání fytopatogenních hub rodu *Ascochyta* (Lib.) Sacc. na leguminózách. *Biológia*, Bratisl. **23** 803-818. p.
50. ONDREJ, M. (1976): K vyskytu a škodlivosti polyf gni houby *Phoma exigua* Desm. *Ochr.Rostl.* **12** 239-242. p.
51. OPIOLA, P. (1981): Biologia grzyba *Ascochyta sojaecola* Abramov. *Praca mgr 274.Kat.Fit.SGGW-AR*.
52. PIETKIEWICZ, T.A. (1959): Z badan nad mikroflora nasion soi. *Rocz.Nauk Pol.* **79-A-4** 1077-1090. p.
53. RAYNER, R.W. (1970): A mycological colour chart. Kew, Surrey: *C.M.I. & Br.mycol.Soc.*
54. RÁDULESCU, E. & PAULIAN, F.L. (1973): Protectia soiei impotriva bolilor si daunatorilor. *Probleme Agricole* **25** 57-63. p.
55. RICHARDSON, B.J., BAVERSTOCK, P.R. & ADAMS, M. (1986): Allozyme Electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Academic Press Inc., San Diego, California 92101.
56. RILEY, E.A. (1960): A revised list of plant diseases in Tanganyika Territory. *Commonw.Mycol Inst. Mycol.Papers* **75** 18. p.
57. 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. p.
58. SAWADA, K. (1959): Descriptive catalogue of Taiwan (Formosan) fungi. Part XI. *Natl.Taiwan Univ.(Taipei) Coll. Agr.Spec.Bull.* **8** 268pp.
59. SMARTT, J. (1960): A guide to soya bean cultivation in Northern Rhodesia. *Rhodesia Agr.J.* **57** 459-463. p.
60. SPRAGUE, R. (1929): Host range and life-history studies of some leguminous *Ascochytae*. *Phytopathology* **19** 917-932. p.
61. SUTTON, B.C. & SANDHU, D.K. (1969): Electron microscopy of conidium development and secession in *Cryptosporiopsis* sp., *Phoma fumosa*, *Melanconium bicolor* and *M. apiocarpum*. *Can.J.Bot.* **47** 745-749. p.
62. THE INDEX OF FUNGI (1981): 1971 - 1980, Vol. 4 498. CAB CMI, Kew, Surrey

63. TÓTH O. & KÖVICS Gy. (1978): Az *Ascochyta sojaecola* Abramov szója kórokozó magyarországi megjelenése. *Növényvédelem* **14** 299-304. p.
64. TÓTHNÉ-ZAHORECZ E. (1970): Néhány, gazdaságilag jelentős növényparazita mikrogomba hazai előfordulása. *Növényvédelem* **6** 418-422. p.
65. WALLACE, G.B. & WALLACE, M.M. (1947): Second supplement to the revised list of plant diseases in Tanganyika Territory. *Commonw. Mycol. Inst., Mycol. Papers* **26** 1-26. p.
66. WALLACE, G.B. & WALLACE, M.M. (1949): A list of plant diseases of economic importance in Tanganyika Territory. *Commonw. Mycol. Inst., Mycol. Papers* **26** 4. p.
67. ZUKOVSKAYA, S.A. (1979): Mikoflora soi [*Glycine max* (L.) Merr.] na Sovietskom Dalnem Vostoke. Tihookeanskij XIV nauchnij kongress. *Komitet N. Botanika, Moskva* 23-24. p.