

**JADWIGA ŚLIWKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Młochowie

## Metody stosowane do charakteryzowania izolatów *Phytophthora infestans*, organizmu powodującego zarazę ziemniaka

### Methods used for characterization of *Phytophthora infestans* isolates, the organism which causes potato late blight

Praca jest przeglądem literatury dotyczącej rodzajów polimorfizmu występujących wśród izolatów *Phytophthora infestans*, organizmu powodującego ważną chorobę ziemniaka — zarazę ziemniaka. Skupiono się głównie na metodach wykrywania poszczególnych rodzajów polimorfizmu. Szczegółowo omówione zostały metody określania: typu kojarzeniowego, odporności na metalaksyl, wirulencji, agresywności, patogeniczności, izoenzymów peptydazy i izomerazy glukozy-6-fosforanu, polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA jądrowego (sonda RG-57) oraz haplotypu mitochondrialnego. Wspomniano o testach opartych na metodzie PCR pozwalających wykrywać typ kojarzeniowy i polimorfizm w obrębie znanych sekwencji *P. infestans*, a także o markerach RAPD.

**Słowa kluczowe:** izolaty, markery, metody charakteryzowania, *Phytophthora infestans*.

The article is a review of the literature on different kinds of polymorphism described in isolates of *Phytophthora infestans*, the organism which causes an important potato disease — late blight. The article is focused on methods for revealing these kinds of polymorphism. The methods for revealing mating type, metalaxyl resistance, virulence, aggressiveness, pathogenicity, isoenzymes of peptidase and glucose-6-phosphate isomerase, restriction fragment length polymorphism of nuclear DNA (probe RG-57) and mitochondrial haplotype are described in a more detailed way. PCR-based tests for examining mating type, polymorphism inside the known DNA sequences and also RAPD markers are mentioned as well.

**Key words:** isolates, markers, methods of characterisation, *Phytophthora infestans*.

#### WSTĘP

*Phytophthora infestans* należy do królestwa Chromista, gromady Oomycetes i powoduje zarazę ziemniaka, gospodarczo najważniejszą w skali światowej chorobę ziemniaka (Świeżyński i Zimnoch-Guzowska, 2001). Jest to organizm heterotalliczny, w którym rozmnażanie płciowe następuje w wyniku kontaktu osobników reprezentujących dwa różne typy kojarzeniowe A1 i A2. Obecnie *P. infestans* towarzyszy uprawom ziemniaka i pomidora na całym świecie, jednak przepływ genów pomiędzy populacjami patogenu z

różnych regionów nie jest swobodny, hamują go bariery geograficzne oraz ograniczenia importowe ziemniaków i pomidorów. Z powodu utrudnionej migracji, działania dryfu genetycznego i wpływu składu populacji przeniesionej na nowe siedlisko (efektu założyciela) współczesne populacje *P. infestans* różnią się występowaniem i proporcjami alleli, czyli stopniem polimorfizmu. Za najbardziej polimorficzną uważa się populację *P. infestans* w Środkowym Meksyku, prawdopodobnym miejscu pochodzenia tego organizmu (Fry i in., 1993; Grünwald i in., 2001). Pewne allele, zarówno neutralne jak i te, na które działa dobór naturalny wciąż jeszcze nie zostały odnotowane w niektórych regionach geograficznych, przykładem może tu być typ kojarzeniowy A2 (Vega-Sánchez i in., 2000; McLeod i in., 2001; Perez i in., 2001). Dzięki temu, badania polimorfizmu i struktury genetycznej różnych populacji *P. infestans* zyskują na wartości i mogą posłużyć do śledzenia historycznych dróg migracji patogenu (Goodwin i in., 1994 a; Koh i in., 1994; Goodwin, 1997 a), czy odróżnienia populacji seksualnych od aseksualnych (Tooley i in., 1985; Goodwin i in., 1995 a; Zarzycka, Sobkowiak, 1999).

W genetyce populacyjnej *P. infestans* kluczową rolę odgrywa pojęcie linii klonalnej składającej się z wegetatywnych potomków danego genotypu (Goodwin, 1997 b; Kato i in., 1997). Zmienność w obrębie linii klonalnej powstaje wyłącznie na drodze mutacji. Wyróżnikiem linii klonalnych *P. infestans* jest łącznie 28 niesprzężonych loci, kodujących: typ kojarzeniowy, izoenzymatyczne genotypy izomerazy glukozy-6-fosforanu i peptydazy oraz prążki profilu jądrowego polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) uzyskanego przy zastosowaniu sondy molekularnej RG 57 (Goodwin i in., 1994 b).

Dalsza część artykułu ma na celu omówienie wymienionych loci i innych markerów genotypowych i fenotypowych oraz metod ich wykrywania używanych do charakteryzowania izolatów *P. infestans*.

#### TYP KOJARZENIOWY

Typ kojarzeniowy A1 dominował na świecie aż do wczesnych lat 80. ubiegłego stulecia, podczas gdy typ A2, odkryty stosunkowo późno, był znany tylko w Meksyku (Niederhauser, 1956). Od tego momentu odnotowywano występowanie typu A2 w Europie, Ameryce Północnej, Azji i Afryce (Fry i in., 1993).

Typ kojarzeniowy należy do podstawowych charakterystyk izolatu, a jego określenie jest stosunkowo łatwe. Najprostszą i najczęściej stosowaną w tym celu metodą jest skrzyżowanie badanego izolatu z izolatami o znanym typie kojarzeniowym i zaobserwowanie obecności oospor - grubościennych, kulistych zarodników powstających w wyniku zapłodnienia (Tooley i in., 1985; Shattock i in., 1986; Shattock i in., 1990; McLeod i in., 2001). Jeśli badany izolat wytwarza oospory z izolatem A1, a nie wytwarza ich z izolatem A2, to jest typu kojarzeniowego A2.

Oospory nie zawsze powstają w wyniku zapłodnienia krzyżowego. Doświadczenie Ko (1978, 1980), w którym rosące na jednej szalce izolaty A1 i A2 oddzielono błoną półprzepuszczalną, wykazało, że obecność izolatu o odmiennym typie kojarzeniowym stymuluje tworzenie oospor za pośrednictwem związków chemicznych mogących przenikać przez błonę, a fizyczny kontakt badanych grzybni nie jest niezbędny. W

doświadczeniu tym oba izolaty wytworzyły oospory w wyniku samozapłodnienia (Ko, 1978, 1980). Wśród izolatów *P. infestans* wykryto także izolaty homotalliczne, które wytwarzają oospory pod nieobecność izolatu odmiennego typu kojarzeniowego (Shattock i in., 1987).

Krzyżowanie izolatów *P. infestans* można prowadzić na pożywce agarowej żytniej (Mahuku i in., 2000; Sedegui i in., 2000; Grünwald i in., 2001), owsianej (Elansky i in., 2001) lub V8 (Vega-Sánchez i in., 2000; McLeod i in., 2001; Perez i in., 2001). Niektórzy autorzy stymulowali wytwarzanie oospor dodatkiem węglanu wapnia i  $\beta$ -sitosterolu (Shattock i in., 1986; Koh i in., 1994) lub tylko  $\beta$ -sitosterolu (Spielman i in., 1990). Obecność oospor obserwuje się po inkubacji w temperaturze od 15° C (Perez i in., 2001) do 22° C (Hermansen i in., 2000), zazwyczaj jednak 18° C, trwającej mniej niż 10 dni (Lebreton i in., 1998; Mahuku i in., 2000; McLeod i in., 2001), 10–20 dni (Hermansen i in., 2000; Vega-Sánchez i in., 2000; Elansky i in., 2001), lub nawet 3–4 tygodnie (Tooley i in., 1985; Tooley i in., 1989; Perez i in., 2001).

Typ kojarzeniowy *P. infestans* jest determinowany przez pojedynczy gen, który wykazuje zaburzoną segregację. Stwierdzono, że z typem A2 jest związana delecja fragmentu chromosomu nazwanego *S1*. Fragment ten był wykrywany metodą RFLP tylko w DNA izolatów A1, a jego sekwencja posłużyła do zaprojektowania starterów reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (PCR). Przy ich zastosowaniu można selektywnie namnażać obszar *S1*, a tym samym wykrywać typ kojarzeniowy A1. DNA izolatów typu A2 w powyższym teście PCR nie daje produktu, aczkolwiek wśród 95 izolatów znaleziono jeden typu kojarzeniowego A2, który posiadał obszar *S1* i dawał pozytywny wynik testu PCR (Judelson i in., 1996). Ta metoda określania typu kojarzeniowego była jak dotychczas stosowana rzadko (Perez i in., 2001).

#### ODPORNOŚĆ NA METALAKSYL

Zwalczanie *P. infestans* przy użyciu metalaksylu wywiera presję selekcyjną na populację patogenu, co doprowadziło do ekspansji izolatów odpornych na ten fungicyd. Odporność na metalaksyl jest cechą warunkowaną przez jeden gen wykazujący niepełną dominację, co oznacza, że homozygoty dominujące są odporne na metalaksyl, homozygoty recesywne — wrażliwe, a heterozygoty wykazują fenotyp pośredni (Shattock i in., 1987). Stosowane są dwie metody określania odporności izolatu na metalaksyl.

W metodzie pływających dysków na powierzchni wodnego roztworu metalaksylu umieszcza się krążki wycięte z liścia ziemniaka. Dyski te inokuluje się kroplą zawiesiny sporangiów lub zoospor *P. infestans*. Po 5–7 dniach inkubacji w świetle, w temperaturze sprzyjającej rozwojowi patogenu ocenia się rozwój grzybni i sporulację na powierzchni dysków (Therrien i in., 1989; Fry i in., 1991; Shattock i in., 1990; Chycoski i in., 1996; Lebreton i in., 1998; Hermansen i in., 2000; McLeod i in., 2001). Na podstawie doświadczeń z szeregiem stężeń metalaksylu można wyznaczyć takie stężenie, które hamuje rozwój patogenu w 50%, tzw.  $EC_{50}$  (McLeod i in., 2001). Stosując jedno lub dwa rozcieńczenia metalaksylu można przyporządkować izolaty do kategorii: wrażliwy,

pośredni, odporny na podstawie arbitralnie przyjętej skali (Fry i in., 1991) lub do tylko dwóch kategorii, wrażliwych i odpornych (Chycoski i in., 1996).

Druga metoda opiera się na pomiarze średnicy kolonii *P. infestans* na pożywce agarowej zawierającej fungicyd. Względny wzrost izolatu wyraża się jako procent średnicy kolonii rosnącej na pożywce wolnej od metalaksylu (Miller i in., 1997; Sedegui i in., 2000; Derie i in., 2001; Elansky i in., 2001; Grünwald i in., 2001; Mukalazi i in., 2001; Perez i in., 2001; Peters i in., 2001). Niektórzy autorzy wyznaczają tą metodą EC<sub>50</sub> (Peters i in., 2001), większość jednak przyporządkowuje izolaty do dwóch lub trzech kategorii odporności na podstawie arbitralnie określonej skali (Miller i in., 1997; Derie i in., 2001; Elansky i in., 2001). Arbitralność skali oraz stosowanie stężeń metalaksylu w pożywce, w obu opisanych metodach, w zakresie 5 µg/ml do 100 µg/ml sprawia, że wyniki uzyskane przez różnych autorów są nieporównywalne i w związku z tym Miller zaproponował użycie izolatów US-1 (wrażliwy), US-8 i US-11 (odporne), w celu wystandaryzowania stężenia metalaksylu i kryteriów odporności (Miller i in., 1997).

W latach 70. dwudziestego wieku sugerowano, że odporność na chloramfenikol i streptomycynę również mogą być cennymi markerami fenotypowymi izolatów *P. infestans*, ale obecnie nie znajdują one szerszego zastosowania w charakteryzowaniu izolatów (Shattock i in., 1987).

Nie wykryto zróżnicowania wśród izolatów *P. infestans* pod względem odporności na inne fungicydy stosowane przeciw zarazie ziemniaka, mankozeb i chlorotalonil (Kato i in., 1997).

#### WIRULENCJA, AGRESYWNOSĆ, PATOGENICZNOŚĆ

Fenotyp *P. infestans* można scharakteryzować określając rasę danego izolatu, czyli listę genów głównych odporności ziemniaka (genów *R*), które badany izolat jest w stanie przełamać, dzięki posiadanym odpowiadającym im czynnikom wirulencji. Znanych jest 11 genów *R*, wprowadzonych do ziemniaków uprawnych z dzikiego gatunku *S. demissum* oraz 11 czynników wirulencji *P. infestans* (Black i in., 1953). Rasę izolatu określa się przez badanie jego interakcji z roślinami posiadającymi poszczególne geny *R*, najczęściej jest to 11 roślin, każda z jednym tylko genem, zwanych testerami Blacka. Testy prowadzi się na odciętych listkach testerów Blacka (Sujkowski i in., 1996; Lebreton i in., 1998; Derie i in., 2001; Elansky i in., 2001; Perez i in., 2001; Zarzycka, 2001), rzadziej na dyskach wyciętych z liści (Tooley i in., 1989; Hermansen i in., 2000), inokulowanych kroplą zawiesiny sporangiów lub zoospor. Po 5-6 dniowej inkubacji w 15–18° C określa się interakcje izolatu z gospodarzami w kategoriach +/-.

Wirulencję względem danego genu *R* warunkuje brak dominującego allelu awirulencji (*Avr*) w *P. infestans*. Prawdopodobnie produktem genu *Avr* jest substancja, która jest wykrywana przez roślinę jako sygnał, pozwalający na wczesne wykrycie infekcji i włączenie reakcji odpornościowych. Znane są już pozycje genów *Avr1*, 2, 3, 4, 10, 11 na mapie genomu *P. infestans*, wiadomo także, że geny *Avr3*, 10 i 11 są ze sobą sprzężone i leżą w obrębie ósmej grupy sprzężeń, zaś delecja fragmentu chromosomu, w którym się

znajdują, prowadzi do uzyskania przez izolat wirulencji względem odpowiednich genów R ziemniaka (Whisson i in., 2001 a; Whisson i in., 2001 b; van der Lee i in., 2001).

Agresywność izolatu obrazuje tempo w jakim poraża on i rozwija się w gospodarzu. Jest badana przez pomiar wielkości plamy w mm lub ocenę jej wielkości w skali, odpowiadającej % porażenia powierzchni, na porażonych listkach rośliny podatnej i pozbawionej znanych genów R, które mogłyby komplikować przebieg interakcji. Do stosowanych w badaniach odmian pozbawionych genów R należą: Norchip (Chycoski i in., 1996; Kato i in., 1997), Bintje (Lebreton i in., 1999; Zarzycka, 2001) lub Tarpan (Zarzycka, 2001).

Lista gospodarzy *P. infestans* obejmuje oprócz ziemniaka wiele gatunków, m. in. pomidor *Lycopersicon esculentum*. Istnieją izolaty zdolne do porażenia obydwu tych gospodarzy lub tylko jednego z nich, lub wykazujące na różnych gospodarzach zróżnicowaną agresywność (Sedegui i in., 2000; Mukalazi i in., 2001). Zdolność do porażenia określonego gatunku jest nazywana patogenicznością względem danego gospodarza. Tę fenotypową cechę izolatów *P. infestans* bada się również na odciętych listkach lub całych roślinach i określa w kategoriach +/- (Sedegui i in., 2000; Mukalazi i in., 2001).

#### IZOENZYMY

Izoenzymy są to formy polipeptydów katalizujące tę samą reakcję chemiczną, ale różniące się między sobą masą cząsteczkową, kształtem i/lub wypadkowym ładunkiem elektrycznym. Różnice te powstają w wyniku mutacji najczęściej punktowych i uważanych za neutralne, jako że ostatecznie nie mają wpływu na aktywność białka, prowadzących do powstania różnych alleli kodujących ten sam enzym. Jeśli są to allele jednego locus, ich produkty są nazywane allozymami, jeśli mogą się znajdować w kilku różnych loci — izoenzymami (Spielman, 1989). Polimorficzne enzymy są często spotykane w organizmach żywych i mogą być wykorzystywane jako markery fenotypowe łatwo przekładalne na język genów, gdyż najczęściej odpowiadają za nie allele kodominujące. Każdy obecny w danym organizmie allel ulega ekspresji i daje się wykryć (Spielman, 1989).

Do wykrywania polimorfizmu enzymów służy elektroforetyczny rozdział białek połączony z wybarwieniem jednego enzymu, związanym z jego właściwościami katalitycznymi. W czasie natywnej elektroforezy białek na ich ruchliwość elektroforetyczną, czyli szybkość migracji w polu elektrycznym, mają wpływ: masa cząsteczki, jej kształt i ładunek elektryczny, czyli te parametry, którymi różnią się izoenzymy.

W przypadku *P. infestans*, poszukiwania markerów izoenzymatycznych były prowadzone wśród 38 enzymów, spośród których wykryto aktywność 17, z czego 11 były to enzymy monomorficzne. Zaledwie cztery enzymy były polimorficzne i można było je wykryć we wszystkich badanych izolatach z wystarczającą jakością (Tooley i in., 1985). Były to: izomeraza glukozy-6-fosforanu, peptydaza, dehydrogenaza ksantynowa i enzym jabłczanowy. W pracy Spielman i wsp. (1990), w tym samym celu zbadano 52 enzymy, z czego polimorficzne, nieskomplikowane genetycznie i rozdzielające się w sposób czytelny,

były tylko trzy: izomeraza glukozy-6-fosforanu, peptydaza i izomeraza fosforanu mannozy. Późniejsze badania zawęziły tę grupę do izomerazy glukozy-6-fosforanu (GPI) i peptydazy (PEP). Spowodowane to było rzadkością występowania izolatów polimorficznych pod względem pozostałych enzymów.

Obecnie profile izoenzymatyczne GPI i PEP są jedną z podstawowych charakterystyk izolatów oraz jednym z wyznaczników linii klonalnych *P. infestans*. Do tej pory wykryto siedem alleli GPI i pięć PEP (Fry i in., 1993). Oba te enzymy są w formie natywnej dimerami.

Tabela 1

**Rodzaje nośników stosowane w elektroforezie GPI i PEP *P. infestans***  
**Types of media used in GPI and PEP electrophoresis in *P. infestans***

| Nośnik<br>Medium                                                              | Autor<br>Author                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Skrobia<br>Starch                                                             | Tooley i in., 1985,<br>Tooley i in., 1989,<br>Shattock i in., 1990,<br>Spielman i in., 1990,<br>Spielman i in., 1991,<br>Fry i in., 1991,<br>Mosa i in., 1993,<br>Goodwin i in., 1994,<br>Koh i in., 1994,<br>Sujkowski i in., 1994,<br>Lebreton i in., 1998,<br>Grünwald i in., 2001,<br>Perez i in., 2001, |
| Octan celulozy<br>Cellulose acetate                                           | Goodwin i in., 1995,<br>Miller i in., 1997,<br>Erselius i in., 2000,<br>Mahuku i in., 2000,<br>Miller i in., 2000,<br>Sedegui i in., 2000,<br>Vega-Sánchez i in., 2000,<br>Elansky i in., 2001,<br>Grünwald i in., 2001,<br>Perez i in., 2001,                                                               |
| Poliakrylamid<br>Polyacrylamide                                               | Ordóñez i in., 2000,<br>Vega-Sánchez i in., 2000,<br>Perez i in., 2001,                                                                                                                                                                                                                                      |
| Poliakrylamid + izoelektroogniskowanie<br>Polyacrylamide + isoelectrofocusing | McLeod i in., 2001,<br>Fry i in., 1991.                                                                                                                                                                                                                                                                      |

Oznacza to, że homozygoty w obrazie elektroforetycznym mają jeden prążek odpowiadający dimerowi złożonemu z dwóch jednakowych podjednostek, natomiast heterozygoty mają trzy prążki, z których dwa odpowiadają dwóm różnym homodimerom, zaś trzeci leżący pomiędzy nimi odpowiada heterodimerowi, zbudowanemu z produktów obu alleli. Wyjątkowa pod względem profilu izoenzymatycznego GPI jest linia klonalna US-8, której obraz elektroforetyczny ma pięć prążków i która posiada aż trzy allele GPI nazwane 100, 111 i 122 (Spielman, 1989). Oznaczenia alleli izoenzymów są tworzone na podstawie ruchliwości elektroforetycznej produktów: najczęściej spotykany allel

oznaczono 100, zaś oznaczenia pozostałych to szybkość migracji ich produktów wyrażona w procentach względem produktu allelu 100 (Shattock i in., 1987). Na przestrzeni lat wielu autorów optymalizowało metody wykrywania GPI i PEP w próbkach grzybni *P. infestans*, a nawet w próbkach z porażonych roślin (Goodwin i in., 1995) stosując w elektroforezie różne nośniki (tab. 1) i systemy buforowe. Nośniki różnią się między sobą wymaganym nakładem pracy, czasem i kosztów, jak również rozdzielczością. Przykładem może być tu genotyp GPI 90/100, który można odróżnić od genotypu 100/100 wyłącznie na żelu skrobiowym (Vega-Sánchez i in., 2000) lub poliakrylamidowym, stosując izoelektroogniskowanie (McLeod i in., 2001).

#### RFLP DNA JĄDROWEGO

Badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) jest bardzo czułą metodą wykrywania zróżnicowania wewnątrzgatunkowego. Podstawą tej metody są powstałe w wyniku mutacji zmiany DNA, które prowadzą do zaniku lub powstawania nowych miejsc restrykcyjnych. W metodzie tej, DNA pocięte restryktazą, rozdzielane jest elektroforetycznie, następnie przenoszone na membranę i hybrydyzowane z sondą DNA. Sonda jest znakowana, dzięki czemu po hybrydyzacji można zobaczyć na radiogramach prążki odpowiadające fragmentom DNA o sekwencjach homologicznych z sekwencją sondy i różnych długościach, wynikających z położenia miejsc restrykcyjnych.

Poszukiwaniem sekwencji, która nadawałaby się na sondę do badań RFLP DNA jądrowego *P. infestans*, a więc hybrydyzowała z dużą liczbą wysoko polimorficznych fragmentów kodowanych przez niesprężone loci, zajmował się Goodwin (Goodwin i in., 1992). Poszukiwania rozpoczęto od stworzenia fragmentarycznej biblioteki genowej *P. infestans* w *Escherichia coli*. Z kolonii bakterii wyizolowano ok. 150 plazmidów zawierających fragmenty DNA *P. infestans*, które następnie oznakowano izotopem <sup>32</sup>P. Tak powstałe sondy hybrydyzowano z DNA siedmiu izolatów pochodzących z Centralnego Meksyku, pociętym enzymem EcoRI. Dwie sondy, RG-57 i RG-7 ujawniły największą liczbę wysoko polimorficznych fragmentów tworzących unikalny wzór dla każdego z siedmiu badanych izolatów. Krzyżując izolaty i badając profile RFLP w uzyskanych potomstwach stwierdzono, że większość z 25 fragmentów hybrydujących z sondą RG-57 dziedziczy się niezależnie. Wyjątek stanowiły prążki 21 i 23, które są, albo ściśle sprzężone ze sobą, albo są allelami jednego locus. W przypadku sondy RG-7 kosegregacja, alleliczność i ściśle sprzężenia zdarzały się o wiele częściej, co zdyskwalifikowało tę sondę z dalszych badań. Nie stwierdzono występowania mutacji w badanych potomstwach (Goodwin i in., 1992). Zbadano także ewolucyjną konserwatywność sekwencji sondy RG-57 hybrydując ją z DNA pięciu innych gatunków z rodzaju *Phytophthora*. Silna hybrydyzacja miała miejsce w trzech przypadkach: *P. mirabilis*, *P. colocasiae*, *P. phaseoli*. Stwierdzono też, że sonda RG-57 to sekwencja jądrowa, długości 1,2 kb i że nie koduje ona rybosomalnego DNA (Goodwin i in., 1992).

Od opublikowania pracy Goodwina w 1992 roku, sonda RG-57 zyskała dużą popularność, a uzyskany przy jej użyciu profil RFLP stał się jednym z wyznaczników linii

klonalnych. Obecnie często znakuje się sondę RG-57 w sposób nieradioaktywny (Ordonez i in., 2000; McLeod i in., 2001; Grünwald i in., 2001).

#### HAPLOTYP MITOCHONDRIALNY

Polimorfizm mitochondrialnego DNA stał się ważnym markerem izolatów *P. infestans*, gdyż jest dziedziczony po jednym z rodziców, prawdopodobnie matecznie, tzn. jedynie po tym z rodziców, którego gametę stanowiło oogonium. Polimorfizm mitochondrialnego DNA jest też łatwo wykrywalny. Po raz pierwszy polimorfizm miejsc restrykcyjnych mitochondrialnego DNA (mtDNA) *P. infestans* został wykryty przez Cartera. Wyizolował on mtDNA 24 izolatów z 11 krajów i poddał je działaniu siedmiu enzymów restrykcyjnych: BclI, BglII, ClaI, EcoRI, MspI, HindIII i HhaI. Pocięte DNA zostało rozdzielone elektroforetycznie na żelu agarozowym i wybarwione bromkiem etydyny. W efekcie wyróżniono w mtDNA *P. infestans* cztery typy: Ia, Ib, IIa i IIb (Carter i in., 1990). Główny polimorfizm polega na obecności w typie II, lub braku w typie I, fragmentu o długości 1,6kb, któremu towarzyszą zmiany w sekwencjach flankujących, ujawnione przez restryktazę EcoRI (Griffith i Shaw, 1998). Dodatkowy polimorfizm wykrywają enzymy MspI i HhaI, dzieląc powyższe typy na podtypy a i b. Polega on prawdopodobnie na zmianach pojedynczych nukleotydów lub bardzo małych delecjach, czy insercjach, nie wpływających na całkowity rozmiar mtDNA (Carter i in., 1990).

Po zsekwencjonowaniu mtDNA *P. infestans* (Paquin i in., 1997) Griffith i Shaw opracowali test oparty na metodzie PCR, który pozwala szybko i łatwo określić haplotyp mitochondrialny izolatu, z niewielkiej ilości całkowitego DNA. Zaprojektowali oni cztery zestawy primerów, z których następnie wybrali dwa, namnażające takie fragmenty mtDNA, które pocięte restryktazami MspI i EcoRI pozwalają odróżnić wszystkie 4 mitochondrialne haplotypy (Griffith i Shaw, 1998).

Znajomość mitochondrialnego haplotypu izolatu daje podstawy do przypuszczeń o niektórych innych jego cechach. Stwierdzono, że izolaty haplotypu Ib nigdy nie są wysoko odporne na metalaksyl, zazwyczaj są typu kojarzeniowego A1 i zazwyczaj posiadają genotyp izoenzymatyczny GPI 86/100, PEP 92/100 oraz profil RFLP DNA jądrowego charakterystyczny dla linii klonalnej US-1. Izolaty typu kojarzeniowego A2, które po roku 1970 w wielu rejonach świata wypierały typ A1 w większości są haplotypu mitochondrialnego Ia, z niewielką grupą IIa. Haplotyp IIb wykryto jak dotąd u nielicznych izolatów z rejonu Kalifornii i Vancouver oraz u jednego izolatu holenderskiego (Griffith i Shaw, 1998).

Haplotyp mitochondrialny został również określony dla DNA pochodzącego z historycznych próbek porażonych liści ze zbiorów zielnikowych Kew Gardens z czasów Wielkiego Głodu w Irlandii, spowodowanego epidemią zarazy ziemniaka w latach 40. dziewiętnastego wieku. Wbrew hipotezie mówiącej, że Europę do lat 1970-tych zasiedlała linia klonalna US-1 o haplocie Ib, okazało się, że próbki historyczne nie należą do haplocie Ib (Ristaino i in., 2001).



#### CHARAKTERYZOWANIE IZOLATÓW *P. INFESTANS* W POLSCE

Polska populacja *P. infestans* pozostaje wciąż słabo scharakteryzowana molekularnie. Najdokładniejszych informacji o genetycznym zróżnicowaniu polskiej populacji *P. infestans* dostarczyli Sujkowski i wsp., (1994; 1996). Zbadali oni 247 izolatów, zebranych w całej Polsce w latach 1987-1991, pod względem typu kojarzeniowego, wirulencji, profili izoenzymatycznych GPI i PEP i profilu RFLP DNA jądrowego.

W latach późniejszych badania polskiej populacji *P. infestans* opierały się głównie na markerach fenotypowych. W Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Oddział Młochów prowadzone są badania typu kojarzeniowego, wirulencji i agresywności kolekcjonowanych izolatów *P. infestans* (Zarzycka i Sobkowiak, 1999; Zarzycka 2001). W latach 1987-2001 przebadano łącznie 1603 izolaty (Zarzycka, ustna informacja).

Bartkowiak i Weber, (2000) zebrali 68 izolatów z regionu Kujaw w latach 1994-1996 i określili ich typ kojarzeniowy oraz wirulencję względem 11 genów R ziemniaka i pięciu genów głównych odporności pomidora.

Kapsa, (2001) badała izolaty pochodzące z łodyg i liści ziemniaków rosnących w Boninie w 1995 roku. Określono typ kojarzeniowy zebranych izolatów, ich wirulencję, agresywność, odporność na metalaksyl, odporność na inne komercyjnie dostępne fungicydy oraz występowanie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych. W IHAR Oddział Młochów podejmowane są także próby analizy izoenzymatycznej izolatów.

#### PODSUMOWANIE

Wymienione wyżej charakterystyki izolatów *P. infestans* są wykorzystywane przez badaczy z różną częstotliwością (tab. 2). Do najpopularniejszych, wiarygodnych i stabilnych markerów należą: typ kojarzeniowy, profile izoenzymatyczne GPI i PEP, odporność na metalaksyl i profil RFLP DNA jądrowego. W dostępnej w internecie globalnej bazie danych markerów *P. infestans* można znaleźć informacje dotyczące: pochodzenia geograficznego, pierwotnego gospodarza i jego odmiany, typu kojarzeniowego, genotypów GPI i PEP, odporności na metalaksyl i profilu RFLP DNA jądrowego danego izolatu (Forbes i in., 1998; <http://www.cipotato.org/gilb/isolate/>).

Podejmowane są próby rozszerzenia tej listy markerów. Markery RAPD zastosował Mahuku, wykorzystując 40 dostępnych komercyjnie primerów, z których 6 wykazało polimorfizm DNA sześciu badanych izolatów. Następnie wybrane primery zastosowano do charakteryzacji 141 kanadyjskich izolatów, co pozwoliło wyodrębnić wśród nich 21 grup, niesprzężonych z typem kojarzeniowym, profilem GPI ani odpornością na metalaksyl (Mahuku i in., 2000). W innej pracy zaprojektowano primery na podstawie znanych sekwencji pięciu genów *P. infestans*, które ulegają ekspresji podczas infekcji. Polimorfizm odnotowano jedynie w obrębie sekwencji *ipiB1*, po jej namnożeniu metodą PCR i trawieniu enzymem restrykcyjnym HaeIII (Perez i in., 2001). Perez zastosował markery AFLP, celem wykrycia polimorfizmu w ramach linii klonalnej US-1 (Perez i in., 2001), używał ich także Strömberg i wsp.(2001).

Tabela 2

**Częstotliwość różnych markerów izolatów *P. infestans* w cytowanych publikacjach**  
**Frequency of different markers of *P. infestans* isolates in the cited papers**

| Marker                                              | Liczba publikacji<br>Number of papers | % publikacji<br>% of papers |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Typ kojarzeniowy<br>Mating type                     | 33                                    | 97,0                        |
| Profil GPI<br>GPI profile                           | 30                                    | 88,2                        |
| Profil PEP<br>PEP profile                           | 25                                    | 73,5                        |
| Odporność na metalaksyl<br>Metalaxyl resistance     | 18                                    | 52,9                        |
| Sonda RG-57<br>RG-57 probe                          | 17                                    | 50,0                        |
| Wirulencja<br>Virulence                             | 10                                    | 29,4                        |
| Haplotyp mitochondrialny<br>Mitochondrial haplotype | 7                                     | 20,6                        |
| Agresywność<br>Aggressiveness                       | 3                                     | 8,8                         |
| Patogeniczność<br>Pathogenicity                     | 3                                     | 8,8                         |
| Inne<br>Other                                       | 3                                     | 8,8                         |
| Ogólna liczba publikacji<br>Total number of papers  | 34                                    | 100                         |

Dzięki fenotypowym i genotypowym markerom izolatów *P. infestans* możliwe jest śledzenie dróg migracji tego patogenu, prowadzenie badań genetycznych, w których markery służą do odróżniania rekombinantów, prowadzenie badań filogenetycznych, odróżnianie populacji seksualnych od aseksualnych i określanie zmian w puli genetycznej populacji w czasie i przestrzeni.

## LITERATURA

- Bartkowiak B., Weber Z. 2000. Characterization of *Phytophthora infestans* population from tomato in Kujawy region from 1994 to 1996. *Phytopathol. Pol.* 19: 27 — 33.
- Black W., Mastenbroek C., Millsand W. R., Peterson R. C. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica* 2: 173 — 178.
- Carter D. A., Archer S. A., Buck K. W., Shaw D. S., Shattock R. C. 1990. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycol. Res.* 94: 1123 — 1128.
- Chycoski C. I., Punja Z. K. 1996. Characteristics of populations of *Phytophthora infestans* from potato in British Columbia and other regions of Canada during 1993 to 1995. *Plant Dis.* 80: 579 — 589.
- Derie M. L., Inglis D. A. 2001. Persistence of complex virulences in populations of *Phytophthora infestans* in Western Washington. *Phytopathology* 91: 606 — 612.
- Elansky S., Smirnov A., Dyakov Y., Dolgova A., Filippov A., Kozlovsky B., Kozlovskaya I., Russo P., Smart C., Fry W. E. 2001. Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from Moscow region, Siberia and Far East. *J. Phytopathology* 149: 605 — 611.

- Erselius L. J., Vega-Sánchez M. E., Forbes G. A. 2000. Stability in population of *Phytophthora infestans* attacking tomato in Ecuador demonstrated by cellulose assessment of glucose-6-phosphate isomerase. *Plant Dis.* 84: 325 — 327.
- Forbes G. A., Goodwin S. B., Drenth A., Oyarzun P., Ordóñez M. E., Fry W. E. 1998. A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 82: 811 — 818.
- Fry W. E., Drenth A., Spielman L. J., Mantel B. C., Davidse L. C., Goodwin S. B. 1991. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Phytopathology* 81: 1330 — 1336.
- Fry W. E., Goodwin S. B., Dyer A. T., Matuszak J. M., Drenth A., Tooley P. W., Sujkowski L. S., Koh Y. J., Cohen B. A., Spielman L. J., Deahl K. L., Inglis D. A., Sanlan K. P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Dis.* 77: 653 — 661.
- Goodwin S. B., Drenth A., Fry W. E. 1992. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr. Gen.* 22: 107 — 115.
- Goodwin S. B., Cohen B. A., Deahl K. L., Fry W. E. 1994 a. Migration from Northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology* 84: 553 — 558.
- Goodwin S. B., Cohen B. A., Fry W. E. 1994 b. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1191 — 1195.
- Goodwin S. B., Sujkowski L. S., Dyer A. T., Fry B. A., Fry W. E. 1995 a. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Northern North America. *Phytopathology* 85: 473 — 479.
- Goodwin S. B., Schneider R. E., Fry W. E. 1995 b. Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 79: 1181 — 1185.
- Goodwin S. B., Drenth A. 1997 a. Origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology* 87: 992 — 999.
- Goodwin S. B. 1997 b. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87: 462 — 473.
- Grünwald N. J., Flier W. G., Sturbaum A. K., Garay-Serano E., van den Bosch T. B. M., Smart C. D., Matuszak J. M., Lozoya-Saldana H., Turkensteen L. J., Fry W. E. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley region of Central Mexico. *Phytopathology* 91: 882 — 890.
- Griffith G. W., Shaw D. S. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4007 — 4014.
- Hermansen A., Hannukala A., Hafskjold Naerstad R., Brurberg M. B. 2000. Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathol.* 49: 11 — 22.
- Judelson H. S. 1996. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Mol. Gen. Genet.* 252: 155 — 161.
- Kapsa J. 2001. Zaraza (*Phytophthora infestans* /Mont./ de Bary) występująca na łodygach ziemniaka. Monogr. i Rozpr. Nauk. IHAR 11, Radzików.
- Kato M., Mizubuti E. S., Goodwin S. B., Fry W. E. 1997. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* 87: 973 — 978.
- Ko W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *J. Gen. Microbiol.* 107: 15 — 18.
- Ko W. H. 1980. Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. *J. Gen. Microbiol.* 116: 459 — 463.
- Koh Y. J., Goodwin S. B., Dyer A. T., Cohen B. A., Ogoshi A., Sato N., Fry W. E. 1994. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian Countries. *Phytopathology* 84: 922 — 927.
- Lebreton L., Laurent C., Andrivon D. 1998. Evolution of *Phytophthora infestans* populations in the two most important potato production areas of France during 1992–96. *Plant Pathol.* 47: 427 — 439.
- Lebreton L., Lucas J. M., Andrivon D. 1999. Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and tomato in France. *Phytopathology* 89: 679 — 686.

- Mahuku G., Peters R. D., Platt H. W., Daayf F. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994 to 1996. *Plant Pathol.* 49: 252 — 260.
- McLeod A., Denman S., Sadie A., Denner F. D. N. 2001. Characterisation of South African isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 85: 287 — 291.
- Miller J. S., Hamm P. B., Johnson D. A. 1997. Characterisation of the *Phytophthora infestans* population in the Columbia Basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995. *Phytopathology* 87: 656 — 660.
- Mosa A. A., Kobayashi K., Ogoshi A., Kato M., Sato N. 1993. Isoenzyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. *Plant Pathol.* 42: 26 — 34.
- Mukalazi J., Adipala E., Sengooba T., Hakiza J. J., Olanya M., Kidanemariam H. M. 2001. Metalaxyl resistance, mating type and pathogenicity of *Phytophthora infestans* in Uganda. *Crop Protection* 20: 379 — 388.
- Niederhauser J. S. 1956. The blight, the blighter, and the blighted. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 19: 5 — 63.
- Ordóñez M. E., Hohl H. R., Velasco J. A., Ramon M. P., Oyarzun P. J., Smart C. D., Fry W. E., Forbes G. A., Erselius L. J. 2000. A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans* attacks wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology* 90: 197 — 202.
- Paquin B., Laforest M. J., Forget L., Roewer I., Wang Z., Longcore J., Lang B. F. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.* 31: 380 — 395.
- Perez W. G., Gamboa J. S., Falcon Y. V., Coca M., Raymundo R. M., Nelson R. J. 2001. Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 91: 956 — 965.
- Peters R. D., Sturz A. V., Matheson B. G., Arsénault W. J., Malone A. 2001. Metalaxyl sensitivity of isolates of *Phytophthora erythroseptica* in Prince Edward Island. *Plant Pathol.* 50: 302 — 309.
- Ristaino J. B., Groves C. T., Parra G. R. 2001. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimen. *Nature* 411: 695 — 697.
- Sedegui M., Carroll R. B., Morehart A. L., Evans T. A., Kim S. H., Lakhdar R., Arifi A. 2000. Genetic structure of *Phytophthora infestans* population in Morocco. *Plant. Dis.* 84: 173 — 176.
- Shattock R. C., Shaw D. S., Fyfe A. M., Dunn J. R., Loney K. H., Shattock J. A. 1990. Phenotypes of *Phytophthora infestans* collected in England and Wales from 1985 to 1988: mating type, response to metalaxyl and isoenzyme analysis. *Plant Pathol.* 39: 242 — 248.
- Shattock R. C., Tooley P. W., Fry W. E. 1986. Genetics of *Phytophthora infestans*: determination of recombination, segregation, and selfing by isozyme analysis. *Phytopathology* 76: 410 — 413.
- Shattock R. C., Tooley P. W., Sweigard J., Fry W. E. 1987. Genetic studies of *Phytophthora infestans*. in *Genetics and Plant Pathogenesis*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 175 — 185.
- Spielman L. J. 1989. Isozymes in the population genetics of *Phytophthora infestans*. *Phytophthora*, Cambridge University Press, Cambridge: 231 — 241.
- Spielman L. J., Drenth A., Davidse L. C., Sujkowski L. J., Gu W., Tooley P. W., Fry W. E. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? *Plant Pathol.* 40: 422 — 430.
- Spielman L. J., Sweigard J. A., Shattock R. C., Fry W. E. 1990. The genetics of *Phytophthora infestans*: segregation of allozyme makers in F<sub>2</sub> and backcross progeny and the inheritance of virulence against potato resistance genes R2 and R4 in F<sub>1</sub> progeny. *Exp. Mycol.* 14: 57 — 69.
- Strömberg A., Boström U., Hallenberg N. 2001. Oospore germination and formation by the late blight pathogen *Phytophthora infestans* *in vitro* and under field conditions. *J. Phytopathology* 149: 659 — 664.
- Sujkowski L. S., Goodwin S. B., Dyer A. T., Fry W. E. 1994. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* 84: 201 — 207.
- Sujkowski L. S., Goodwin S. B., Fry W. E. 1996. Changes in specific virulence in Polish populations of *Phytophthora infestans*: 1985–1991. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 555 — 561.
- Świeżyński K. M., Zimnoch-Guzowska E. 2001. Breeding potato cultivars with tubers resistant to *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 44: 97 — 117.

- Therrien C. D., Ritch D. L., Davidse L. C., Jespers B. K., Spielman L. J. 1989. Nuclear DNA content, mating type and metalaxyl sensitivity of eighty-three isolates of *Phytophthora infestans* from the Netherlands. *Mycol. Res.* 92: 140 — 146.
- Tooley P. W., Fry W. E., Villarreal Gonzalez M. J. 1985. Isozyme characterisation of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *J.Hered.* 76: 431 — 435.
- Tooley P. W., Therrien C. D., Ritch D. L. 1989. Mating type, race composition, nuclear DNA content, and isozyme analysis of Peruvian isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 79: 478 — 481.
- Van der Lee T., Testa A., van Klooster J., van den Berg-Velthuis G., Govers F. 2001. Chromosomal deletion in isolates of *Phytophthora infestans* correlates with virulence on R3, R10, and R11 potato lines. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1444 — 1452.
- Vega-Sánchez M. E., Erselius L. J., Rodriguez A. M., Bastidas D., Hohl H. R., Ojiambo P. S., Mukalazi J., Vermeulen T., Fry W. E., Forbes G. A. 2000. Host adaptation to potato and tomato within the US — 1 clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Uganda and Kenya. *Plant Pathol.* 49: 531 — 539.
- Whisson S. C., van der Lee T., Bryan G. J., Waugh R., Govers F., Birch P. R. J. 2001 a. Physical mapping across an avirulence locus of *Phytophthora infestans* using a highly representative, large-insert bacterial artificial chromosome library. *Mol. Genet. Gen.* 266: 289 — 295.
- Whisson S. C., van der Lee T., Bryan G. J., Waugh R., Govers F., Birch P. R. J. 2001 b. *Phytophthora infestans* genomics: positional cloning of a virulence genes. *Scottish Crop Research Institute Annual Report*: 132 — 134.
- Zarzycka H., Sobkowiak S. 1999. Sexuality of *Phytophthora infestans* and the role of oospores as a primary infection source of potato late blight. *J. Plant Protection Res.* 39: 109 — 115.
- Zarzycka H. 2001. Ocena wirulencji, agresywności i typu kojarzeniowego izolatów *Phytophthora infestans*. W: *Monogr. i Rozpr. Nauk. IHAR 10, praca zbior. Radzików*: 65 — 67.