SZENT ISTVÁN EGYETEM

INTRA- ÉS INTERSPECIFIKUS KÖLCSÖNHATÁSOK A *PHYTOPHTHORA*-NEMZETSÉGBEN

Doktori értekezés

Nagy Zoltán Árpád

Gödöllő

2006

A doktori iskola

megnevezése: **Biológiatudományi Doktori Iskola**

tudományága: **Biológiatudományok**

vezetője: **Dr. Tuba Zoltán**
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Növénytani és Növényélettani Tanszék

témavezető: **Dr. Érsek Tibor**
tudományos osztályvezető, az MTA doktora
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete,
Növénykórtani Osztály

…….	…….
Dr. Tuba Zoltán	Dr. Érsek Tibor
Az iskolavezető jóváhagyása	A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK **5**

1. BEVEZETÉS **9**

1. 1. Célkitűzések **11**

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS **13**

2. 1. Egy hírhedt kórokozó nemzetség **13**

2. 2. A *Phytophthora infestans* **15**

2. 2. 1. A *Phytophthora infestans* változatossága 19

2. 2. 1. 1. Fenotípusos változatosság 19

2. 2. 1. 2. Genotípusos változatosság 20

2. 2. 2. Kórtörténeti és történelmi előzmények 24

2. 2. 3. Változatosság az ivartalanul szaporodó populációkban 25

2. 2. 4. Ivarosan szaporodó populációk változatossága 26

2. 2. 5. Melyik *Phytophthora infestans*-törzs okozta az írországi járványt? 28

2. 2. 6. A *Phytophthora infestans* Magyarországon 28

2. 3. Természetben előforduló hibrid eredetű mikroorganizmusok **29**

2. 4. Hibridek a *Phytophthora*-nemzetségben **30**

2. 4. 1. Mesterségesen létrehozott fajhibridek 30

2. 4. 2. Természetes körülmények között kialakult hibridek 31

2. 5. Egy természetes eredetű fajhibrid, az éger-*Phytophthora* **32**

2. 5. 1. Kórtörténeti előzmények 32

2. 5. 2. Az éger-*Phytophthora* sejttani és genetikai jellegzetességei 33

2. 5. 3. Az éger-*Phytophthora* Magyarországon 37

3. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK **39**

3. 1. Fitoftórák tenyésztésére használt táptalajok **39**

3. 1. 1. Borsótáptalaj 39

3. 1. 2. V8-dzsúsz 39

3. 1. 3. Sárgarépa-táptalaj 39

3. 2. Kórokozók izolálása **39**

3. 2. 1. *Phytophthora infestans* 39

3. 2. 2. Éger-*Phytophthora* 40

3. 3. Felhasznált izolátumok **41**

3. 3. 1. *Phytophthora infestans* 41

3. 3. 2. Éger-*Phytophthora* 41

3. 4. A *Phytophthora infestans* fenotípusos tulajdonságainak meghatározása 42
3. 4. 1. Metalaxilérzékenység 42
3. 4. 2. Párosodási típus meghatározása 43

3. 5. Az éger-*Phytophthora* morfológiája és hőmérsékletigénye 43
3. 5. 1. Sporangiumképzés indukálása 45
3. 5. 2. Mikroszkópos vizsgálatok 45
3. 5. 3. Hőmérsékleti optimum megállapítása 45

3. 6. Micéliumpor előállítása 46

3. 7. Izozimelemzés 46

3. 8. DNS-kivonás 49

3. 9. DNS–DNS-hibridizáció 50
3. 9. 1. A *Phytophthora infestans* DNS-szakaszainak hibridizációja RG57 próbával 51
3. 9. 2. Szekvenciahomológia kimutatása a *Phytophthora cambivora* és az éger-*Phytophthora* között 52

3. 10. Adatelemzés 52

3. 11. Polimorfizmus az ITS-régióban 53

3. 12. RAPD-elemzés 54

4. EREDMÉNYEK 55

4. 1. *Phytophthora infestans*-izolátumok feno- és genotípusos jellemzői 55

4. 2. Leromlásos tünetek égeren 67

4. 3. Az éger-*Phytophthora* morfológiai és élettani jellemzői 68

4. 4. Az éger-*Phytophthora* molekuláris jellemzői 71
4. 4. 1. Izozimelemzés 71
4. 4. 2. Az éger-*Phytophthora* ITS-régiója 75
4. 4. 3. RAPD-elemzés 77

4. 5. Új tudományos eredmények 79

5. KÖVETKEZTETÉSEK 81

5. 1. A magyarországi *Phytophthora infestans*-populációk általános jellemzői 81

5. 2. A *Phytophthora infestans* változékonyságát befolyásoló tényezők 85
5. 2. 1. Ivaros és ivartalan szaporodás 85
5. 2. 2. Migráció 86
5. 2. 3. Genetikai sodródás 87

5. 3. Az éger-*Phytophthora* kártétele 88

5. 4. Hazai égeresekben is feltűnt az éger-*Phytophthora* 89

5. 5. Az éger-*Phytophthora* variánsai elkülöníthetők izozim- és DNS-markerekkel 90

5. 6. Szülői DNS jelenléte a hibridben **92**

5. 7. Az éger-*Phytophthora* kialakulása **94**

6. ÖSSZEFOGLALÁS **97**

7. SUMMARY **101**

8. MELLÉKLETEK **105**

M1. Felhasznált irodalom **105**

M2. A gyakrabban előforduló rövidítések és a felhasznált vegyszerek jegyzéke **125**

M3. A felhasznált oldatok összetétele **127**

M4. DNS–DNS-hibridizáció és kolorimetriás kimutatása **129**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS **131**

1. BEVEZETÉS

Földünkön széttekintve mindenhol az élővilág változatossága tárul elénk. Ez a változatosság oly hatalmas, hogy még a sok milliónyi faj pontos számát sem ismerjük, csak becslésekre hagyatkozhatunk. Alkalmazkodóképességük lehetővé teszi az élőlényeknek, hogy minden elképzelhető és elképzelhetetlen élőhelyet elfoglalhassanak. Az élővilág jellemző tulajdonsága a változatosság, amely két szinten nyilvánul meg. Nem csak a más-más élőhelyekhez alkalmazkodott fajok különböznek, hanem fajon belül is tapasztalható változatosság, az egyedek nem tökéletesen egyformák.

Ez még a fonalas telepszerveződésű mikroorganizmusok populációira is igaz, bár az egyed meghatározása nehézségeket okoz. Ez a jelenség az ivaros szaporodáskor fellépő rekombinációra vezethető vissza, az ivarsejtek meiotikus osztódásakor ugyanis a két szülőből származó génállománynak egy új kombinációja kerül át az utódba. Újabban ismertté vált, hogy genetikai kölcsönhatás nem csak egy fajon belül (interspecifikusan) jöhet létre, hanem paraszexuális úton két faj között (intraspecifikusan) is kialakulhat, bár sokkal kisebb gyakorisággal.

Mind az intraspecifikus, mind az interspecifikus változatosság hátterében a genetikai információt hordozó DNS megváltozása áll. A DNS megduplázódásakor bekövetkező módosulás (mutáció) az egyetlen nukleotidot érintő változástól a hosszabb (akár kromoszómaméretű) DNS-szekvenciák megváltozásáig terjedhet. Az ivaros és/vagy ivartalan szaporodáskor fellépő rekombináció pedig lehetővé teszi, hogy a két szülőben külön-külön meglévő tulajdonságok egyetlen utódban egyesülhessenek. Genetikai kölcsönhatás pedig nem csak egy faj egyedei között játszódhat le, hanem rokon fajok között is.

A genetikai változatosságot vizsgáló kutatások a DNS-t közvetlenül elemző módszerek elterjedésével kaptak lendületet. Ilyen például a polimeráz-láncreakció (PCR[1]), amely lehetővé teszi egy adott DNS-szakasz vizsgálatát akár a PCR-termékek restrikciós endonukleázokkal végzett hasítása, akár közvetlen szekvenciaelemzése révén. A teljes genom vizsgálatára is alkalmas a tetszőleges bázissorrendű indítószekvenciákkal (RAPD) végzett PCR, vagy egy kitüntetett DNS-szakasz jelölésén és genomon belüli hibridizációs mintázatának elemzésén alapuló úgynevezett genetikai ujjlenyomat *(fingerprint)*- vizsgálat.

DNS-vizsgálatokkal információt szerezhetünk az egy populáción belül, illetve populációk között lejátszódó genetikai folyamatokról. Bepillantást nyerhetünk a fajok közötti genetikai rokonság mérése révén a fajok leszármazási viszonyaiba, ami forradalmasítja a rendszertani kutatásokat.

Az intraspecifikus kölcsönhatásokból származó változatosságra és az ebből adódó gazdasági problémákra számos példát ismerünk, de ezek közül is kiemelkedik a *Phytophthora infestans*. E hírhedt kórokozó, mely a XIX. században hatalmas burgonya- és paradicsomvész-járványokat okozott Európa nyugati felén és elsősorban a Brit-szigeteken, még a történelem alakulására is hatással volt. A későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a korabeli járványokban a kórokozó genetikai változatossága nem volt jelentős. Napjainkban azonban a *Ph. infestans* populációiban jelentős változások következtek be. Az egyre intenzívebbé váló kutatások eredményei alapján a korábbi, világszerte elterjedt populáció szinte egyik pillanatról a másikra átadta helyét egy jóval agresszívebb változatnak. A régi populáció pedig eltűnt, mindössze néhány élőhelyen maradt fenn.

DNS-vizsgálatok szolgáltattak bizonyítékokat a kórokozók elterjedésének és kialakulásának új módjaira is. Már régebben is felfigyeltek arra, hogy bizonyos újonnan felbukkant kórokozók, amelyeket azonban nem lehetett azonosí-

[1] A gyakrabban előforduló rövidítések jegyzéke a 2. mellékletben (125. oldal) található meg.

tani semmilyen korábban ismert fajjal sem, már meglévő, ismert fajok tulajdonságainak kombinációit mutatták. Ezért elképzelhető volt, hogy új kórokozók akár rokon fajok közötti kölcsönhatásból is keletkezhetnek hibridizáció útján. Ráadásul az ilyen fajhibridek némelyike még a szülőfajoknál is agresszívebb lehet, és ezáltal lassan kiszoríthatja a szülőket azok eredeti élőhelyéről.

A kilencvenes évek elején Nagy-Britannia déli részén a folyómenti égeresek jelentős pusztulására figyeltek fel. Az addig ismeretlen kórokozóról kiderült, hogy az két *Phytophthora*-faj interspecifikus hibridje, amely Európa számos országában, így Magyarországon is jelen van.

1. 1. Célkitűzések

A *Phytophthorá*k, mint az egyik legfontosabb növénykórokozó nemzetség fajai között a legújabb eredmények szerint mind a fajon belüli, mind fajok közötti változékonyság jelentős. Ennek a munkának a célja ezért a *Phytophthora*-fajok Magyarországon jelentkező feno- és genotípusos változékonyságának az elemzése volt.

A nagy intraspecifikus változékonyságáról ismert *Ph. infestans* kutatásának a nemzetközi irodalomban régi hagyományai vannak, vizsgálata azonban Magyarországon csak korlátozottan ment végbe. Ezért a hazai *Ph. infestans*-populációk vizsgálatakor arra kerestük a választ, hogy milyen a populáció szerkezete és ez párhuzamban van-e a más országokban észlelt változásokkal. Vizsgálatainkhoz a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően a „hagyományos” – azaz a párosodási típusra és a fungicidrezisztenciára alapuló morfológiai és élettani vizsgálatok mellett – molekuláris biológiai módszereket (DNS-ujjlenyomat- és izoenzimelemzést) is használtunk.

Az éger újonnan felbukkant kórokozója a magyarországi égeresekre is komoly fenyegetést jelent. Ezért céljaink között szerepelt a kórokozó hazai égeresekből való izolálása, valamint a begyűjtött izolátumok morfológiai és mole-

kuláris biológiai módszerekkel való elemzése, hogy megállapíthassuk a magyarországi populációk rendszertani helyét a nemzetségen belül, illetve hogy a hibrid eredetének tisztázásához felhasználható genetikai markereket azonosíthassunk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. 1. Egy hírhedt kórokozó nemzetség

A *Phytophthora*-nemzetséget a többi petespórás fajjal együtt Oomycetidae néven a Phycomycetes-osztály részeként sorolták be (BÁNHEGYI et al. 1985). Bár az e csoportba tartozó fajok telepszerveződésükben a valódi gombákra emlékeztetnek, az ostoros sejtekkel történő szaporodásuk, a sejtfalukat alkotó β-glükánok (cellulóz és β-(1–3)-β-(1–6)-glükánok), fejlett endoplazmatikus membránrendszerük és diktioszómáik miatt számos tulajdonságban különböznek is tőlük. Fontos eltérés, hogy a gombák országának tagjaival ellentétben ezek a szervezetek válaszfal (szeptum) nélküli hifáikban diploid sejtmagot tartalmaznak (SANSOME 1961 és 1963, BRASIER és SANSOME 1975). A telepszerveződésbeli és genetikai különbségek mellett biokémiai sajátságaikban is távol állnak a valódi gombáktól így tartaléktápanyaguk (glikogén helyett β-(1–3)-glükán), de akár a szterolvegyületek szintézisének hiánya alapján is nagyon hasonlítanak egyes ősi algacsoportokhoz. Valószínűleg e biokémiai sajátságoknak tulajdonítható, hogy a valódi gombák ellen hatásos fungicidek általában nem hatnak rájuk, illetve az ellenük hatásos fungicidek sem használhatók a valódi gombák ellen. A 18S rRNS génjének vizsgálata megerősítette, hogy a barnamoszatokkal (Phaeophyta) és sárgásmoszatokkal (Chrysophyta) lényegesen nagyobb hasonlóságot mutatnak, mint a valódi gombákkal. Ennek alapján a petespórás gombák is Oomycota-törzsként mindezen szervezetekkel együtt a legújabb rendszertanban a Chromista-országba kerültek (HAWKSWORTH et al. 1995). MONEY (1998) meghatározása, hogy az adszorpciós táplálékfelvételű,

csúcsirányú hifanövekedésű és spórás szaporodású szervezetek gombának nevezhetők, igaz a petespórás szervezetekre is. Emellett ezek az élőlények sokszor szolgáltak modellként a valódi gombák jobb megismeréséhez is. Mindenesetre e szervezetek nem tagjai a gombák monofiletikus országának. Legcélszerűbb elnevezésük tehát a gombaszerű szervezet.

Az Oomycota-törzs, illetve annak egyetlen osztálya, az Oomycetes (HAWKSWORTH et al. 1995) tagja néhány kisebb jelentőségű taxon mellett a Saprolegniales-rend szaprotróf és parazita fajokat egyaránt tartalmazó csoportja és a Peronosporales-rendben a szőlő peronoszpórás betegségét okozó *Plasmopara viticola* számos más növény peronoszpórájával együtt. Az egyik legnagyobb jelentőségű rend a Pythiales, ennek két fontos nemzetsége a *Pythium* és a *Phytophthora*. Újabb, riboszomális DNS-szekvencia-elemzések alapján azonban a *Phytophthora*-nemzetség a peronoszpórákhoz jóval közelebb áll, mint a *Pythium*okhoz (PETERSEN és ROSENDAHL 2000). Újabb áttekintést DICK (2000) adott a rokonsági kör rendszertanáról. A *Phytophthora*-nemzetségben napjainkig mintegy 60 fajt tartottunk számon, amelyek számtalan gazdanövényt képesek megbetegíteni (ERWIN és RIBEIRO 1996). Az utóbbi években azonban jónéhány új fajt azonosítottak, egyebek mellett mérsékelt égövi erdei ökoszisztémákból is öt új fajt írtak le néhány év alatt (ILIEVA et al. 1998, JUNG et al. 1999, 2002 és 2003, WERRES et al. 2001, FLIER et al. 2002, BRASIER et al. 2003).

Bár növényi szövetben élnek, kitartóképleteik – oospórák, illetve ivartalan úton keletkező klamidospórák – révén évekig képesek a talajban fertőzőképes állapotban fennmaradni, és kedvező körülmények között kicsírázni. Egy vegetációs időszakban azonban a gyorsan terjedő járványokért az ivartalan úton keletkező kétostoros rajzóspórák felelősek, melyek a növények levelén, vagy a talaj részecskéi között kialakult folyadékfilmben mozogva találják meg a gazdanövény fertőzésekkel szemben fogékonyabb pontjait, a gázcserenyílásokat, sebzéseket.

Ivaros szaporodásuk oospórákkal (petespórákkal) történik, amelyek homotallikus fajokban (ilyen a *Ph. fragariae*, illetve a hazánkban is élő *Ph. quercina* vagy *Ph. sojae*) egy telepen belül keletkeznek. Ezzel ellentétben a heterotallikus fajok (például *Ph. cambivora*, *Ph. infestans* és *Ph. cryptogea*) csak két ellentétes párosodási típusú (A1 és A2) telep kölcsönhatásakor képeznek oospórát.

Jóllehet a legtöbb fitoftóra szaporodása vízhez kötött, mint például a nem leváló sporangiumot képező *Ph. cambivorá*é, de a nemzetségben vannak a levegőben terjedéshez adaptálódott fajok is, amelyeknek sporangiuma könnyen letörik a tartójáról, és a széllel messzire sodródik, ilyen a *Ph. infestans* is. A sporangiumok és a bennük ivartalan úton keletkező kétostoros rajzóspórák (zoospórák) lehetővé teszik, hogy a kórokozó egy vegetációs időszak alatt robbanásszerűen elszaporodhasson.

A *Phytophthora*-nemzetség fajai között egyaránt találunk sokgazdás kórokozókat, például a *Ph. cinnamomi*t, a *Ph. nicotianae*t, vagy a fás növényeket betegítő *Ph. cambivorá*t. Emellett azonban vannak a nemzetségnek egyetlen gazdanövényfajra (esetleg -nemzetségre vagy -családra) specializálódott tagjai is. A *Ph. mirabilis* csak a *Mirabilis jalapá*n él, míg a *Ph. infestans* vagy a *Ph. fragariae* a Solanaceae-család, illetve a Rosaceae-család egyes fajait betegíti meg.

2. 2. A *Phytophthora infestans*

Talán nincs is még egy olyan kórokozó, amely hasonlóan súlyos járványokat okozott, mint a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Írországban a XIX. század közepén robbanásszerűen szétterjedve szinte a teljes burgonyatermést megsemmisítette. A kórokozó még a történelem alakulására is hatással volt, hiszen a járványt követő éhínség mintegy egymillió ember halálát okozta és körülbelül kétmillióan vándoroltak ki az országból. A természeti csapáshoz

hasonlatos járvány 150. évfordulója körül megszaporodtak a csak a *Ph. infestans*szal foglalkozó nagyobb konferenciák, amelyeken összefoglalták a kórokozóról összegyűlt addigi ismereteinket (LUCAS et al. 1991, DOWLEY et al. 1995), hogy megértve a kórokozó biológiáját elősegítsék a jövőben az ellene való minél hatékonyabb és környezetkímélőbb védekezést.

A kór tünetei rendkívül feltűnőek. A fertőzést elősegítő hűvös, csapadékos időjárás esetén a kórokozó járványszerűen léphet fel. A sporangiumok a légáramlatokkal kerülnek a növény felszínére, ott rajzóspórával közvetetten, vagy csíratömlővel közvetlenül csíráznak, és a sztómákon keresztül hatolnak be a növénybe. A hifák elárasztják a növény sejtközötti járatait, hausztóriumokkal pedig benyomulnak a sejtekbe is. Ekkor a leveleken már feltűnő, gyorsan barnuló, vízzel átitatott foltok keletkeznek (1. ábra). A levél fonákán a gázcserenyílásokon át felszínre bukkanó sporangiumtartókról a szél a további fertőzéshez messzire sodorhatja a sporangiumokat, amelyek nedves növényi felszínen, vagy vízzel telített talajon csírázva a növény föld feletti szervei mellett a növény gumóját, gyökerét is képesek megtámadni. A fertőzött gumó kemény marad és kettévágva gesztenyebarna foltokat mutat, majd a foltok összeérésével elrothad (szárazrothadás). A *Solanum*-fajok mellett a *Ph. infestans* a paradicsomnak is minden szervét képes megtámadni, a termés még éretlen, zöld állapotban a burgonyagumóhoz hasonló szárazrothadásos tüneteket mutat. A kórokozó föld alá került növényi maradványokon vegetatívan áttelelhet. Heterotallikus faj lévén a *Ph. infestans* csak bizonyos feltételek megléte esetén képes petespórákat létrehozni, de ha az ehhez szükséges két párosodási típus egy időben és helyen jelen van, a keletkező petespórákkal a kórokozó áttelelési esélyei jelentősen megnőnek. Ráadásul petespórái révén a kórokozó évekig fertőzőképes állapotban maradhat fenn a talajban.

A *Ph. infestans* világszerte nagy feno- és genotípusos változatosságot mutat és kutatásának a faj jelentőségének megfelelően szerteágazó és gazdag múltja van.

2. 2. 1. A *Phytophthora infestans* változatossága

2. 2. 1. 1. Fenotípusos változatosság

Egy faj vagy egy populáció genetikai változatosságának mérésére több lehetőség is van, ezek közül számosat a *Ph. infestans* populációinak elemzésére is fel lehet használni. Legegyszerűbben a fenotípusban közvetlenül megmutatkozó bélyegek elemezhetők. Mivel a *Phytophthora*-fajok egyszerű telepszerveződése nem teszi lehetővé számos anatómiai bélyeg elkülönítését, a fenotípusos tulajdonságok csak korlátozottan használhatók. Leginformatívabbak a párosodási típus, a fungicidekkel szembeni érzékenység és a virulencia.

A *Ph. infestans* heterotallikus faj, azaz ivaros úton keletkező oospórák (1. ábra D és E) kialakulásához két, ellentétes párosodási típusú telep (A1 és A2) egyidejű jelenléte szükséges. Egy ismeretlen izolátum párosodási típusának meghatározásához azt törzstenyészetekből származó ismert párosodási típusú törzsekkel kell egy Petri-csészében közösen tenyészteni. Aszerint, hogy az ismeretlen izolátum az A1 vagy az A2 párosodási típusú törzzsel képez oospórát az izolátum párosodási típusa meghatározható (A2 vagy A1).

Oomycetes-osztályba tartozó gombák ellen gyakran alkalmazott szisztemikus fungicidcsalád a fenil-amidok, közülük az egyik legelterjedtebb a metalaxil, amely hatását az RNS-polimeráz gátlásán keresztül fejti ki (FISHER és HAYES 1982). Mivel a fungicid hatását csökkentheti az ellene kialakuló rezisztencia, fontos a rezisztencia kialakulásának megelőzése. Ezért széleskörűen alkalmaznak metalaxilérzékenységi vizsgálatokat. A fungicidre adott válasz alapján megkülönböztetnek rezisztens, érzékeny valamint átmeneti érzékenységi kategóriát, de az egyes kategóriákhoz tartozó koncentrációk rendkívül változatosak. Az *in vitro* fungicid-rezisztencia vizsgálatoknál a metalaxil kon-

centrációja a *Ph. megasperma* ellen hatásosnak bizonyuló 5 és 100 ppm közötti tartományban mozog (DAVIDSE et al. 1984), de más szerzők változatos koncentrációkat és érzékenységi kategóriákat használnak, ezért az eredményeket nehéz összevetni (THERRIEN et al. 1993, ELANSKY et al. 2001, COOKE et al. 2003). Magyarországon eddig a DAGGETT et al. (1993) és KOH et al. (1994) által leírt 5 és 100 ppm koncentrációt használták a metalaxil-érzékenység vizsgálatára (BAKONYI et al. 2002b, NAGY et al. 2003a).

Már GIDDINGS és BERG (1919) is megfigyelte, hogy a *Ph. infestans* burgonyáról és paradicsomról izolált törzseinek aggresszivitása eltérő a különböző gazdanövényeken. A paradicsomról származók agresszívek burgonyán is, viszont a burgonyáról származók kevésbé betegítik a paradicsomot. Később specializált rasszok jelenlétét is kimutatták és ezt a jelenséget a kórokozóban megtalálható eltérő virulenciafaktorok jelenlétére vezették vissza. A *Ph. infestans* ellen ma már több mint 11 rezisztenciagén ismert elsősorban a *Solanum demissum*ból, de más fajokból, például a *S. stoloniferum*ból is. Ezek a nemesítés során bekerültek a termesztett burgonyába is, de időközben a *Ph. infestans*nak is ugyanannyi virulenciafaktora vált ismertté (NIEDERHAUSER 1991). A virulenciafaktorok (vagyis a rasszkarakter) meghatározásához a rezisztenciagéneket egyenként tartalmazó tesztnövénysorozat mesterséges fertőzésére van szükség (ÉRSEK és BAKONYI 1997). A vizsgált izolátum rasszkarakterét azon rezisztenciagének felsorolása adja meg, amelyek hatástalanok az adott izolátummal szemben. Így például az R1, R2 és R3 rezisztenciagének hatását egyaránt letörni képes törzset 1.2.3-as rasszként azonosítjuk.

2. 2. 1. 2. Genotípusos változatosság

A fenotípusos markerek azonban nem megfelelőek a genom közvetlen vizsgálatára, erre a genetikai markerek a legalkalmasabbak. Számos genetikai markerrendszert fejlesztettek ki, amelyek jól használhatók a fitoftórák vizsgálatára is. A DNS-elemzésen alapuló módszerek előtt kiterjedten használták az

izoenzimek (röviden izozimek) variabilitásának vizsgálatát. A módszer enzimek egyedenként különböző allélváltozatainak azonosításán alapul. A felhasznált enzim általában valamilyen alapanyagcsere-folyamat egyik lépését katalizálja, ezért az enzim szerkezete az egyedek nagy részében alapvetően nem változik meg, de egyedi eltérések kialakulhatnak. Ha az enzimet egy organizmusban több különböző allél kódolja, a megváltozó aminosavsorrend miatt – ha a közegben a pH állandó – az enzim felületi töltése megváltozik. Ez a változás kihat az enzim elektromos térbeni vándorlási sebességére is, így az izozimek elektroforézissel szétválaszthatók. Az egyes izozimek megkülönböztetésére az egymáshoz viszonyított relatív futási távolságukat használják. A leggyakoribb változatot 100-nak tekintve a többi izozimváltozat ehhez képest 83, 96 vagy akár 120%-os távolságig is elfuthat, ezáltal három új allélt különböztetve meg.

A *Ph. infestans* vizsgálatához TOOLEY et al. (1985) a glükóz-6-foszfát-izomeráz (Gpi) és a glicil-leucin-peptidáz (Pep) enzimeket találták a legmegfelelőbbnek. Ebben a fajban mindkét enzim dimerikus, azaz az enzim aktív formájában két alegységből épül fel (TOOLEY et al. 1985). Homozigóta esetben a két homológ kromoszóma ugyanolyan polipeptidláncot kódol, ezért a gélen egyetlen sáv jelenik meg. Ha az izolátum heterozigóta, akkor háromféle enzimforma keletkezik 1:2:1 arányban. Kétféle – azonos polipeptidláncokból felépülő – homodimer eltérő elektroforetikus mobilitással és egyféle heterodimer, amely kétszeres intenzitással a két homodimer változat között jelenik meg a gélen (GOODWIN et al. 1995). Az izozimek vizsgálata betekintést nyújt a populáció diverzitásába (SPIELMAN et al. 1991, SUJKOWSKI et al. 1994), mert közvetlenül lehetővé teszi allélok azonosítását és gyakoriságuk megváltozásának követését. Az izozimelemzés akkor vált igazán elterjedtté, amikor megjelentek az előre öntött cellulóz-acetát-géleket használó eljárások (GOODWIN et al. 1995).

COOKE és LEES (2004) foglalták össze a *Ph. infestans* populációgenetikai elemzésére eddig használt markereket, és szerintük populációgenetikai vizsgá-

latokra azok az ideális markerek, amelyekkel nagy számú mintát fel lehet dolgozni, és egyidejűleg elég rugalmasak ahhoz, hogy ne igényeljék tiszta tenyészetek létrehozását. Izozimvizsgálatokat viszont csak tiszta tenyészetből kivont anyaggal lehet végezni. Ezzel szemben a DNS-vizsgálatokban nincsenek ilyen nehézségek. Polimeráz-láncreakcióval (PCR) például lehetséges több mint száz éves herbáriumi anyagok felhasználása is (RISTAINO et al. 2001, MAY és RISTAINO 2004).

A *Ph. infestans* genomjában mérsékelt gyakorisággal ismétlődő, 1,2 kb hosszúságú DNS-szekvencia (RG57 próba) használható genetikai ujjlenyomat *(fingerprint)* készítésére, ha az egyed teljes genomi DNS-ét *Eco*RI restrikciós enzimmel való hasítás után ezzel a próbával hibridizáltatjuk, és a hibridizációs szakaszokat azonosítjuk. Az RG57 próba 25 eltérő méretű DNS-szakaszhoz hibridizáltatható, méretük 1,2 és 18 kb között van. A keletkező mintázat ivartalan klónok egyedeiben alig mutat különbséget; a változatos kombinációk azonban ivaros szaporodást sejtetnek. Keresztezésekben a 25 sávból két pár szorosan kapcsoltnak mutatkozott, a többi függetlenül rekombinálódott (GOODWIN et al. 1992a). Bár a hibridizációs membránon a jel erőssége utal a minta heterozigóta vagy homozigóta voltára (GOODWIN et al. 1992a), ezt az intenzitáskülönbséget sok más kísérleti körülmény is befolyásolhatja, tehát a két homológ kromoszóma azonos lokuszainak együttes vizsgálatára nincs lehetőség. Éppen ezért a szakirodalomban elterjedt RG57 genotípus helyett pontosabb RG57 fenotípusról beszélni. Ezek ellenére a módszert széles körben alkalmazzák, és főleg a klonálisan szaporodó törzsek azonosításában használható fel eredményesen (GOODWIN et al. 1992b, DRENTH et al. 1993, KOH et al. 1994, SUJKOWSKI et al. 1994, LEBRETON és ANDRIVON 1998, BRURBERG et al. 1999, JAIME-GARCIA et al. 2000, ZWANKHUIZEN et al. 2000, ELANSKY et al. 2001, MCLEOD et al. 2001, BAKONYI et al. 2002a és 2002b, NAGY et al. 2003a, REIS et al. 2003, ADLER et al. 2004). Az RG57 ujjlenyomatok elemzésének hátránya, hogy tiszta tenyé-

szetből származó nagy mennyiségű és nagy tisztaságú DNS-re van szükség. A FORBES et al. (1998) által létrehozott első világméretű adatbázis is főleg RG57 adatokra épül.

A mitokondriális genom egyszülős öröklődésű, ezért alkalmas a leszármazási vonalak megállapítására. A *Ph. infestans* teljes mitokondriális genomjának szekvenciaanalízise után CARTER et al. (1990) a restrikciós szakaszhosszak polimorfizmusának (RFLP) elemzésével négy mitokondriális haplotípust különítettek el (Ia, Ib, IIa és IIb). Ennek a munkának a folytatásaként GRIFFITH és SHAW (1998) a mitokondriális genom szekvenciájának ismeretében polimeráz-láncreakcióhoz terveztek indítószekvenciákat a négy haplotípus elkülönítésére. Ezek között a mitokondriális genom két szakaszának (az 1070 bp hosszú P2 és a 964 bp hosszú P4) polimeráz-láncreakcióval való felszaporítása után restrikciós endonukleázok segítségével lehet különbséget tenni. Carter és munkatársainak munkájával párhuzamosan GOODWIN (1991) korábbi restrikciós térképek felhasználásával egy másik rendszert is megalkotott a mitokondriális DNS-haplotípusok elkülönítésére. A Goodwin által megkülönböztetett négyféle mitokondriális haplotípus, valamint a KOH et al. (1994) által ezek mellett felfedezett további kettő azonban nem egyértelműen feleltethető meg a Carter és munkatársai által alkotott rendszernek (GAVINO és FRY 2002).

Újabban mikroszatellitek (SSR) elemzését is felhasználják a *Ph. infestans* populációinak elemzésére. A mikroszatellitek általában 1-6 bázispárnyi DNS-mintázatok 10-20-szoros ismétlődései a genomban (LI et al. 2002). Változékonyságuk az ismétlődések számában nyilvánul meg, így egy-egy mikroszatellit lokuszon igen nagymértékű, allelikusan öröklődő változékonyság alakulhat ki. Mivel az eukarióta sejtek genomjában nagy mennyiségben és egyenletesen elszórva találhatók, kiváló genetikai markerek lehetnek. Mikroszatellitek azonosításában nagy segítséget jelent, ha már előzetesen rendelkezésre állnak DNS-

szekvencia adatok. Mivel a *Ph. infestans* genomjából több szekvencia is ismert, néhány kutatócsoport ezek segítségével fejlesztett mikroszatellit-markereket használ a *Ph. infestans*-populáció elemzésére (KNAPOVA és GISI 2002, COOKE és LEES 2004). Bár a mikroszatellit-elemzés a markerek költséges kifejlesztése és a nagy eszközigény miatt nehézkesnek és drágának tűnik, rövid idő alatt lehetővé teszi sok marker elemzését sok mintában. Ráadásul a diploid organizmusokban mindkét allél azonosítása lehetővé válik, így az RG57 mintázat elemzésével ellentétben alkalmas populációgenetikai számításokhoz is. Várható, hogy a jövőben nem csak a *Ph. infestans* esetében, hanem más organizmusokban is a mikroszatellitek vizsgálata lesz az egyik legdinamikusabban fejlődő terület.

Természetesen a legteljesebb genetikai információt a szekvenciaelemzések nyújtják, ezzel egy bázispárnyi eltérések is azonosíthatókká válnak a genomban, de ilyen vizsgálatokat a *Ph. infestans* populációinak elemzésére egyelőre nem végeznek.

2. 2. 2. Kórtörténeti és történelmi előzmények

NIEDERHAUSER (1991) szerint e heterotallikus kórokozó génközpontja Közép-Mexikó, mert itt a legnagyobb a faj genetikai változékonysága, feltehetően az ivaros szaporodáshoz szükséges két párosodási típus együttes jelenléte miatt. Niederhauser elfogadja Vavilovnak azt az elméletét, hogy a kórokozók és a gazdanövényeik koevolúciója során alakulnak ki rezisztenciagének és az azokkal szemben hatásos virulenciafaktorok is; nem véletlen tehát, hogy a közép-mexikói *Solanum*-populációk mutatják a legnagyobb rezisztenciagén-gazdagságot is.

A *Ph. infestans* legelőször 1843-ban bukkant fel az Egyesült Államokban, Philadelphia környékén (BOURKE 1964 és 1991, PETERSON et al. 1992). Két évvel később már Európában is megjelent és rendkívül gyorsan meghódította új élőhelyét. Felbukkanása után a *Ph. infestans* nagyon gyorsan szétterjedt Európa

burgonyatermő vidékein, mivel az akkoriban termesztett burgonyafajták mind fogékonyak voltak az új kórokozóra. A legnagyobb pusztítást azonban Írországban végezte katasztofális termésveszteséget okozva. Herbáriumi adatok szerint a *Ph. infestans* a XIX. század utolsó harmadában már Magyarországon is ismert volt, Eperjesen dísznövényként termesztett *Solanum*-fajokon találták meg, de a burgonyán SCHILBERSZKY (1928) szerint már 1847-ben megjelent hazánkban. A *Ph. infestans* terjedése megállíthatatlannak bizonyult és néhány év alatt minden olyan területen megjelent, ahol burgonyát termesztettek.

2. 2. 3. Változatosság az ivartalanul szaporodó populációkban

SPIELMAN et al. (1991) körülbelül 400, elsősorban Európából származó *Ph. infestans*-izolátumot elemzett, jelentős számú észak-amerikai, perui és japán mintával kiegészítve. Eredményeik alapján az izolátumok két csoportba sorolhatók. Azokon a területeken, ahol csak az A1 párosodási típusú izolátumok voltak jelen, a populáció genetikailag rendkívül egységes volt. Megállapították, hogy valamennyi izolátumot a 86/100-as *Gpi* és a 92/100-as *Pep* genotípus jellemzi. Ellenben azokon a területeken – elsősorban Lengyelországban és Hollandiában –, ahol mindkét párosodási típus együttesen fordult elő, új izozimallélokat azonosítottak mind a *Gpi*, mind a *Pep* lokuszon. A két populáció időben is élesen elkülönült egymástól, 1980 előtt sehonnan sem lehetett a két párosodási típust egyaránt tartalmazó, változatos izozimmintázatú izolátumokat azonosítani. Az RG57 mintázatok eredményei ezzel egybevágtak. Jórészt a nyolcvanas évek elejéről és öt világrész húsz országából származó mintegy kétszáz izolátum között egyetlen klónvonal és néhány változata dominált (GOODWIN et al. 1994).

A kórokozó terjedésére született elmélet szerint a *Ph. infestans* szétterjedése a világon több szakaszra osztható (FRY et al. 1993, GOODWIN 1997). Első lépésként néhány gumó került ki Mexikóból és ez okozta az első járványt az Egyesült Államokban 1843-ban. A kórokozó innen kerülhetett át Európába

1845 körül, majd a világ többi részére az európai burgonyaszállítmányokkal jutott el, mert abban az időben a vetőgumó legnagyobb részét Európában termelték.

GOODWIN (1997) szerint a *Ph. infestans* genetikai változékonysága a terjedéssel párhuzamosan több lépcsőben leszűkült. A mexikói populációnak eleve csak egy korlátozott része került az Egyesült Államokba. Ennek az amerikai populációnak egy része jutott tovább Írországba, majd terjedt szét a világon, amit alátámaszt a kórokozó populációinak nagyobb diverzitása az Egyesült Államokban, mint a világ többi részén (GOODWIN et al. 1994). Ezzel magyarázható, hogy több mint száz éven át mindössze néhány klonálisan szaporodó genotípus (US-1 jelű és néhány változata) képviselte a kórokozó populációit.

Annak valószínűsége azonban, hogy csak egyetlen törzs kerüljön az Egyesült Államokba és onnan Európába, ANDRIVON (1996) szerint nagyon kicsi. Javaslata szerint a járvány forrását Dél-Amerikában kellene keresni, ahol egy kisebb változatosságú populációból került ki a világméretű járvány elindítója. Ecuadorban a burgonya fogyasztásának történelmi hagyományai is vannak – ellentétben Közép-Amerikával – és oda könnyebben eljuthatott a kórokozó természetes úton, vagy emberi közvetítéssel. Ennek ellenére kétségtelen, hogy a *Ph. infestans* géncentruma Közép-Mexikó. Bárhol legyen is azonban a járvány kiinduló forrása, genetikai vizsgálatok is megerősítik, hogy ezt a populációt mindössze egy-két törzs alkotta nagyon korlátozott genetikai varianciával (FRY et al. 1993, GOODWIN et al. 1994).

2. 2. 4. Ivarosan szaporodó populációk változatossága

SMOOT et al. (1958) Egyesült Államokból és Mexikóból származó *Ph. infestans*-izolátumok laboratóriumi keresztezésénél oospóraképződést figyeltek meg. (Ugyanők említik meg azt is, hogy az első adat a *Ph. infestans* oospóráiról majdnem egy évszázaddal korábbról W. G. Smith-től származik, a Gardeners' Chronicle 4. évfolyamából, 1875-ből.) GALLEGLY és GALINDO

(1958) pedig Mexikóban a burgonya levelén szabad természetben is oospóraképződést figyeltek meg, gumóban azonban ugyanezt csak évtizedekkel később sikerült (FERNÁNDEZ-PAVÍA et al. 2002). Az oospóraképzéshez (ivaros szaporodáshoz) szükséges két (A1 és A2) párosodási típust képviselő törzsek együttesen azonban sokáig csak ebből az országból voltak ismertek. Mexikón kívül csak az A1 párosodási típusú törzsek voltak jelen, az A2-es típust először 1984-ben találták meg Svájcban (HOHL és ISELIN 1984).

Ekkorra tehető olyan új populációk robbanásszerű elterjedése világszerte, amelyek már mindkét párosodási típust tartalmazták, így képesek voltak a talajban is áttelelni oospóráik révén, ráadásul nagyobb aggresszivitásuk és fungicidrezisztenciájuk miatt azóta folyamatosan veszélyeztetik a burgonyatermesztés sikerét. Az új törzsek elterjedésének módjára több elmélet született, de a legtöbb adat az őshazából kiinduló második migrációt támasztja alá (GOODWIN és DRENTH 1997). Az új populációk a korábbival ellentétben komplex virulenciájúak, azaz egyszerre több rezisztenciagén letörésére is képesek (ÉRSEK és BAKONYI 1997).

A kilencvenes években végzett felmérések alapján a Mexikóból még a XIX. században elszabadult, úgynevezett régi populáció erőteljesen visszaszorult, és új populációknak adta át a helyét (GOODWIN 1997). A vizsgált izolátumok genetikai változatossága izozim- és RG57-mintázatok alapján sokkal nagyobb volt, mint amit korábban tapasztaltak és számtalan, korábban meg nem figyelt új genotípust írtak le. Emellett ezek között az új törzsek között már mindkét párosodási típus előfordult (MOSA et al. 1993, SUJKOWSKI et al. 1994, LEBRETON és ANDRIVON 1998, ZWANKHUIZEN et al. 2000, KNAPOVA és GISI 2002, DAY et al. 2004). A legtöbb területen az új törzsek teljesen kiszorították a régieket, amelyek mindössze néhány helyen maradtak fenn, így Délkelet-Ázsiában (KOH et al. 1994) és Dél-Afrikában (MCLEOD et al. 2001) valamint paradicsomon Brazíliában (REIS et al. 2003). Nepálban ellenben együtt él a régi és

az új populáció (GHIMIRE et al. 2003). Ecuadorban szintén nyoma veszett a *Ph. infestans* régi populációjának (FORBES et al. 1997), de érdekes módon a nagy változatosságú új törzsek megjelenése helyett ott egy másik, a régi populációhoz hasonló módon szintén klonálisan szaporodó változat (EC-1) vált uralkodóvá (ERSELIUS et al. 2000).

2. 2. 5. Melyik *Phytophthora infestans*-törzs okozta az írországi járványt?

Amerikai kutatók legújabb eredményei ellentmondanak a korábban feltételezett elméletnek a *Ph. infestans* elterjedéséről. Ristaino és munkatársai ugyanis herbáriumi anyagok vizsgálata során oospórákat fedeztek fel a XX. sz. elejéről az Egyesült Államokból származó burgonyalevelekben. PCR-vizsgálatok alapján az oospórák *Ph. infestans*nak bizonyultak (RISTAINO 1998, RISTAINO et al. 2001). Mexikón kívül nem ismerünk 1980 előtti, A2-es párosodási típusú izolátumot, de Ristaino eredményei alapján megdőlhet az a korábban széles körben elfogadott nézet, hogy a kórokozó a nyolcvanas évek elejéig Mexikón kívül csak ivartalanul szaporodott (FRY et al. 1993, GOODWIN 1997). Igaz ugyan, hogy oospórák ritkán önmegtermékenyítés útján is kialakulhatnak (SMART et al. 1998), de a régi mintákból polimeráz láncreakcióval a mitokondriális DNS Ia haplotípusú változatát mutatták ki, a „régi” populációra jellemző Ib haplotípust csak Dél-Amerikai mintákban találták meg (RISTAINO 2002, MAY és RISTAINO 2004). Ezen új eredmények ráirányítják a figyelmet a herbáriumok fontosságára a kórtörténeti kutatásokban, és az ezekben felhalmozott adatok felhasználásával várhatóan új elméletek születnek az írországi burgonyavészt okozó *Ph. infestans*-törzsek eredetére is (HAWKSWORTH 2001).

2. 2. 6. A *Phytophthora infestans* Magyarországon

A *Ph. infestans* magyarországi populációira vonatkozó adatok egészen a közelmúltig hiányosak voltak. Dél-Dunántúli izolátumok rasszkarakterének vizsgálata alapján a hatvanas években hazánkban csak a régi populációhoz tar-

tozó négy, egyszerű virulenciaspektrumú törzs fordult elő (MUDICH 1965). Az A2 párosodási típust hazánkban 1996-ban izolálták, de feltételezhetően már néhány évvel korábban megjelent (BAKONYI és ÉRSEK 1997a és 1997b). Ezt követően több, szélesebb körű gyűjtőmunka során BAKONYI et al. (1998 és 2002b), illetve NAGY et al. (2003a) majd SOM et al. (2004) feno- és genotípusos (párosodási típus, metalaxil-érzékenység, *Gpi* és *Pep* genotípusok, RG57-*fingerprint* és mitokondriális haplotípus) markereket használva elemezték a hazai *Ph. infestans*-populációt. Összesen 63 izolátum vizsgálata során a régi, klonálisan szaporodó populációra jellemző *Pep* 92-es és *Gpi* 86-os allél nem fordult elő. Az RG57-mintázatok között számtalan új genotípus jelent meg, és a feltárt mitokondriális haplotípusok (Ia és IIa) is az új populációra voltak jellemzőek. Ezek az eredmények már sejttették, hogy a világméretű változások Magyarországot sem kerülték el. Ezt megerősítették BOHÁR et al. (1999) eredményei is, akik számos izolátum rasszkarakterét elemezve esetenként nyolc virulenciafaktort is tartalmazó, összetett törzseket írtak le.

2. 3. Természetben előforduló hibrid eredetű mikroorganizmusok

Egy szervezet hibrid eredetét bizonyítani morfológiai bélyegek alapján nem könnyű. Ha felmerül a gyanú, hogy egy faj átmeneti tulajdonságai esetleg interspecifikus genetikai kölcsönhatás eredményei lehetnek, akkor a szóba jöhető szülőfajokkal végzett keresztezési kísérletek alátámaszthatják az elméletet. Növénykórokozó mikroorganizmusok esetében azonban az ilyen kísérletek kivitelezése nem várt nehézségeket eredményezhet. Az elmúlt két évtizedben mindenesetre több fajjal kapcsolatban is felmerült a gyanú, hogy létük interspecifikus kölcsönhatás eredménye lehet (BRASIER 2000).

Két *Ophiostoma*-faj, az *O. ulmi* és az *O. novo-ulmi* is ismert, amely a szilfán okoz súlyos károkat. Találtak azonban néhány olyan izolátumot, amelyek élettani és kórtani tulajdonságaikban meglepően hasonlítottak a két faj laboratő-

riumban mesterségesen előállított hibridjére, hibrid voltukat BRASIER et al. (1998) bizonyították be.

A *Tilletia caries* és *T. controversa* kőüszögfajokkal együttesen fertőzött búzán a teliospórák csírázási dinamikájában és a cikloheximid-érzékenységben átmeneti típusok is megjelentek (TRAIL és MILLS 1990). Ezt a szerzők sikeres hibridizációs eseménynek minősítették, jóllehet RUSSEL és MILLS (1993 és 1994) kariotípus-elemzés alapján a két fajt már egyetlennek tekinti, ezért leszármazottjuk hibrid volta is kérdésessé vált.

A molekuláris biológiai módszerek széles körű elterjedésével több organizmusról már bizonyítani is lehetett a hibrid eredetet. Ilyen a *Melampsora medusae-populina*, amelyben az uredospórák mintázata, alakja és mérete sok átmeneti értéket mutat a *M. larici-populina* és a *M. medusae* hasonló tulajdonságaival (SPIERS és HOPCROFT 1994). A *M.* × *columbiana* nyárfarozsda hibrid uredospóráinak mérete, tüskézettségének sűrűsége és mintázata, valamint ITS-szekvenciája is a *M. occidentalis* és a *M. medusae* közötti átmenetnek bizonyult. Ráadásul ez az utóbbi hibrid agresszívebbnek bizonyult a szülőfajoknál, és lassan kiszorítja azokat eredeti élőhelyükről (NEWCOMBE et al. 2000). A *M.* × *columbianá*hoz hasonló jelenségeket figyeltek meg a *Heterobasidion*-nemzetségben is tűlevelűek gyökérzetén (GARBELOTTO et al. 1996).

A valódi gombák mellett az Oomycota-szervezetek – így a fitoftórák – körében is bizonyított interspecifikus hibridek kialakulása.

2. 4. Hibridek a *Phytophthora*-nemzetségben

2. 4. 1. Mesterségesen létrehozott fajhibridek

A fajhibridek keletkezésének vizsgálatát hátráltatja, hogy ritkán lehet természetes körülmények között kialakult fajhibrideket találni. Ez a hátrány azonban kiküszöbölhető hibridek mesterséges előállításával. Nehézséget okoz azonban, hogy például az ivaros hibridizációhoz a szexuális inkompatibilitás

leküzdése sokszor lehetetlen. Ennek ellenére GOODWIN és FRY (1994) sikeresen megvalósították a *Ph. infestans* és a *Ph. mirabilis* keresztezését, és ezt izozim-elemzéssel valamint RG57-*fingerprint* alapján bizonyították.

A szomatikus sejtek indukált fúziója azonban jóval nagyobb esélyt kínál hibridek létrehozására, amióta meghonosították a protoplaszttechnikát a mikológiai gyakorlatban is (FERENCZY et al. 1974), kiküszöbölve ezáltal a sejtfal okozta fúziós gátat.

Mivel a petespórás gombák ivartalan ciklusában keletkező rajzóspórák sejtfalmentesek, a „protoplasztokat" maga a természet készíti el, így ezen sejtek fúziója közvetlenül is indukálható (ÉRSEK és BAKONYI 1995). Rajzóspórák indukált fúziójával először ÉRSEK et al. (1995) hoztak létre szomatikus fajhibridet a *Ph. nicotianae* és a *Ph. capsici* között. A kialakult hibridtörzsek morfológiájukban mindkét szülőfajra hasonlítottak. Southern-hibridizációval mindkét szülőfaj DNS-e kimutatható volt az utódtörzsekben és a keletkezett hibrid képes volt olyan gazdanövényeket is fertőzni, amelyeken korábban egyik szülő sem élt (ENGLISH et al. 1999).

2. 4. 2. Természetes körülmények között kialakult hibridek

MAN IN 'T VELD et al. (1998) hidropóniás rendszerben termesztett kankalinról (*Primula* sp.) és vitorlavirágról (*Spathiphyllum* sp.) izoláltak *Phytophthorát*, az azonban nem hasonlított a korábban ezekről a növényekről ismert más fitoftórafajokra *(Ph. nicotianae, Ph. palmivora, Ph. primulae, Ph. cactorum, Ph. drechsleri)*, de semmilyen más ismert *Phytophthora*-fajra sem. Izozimelemzéssel, AFLP-termékek vizsgálatával és RAPD-termékek Southern-féle hibridizációjával kimutatták, hogy a kórokozó a *Ph. nicotianae* és a *Ph. cactorum* genetikai kölcsönhatásából kifejlődött fajhibrid (MAN IN 'T VELD et al. 1998, BONANTS et al. 2000). Ráadásul ez már nem csak a szülők közös gazdanövényét, a kankalint betegíti meg, hanem a cikláment is, jóllehet ezen a gazda-

növényen sem a *Ph. nicotianae* sem pedig a *Ph. cactorum* nem él. Ez esetben tehát a hibrid gazdanövényköre bővült az eredeti szülőkéhez képest.

Európában bangitán (*Viburnum* sp.) és havasszépén (*Rhododendron* sp.) hajtások elhalását okozza egy korábban ismeretlen, és kezdetben hibrid eredetűnek gondolt fitoftórafaj, a *Ph. ramorum* (WERRES et al. 2001). Amerikai kutatók ugyanezt a fajt azonosították Kaliforniában *Lithocarpus densiflorus*ról és *Quercus*-fajokról (RIZZO et al. 2002). Bár ITS-szekvenciák és AFLP-adatok alapján különbség mutatható ki az európai és az amerikai izolátumok között (BRASIER 2003, IVORS et al. 2004), mindkét csoport ugyanahhoz a fajhoz tartozik.

SANSOME et al. (1991) a *Ph. meadii* fajban egyaránt feltártak poliploid és diploid izolátumokat, de sejttani vizsgálataik alapján normális fejlődésű oospórákat csak a poliploidok képeztek. A diploid törzsekben abnormális oospóraképződés mellett megfigyeltek poliploidizálódott és ezután már normálisan fejlődő oospórákat is. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a *Ph. meadii* valószínűleg egy poliploidizációval stabilizálódott fajhibrid; bár hibrid voltának molekuláris bizonyítékai még váratnak magukra.

2. 5. Egy természetes eredetű fajhibrid, az éger-*Phytophthora*

2. 5. 1. Kórtörténeti előzmények

1993-94-ben Nagy-Britannia déli részén a folyóparti égerfák (*Alnus glutinosa*) törzsén sűrű, fekete nedvfolyások (kátrányfoltok) jelentek meg, a sebek környéki nekrózisokból pedig egy addig ismeretlen, szokatlan fitoftórát izoláltak. Az első vizsgálatok alapján a kórokozót egyetlen korábbról ismert fajjal sem lehetett azonosítani, ezenkívül először fordult elő, hogy égerről izoláltak fitoftórát (BRASIER et al. 1995, GIBBS et al. 1999). A kórokozó sokban hasonlított a *Ph. cambivorá*ra, amely számtalan fafajon okoz betegséget, elsősorban a *Malus*-, *Castanea*-, *Juglans*-, *Acer*-, *Fagus*- és *Prunus*-nemzetségek-

ből, de égerről eddig még nem mutatták ki. A lomblevelek méretének csökkenésével együtt járt a lombkorona megritkulása is. Ezek a tünetek a kátrányfolyással együtt Nagy-Britannia déli részén számos helyen megfigyelhetők voltak, néhol az állomány 10–15, esetenként 20%-át is érintették (GIBBS 1995). Ezek a tünetek nem csak az enyves égeren jelentkeztek (2. ábra), hanem az *Alnus incanán* és az *A. cordatán* is megfigyelhetők voltak.

A tüneteket mutató fák gyökérzete is jelentős mértékben elpusztult. A nedvfolyást mutató törzsekből, a gyökerekről, illetve az érintett égerfák gyökérzónájából egyaránt kitenyészthető volt a kórokozó, amelyet később számos észak- és nyugat-európai országban megfigyeltek: Csehországban ČERNY et al. (2003), Svédországban OLSSON (1999), Franciaországban STREITO és GIBBS (1999). A kórokozó jelenleg ismert legdélebbi előfordulási helye Olaszországban van (SANTINI 2001).

2. 5. 2. Az éger-*Phytophthora* sejttani és genetikai jellegzetességei

BRASIER et al. (1995) eredményei alapján a beteg égerfákról izolált kórokozó rücskös falú oogóniumokat és amfigín, kétsejtű anterídiumokat képezett. Ezek a tulajdonságok egy jól ismert kórokozóra, *Ph. cambivorá*ra emlékeztettek, amely számos fafajt képes megbetegíteni, de az égert nem. Emellett az égerfitoftóra – ellentétben a *Ph. cambivorá*val – homotallikus volt, és a tenyészetében feltűnően nagy számban keletkeztek abnormális oospórák. Sejttani vizsgálatok kimutatták, hogy az éger-*Phytophthora* izolátumaiban nem zajlik le szabályos meiózis, és a kromoszómaszám sokkal nagyobb, mint a *Ph. cambivorá*ban tapasztalható n=5–6. Ezek a tulajdonságok azt sugallták, hogy az éger ezen új kórokozója hibrid eredetű lehet, és az egyik szülő valószínűleg a *Ph. cambivora* (BRASIER et al. 1999).

Anatómiai hasonlóságok mellett a riboszomális DNS ITS-régiójának vizsgálata is megerősítette a feltételezést, hogy az új kórokozó hibrid eredetű, ugyanis az égerfitoftórában több, azonos hosszúságú, de eltérő szekvenciájú

ITS-régiót mutattak ki. Az éger-*Phytophthora* izolátumai jól körülhatárolható csoportot alkottak, és a legnagyobb hasonlóságot a *Ph. cambivorá*val és a *Ph. fragariae*val mutatták (BRASIER et al. 1999). Ez utóbbi két faj ITS-szekvenciájuk alapján nagyon közeli rokonságban áll egymással és mindkettő ugyanabba az ITS-csoportba tartozik a nemzetségen belül (COOKE és DUNCAN 1997, COOKE et al. 2000). Ezek alapján feltételezhető, hogy az éger-*Phytophthora* szülőfajait is ebben a rokonsági körben kell keresni.

A teljes genom összehasonlító elemzésére alkalmas AFLP-adatok egybevágtak az ITS-szekvenciákból levonható következtetéssel, de nem támasztották alá teljes mértékben a *Ph. fragariae* szerepét az égerfitoftóra kialakulásában. Ezért a jelenlegi adatok alapján az égerfitoftóra feltehetőleg a *Ph. cambivora* és egy *Ph. fragariae*hoz közelálló, egyelőre ismeretlen taxon kölcsönhatása során alakulhatott ki.

A hibridnek több, mesterséges fertőzési kísérletek tanúsága szerint (BRASIER és KIRK 2001) eltérő patogenitású változata ismert. Legagresszívebb az úgynevezett standard típus, egyben ez a leginkább elterjedt és legkorábban megtalált alak. Az úgynevezett variánsok (svéd, holland, német) a standard alaktól mind sejttani tulajdonságaik, mind pedig molekuláris biológiai bélyegeik alapján elkülönülnek. BRASIER et al. (2004) az éger e kórokozóját *Ph. alni* Brasier & S. A. Kirk néven külön fajként írták le, az egyes variánsokat pedig ennek alfajaiként nevezték el. A standard típus a *Ph. alni* subsp. *alni*, a genetikailag legegységesebb variáns, a svéd típusú pedig *Ph. alni* subsp. *uniformis* néven került be az irodalomba. A változatos morfológiájú, genetikailag is kevésbé stabil törzseket tartalmazó német és holland variáns a *Ph. alni* subsp. *multiformis* nevet kapta. Az Észak-Yorkshire-ből származó és mindössze egy, azóta már elpusztult izolátum által képviselt brit variáns ITS-szekvenciája és izozimmintázatai alapján nem különbözik a holland és német variánstól, ezért szintén ebbe az alfajba sorolták.

2. 5. 3. Az éger-*Phytophthora* Magyarországon

Magyarországon a jellegzetes tüneteket először 1999-ben észlelték a Hanságban (VARGA 2000), a kórokozót pedig egy évre rá SZABÓ et al. (2000) azonosították. KOLTAY (2003) felmérve Magyarország hegyi és síkvidéki égereseit megállapította, hogy az állományok 78, illetve 83%-a mutat tüneteket, a kórokozó izolálása azonban nem mindenhonnan sikerült.

3. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3. 1. Fitoftórák tenyésztésére használt táptalajok

3. 1. 1. Borsótáptalaj

A táptalaj 75 g fagyasztott zöldborsó 2-300 ml ioncserélt vízben megfőzött, turmixolt majd gézen átszűrt levéhez adott 1 g L-aszparagin (vagy 2 g DL-aszparagin), 500 mg KH_2PO_4, 250 mg $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10 g szacharóz, 1 mg tiamin-hidroklorid és 15 g porított agar 1 literre kiegészített oldatából készül. A táptalaj pH-ját sterilizálás előtt kálium-hidroxid-oldattal 6,5-re kell beállítani.

3. 1. 2. V8-dzsúsz

A nyolcféle zöldségnövény levéből készült ivólét folyékony vagy szilárd tápközegként felhasználva számos fitoftórafaj jól tenyészthető. 200 ml V8-dzsúszt állandó keverés és melegítés mellett 4 g $CaCO_3$-tal telítünk. Az oldhatatlan csapadékot 10 perces, percenként 4000 fordulatszámú centrifugálással kell eltávolítani, majd a táptalaj 1 literre kiegészítve és 15 g agarral szilárdítva használható fel.

3. 1. 3. Sárgarépa-táptalaj

A táptalajhoz 200 g alaposan összeturmixolt sárgarépa leszűrt levét 1 literre kell kiegészíteni és sterilizálás előtt 15 g/L agarral kell szilárdítani.

3. 2. Kórokozók izolálása

3. 2. 1. *Phytophthora infestans*

A fertőzési tüneteket mutató növényi szövetből a nekrotikus régió határáról vett kis szövetdarabkából antibiotikumokat tartalmazó szelektív táptalajon a

gomba közvetlenül kitenyészthető. Szelektív táptalaj borsótáptalajból készíthető, antibiotikumos kiegészítéssel: 10 mg/L pimaricin, 500 mg/L ampicillin és 10 mg/L rifampicin. Az antibiotikumokat csak a már lehűlt táptalajhoz lehet hozzáadni, közvetlenül a Petri-csészék kiöntése előtt. Tiszta tenyészetet szelektív táptalajon való többszöri átoltás után kapunk. Ha a növényi anyag szaprotróf baktériumokkal vagy gombákkal másodlagosan erősen fertőzött, célszerű először ép, felületén 10 percig 10%-os NaOCl oldattal (megfelelő a kereskedelemben kapható háztartási Hypo is, tízszeres hígításban) fertőtlenített, majd steril vízzel leöblített, megszárított burgonyagumót vagy gumószeletet fertőzni. Hatnyolc napos, 20 °C-os inkubáció után a gumót kettétörve a törött felületről kivágott és nekrotikus tüneteket mutató gumódarabka vagy a gumószelet felületéről oltókaccsal leemelt parányi micéliumdarabka szelektív táptalajra helyezhető. Borsótáptalajon a kórokozó sötétben hosszabb ideig is életben tartható. A *Ph. infestans* növekedési optimuma 18-20 °C között van, alacsonyabb hőmérsékleten (10-15 °C) tartva a tenyészetet az átoltások közötti idő 5-6 hétre hosszabbítható meg.

3. 2. 2. Éger-*Phytophthora*

A kórokozó mind a tüneteket mutató növényi szövetből, mind pedig a fertőzött fák gyökérzónájából származó talajból kitenyészthető. A friss, nedvező kátrányfoltok körüli területről származó kéregforgácsok közvetlenül, vagy előzőleg folyó víz alatt 30-60 percig mosva és szárítva is szelektív borsótáptalajra helyezhetők. A baktériumok gátlására 500 mg/L ampicillin és 10 mg/L rifampicin használható. Gombás fertőzéstől 10 mg/L pimaricin, 10 mg/L benomil és 10 mg/L PCNB segítségével szabadulhatunk meg, a *Pythium*-fajok növekedésének gátlására pedig legfeljebb 10 mg/L koncentrációjú himexazol használható. A nekrotikus gyökérből a kéreghez hasonló módon lehet szelektív táptalajon a kórokozót izolálni. THEMANN és WERRES (1998) módszerét módosítva rododendronlevél helyett babérmeggylevéllel (*Prunus laurocerasus* L.),

esetenként körte érett termésével azonban lehetséges a rajzóspórák közvetlen izolálása is. Ekkor a lemosott kéreg- és gyökérdarabokat, vagy a gyökérzónából származó hajszálgyökereket is tartalmazó talajt vízbe áztatva és a víz tetejére babérmeggyleveleket helyezve a rajzóspórák által szobahőmérsékleten és fényen 5-7 nap alatt kolonizált levélből felületi fertőtlenítés után szelektív táptalajon a kórokozó kitenyészthető. A víznek 4-5 cm vastag rétegben kell ellepnie a mintát. Körtecsapdánál a termést feléig bele kell állítani a vizes talajszuszpenzióba, a rajzóspórák általában a termés és a vízfelszín érintkezési vonalánál telepednek meg. A kórokozó fenntartása sárgarépa-táptalajon történik.

3. 3. Felhasznált izolátumok

3. 3. 1. *Phytophthora infestans*

A *Ph. infestans* populációjának vizsgálatához az izolátumok a fertőzést mutató burgonya- és paradicsomállományokból véletlenszerűen kiválasztott levelekről származtak (származási helyük és a gyűjtés éve a 3. táblázatban található). Az összehasonlító vizsgálatokhoz négy, burgonyáról származó referenciaizolátumot is felhasználtunk, amelyek (US940501, US930287, JP880001) W. E. Fry laboratóriumából (Cornell Egyetem, Ithaca, NY, Egyesült Államok), illetve (a Pi1568-as) G. A. Forbestól (Nemzetközi Burgonyakutatási Központ, Quito, Ecuador) származtak. A referenciaizolátumok jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze, RG57 genotípusuk pedig a következő volt:

US940501: 10101–01011–00110–10001–10011
US930287: 10001–00001–00110–10001–10111
JP880001: 10001–10000–00110–11000–10011
Pi-1568: 11111–01001–00110–10001–11011.

3. 3. 2. Éger-*Phytophthora*

A Magyarországról származó éger-*Phytophthora*-izolátumok két területről származtak, a Dél-Hansági Erdészet Csíkos éger nevű területéről (hansági

minták), valamint a Hévízi-tó környékén található égeres lápterületről (hévízi minták). Az éger-*Phytophthora* anatómiai és élettani tulajdonságainak vizsgálatához összehasonlító izolátumokat szereztünk be az éger-*Phytophthora* mellett a *Ph. cambivora* és a *Ph. fragariae* var. *rubi* fajokból is C. M. Brasiertől a nagy-britanniai Forest Research Agencyből (Farnham, Surrey). A felhasznált izolátumok adatainak összefoglalása a 2. táblázatban látható.

1. táblázat: A *Phytophthora infestans* elemzéséhez felhasznált referencia-izolátumok gyűjtési adatai, valamint feno- és genotípusos tulajdonságai.

Izolátum sorszáma/ genotípus jele	Pár. típus	Gyűjtés helye, éve	Meta-laxil[a]	Gpi	Pep
US940501/ US-1	A1	Michigan, USA, 1994.	É	86/100	92/100
US930287/ US-8	A2	Maine, USA, 1993.	R	100/111/ 122	100/100
JP880001/ JP-1	A2	Nagaszaki, Japán, 1998.	R	100/100	96/96
Pi1568/ EC-1	A1	Ecuador, n.a.	R	n. a.	96/100

[a]É: érzékeny, R: rezisztens izolátum.
n. a.: nincs adat.

3. 4. A *Phytophthora infestans* fenotípusos tulajdonságainak meghatározása

3. 4. 1. Metalaxilérzékenység

Kisméretű (6 cm átmérőjű) Petri-csészékbe 7 ml borsótáptalaj került, amely a dimetil-szulfoxidban (DMSO-ban) oldott metalaxilt 5 és 100 μg/ml koncentrációban tartalmazta. A kontroll csészék metalaxilt nem, csak DMSO-t tartalmaztak. Valamennyi Petri-csészébe 4-5 napos telepek még aktívan növekvő szegélyéről 5-5 mm átmérőjű agarkorongok kerültek. Értékelésre 4-5 nap

elteltével került sor az átlagos telepátmérő – levonva az inokulum 5 mm-es kezdőátmérőjét – kontrollhoz viszonyításával. Az egyes kategóriák (érzékeny, átmeneti érzékenységű, illetve rezisztens) kialakítása KOH et al. (1994) és DAGGETT et al. (1993) szerint történt. Vagyis az az izolátum, amely mindkét fungicidkoncentrációnál kisebb telepeket fejlesztett, mint a kontroll 40%-a, érzékeny volt. Az az izolátum, melynek telepe 5 μg/ml metalaxil-koncentrációnál nagyobb volt, mint a kontroll 40%-a, de 100 μg/ml metalaxilkoncentrációnál kisebb, átmeneti *(intermedier)* érzékenységű volt. Végül az az izolátum minősült rezisztensnek, amely mindkét metalaxil-koncentrációnál nagyobb telepeket fejlesztett, mint a kontroll 40%-a. Valamennyi kísérletre legalább két ismétlésben került sor.

3. 4. 2. Párosodási típus meghatározása

Az izolátumok párosodási típusa ismert párosodási típusú referenciatörzsekkel – A1: US940501, A2: US930287 – borsótáptalajon való együttes tenyésztéssel határozható meg két hetes, 20 °C-os inkubáció után. Az az izolátum, amely az A1-es párosodási típusú izolátummal bőségesen képez oospórákat, viszont az A2-vel nem, A2-es párosodási típusúnak tekintendő. Ellenben az az izolátum, amely csak az A2-vel képez oospórát A1-es párosodási típusúnak minősül.

3. 5. Az éger-*Phytophthora* morfológiája és hőmérsékletigénye

Az éger-*Phytophthora* telepnövekedési morfológiáját különböző összetételű táptalajon (borsó, sárgarépa illetve V8-dzsúsz), 9 cm átmérőjű Petri-csészében a telepnövekedés sebességéhez optimális hőmérsékleten vizsgáltuk az izolátumok által képezett telep tulajdonságainak (telepalak, légmicélium mennyisége) megállapításához.

3. 5. 1. Sporangiumképzés indukálása

Fitoftórák azonosításához ivartalan és ivaros szaporítószerveik ismerete szükséges. A sporangiumképződés a *Phytophthora*-nemzetségben fajonként eltérő módon szabályozott, különleges környezeti feltételek megléte esetén indul meg. Bár ERWIN és RIBEIRO (1996) számtalan speciális táptalajt és feltételt is leírnak a sporangiumképződés elősegítésére, az égerfitoftóra valamint a *Ph. cambivora* és *Ph. fragariae* esetében a talajkivonat bizonyult megfelelőnek. Ehhez 100 g talajt 100 ml ioncserélt vízben egy éjszakán át kell áztatni, majd ennek szűrletét kell a 4–5 napig borsótápoldatban nevelt tenyészetekre önteni. A talajkivonatos kezelés előtt a tápoldatot szűréssel el kell távolítani a micéliumról. Ezután ioncserélt vízzel át is kell azt öblíteni, hogy a tápoldattól minél jobban megtisztíthassuk.

3. 5. 2. Mikroszkópos vizsgálatok

Fénymikroszkópos vizsgálattal állapítottuk meg a sporangiumok keletkezési módját, szerkezetét, méreteit, az oogónium és az anterídium alakját, méretét és kapcsolódásuk módját. Az oogóniumok felületi mintázatát emellett Hitachi S-2360N típusú pásztázó elektronmikroszkóp segítségével is vizsgáltuk az Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényszervezettani tanszékén. Ehhez a sárgarépatáptalajon növő telepekből kivágott agarkockákat 2 órán át 2%-os glutáraldehid-oldatban, majd további egy órán keresztül 1%-os ozmium-tetraoxid-oldatban rögzítettük. A mintákra növekvő koncentrációjú etanolsorozatban (25%, 50%, 75%, 90%, 96% és 100%) és amil-acetátban történő víztelenítés és CO_2-os kritikus pontos szárítás után tiszta arany gőzét kondenzáltuk (SZEDLAY et al. 1996).

3. 5. 3. Hőmérsékleti optimum megállapítása

Az aktívan növő telepek széléből kivágott 5 mm átmérőjű agarkorongokat 9 cm átmérőjű Petri-csészébe öntött 20 ml sárgarépaagaron sötétben inkubáltuk 17,5; 20; 22,5; 25; 27,5; 30; 32,5 és 35 °C hőmérsékleten. Valamennyi izolátum

értékelésére a negyedik napon került sor, amikor a leggyorsabban növekedő izolátum sem érte még el a Petri-csésze szélét. Az optimális növekedési hőmérséklet az utolsó napon mért telepátmérőből számolható (az inokulációtól eltelt napok számával osztva). A méréseket minden egyes hőmérsékleten legalább három ismétlésben végeztük.

3. 6. Micéliumpor előállítása

Mind a DNS-, mind az enzimkivonáshoz az izolátumok tiszta tenyészetéből micéliumport kell készíteni. Valamennyi izolátumot fénymikroszkópos azonosítás után borsótápoldatban tenyésztettük. Az ioncserélt vízzel kétszer átöblített és leszűrt tenyészeteket liofilizálás után dörzsmozsárban homogenizáltuk. Az így nyert micéliumpor -70 °C-os hűtőben évekig eltartható. A tenyésztési idő a fajra jellemző optimális hőmérsékleten a *Ph. infestans* és a *Ph. fragariae* esetében 7–10 nap, viszont a náluk sokkal gyorsabban növekedő éger-*Phytophthorá*nál vagy a *Ph. cambivorá*nál csak 3–5 nap.

3. 7. Izozimelemzés

Izozimanalízishez 25 mg fagyasztva szárított (liofilizált) micéliumporból 300 µl térfogatban vontuk ki az enzimeket, a kivonóoldat[2] LÁDAY et al. (2000) szerint készült. A micéliumpor és a kivonóoldat összekeverése és egy órán át tartó 4 °C-os inkubációja után a sejttörmeléket 4 °C hőmérsékleten 15 percig tartó, percenként 15000 fordulatszámú centrifugálással kell eltávolítani. Az elektroforézishez a Helena Laboratories által gyártott cellulóz-acetátgél közegű készüléket használtuk. Az enzimek elválasztás utáni láthatóvá tétele agar-felülrétegzéses eljárással történt (GOODWIN et al. 1995, HEBERT és BEATON), vagyis a festőelegyet tartalmazó agaros oldatot rárétegeztük a gélre.

[2] Az e fejezetben említett oldatok összetételét a 3. melléklet (127. oldal) részletezi.

A *Ph. infestans* vizsgálatához a glükóz-6-foszfát-izomeráz és a glicil-leucin-peptidáz, míg az éger-*Phytophthora* vizsgálatához a glükóz-6-foszfát-izomeráz mellett az almasav-dehidrogenáz, az izocitromsav-dehidrogenáz és a leucil-tirozin-peptidáz enzimeket használtuk fel.

A festőelegyekhez felhasznált oldatok koncentrációja:

TRIS (pH=8,0):	0,1 mol/L
NAD (β-nikotinamid-adenin-dinukleotid):	3 mg/ml
NADP (β-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát nátrium só):	3 mg/ml
DL-almasav (pH=8,0):	70 mg/ml
dipeptidek (glicil-leucin és tirozil-leucin):	15 mg/ml
fruktóz-6-foszfát:	20 mg/ml
G6PDH (glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz)	1000 U/ml
DL-izocitromsav:	100 mg/ml
L-aminosav-oxidáz:	10 U/ml
o-dianizidin (3,3'-dimetoxi-benzidin):	4 mg/ml
peroxidáz:	1000 U/ml
$MgCl_2$:	20 mg/ml
$MnCl_2$:	20 mg/ml
MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2*H*-tetrazólium-bromid):	10 mg/ml
PMS (N-metil-fenazónium-metil-szulfát):	10 mg/ml
agar:	1,6% (m/V)

A NAD- és NADP-oldat milliliterenként 1 μl 250 mg/ml koncentrációjú nátrium-azid-oldattal tartósítandó. Az egyes komponenseket 60 °C-os vízfürdőben kell összekeverni, hogy az agar ne dermedjen meg, de az enzimeket és a festéket (PMS, MTT) csak közvetlenül a festés megkezdésekor szabad az elegyhez adni. Az egyes enzimek elválasztásához és láthatóvá tételéhez a következő reakciókörülményeket és festőelegyeket használtuk:

Glükóz-6-foszfát-izomeráz *(Gpi)* (E. C. 5.3.1.9.):

Futási idő: 25 perc TG pufferben.

Festőelegy összetétele: 1,0 ml Tris, 1,0 ml dH_2O, 1,0 ml NAD, 200 µl fruktóz-6-foszfát, 3 µl G6PDH, 200 µl MTT, 40 µl PMS, 2 ml agar.

Glicil-leucin-peptidáz *(Pep)* (E. C. 3.4.11/13.):

Futási idő: 20 perc TG pufferben.

Festőelegy összetétele: 1,0 ml Tris, 1,0 ml dH_2O, 400 µl dipeptid, 150 µl peroxidáz, 150 µl L-aminosav-oxidáz, 320 µl o-dianizidin, 80 µl $MnCl_2$, 2,0 ml agar.

Almasav-dehidrogenáz *(Mdh)* (E. C. 1.1.1.37.):

Futási idő: 25 perc CAAPM pufferben.

Festőelegy összetétele: 1,0 ml Tris, 0,5 ml dH_2O, 1,0 ml NAD, 500 µl DL-almasav, 200 µl MTT, 40 µl PMS, 2 ml agar.

Izocitromsav-dehidrogenáz *(Idh)* (E. C. 1.1.1.42.):

Futási idő: 25 perc CAAPM pufferben.

Festőelegy összetétele: 1,0 ml Tris, 1,5 ml NADP, 400 µl DL-izocitromsav, 320 µl $MgCl_2$, 200 µl MTT, 40 µl PMS, 2 ml agar.

Leucil-tirozin-peptidáz (E. C. 3.4.11/13.):

Futási idő: 20 perc TG pufferben.

Festőelegy összetétele: 1,0 ml Tris, 1,0 ml dH_2O, 400 µl dipeptid, 150 µl peroxidáz, 150 µl L-aminosav-oxidáz, 320 µl o-dianizidin, 80 µl $MnCl_2$, 2,0 ml agar.

3. 8. DNS-kivonás

Általánosan GOODWIN et al. (1992a) módszerét használtuk a DNS-kivonáshoz, de a *Ph. infestans*-minták egyharmadánál az eljárást MURRAY és THOMSON (1980) módszerének módosításával végeztük.

GOODWIN et al. (1992a) módszere szerint 80 mg micéliumporhoz 900 µl kivonó oldatot adva 1 óra 65 °C-os inkubáció után a sejttörmeléktől centrifugálással (15 perc, 15000 fordulat percenként) megtisztított felülúszó 750 µl-ét 750 µl fenol:kloroform:izoamil-alkohol 25:24:1 arányú elegyével összerázva és centrifugálva (5 perc, 15000 fordulat/perc) szétválik: a szerves fázis felett fehérjecsapadék helyezkedik el, a DNS-oldat pedig legfelül maradva pipettával eltávolítható (fenolozás). Az eljárás addig ismételendő, míg az elegyből az összes fehérje ki nem csapódott. Utolsó lépésként a fenolnyomok kloroform:izoamil-alkohol 24:1 arányú elegyével távolítandók el (kloroformozás). A felülúszóból a DNS kicsapással tisztítható tovább: a DNS oldathoz 0,54 térfogatarányban izopropanolt és 0,1 térfogatarányban 3,0 M-os nátrium-acetát-oldatot adva (pH=5,2) -20 °C-on a DNS egy-két óra alatt kicsapódik. A csapadékot centrifugálással (15 perc, 15000 fordulat/perc) összegyűjtve majd 70%-os etanollal mosva, szárítás után a DNS-tartalmú üledéket 0,1 M-os Tris-HCl-oldatban (pH=8,0) kell feloldani. RNáz-os (1 órás inkubáció, az enzim koncentrációja a reakcióelegyben: 0,1 mg/ml), majd proteinázos emésztést (az előző reakcióelegyhez közvetlenül adva a proteinázt, koncentrációja az elegyben: 0,1 mg/ml) követően – az emésztőenzimeket egy utolsó ciklus fenolozással, majd kloroformozással eltávolítva – etanolos kicsapás (0,1 térfogatrész nátrium-acetát, 2-3 térfogatrész jéghideg etanol, inkubáció -20 °C-on 2–16 óra) és a csapadék 70%-os etanolos mosása után a tiszta, szárított DNS-csapadék 50 µl 0,1 M-os Tris-HCl-ben oldandó fel. A DNS -70 °C-on, rövidebb ideig -20 °C-on tárolható.

MURRAY és THOMSON (1980) CTAB-oldatot használ a DNS tisztításához, amit általában a növényi DNS kivonásához használnak. Bár spektroszkópiásan nem lehet különbséget tenni sem a DNS tisztaságának ellenőrzésére használt A_{260}–A_{280} arány (a minta fényelnyelése 260 és 280 nm-en) sem a 250–300 nm közötti hullámhosszon tapasztalható spektrum szerint, de fitoftórák összgenomi DNS-ének emésztésére ez utóbbi a jobb módszer. Igaz, hogy valamivel kisebb lesz a kinyert DNS mennyisége, ellenben az emésztett DNS agarózgél-elektroforézissel sokkal szebben választható el, a kapott DNS-szakaszok sávjai a gélben tömöttek, nincs szétkenődő, a kiértékelést zavaró szennyeződés („*smear*”).

A módszer szerint 1 ml CTAB-oldatban elhomogenizált 50 mg micélium-por 1 órán keresztül tartó 60 °C-os inkubációja után a sejttörmeléktől centrifugálással (15 perc, 15000 fordulat/perc) megtisztított felülúszót a feljebb leírt módszer szerint kell fenolozni és kloroformozni, de csak egyszer. Ezután a felülúszóhoz adott azonos térfogatú „B” oldattal kell a DNS-t kicsapni. A csapadékot centrifugálása után CTAB-oldat és „B” oldat 1:1 arányú keverékével mosva 1 ml „C” oldatban kell feloldani. Ezután a DNS-tisztítás következő lépései, az enzimes kezelés és a további tisztítás megegyeznek a GOODWIN et al. (1992a) által leírt módszerrel, bár a csapadék újabb tisztításakor az izopropanolos kicsapáshoz nem kell nátrium-acetátot adni.

A DNS-kivonás után kapott oldat DNS-koncentrációja fotometriásan mérve 2-5 mg/ml között volt.

3. 9. DNS–DNS-hibridizáció

A *Ph. infestans* genomelemzésére használt RG57 próbát W. E. Fry bocsátotta rendelkezésünkre. Az éger-*Phytophthorá*ra készített próbát *Ph. cambivora* P1010 jelű izolátumából OPG-02 RAPD-indítószekvenciákkal végzett polimeráz-láncreakcióval szaporítottuk fel. Agarózgél-elektroforézises elválasz-

tás után a kívánt DNS-szakaszt a gélből a Boehringer Mannheim Agarose Gel DNA Extraction Kit-je segítségével izoláltuk.

Valamennyi próba jelölését a DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim) felhasználásával végeztük a gyártó kézikönyve szerint (DIG SYSTEM… 1995). Ehhez a DNS-t denaturáció (forrásban lévő vízfürdőben 10 perces inkubációt követően gyors hűtés jég-víz-elegyben) után 37 °C-on inkubáltuk 20 órán át. A reakcióelegy a DNS-polimeráz-I nagy alegységét (Klenow enzim), véletlenszerű bázissorrendű indítószekvenciákat és jelölt, illetve jelöletlen nukleotidokat tartalmazott. A jelölés sikerességét előkísérletben megmérve a reakció változó hatékonyságú volt, a próba koncentrációja 4 és 25 ng/µl között mozgott.

3. 9. 1. A *Phytophthora infestans* DNS-szakaszainak hibridizációja RG57 próbával

A tisztított DNS-oldat 6-10 µl-ét (kb. 30µg DNS) *Eco*RI restrikciós endonukleázzal egész éjszaka 50 µl térfogatban emésztettük és a DNS-darabokat etanolos kicsapással kisebb térfogatba koncentrálva 0,8%-os agarózgél-elektroforézissel választottuk el 40 V-os feszültséggel 16-20 óra alatt, 0,5×TBE-oldatban. Ezután a szétválasztott DNS-szakaszokat Southern-féle eljárással (Hybond N^+ típusú) nejlon membránra vittük át elektroblottal. Az átvitel 3,5 órán át tartott 1,5 A áramerősség mellett, 0,5×TBE-oldatban. A DIG-gel jelölt próba membránhoz hibridizáltatása 68 °C-on 16 órán keresztül tartott. A membrán részletes festési eljárását a 3. melléklet tartalmazza. Az értékelésnél a 25 lokuszt referenciaizolátumok segítségével azonosítva annak megfelelően, hogy a próba hibridizált-e az adott helyre vagy sem, 1-gyel vagy 0-val jelölve egy 25 tagú számsorozatot kell képezni. Ez a számsorozat lesz az adott izolátum RG57-ujjlenyomata (RG57-*fingerprint*). Az értékelésnél a 4. sávot nem vettük figyelembe, mert nem ismételhető egyértelműen (FORBES et al. 1998, LEBRETON és ANDRIVON 1998, ZWANKHUIZEN et al. 2000), értékelhetősége

attól függ, hogy a próba eredetileg milyen plazmidból származik (D. SHAW szóbeli közlése).

3. 9. 2. Szekvenciahomológia kimutatása a *Phytophthora cambivora* és az éger-*Phytophthora* között

A *Ph. cambivorá*ból és az éger-*Phytophthorá*ból OPG-02-es indítószekvenciával PCR-ben felszaporított és 1,2%-os agarózgélen elválasztott DNS-szakaszokat a gélből a *Ph. infestans*nál leírt módon Southern-féle eljárással szintén nejlon membránra (Hybond N^+ típusú, pozitívan töltött) vittük át elektroblottal. A digoxigenin-11-dUTP-vel (DIG) jelölt OPG-02-es próba hibridizációja és a membrán festési eljárása azonos volt a *Ph. infestans*nál leírtakkal.

3. 10. Adatelemzés

Nei-féle géndiverzitás-elemzést (NEI 1973) használtunk a *Ph. infestans* gazdanövény, illetve párosodási típus alapján elkülönített részpopulációi között megfigyelt genotípusos változatosság vizsgálatára. A vizsgált populációk közötti géndifferenciációs együtthatót (G_{ST}) az összehasonlított populációk közötti – a vizsgált lokuszokra átlagolt – géndiverzitásból ($\overline{H}_S$), és a teljes populációban mérhető géndiverzitásból ($\overline{H}_T$) számítottuk ki az alábbi képlet alapján (NEI és CHESSER 1983):

$$G_{ST} = \frac{\overline{H}_T - \overline{H}_S}{\overline{H}_T}.$$

Mindezt kiegészítettük a Nei-féle torzítatlan *(unbiased)* genetikai távolság kiszámításával, amelyet a Popgene 1.31 programmal végeztünk el (YEH et al. 1997). A *Ph. infestans* populációjának elemzésére csak az izozimlokuszokon megfigyelt allélgyakoriságot vettük figyelembe, mert az RG57 adatok nem használhatók fel egy diploid populáció elemzésére, ugyanis az egyes hibridizációs sávok jelenléte egyaránt jelenthet homozigóta és heterozigóta állapotot.

A populáció teljes változatosságának elemzésére a párosodási típusból, a *Pep* (peptidáz) és az RG57-genotípusból egyetlen multilokuszos genotípussá kombinált adatsorokat vettünk figyelembe. Minden izolátumot egy bináris számsorozat jellemzett, amelyben az izozim- és RG57-lokuszokon megjelenő allélt 1, az allél hiányát pedig 0 jelezte. A párosodási típus A1 és A2 állapota is megfelelt egy 1-0 párnak. Az egyes részpopulációk változatosságát *t*-próbával hasonlítottuk össze (HUTCHESON 1970, SIGLER és ZEYER 2002, DAY et al. 2004), a változatosság mérésére a Shannon-index szolgált (ZWANKHUIZEN et al. 2000). Ez a következő egyenlettel fejezhető ki:

$$H = \sum_{i=1}^{k} p_i \ln p_i,$$

ahol p_i az *i*-ik genotípus gyakorisága a mintában, *k* pedig a különböző genotípusok összes száma.

3. 11. Polimorfizmus az ITS-régióban

Polimeráz-láncreakció segítségével a vizsgálni kívánt DNS-szakasz felszaporítható. Az ITS-régió vizsgálatára tervezett univerzális indítószekvenciákkal valamennyi fajból felszaporítható egy fitoftórákban körülbelül 900 bázispár hosszúságú termék, melyet restrikciós endonukleázokkal hasítva a keletkező termékek hosszúsági eloszlása jellemző az egyes organizmusokra. A felhasznált két univerzális indítószekvencia az ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') és az ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') volt (WHITE et al. 1990). A PCR körülményei: 1. lépés 94 °C-on 5 percig, 40 ciklus DNS-szaporítás (94 °C 1 perc; 55°C 1 perc; 72 °C 2 perc), végül a végső lánchosszabbítás 72 °C-on 10 percig tartott. Az 50 µl végtérfogatú PCR-elegy összetétele: 30-50 ng templát DNS, 2 egység *Taq* DNS-polimeráz, mindkét indítószekvenciából 2,5-2,5 µl (10 µM), 4 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1 µl dNTP oldat (mind a négy bázisra nézve 2,5 mM-os) és az enzimmel együtt szállított reakciópuffer (5 µl,

10x-es koncentrációjú). A PCR-termékekből 10-10 µl-t *Msp*I és *Hae*III restrikciós endonukleázokkal 4 órán át 37 C°-on emésztettünk, majd a termékeket 1,5%-os agarózgéles elválasztás után etídium-bromiddal tettük ultraibolya fényben láthatóvá (SAMBROOK et al. 1989). Az emésztőelegy összetétele: 10 µl PCR-termék, 6 egység enzim, 2 µl reakciópuffer, melyet az enzimhez szállítanak, 7,4 µl desztillált víz.

3. 12. RAPD-elemzés

Az éger-*Phytophthora* RAPD-elemzéséhez (WILLIAMS et al. 1990, FOSTER et al. 1993) az Operon Technologies Inc. (Alameda, Egyesült Államok) indítószekvencia-készleteit használtuk fel (a teljes OPG és OPK készlet (20-20 indítószekvencia) mellett néhány további indítószekvenciát más sorozatokból is). Valamennyi indítószekvencia 10 bp hosszúságú volt, véletlenszerű bázissorrenddel. A polimeráz-láncreakció körülményei hasonlóak voltak az ITS-szekvencia vizsgálatának körülményeihez, azzal az eltéréssel, hogy 36 DNS szaporítási ciklus futott le a következő paraméterekkel: 94 °C 1 perc; 36°C 1 perc; 72 °C 2 perc. Az indítószekvenciák koncentrációja 0,4 µM volt. A keletkezett termékeket 1,2%-os agarózgélen választottuk el. Az OPG-02 indítószekvenciával (5'-GGCACTGAGG-3') kapott RAPD-termékek közül az egyiket, mely a *Ph. cambivorá*ban és a hibridekben is megtalálható volt, DIG-gel jelölve hibridizációs próbaként használtuk fel.

4. EREDMÉNYEK

4. 1. *Phytophthora infestans*-izolátumok feno- és genotípusos jellemzői

A 2001-es és 2002-es vegetációs időszakban összesen 118 izolátumot gyűjtöttünk össze burgonyáról, illetve kisebb részben paradicsomról. Ezt követően a nemzetközi gyakorlatban is széles körben alkalmazott fenotípusos (*in vitro* metalaxilérzékenység) és genotípusos (párosodási típus, glükóz-foszfát-izomeráz (Gpi) és peptidáz-A (Pep), valamint a genomban mérsékelt gyakorisággal ismétlődő RG57 jelű DNS-szakasz mintázatainak) elemzésüket végeztük el.

A minták jelentős része a 2002. évi gyűjtés eredménye és ebben izolátumaink fele két nagyobb burgonyatermő régiót képviselt: a Nógrád megyei Ludányhalásziból 20, a Veszprém megyei Zirc térségéből pedig (Borzavár, Porva, Olaszfalu, Tündérmajor) 39 izolátum származott. Az egyes izolátumok származási helye a 3. ábrán látható.

Új izolátumaink nagy feno- és genotípusos változatosságot mutattak. Mindkét gazdanövényen körülbelül fele-fele arányban találtunk A1-es és A2-es párosodási típust: burgonyán 35 A1-es és 40 A2-es párosodási típusú izolátum fordult elő, míg paradicsomon számuk rendre 26 és 17 volt. Tíz mintavételi helyen (Debrecen I, Ludányhalászi III, Borzavár II, Borzavár III, Porva, Tündérmajor, Röjtökmuzsaj, Heves, Ócsa II és Kótaj) egyetlen táblán belül is megfigyeltük mindkét párosodási típust. Metalaxilrezisztencia az izolátumok 31%-ában lépett fel, de az átmeneti érzékenység is hasonló arányban fordult elő (31%). A *Gpi* enzimnek valamennyi izolátumban csak a 100/100-as homozigóta genotípusa fordult elő. Ezzel ellentétben a *Pep* lokuszon háromféle allél össze-

sen négy kombinációját, a 100/100 (34%), a 96/100 (27%), a 96/96 (32%) és a 83/96 (7%) *Pep*-genotípusokat azonosítottuk. Izolátumaink nagy része egyedi RG57-mintázatot mutatott, a 118 izolátum között 75 különbözőt mutattunk ki. A 25 ismert RG57-lokusz közül izolátumainkban öt lokuszon nem tapasztaltunk polimorfizmust, teljesen egyöntetű képet mutattak: a 11., 12. és a 15. sáv egyik izolátumban sem jelent meg, ellenben a 13. és a 25. minden izolátumban jelen volt. Az RG57-mintázatok közül a leggyakoribb a XXVII-es volt, de ez is mindössze kilenc izolátumnál fordult elő (3. táblázat). A *Ph. infestans* populációinak jellemzésére általánosan használt, ún. multilokuszos genotípusok (a párosodási típus, izozim-genotípusok és az RG57-mintázatok kombinációja) tekintetében még nagyobb a változékonyság: a leggyakoribbat is csak hat alkalommal azonosítottuk.

3. ábra: A 2001–2002-ben gyűjtött *Phytophthora infestans*-izolátumok gyűjtési helye és a begyűjtött izolátumok száma.

A *Ph. infestans*-izolátumok számának megoszlását gazdanövényenként a vizsgált tulajdonságok tekintetében a 4. táblázat összegzi, az 5. táblázat pedig a tulajdonságok párosodási típus szerinti megoszlását tartalmazza. A *Pep*-genotípusok eloszlása jelentős eltéréseket mutatott. Burgonyán a *Pep* 100/100 dominált, míg a paradicsomon a 96/96 49%-os aránya a feltűnő. A *Pep* 83/96-os genotípus csak burgonyáról származó izolátumokban volt kimutatható. Annak ellenére, hogy burgonyáról sokkal több izolátum származott, az egyedi RG57 genotípusok mindkét gazdanövényen hasonló arányban jelentkeztek (43 illetve 28 különböző *fingerprint* a 75 illetve 43 izolátum között). Jelentős különbségek mutatkoztak a metalaxilérzékenységben, a paradicsomon az izolátumok túlnyomó többsége (74%) érzékeny volt, ez burgonyán már csak alig 19% (4. táblázat).

4. táblázat: A *Phytophthora infestans*-izolátumok egyes tulajdonságainak megoszlása gazdanövényük alapján.

Tulajdonság		Izolátumok burgonyáról	Izolátumok paradicsomról	Összesen
Izolátumok száma		75 (100%)	43 (100%)	118 (100%)
Párosodási típus:	**A1**	35 (47%)	26 (60%)	61 (52%)
	A2	40 (53%)	17 (40%)	57 (48%)
Gpi	**100/100**		118 (100%)	
Pep	**100/100**	28 (37%)	12 (28%)	40 (34%)
	96/100	22 (29%)	10 (23%)	32 (27%)
	96/96	17 (23%)	21 (49%)	38 (32%)
	83/96	8 (11%)	0	8 (7%)
RG57-genotípus		43/75	28/43	75/118[b]
Metalaxilérzékenység[a]:	**R**	27 (36%)	9 (23%)	36 (31%)
	I	34 (45%)	1 (3%)	35 (31%)
	É	14 (19%)	29 (74%)	43 (38%)

[a]Összesen 114 izolátumot teszteltünk. (R: rezisztens, I: átmeneti *(intermedier)* érzékenységű, É: érzékeny).
[b]További négy RG57 genotípus mindkét gazdanövényen előfordult.

5. táblázat: A *Phytophthora infestans*-izolátumok egyes tulajdonságainak megoszlása párosodási típus szerint.

Tulajdonság		A1	A2	Összesen
Izolátumok száma		61 (100%)	57 (100%)	118 (100%)
Gpi	**100/100**		118 (100%)	
Pep	**100/100**	29 (47%)	11 (19%)	40 (34%)
	96/100	12 (20%)	20 (35%)	32 (27%)
	96/96	12 (20%)	26 (46%)	38 (32%)
	83/96	8 (13%)	0	8 (7%)
RG57-genotípusok		42/61	28/57	75/118[b]
Metalaxilérzékenység[a]:	**R**	20 (33%)	16 (30%)	36 (31%)
	I	14 (23%)	21 (39%)	35 (31%)
	É	26 (44%)	17 (31%)	43 (38%)

[a]Összesen 114 izolátumot teszteltünk. (R: rezisztens, I: átmeneti *(intermedier)* érzékenységű, É: érzékeny).
[b]További öt RG57 genotípus mindkét párosodási típusban előfordult.

A párosodási típus tekintetében jelentős eltérések tapasztalhatók a *Pep*-genotípusok eloszlásában. Az A1-es izolátumokban a *Pep* 100/100-as genotípus aránya 47%, míg az A2-es izolátumok között a *Pep* 96/96 ért el hasonló arányt (46%). A *Pep* 83/96-os genotípus csak az A1 párosodási típusú izolátumok között volt kimutatható. Az A1 párosodási típusú *Ph. infestans*-izolátumok – bár számuk alig különbözött az A2-esekétől – kitűnnek RG57 genotípusaik nagy változatosságával, 42 egyedi genotípust lehetett azonosítani az A1-es izolátumok között, míg az A2 párosodási típusúak között ez csak 28 volt. A rezisztens, átmeneti érzékenységű és érzékeny izolátumok aránya ugyanakkor nem tér el a két párosodási típus között (5. táblázat).

Annak ellenére, hogy az izozimgenotípusok gyakoriságában jelentős különbségek mutatkoznak a *Ph. infestans* izolátumok egyes csoportjai között, az allélgyakoriságon alapuló géndiverzitás-elemzés nem tárt fel jelentős eltéréseket (6. táblázat). Összehasonlítva a gazdanövény illetve párosodási típus alapján elkülöníthető csoportokat, mind a géndifferenciációs együttható (G_{ST} = 0,020

illetve G_{ST} = 0,053), mind pedig a Nei-féle genetikai távolság kicsi volt (0,0151 illetve 0,0391).

6. táblázat: Géndiverzitás-elemzés és genetikai távolságok a *Phytophthora infestans* izolátumok egyes csoportjai között.

Összehasonlítás alapja	$\overline{H}_S$	$\overline{H}_T$	G_{ST}	Genetikai távolság
Gazdanövény szerint	0,257	0,263	0,020	0,0152
Párosodási típus szerint	0,252	0,266	0,053	0,0391

A *Ph. infestans* izolátumok egyes alcsoportjaiban a multilokuszos genotípusok alapján tapasztalható genotípusos változékonyság nem mutatott szignifikáns eltéréseket 95%-os valószínűség mellett. A Shannon-index értéke a burgonyáról származó izolátumok között 3,802, a paradicsomról származók között pedig 3,355 volt, míg a párosodási típusok szerint megkülönböztethető két csoportban ugyanez az érték 3,679, illetve 3,403 volt az A1-es és A2-es párosodási típusú izolátumokra.

Ha azokat az izolátumokat, amelyeknek azonos volt a multilokuszos genotípusuk, azaz klónvonalaknak tekinthetők, csak egyszer vesszük figyelembe a géndiverzitás-elemzésnél, hasonló eredményeket kapunk (7., 8. és 9. táblázat).

A 2002-ben gyűjtött izolátumok közül 20 Nógrád megye, 39 pedig Veszprém megye egy-egy kisebb burgonyatermő vidékéről származott. Az egyes *Pep* genotípusok aránya összességében és a Nógrád megyei mintaterületen nem különbözött jelentősen a teljes populációban tapasztalt arányoktól (lásd az 5. táblázatot), azaz a *Pep* 100/100, 96/100 és 96/96 arányától (1/3:1/3:1/3). Azonban a Veszprém megyei mintaterületen mind a nyolc A1-es párosodási típusú izolátum ugyanazt a *Pep* 100/100 genotípust képviselte. A nyolc A1-es

7. táblázat: A különböző multilokuszos genotípusba tartozó *Phytophthora infestans*-izolátumok tulajdonságainak eloszlása gazdanövényük alapján.

Tulajdonság		Izolátumok burgonyáról	Izolátumok paradicsomról	Összesen
Izolátumok száma		53 (100%)	33 (100%)	86 (100%)
Párosodási típus:	**A1**	30 (57%)	17 (51%)	47 (55%)
	A2	23 (43%)	16 (49%)	39 (45%)
Gpi	**100/100**		86 (100%)	
Pep	**100/100**	22 (42%)	7 (21%)	29 (34%)
	96/100	14 (26%)	10 (31%)	24 (28%)
	96/96	9 (17%)	16 (48%)	25 (29%)
	83/96	8 (15%)	0	8 (9%)
RG57-genotípus		43/53	28/43	75/118[b]
Metalaxilérzékenység[a]:	**R**	17 (34%)	8 (28%)	25 (32%)
	I	21 (42%)	1 (3%)	22 (28%)
	É	12 (24%)	20 (69%)	32 (40%)

[a]Összesen 79 izolátumot teszteltünk. Az azonos multilokuszos genotípusú, de eltérő metalaxilérzékenységű törzsek figyelmen kívül hagyva. (R: rezisztens, I: átmeneti *(intermedier)* érzékenységű, É: érzékeny).
[b]További négy RG57 genotípus mindkét gazdanövényen előfordult.

8. táblázat: A különböző multilokuszos genotípusba tartozó *Phytophthora infestans*-izolátumok tulajdonságainak elgoszlása párosodási típus szerint.

Tulajdonság		A1	A2	Összesen
Izolátumok száma		47 (100%)	39 (100%)	86 (100%)
Gpi	**100/100**		86 (100%)	
Pep	**100/100**	20 (43%)	9 (23%)	29 (34%)
	96/100	11 (23%)	13 (33%)	24 (28%)
	96/96	8 (17%)	17 (44%)	25 (29%)
	83/96	8 (17%)	0	8 (9%)
RG57-genotípus		42/47	28/39	75/86[b]
Metalaxilérzékenység[a]:	**R**	16 (35%)	9 (27%)	25 (32%)
	I	13 (28%)	9 (27%)	22 (28%)
	É	17 (37%)	15 (46%)	32 (40%)

[a]Összesen 79 izolátumot teszteltünk. Az azonos multilokuszos genotípusú, de eltérő metalaxilérzékenységű törzsek figyelmen kívül hagyva. (R: rezisztens, I: átmeneti *(intermedier)* érzékenységű, É: érzékeny).
[b]További öt RG57 genotípus mindkét párosodási típusban előfordult.

Veszprém megyei minta más szempontból is különleges, mert annak ellenére, hogy burgonyáról származnak, egyáltalán nem található közöttük metalaxil-rezisztens izolátum (10. táblázat).

9. táblázat: Géndiverzitás-elemzés és genetikai távolságok a különböző multilokuszos genotípusba tartozó *Phytophthora infestans*-izolátumok egyes csoportjai között.

Összehasonlítás alapja	$\overline{H}_S$	$\overline{H}_T$	G_{ST}	Genetikai távolság
Gazdanövény szerint	0,256	0,268	0,045	0,0338
Párosodási típus szerint	0,252	0,271	0,033	0,0254

10. táblázat: A Nógrád és Veszprém megyéből származó *Phytophthora infestans*-izolátumok jellemző tulajdonságai.

Tulajdonság		A1		A2		Összesen	
		Nógrád	Veszprém	Nógrád	Veszprém	Nógrád	Veszprém
***Pep*:100/100**		9 (47%)	8 (100%)	0	4 (13%)	9 (45%)	12 (31%)
96/100		3 (16%)	0	1 (100%)	12 (48%)	4 (20%)	12 (31%)
96/96		2 (11%)	0	0	15 (39%)	2 (10%)	15 (38%)
83/96		5 (26%)	0	0	0	5 (25%)	0
Mex[a]	**R**	11 (58%)	0	0	11 (36%)	11 (55%)	11 (28%)
	I	7 (37%)	6 (75%)	1 (100%)	18 (58%)	8 (40%)	24 (62%)
	É	1 (5%)	2 (25%)	0	2 (6%)	1 (5%)	4 (10%)
RG57		16	4	1	12	17	18[b]

[a]Metalaxilérzékenység. R: rezisztens, I: átmeneti *(intermedier)* érzékenységű, É: érzékeny.
[b]Két további RG57-genotípus mindkét párosodási típusban előfordul.

4. 2. Leromlásos tünetek égeren

Az enyves éger leromlása és pusztulása során tapasztalt jellegzetes tünetek, a gyökérnyaki régióból kiinduló és felfelé haladó kéregnekrózisok és a fe-

lületükön kialakuló fekete, nedvező foltosodás (kátrányfolt) a más fás növényeken *Ph. cambivora* által okozott tüneteket idézték. A kátrányfoltokat mutató fákon gyökérpusztulás lépett fel, és a törzs kambiumpusztulás miatti deformációja is tapasztalható volt. A szállítószövetek csökkent működése következtében előálló tápanyaghiány miatt az érintett fák koronája is megritkult (2. ábra).

A tüneteket mutató fák kéreg vagy gyökérszövetéből kitenyésztett kórokozó morfológiailag hasonló volt a heterotallikus *Ph. cambivorá*hoz, azonban azzal ellentétben homotallikus volt. A hansági mintaterületen a kórokozó valószínűleg az izolálást megelőzően évekkel jelen volt, mert a törzstorzulás és az újonnan fejlődő faszövetben talált évgyűrűk erre engednek következtetni. Ellenben Hévízen, a fiatal, 6–8 éves állományban bekövetkezett fertőzésnél törzstorzulást nem tapasztaltunk. Kétéves égercsemeték mesterséges fertőzésével (155b izolátum) a kórokozó patogenitása igazolódott.

4. 3. Az éger-*Phytophthora* morfológiai és élettani jellemzői

A magyarországi égerfitoftóra-izolátumok ivarszerveik alapján két jól megkülönböztethető csoportba tartoznak. A Hanságból származó három izolátum (155a, 155b és 155c) a P876-os (svéd típusú referencia-) izolátumra hasonlított, azaz optimális körülmények között sima felszínű oogóniumokat képezett, melyeknek átmérője 24 és 64 μm között volt. Az anterídiumok jobbára kétsejtűek voltak és amfigín módon kapcsolódtak az oogóniumhoz. Azonban 15 °C alatt az oogóniumok fala enyhén rücskös felszínű lett. A Hévízről származó izolátumok (Phx1/a, Phx4/1, Phx4/2, Phx6, Phx8 és Phx9) 23–54 μm átmérőjű, rücskös felszínű oogóniumokat képeztek, az anterídium amfigín típusú volt és a hansági izolátumoknál gyakrabban volt kétsejtű. Ezek a tulajdonságok megegyeztek a P772-es (standard típusú referencia-) izolátum és a *Ph. cambivora* hasonló tulajdonságaival (4. ábra).

Valamennyi izolátum sporangiumképzését csak talajkivonatban lehetett indukálni, egyik izolátum sem képezett sporangiumot sem sóoldatokban, sem különféle tápközegekben. A sporangiumok vékony, sima falúak voltak, a tartóikról nem váltak le. Ez a tulajdonságuk megegyezik a *Ph. cambivora* és a *Ph. fragariae* jellemzőivel. Az ivaros és ivartalan szaporítóképletek méreteit harminc mérés átlaga alapján a 11. táblázat foglalja össze.

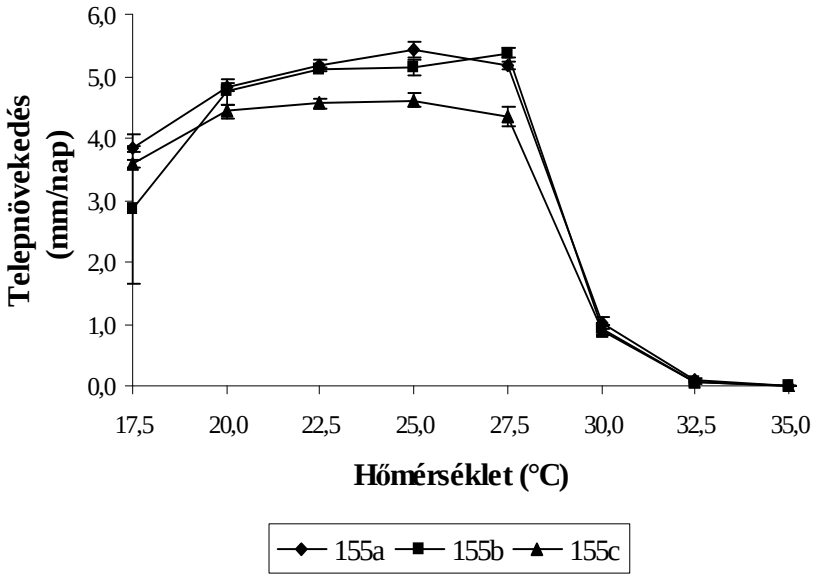
Az égerfitoftóra enyhén gyapjas, enyhén besüppedt telepeket fejlesztett sárgarépa-táptalajon éppúgy, mint V8-agaron vagy borsón, bár ez utóbbin a légmicéliumképződés valamivel gyorsabb volt. A hansági izolátumok légmicéliuma mindhárom táptalajon kissé erőteljesebb volt a hévízi izolátumokéinál. A miceliális növekedés sebessége V8- és borsótáptalajon gyorsabb volt, de az ivaros képletek képződésének a sárgarépa-táptalaj kedvezett.

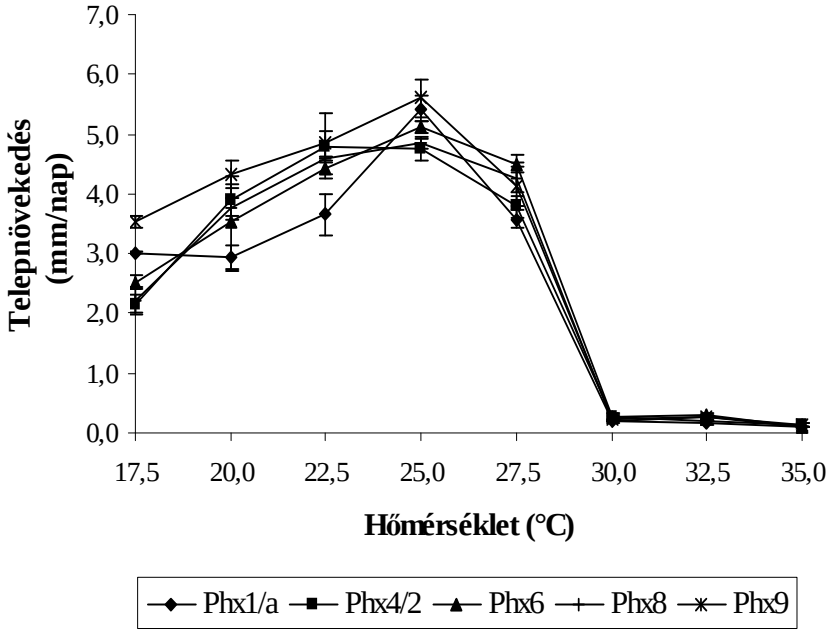
Mind a hansági, mind pedig a hévízi izolátumok növekedése 25 °C-on optimális (5. ábra), 30 °C felett pedig nem észlelhető telepnövekedés. A hévízi izolátumok azonban valamivel érzékenyebbek a 25 °C feletti hőmérsékletre, mert itt a növekedésük gyengébb, mint a hansági izolátumoké.

4. 4. Az éger-*Phytophthora* molekuláris jellemzői

4. 4. 1. Izozimelemzés

Mind a *Ph. cambivora* és a *Ph. fragariae*, mind pedig az égerfitoftóra izolátumaiban egyetlen, azonos elektroforetikus mobilitású izocitromsav-dehidrogenáz (Idh) izozim volt jelen. Viszont a leucil-tirozin-peptidáz, az almasav-dehidrogenáz (Mdh) és a glükóz-6-foszfát-izomeráz (Gpi) alkalmas volt a két morfológiailag is eltérő csoport szétválasztására. Egy-egy csoporton belül pedig valamennyi izolátum azonos mintázatot mutatott. A kapott gélmintázatok alapján az égerfitoftóra egyes izolátumainak feltételezett genotípusa minden vizsgált enzimnél meghatározható. Összehasonlító adatok híján egy-egy enzimrendszeren belül a különböző allélokat csak eltérő betűk jelölik (12 táblázat).





5. ábra: Az égerfitoftóra hazai izolátumainak napi átlagos sugárirányú telepnövekedése sárgarépaagaron, a hőmérséklet függvényében. Fent: hansági izolátumok, lent: hévízi izolátumok.

12. táblázat: Izozimelektroforézis alapján feltételezhető genotípusok az égerfitoftóra hazai izolátumaiban és a referenciaizolátumokban. P876: svéd variáns; P772: standard típus; P1010: *Ph. cambivora*; P823: *Ph. fragariae*.

Enzim neve	P876	Hanság	P772	Hévíz	P1010	P823
Izocitromsav-dehidrogenáz	AA	AA	AA	AA	AA	AA
Glükóz-6-fosz-fát-izomeráz	AA	AA	ABCC	ABCC	BB	CC
Almasav-dehidrogenáz	AA BB	AA BB	n. a.[a]	n. a.[a]	AA CC	AA AA
Leucil-tirozin-peptidáz	AA	AA	BC	BC	DD	EE

[a]A mitokondriumban és a sejtmagban kódolt lokuszok terméke a gélen nem választható szét.

A legérdekesebb eredményt a Gpi adta. A hévízi izolátumokban és a P772-es standard típusban öt sáv keletkezett, intenzitásuk a gélben 1:2:5:4:4 volt. Az öt sáv közül a középső azonos mobilitású volt a hansági, a P876-os svéd típus és a P1010-es *Ph. cambivora* egyetlen sávjával, míg a leggyorsabb sáv a *Ph. fragariae* egyetlen sávjával megegyező sebességgel mozgott.

A hévízi izolátumok *Mdh*-mintázata megegyezett a standard típusú referenciaizolátuméval, a hansági izolátumoké pedig a svéd típusú referenciaizolátuméval. Mindkét hibridtípus *Mdh*-mintázata eltért a *Ph. fragariae* (egyetlen sáv) és a *Ph. cambivora* mintázataitól. Azonban a mitokondriumban és a sejtmagban kódolt Mdh-t a *Ph. cambivora* mellett csak a hansági és a svéd típusú referenciaizolátumban lehetett a gélen elválasztani.

A leucil-tirozin-peptidáz enzim esetében a hévízi izolátumok és a standard típusú referenciaizolátum heterozigótának bizonyultak, és három lassan mozgó, gyengén szétválasztható sávot adtak. Ezzel szemben a *Ph. cambivora*, a *Ph. fragariae*, valamint a hansági izolátumok és a svéd típusú referencia-

égerfitoftóra homozigóták voltak, de eltérő mobilitású allélt tartalmaztak (6. ábra).

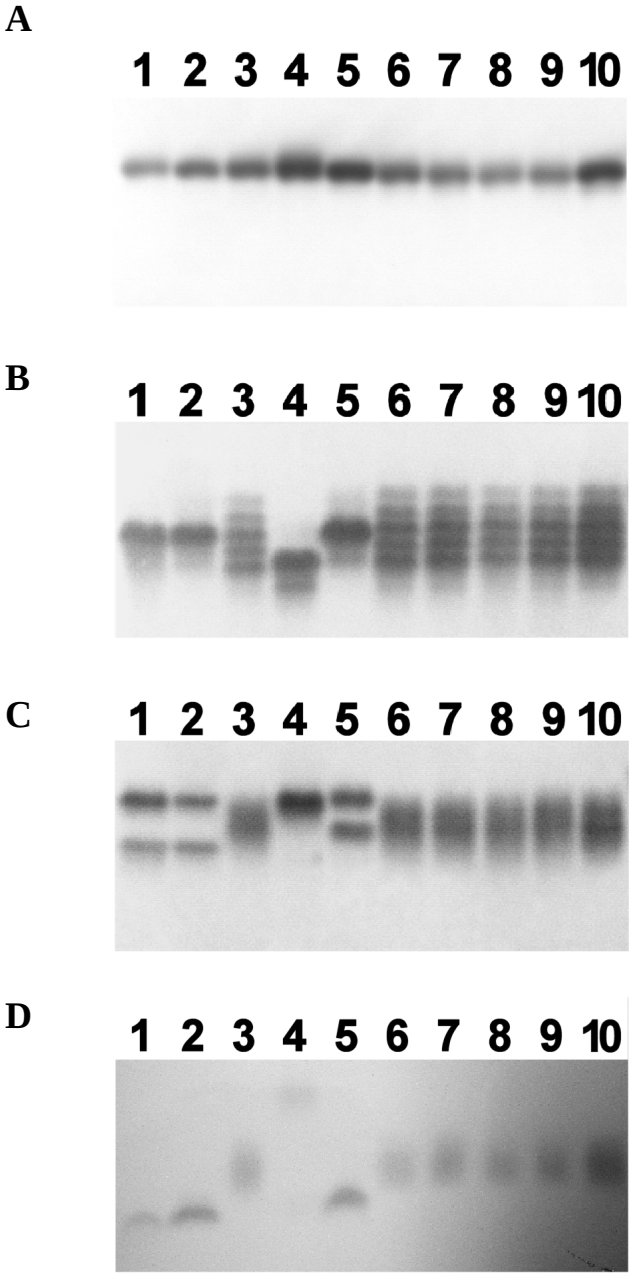
4. 4. 2. Az éger-*Phytophthora* ITS-régiója

Az univerzális ITS-1 és ITS-4 indítószekvenciákat felhasználva minden izolátumban a várt, körülbelül 900 bp hosszú termék keletkezett, mely az ITS1 és ITS2 régiót és az általuk közrefogott 5,8S rRNS génjét tartalmazta.

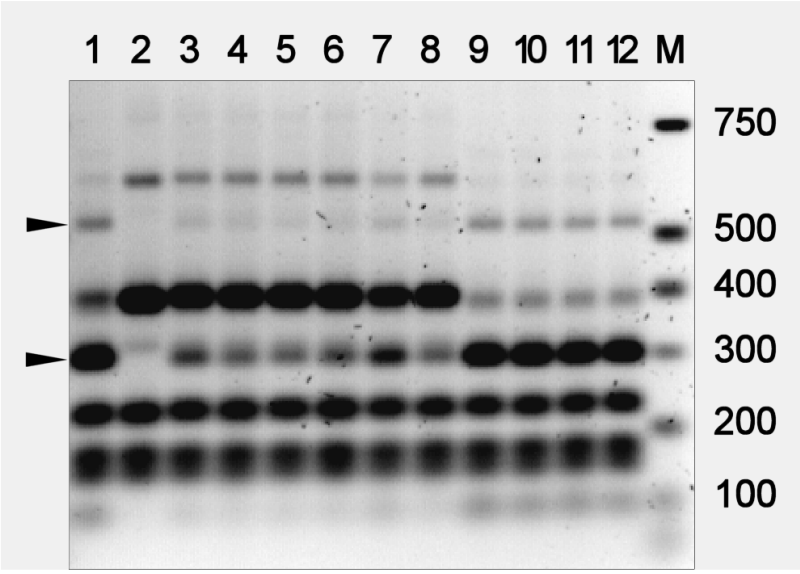
Az ITS-régió *Msp*I enzimmel történő emésztését követően a két hibridtípus között az emésztési termékek mérete és száma tekintetében nem volt különbség, jóllehet az egyes termékek mennyisége eltért a két típus között, ezért eltérő intenzitással festődtek meg a gélben. A hansági izolátumok emésztési mintázata megegyezett a P876-os referenciaizolátummal (svéd variáns), míg a hévízi izolátumok mintázata a P772-es referenciaizolátum (standard típus) mintázatával volt azonos.

A svéd típusú referenciaizolátumban és a hansági izolátumokban négy olyan DNS-fragmentum (100 bp, 300 bp, 390 bp és 510 bp hosszúságú) jelent meg, amelyek intenzitásukban is a *Ph. cambivorá*ban található sávokkal egyeztek meg. Valamennyi hibridben valamint a *Ph. cambivorá*ban és a *Ph. fragariae*ban is három emésztési termék (220 bp és két nehezen szétválasztható 150 ill. 160 bp körüli sáv) azonos intenzitással jelent meg. Mindemellett a hibridekben jelen volt két olyan DNS-szakasz – egyikük körülbelül 520 bp, másikuk 300 bp hosszú –, amely csak a *Ph. cambivorá*ban található meg, a *Ph. fragariae*ban nem (7. ábra). Eszerint mintázatban a svéd variáns jobban hasonlított a *Ph. cambivorá*ra, a standard típus pedig – jóllehet tartalmazott *Ph. cambivorá*ra jellemző sávokat is – a *Ph. fragariae*ra.

A *Hae*III restrikciós endonukleázos emésztést követően a svéd variánsokban ugyanolyan méretű DNS-szakaszok keletkeztek, mint a *Ph. cambivorá*ban. A standard típus mintázata ehhez hasonló volt, de emellett tartalmazott két olyan DNS-szakaszt is, amelyek a *Ph. fragariae*ra jellemzőek.



6. ábra: Az égerfitoftóra izozimjeinek elektroforetikus fenotípusai négy enzim alapján. A: izocitromsav-dehidrogenáz, B: glükóz-6-foszfát-izomeráz, C: almasav-dehidrogenáz, D: leucil-tirozin-peptidáz. Valamennyi gélen a sorrend: hansági izolátum: (1); svéd variáns, P876: (2); standard típus, P772: (3); *Ph. fragariae*, P823: (4); *Ph. cambivora*, P1010: (5); hévízi izolátumok (6–10). Minden gélen azonos a futás iránya: fentről lefelé.

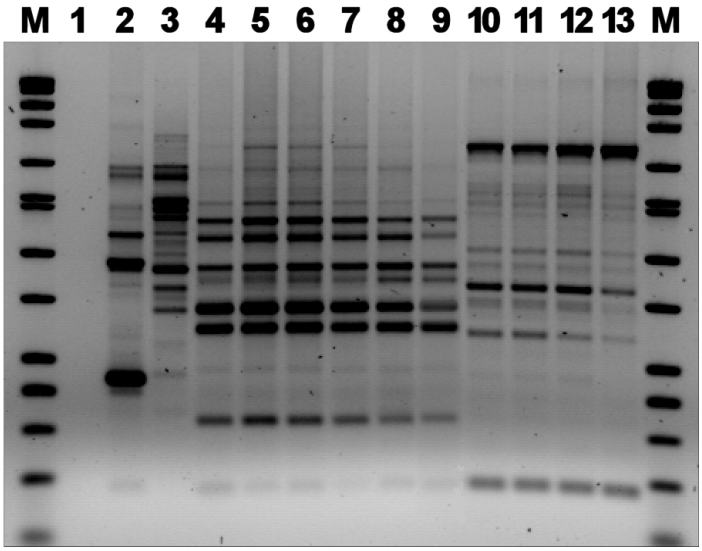


7. ábra: Az égerfitoftóra teljes ITS-régiójának *Msp*I restrikciós endonukleázzal hasított darabjai. Nyílhegy jelöli a *Ph. fragariae*ból hiányzó DNS-szakaszokat. *Ph. cambivora,* P1010: (1); *Ph. fragariae,* P823: (2); hévízi izolátumok: (3–7); standard típus, P772: (8); svéd variáns, P876: (9); hansági izolátumok: (10–12). M: molekulatömeg-marker.

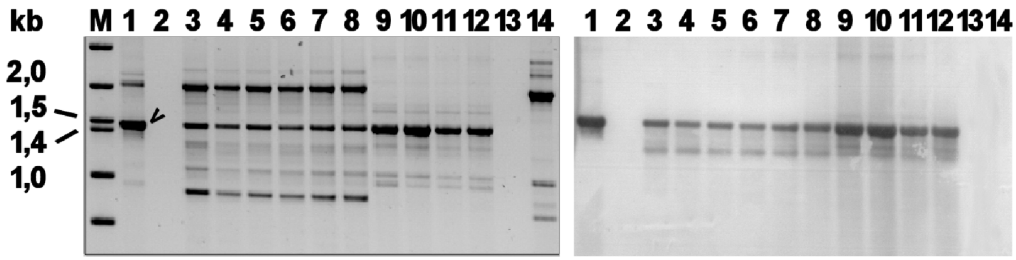
4. 4. 3. RAPD-elemzés

Az ITS és az izozimadatokhoz hasonlóan a RAPD-mintázatok többsége is jellegzetes különbséget mutatott az égerfitoftóra két variánsa között. Egy-egy csoporton belül azonban minden izolátum mintázata egységes volt (8. ábra). A legtöbb RAPD-PCR-termék specifikusan csak az egyik (ritkán mindkét) hibrid-típusban jelent meg. Néhány indítószekvenciával olyan termékek is keletkeztek, amelyek a hibridek mellett valamelyik szülőben is megjelentek. Ez a szülő szinte mindig a *Ph. cambivora* volt, ritkán keletkeztek olyan PCR-termékek (pl. az OPG-18 indítószekvenciával) amelyek csak a hibridekben és a *Ph. fragariae*ban jelentek meg, a *Ph. cambivorá*ban azonban nem.

Az OPG-02 jelű indítószekvencia segítségével a *Ph. cambivorá*ban keletkező mintegy 1500 bp hosszú DNS-fragmentumot, mely jelen volt valamennyi hibridben, de hiányzott a *Ph. fragariae*ből, DNS hibridizációs próbaként használtuk. A hibridekben keletkezett, a próbával azonos méretű termék homológnak bizonyult a *Ph. cambivorá*ban találhatóval (9. ábra).



8. ábra: Égerfitoftóra, *Ph. cambivora* és *Ph. fragariae* RAPD-PCR-termékei az OPW-04 indítószekvenciával. Sorrend: templát DNS nélküli kontroll: (1); *Ph. cambivora*, P1010: (2); *Ph. fragariae*, P823: (3); hévízi izolátumok: (4–8); standard típus, P772: (9); svéd variáns, P876: (10); hansági izolátumok: (11–13). M: molekulatömeg-marker, a gél futási iránya: fentről lefelé.



9. ábra: Égerfitoftóra, *Ph. cambivora* és *Ph. fragariae* RAPD-PCR termékei az OPG-02 indítószekvenciával (bal oldal), illetve ennek hibridizációs membránja (jobb oldal) a *Ph. cambivora* 1500 bp hosszú DNS-próbájával (nyílhegy) hibridizáltatva. A minták sorrendje: *Ph. cambivora*, P1010: (1); hévízi izolátumok: (3–7); standard típus, P772: (8); svéd variáns, P876: (9); hansági izolátumok: (10–12); *Ph. fragariae*, P823: (14). A 2. és 13. mintahely üres. M: molekulatömeg-marker.

4. 5. Új tudományos eredmények

A doktori munka része, illetve folytatása azoknak az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében végzett kutatásoknak, amelyek az intraspecifikus és az interspecifikus kölcsönhatások okozta populációs változásokra összpontosítanak a burgonya és paradicsomvészt kiváltó *Ph. infestans*on, illetve az égerpusztulásért felelős *Ph. alni* fajhibriden keresztül. A doktori munka során a következő új tudományos eredmények születtek:

- További bizonyítékokkal szolgáltunk arra vonatkozóan, hogy a magyarországi *Ph. infestans*-populációkban is végbement a teljes kicserélődés, új változatok terjedtek el és váltak egyeduralkodóvá. Ez a hazai *Ph. infestans*-populáció szerkezetében alig hasonlít a korábbi európai populációkra, annál sokkal nagyobb diverzitású.

- Két hazai élőhelyen azonosítottuk az Európa-szerte pusztító égervész hibrid kórokozójának (legújabban *Ph. alni* néven leírt) két (újabban alfajként jegyzett) típusát: a standard típust (*Ph. alni* ssp. *alni*) és az úgynevezett svéd variánst (*Ph. alni* ssp. *uniformis*).
- Izozim- és DNS-markereket azonosítottunk a *Ph. alni* e két leggyakoribb típusának (alfajának) molekuláris jellemzésére és megállapítottuk, hogy a *Ph. alni* két típusa (alfaja) mind izozim-, mind RAPD-markerek alapján elkülöníthető, az egyes típusok ellenben genetikailag homogének.
- Kimutattuk a *Ph. alni* fajhibridben az egyik szülő, a *Ph. cambivora* DNS-ének jelenlétét DNS–DNS hibridizációval.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A fitoftórás betegségek komoly fenyegetést jelentenek a növénytermesztésre. Szerte a világon jelentős gazdasági károkat okoznak nem csak az élelmiszertermelésben, hanem a dísznövénykertészetekben is (ERWIN és RIBEIRO 1996). Még a nemzetség legismertebb és legrégebben tanulmányozott képviselője, a *Ph. infestans* is képes volt új kihívás elé állítani a szakembereket. Mi több, az utóbbi időben feltűntek rokon fajok genetikai kölcsönhatásaként kialakult természetes fajhibridek is. Emellett egy sor új faj azonosítására is sor került, valamint a már ismert fajok gazdanövényköre is újabbakkal bővült.

A doktori munka ezeknek az új jelenségeknek a tárházából a *Ph. infestans* populációinak szerkezetében hazánkban éppen napjainkban végbemenő átalakulásra, illetve az intraspecifikus kölcsönhatásban kialakult új fajhibrid, az éger-*Phytophthora* genetikai elemzésére összpontosít.

5. 1. A magyarországi *Phytophthora infestans*-populációk általános jellemzői

Bár a fitoftórakutatásnak a nemzetközinél valamivel rövidebb a hazai múltja, több figyelemreméltó eredménnyel gazdagította ismereteinket e kórokozóról (ÉRSEK 2001). Az A2 párosodási típus 1996-ban történt hazai felfedezését (BAKONYI és ÉRSEK 1997a és 1997b) követő szélesebb körű gyűjtőmunka során BAKONYI et al. (1998 és 2002b) és NAGY et al. (2003a) burgonyán mintegy fele-fele arányban találtak A1 és A2 párosodási típust, paradicsomon azonban az A2 dominált. Az izolátumok mintegy harmada rezisztens volt a metalaxillal szemben, ráadásul a rezisztens izolátumok többsége burgonyáról származott. SOM et al. (2004) mintegy száz izolátum mitokondriális haplotípus elemzését

végezték el és a négy lehetséges haplotípus közül kettőt (Ia 30% és IIa 70%) azonosítottak.

A 2001–2002-ben végzett gyűjtés során a *Ph. infestans* számos, eddig ismeretlen genotípusát azonosítottuk. Genotípusuk alapján egyik izolátum sem tartozott a *Ph. infestans* régi populációjához, amely A1-es párosodási típusú, valamint döntően metalaxilérzékeny és a *Gpi*-lokuszon 86/100, a *Pep*-lokuszon 92/100 genotípusú törzsekből állt, korlátozott számú RG57-mintázattal (FORBES et al. 1998). Ezzel ellentétben a magyarországi *Ph. infestans*-populációból teljes mértékben hiányzik a *Pep* 92 és a *Gpi* 86-os allél, az A2 párosodási típus aránya pedig jelentős (48% illetve 45%, 4. és 7. táblázat). Hasonlóan nagy a metalaxil-rezisztens izolátumok aránya (32%). Ezek a tulajdonságok mind azokat az új populációkat jellemzik, amelyek a nyolcvanas évek előtt ismeretlenek voltak. Így a hazánkban tapasztalt folyamatok jól illeszkednek a máshol tapasztaltakhoz, amely szerint a kórokozó populációinak világszerte jelentős, a legtöbb országban teljes kicserélődése ment végbe (FRY et al. 1992, GOODWIN 1997). Az értekezésben nem részletezett mitokondriális haplotípusok elemzése szintén alátámasztja, hogy Magyarországról a régi populáció teljesen eltűnt. A négy ismert mitokondriális haplotípus közül a hazánkban megtalált kettő (Ia és IIa) csak az új *Ph. infestans*-populációkat jellemzi (SOM et al. 2004).

Izozim-adatok önmagukban is jelzik a hazai *Ph. infestans*-populációk egyediségét. A 100/100-as *Gpi* genotípus nálunk egyeduralkodó, ami hasonló az Észak-Írországban megfigyelthez (CARLISLE et al. 2001). Ezzel szemben máshol a *Gpi* 100/100 mellett a *Gpi* 90/100 is megtalálható (LEBRETON és ANDRIVON 1998, BAKONYI et al. 2002a). A *Pep* 96-os allél nagy gyakorisága egyetlen európai populációra sem jellemző. A *Pep* 83/96 pedig, amely egyelőre csak a burgonyához és az A1-es párosodási típushoz köthető, először Magyarországon vált ismertté (BAKONYI et al. 1998 és 2002b) és ezen kívül csak Belgiumban jelezték előfordulását (BAKONYI et al. 2002a).

A multilokuszos genotípusok nagy száma szintén fontos sajátsága a *Ph. infestans* hazai populációinak. Bár nagy változékonyságú populációk máshol is megfigyelhetők, így például Lengyelországban (SUJKOWSKI et al. 1994) vagy az észak-európai államokban (BRURBERG et al. 1999), az országonként végzett populációelemzésekben általában ki lehetett mutatni néhány olyan genotípust, amely domináns az adott régióban, bármekkora változatosság is tárható fel egyébként a terület kórokozó populációiban. Így van ez még Hollandiában is, ahol több mint 1000 izolátum között 170 különböző *fingerprint*et tártak fel, de ezek közül kettő is több mint 15%-os arányban fordult elő (ZWANKHUIZEN et al. 2000) és több éven keresztül visszatérően megfigyelhetők voltak, bár arányuk évről évre jelentősen ingadozott. Magyarországon – ellentétben az előbbi területekkel – nincs egyetlen dominánsnak tekinthető genotípus sem.

A nagy genetikai változatosságot és a hazai populációk egyediségét a mikroszatellit vizsgálatok eredményei is megerősítik. Nemzetközi együttműködés során lehetőség nyílt arra, hogy újonnan meghatározott mikroszatellit-lokuszok közül négyet (Pi02, Pi56, Pi63 és Pi70; A. LEES és D. COOKE személyes közlése) vizsgáljunk meg néhány izolátumban. Az izolátumokat úgy válogattuk gazdanövény, párosodási típus és földrajzi eredet szerint, hogy a nagyon korlátozott mintaméretben is reprezentálják a magyar populációkat. A feldolgozott 10 izolátumban a négy lokuszon négy új, eddig máshonnan sem ismert allél bukkant fel, szemben az ezzel egyidőben feldolgozott lengyel, francia vagy akár ír mintákkal, amelyekben legfeljebb 1 új allél jelentkezett (nem közölt adatok).

A párosodási típus, a *Pep* izozimek és az RG57-mintázatok alapján a kórokozó hazai populációi rendkívül változatosak. Ezt mutatja, hogy a számos megfigyelt RG57-mintázat közül egy sem jelent meg számottevő gyakorisággal. Ilyen mértékű változatosságra eddig Magyarországon kívül csak Közép-Mexikóban volt példa (GOODWIN et al. 1992b), ahol szinte minden izolátumnak

más és más genotípusa volt. A nagy változatosságért felelős ivaros rekombinációt pedig elősegíti, hogy mindkét párosodási típus jelentős arányban fordul elő a populációban. Mivel tíz alkalommal egy mintavételi területen belül is ki lehetett mutatni mindkét párosodási típus jelenlétét, nagy valószínűséggel végbe is megy ivaros rekombináció, annak ellenére, hogy oospórákat közvetlenül nem észleltünk. A tapasztalt számos eltérő multilokuszos genotípusnak megfelelően a *Ph. infestans* izolátumok minden gazda és párosodási típus szerint elkülönített csoportjában jelentős a változatosság. Az ennek mérésére alkalmazott egyik legrégebbi mérőszám, a Shannon index ezért nem mutatott szignifikáns eltérést a populáció egyes alcsoportjai között. Ez azonban csak azt jelzi, hogy az ivaros rekombináció mindegyik részpopuláción belül azonos mértékben játszik szerepet a változatosság fenntartásában. Annak megbecslése azonban, hogy a rekombináció pontosan milyen mértékű, egyetlen mintavétel alapján nem lehetséges.

A Nei-féle géndiverzitás-elemzés megerősítette az RG57-adatok nagy változatossága alapján feltételezett jelentős mértékű rekombinációt. Mivel a teljes populációban tapasztalt nagy diverzitás az egyes csoportokon belül megjelenő változatosságnak a következménye (kis G_{ST} értékek), közöttük azonban nem mutatható ki jelentős különbség. Azaz, a teljes genetikai változatosságnak mindössze 5 illetve 2%-a vezethető vissza az egyes csoportok közötti különbségekre (6. táblázat). Annak eldöntése azonban, hogy ez szignifikáns eltérés-e nehézkes, mivel a *Ph. infestans* nem csak ivarosan, hanem ivartalanul is szaporodik, és ennek arányát nehéz meghatározni. Ezért célszerű az elemzésből kizárni az azonos multilokuszos genotípust mutató egyedeket azzal a feltevéssel, hogy ezek egyetlen ivartalanul szaporodó telep leszármazottai, és így az egyik elemzést torzító tényező kiiktatható. Elvégezve ezt az egyszerűsítést, hasonló eredményt kapunk, azaz a teljes diverzitásnak csak 2 és 4%-a köszönhető a részpopulációk közötti különbségnek (9. táblázat).

Az elemzés azonban nehezen általánosítható, mert bár a kis mintaszám nem rontja az eredmények értelmezhetőségét (NEI 1978), de ehhez sokkal több lokusz adatait kellett volna feldolgozni. Az RG57 adatok azonban nem használhatók fel egy diploid populáció vizsgálatára, mert nem adnak információt az egyed homozigóta illetve heterozigóta állapotáról. Jól alkalmazhatók a klonálisan szaporodó populációban az egyes klónvonalak azonosítására és általánosságban még mindig használhatók a populációk változatosságának jellemzésére. Így populációgenetikai elemzésre csak az izozimallélok használhatók fel. Más markereket (például mikroszatellit) is bevonva az elemzésbe, több részlet tárható fel a populációk szerkezetéről.

5. 2. A *Phytophthora infestans* változékonyságát befolyásoló tényezők

Egy populáció genetikai összetételét számos tényező befolyásolja egyidejűleg, ezért ezeknek a hatásoknak az elkülönítése egyetlen mintavétel alapján nem lehetséges. Egy ivartalanul szaporodó populációban a rendszeres rekombináció nélkül a genom egyes lokuszai gyakorlatilag kapcsoltnak tekinthetők, ezért az alléleloszlás nem lesz véletlenszerű. Az eltérés mértéke *(linkage disequilibrium)* információt szolgáltathat arról, hogy a megfigyelt populáció milyen messze van az ideális véletlenszerűen párosodó állapottól, ezt azonban számos tényező együttes hatásának eredménye.

5. 2. 1. Ivaros és ivartalan szaporodás

A kapcsoltsági egyensúlyt befolyásoló tényezők közül a legfontosabb, hogy a *Ph. infestans* életciklusában az ivaros szaporodás mellett az ivartalan szaporodás is jelentős szerepet játszik, amely főleg az egy vegetációs időszakon belüli gyors szétterjedést segíti.

Még nem tisztázott teljes mértékben a petespórák szerepe a *Ph. infestans* populációinak évenkénti megújulásában és változékonyságának kialakításában, bár a burgonyavész korai kitöréseiben minden bizonnyal ezek játsszák a leg-

fontosabb szerepet. Petespórák képződése azonban még mesterséges fertőzést követően sem mindig megy végbe. LEVIN et al. (2001) szabadföldi inokulációt követően csak korlátozott mértékű petespóraképződést figyeltek meg. Ennek oka lehet többek között az, hogy a növény nedvességtartalma vagy a levelek kora nem volt megfelelő, mert vízfelszínen lebegő leveleken jóval gazdagabb petespóraképződés figyelhető meg, mint nedveskamrában (COHEN et al. 2000). Szintén a növényi szövetek víztartalmával függhet össze, hogy a gumókban is korlátozott a petespóraképzés, ennek ellenére a kórokozó megfelelő korú, vagy fajú/fajtájú gazdanövényen nehézség nélkül áttelelhet. Viszont az egyelőre nem ismert pontosan, hogy természetes körülmények között mennyi ideig életképesek ezek a képletek. Mexikóban *Solanum demissum*- és *S. tuberosum*-fajok levelein nagy számban keletkeznek oospórák és a két gazdanövényen létrejött *Ph. infestans*-populáció nem izolált, kölcsönösen képes fertőzni a másik gazdanövényt (GRÜNWALD et al. 2000, FLIER et al. 2001). Az Európában mezőgazdasági területeken gyomként előforduló *Solanum*-fajok szintén szolgálhatnak inokulumforrásként (COOKE et al. 2002). Ha a kórokozó döntően az áttelelő oospórákból újul meg a következő vegetációs időszakban, az ivaros rekombináció során keletkezett új kórokozónemzedék gyökeresen eltérhet a megelőző évitől.

5. 2. 2. Migráció

Növényi kórokozó lévén a *Ph. infestans* könnyedén áthidalhat nagyobb távolságokat is a gazdanövény szöveteiben, védett körülmények között. Ez azonban természetes úton ritkán következik be. Ennél sokkal nagyobb jelentőségű a sporangiumok terjedése, ennek kevésbé vannak fizikai korlátai. A sporangiumok néhány órán át még nagyon alacsony (40%-os) páratartalom mellett is életképesek maradnak (MINOGUE és FRY 1981). Mivel azonban a sporangiumok a tartósan száraz körülményeket nehezen viselik, sok száz kilométerre a szél útján nem juthatnak el. Ennek következményeként viszont egy

élőhelyen egy vagy legfeljebb néhány genotípus által dominált populáció alakul ki, a kezdetben megtelepedő néhány sporangium leszármazottjaként. Mivel a Veszprém, illetve Nógrád megyéből származó, egy vegetációs időszakban és korlátozott termőterületről gyűjtött mintákban sem volt domináns genotípus (3. és 10. táblázat), a nagyobb távolságról érkező „bevándorló" sporangiumok mellett más tényező is szerepet játszik a gazdanövények kolonizációjában.

A *Ph. infestans* migrációjában azonban a természetes folyamatok mellett egyéb tényezők is fontos szerepet játszanak. A kórokozó a bevándorló sporangiumok által megtehető legnagyobb távolságot is könnyedén meghaladhatja, ha „kihasználja" a mezőgazdasági termékek szállításának megnövekedett lehetőségeit. Emberi közvetítéssel óceánokon is könnyedén átjuthat, elég csak a XIX. századi Európában való felbukkanására gondolni, amikor egy frissen érkezett burgonya-szállítmánnyal potyautasként a kórokozó is megjelent. Ráadásul ez a múltbéli rossz tapasztalat sem volt elég az újabb súlyos hiba elkerülésére, mert ugyanez az eset ismétlődött meg a XX. században is. 1976-ban Európába érkezett körülbelül 25 000 tonna mexikói burgonya, egy része egyenesen az országnak arról a részéről, ahol az A1 és A2 párosodási típus szinte egyenlő arányban található meg (NIEDERHAUSER 1991). A migrációegyik különleges esete, amikor a vetőgumók importja révén kerül be a kórokozó egy addig még nem fertőzött területre. Ez esett meg a múlt században, amikor az akkoriban csak Európában termesztett vetőgumóval a burgonyavész más kontinenseket is meghódított (GOODWIN 1997). Ugyanígy ember által közvetített migrációnak tulajdonítható, hogy alig néhány évvel a nevezetes mexikói importburgonya beérkezése után megjelent a második párosodási típus (A2) is (HOHL és ISELIN 1984), komoly változásokat hozva a *Ph. infestans* életciklusába.

5. 2. 3. Genetikai sodródás

Növényi kórokozók populációi azonban általában nagyon messze vannak attól az ideális állapottól, amikor a rekombináció véletlenszerűen kiválasztott

egyedek között bekövetkező eseménynek tekinthető. Ugyanis az összes növényvédelmi eljárás célja, hogy a kórokozók populációját minél alacsonyabb szinten tartsa, ennek megfelelően a kórokozó egyedszáma, vagy inkább telepszáma évről évre jelentős mértékben ingadozik. Ez pedig alapvetően befolyásolja a szaporodásban részt vevő egyedek számát is. Emellett a növényvédő szerek szelektíven gátolhatják a kórokozó bizonyos populációinak növekedését és így terjedését is, míg másokét nem befolyásolják.

Ha a kórokozó életében az ivartalan szaporodás domináns szerepet játszana, akkor egy élőhelyen és egy vegetációs időszakban döntően genetikailag homogén populációnak kellene kialakulnia. Ha a hazai *Ph. infestans*-populációk a szomszédos burgonyatermő területekkel szoros kapcsolatban állnának a két élőhely között fellépő migráció miatt, akkor a Magyarországon oly gyakori *Pep* 96-os allélnak, vagy – ha a kórokozó döntően ivartalanul szaporodna – a nálunk megfigyelt RG57-genotípusoknak is meg kellene jelenniük más területeken. Így tehát, figyelembe véve a mintavétel és az analízis korlátait is, megállapítható, hogy a hazánkban a *Ph. infestans* populációiban tapasztalt nagy genetikai változatosság döntően helyi folyamatok (ivaros és ivartalan kölcsönhatás) eredményeként alakult ki.

5. 3. Az éger-*Phytophthora* kártétele

Napjainkban egy új fitoftóra jelent meg Észak- és Nyugat-Európában a folyómenti égerligetekben. Magyarországon az első külföldi jelzések után (BRASIER et al. 1995, GIBBS 1995) néhány évvel találták meg a betegséget (VARGA 2000), majd magát a kórokozót (SZABÓ et al. 2000), de a korábbi tapasztalatokkal ellentétben nem folyóparton, hanem síksági lápokban. Később azonban KOLTAY (2003) hegyvidéki patakokat kísérő égeresekben is éger-*Phytophthora* fertőzés tüneteit mutató egyedekről számolt be, ezekből a kórokozót több esetben ki is tudtuk mutatni (nem közölt adatok).

BRASIER et al. (1999) szerint ez a kórokozó egy természetben létrejött fajhibrid, amely feltehetően a *Ph. cambivora* és a *Ph. fragariae* vagy ahhoz hasonló faj közötti genetikai kölcsönhatás eredményeként alakult ki. A legújabban *Ph. alni* fajkomplexumként jelzett fajhibridnek a legelterjedtebb és egyben a legagresszívabb (BRASIER és KIRK 2001), majdnem tetraploid standard típusa (legújabban *Ph. alni* subsp. *alni*) mellett számos variánsát (svéd [*Ph. alni* subsp. *uniformis*], holland, német és brit [*Ph. alni* subsp. *multiformis*]) is megkülönböztetik. Sejttani vizsgálatok szerint (BRASIER et al. 1999) az égerfitoftóra valamennyi alfaja a *Ph. fragariae*ra és a *Ph. cambivorá*ra jellemző n=5–6 kromoszómaszámhoz képest 18–22 kromoszómát tartalmaz, tehát közel van a tetraploid állapothoz. A tetraploid állapot nem akadályozza meg a meiózis szabályos lefolyását, mert így minden kromoszómának megvan a homológ párja és ezért tetraploid állapotban még az interspecifikus hibridek is könnyen stabilizálódhatnak genetikailag. Úgy tűnik azonban, hogy ez a folyamat az éger-*Phytophthorá*ban nem ment végbe maradéktalanul. Ez a tény megmagyarázhatja, hogy az éger-*Phytophthora* tetrazólium-bromid festéssel (JIANG és ERWIN 1990) életképesnek látszó oospórái miért csíráznak gyengén *in vitro* körülmények között (DELCÁN és BRASIER 2001).

5. 4. Hazai égeresekben is feltűnt az éger-*Phytophthora*

A Magyarországon izolált kórokozó által okozott tünetek hasonlítottak a korábban leírtakra (GIBBS 1995), és a kórokozó már az első vizsgálatok szerint is égerfitoftórának mutatkozott. Sporangiumainak és ivarszerveinek szerkezete alapján számos tulajdonságban hasonlított a *Ph. cambivorá*ra, de a homotallikusan fejlődő oogóniumok egyértelműen elkülönítik attól. A Hévízről származó izolátumok rücskös falú oogóniumokat képeztek éppen úgy, mint a standard típus, de azzal ellentétben a telep enyhén bolyhos volt, nem úgy, mint a P772-es izolátum (NAGY et al. 2002). A Hanságból származó izolátumok simafelszínű

oogóniumokat képeztek, hasonlóan a svéd variánshoz, de a telepük nem volt annyira bolyhos, mint a P876-os izolátumé (NAGY et al. 2000, SZABÓ et al. 2000). A hazai izolátumok morfológiai tulajdonságait összevetve a referencia-izolátumokkal ellentmondó eredményekre jutnánk, ezért fontos, hogy DNS-alapú adatok is alátámasszák a diagnózist.

Hasonlóan a morfológiai vizsgálatokhoz, izolátumainkat a telepnövekedés számára optimális és/vagy maximális hőmérséklet alapján sem lehet egyértelműen elkülöníteni, bár kismértékű eltérés tapasztalható a két hibridtípus között. Hőmérsékletigényük alapján a fitoftórákat három csoportba sorolják (ERWIN és RIBEIRO 1996). Az egyes fajcsoportok jellemző tulajdonsága a telepnövekedés maximális hőmérséklete, de az éger-*Phytophthora* és a *Ph. cambivora* ugyanabba a csoportba tartozik. Irodalmi adatok szerint a *Ph. cambivora* maximális növekedési hőmérséklete 34 °C (BRASIER et al. 1999), míg a *Ph. fragariae* var. *rubi*ra jellemző érték 25-28 °C (WILCOX et al. 1993). Ráadásul a *Ph. cambivora* optimális növekedési hőmérséklete is magasabb, 27 °C (BRASIER et al. 1999) - más források szerint csak 24 °C (ERWIN és RIBEIRO 1996) - azonban a *Ph. fragariae* var. *rubi* számára legkedvezőbb hőmérséklet jóval alacsonyabb, mindössze 19-22 °C.

5. 5. Az éger-*Phytophthora* variánsai elkülöníthetők izozim- és DNS-markerekkel

Egy szervezet hibridtermészetének bizonyítása molekuláris módszerekkel lehetséges. Korábban izozimelemzést használtak, amelyet fajok elkülönítésére is alkalmasnak találtak (OUDEMANS és COFFEY 1991a és 1991b, CHEN et al. 1992, LÁDAY et al. 2000).

MAN IN 'T VELD et al. (1998) a *Ph. cactorum* és a *Ph. nicotianae* interspecifikus hibridjében megfigyelték, hogy a két szülőfajra jellemző *Mdh*-mintázatok rekombinálódnak. Azaz a két homozigóta szülőfaj eltérő mobilitású homodimer *Mdh*-enzimei mellett a hibridekben a heterozigótákra jellemző

mintázat jelent meg, amely a szülői allélok kombinációjaként a megfigyelhető két homodimer enzim között egy heterodimer izozim megjelenését is jelentette.

Az égerfitoftóra esetében a vizsgált izozimek közül három is alkalmas a két hazánkban előforduló típus elkülönítésére, de egyetlen enzim esetében sem találtuk egyértelmű jelét, hogy a szülői allélok a fentiekhez hasonló módon rekombinálódtak volna a hibridekben. Az égerfitoftórák egyes típusainak elkülönítésére legjobban felhasználható enzim a *Gpi* volt. A standard típusban meg lehetett figyelni mind a *Ph. cambivorá*ra, mind a *Ph. fragariae*ra jellemző enzimsávokat, illetve az ezek kombinációjaként is értelmezhető köztes típust. További szülői izolátumok vizsgálatával pedig az is eldönthető lenne, hogy ez interspecifikus rekombináció eredménye-e (MAN IN 'T VELD et al. 1998). Az említett három sáv mellett azonban még további két sáv is megjelent. Az öt sáv intenzitásának eloszlása megfelel egy olyan négyallélos rendszernek, ahol a négy allélból kettő azonos. BRASIER et al. (1999) sejttani vizsgálatok alapján is tetraploid közelinek (4n+2) találták az éger-*Phytophthora* standard típusát, a *Gpi*-adatok ezzel egybevágnak. Mivel a fitoftórák diploid szervezetek, a számfeletti *Gpi*-sávok fajok közötti genetikai kölcsönhatásból származhatnak.

Az ITS-régió restrikciós endonukleázokkal hasított termékeinek összesített hossza nagyobbnak bizonyult, mint a PCR-termék eredeti 900 bp körüli mérete. Mivel a *Ph. cambivora* és a *Ph. fragariae* ITS régiójának hossza azonos (COOKE és DUNCAN 1997), gélelektroforézissel nem lehet kimutatni, ha a PCR-reakció a hibrid fitoftórából esetleg egynél több (csak szekvenciájában különböző) DNS-molekulát szaporít fel. Az emésztési képek azonban egyértelműen arra utalnak, hogy az ITS-régióban egynél több, azonos hosszúságú szekvencia van jelen. BRASIER et al. (1999) hasonló eredményt kaptak, illetve a *Ph. nicotianae* × *Ph. cactorum* hibridjében is mind a két ITS-szekvencia jelen volt (BONANTS et al. 2000). Az égerfitoftóra mindkét hazai típusában azonos számú és méretű emésztett ITS-termék található, de a standard típusban és a svéd vari-

ánsban az egyes DNS-szakaszok eltérő intenzitással jelentek meg, azaz a különböző égerfitoftóra típusokban az eltérő ITS-szekvenciák aránya nem egyforma.

A RAPD-eredmények alapján több indítószekvencia esetén is keletkeztek a hibridekben a feltételezett szülőfajokkal méretükben azonos termékek (8. és 9. ábra). MAN IN 'T VELD et al. (1998) hasonló jelenséget figyeltek meg a kankalin hidropóniás tenyészetéből izolált, *Ph. nicotianae* és *Ph. cactorum* alkotta hibrideknél. Az általuk vizsgált szülőfajok összes izolátuma hasonló RAPD-mintázatot mutatott: a hibridekben mindkét szülőfajéval azonos hosszúságú DNS-szakaszokat mutattak ki, és Southern-hibridizációval ezek homológiáját is bizonyították.

Brasier et al. (1995, 1999) morfológiai, ITS-szekvencia- és AFLP- adatai alapján az égerfitoftórák egy-egy típuson (alfajon) belül genetikailag meglehetősen homogének. Saját morfológiai vizsgálataink alapján azonban az égerfitoftóra egyes alfajait nem lehet teljes biztonsággal meghatározni. Viszont a morfológiai és élettani vizsgálatokkal ellentétben valamennyi molekuláris biológiai adat (izozimek, RAPD, ITS-RFLP) megerősítette, hogy az égerfitoftóra hazai izolátumai két jól elkülöníthető csoportba tartoznak. Ugyanezt támasztják alá a mitokondriális DNS-RFLP eredmények is (NAGY et al. 2003b). A hansági izolátumok valamennyien a svéd variánsra, míg a hévízi izolátumok a standard típusra hasonlítanak.

5. 6. Szülői DNS jelenléte a hibridben

BONANTS et al. (2000) a *Ph. cactorum*ra és a *Ph. nicotianae*ra specifikus AFLP-termékeket sikeresen hibridizáltattak a két faj alkotta hibrid-*Phytophthora Eco*RI-gyel emésztett összgenomi DNS-éhez. Ugyanezeknél a hibrideknél MAN IN 'T VELD et al. (1998) RAPD-PCR-termékek homológiáját mutatták ki. Mesterségesen létrehozott hibridekben ÉRSEK et al. (1995) mutattak ki szülői

eredetű DNS-t. Hasonlóan az előbbi esetekhez, az éger-*Phytophthorá*nál is sikerült szekvenciahomológiát kimutatni a hibridek és a feltételezett szülőfajok között. Az éger-*Phytophthorá*ban az OPG-02 jelű indítószekvenciával egy olyan 1500 bp hosszú RAPD-termék is keletkezik, amely megtalálható a *Ph. cambivorá*ban és valamennyi hibridben is, de nincs benne a *Ph. fragariae*ban. A *Ph. cambivora* e DNS-szakasza próbaként használva erős homológiát mutatott a hibrid izolátumok hasonló méretű DNS-szakaszaival. A morfológiai, ITS-szekvenciabeli és az AFLP-adatok (BRASIER et al. 1999) egyaránt arra mutatnak, hogy az égerfitoftóra egyik szülőfaja a *Ph. cambivora*. Az OPG-02 jelű indítószekvenciával keletkezett RAPD-PCR-termékek közötti homológia ezért annak a jele, hogy a hibrid égerfitoftórák tartalmaznak *Ph. cambivora* eredetű DNS-t is.

Ugyanezt támasztja alá az is, hogy a SCHUBERT et al. (1999) által RAPD-PCR-termékek szekvenciája alapján tervezett és *Ph. cambivorá*ra specifikusnak talált indítószekvenciáról laboratóriumunkban kiderült, hogy az égerfitoftórából is egy ugyanolyan méretű terméket szaporít fel, mint a *Ph. cambivorá*ban. Igaz ugyan, hogy restrikciós endonukleázos emésztést követően a PCR-termék eltérő szekvenciájúnak bizonyult (nem közölt adatok).

Ez éppúgy, mint a RAPD-elemzéseink (8 és 9. ábra), további bizonyítékát jelentik annak, hogy az égerfitoftóra evolúciós leszármazottja lehet a *Ph. cambivorá*nak.

Arra nézve még senki sem közölt adatokat, hogy a BONANTS et al. (1997) által közölt ITS-alapú indítószekvencia, valamint a STAMMLER és SEEMÜLLER által (1993) a riboszóma kis alegységének génjére kidolgozott és a *Ph. fragariae*ra specifikus indítószekvencia képes-e a megfelelő termékek felszaporítására az éger-*Phytophthorá*ból is.

5. 7. Az éger-*Phytophthora* kialakulása

Az éger-*Phytophthora* eredete még nem tisztázódott teljes mértékben. Eredményeink összhangban a korábbi irodalmi adatokkal azt valószínűsítik, hogy a *Ph. cambivora* lehetett az egyik szülő. A *Ph. cambivora* ITS-szekvenciája *Msp*I restrikciós endonukleázzal hasítva ugyanolyan mintázatot adott, mint a svéd típusú égerfitoftórák (a hansági izolátumok és az P876-os referenciaizolátum). Több izolátumot elemezve az ITS-szekvencia-adatokon alapuló törzsfán az éger-*Phytophthora* különböző variánsai közül a svéd típusú állt a legközelebb a *Ph. cambivorá*hoz (BRASIER et al. 2004). Az izozimvizsgálatok eredményei ezzel egybevágnak. A Gpi és az Mdh egyik lokuszán is ugyanazokat az allélokat mutattuk ki a svéd variánsban és a *Ph. cambivorá*ban is.

Az éger-*Phytophthora* másik szülőfaja egyelőre nem ismert, sőt az sem kizárt, hogy a különböző hibridtípusok külön-külön hibridizációs események során alakultak ki (Brasier et al. 1999). Az ITS-szekvenciákon alapuló törzsfában a *Phytophthora*-nemzetség három faja, a *Ph. cambivora*, a *Ph. fragariae*, és a *Ph. cinmomi* egy csoportot alkotott (COOKE és DUNCAN 1997, COOKE et al. 2000). Ha nem is valószínű, hogy a *Ph. fragariae* volt az égerfitoftóra másik szülőfaja, de a lehetséges szülőket ebben a rokonsági körben kell keresni. Éppen a legutóbbi évek eredményei bizonyították, hogy még korántsem tudunk mindent erről a kórokozócsoportról. A számos újonnan felfedezett faj (ILIEVA et al. 1998, JUNG et al. 1999, 2002 és 2003, WERRES et al. 2001, FLIER et al. 2002, BRASIER et al. 2003) közül kettő, a *Ph. europea* és a *Ph. uliginosa*, éppen abba az ITS-csoportba tartozik, amelyben az égerfitoftórák is helyet kaptak. Elképzelhető tehát, hogy a számos felfedezetlen faj között előbb-utóbb az éger-*Phytophthora* másik szülőfaját is megtaláljuk.

A hibridek kialakulásában lévő bizonytalanságokat jelentősen csökkentheti, ha képesek leszünk megfejteni a hibridizációhoz vezető folyamatokat.

Újonnan kialakult kórokozóként mindenesetre az éger-*Phytophthora* is helyet követel magának a természetben. Ha a hibridizációs folyamat más fajok esetében is hasonló sikerrel jár, az jelentősen meg fogja változtatni egyes ökoszisztémák működését.

Különösen fenyegető, ha a sérülékeny, veszélyeztetett természetes életközösségekben bukkan fel egy újabb kórokozó. Ez olyan stresszt okozhat, ami az adott közösség felbomlásához is vezethet. Az ember beavatkozási lehetőségei ilyen esetekben korlátozottak. Például az éger-*Phytophthora* ellen valószínűleg hatékonyan lehetne védekezni valamilyen fungiciddel. Eredményeink szerint ugyanis (*in vitro* körülmények között) a hazai izolátumok érzékenyek a metalaxilra (nem közölt adatok), de egy ilyen beavatkozás védett területen, ráadásul vizes élőhelyen elképzelhetetlen. Ezért csak a megfontolt és felelősségteljes viselkedés vezethet eredményre, vagyis ha elkerüljük a fajok vagy növényi minták megfontolatlan mozgatását és a régóta jól működő bioföldrajzi folyamatokat rábízzuk a természetre.

Fajhibridek kialakulása és elterjedése a természetben napjaink felgyorsult és egész Földünkre kiterjedő életében még könnyebb is lehet, hiszen a távolságok nem csak az emberek és az áruk előtt csökkennek, hanem a mikroorganizmusok előtt is, amelyek az ember akaratlan segítségével korábban áthidalhatatlan távolságokat tehetnek meg. Felgyorsult evolúciójuk további kórokozók felbukkanását is lehetővé teszi, amely visszafordíthatatlanul visszahat környezetünkre.

*

Összegzésként elmondható, hogy a *Phytophthora*-nemzetség mint az egyik legjelentősebb növénykórokozó csoport már a múltban is sok kárt okozott, a közeli jövőben azonban még komolyabb kihívások elé állíthatja az embe-

riséget. Bizonyos populációinak a megváltozott gazdasági, társadalmi, valamint az ezekre (is) visszavezethető környezeti feltételek következtében megnövekedett intra- és interspecifikus változékonysága hatékony védekezési stratégiák kidolgozására vagy a meglévők megváltoztatására ösztönöz. Mindehhez nélkülözhetetlen a populációk genetikai szerkezetének ismerete, valamint változásainak követése, amiben ma már a molekuláris módszerek is nagy segítséget nyújtanak. Genetikailag ennyire változékony kórokozók ellen tökéletes védelmet szinte lehetetlen biztosítani. Az már a metalaxil kapcsán (is) kiderült, mennyire kockázatos egyetlen növényvédő szerre alapozni a kémiai védekezést, ezért tanácsos a jövőben az eltérő hatásmechanizmusú növényvédő szerek kombinációját alkalmazni a rezisztencia kialakulási gyakoriságának csökkentésére. Másfelől, bizonyos esetekben – elég az égerfitoftóra kapcsán az erdei ökoszisztémákra gondolni – a vegyszeres védekezés környezetvédelmi szempontból csaknem megvalósíthatatlan. Ilyenkor szinte az egyetlen, más esetekben viszont a kémiai védekezés melletti lehetőség a betegségnek ellenálló fajták nemesítése. De mindenekelőtt lényeges, hogy a vető- vagy szaporítóanyag kórokozótól mentes legyen. A fertőzött növények kiszűréséhez azonban gyors diagnosztikai módszerek szükségesek. Ilyen célú munkát folytatunk jelenleg az égerfitoftóra molekuláris azonosítására.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Phytophthora*-nemzetség genetikai változékonyságában jelentős szerepet játszanak a fajon belüli és a fajok közötti genetikai kölcsönhatások.

A fajon belüli genetikai változékonyság legjobban a burgonya- és paradicsomvész kórokozóján tanulmányozható, a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary az Oomycota-törzs egyik leghírhedtebb tagja. E heterotallikus szervezetnek az 1970-es évekig Mexikón kívül csak az A1-es párosodási típusú törzsei voltak ismertek. A nagy genetikai változatosságot biztosító ivaros szaporodáshoz szükséges két (A1 és A2) párosodási típus csupán a kórokozó feltételezett őshazájában, Közép-Mexikóban fordult elő. Genetikai vizsgálatok adatai szerint a világ többi részén csak néhány kis változatosságú, ivartalanul szaporodó genotípus élt. A nyolcvanas évektől egy agresszív és a fenil-amid típusú fungicidekkel, mint például a metalaxillal szemben rezisztens, valamint mindkét párosodási típust magában foglaló populáció terjedésének lehetünk tanúi világszerte. Ezzel párhuzamosan a régi populációk visszaszorultak, Európából pedig teljesen eltűntek.

Ez a vizsgálat részben annak kiderítésére irányult, hogy a *Ph. infestans* populációiban világszerte bekövetkező változások hazánkat milyen mértékben érintik. Különböző régiókból több mint száz izolátumot gyűjtöttünk 2001-ben és 2002-ben. Izolátumaink párosodási típusainak és a metalaxil fungiciddel szembeni toleranciájának meghatározása mellett elemeztük a glicil-leucin-peptidáz *(Pep)*, a glükóz-6-foszfát-izomeráz *(Gpi)* izozim-genotípusokat és a nukleáris genomban mérsékelt gyakorisággal ismétlődő 1200 bp nagyságú, RG57 jelű DNS-szakasz hibridizációs mintázatait. Eredményeink alapján izolátumaink ahhoz az új populációhoz tartoznak, amely a régi populációt teljesen

kiszorította. Átlagosan fele-fele arányban fordult elő a két párosodási típus, és izolátumaink nagyobb része (62%) toleránsnak (rezisztensnek vagy átmeneti érzékenységűnek) bizonyult a leggyakrabban alkalmazott fungiciddel, a metalaxillal szemben. A *Gpi* lokuszt tekintve valamennyi izolátum homozigóta 100/100 genotípusú volt, ezzel szemben a *Pep* lokuszon 3 allél összesen négy kombinációja, a 100/100 (34%), a 96/96 (32%), a 96/100 (27%) és a 83/96 (7%) jelent meg. Ez utóbbi genotípus Európában nagyon ritka, és csak az A1-es párosodási típust képviseli. Az RG57-genotípusok rendkívül nagy genetikai változékonyságot sejtetnek, még a leggyakoribb is mindössze 9 esetben fordult elő.

A *Ph. infestans*-populáció jellemzésére általánosan használt, ún. multilokuszos genotípusok (a párosodási típus, izozim-genotípusok és az RG57-mintázatok kombinációja) tekintetében még nagyobb a változékonyság: a leggyakoribbat is csak hat alkalommal azonosítottuk. A populáció szerkezete és a benne tapasztalható nagy változatosság jelzi, hogy a populációk változékonyságának kialakításában a helyi folyamatoknak (ivaros és ivartalan kölcsönhatás) döntő szerepe van.

Földrajzilag izolált környezetben fejlődő és ezért gyenge reprodukciós izolációjú fajok közös élőhelyre kerülve képesek genetikai kölcsönhatásra. Ennek tulajdonítható az az 1999-ben megfigyelt új, addig ismeretlen fitoftórás betegség, amely az enyves égeren (*Alnus glutinosa*) jelent meg Nyugat-Magyarországon. Korábbi sejttani és genetikai adatok alapján bebizonyosodott, hogy a betegség oka egy természetes eredetű fajhibrid, amely feltehetően a *Ph. cambivora* és a *Ph. fragariae* vagy ahhoz közel álló faj genetikai kölcsönhatásából keletkezett. A hibrid kórokozó, amely Nyugat- és Észak-Európában számos országban a folyóparti égerállományok jelentős károsodását eredményezi, genetikailag heterogén, több különböző heteroploid típust foglal magában, ezek: a standard típus és az úgynevezett variánsok. Legújabban a kórokozót

Phytophthora alni Brasier & S. A. Kirk néven leírták. A hibrid különböző típusai alfajokként szerepelnek: a *Ph. alni* subsp. *alni* a legelterjedtebb és legagresszívabb úgynevezett standard típust képviseli, míg a svéd variáns a *Ph. alni* subsp. *uniformis*, a holland és német variáns pedig a *Ph. alni* subsp. *multiformis*. A dolgozat – a *Ph. infestans* populációinak elemzése mellett – ezen új *Phytophthora*-faj hazai izolátumaiban jelentkező változatosságát is tárgyalja.

A Magyarországon két síklápból izolált kórokozó fenotípusos és molekuláris tulajdonságainak elemzése alapján a Hanságban a svéd variáns él, míg Hévíz környékén a standard típus található. Glükóz-6-foszfát-izomeráz, almasav-dehidrogenáz, leucil-tirozin-peptidáz izozimmintázatok, a riboszomális gének között található ITS-régió restrikciós endonukleázokkal kapott emésztési mintázatai, illetve a RAPD-PCR-rel kapott DNS-termékek méreteloszlása alapján az izolátumok egy alfajon belül homogének. A két alfaj azonban jól megkülönböztethető és a megfelelő referenciaizolátumokkal egyezést mutat. Az OPG-02-es indítószekvenciával kapott és minden éger-*Phytophthora*-izolátumban meglévő RAPD-termék homológ szekvenciájú a *Ph. cambivorá*ban, mint az egyik szülőben megtalálható hasonló méretű RAPD-PCR-termékkel. Az ITS-régió *Hae*III és *Msp*I restrikciós enzimekkel kapott mintázata alátámasztja a *Ph. alni* kétszülős eredetét.

7. SUMMARY

Genetic variability in the genus *Phytophthora*, which has increased dramatically in its species number, is due to intraspecific and interspecific interactions.

Intraspecific polymorphism was studied within the Hungarian populations of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, the causal agent of late blight of potato and tomato, which is one of the most devastating species of the phylum Oomycota. The pathogen is heterothallic with mating types A1 and A2. Until the early 1980s, sexual reproduction of the pathogen was known to be confined to its place of origin, Central Mexico, where the two mating types coexisted. On the contrary, populations in the rest of the world were of the A1 mating type only and exhibited limited genetic variability. In the past two decades, novel populations have spread worldwide comprising genotypes with increased aggressiveness and extended virulence, tolerance to phenylamide fungicides and, due to the simultaneous occurrence of both mating types, the ability to reproduce sexually. These new populations, have displaced the old clonal population. Our aim was to investigate the populational structure of the pathogen and find out if similar changes have taken place in Hungary.

Isolations were carried out from both potato and tomato fields in 2001 and 2002 in Hungary. More than 100 isolates were analysed for response to metalaxyl and mating type, for isozymes at two loci, *i.e.* glycil leucine peptidase *(Pep),* glucose-6-phosphate isomerase *(Gpi),* and hybridisation patterns of the multilocus RG57 probe to the nuclear genome. On this basis, all isolates exhibit genotypes characteristic of the new population. More than one half of the isolates (62%) tolerated (showed resistance or intermediate response

to) the frequently used fungicide, metalaxyl. The ratio of mating types A1 and A2 was nearly 1:1. The *Gpi* genotypes were all homozygous, 100/100 whereas at the *Pep* locus, four allelic combinations occurred, 100/100 (34%), 96/96 (32%), 96/100 (27%) and 83/96 (7%). The *Pep* 83/96 is rare in Europe and all isolates with this genotype were of A1 mating type. The RG57 fingerprints were extremely diverse with numerous unique fingerprints and even the most frequent pattern occured not more than 9 times.

Combined genotypic traits such as mating type, *Pep, Gpi* and RG57 into one multilocus genotype revealed an even greater population diversity. The most frequent multilocus genotype characterised as few as 6 isolates, and a significant part of the population exhibited unique genotypes. These results suggest that diversity of the *Ph. infestans* populations in Hungary is due to local events (sexual and asexual interactions) rather than migration from other countries.

In the 1990s new *Phytophthora* disease of common alder (*Alnus glutinosa*) occurred in Hungary. The symptoms were similar to those previously described in several Northern and Western European countries. Based on earlier studies, the alder *Phytophthora* were considered likely to be a species hybrid between *Ph. cambivora* and a *Ph. fragariae*-like species: across Europe a range of new alder *Phytophthora* is spreading, comprising a range of heteroploid hybrids. The most aggressive standard type has recently been described as *Ph. alni* subsp. *alni* Brasier & S. A. Kirk. Other variants such as the Swedish type and Dutch or German types, however, belong to other subspecies such as *Ph. alni* subsp. *uniformis* and *Ph. alni* subsp. *multiformis*, respectively.

Phenotypic and molecular features of the pathogen in Hungary were characterised and compared with isolates from elsewhere. The morphologies of five isolates from one region (Hévíz), resembled those of *Ph. alni* subsp. *alni*, whereas the three isolates from another region (Hanság) exhibited traits similar

to *Ph. alni* subsp. *uniformis*. Molecular markers of these two groups of Hungarian isolates also represented a good fit to the representative isolates of the aforementioned subspecies. Isozyme patterns and profiles of restriction fragments of the entire internal transcribed spacer (ITS) region and of RAPD-PCR products did not differ within a group, but distinct differences were exhibited between the two groups of isolates. Southern analysis of DNA amplified with RAPD primer OPG-02 revealed the homologous nature of co-migrating bands of *Ph. cambivora* and isolates of alder *Phytophthora*. Furthemore, restriction fragment length polymorphism of the ITS region of ribosomal DNAs digested with restriction endonuclease *Hae*III and *Msp*I were consistent with the hypothesised biparental origin of alder *Phytophthora.*

8. MELLÉKLETEK

M1. Felhasznált irodalom

ADLER N. E., ERSELIUS L. J., CHACÓN M. G., FLIER W. G., ORDOÑEZ M. E., KROON L. P. M. N. és FORBES G. A. (2004): Genetic diversity of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology,* 94 (2) 154-162. p.

ANDRIVON D. (1996): The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology,* 45 (6) 1027-1035. p.

BAKONYI J. és ÉRSEK T. (1997a): A burgonyavész fenyegető jelei Magyarországon. *Növényvédelem,* 33 (5) 221-228. p.

BAKONYI J. és ÉRSEK T. (1997b): First report of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* on potato in Hungary. *Plant Disease,* 81 (9) 1094. p.

BAKONYI J., HEREMANS B., JAMART G. (2002a): Characterization of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato in Flanders, Belgium. *Journal of Phytopathology,* 150 (8–9) 512-516. p.

BAKONYI J., LÁDAY M., DULA T. és ÉRSEK T. (2002b): Characterisation of isolates of *Phytophthora infestans* from Hungary. *European Journal of Plant Pathology,* 108 (2) 139-146. p.

BAKONYI J., LÁDAY M., DULA T. és ÉRSEK T. (1998): Characterization of *Phytophthora infestans* isolates from Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica,* 33 (1–2) 49-54. p.

BÁNHEGYI J., TÓTH S., UBRIZSY G. és VÖRÖS J. (1985): Magyarország mikroszkopikus gombáinak határozókönyve. Budapest: Akadémiai kiadó. 1316 p.

BOHÁR Gy., BAKONYI J., DULA T., APPONYINÉ GARAMVÖLGYI I. és ÉRSEK T. (1999): A *Phytophthora infestans* új populációi Magyarországon. *Növényvédelem,* 35 (7) 301-306. p.

BONANTS P. J. M., HAGENAAR-DE WEERDT M., MAN IN ’T VELD W. A. és BAAYAEN R. P. (2000): Molecular characterization of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytohpthora cactorum*. *Phytopathology,* 90 (8) 867-874. p.

BONANTS P., HAGENAAR-DE WEERDT M., VAN GENT-PELZER M., LACOURT I., COOKE D. és DUNCAN J. (1997): Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology,* 103 (3) 345-355. p.

BOURKE P. M. A. (1964): Emergence of potato blight, 1843–46. *Nature,* 203 (4947) 805-808. p.

BOURKE A. (1991): Potato blight in Europe in 1845: the scientific controversy. 12-24. p. In: LUCAS J. A., SHATTOCK R. C., SHAW D. S. és COOKE L. R. (Szerk.): *Phytophthora*. Cambridge: Cambridge University Press, 447 p.

BRASIER C. (2003): Sudden oak death: *Phytophthora ramorum* exhibits transatlantic differences. *Mycological Research,* 107 (3) 258-259. p.

BRASIER C. (2000): The rise of the hybrid fungi. *Nature,* 405 (6783) 134-135. p.

BRASIER C. M., COOKE D. E. L. és DUNCAN J. M. (1999): Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* 96 (10) 5878-5883. p.

BRASIER C. M. és KIRK S. A. (2001): Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder phytophthoras, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathology,* 50 (2) 218-229. p.

BRASIER C. M., KIRK S. A., DELCAN J., COOKE D. E. L., JUNG T. és MAN IN 'T VELD W. A. (2004): *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research,* 108 (10) 1172-1184. p.

BRASIER C. M., KIRK S. A., PIPE N. D. és BUCK K. W. (1998): Rare interspecific hybrids in natural populations of the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mycological Research,* 102 (1) 45-57. p.

BRASIER C. M, ROSE J. és GIBBS J. N. (1995): An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology,* 44 (6) 999-1007. p.

BRASIER C. M., SANCHEZ-HERNANDEZ E. és KIRK S. A. (2003): *Phytophthora inundata* sp. nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. *Mycological Research,* 107 (4) 477-484. p.

BRASIER C. M. és SANSOME E. (1975): Diploidy and gametangial meiosis in *Phytophthora cinnamomi, P. infestans* and *P. drechsleri*. *Transactions of the British Mycological Society,* 65 (1) 49-65. p.

BRURBERG M. B., HANNUKKALA A. és HERMANSEN A. (1999): Genetic variability of *Phytophthora infestans* in Norway and Finland as revealed

by mating type and fingerprint probe RG57. *Mycological Research,* 103 (12) 1609-1615. p.

CARLISLE D. J., COOKE L. R. és BROWN A. E. (2001): Phenotypic and genotypic characterisation of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology,* 107 (3) 291-303. p.

CARTER D. A., ARCHER S. A., BRUCK K. W., SHAW D. S. és SHATTOCK R. C. (1990): Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycological Research,* 94 (8) 1123-1128. p.

ČERNY K., GREGOROVÁ B., HOLUB V. és STRNADOVÁ V. (2003): First finds of "alder-Phytophthora" in the Czech Republic. *Czech Mycology,* 55 (3–4) 291-296. p.

CHEN W., SCHNEIDER R. W. és HOY J. W. (1992): Taxonomic and phylogenetic analysis of ten *Pythium* species using isozyme polymorphisms. *Phytopathology,* 82 (10) 1234-1244. p.

COHEN Y., FARKASH S., BAIDER A. és SHAW D. S. (2000): Sprinkling irrigation enhances production of oospores of *Phytophthora infestans* in field-grown crops of potato. *Phytopathology,* 90 (10) 1105-1111. p.

COOKE D. E. L., DRENTH A., DUNCAN J. M., WAGELS G. és BRASIER C. M. (2000): A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology,* 30 (2) 17-32. p.

COOKE D. E. L. és DUNCAN J. M. (1997): Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research,* 101 (6) 667-677. p.

COOKE D. E. L. és LEES A. K. (2004): Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology,* 53 (12) 692-704. p.

COOKE D. E. L., YOUNG V., BIRCH P. R. J., TOTH R., GOURLAY F., DAY J. P., CARNEGIE S. F. és DUNCAN J. M. (2003): Phenotypic

and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995–97). *Plant Pathology,* 52 (2) 181-192. p.

COOKE L. R., CARLISLE D. J., WILSON D. G. és DEAHL K. L. (2002): Natural occurence of *Phytophthora infestans* on woody nightshade (*Solanum dulcamara*) in Ireland. *Plant Pathology,* 51 (3) 392. p.

DAGGETT S. S., GÖTZ E. és THERRIEN C. D. (1993): Phenotypic changes in populations of *Phytophthora infestans* from Eastern Germany. *Phytopathology,* 83 (3) 319-323. p.

DAVIDSE L. C., GERRITSMA O. C. M. és VELTHUIS G. C. M. (1984): A differential basis of antifungal activity of acylalanine fungicides and structurally related chloroacetanilide herbicides in *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* 21 (3) 301-308. p.

DAY J. P., WATTIER R. A. M., SHAW D. S. és SHATTOCK R. C. (2004): Phenotypic and genotypic diversity in *Phytophthora infestans* on potato in Great Britain, 1995–98. *Plant Pathology,* 53 (3) 303-315. p.

DELCÁN J. és BRASIER C. M. (2001): Oospore viability and variation in zoospore and hyphal tip derivatives of the hybrid alder Phytophthoras. *Forest Pathology,* 31 (2) 65-83. p.

DICK M. W. [2000]: The *Peronosporomycetes.* [Berlin: Springer-Verlag] (McLAUGHLIN D. J., McLAUGHLIN E. F. és LEMKE P. A. (Szerk.): *The Mycota* VII.–A. *Systematics and Evolution*).

DIG system users guide for filter hybridisation, The [1995]: s. l. Boehringer Mannheim Biochemica, Germany 100 p.

DOWLEY L. J., BANNON E., COOKE L. R., KEANE T. és O'SULLIVAN E. (Szerk.) (1995): *Phytophthora infestans* 150. Dublin: Boole Press Ltd., 382 p.

DRENTH A., GOODWIN S. B., FRY W. E. és DAVIDSE L. C. (1993): Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in The Netherlands revealed by DNA polymorphisms. *Phytopathology,* 83 (10) 1087-1092. p.

ELANSKY S., SMIRNOV A., DYAKOV Y., DOLGOVA A., FILIPPOV A., KOZLOVSKY B., KOZLOVSKAYA I., RUSSO P., SMART C. és FRY W. (2001): Genotypic Analysis of Russian Isolates of *Phytophthora infestans,* from the Moscow Region, Siberia and Far East. *Journal of Phytopathology,* 149 (10) 605-611. p.

ENGLISH J. T., LÁDAY M., BAKONYI J., SCHOELTZ J. E. és ÉRSEK T. (1999): Phenotypic and molecular characterization of species hybrids derived from induced fusion of zoospores of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora nicotianae*. *Mycological Research,* 103 (8) 1003-1008. p.

ÉRSEK T. (2001): A fitoftórakutatás Magyarországon. *Növénytermelés,* 50 (5) 593-604. p.

ÉRSEK T. és BAKONYI J. (1995): A rajzóspórás gombák természetes protoplasztjai. *Növényvédelem,* 33 (11) 521-532. p.

ÉRSEK T. és BAKONYI J. (1997): A burgonyavész és kórokozója: a *Phytophthora infestans*. *Növényvédelem,* 33 (7) 353-382. p.

ÉRSEK T., ENGLISH J. T., és SCHOELTZ J. E. (1995): Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges by zoospore fusion. *Phytopathology,* 85 (11) 1343-1347. p.

ERSELIUS L. J., VEGA-SÁNCHEZ M. E. és FORBES G. A. (2000): Stability in population of *Phytophthora infestans* attacking tomato in Equador demonstrated by cellulose-acetate assessment of glucose-6-phosphate isomerase. *Plant Disease,* 84 (3) 325-327. p.

ERWIN D. C. és RIBEIRO O. K. (1996): *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, Egyesült Államok: APS Press. 562 p.

FERENCZY L., KEVEI F. és ZSOLT J. (1974): Fusion of fungal protoplasts. *Nature,* 248 (5451) 793-794. p.

FERNÁNDEZ-PAVÍA S. P., GRÜNWALD N. J. és FRY W. E. (2002): Formation of *Phytophthora infestans* oospores in nature on tubers in Central Mexico. *Plant Disease,* 86 (1) 73. p.

FISHER D. J. és HAYES A. L. (1982): Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. *Pesticide Science,* 13 (3) 330-339. p.

FLIER W. G., GRÜNWALD N. J., FRY W. E. és TURKENSTEEN L. J. (2001): Formation, production and viability of oospores of *Phytophthora infestans* from potato and *Solanum demissum* in the Toluca valley, Central Mexico. *Mycological Research,* 105 (8) 998-1006. p.

FLIER W. G., GRÜNWALD N. J., KROON L. P. M. N., VAN DEN BOSCH T. B. M., GARAY-SERRANO E., LOZOYA-SALDAÑA H., BONANTS P. J. M. és TURKENSTEEN L. J. (2002): *Phytophthora imopoeae* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Imopoea longipedunculata* in the Toluca Valley of Central Mexico. *Mycological Research,* 106 (7) 848-856. p.

FORBES G. A., GOODWIN S. B., DRENTH A., OYARZUN P., ORDOÑEZ M. E. és FRY W. E. (1998): A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease,* 82 (7) 811-817. p.

FORBES G. A., ESCOBAR X. C., AYALA C. C., REVELO J., ORDOÑEZ M. E., FRY B. A., DOUCETT K. és FRY W. E. (1997): Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology,* 87 (4) 375-380. p.

FOSTER L. M., KOZAK K. R., LOFTUS M. G., STEVENS J. J., ROSS I. K. (1993): The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycological Research,* 97 (7) 769-781. p.

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., INGLISH D. A. és SANDLAN K. P. (1993): Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implication. *Plant Disease,* 77 (7) 653-661. p.

FRY W. E., GOODWIN S. B., MATUSZAK J. M., SPIELMAN L. J., MILGROOM M. G. és DRENTH A. (1992): Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology,* 30 107-129. p.

GALLEGLY M. E. és GALINDO J. (1958): Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology,* 48 (5) 274-277. p.

GARBELOTTO M., RATCLIFF A., BRUNS T. D., COBB F. W. és OTROSINA W. J. (1996): Use of taxon-specific competitive-priming PCR to study host specificity, hybridization, and intergroup gene flow in intersterility groups of *Heterobasidion annosum. Phytopathology,* 86 (5) 543-551. p.

GAVINO P. D. és FRY W. E. (2002): Diversity in and evidence for selection on the mitochondrial genome of *Phytophthora infestans*. *Mycologia,* 94 (5) 781-793. p.

GHIMIRE S. R., HYDE K. D., HODGKISS I. J., SHAW D. S. és LIEW E. C. Y. (2003): Variations in the *Phytophthora infestans* population in Nepal by nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms. *Phytopathology,* 93 (2) 236-243. p.

GIBBS J. N.: (1995) Phytophthora root disease of alder in Britain. *EPPO Bulletin,* 25 (4) 661-664. p.

GIBBS J. N., LIPSCOMBE M. A. és PEACE A. J. (1999): The impact of Phytophthora disease on riparian populations of common alder (*Alnus*

glutinosa) in southern Britain. *European Journal of Forest Pathology,* 29 (1) 39-50. p.

GIDDINGS N. J. és BERG A. (1919): A comparison of the late blights of tomato and potato. *Phytopathology,* 9 (5) 209-210. p.

GOODWIN S. B. (1991): DNS polymorphism in *Phytophthora infestans*: the Cornell experience. 256-271. p. In: LUCAS J. A., SHATTOCK R. C., SHAW D. S. és COOKE, L. R. (Szerk.): *Phytophthora*. Cambridge: Cambridge University Press, 447 p.

GOODWIN S. B. (1997): The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology,* 87 (4) 462-473. p.

GOODWIN S. B. és DRENTH A. (1997): Origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology,* 87 (10) 992-999. p.

GOODWIN S. B. és FRY W. E. (1994): Genetic analyses of interspecific hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora mirabilis*. *Experimental Mycology,* 18 (1) 20-32. p.

GOODWIN S. B., COHEN B. A. és FRY W. E. (1994): Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* 91 (24) 11591-11595. p.

GOODWIN S. B., DRENTH A. és FRY W. E. (1992a): Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Current Genetics,* 22 (2) 107-115. p.

GOODWIN S. B., SCHNEIDER R. E. és FRY W. E. (1995): Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease,* 79 (11) 1181-1185. p.

GOODWIN S. B., SPIELMAN L. J., MATUSZAK J. M., BERGERON S. N. és FRY W. E. (1992b): Clonal diversity and genetic differentiation of

Phytophthora infestans populations in Northern and Central Mexico. *Phytopathology,* 82 (9) 955-961. p.

GRIFFITH G. W. és SHAW D. S. (1998): Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology,* 64 (10) 4007-4014. p.

GRÜNWALD N. J., FLIER W. G., TURKENSTEEN L. és FRY W. E. (2000): Populations of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley on wild *Solanum* species are not different from those on cultivated potatoes. *Phytopathology,* 90 (6) S31. p.

HAWKSWORTH D. L. (2001): What *Phytophthora infestans* race caused the Irish potato famine? *Mycological Research,* 105 (9) 1026. p.

HAWKSWORTH D. L., KIRK P. M., SUTTON B. C. és PEGLER D. N. (1995): Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. Kew, Egyesült Királyság: CAB International. 616 p.

HEBERT P. D. N. és BEATON M. J. (s. a.): Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Beaumont, Texas: Helena Laboratories, 31 p.

HOHL H. R. és ISELIN K. (1984): Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. *Transactions of the British Mycological Society,* 83 (3) 529-530. p.

HUTCHESON K (1970): A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology,* 29 (1) 151-154. p.

ILIEVA E., MAN IN 'T VELD W. A., VEENBAAS-RIJKS W. és PIETERS R. (1998): *Phytophthora multivesiculata,* a new species causing rot in *Cymbidium*. *European Journal of Plant Pathology,* 104 (7) 677-684. p.

IVORS K. I., HAYDEN K. J., BONANTS P. J. M., RIZZO D. M. és GARBELOTTO M. (2004): AFLP and phylogenetic analyses of North

American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Mycological Research,* 108 (4) 378-392. p.

JAIME-GARCIA R., TRINIDAD-CORREA R., FELIX-GASTELUM R., ORUM T. V., WASSMANN C. C. és NELSON M. R. (2000): Temporal and spatial patterns of genetic structure of *Phytophthora infestans* from tomato and potato in the Del Fuerte Valley. *Phytopathology,* 90 (11) 1188-1195. p.

JIANG J. és ERWIN D. C. (1990): Morphology, plasmolysis, and tetrazolium bromide stain as criteria for determining viability of *Phytophthora* oospores. *Mycologia,* 82 (1) 107-113. p.

JUNG T., COOKE D. E. L., BLASCHKE H., DUNCAN J. M. és OßWALD W. (1999): *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research,* 103 (7) 785-798. p.

JUNG T., HANSEN E. M., WINTON L., OßWALD W. és DELATOUR C. (2002): Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycological Research,* 106 (4) 397-411. p.

JUNG T., NECHWATAL J., COOKE D. E. L., HARTMANN G., BLASCHKE M., OßWALD W. F., DUNCAN J. M. és DELATOUR C. (2003): *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research,* 107 (7) 772-789. p.

KNAPOVA G. és GISI U. (2002): Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology,* 51 (5) 641-653. p.

KOH Y. J., GOODWIN S. B., DYER A. T., COHEN B. A., OGOSHI A., SATO N. és FRY W. E. (1994): Migration and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries. *Phytopathology,* 84 (9) 922-927. p.

KOLTAY A. (2003): Előzetes vizsgálati eredmények a magyarországi éger- (*Alnus glutinosa*) állományok *Phytophthora* okozta pusztulásáról. *Növényvédelem,* 39 (1) 3-7. p.

LÁDAY M., BAGI F., MESTERHÁZY Á. és SZÉCSI Á. (2000): Isozyme evidence for two groups of *Fusarium graminearum*. *Mycological Research,* 104 (7) 788-793. p.

LEBRETON L. és ANDRIVON D. (1998): French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *European Journal of Plant Pathology,* 104 (6) 583-594. p.

LEVIN A., BAIDER A., RUBIN E., GISI U. és COHEN Y. (2001): Oospore formation by *Phytophthora infestans* in potato tubers. *Phytopathology,* 91 (6) 579-585. p.

LI Y-C., KOROL A. B., FAHIMA T., BEILES A. és NEVO E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology,* 11 (12) 2453-2465. p.

LUCAS J. A., SHATTOCK R. C., SHAW D. S. és COOKE L. R. (Szerk.) [1991]: *Phytophthora*. Cambridge: Cambridge University Press, 447 p.

MAN IN ’T VELD W. A., VEENBAAS-RIJKS W. J., ILIEVA E., DE COCK A. W. A. M., BONANTS P. J. M. és PIETERS R. (1998): Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology,* 88 (9) 922-929. p.

MAY K. J. és RISTAINO J. B. (2004): Identity of the mtDNA haplotype(s) of *Phytophthora infestans* in historical specimens from the Irish potato famine. *Mycological Research,* 108 (5) 471-479. p.

McLEOD A., DENMAN S., SADIE A. és DENNER F. D. N. (2001): Characterization of South-African isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease,* 85 (3) 287-291. p.

MINOGUE K. P. és FRY W. E. (1981): Effect of temperature, relative humidity, and rehydration rate on germination of dried sporangia of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology,* 71 (11) 1181-1184. p.

MONEY N. P. (1998): Why oomycetes have not stopped being fungi? *Mycological Research,* 102 (6) 767-768. p.

MOSA A. A, KOBAYASHI K., OGOSHI A., KATO M. és SATO N. (1993): Isoenzyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. *Plant Pathology,* 42 (1) 26-34. p.

MUDICH A. (1965): A *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary dél-dunántúli biotípusainak meghatározása. *Növényvédelem,* 1 (5) 27-32. p.

MURRAY M. G. és THOMPSON W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research,* 8 (19) 4321-4325. p.

NAGY Z. Á., BAKONYI J. és ÉRSEK T. (2003a): Novel genotypes in *Phytophthora infestans* populations in Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica,* 38 (1–2) 7-11. p.

NAGY Z. Á., BAKONYI J. és ÉRSEK T. (2003b): Standard and Swedish variant types of the hybrid alder *Phytophthora* attacking alder in Hungary. *Pest Management Science,* 59 (4) 484-492. p.

NAGY Z. Á., BAKONYI J., FISCHL G. és ÉRSEK T. (2002): Egy fitoftórahibrid két típusa a hazai égeresekben. *Növényvédelem,* 38 (6) 289-293. p.

NAGY Z. Á., SZABÓ I., BAKONYI J., VARGA F. és ÉRSEK T. (2000): A mézgás éger fitoftórás betegsége Magyarországon. *Növényvédelem,* 36 (11) 573-579. p.

NEI M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* 70 (12) 3321-3323. p.

NEI M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics,* 89 (3) 583-590. p.

NEI M. és CHESSER R. K. (1983): Estimation of fixation indices of gene diversities. *Annals of Human Genetics,* 47 (July) 253-259. p.

NEWCOMBE G., STIRLING B., McDONALD S. és BRADSHAW H. D. (2000): *Melampsora* × *columbiana*, a natural hybrid of *M. medusae* and *M. occidentalis*. *Mycological Research,* 104 (3) 261-274. p.

NIEDERHAUSER J. S. (1991): *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. 25–45. pp. In: LUCAS J. A., SHATTOCK R. C., SHAW D. S. és COOKE L. R. (Szerk.): *Phytophthora*. Cambridge: Cambridge University Press, 447 p.

OLSSON C. H. B. [1999]: Diagnosis of root infecting *Phytophthora* spp. Doktori értekezés, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. (*Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria* 161.) 48 p. + mellékletek.

OUDEMANS P. és COFFEY M. D. (1991a): A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. *Mycological Research,* 95 (9) 1025-1046. p.

OUDEMANS P. és COFFEY M. D. (1991b): Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Mycological Research,* 95 (1) 19-30. p.

PETERSEN A. B. és ROSENDAHL S. (2000): Phylogeny of the *Peronosporomycetes* (*Oomycota*) based on partial sequences of the large ribosomal subunit (LSU rDNA). *Mycological Research,* 104 (11) 1295-1303. p.

PETERSON P. D. Jr., CAMPBELL C. L. és GRIFFITH C. S. (1992): James E. Teschemacher and the cause and management of potato blight in the United States. *Plant Disease,* 76 (7) 754-756. p.

REIS A., SMART C. D., FRY W. E., MAFFIA L. A. és MIZUBUTI E. S. G. (2003): Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from

Southern and Southeastern Brazil from 1998 to 2000. *Plant Disease,* 87 (8) 896-900. p.

RISTAINO J. B. (1998): The importance of archival and herbarium materials in understanding the role of oospores in late blight epidemics of the past. *Phytopathology,* 88 (11) 1120-1130. p.

RISTAINO J. B. (2002): Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Microbes and Infection,* 4 (13): 1369-1377. p.

RISTAINO J. B., GROVES C. T. és PARRA G. R. (2001): PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens. *Nature,* 411 (6838) 695-697. p.

RIZZO D. M., GARBELOTTO M., DAVIDSON J. M., SLAUGHTER G. W. és KOIKE S. T. (2002): *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease,* 86 (3) 205-214. p.

RUSSEL B. W. és MILLS D. (1993): Electrophoretic karyotypes of *Tilletia caries*, *T. controversa* and their F_1 progeny: further evidence for conspecific status. *Molecular Plant-Microbe Interactions,* 6 (1) 66-74. p.

RUSSEL B. W. és MILLS D. (1994): Morphological, physiological, and genetic evidence in support of a conspecific status for *Tilletia caries*, *T. controversa*, and *T. foetida*. *Phytopathology,* 84 (6) 576-582. p.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F. és MANIATIS T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. 2. kiadás, 9.35. p. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, Egyesült Államok.

SANSOME E. (1961): Meiosis in the oogonium and antheridium of *Pythium debarianum* Hesse. *Nature,* 191 (4790) 827-828. p.

SANSOME E. (1963): Meiosis in *Pythium debaryanum* Hesse and its significance in the life-history of the Biflagellatae. *Transactions of the British Mycological Society,* 46 (1) 63-72. p.

SANSOME E., BRASIER C. M. és HAMM P. B. (1991): *Phytophtora meadii* may be a species hybrid. *Mycological Research,* 95 (3) 273-277. p.

SANTINI A. (2001): A new *Phythophthora* root disease of alder in Italy. *Plant Disease,* 85 (5) 560. p.

SCHILBERSZKY K. (1928): A burgonyavész gombájának ökológiája. Budapest: Wodianer és fiai Rt. 99 p.

SCHUBERT R., BAHNWEG G., NECHWATAL J., JUNG T., COOKE D. E. L., DUNCAN J. M., MÜLLER-STARCK G., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H. Jr. és OßWALD W. (1999): Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *European Journal of Forest Pathology,* 29 (3) 169-188. p.

SIGLER W. V. és ZEYER Z. (2002): Microbial diversity and activity along the forefields of two receding glaciers. *Microbial Ecology,* 43 (4) 397-407. p.

SMART C. D., WILLMANN M. R., MAYTON H., MIZUBUTI E. S. G., SANDROCK R. W., MULDOON A. E. és FRY W. E. (1998): Self-fertility in two clonal lineages of *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology,* 25 (2) 134-142. p.

SMOOT J. J., GOUGH F. J., LAMEY H. A., EICHENMULLER J. J. és GALLEGLY M. E. (1958): Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology,* 48 (3) 165-171. p.

SOM V., NAGY Z. Á., BAKONYI J. és ÉRSEK T. (2004): Mitokondriális DNS-haplotípusok a hazai *Phytophthora infestans*-populációk jellemzésére. *Növényvédelem,* 40 (8) 393-400. p.

SPIELMAN L. J., DRENTH A., DAVIDSE L. C., SUJKOWSKI L. J., GU W., TOOLEY P. W. és FRY W. E. (1991): A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? *Plant Pathology,* 40 (3) 422-430. p.

SPIERS A. G. és HOPCROFT D. H. (1994): Comparative studies of the poplar rusts *Melampsora medusae*, *M. larici-populina*, and their interspecific hybrid *M. medusae-populina*. *Mycological Research,* 98 (8) 889-903. p.

STAMMLER G. és SEEMÜLLER E. (1993): Specific and sensitive detection of *Phytophthora fragariae* var. *rubi* in raspberry roots by PCR amplification. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz – Journal of Plant Diseases and Protection,* 100 (4) 394-400. p.

STREITO J. C. és GIBBS J. N. (1999): Alder *Phytophthora* in France and the United Kingdom: Symptoms, isolation methods, distribution and damage. In: HANSEN E. M. és SUTTON W. (Szerk.): *Phytophthora diseases of forest trees.* Corvallis, Oregon: Forest Research Laboratory, Oregon State University, Egyesült Államok. IUFRO Working Party 7.02.09 Proceedings from the First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems.

SUJKOWSKI L. S., GOODWIN S. B., DYER A. T. és FRY W. E. (1994): Increased genotypic diversity via migration and possible occurence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology,* 84 (2) 201-207. p.

SZABÓ I., NAGY Z., BAKONYI J. és ÉRSEK T. (2000): First report of Phytophthora root and collar rot of alder in Hungary. *Plant Disease,* 84 (11) 1251. p.

SZEDLAY GY., JAKUCS E., BÓKA K. és BOLDIZSÁR I. (1996): Macro- and micromorphological characteristic of *Ganoderma lucidum* Karsten strains isolated in Hungary. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici,* 88 57-68. p.

THEMANN K. és WERRES S. (1998): Verwendung von Rhododendronblattern zum Nachweis von Phytophthora-Arten in Wurzel- und Bodenproben. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes,* 50 (2) 37-45. p.

THERRIEN C. D., TOOLEY P. W., SPIELMAN L. J., FRY W. E., RITCH D. L. és SHELLEY S. E. (1993): Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. *Mycological Research,* 97 (8) 945-950. p.

TOOLEY P. W., FRY W. E. és VILLAREAL GONZALEZ M. J. (1985): Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *The Journal of Heredity,* 76 (6) 431-435. p.

TRAIL F. és MILLS D. (1990): Growth of haploid *Tilletia* strains in planta and genetic analysis of a cross of *Tilletia caries* × *T. controversa*. *Phytopathology,* 80 (4) 367-370. p.

VARGA F. (2000): A mézgás éger fitoftórás betegségének megjelenése Magyarországon. 126. p. In: KUROLI G., BALÁZS K és SZEMESSY Á. (szerk.): *46. Növényvédelmi Tudományos Napok,* Budapest. 174 p.

WERRES S., MARWITZ R., MAN IN ’T VELD W. A., DE COCK A. W. A. M., BONANTS P. J. M., DE WEERDT M., THEMANN K., ILIEVA E. és BAAYEN R. P. (2001): *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research,* 105 (10) 1155-1165. p.

WHITE T. J., BRUNS T., LEE S. és TAYLOR J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.

315-322. p. In: INNIS M. A., GELFAND D. H., SNINSKY J. J. és WHITE T. J. (Szerk.): *PCR protocols: A guide to methods and applications.* San Diego, Kalifornia: Academic Press Inc. 482 p.

WILCOX W. F., SCOTT P. H., HAMM P. B., KENNEDY D. M., DUNCAN J. M., BRASIER C. M. és HANSEN E. M. (1993): Identity of *Phytophthora* species attacking raspberry in Europe and North America. *Mycological Research,* 97 (7) 817-831. p.

WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. és TINGEY S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research,* 18 (22) 6531-6535. p.

YEH F. C., YANG R-C., BOYLE T. B. J., YE Z-H és MAO J. X. (1997): POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Alberta, Kanada: University of Alberta, Canada, Molecular Biology and Biotechnology Centre.

ZWANKHUIZEN M. J., GOVERS F. és ZADOKS J. C. (2000): Inoculum sources and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in Southern Flevoland, the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology,* 106 (7) 667-680. p.

M2. A gyakrabban előforduló rövidítések és a felhasznált vegyszerek jegyzéke

AFLP: felerősített fragmentumhossz polimorfizmus (amplified fragment length polymorphism)

BCIP: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát

benomil: metil-1-(butil-karbamoil)-benzimidazol-2-il-karbamát

bp: bázispár

dH_2O: desztillált víz

DMSO: dimetil-szulfoxid

DNáz: dezoxiribonukleáz

DTT: 1,4-ditio-DL-treitol

etídium-bromid: 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridínium-bromid

EDTA: etilén-diamin-tetraacetát dinátrium só 2-hidrát

himexazol: 5-metil-1,2-oxazol-3-ol

ITS: a riboszóma nagy és kis alegységeinek génje között elhelyezkedő átíródó, de ki nem fejeződő DNS-régió (internal transcribed spacer). Két darabja közrefogja az 5,8 S rRNS génjét.

kb: kilobázis(pár)

metalaxil: D,L-N-(2,6-dimetil-fenil)-N-(2'-metoxi-acetil)-alanin-metil-észter

NBT: nitrokék-tetrazólium-klorid (5,5'-difenil-3,3'-bisz-(4-nitrofenil)-2,2'-(3,3'-dimetoxibifenil-4,4'-ilén)-ditetrazólium-diklorid)

PCNB: pentakloro-nitro-benzol

PCR: polimeráz-láncreakció (polymerase chain reaction)

ppm: milliomodrész (pars per million)

PVP: poli-(vinil-pirrolidon)

RAPD: véletlen szekvenciájú oligonukleotidokkal végzett PCR (random amplified polymorphic DNA)

RNáz: ribonukleáz

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SSR: mikroszatellit DNS-régió (simple sequence repeat)

TRIS: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol

TRIS-HCl: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol-hidroklorid.

M3. A felhasznált oldatok összetétele

Enzimkivonó oldat: 0,1 M TRIS, 0,001 M EDTA, 0,01 M KCl, 6,5 mM DTT, 350 nM PVP-40000, pH=8,0. Az elegy öt törzsoldatból is összeállítható, így 100 ml-hez 10 ml TRIS (1 M, pH=8,0), 0,2 ml EDTA (0,5 M, pH=8,0), 1 ml KCl (1 M), 1,3 ml DTT (0,5M), 1,4 g PVP-40000 kell.

DNS kivonó oldatok:

GOODWIN et al. (1992a):

50mM Tris (pH=8,0), 150 mM EDTA (pH=8,0), 1% N-lauroil-szarkozin.

MURRAY és THOMSON (1980):

CTAB oldat: 1% hexadecil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB), 0,7 M NaCl, 50 mM TRIS-HCl (pH=8,0), 250 mM EDTA (pH=8,0)

„B” oldat: 1% CTAB, 50 mM TRIS-HCl (pH=8,0), 10 mM EDTA (pH=8,0)

„C” oldat: 1 M NaCl, 10 mM TRIS-HCl (pH=8,0), 0,1 mM EDTA (pH=8,0)

Elektroforézis kádak töltőoldata:

1×TBE-oldat: 10,8 g/L TRIS, 5,5 g/L bórsav, 4 ml EDTA (0,5 M)

0,5×TBE-oldat: 5,4 g/L TRIS, 2,75 g/L bórsav, 2 ml EDTA (0,5 M)

TG-oldat izozimelektroforézishez: 3 g/L TRIS, 14,4 g/L glicin

CAAPM-oldat izozimelektroforézishez: 10,5 g/L vízmentes citromsav, 12,5 ml/L 4-(3-amino-propil)-morfolin.

Southern-féle eljárás (blot) és hibridizáció:

maleinsav puffer: 0,1 M maleinsav, 0,15 M NaCl, pH=7,5

detekciós puffer: 0,1 M TRIS, 0,1 M NaCl, pH=9,5

SSC oldat:

5×SSC: 0,75 M NaCl, 0,075 M Na_3-citrát × $2H_2O$, pH=7,0

2×SSC: 0,3 M NaCl, 0,03 M Na_3-citrát × $2H_2O$, pH=7,0

SDS oldat: 10 % (m/V)-os.

Hibridizációs oldat: 25 ng/ml DIG-jelölt próba, 5×SSC-ben elegyítve, valamint 0,1% N-lauroil-szarkozin, 0,02% SDS, 1% blokkoló reagens (Roche Applied Science katalógusszám: 1096176).

Az oldat végső térfogata 20 ml.

Öblítő oldat:

tömény: 2×SSC, 0,1% SDS, 50 ml/100 cm^2 membrán,

híg: 0,1×SSC, 0,1% SDS, 50 ml/100 cm^2 membrán.

Mosóoldat: maleinsav puffer benne oldva 0,3% Tween-20® detergens, 100 ml/100 cm^2 membrán.

Az oldatok készítéséhez steril desztillált vizet kell használni. Azokat az oldatokat, amelyek DNS-kivonáshoz, hibridizáláshoz használatosak, steril körülmények között kell készíteni, vagy készítés után sterilizálni a DNáz-szennyezettség elkerülésére. Detergenst tartalmazó oldatokat nem szabad autoklávban sterilizálni, legfeljebb baktériumszűrőn átszűrve. Elektroforézis oldatok készíthetők ioncserélt vízből is, sterilizálni nem kell.

M4. DNS–DNS-hibridizáció és kolorimetriás kimutatása

1.: a membrán megnedvesítése 2×SSC-ben 1 percig.

2.: előhibridizálás a próbát nem tartalmazó hibridizációs oldatban, a későbbi reakciókkal azonos hőmérsékleten legalább két óráig.

3.: a próba hibridizáltatása a membránhoz, 68 °C-on a hibridizációs oldatban 16 óráig. A reakció végén a próba újra felhasználható.

4.: a membrán mosása kétszer öt percig tömény öblítőoldatban.

5.: a membrán mosása kétszer tizenöt percig híg öblítőoldatban.

6.: a membrán mosása mosóoldatban 15 percig.

7.: előkészítés az antitest kötéshez: a membrán inkubációja maleinsav pufferben oldott 1% blokkolóoldatban legalább harminc percig.

8.: az antitest kötése, 20 ml/100 cm^2 a 7. lépésben leírt oldatból, amely az antitestet is tartalmazza 1,5 U/100 cm^2 koncentrációban.

9.: a membrán mosása mosóoldatban kétszer tizenöt percig.

10.: inkubáció detekciós pufferben 1 percig.

11.: inkubáció detekciós pufferben 10 ml/100 cm^2 benne oldott 200 μl NBT/BCIP dimetil-szulfoxidos oldata (Roche Applied Science kat. sz.: 1681451) 16 órán át.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a kitartó anyagi és erkölcsi támogatást témavezetőmnek és Tóth Sándornak, aki bevezetett a mikológiába. Tanácsaikért és bátorításukért köszönet illeti az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének munkatársait – különösen Bakonyi Józsefet és Láday Miklóst –, akik bevezettek a laboratóriumi gyakorlatba, sok melléfogástól kímélve meg az évek során.

Bár ennek a dolgozatnak csak egyetlen szerzője van, de a *Ph. infestans*-izolátumok begyűjtéséhez sok embertől kaptam önzetlen segítséget: Bakonyi József, Bónis Péter, Érsek Tibor, Follárt János, Gergely László, Hertelendy Péter, Komlósi Beáta, Kurcz László, Mozsár József, Simon Zoltán, Varga Mária és Wolf István. Többen közülük a Növény- és Talajvédelmi Szolgálat, vagy az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet munkatársai, akik hivatalos útjaikon is gondoltak mintagyűjtésre. Különösen nagy köszönet illeti Dula Bencénét (Heves megyei Növény- és Talajvédelmi Szolgálat), aki éveken át ellátott *Ph. infestans*-izolátumokkal. Az égerfitoftóra-izolátumok, vagy a fertőzött növényi anyagok Szabó Ilonától (Nyugat-Magyarországi Egyetem), Fischl Gézától (Veszprémi Egyetem) és Koltay Andrástól (Erdészeti Tudományos Intézet) származnak.

A színes képek közül a *Ph. infestans* tüneteinek illusztrációja a gazdanövényeiken, illetve számos mikroszkópi felvétel Érsek Tibor munkája, akárcsak az égertörzs keresztmetszeti képe. A pusztuló égerfák koronáját Koltay András örökítette meg. Hozzájárulásukkal színvonalasabbá válhatott a dolgozat, köszönet érte.

Köszönöm a közreműködést Kerrin Bucklernek a színes képek nyomtatásában, és az angol fejezet nyelvi ellenőrzését David Shaw-nak.