

POJAV GLIVE *PHOMA EXIGUA* NA HME LJU V SLOVENIJISebastjan RADIŠEK¹, Jernej JAKŠE², Branka Javornik³, J. de GRUYTER⁴

UDK / UDC 633.791:631.527.3:632.3 (045)
izvirni znanstveni članek / original research article
prispelo / received: 25.10.2007
sprejeto / accepted: 07.12.2007

IZVLEČEK

V letu 2005 je prišlo na območju hmeljišč Koroške in Podravske regije do izbruha, v Sloveniji še neidentificirane bolezni hmelja, ki je povzročila pegavost listja, odmiranje cvetov in rjavenje storžkov. Na osnovi klasičnih in molekularnih diagnostičnih tehnik je bila kot povzročiteljica bolezenskih znamenj identificirana gliva *Phoma exigua*. V prispevku so predstavljene ocene izgube pridelka v najbolj prizadetih nasadih, diagnostične tehnike identifikacijske analize in osnovne epidemiološke lastnosti povzročiteljice s taksonomijo ter usmeritvami za obvladovanje.

Ključne besede: diagnostika, bolezni rastlin, varstvo rastlin

THE APPEARANCE OF *PHOMA EXIGUA* ON HOP IN SLOVENIA**ABSTRACT**

In the year 2005, an outbreak of unidentified disease on hop in Slovenia, was observed in Koroška and Podravje regions, which induced leaf spots, flower decaying and browning of cones. On the basis of classical and molecular diagnostics techniques, fungus *Phoma exigua* was identified as the causal agent. The article presents crop loss assessments from affected hop gardens, diagnostics techniques used in the identification analysis, basic epidemiology of the fungus with taxonomy and directions for crop protection.

Key words: diagnostics, plant diseases, plant protection

¹ Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Diagnostični laboratorij, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec; sebastjan.radisek@ihps.si

^{2,3} Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

⁴ Plant Protection Service, Wageningen, Nizozemska

1 UVOD

Pridelavo hmelja od nekdaj spremlja pojav bolezn in škodljivcev, ki ob neustreznem varstvu lahko popolnoma uničijo pridelek ali celo povzročijo propad rastlin. Med najpomembnejše bolezni hmelja, s katerimi se srečuje večina svetovnih hmeljarskih pridelovalnih območij, štejemo hmeljevo peronosporo (*Pseudoperonospora humuli* Miyabe & Takah. G.W. Wilson), hmeljevo pepelovko (*Podosphaera macularis* Wallr. U. Braun & Takam.), verticilijsko uvelost hmelja (*Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold; *V. dahliae* Klebahn) in bolezni povzročene z virusnimi okužbami. Poleg teh je na hmelju znanih še precej več povzročiteljev bolezni. Tako je do sedaj opisanih 35 različnih glivičnih obolenj, 2 oomiceti, 4 bakterijska obolenja, 12 virusov, 3 viroidi in 1 fitoplazma [2], ki predstavljajo nabor potencialnih povzročiteljev gospodarske škode v hmeljarstvu.

V sredini avgusta leta 2005 je prišlo na območju Koroške v Radljah ob Dravi do močnega pojava, v Sloveniji še neidentificirane bolezni hmelja, ki je povzročila pegavost listja, odmiranje cvetov in storžkov. Bolezen je najprej prizadela spodnji del rastline, napredovala po rastlini navzgor in na koncu zajela celotno hmeljno rastlino. Bolezenska znamenja na listju so se v začetni fazi izrazila v obliki majhnih ovalnih, sivo rjavih peg, ki so se kasneje razvile do velikosti premera 1 do 3 cm. Nekatere od peg so bile omejene z listnimi žilami. Z napredovanjem bolezni so se pege združevale in na najbolj prizadetem listju zajele celotno listno površino. Na mladih poganjkih je prišlo do odmiranja cvetov in razvijajočih storžkov, med katerimi jih je večina imela prizadete tudi peclje. Na storžkih so se pojavile rdečo rjave nekroze, najprej na koncih braktej in brakteol, ki so širile in v nekaterih primerih zajele celotno površino storžkov. Bolezen je bila najintenzivnejša na sortah Merkur, Magnum in Bobek. Pri nadaljnjih opazovanjih hmeljišč smo bolezen zasledili tudi na območju Ptuja, prav tako v nasadih sort Magnum in Merkur.

Opisi podobnih bolezenskih znamenjih na hmelju so znani iz Anglije iz leta 1926, ko je bila kot povzročiteljica identificirana gliva *Ascochyta humuli* Kabat & Bubak [13]. Podoben zapis obstaja tudi iz območja nekdanjih republik Sovjetske zveze [8], vendar je v obeh primerih bolezen prizadela samo listje hmeljnih rastlin in ni prišlo do gospodarske škode na pridelku. Zaradi nenadnega bolezenskega pojava v Sloveniji, ki je poleg listja prizadel tudi storžke in povzročil škodo na pridelku, smo takoj pričeli s postopki identifikacije povzročitelja, saj je le to predpogoj za vse nadaljnje aktivnosti pri varstvu pridelka. V prispevku predstavljamo obseg okužbe v letu 2005, potek identifikacijske analize povzročitelja bolezni, njegove osnovne epidemiološke lastnosti s taksonomijo in usmeritvami za obvladovanje.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Izolacija in mikroskopska analiza

Izolacijo povzročitelja bolezni smo izvršili iz prizadetega tkiva storžkov in listja, ki smo ga predhodno mikroskopsko pregledali. Pri tem smo v sterilnih pogojih izvedli površinsko sterilizacijo z namakanjem tkiva (1 min) v 2 % raztopini natrijevega hipoklorida (NaOCl). Koščke tkiva smo nato položili v petrijevke s krompirjevim dekstroznim agarjem (PDA-

potato dextrose agar; pH 5.2; 50 mg streptomycin sulfat/l) in inkubirali pri sobni temperaturi v temi. Po 5 dneh smo izolirane kulture mikroskopsko pregledali in z namenom *in vitro* opazovanja precepili na tri različna identifikacijska gojišča OA (oatmeal agar), MA (malt agar) in CA (cherry-decoction agar).

2.2 Patogeni testi

Patogene teste smo izvedli z umetnimi okužbami storžkov in listja lateralnih poganjkov, ki smo jih nabrali v nasadih sort Bobek in Merkur. Pri tem smo po dva lateralna poganjka uredili v obliki šopkov v 500 ml erlenmajericah v 4 ponovitvah za vsako sorto. Inokulum smo pripravili s spiranjem kultur reprezentativnega izolata (2PEX). Infekcijski potencial inokula je znašal 10^6 CFU/ml. Lateralne poganjke smo inokulirali z ročno razpršilko, pokrili s prozorno PVC vrečko in inkubirali v rastni komori (Kambič, RK-13300) pri 80 % relativni zračni vlagi in pod 12-urno fotoperiodo fluorescentne svetlobe (L 58W/77; Fluora, Osram). Pri tem smo v času osvetlitve temperaturo komore naravnali na 20° C, v temni fazi pa na temperaturo 15° C. Pojav boleznih na lateralnih poganjkih smo ocenili 10 dni po inokulaciji kot delež prizadete površine listja in storžkov s skalo 0-5 (0=brez bolezenskih znamenj, 1= 1-20 %; 2=21-40 %; 3=41-60 %, 4=61-80 %, 5=81-100 %). Prisotnost glive *Phoma exigua* na prizadetem tkivu smo potrdili s svetlobnim mikroskopom in reizolacijo izolata.

2.3 Izolacija DNA

Pred izolacijo DNA smo izolate namnožili v tekočem gojišču »General fungal medium« [11]. Kulture smo 4-5 dni inkubirali v temi pri sobni temperaturi na rotacijskem stresalniku (50 vrt./min). Po inkubaciji smo micelij iz gojišča filtrsko odstranili in ga večkrat sprali s sterilno destilirano vodo. Sledila je izolacija DNA po vpeljanem SDS protokolu, ki sta ga razvila Lee in Taylor [6], z nekaterimi modifikacijami [9]. Za izolacijo DNA iz prizadetega rastlinskega tkiva smo uporabili CTAB metodo [5].

2.4 Molekularna identifikacija

Molekularno identifikacijo smo opravili z določitvijo nukleotidnega zaporedja ITS (angl. Internal Transcribed Spacer) regij ribosomalnih RNA genov (rRNA). Pri tem smo najprej izvedli PCR (polimerazna verižna reakcija) pomnoževanje ITS1, 5.8S rDNA in ITS2 regij s pomočjo ITS4/ITS5 specifičnih nukleotidov [12]. Reakcijske mešanice (50 µl) so vsebovale 1× PCR pufer, 0,2 mM vsakega dNTP-ja, 0,5 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 1,5 mM MgCl₂ in 0,6 enote encima *Taq* DNA polimeraze in 20 ng genomske DNA izolatov. V primeru kontrolne reakcije smo namesto DNA izolatov, uporabili 2 µl sterilne vode. Reakcije smo izvajali v PCR napravi DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, Foster City, ZDA), po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 4-minutna denaturacija pri 94° C, ki ji sledi 30

ciklov pri 94° C (45 s), 58° C (30 s) in pomnoževanje pri temperaturi 72° C (70 s). Uspešnost PCR pomnoževanja smo preverili z 1,6 % agarozno gelsko elektroforezo. Določitev nukleotidnega zaporedja smo izvedli s pomočjo sekvenčnega servisa (Macrogene, Korea). Nukleotidna zaporedja fragmentov smo primerjali s podatki v GenBank (NCBI) podatkovnih bazah z uporabo skupine programov BLAST [1].

2.5 Ocenitev obsega in stopnje okužbe

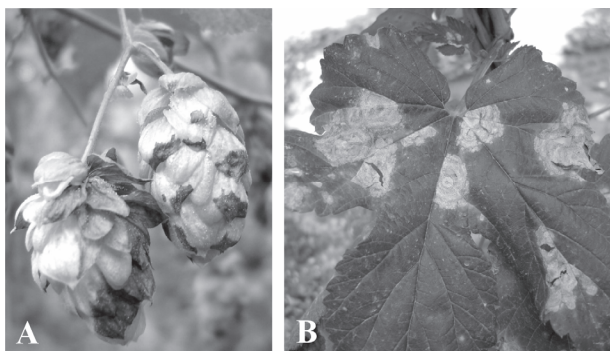
Ocenitev pojava bolezni v prizadetih nasadih smo opravili v času obiranja hmelja. Pri tem smo na končnem traku obiralnega stroja odvzeli vzorce v obsegu približno 4000 storžkov, izmed katerih smo jih za nadaljnjo analizo naključno izbrali 400. Izbrane storžke smo v laboratoriju pregledali s svetlobnim mikroskopom in jih ocenili z ocenjevalno skalo od 0 - 4 (0 = zdravi storžki, 1 = do 1 % okužba, 2 = 1-5 % okužba, 3 = 5-20 %, 4 = nad 20 % okužba). Stopnjo okužbe smo izračunali po formuli Townsend-Heuberger.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Morfološka identifikacija

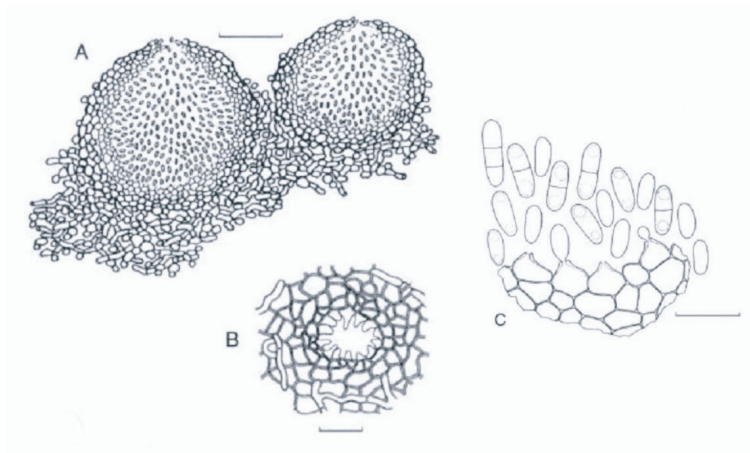
Mikroskopski pregled prizadetega tkiva listov in storžkov (Slika 1) je razkril prisotnost piknidijev okrogle oblike velikosti 80–200 µm z jasnimi ustjem skozi katerega so množično izhajali konidiji. Ti so bili večinoma ne-septirani, velikosti 6.5 (4.5-8) × 2.5 (2-4) µm, hialini in elipsoidne oblike. Z metodo površinske sterilizacije smo iz prizadetega tkiva na PDA gojišču izolirali 10 izolatov (oznaka 1PEX-10PEX), ki smo jih nadalje precepili na tri različna identifikacijska gojišča OA (oatmeal agar), MA (malt agar) in CA (cherry-decoction agar).

Na vseh gojiščih se je razvil puhast micelij sivo-olivne barve, pri čemer je bila kultura nepravilne oblike. Razvoj piknidijev smo po 10-20 dneh opazili na vseh gojiščih, vendar so bili ti zelo redki in deloma pogreznjeni v agar. V primeru OA gojišča smo opazili rahlo hitrejšo rast micelija. Specifičen test z natrijevim hidroksidom (NaOH) je pokazal negativno reakcijo, kar uvršča te izolate v skupino E-. Na osnovi morfoloških lastnosti (Slika 2) smo kot povzročitelja bolezni identificirali glivo iz rodu *Phoma* spp. Z namenom potrditve ugotovitev smo identifikacijo nadaljevali v sodelovanju z mikološkim oddelkom službe zdravstvenega varstva rastlin na Nizozemskem (Plant Protection Service, Mycological Department, Wageningen), kjer so v poslanih vzorcih na osnovi morfoloških lastnosti [3] identificirali glivo *Phoma exigua* Desm.



Slika 1: Bolezenska znamenja hmelja ob okužbi z glivo *Phoma exigua*. A: rjavenje storžkov; B: pege na listju.

Figure 1: Disease symptoms on hop caused by *Phoma exigua*: A: brown lesions on hop cones; B: lesions on leaves.



Slika 2: Morfološke lastnosti glive *Phoma exigua* var. *exigua* [10]. A: Prečni prerez dveh piknidijev; B: Tlorisni pogled na ustje piknidija; C: konidiogene celice in konidiji.

Figure 2: Morphological characteristics of *Phoma exigua* [10]. A: Vertical section of two pycnidia; B: Superficial view of an ostiolum; C: conidiogenous cells and conidia.

3.2 Patogeni testi

Z namenom potrditve Kochovih postulatov smo izvedli testiranje patogenosti reprezentativnega izolata 2PEX. Pri tem smo umetno okužili lateralne poganjke hmelja sort Bobek in Merkur, ki sta se izkazali za občutljivi. Prva bolezenska znamenja so se razvila 6 dni po inokulaciji. Na listih so se razvile sivo-rjave ovalne pege, ki so se vsakodnevno koncentrično večale. Na storžkih smo opazili rjavenje braktej in brakteol, ki se je pričelo na koncih in napredovalo proti osnovi storžka. Z mikroskopskim pregledom smo potrdili prisotnost piknidijev glive *Phoma exigua*, ki smo jih reizolirali na krompirjevo gojišče. Reizoliran izolat smo nadalje analizirali z molekularno analizo.

Preglednica 1: Rezultati patogenega testiranja izolata 2PEX glive *Phoma exigua*.

Table 1: Results of pathogenicity testing of 2PEX isolate of *Phoma exigua*.

Sorta	Povprečna okužba šopka ^a					Reizolacija
	1	2	3	4	K ^b	
Bobek	1,5	2	2,5	1,5	0	+
Merkur	2	1,5	2	2	0	+

^aOcenjeno 10 dni po inokulaciji (Skala 0-5).

^bNeokužen šopek lateralnih poganjkov hmelja.

3.3 Molekularna identifikacija

Določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje) ITS regij ribosomalnih RNA genov in njihova primerjava med različnimi vrstami gliv predstavlja najpogostejše študije proučevanja filogenetskih odnosov in identifikacije posameznih glivnih izolatov. V naši diagnostični analizi smo sekvencirali ITS1, 5.8S rDNA in ITS2 regije dvema reprezentativnima izolatom 2PEX in 3PEX, reizoliranem izolatu 2PEX, ter referenčnem izolatu glive *Phoma exigua* var. *exigua* (CBS 431.74), ki smo ga pridobili iz mikološke zbirke The Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) - an Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW). Pri vseh treh izolatih smo dobili enako 523 bp dolgo sekvenco, ki je bila identična (E=0.0) že vpisanim sekvencam glive *Phoma exigua* v podatkovni bazi GenBank [1].

Tako smo tudi z molekularno analizo potrdili rezultate morfološke identifikacije, da je povzročitelj pegavosti listja in rjavenja storžkov gliva *Phoma exigua*. Kot referenco našim analizam smo v podatkovno GenBank vpisali sekvenco za izolata 2PEX in CBS 431.74 pod akcesijskima številcama EF136399 in EF136400.

3.5 Ocenitev obsega in stopnje okužbe

Po prvem odkritju izbruha bolezni v Radljah ob Dravi smo opravili preglede in vzorčenja v ostalih hmeljarskih območjih Slovenije in pri tem odkrili bolezen tudi v nasadih na območju Ptuja. Pojav bolezni v prizadetih nasadih je zajel večji del nadzemnega dela rastline (liste, cvetove in storžke), vendar smo se pri ocenjevanju pojava osredotočili na storžke, predvsem z namenom določitve škode pridelka. Pojav na listih in cvetovih je slikovno dokumentiran in dostopen pri prvem avtorju prispevka. Škodo pridelka smo določili z vzorčenjem storžkov na končnem traku obiralnega stroja. Pri tem smo določili delež prizadetih storžkov in indeks stopnje okužbe, ki ga lahko upoštevamo kot indikator dejanskega uničenja pridelka. V preglednici 2 so zbrani rezultati ocenjevanja storžkov.

Preglednica 2: Rezultati ocenjevanja pojava glive *Phoma exigua* na storžkih glede na sorto in območje v letu 2005.

Table 2: Results of appearance assessment of *Phoma exigua* on hop cones, regarding variety and hop production area in the year 2005.

Območje	Sorta	Delež obolelih storžkov	Indeks obolenja ^a
Radlje ob Dravi	Bobek	30 %	11%
	Merkur	35 %	14 %
	Magnum	29 %	9 %
Ptuj	Magnum	19%	8%
	Merkur	Prisotna	Prisotna

^aTownsend-Heuberger indeks obolenja

3.6 Taksonomija in nomenklatura rodu *Phoma*

Na osnovi morfoloških lastnosti in gostiteljev so se glive, ki tvorijo piknidije največkrat uvrščale v rodove *Phoma*, *Phyllosticta* in *Ascochyta*, vendar je ta klasifikacija bila vedno precej nejasna s številnimi spremljajočimi sinonimi pri vseh treh rodovih. V zadnjih štirih desetletjih se je naredil velik napredek predvsem pri taksonomiji rodu *Phoma*, ki je sedaj na osnovi *in vitro* in *in vivo* morfoloških lastnosti razdeljen na sekcije *Phoma*, *Phyllostictiodes*, *Heterospora*, *Peyronellaea*, *Macrophoma*, *Pilosa*, *Plenodomus*, *Sclerophomella* in *Paraphoma* [3]. Gliva *Phoma exigua* je uvrščena v sekcijo *Phyllostictioides*, pri čemer je nadalje opisanih kar 11 varietet te vrste [10]. Pri glivi *P. exigua* še niso potrdili spolnega cikla, vendar veliko vrst v tej sekciji predstavlja anamorfe vrst iz rodu *Didymella*. Taksonomsko je rod *Phoma* uvrščen v nedefinirano skupino *Incertae sedis*, red *Pleosporales*, podrazred *Pleosporomycetidae*, razred *Dothideomycetes* in skupino *Ascomycota* [4].

3.7 Razvojni krog glive *Phoma exigua*

Gliva *Phoma exigua* spada med fakultativne organizme, saj lahko nastopa kot rastlinski patogen (nekrotrof) ali pa kot saprofit na odmrlih rastlinskih ostankih. S svojimi 11 varietetami predstavlja kompleks različnih odnosov med njenimi gostitelji. Tako lahko povzroča obsežen spekter bolezenskih znamenj kot je npr. padavica, gnitje korenin, pegavost listja in različne nekroze rastlinskega tkiva. Po koncu vegetacije preživi v tleh v obliki dormantnega micelija ali v obliki piknidijev, ki so se razvili na okuženem rastlinskem tkivu. Z začetkom vegetacije v spomladanskih mesecih iz trajnega micelija poženejo nove hife, ki inficirajo rastline ali pa nadaljujejo kolonizacijo odmrlih rastlinskih ostankov. Podobno tudi piknidiji z bruhanjem spor, ki se širijo predvsem z dežjem, predstavljajo začetek novega infekcijskega cikla. Prve infekcije se pri nekaterih rastlinah pojavijo, ko se temperature dvignejo nad 10° C in so pogojene predvsem visoko relativno vlago in dežjem. Na koloniziranem tkivu se razvijejo novi piknidiji, ki so z bruhanjem konidijev vir novih okužb. Razvoj piknidijev je lahko zelo hiter, saj se lahko razvijejo v 3 dneh pri temperaturi 26° C [7], kar omogoča tej glivi ob ugodnih razmerah hiter nastanek novih infekcij in kolonizacijo rastlin.

3.8 Možnosti obvladovanja glive *Phoma exigua* v hmeljarstvu

Na osnovi epidemioloških lastnosti in izkušenj obvladovanja na ostalih gojenih rastlinah, kjer glive iz rodu *Phoma* povzročajo vsakoletne izgube pridelka, lahko postavimo nekaj usmeritev za obvladovanje glive *P. exigua* v hmeljarstvu. Hmelj je trajnica, ki jo v kmetijstvu izkoriščamo tudi do 20 let na isti površini. To daje nekaterim povzročiteljem bolezni, kot je gliva *P. exigua* dobre pogoje za dviganje infekcijskega potenciala. Zato kot prvo usmeritev obvladovanja lahko postavimo odsvetovanje vračanja hmeljevine po obiranju pridelka v hmeljišča. Če to ni mogoče, je priporočljivo hmeljevino naprej obdelati s kompostiranjem, kjer ob razgradnji svežih ostankov rastlin prihaja do segrevanja mase in posledično odmrtna rastlinskih patogenov. Za pravilno kompostiranje, hmeljevino uredimo v kup višine 2 m, katerega nato prekrijemo za dobo najmanj 2 mesecev s PVC folijo, da zagotovimo segrevanje tudi na površini kupa, hkrati pa preprečimo raznašanje z vetrom. Poleg sanitarnih ukrepov in žlahtnjenja odpornih sort je ob izbruhu nujno tudi varstvo rastlin z uporabo fungicidov. Pri tem je znanih precej aktivnih snovi, ki so učinkovite za zatiranje gliv iz rodu *Phoma*, od katerih lahko omenimo azoksistrobin, difenokonozol, tebukonazol, metkonazol in karbendazim. Seveda nam te lahko predstavljajo le usmeritev pri določitvi najprimernejših za zatiranje glive *P. exigua* v hmeljarstvu. Tako bo v prihodnje potrebno, posebno ob ponavljajočih izbruhih, *in vitro* in *in vivo* določiti učinkovitost in primernost fungicidov, ugotoviti pragove škodljivosti in proučiti možnosti napovedovanja izbruhov te bolezni.

4 ZAKLJUČEK

V zadnjem stoletju se je seznam povzročiteljev bolezni na hmelju redno povečeval predvsem preko razvoja diagnostičnih metod, stalnega prilagajanja parazitov na nove gostitelje, razvoja

hmeljarstva kot trajne monokulture in klimatskih sprememb. Znanih je tudi kar nekaj pomembnih izbruhov in epifitocij, ki so pomembno vplivale na spremembe pri pridelavi hmelja. V letu 2005 nas je v Sloveniji presenetil agresiven izbruh do sedaj še neidentificirane bolezni na hmelju. Na osnovi klasičnih in molekularnih diagnostičnih tehnik smo kot povzročitelja identificirali glivo *Phoma exigua*, ki je tipičen predstavnik rastlinskih polifagov. V prizadetih hmeljiščih smo ocenili obseg okužbe in v prispevku predstavili osnovne lastnosti te glive ter usmeritve pri razvoju strategij varstva pridelka.

ZAHVALA

Avtorji članka se zahvaljujemo mag. Milanu Žolnirju za koristne informacije pri delu in pomoč pri spremljanju ter ugotavljanju razširjenosti pojava glive *Phoma exigua* v hmeljiščih.

5 VIRI

1. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., Gapped. BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.- *Nucleic Acids Research* 25(1997), s. 3389-3402.
2. APS, <http://www.apsnet.org/online/common/comment/hop.asp> (19.10.2007).
3. Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M. E., Hamers, M. E. C. *Phoma Identification Manual* (2004).- Wallingford, UK: CABI Publishing.
4. Index Fungorum, <http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp> (19.10. 2007).
5. Kump, B., Javornik, B., Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) populations by RAPD markers.- *Plant Science*, 114(1996), s. 149-159.
6. Lee, S.B., Taylor, J.W., Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. V: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, D.H., White, J.J., Eds. T.J. (ur).- San Diego, Academic Press, (1990), s. 282-287.
7. McCoy, R. E., Horst, R. K., Dimock, A. W. Environmental factors regulating sexual and asexual regulation by *Mycosphaerella ligulicola*.- *Phytopathology* 62(1972) s. 1188-1195.
8. Pidopličko, N.M, Gribo paraziti kulturnih rastenij.- *Opridelitelj* 3(1978), Kijev, strana 102, s. 153-145.
9. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B., Optimisation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*).- *Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo*, 77(2001)2, s. 139-146.
10. Van der AA, H.A., Boerema, G.H., de Gruyter J. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes).- VI-1, *Sectoin Phyllostictoides: Characteristics and nomenclature of its type species Phoma exigua*. *Personia* 3(2000), s. 435-456.
11. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, K. *Fingerprinting in Plants and Fungi*.- London, CRC Press, Inc., (1995), s. 322.

12. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.- *V: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, D.H., White, J.J., Eds. T.J. (ur). San Diego, Academic Press, (1990), s. 282-287.
13. Wormald, H.- E. Malling Research Station, Annual Report for 1926-27, II Suppl. (1928).