

SYLWESTER SOBKOWIAK**HANNA ZARZYCKA****RENATA LEBECKA****EWA ZIMNOCH-GUZOWSKA**

Zakład Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Młochowie

Wpływ koncentracji inokulum i terminów oceny odporności na ekspresję agresywności i wirulencji *Phytophthora infestans* w stosunku do ziemniaka

Effect of inoculum concentration and date of resistance test on expression of aggressiveness and virulence of *Phytophthora infestans* towards the potato

W ciągu dwóch lat badań oceniano zmienność wirulencji i agresywności 12 izolatów *Phytophthora infestans* po inokulacji listków ziemniaka. Ekspresja obu tych cech zmieniała się okresowo w ciągu roku. Najwyższy poziom agresywności i najszerszy zakres wirulencji był obserwowany wczesną wiosną i jesienią. Dwa izolaty *P. infestans* MP 324 i MP 423 charakteryzowały się największą stabilnością ekspresji agresywności i wirulencji. Stwierdzono istotną korelację między poziomem agresywności i wykrywalnością czynników wirulencji. Badano także wpływ różnych stężeń inokulum na ekspresję agresywności i wirulencji. Obserwowano istotnie wyższą wykrywalność czynników wirulencji po zastosowaniu inokulum o wyższych stężeniach. Nie stwierdzono jednak korzystnego wpływu wyższych koncentracji zawiesiny na poziom agresywności w okresie, w którym rutynowo są przeprowadzane testy odporności ziemniaka na *P. infestans*.

Słowa kluczowe: agresywność, inokulum, *Phytophthora infestans*, termin oceny, wirulencja

The variation of aggressiveness and virulence of 12 *Phytophthora infestans* isolates after artificial inoculation on potato leaflets was examined in a two-year study. The expression of these features varied periodically during the year. The highest level of aggressiveness and the widest spectrum of virulence were observed in early spring and early autumn. The best stability of virulence and aggressiveness expression was presented by MP 324 and MP 423 isolates of *P. infestans*. Significant correlation between level of aggressiveness and detectability of virulence was noticed. Higher inoculum concentrations were found to enhance both the virulence spectrum and the level of aggressiveness of *P. infestans*. However, no positive effect of the increased inoculum doses on the level of aggressiveness was observed in the seasons of routine tests to assess potato resistance to *P. infestans*.

Key words: aggressiveness, date of evaluation, inoculum, *Phytophthora infestans*, virulence

WSTĘP

Warunki środowiska, w których rośnie ziemniak mają znaczny wpływ na jego reakcje odpornościowe na *Phytophthora infestans* (Rotem i in., 1971; Victoria i Thurston, 1974). Warunki te wpływają zarówno na odporność żywiciela i cechy patogenu, jak i na ekspresję interakcji pomiędzy tymi dwoma organizmami. W czasie przeprowadzania oceny odporności materiałów hodowlanych ziemniaka na *P. infestans* często obserwowano okresową zmienność reakcji ziemniaka na ten patogen. Badania nad wpływem pór roku na patogeniczność *P. infestans* w stosunku do ziemniaka przeprowadziła Świszczewska ze współpracownikami (1972). Wielu autorów stwierdziło znaczny wpływ długości dnia na intensywność rozwoju choroby na liściach ziemniaka: silniejsze porażenie było obserwowane przy krótkim dniu (Thurston, 1957; Ulrich i Krug, 1965). Z tego powodu znaczny wpływ na reakcje odpornościowe ziemniaka może mieć wybór właściwego terminu przeprowadzania testów oceny odporności (Darsow i wsp., 1988). Problem zapobiegania zmienności w przebiegu interakcji *P. infestans*-ziemniak rozpatrywano pod kątem zwiększenia reakcji podatności rośliny poprzez dobór listków o odpowiednim wieku fizjologicznym odpowiednio usytuowanych na roślinie (Sieczka, 1979; Carnegie i Colhoun, 1982). Z drugiej strony podejmowano próby zwiększenia patogeniczności *P. infestans* poprzez kształtowanie składu jakościowego i koncentracji inokulum. Uważa się, że najlepsze efekty można uzyskać po zastosowaniu jako inokulum zawiesiny sporangiów i pływek (Pietkiewicz, 1976b; Carnegie i Colhoun, 1982; Zarzycka i wsp., 1984). Zawiesina złożona jedynie z pływek uwolnionych ze sporangiów nie jest polecana, gdyż zarodniki te szybko tracą żywotność (Lapwood i McKee, 1966; Nilson, 1981). Stwierdzono również wpływ koncentracji inokulum na poziom porażenia ziemniaka przez *P. infestans* (Pietkiewicz, 1976 a; Sieczka, 1979; Nilson, 1981; Carnegie i Colhoun, 1982; Zarzycka, 1989). Wyniki dotychczasowych badań nie były jednoznaczne, gdyż przy wyższej koncentracji sporangiów stwierdzono intensywniejsze porażenie listków, ale gdy przekroczyło ono 200 sporangiów w 1 mm³ infekcyjność inokulum spadała. Wpływ ten zaobserwowano tylko w przypadku odpornych odmian ziemniaka.

Sujkowski (1983; 1986 a i 1986 b) obserwował sezonową zmienność ekspresji patogeniczności i sporulacji *P. infestans* występującą w ciągu roku. Według niektórych autorów (Jinks i Grindle, 1963; Paxman, 1963; Caten i Jinks, 1968; Kubicka, 1969; Pietkiewicz, 1978) zróżnicowanie izolatów pod względem patogeniczności wynika z przystosowania patogenu do innej niż macierzysta formy ziemniaka (np. innej odmiany).

Badania nad sezonową zmiennością agresywności i wirulencji *P. infestans* zostały rozpoczęte w roku 2000 (Sobkowiak i in., 2001). W poszczególnych miesiącach na ogół zachował się wysoki poziom agresywności i wirulencji. Tylko w czerwcu stwierdzono nagłe zmniejszenie ekspresji tych cech.

Niniejsza praca miała na celu stwierdzenie, czy ekspresja agresywności i wirulencji *P. infestans* ulega sezonowej zmienności i uzyskanie wskazówek do skorygowania terminów przeprowadzania testów oceny odporności materiałów hodowlanych ziemniaka na ten patogen. W związku z obniżeniem patogeniczności izolatów w czerwcu roku 2000 (Sobkowiak i in., 2001), dodatkowo w roku 2001 przeprowadzono począwszy od maja

a skończywszy na początku lipca cotygodniowe monitorowanie frekwencji czynników wirulencji. Ponadto podjęto próbę zwiększenia ekspresji wirulencji i agresywności patogenu za pomocą zastosowania koncentracji inokulum wyższej niż używanej standardowo.

MATERIAŁ I METODY

Ocena zmienności agresywności i wirulencji *P. infestans*

Doświadczenia przeprowadzono od lutego do grudnia w latach 2000–2001. Oceniano poziom agresywności i zakres wirulencji 12 izolatów *P. infestans* wyizolowanych w latach 1997–1999, które podczas wstępnej oceny charakteryzowały się szerokim zakresem wirulencji (9–10 czynników) oraz wysokim poziomem agresywności (1 według skali 9-stopniowej) (tab. 1). Kultury izolatów użytych do doświadczeń były przechowywane pod olejem parafinowym w temperaturze 7°C, a w czasie rozmnażania przed inokulacją były trzykrotnie pasażowane na plastrach ziemniaka podatnej odmiany Tarpan.

Rośliny przeznaczone do inokulacji, które rosły w szklarni, były w okresie wczesnowiosennym, późnojesiennym i zimowym doświetlane światłem o natężeniu 2000 luksów przez 6 godzin w ciągu doby. Poziom agresywności badano na listkach odmian Bintje i Tarpan, charakteryzujących się brakiem odporności specyficznej warunkowanej genami R. Zakres wirulencji izolatów sprawdzano na listkach testerów Blacka zawierających pojedyncze geny odporności specyficznej od R1 do R11. Listki do inokulacji były pobierane ze środkowego piętra 8-tygodniowych roślin ziemniaka.

W połowie każdego miesiąca, inokulowano poszczególnymi izolatami po dwa odcięte listki każdego z testerów (i odmian) umieszczając na nich po dwie krople inokulum (każdą po przeciwnych stronach nerwu listka) o koncentracji 50 sporangiów w 1 mm³. Każda kropla zawierała około 2000–2500 sporangiów. Inokulacji dokonywano, gdy ze sporangiów zaczynały się uwalniać pływki.

Ocena porażenia była przeprowadzona po 6 dniach inkubacji listków w temperaturze 16°C w świetle fluorescencyjnym o natężeniu około 2000 luksów. Przy określaniu poziomu agresywności posługiwano się 9-stopniową skalą oceny, w której 1 oznacza całkowite porażenie, a każdy następny stopień odpowiada określonemu procentowi porażonej powierzchni listka (Zarzycka, 1997).

Zakres wirulencji oceniano na listkach 11 testerów Blacka. Jako objaw ekspresji danego czynnika wirulencji uznawano występowanie typowej plamy chorobowej z zarodnikowaniem. Opisane powyżej warunki prowadzenia doświadczeń odpowiadały standardowym warunkom stosowanym przy ocenie odporności materiałów hodowlanych ziemniaka na *P. infestans*.

Ponieważ w czerwcu 2000 roku zaobserwowano znaczne obniżenie patogeniczności badanych izolatów *P. infestans*, w czerwcu 2001 roku przeprowadzono dodatkowe cotygodniowe testy, aby można było dokładniej określić przebieg zmian patogeniczności w tym okresie.

Ocena wpływu koncentracji inokulum na zmienność agresywności i wirulencji *P. infestans*

Doświadczenie przeprowadzono w 2001 roku od lutego do grudnia. Zastosowano pięć izolatów charakteryzujących się szerokim zakresem wirulencji i wysokim poziomem agresywności. Izolaty te charakteryzowały się:

- Izolat US-8 pochodził ze Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej, podczas wstępnej oceny charakteryzował się nie 10-, a 9-czynnikową frekwencją czynników wirulencji.
- Izolat MP 425 w marcu 2000 roku jako jedyny wykazał się 11-czynnikową ekspresją wirulencji.
- Izolat MP 427 w roku 2000, nie włączając głębokiego spadku wirulencji w czerwcu, wykazał się w czasie 11 miesięcznej oceny największą stabilnością wirulencji (od 7 czynników w lutym i sierpniu do 10 czynników w marcu, październiku i grudniu).
- Izolaty MP 420 i MP 421 w czasie oceny w 2000 roku, charakteryzowały się trzema (MP 420) oraz dwoma (MP 421) głębokimi spadkami wirulencji przy użyciu inokulum o koncentracji 50 sporangiów w 1 mm³.
- Zastosowano 3 koncentracje inokulum: 50 (standardowa), 100 i 200 sporangiów w 1 mm³. Sposób przeprowadzenia doświadczeń był taki sam jak w p. 1.

Sposób opracowania wyników

Istotność różnic w poziomie agresywności i zakresie wirulencji oszacowano za pomocą analizy wariancji stosując test Tukeya. Analizę agresywności wykonano na stopniach porażenia, a wirulencji na przekształceniach proporcji dwumianowej Freemana-Tukeya. Ze względu na nieustaloną bardzo niską wykrywalność czynników wirulencji oraz niską agresywność w czerwcu 2000 roku wśród większości ocenianych izolatów, nie włączono wyników z tego okresu do ogólnej oceny.

WYNIKI I DYSKUSJA

Sezonowa zmienność poziomu agresywności *P. infestans*

Agresywność w latach 2000–2001 była bardzo duża. Wszystkie badane izolaty można zaliczyć do bardzo agresywnych (tab. 1). Jednak agresywność w 2000 roku charakteryzowała się większą sezonową zmiennością niż w roku 2001. Przez cały okres wiosenny 2000 roku obserwowano wysoki poziom agresywności w granicach 1–1,8 stopnia (rys. 1 A). W okresie letnim zanotowano dwa spadki poziomu ekspresji tej cechy: w czerwcu (a następnie wzrost w lipcu) i sierpniu, potem szczyt we wrześniu i październiku i stopniowy spadek agresywności do poziomu 2,4 w listopadzie. W 2001 roku zanotowano wyraźny szczyt wiosenny w kwietniu i maju, wyraźny spadek agresywności do 2,1 stopnia w czerwcu i drugi, wyraźny szczyt jesienny we wrześniu. Istotność różnic w poziomie agresywności obserwowano przy jej czerwcowym spadku w porównaniu z obu szczytami (wiosennym i jesiennym). Stwierdzono pewną zmienność w reakcji poszczególnych izolatów, lecz nie była ona statystycznie istotna (rys. 3 A). Tendencję do silnej agresywności, zbliżonej do oceny początkowej (tab. 1), w stosunku do odmian ziemniaka nieposiadających odporności specyficznej, wykazywały izolaty MP 423, MP 324 i MP 421.

Tabela 1

Początkowa charakterystyka izolatów *P. infestans* użytych w doświadczeniu
Initial characteristics of *P. infestans* isolates used in the experiment

Nazwa izolatu Name of isolate	Rok izolacji Year of isolation	Zakres wirulencji ¹ Range of virulence	Poziom agresywności ² Level of aggressiveness	Typ kojarzeniowy Mating type
MP 322	1997	1.2.3.4.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 324	1997	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 419	1997	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 420	1997	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 421	1997	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 422	1998	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 423	1998	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A2
MP 424	1999	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 425	1999	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 426	1999	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
MP 427	1999	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A1
US-8	1994	1.2.3.4.5.6.7.10.11	1,0	A2

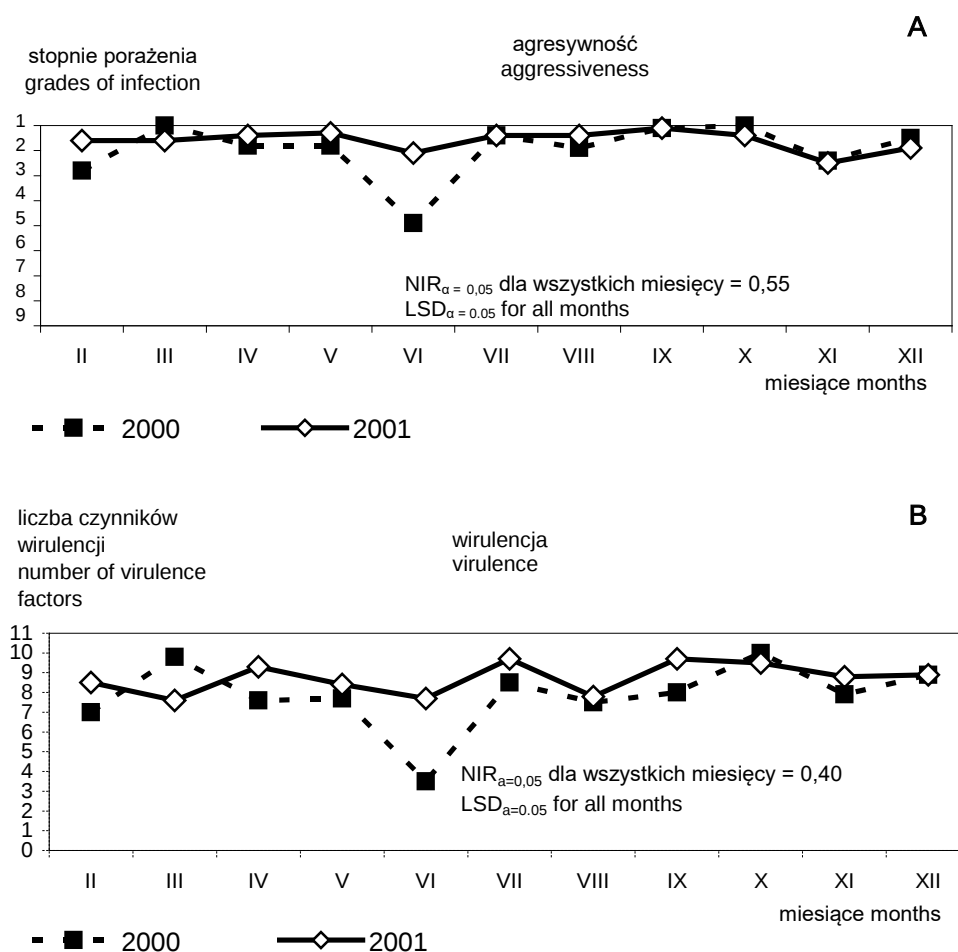
¹ Oceniano na listkach testerów Blacka zawierających pojedyncze geny odporności specyficznej od R1 do R11; Assessed on single Black's differential from R1 to R11

² W skali 1–9, gdzie 1 oznacza całkowite porażenie; On a scale of 1–9, where 1 means total infection

Najniższy poziom agresywności zanotowano w czerwcu 2000 roku. Przebieg linii obrazujących w naszych badaniach sezonową dynamikę ekspresji agresywności (rys. 1 A) jest zbliżony do przebiegu linii obrazujących dynamikę patogeniczności *P. infestans* w badaniach Sujkowskiego (1986 a). Wprawdzie pojęcie patogeniczności jest szersze od pojęcia agresywności, gdyż patogenicznością nazywa się aktywność patogenu skierowaną przeciwko wszystkim genotypom ziemniaka, agresywnością — aktywność skierowaną przeciwko genotypom nieposiadającym odporności specyficznej, ale w obu przypadkach skutki interakcji patogen-żywiciel ocenia się metodą ilościową (a nie jakościową jak w przypadku wirulencji) (Vanderplank, 1978). Dlatego uważamy, że oba te pojęcia można uznać za porównywalne. Podobieństwa w przebiegu zmian patogeniczności wyrażają się u Sujkowskiego niewielkim spadkiem patogeniczności w czerwcu, wzrostem w lipcu, silnym spadkiem w sierpniu, a następnie jesiennym szczytem we wrześniu. Różnice w przebiegu zmian patogeniczności polegają na późniejszym, majowym wystąpieniu wiosennego szczytu patogeniczności w pracy Sujkowskiego, a nie w marcu jak w omawianych obecnie badaniach. Poziom patogeniczności oceniany przez Sujkowskiego w maju był wyższy niż marcowa agresywność izolatów oceniana w latach 2000–2001.

Ponieważ nasze prace dotyczyły przede wszystkim ustalenia najkorzystniejszego terminu przeprowadzenia masowych testów nad odpornością ziemniaka na zarazę przyjęliśmy za prawdopodobną postawioną przez Sujkowskiego (1983; 1986 a i 1986 b) hipotezę o cyklicznej zmienności patogeniczności i sporulacji *P. infestans*. Należy jednak podkreślić, że znaczna część doświadczeń Sujkowskiego (łącznie z uprawą roślin) przeprowadzona była w fitotronie w kontrolowanych warunkach temperatury, oświetlenia i wilgotności. Natomiast warunki w naszych doświadczeniach odpowiadały standardom stosowanym przy przeprowadzaniu testów masowych (Zarzycka, 2001). Stąd należy się liczyć ze znacznym wpływem zmieniających się w ciągu roku warunków szklarniowych na reakcje odpornościowe uprawianych tam roślin. Chyba tym należy tłumaczyć różnice

występujące między badaniami Sujkowskiego a naszymi w terminach i intensywności szczytów oraz spadków agresywności w czasie sezonu badawczego. Należałoby tu jeszcze dodać, że różnice w reakcji odpornościowej w różnych terminach badań obserwowane były również przez Świeżyńskiego i wsp. (1997).



Rys. 1 A i B. Dynamika ekspresji wirulencji i agresywności izolatów *P. infestans* w stosunku do listków ziemniaka w ciągu lat 2000–2001

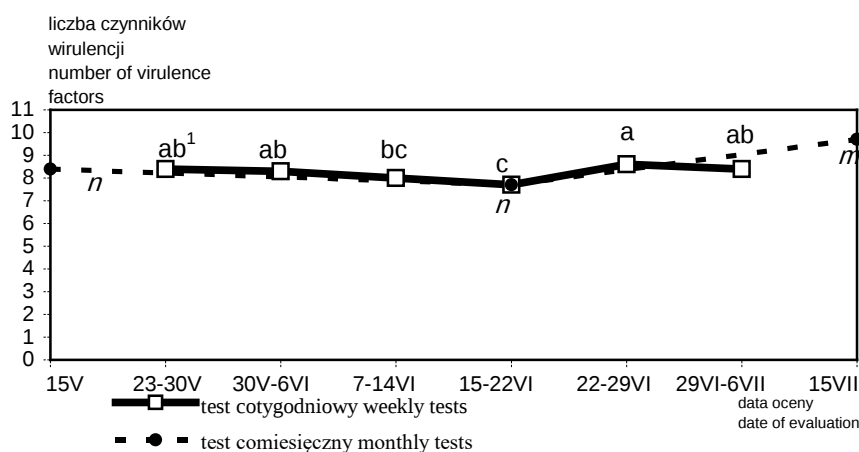
Fig. 1 A and B. Dynamics of virulence and aggressiveness expression of *P. infestans* isolates towards potato leaflets in 2000–2001

Sezonowa zmienność zakresu wirulencji *P. infestans*

Zakres wirulencji badanych izolatów był w latach 2000–2001 bardzo szeroki, jednak ekspresja poszczególnych czynników była zmienna w różnych okresach badań.

Ekspresja wirulencji była wyraźnie wyższa w 2001 roku niż w 2000 (rys. 1 B). Badane izolaty charakteryzowały się na początku badań szerokim spektrum wirulencji (8,5–10 czynników). Taki poziom izolaty osiągnęły w 2000 roku w czasie wiosennego szczytu w marcu, letniego w lipcu i jesiennego w październiku. W pozostałych terminach badań ekspresja wirulencji była niepełna, a najniższy poziom osiągnęła w czerwcu — średnio poniżej 4 czynników. W 2001 roku obserwowano szczyt wiosenny w kwietniu, spadek zakresu wirulencji w czerwcu, szczyt letni w lipcu i jesienny we wrześniu–październiku. Ogólnie ekspresja wirulencji w 2001 roku nie spadła poniżej 7 czynników w poszczególnych miesiącach (rys. 1 B).

W miesiącach szczytów i spadków wirulencji zanotowano statystycznie istotne różnice w spektrum wirulencji w porównaniu do pozostałych terminów (rys. 1 B).



¹ Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie istotnie według testu Tukeya przy $P = 0,05$

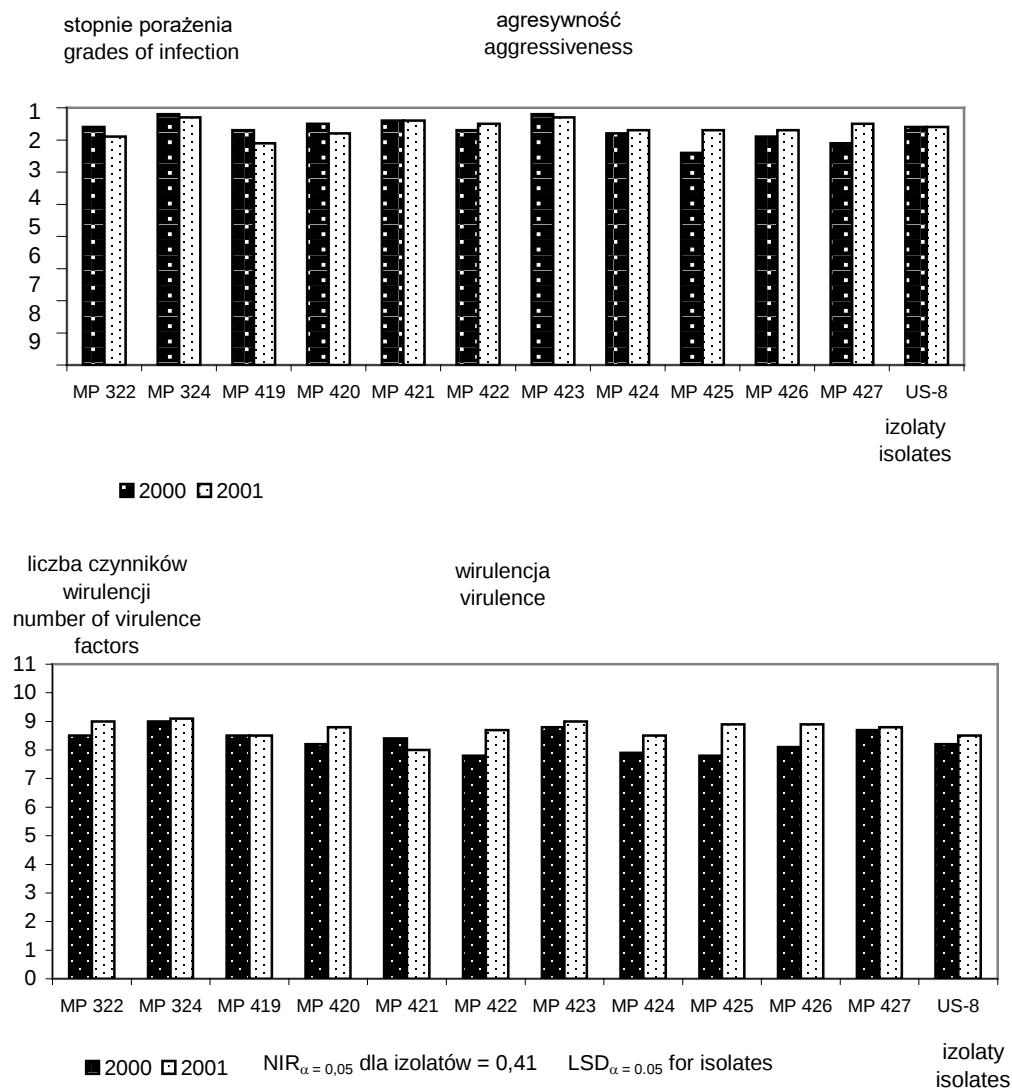
¹ Values followed by the same letters are not significantly different according to Tukey's test at $P = 0.05$

Rys. 2. Dynamika ekspresji wirulencji izolatów *P. infestans* w stosunku do ziemniaka ocenianych w okresie od 23 maja do 6 lipca 2001 r.

Fig. 2. Dynamics of virulence expression of *P. infestans* isolates towards potato leaflets from May 23 to July 6 2001

Dane przedstawione na rysunku 3 B charakteryzują ekspresję wirulencji pomiędzy izolatami. W ciągu dwóch lat badań najbardziej wirulentne okazały się izolaty MP 324 i MP 423, wśród których średnia ekspresja wirulencji wynosiła 9 czynników. Wymienione dwa izolaty, oprócz największej średniej frekwencji czynników wirulencji, odznaczały się dużą stabilnością zarówno wirulencji jak i agresywności (rys. 3 A i B). Izolaty te będą brane pod uwagę przy doborze izolatów do oceny odporności materiałów hodowlanych

IHAR w Młochowie. Trzy izolaty (MP 324, MP 425 i MP 427) w lipcu roku 2001 w okresie szczytu letniego charakteryzowały się 11 czynnikową ekspresją wirulencji.



Rys. 3 A i B. Dynamika ekspresji wirulencji silnie patogenicznych izolatów *P. infestans* ocenianych w ciągu lat 2000–2001

Fig. 3 A and B. Dynamics of virulence spectrum of highly pathogenic *P. infestans* isolates in 2000–2001

W dwuletnich badaniach najmniejszą ekspresją wirulencji odznaczały się izolaty MP 421 i MP 424 (średnio 8 czynników) (rys. 3 B).

W czasie przeprowadzania dodatkowych cotygodniowych testów w czerwcu 2001 roku zaobserwowano podobny przebieg krzywej charakteryzującej ekspresję wirulencji do przebiegu krzywej charakteryzującej ekspresję wirulencji w testach przeprowadzonych w odstępach miesięcznych (rys. 2). Jednorazowa obserwacja przeprowadzona w środku miesiąca okazała się w tych testach wystarczająca.

Przebieg linii obrazujących poziom agresywności i zakres wirulencji badanych izolatów w latach 2000 i 2001 przedstawia znaczne podobieństwo (rys. 1 A i B). Współczynnik korelacji dla obu lat wynosi $r = -0,860^{**}$ (znak ujemny wynika z odwrótności zastosowanych skal oceny). Wskazuje to na współzależność między agresywnością i wirulencją *P. infestans* w stosunku do listków ziemniaka.

Ponieważ przy ocenie odporności materiałów hodowlanych ziemniaka na *P. infestans* ważny jest dobór patogenu charakteryzującego się wysokim poziomem agresywności i szerokim zakresem wirulencji, wskazane jest rozpoczynanie rutynowych testów oceniających odporność w drugiej połowie czerwca i kończenie ich w drugiej połowie lipca. Doświadczenia mogą być również przeprowadzane w okresie szczytu wiosennego (marzec-kwiecień) i jesiennego (wrzesień-październik). Przed rozpoczęciem testu oceny odporności wskazane jest 2–3 krotne sprawdzenie patogeniczności patogenu ze względu na międzyizolatową zmienność zarówno agresywności jak i wirulencji.

Sezonowa zmienność ekspresji poszczególnych czynników wirulencji *P. infestans*

Największą frekwencją występowania w granicach od 0,86 do 1,00 odznaczały się czynniki wirulencji 1, 2, 3, 4, 6, 7 i 11 (tab. 2). Średnią frekwencją w granicach od 0,42 do 0,79 odznaczały się czynniki 10, 5 i 8, a słabą (0,04) — czynnik 9. Najślabszą wykrywalność większości czynników, głównie w 2000 roku, zaobserwowano w czerwcu, czyli w czasie największego spadku poziomu agresywności: w tym okresie, zwłaszcza w 2000 roku, stwierdzono znacznie zmniejszoną wykrywalność czynników wirulencji wymienionych powyżej jako najczęściej występujące. W sierpniu, przy spadku agresywności, stwierdzono słabszą wykrywalność czynników 5, 8 i 10, a w kwietniu czynników 5, 8 i 11.

Czynnik 9 pojawiał się sporadycznie w testach miesięcznych. Niską jego frekwencję wykryto w marcu i grudniu 2000 roku, oraz od lipca do grudnia 2001 roku z wyjątkiem października.

Zaobserwowano związek między poziomem agresywności a frekwencją czynników wirulencji (z wyjątkiem czynników 8, 9 i 10). Współczynniki korelacji między tymi cechami były istotne i ich wartość wahała się w granicach od $r = -0,701^*$ do $r = -0,843^{**}$ (tab. 2). Słaba wykrywalność poszczególnych czynników wirulencji objawiała się nie tylko całkowitym brakiem wykrywalności, (która dotyczyła czynników 5, 8 i 9), ale również niepełną ekspresją polegającą na tym, że porażały się nie wszystkie inokulowane listki. Ta niepełna ekspresja wirulencji w miesiącach czerwiec, sierpień i kwiecień dotyczyła praktycznie prawie wszystkich czynników, jeśli się weźmie pod uwagę oba lata badań.

Tabela 2

Frekwencja poszczególnych czynników wirulencji w latach 2000–2001
The frequency of particular virulence factors in the years 2000–2001

Miesiące Months	v-geny v-genes																					
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	lata years																					
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
II	0,58	1,0	0,71	1,0	0,88	1,0	0,92	1,0	0	0	0,63	1,0	0,83	1,0	0,71	0,71	0	0	0,92	0,75	0,83	1,0
III	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,83	0,38	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,21	0,08	0	1,0	0,08	1,0	0,92
IV	0,96	1,0	0,92	1,0	0,63	1,0	0,83	1,0	0,17	0,88	0,92	1,0	0,92	1,0	0,96	0,38	0	0	0,79	1,0	0,58	1,0
V	0,92	1,0	0,96	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0	0,50	0,92	1,0	1,0	0,96	0	0	0	0	0,96	1,0	1,0	0,92
VI	0,38	1,0	0,50	1,0	0,38	1,0	0,42	1,0	0	0,29	0,46	1,0	0,42	1,0	0	0	0	0	0,46	0,92	0,46	0,50
VII	1,0	1,0	0,96	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,88	0,63	0,92	1,0	1,0	1,0	0,04	1,0	0	0,29	0,71	0,92	0,96	0,83
VIII	0,92	1,0	0,96	1,0	0,92	1,0	0,96	1,0	0,33	0,79	0,96	1,0	0,83	1,0	0,04	0,04	0	0,04	0,58	0,33	0,96	0,63
IX	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,88	1,0	0,21	0,83	1,0	1,0	1,0	1,0	0,25	0,88	0	0,04	0,63	0,96	1,0	1,0
X	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,92	1,0	0,96	1,0	1,0	1,0	0,79	0	0	1,0	0,92	1,0	0,92
XI	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0	0,29	1,0	1,0	1,0	1,0	0,08	0,42	0	0,13	0,92	0,96	1,0	1,0
XII	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,46	0,92	1,0	1,0	1,0	0,83	0,29	0	0,17	0,13	1,0	1,0	1,0	1,0
Średnia Mean	0,86	1,0	0,89	1,0	0,87	1,0	0,89	1,0	0,38	0,58	0,87	1,0	0,89	0,98	0,44	0,40	0,01	0,06	0,78	0,80	0,87	0,88
$\bar{X}$	0,93 a ²		0,95 a		0,94 a		0,95 a		0,48 b		0,94 a		0,94 a		0,42 b		0,04 c		0,79 a		0,88 a	
r ¹	0,822**		0,836**		0,717*		0,749**		0,701*		0,800**		0,843**		0,484		0,149		0,065		0,703*	

$\bar{X}$ — Średnia dla czynników wirulencji z dwóch lat; Mean for factors of virulence within two years

r¹ = Współczynnik korelacji między frekwencją poszczególnych czynników wirulencji a poziomem agresywności; Coefficient of correlation between the frequency of virulence factors and the level of aggressiveness

² Wartości w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się od siebie istotnie według testu Tukeya, przy P = 0,05; Values in the row followed by different letters are significantly different according to Tukey's test at P = 0.05

Ma to prawdopodobnie związek ze spadkiem agresywności badanych izolatów. W miesiącach, w których notowano szczyt poziomu agresywności w marcu, wrześniu, czy w lipcu niepełną ekspresję notowano rzadko i tylko na listkach niektórych testerów.

Wpływ koncentracji inokulum na zmienność poziomu agresywności i zakresu wirulencji *P. infestans*

Próba polepszenia stabilności agresywności i wirulencji patogenu za pomocą zwiększania koncentracji inokulum nie spełniła w pełni oczekiwań. W większości testów przeprowadzonych w różnych terminach różnice w poziomie agresywności po zastosowaniu zróżnicowanego inokulum były nieistotne. Korzystny wpływ wyższych stężeń inokulum obserwowano jedynie w okresie wczesnowiosennym (marzec) i późnojesiennym (listopad). Natomiast w środku lata, w sierpniu istotnie wyższy poziom agresywności stwierdzono po zastosowaniu inokulum standardowego (tab. 3). Podobne wyniki uzyskał Pietkiewicz (1976 a), który stwierdził, że przy stopniowym podnoszeniu koncentracji sporangiów w inokulum następowało wyższe porażenie roślin, ale po przekroczeniu stężenia 200 sporangiów w 1 mm³ infekcyjność inokulum spadała z powodu pogorszenia się warunków tlenowych i związanego z tym słabszego uwalniania pływki. W takim układzie zastosowanie dotleniacza (np. dotleniacza akwariowego) miało korzystny wpływ na ilość sporangiów uwalniających pływki, a tym samym na zwiększenie potencjału infekcyjnego inokulum (Zarzycka, 1989).

Tabela 3

Wpływ koncentracji inokulum na ekspresję agresywności *P. infestans* Effect of inoculum concentration on expression of aggressiveness of *P. infestans*

Miesiące Months	Koncentracja sporangiów w 1 mm ³ — średnie z 12 izolatów Sporangia concentration in 1 mm ³ — means for 12 isolates		
	50	100	200
II	1,35 de ¹	1,60 cde	1,45 cd
III	1,80 bc	1,35 ef	1,40 d
IV	1,40 cde	1,05 f	1,25 d
V	1,15 e	1,40 def	1,25 d
VI	1,50 cde	1,80 bcd	1,85 bc
VII	1,35 de	1,25 ef	1,30 d
VIII	1,20 e	1,95 ab	1,90 b
IX	1,10 e	1,20 f	1,40 d
X	1,75 bcd	1,60 cde	1,65 bcd
XI	2,80 a	2,10 ab	1,45 cd
XII	2,05 b	2,25 a	2,50 a
średni poziom agresywności mean level of aggressiveness	1,59 x ²	1,60 x	1,58 x

Wartości w kolumnach¹ i w wierszu² oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie istotnie według testu Tukeya przy P = 0,05

Values in columns¹ and in row² followed by the same letters are not significantly different according to Tukey's test at P = 0.05

Wyższe koncentracje inokulum miały korzystny wpływ na ekspresję wirulencji. W większości terminów wykrywalność czynników wirulencji po zastosowaniu stężenia 200 sporangiów w 1 mm³ była istotnie wyższa niż po zastosowaniu stężenia standardowego (tab. 5). Na ogół frekwencja czynników wirulencji po zastosowaniu koncentracji

standardowej była mniejsza aniżeli po zastosowaniu pozostałych koncentracji inokulum. Zdarzały się jednak wyjątki, że po zastosowaniu inokulum o koncentracji 50 sporangiów w 1 mm³ wykrywano więcej czynników wirulencji aniżeli po zastosowaniu inokulum o koncentracji 100 sporangiów w 1 mm³ (taką tendencję zaobserwowano w maju i lipcu wśród trzech izolatów). Standardowa koncentracja inokulum zastosowana w maju wobec izolatu MP 421 także miała lepszy wpływ na dynamikę ekspresji wirulencji, ale w tym przypadku, od koncentracji 200 sporangiów w 1 mm³.

W lipcu oraz listopadzie wykrywano przypadki 11 czynnikowej (maksymalnej) ekspresji wirulencji. Tak wysoką wykrywalność najczęściej uzyskiwano po zastosowaniu inokulum o koncentracji 200 sporangiów w 1 mm³ (w listopadzie — wśród trzech izolatów oraz w lipcu — wobec dwóch izolatów). Stężenie 100 sporangiów w 1 mm³ w inokulum zastosowane w listopadzie okazało się względem izolatu MP 421 wystarczające do osiągnięcia 11 czynnikowej ekspresji wirulencji. Natomiast izolaty MP 425 i MP 427 w lipcu osiągnęły 11 czynnikową ekspresję już po zastosowaniu najmniejszego stężenia inokulum. Po zastosowaniu inokulum *P. infestans* o koncentracji 100 sporangiów w 1 mm³ zakres wirulencji kształtował się w przedziale od 7,5 do 11 czynników, a po zastosowaniu inokulum o koncentracji 200 sporangiów w 1 mm³ parametry te ustabilizowały się na poziomie od 8 do 11 czynników. Najmniej stabilne dla wirulencji okazało się najniższe stężenie inokulum 50 sporangiów w 1 mm³, gdyż w kombinacji tej ekspresja wirulencji wahała się od 6 do 11 czynników (tab. 4).

Tabela 4

Wpływ koncentracji inokulum na ekspresję wirulencji *P. infestans*
Effect of inoculum concentration on expression of virulence of *P. infestans*

Miesiące Months	Koncentracja sporangiów w 1 mm ³ — średnie z 12 izolatów Sporangia concentration in 1 mm ³ — means for 12 isolates		
	50	100	200
II	8,6 c ¹	8,9 de	9,2 e
III	7,5 ef	8,8 de	9,4 e
IV	9,0 b	9,3 cd	9,9 cd
V	8,3 cd	7,8 f	8,7 f
VI	7,0 f	8,4 ef	8,5 f
VII	10,0 a	9,8 ab	10,2 b
VIII	7,8 de	8,1 f	8,5 f
IX	9,2 b	9,9 ab	9,9 d
X	9,2 b	9,8 b	10,0 cd
XI	8,6 c	10,1 a	10,7 a
XII	9,1 b	9,5 bc	10,2 bc
Średnia w latach Mean in years	8,6 n ²	9,1 m	9,6 l

Wartości w kolumnach¹ i w wierszu² oznaczone tymi samymi literami nie różnią się od siebie istotnie według testu Tukeya przy P = 0,05

Values in columns¹ and in row² followed by the same letters are not significantly different according to Tukey's test at P = 0.05

W czasie 11 miesięcznej oceny, izolaty okazały się bardziej stabilne pod względem ekspresji czynników wirulencji wobec wyższych koncentracji inokulum (tab. 5).

Tabela 5

Wpływ koncentracji inokulum na ekspresję poszczególnych czynników wirulencji
Influence of inoculum concentration on expression of particular virulence factors

Kon.	Czynniki wirulencji Virulence factors																																
	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			11		
	ekspresja czynników wirulencji expression of virulence factors																																
	IP ¹	IN ²	F ³	IP	IN	F	IP	IN	F	IP	IN	F	IP	IN	F	IP	IN	F	IP	IN	F	IP	IN	F	IP	IN	F	IP	IN	F	IP	IN	F
50	5	0	1,0	5	0	1,0	5	0	1,0	5	0	1,0	2,3	1,1	0,6	5	0	1,0	4,9	0,1	1,0	1,4	0,9	0,4	0,3	0,3	0,1	3,6	0,6	0,8	3,5	0,5	0,8
100	5	0	1,0	5	0	1,0	5	0	1,0	5	0	1,0	2,8	1,2	0,7	5	0	1,0	5	0	1,0	2,3	0,6	0,5	0,4	0,4	0,1	4,4	0,3	0,9	4,5	0,3	0,9
200	5	0	1,0	5	0	1,0	5	0	1,0	5	0	1,0	3,9	0,6	0,8	5	0	1,0	5	0	1,0	2,6	0,4	0,6	1,0	0,4	0,2	4,6	0,2	0,9	4,9	0,1	1,0

Kon. — Koncentracje; Concentrations
IP¹ — Liczba izolatów (na 5 badanych) posiadających pełną ekspresję danego czynnika v (dwa testowane listki danego testeru Blacka były porażone); Number of isolates (of 5 evaluated ones) possessing full expression of a particular v factor (two tested leaves of black’s tester were infected)
IN² — Liczba izolatów (na 5 badanych) posiadających niepełną ekspresję danego czynnika v (jeden z dwóch testowanych listków testeru Blacka był porażony); Number of isolates (of 5 evaluated ones) possessing incomplete expression of a particular v factor (one of 2 tested leaves of Black’s tester was infected)
F³ — Frekwencja danego czynnika wirulencji v; Frequency of a particular virulence v factor

Przy zastosowaniu wyższego stężenia inokulum spadała liczba izolatów, w których występowała niepełna ekspresja czynników wirulencji 5, 8, 10 i 11.

WNIOSKI

1. W ciągu dwóch lat badań ekspresja agresywności i wirulencji zmieniała się okresowo w ciągu roku. Najwyższy poziom agresywności i najszerszy zakres wirulencji obserwowano wczesną wiosną i jesienią.
2. Stwierdzono istotną korelację między poziomem agresywności a wykrywalnością czynników wirulencji.
3. Obserwowano istotnie wyższą wykrywalność czynników wirulencji po zastosowaniu inokulum o wyższych stężeniach.

LITERATURA

- Carnegie S. F., Colhoun J. 1982. Susceptibility of potato leaves to *Phytophthora infestans* in relation to plant age and leaf position. *Phytopathology* 72: 157 — 167.
- Caten C. E., Jinks J. L. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Can. J. Bot.* 46: 329 — 348.
- Darsow U., Junges W., Oertel H. 1988. Die Bedeutung der Prädisposition für die Laborprüfung von Kartoffelblättern auf relative Resistenz gegenüber *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 24: 109 — 119.
- Jinks J. L., Grindle M. 1963. Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity* 18 (3): 254 — 264.
- Kubicka H. 1969. Badania nad *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary na pomidorach w Polsce. II. Porównanie badania nad patogenicznością szczepów *Phytophthora infestans* z pomidorów oraz próba identyfikacji ras tego patogena. *Acta Agrobotanica* 23 (2): 281 — 301.
- Lapwood D. H., McKee R. K. 1966. Dose-response relationships for infection of potato leaves by zoospores of *Phytophthora infestans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 49: 679 — 686.
- Nilsson B. 1981. Component analysis of general resistance to *Phytophthora infestans* in clones from the Colombian potato collection. *Potato Res.* 24: 239 — 244.
- Paxman G. J. 1963. Variation in *Phytophthora infestans*. *E. Potato. J.* 6: 14 — 23.
- Pietkiewicz J. 1976 a. Charakterystyka odporności poziomej ziemniaka na zarazę *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Rozpr. hab. Inst. Ziemn., Bonin.*
- Pietkiewicz J. 1976 b. Metody badań w pracach nad zarazą ziemniaka. *Z Prac Inst. Ziemn.* 6/7: 31 — 39.
- Pietkiewicz J. 1978. Stability of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary races in culture. *Protection Ecology* 1: 55 — 62.
- Rotem J., Cohen J., Putter J. 1971. Relativity of limiting and optimum inoculum loads, wetting duration and temperatures for infection by *Phytophthora infestans*, *Phytopathology* 6: 275 — 278.
- Sieczka M. T. 1979. Próba optymalizacji warunków selekcji ziemniaków pod kątem widzenia odporności polowej na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Praca doktorska, Bonin.*; 81 ss.
- Sobkowiak S., Zarzycka H., Lebecka R., Zimnoch-Guzowska E. 2001. Wpływ terminów oceny na zmienność wirulencji i agresywności wybranych izolatów *Phytophthora infestans*. *Mat. z Konf. „Ochrona Ziemniaka”*, Kołobrzeg, 19–20.04.2001 r.: 144 — 149.
- Sujkowski L. S. 1983. Zmienność właściwości pasożytniczych grzyba *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary w stosunku do ziemniaka w cyklu rocznym. *Praca doktorska, Młochów*: 63 ss.
- Sujkowski L. S. 1986 a. Seasonal variation in pathogenicity of *Phytophthora infestans*. *J. Phytopathology* 117: 160 — 172.
- Sujkowski L. S. 1986 b. Seasonal variation in sporulation of *Phytophthora infestans*. *J. Phytopathology* 117: 357 — 361.

- Świeżyński K., Jakuczun H., Siczka M. T., Zarzycka H. 1997. Odporność ziemniaka na *Phytophthora infestans* i jej ocena. Biul. Inst. Ziemn. 48: 117 — 124.
- Świszczewska J., Osińska M., Piotrowski W. 1972. Patogeniczność ras zarazy ziemniaczanej *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary w zależności od biotypu podłoża i pory roku. Biul. Inst. Ziemn.: 21 — 37.
- Thurston H. D. 1957. The culture of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 47 (3): 186.
- Ullrich J., Krug H. 1965. Der Einfluss von Tageslänge und Temperatur auf die relative Resistenz einiger Kartoffelsorten gegenüber *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Phytopath. Z. 52(3): 295 — 303.
- Vanderplank J. E. 1978. Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 143 — 146.
- Victoria J. I., Thurston H. D. 1974. Light intensity effects on lesion size caused by *Phytophthora infestans* on potato leaves. Phytopathology 64: 753 — 754.
- Zarzycka H. 1997. Ocena zmian zachodzących w polskiej populacji *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Biul. Inst. Ziemn. 48: 125 — 135.
- Zarzycka H. 1989. Wpływ stężenia i rodzaju inokulum na reakcje odpornościowe ziemniaka na *Phytophthora infestans*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 374, 415 — 424.
- Zarzycka H. 2001. Ocena wirulencji, agresywności i typu kojarzeniowego izolatów *Phytophthora infestans*. Monogr. i Rozpr. Nauk., IHAR 10/2001: 65 — 67.
- Zarzycka H., Sawicka E. J., Osiecka M., Sujkowski L. S. 1984. Synteza ziemniaków 24- chromosomowych odpornych na zarazę ziemniaka. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 273, 53 — 65.