

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Metka ŽERJAV

**ZNAČILNOSTI POPULACIJE KROMPIRJEVE  
PLESNI (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary)  
V SLOVENIJI V OBDOBJU MED 2002 IN 2015**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Metka ŽERJAV

**ZNAČILNOSTI POPULACIJE KROMPIRJEVE PLESNI  
(*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) V SLOVENIJI V OBDOBJU  
MED 2002 IN 2015**

MAGISTRSKO DELO

**POPULATION STRUCTURE OF *Phytophthora infestans* (Mont.) de  
Bary, CAUSAL AGENT OF POTATO LATE BLIGHT, IN SLOVENIA  
IN THE YEARS 2002–2015**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2016

Delo je zaključek magistrskega študijskega programa bioloških in biotehniških znanosti-področje agronomija, na Katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Laboratorijske raziskave so bile opravljene na Oddelku za varstvo rastlin Kmetijskega inštituta Slovenije in v laboratoriju James Hutton Institute, Dundee, Škotska.

Na podlagi statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete z dne 4.5.2015 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja agronomije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Franci Aco Celar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Darja Kocjan Ačko  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Katarina Kos  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: viš. znan. sod. dr. Sebastjan Radišek  
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Metka Žerjav

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 632.4:633.49:635.64:631.524.86(043.3)
KG	varstvo rastlin/bolezni rastlin/krompirjeva plesen/ <i>Phytophthora infestans</i> /odpornost proti fungicidom/paritveni tip/populacija/genotip/potomstva klonov
AV	ŽERJAV, Metka
SA	CELAR, Franci Aco (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje agronomije
LI	2016
IN	ZNAČILNOSTI POPULACIJE KROMPIRJEVE PLESNI ( <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary) V SLOVENIJI V OBDOBJU MED 2002 IN 2015
TD	Magistrsko delo
OP	X, 73, [19] str., 11 pregl., 23 sl., 3 pril., 119 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V letih 2002 do 2007 smo v Sloveniji zbrali izolate krompirjeve plesni ( <i>Phytophthora infestans</i> ) (Pi) s krompirja (156) in paradižnika (73). Določili smo njihov paritveni tip in odpornost proti fungicidu metalaksilu. V letih 2002, 2004, 2005 in 2007 je bil delež odporne Pi v populaciji na krompirju 14 %, 46 %, 25 % in 75 %. Pojavljali so se tudi izolati s srednjo odpornostjo. Na območju Gorenjske je bila populacija Pi na krompirju v tem obdobju bolj odporna (66 %), kot je bilo povprečje za Slovenijo (41 %). Pri vzorcih Pi z njiv je bila odpornost večja kot na vrtovih. Le trije vzorci Pi s paradižnika so bili odporni proti metalaksilu. Paritveni tip A2 je bil zastopan pri izolatih s krompirja glede na leto od 14 do 31 %, toda s 75 % v letu 2007. V listih krompirja in paradižnika smo našli oospore. Za 94 izolatov iz te zbirke in 106 vzorcev DNK Pi, odvzetih v letih 2012, 2014 in 2015, je bil določen genotip z 12 SSR markerji. Primerjava z multilokusnimi profili drugih evropskih izolatov Pi je pokazala, da je bilo 45 % vzorcev z edinstvenim genotipom, ki se je v populaciji pojavil le enkrat in se pred tem še ni pojavljal. Tak rezultat je značilen za populacije s spolnim razmnoževanjem. V Evropi znana potomstva klonov (EU_2_A1, EU_13_A2, EU_34_A1, EU_23_A1, EU_6_A1) so predstavljala 35 % populacije. Velik porast odpornosti in paritvenega tipa A2 v letu 2007 sta bila povezana s prevlado potomstva klona EU_13_A2. Struktura populacije v Sloveniji je bolj podobna tisti v vzhodni Evropi, saj jo v zahodni Evropi praviloma sestavlja manj različnih genotipov.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Md
- DC UDC 632.4:633.49:635.64:631.524.86(043.3)
- CX plant protection/plant diseases/late blight/*Phytophthora infestans*/resistance to fungicides/ mating type/ population/genotype/clonal lineages
- AU ŽERJAV, Metka
- AA CELAR, Franci Aco (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biological and Biotechnical Sciences, field: Agronomy
- PY 2016
- TI POPULATION STRUCTURE OF *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, CAUSAL AGENT OF POTATO LATE BLIGHT, IN SLOVENIA IN THE YEARS 2002–2015
- DT M. Sc. Thesis
- NO X, 73, [19] p., 11 tab., 23 fig., 3 ann., 119 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Between 2002 and 2007, strains of *Phytophthora infestans* (Pi, late blight agent) were collected from potatoes (156) and tomatoes (73) in Slovenia. Their mating types and resistance to metalaxyl were determined. The proportion of resistant strains to metalaxyl was 14% (2002), 46% (2004), 25% (2005) and 75% (2007) although intermediately resistant strains also occurred. More strains from Gorenjska region, where potato production is intense, were resistant (66%) while the average for Slovenia was 41%. The strains obtained from fields were more often resistant than the strains from gardens. Only 3 isolates from tomatoes were resistant to metalaxyl. The A2 mating type of Pi from potatoes was present in 14 to 31% but 75% in 2007. Oospores were detected in tomato and potato leaves. Genotype was determined by 12 SSR markers for 94 isolates of these strains and for 106 Pi strains between 2012 and 2015. Comparing the results with database of multilocus profiles of European Pi strains showed that 45% of the strains were unique and not reported earlier. The results indicate frequent occurrence of sexual recombination. Clonal lineages EU\_2\_A1, EU\_13\_A2, EU\_34\_A1, EU\_23\_A1, EU\_6\_A1 comprised 35% of the population. The occurrence of many strains with resistance and A2 mating type in 2007 was associated with a predominance of clonal lineage EU\_13\_A2. Pi population structure in Slovenia is similar to that observed in Eastern Europe, while populations in Western Europe consist of less genotypes.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	VI
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 POVOD ZA DELO	1
1.2 NAMEN RAZISKAVE IN DELOVNE HIPOTEZE	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1 KRATKA ZGODOVINA KROMPIRJEVE PLESNI	4
2.2 OPIS POVZROČITELJA	5
<b>2.2.1 Taksonomski položaj <i>P. infestans</i></b>	<b>5</b>
<b>2.2.2 Morfološki opis <i>P. infestans</i></b>	<b>6</b>
<b>2.2.3 Genom <i>P. infestans</i></b>	<b>8</b>
<b>2.2.4 Razmnoževanje <i>P. infestans</i></b>	<b>8</b>
2.2.4.1 Paritveni tip in oploditev	8
2.2.4.2 Značilnosti oospor	10
<b>2.2.5 Gostiteljske rastline</b>	<b>11</b>
2.3 IZVOR IN MIGRACIJE <i>P. infestans</i>	13
2.4 BOLEZENSKA ZNAMENJA	14
2.5 RAZVOJ IN ŠIRJENJE BOLEZNI	16
2.6 VARSTVO PRED KROMPIRJEVO PLESNIJO	20
2.7 ODPORNOST <i>P. infestans</i> PROTI FUNGICIDOM	20
<b>2.7.1 Fungicidi za zatiranje krompirjeve plesni</b>	<b>20</b>
<b>2.7.2 Odpornost proti fungicidom iz skupine fenilamidov</b>	<b>22</b>
2.8 METODE OPISOVANJA RAZNOLIKOSTI POPULACIJ <i>P. infestans</i>	25
<b>2.8.1 Pomen raziskovanja raznolikosti populacij</b>	<b>25</b>
<b>2.8.2 Markerji za raziskovanje populacij <i>P. infestans</i></b>	<b>25</b>

2.9	ZNAČILNOSTI EVROPSKIH POPULACIJ KROMPIRJEVE PLESNI	26
2.10	GOSPODARSKI POMEN KROMPIRJEVE PLESNI	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	<b>31</b>
3.1	ZBIRANJE VZORCEV	31
<b>3.1.1</b>	<b>Vzorci za izolacijo <i>P. infestans</i></b>	<b>32</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Vzorci za ugotavljanje oospor</b>	<b>32</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Vzorci DNK <i>P. infestans</i> iz okuženih listov krompirja in paradižnika</b>	<b>33</b>
3.2	IZOLACIJA ORGANIZMA IN SHRANJEVANJE IZOLATOV	34
3.3	UGOTAVLJANJE PARITVENEGA TIPA IZOLATOV <i>P. infestans</i>	36
3.4	UGOTAVLJANJE ODPORNOSTI IZOLATOV <i>P. infestans</i> PROTI FUNGICIDU METALAKSILU	36
3.5	UGOTAVLJANJE NAVZOČNOSTI OOSPOR V LISTIH IN TLEH	37
<b>3.5.1</b>	<b>Neposreden pregled listov z mikroskopom</b>	<b>37</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Ekstrakcija oospor iz listov krompirja in paradižnika</b>	<b>38</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Test z vabo za ugotavljanje oospor v tleh</b>	<b>38</b>
3.6	DOLOČANJE GENOTIPOV <i>P. infestans</i> Z METODO ENOSTAVNIH PONOVLJIVIH SEKVENC	39
<b>4</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO</b>	<b>40</b>
4.1	VZORČENJE IN ZBIRKA IZOLATOV KROMPIRJEVE PLESNI	40
4.2	PARITVENI TIP KROMPIRJEVE PLESNI	41
4.3	ODPORNOST IZOLATOV <i>P. infestans</i> PROTI FUNGICIDU METALAKSILU	43
4.4	NAVZOČNOST OOSPOR V LISTIH IN TLEH	46
<b>4.4.1</b>	<b>Oospore v listih</b>	<b>46</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Oospore v tleh</b>	<b>48</b>
4.5	GENOTIPI <i>P. infestans</i>	50
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>59</b>
6.1	POVZETEK	59
6.2	SUMMARY	61
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>65</b>
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

## KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Nekaterne morfološke značilnosti <i>P. infestans</i> (Erwin in Ribeiro, 1996)	7
Preglednica 2: Zahteve <i>P. infestans</i> po temperaturi in vlagi (Schöber-Butin, 2001)	17
Preglednica 3: Aktivne snovi fungicidov za zatiranje krompirjeve plesni in tveganje za pojav odpornosti (Morton in Staub., 2008; FRAC Code List, 2015)	21
Preglednica 4: Vzorci za ugotavljanje navzočnosti oospor <i>P. infestans</i> v listih krompirja in paradižnika	32
Preglednica 5: Priprava gojišča za ugotavljanje odpornosti izolatov <i>P. infestans</i> proti metalaksilu	37
Preglednica 6: Število vzorcev krompirjeve plesni in uspešnost izolacije <i>P. infestans</i>	40
Preglednica 7: Paritveni tip pri izolatih <i>P. infestans</i> s krompirja in paradižnika, zbranih v letih 2002–2007	42
Preglednica 8: Število proti metalaksilu odpornih, srednje odpornih in občutljivih izolatov <i>P. infestans</i> s krompirja in paradižnika zbranih v letih 2002–2007	43
Preglednica 9: Izsek iz tabele rezultatov SSR genotipiziranja <i>P. infestans</i> za tri lokuse	51
Preglednica 10: Število vzorcev <i>P. infestans</i> z genotipi značilnimi za znana potomstva klonov in z edinstvenimi genotipi pri krompirju (K) in paradižniku (P) v letih 2002–2015	51
Preglednica 11: Paritveni tip in odpornost proti metalaksilu pri izolatih <i>P. infestans</i> z edinstvenimi genotipi, izoliranih s krompirja v letih 2002–2007	55



## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Sporangiji in sporangiofor <i>P. infestans</i>	7
Slika 2: Znamenja okužbe s krompirjevo plesnijo na zgornji (desno) in spodnji strani (levo) krompirjevega lista	14
Slika 3: Krompirjeva plesen na steblu krompirja	15
Slika 4: Krompirjeva plesen povzroča gnilobo gomoljev	15
Slika 5: Krompirjeva plesen na paradižniku	16
Slika 6: Sum na okužbo s krompirjevo plesnijo z oosporami iz tal, Vodice, 9. julij 2010	19
Slika 7: Razširjenost genotipov <i>P. infestans</i> določenih s SSR markerji v Evropi v letu 2014, kot je prikazana na spletni strani Euroblight (Sampling ..., 2015)	28
Slika 8: Lokacije vzorčenja krompirjeve plesni v letih 2002–2007, s katerih smo pridobili izolate	31
Slika 9: List samosevnega krompirja s številnimi lezijami krompirjeve plesni	33
Slika 10: FTA kartica z vzorcem DNK <i>P. infestans</i>	34
Slika 11: List, pripravljen za pregledovanje za navzočnost oospor <i>P. infestans</i>	38
Slika 12: Zastopanost paritvenega tipa A2 v odstotkih med izolati <i>P. infestans</i> s krompirja in paradižnika, zbranih v Sloveniji v letih 2002–2007	42
Slika 13: Karta razširjenosti paritvenih tipov A1 in A2 <i>P. infestans</i> v Sloveniji v letih 2002–2007	43
Slika 14: Odpornost izolatov <i>P. infestans</i> s krompirja proti fungicidu metalaksilu v letih 2002–2007	44
Slika 15: Odpornost izolatov <i>P. infestans</i> s paradižnika proti metalaksilu v letih 2002–2007	45
Slika 16: Odpornost krompirjeve plesni proti metalaksilu v Sloveniji v letu 2004	45

	Str.
Slika 17: Oospora <i>P. infestans</i> v sedimentu po ekstrakciji iz listov paradižnika	47
Slika 18: Oospora <i>P. infestans</i> ob žili v listu krompirja	48
Slika 19: Razširjenost posameznih skupin genotipov <i>P. infestans</i> v letu 2012	53
Slika 20: Razširjenost posameznih skupin genotipov <i>P. infestans</i> v letu 2014	54
Slika 21: Razširjenost posameznih skupin genotipov <i>P. infestans</i> v letu 2015	54
Slika 22: Pogostost genotipov v populaciji <i>P. infestans</i> s krompirja v letih med 2002 in 2015	55
Slika 23: Pogostost genotipov v populaciji <i>P. infestans</i> s paradižnika v letih med 2002 in 2015	56

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Gojišča za izolacijo, gojenje in shranjevanje *Phytophthora infestans*

PRILOGA B: Seznam izolatov *P. infestans* z rezultati odpornosti proti metalaksilu in  
paritvenih tipov

PRILOGA C: Seznam izolatov *P. infestans* z rezultati genotipizacije s SSR markerji

## 1 UVOD

### 1.1 POVOD ZA DELO

Krompirjeva plesen je v svetovnem merilu najpomembnejša bolezen krompirja, njen gostitelj je tudi paradižnik. Povzročajo jo glivam podoben organizem (plesnivka) *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, (deblo Oomycota, red Pythiales), ki je filogenetsko bolj soroden raznobičkastim algam kakor glivam (Rossman in Palm, 2006). Zaradi specifičnega načina razmnoževanja in širjenja, velike agresivnosti in prilagodljivosti pogosto povzročajo epifitocije. V pridelovalnih območjih krompirja v Evropi se je prvič pojavila v štiridesetih letih 19. stoletja in posledice te nove bolezni so bile katastrofalne. Pojav krompirjeve plesni v Evropi še danes velja kot primer za razlago pomena rastlinskih patogenov in njihovih možnih gospodarskih, socialnih in političnih vplivov (Zadoks, 2008).

Kljub dolgoletnemu sobivanju s to boleznijo in napredku znanosti človeku ni uspelo najti optimalnih rešitev za njeno zatiranje. Varstvo krompirja je močno odvisno od uporabe fungicidov, vendar pa je izbruhe bolezni, kljub pogosti rabi fungicidov, vse težje obvladovati, saj se patogen v obdobju zadnjih 35 let nenehno spreminja in prilagaja (Fry in sod., 2015). V državah z intenzivnim načinom pridelovanja krompirja in ugodnimi vremenskimi razmerami za razvoj bolezni morajo v eni rastni dobi opraviti 10 do 16 škropljenj, da ohranijo pridelok. V Evropi je gospodarska škoda, ki vključuje stroške varstva ter izgubo pridelka zaradi plesni, ocenjena na 900 milijonov evrov letno (Haverkort in sod., 2008). Intenzivna raba sistemskih fungicidov iz skupine fenilamidov, med katerimi je najbolj razširjen metalaksil, je povzročila naraščanje odpornih sevov v populaciji plesnivke *P. infestans* (Davidse, 1985; Dowley in sod., 2002). Posledično so se zaradi neučinkovitega varstva večale tudi izgube pridelka, kar je zahtevalo veliko bolj integriran pristop k varstvu rastlin.

Plesnivka *P. infestans* je heterotalična vrsta. V Mehiki, kjer je njen izvorni center, obstaja v obliki dveh paritvenih tipov, A1 in A2, ki sta oba potrebna za njeno spolno razmnoževanje. Tam je populacija genetsko zelo heterogena, oba tipa pa sta zastopana v skoraj izenačenem razmerju (Gallegly in Galindo, 1958; Goss in sod., 2014). Rezultat spolne oploditve je oospora z debelo celično steno, ki je, v nasprotju z drugimi strukturami, ki jih krompirjeva plesen oblikuje, sposobna dalj časa preživeti brez gostitelja in pozneje vplivati na potek razvoja bolezni. Spolno razmnoževanje tudi omogoča nastanek novih genotipov in s tem osebkov s spremenjenimi lastnostmi (Agrios, 2005).

Do 80-tih let 20. stoletja je bilo za populacijo krompirjeve plesni v Evropi značilno, da je bila zelo homogena. Navzoč je bil samo en paritveni tip in razmnoževala se je le vegetativno (Goodwin in sod., 1994), pozneje pa so se začela kazati vse bolj očitna

znamenja, da se populacija spreminja. Pojavil se je nov spolni paritveni tip plesni, ki je omogočil spolno razmnoževanje (Hohl in Inselin, 1984). Nova populacija je bila bolj raznolika (Fry in sod., 1991). Bolezen se je začela pojavljati bolj zgodaj v rastni dobi (Hannukkala in sod., 2007; Wiik, 2014), postala je bolj agresivna (Flier in sod., 1998). Nekatere sorte, ki so prej veljale za odporne, so postale dovzetne za okužbo (Lees in sod., 2012). Spremembe pri pojavljanju bolezni na krompirju in paradižniku smo po letu 1990 začeli opazovati tudi v Sloveniji.

Težave z obvladovanjem bolezni so v Evropi in drugje v svetu izzvale intenzivno raziskovalno dejavnost. V številnih evropskih državah so začeli raziskovati populacije krompirjeve plesni. Ključna vprašanja so bila: kakšna je stopnja odpornosti proti metalaksilu in kako se spreminja, kakšna je zastopanost novega spolnega paritvenega tipa A2, ali je nova populacija sposobna spolnega razmnoževanja ter kakšno vlogo imajo oospore pri razvoju bolezni? Odgovori so se med posameznimi državami precej razlikovali. Veliko število raznolikih rezultatov v evropskem prostoru in splošna ugotovitev, da se populacija hitro spreminja, so nakazali potrebo po enovitem pristopu k spremljanju populacij, da bi lahko pridobljene rezultate analizirali na ravni regij, držav in na mednarodnem nivoju (Cooke in sod., 2012b). Mreža evropskih znanstvenikov, specialistov za bolezni rastlin in strokovnjakov iz fitofarmacevtske industrije, ki deluje v okviru Euroblight iniciative, je zato razvila sistem organiziranega vzorčenja, zbiranja podatkov o fenotipu in genotipu plesni in izdelave kart, ki prikazujejo geografsko razširjenost posameznih genotipov ter osnovala bazo podatkov. Nove tehnike, kot je metoda genotipiziranja na osnovi enostavnih ponovljivih sekvence (SSR), zdaj že omogočajo delo z večjim številom vzorcev, ki je potrebno za raziskave populacij (Euroblight ..., 2015).

Raziskave krompirjeve plesni v Sloveniji so bile v preteklosti omejene predvsem na preizkušanje fungicidov ali drugih alternativnih metod za njeno zatiranje in na preizkušanje odpornosti sort v poljskih razmerah. Izkušenj z laboratorijskim delom s *P. infestans*, kot je izolacija, gojenje in shranjevanje *in vitro* ni bilo in zaradi tega tudi nobenih podatkov o značilnostih populacije.

Spremembe v populaciji neposredno vplivajo na učinkovitost uporabe fungicidov, na razvoj in uporabnost odpornih sort (Lees in sod., 2012) ter na učinkovitost sistemov za napovedovanje pojava krompirjeve plesni (Cooke in sod., 2011). Aktualni podatki o populaciji krompirjeve plesni so zaradi vpliva bolezni na pridelavo krompirja pomembni v prvi vrsti za pridelovalce in tudi za vse, ki jim svetujejo glede varstva. Pomembni so tudi za zlahnitelje in proizvajalce fitofarmacevtskih sredstev. Poznavanje značilnosti populacije je v pomoč pri izboljšavah strategij integriranega varstva.

## 1.2 NAMEN RAZISKAVE IN DELOVNE HIPOTEZE

Edina raziskava o značilnostih populacije krompirjeve plesni je v Sloveniji potekala v letih 2002 do 2005. Podatke o paritvenih tipih in odpornosti proti metalaksilu, ki smo jih zbrali v tem obdobju, smo dopolnili še z rezultati vzorčenja v letu 2007, da bi dobili realno predstavo o problemu odpornosti proti fenilamidom (metalaksilu) in razširjenosti novega paritvenega tipa A2 v Sloveniji. Pri izolatih, shranjenih v zbirki iz tega obdobja, smo želeli z analizami genotipa na osnovi SSR, ki so jih opravili v laboratoriju James Hutton Institute na Škotskem, ugotoviti, kakšna je bila v Sloveniji zastopanost potomstev klonov, ki so bili razširjeni tudi drugje v Evropi in te podatke primerjati z novejšimi podatki genotipiziranja iz let 2012, 2014 in 2015. Na osnovi raznolikosti genotipov smo želeli dognati, ali se v Sloveniji *P. infestans* razmnožuje tudi spolno. Kot neposreden dokaz za obstoj spolnega razmnoževanja smo iskali oospore v tkivih okuženega krompirja in paradižnika ter v tleh. Če se *P. infestans* razmnožuje tudi spolno, je potrebno to upoštevati pri pridelavi krompirja, saj je v tem primeru priporočljiv širši kolobar.

Podatki o odpornosti v populaciji, o razmnoževanju krompirjeve plesni in o zastopanosti agresivnih dominantnih genotipov bodo uporabni pri svetovanju glede varstva proti tej bolezni. Namen naloge je tudi vpeljava sistema vsakoletnega ali vsaj občasnega spremljanja populacije krompirjeve plesni v Sloveniji z vzorčenjem s FTA karticami in tehniko hitrega genotipiziranja. To bi tudi v prihodnje omogočilo dobro načrtovanje varstva krompirja in paradižnika v skladu z aktualnim stanjem v populaciji. Zbrane podatke o populaciji v Sloveniji bomo prispevali v skupno bazo Euroblight, kjer bodo uporabni za nadaljnje raziskave o biologiji, genetiki, epidemiologiji in varstvu pred boleznijo. Eden od ciljev raziskave je tudi osnovanje zbirke izolatov *P. infestans* z znanimi karakteristikami, ki bo na voljo za nadaljnje raziskave v Sloveniji, npr. pri žlahtnjenju krompirja na odpornost proti krompirjevi plesni ali za preizkušanje učinkovitosti fungicidov.

V raziskavi smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

1. Spremembe v populaciji *P. infestans* v nekaterih evropskih državah, ki so opisane v literaturi, se odražajo tudi v populaciji v Sloveniji.
2. V Sloveniji obstajata oba paritvena tipa krompirjeve plesni.
3. V populaciji krompirjeve plesni so sevi odporni na fenilamide.
4. V rastlinah krompirja in/ali paradižnika se tvorijo oospore in je zato posledično večja tudi genetska raznolikost populacije.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KRATKA ZGODOVINA KROMPIRJEVE PLESNI

Čeprav so krompir kot hrano v Evropi dolgo zavračali, se je v začetku 19. stoletja že dobro uveljavil zlasti zato, ker je dal na enoto površine dvakrat več hranil kot žita. V nekaterih deželah, na primer na Irskem, je postal glavno živilo, kar je bilo pogojeno predvsem s socialnimi in ekonomskimi dejavniki. Tamkajšnje klimatske razmere so bile za pridelavo krompirja zelo ustrezne in tudi bolezni in škodljivcev, ki bi ga ogrožale, ni bilo, zaradi česar se je pridelava žita zmanjšala (Agrios, 2005). Leta 1844 se je pojavila krompirjeva plesen v Belgiji na poskusnih poljih, kjer so preizkušali nove sorte krompirja iz Severne Amerike. Iskali so takšne z odpornostjo proti trohnobi gomoljev, ki jo je povzročala gliva iz rodu *Fusarium*. S temi gomolji krompirja so domnevno prineseli tudi povzročitelja krompirjeve plesni. Bolezen se je začela širiti in je v letu 1845 zajela večji del Evrope, Irsko in Britansko otočje (Zadoks, 2008).

Ugodne vremenske razmere z obilico padavin so tako v letih 1845 in 1846 kot tudi še nekaj naslednjih let, omogočale naglo širjenje bolezni. Krompirju je propadalo listje že na polju, gomolji so gnili, večina pridelka, ki so ga shranili za zimo, je zgnila. Sorte, ki so jih pridelovali so bile za povzročitelja bolezni zelo občutljive. Na Irskem, kjer alternativnih virov hrane ni bilo, je sledila huda lakota, ki so jo spremljali izbruhi nalezljivih bolezni. Ocenjujejo, da je zaradi posledic pojava plesni na Irskem umrlo 1,5 milijona ljudi, približno enako število pa se jih je izselilo, največ v Združene države Amerike (Agrios, 2005). Nekoliko manj hude, a vseeno zelo resne, so bile posledice pojava v kontinentalnem delu Evrope. V prvih letih pojava plesni je bila slaba letina tudi za druge kmetijske rastline zaradi rje na rži, glodavcev, močne pozebe ozimnih žit, suše in ponekod poplav in neurij. Pomanjkanje je povzročilo lakoto in splošno gospodarsko recesijo, nezadovoljstvo in socialne nemire, povečala se je revščina. Število smrti zaradi posledic krompirjeve plesni je v kontinentalni Evropi ocenjeno na približno 700.000. Ljudje so se selili tudi v Severno Ameriko, še več pa je bilo lokalnih migracij s podeželja v mesta in industrijska območja. Vrsta različnih dogodkov, vključno s krompirjevo plesnijo, naj bi botroval političnim spremembam v Evropi in pomladi narodov leta 1848 (Zadoks, 2008).

V Sloveniji se je krompir pojavil v obdobju med letoma 1730 in 1740, vendar so ga sprva uporabljali le za živinsko krmo, saj ga ljudje niso hoteli jesti. Oblast je načrtno spodbujala sajenje krompirja in prehranjevanje z njim. Z dvorno uredbo in navodili za sajenje, ki jih je l. 1767 izdala cesarica Marija Terezija in z ustanavljanjem prvih kmetijskih združenj, se je pospešilo pridelovanje krompirja (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). Prehranjevanje ljudi s krompirjem se je znatno povečalo potem, ko je po slabih žitnih letinah v letih od 1815 do 1817 nastopila lakota. Pridelovanje se je najprej razširilo na hribovitih in manj rodovitnih

zemljiščih na Pohorju, v okolici Ribnice in na Notranjskem. Na Kranjskem so ga sredi 19. stoletja gojili na 10 % njiv (Godina-Golija, 1998).

Kako je bilo s krompirjevo plesnijo v naših krajih, je po izvirnih zgodovinskih virih izčrpno opisal Maček (1979) v poročilu »Izbruh in širjenje krompirjeve plesni (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) na Kranjskem v 19. stoletju«. Glavni odbor Kranjske kmetijske družbe je o krompirjevi plesni razpravljal že novembra 1845, saj se je bolezen pri nas pojavila približno istočasno kot drugod po Evropi. V tistem letu je bila razširjena le na posameznih njivah v Kamniku, Mekinjah, Idriji, Kočevju in nekaterih drugih krajih. V večjem obsegu se je v vseh kranjskih okrožjih razširila že v letu 1846, še posebej močno na Dolenjskem in Notranjskem. Najmočnejše epifitocije so bile na Gorenjskem in Notranjskem v letih 1849 in 1850, na Dolenjskem pa leta 1851. Najhujši fitoftorni leti na Štajerskem sta bili 1846 in 1847. Bolezen je močno izbruhnila tudi leta 1889 (Maček, 1979) pa tudi leta 1916 in leta 1948, ko je zaradi deževnega poletja močno zmanjšala pridelek krompirja po celi Sloveniji (Janežič, 1951). Še dolgo po začetku izbruha ni bilo znano, zakaj se bolezen pojavi, zato tudi ukrepi, ki so jih svetovali za preprečevanje bolezni, niso bili učinkoviti. Po prvi svetovni vojni se je pridelava krompirja v Sloveniji začela povečevati in dosegla vrh leta 1957, ko je bilo s krompirjem posajenih 59.120 ha in je bil dosežen rekordni pridelek 983.000 ton (Statistični urad RS, 2015).

## 2.2 OPIS POVZROČITELJA

### 2.2.1 Taksonomski položaj

Še vedno ni povsem jasno, kako širše poimenovati skupino, kamor uvrščamo plesnivko *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, saj sta filogenija in taksonomija teh glivam podobnih organizmov še predmet raziskav. Zanje v slovenskem jeziku uporabljamo izraz plesnivke ali oomicete. Večina avtorjev jih uvršča v kraljestvo Chromista, nekateri v kraljestvo Stramenopila ali v širšo skupino Chromalveolata. V taksonomskem sistemu, ki so ga vpeljali Alexopoulos in sod. leta 1996, je rod *Phytophthora* v kraljestvu Stramenopila, deblo Oomycota, razred Oomycetes, red Peronosporales. Po razvrstitvi Kirk in sod. iz leta 2008 pa je uvrščena v kraljestvo Chromista, isto deblo in razred kot prej, vendar v red Pythiales (Ulloa in Hanlin, 2012). V spletni zbirki podatkov o škodljivih organizmih Q-bank, je *Phytophthora infestans* razvrščena kot: Incertae sedis, Chromista, Oomycota, Oomycetes, Pythiales, Pythiaceae (Q-bank ... , 2015).

Tradicionalno so plesnivke v mikologiji in fitopatologiji obravnavali kot glive, saj pridobivajo hranila z absorpcijo organskih snovi in mnoge od njih tvorijo nitast micelij, ki je sicer značilen za glive. Plesnivke so diploidi (glive so haploidi ali imajo dvojedrne celice) in njihova celična stena ne vsebuje hitina, kot je to značilno za glive, temveč je



zgrajena iz beta glukana in celuloze. Imajo zoospore z dvema različno oblikovanima bičkoma. Micelij pri plesnivkah sestavljajo hife, ki niso septirane. Celice hif vsebujejo diploidna jedra (Rossman in Palm, 2006).

Belgijska botaničarka in mikologinja Marie Anne Libert je bila prva, ki je pojav bolezenskih znamenj krompirjeve plesni na krompirju povezala z glivo, ki jo je tudi opisala in poimenovala *Botrytis vastatrix* ter to objavila leta 1845. Še v istem letu so svoje opise povzročitelja objavili tudi drugi avtorji: Montagne je izbral ime *Botrytis infestans*, Desmazieres pa *Botrytis fallax*. V naslednjih letih se je s taksonomijo, morfologijo in biologijo krompirjeve plesni ukvarjalo še mnogo raziskovalcev. Med njimi je krompirjevo plesen zelo poglobljeno proučeval tudi nemški zdravnik, botanik in mikolog Heinrich Anton de Bary in svoje raziskave združil v monografijo, ki je izšla leta 1861. Med letoma 1847 in 1876 so povzročitelja krompirjeve plesni uvrščali v rod *Peronospora* (*Peronospora trifurcata* Unger, *Peronospora fintelmanni* Caspary, *Peronospora infestans* Caspary, *Peronospora devastatrix* (Libert) Caspary), dokler ni de Bary leta 1876 osnoval nov rod *Phytophthora* in je obveljalo poimenovanje *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (Schöber-Butin, 2001).

### 2.2.2 Morfološki opis *P. infestans*

*P. infestans* ima neseptiran, razvejan, brezbarven micelij z več jedri. Premer hif je spremenljiv in meri od 5 do 8  $\mu\text{m}$ . Micelij v tkivu raste intercelularno in v celice prodira s havstoriji. Na specializiranih hifah (sporangioforih) nastajajo trosovniki (sporangiji). Sporangiofori so razvejani, ob koncu vsakega razvejanja se razvije sporangij (slika 1). Na spodnjem delu ima sporangij pecelj (pedicel), ki je s pregrado ločen od sporangiofora, na nasprotni strani pa razločno izoblikovano papilo. Sporangiji so namenjeni nespolnemu razmnoževanju, ki lahko poteka na dva načina: sporangiji lahko funkcionirajo kot konidiji in sami neposredno kalijo s kličnim mešičkom ali pa v njih nastane več gibljivih zoospor, ki na mestu papile prehajajo na prosto. V takem primeru, ko razmnoževanje poteka z zoosporami, govorimo o posredni kalitvi trosovnikov. Do neposredne kalitve pride predvsem pri temperaturah nad 15 °C. Za posredno kalitev s sproščanjem zoospor so ugodne nižje temperature in potrebna je navzočnost vode. Zoospore ledvičaste oblike so enojedrne in imajo dva bička, s pomočjo katerih se gibljejo. Ob stiku s površino, kot je na primer list, bički odpadejo in zoospora se obda s steno (encistira), nato kali (Schöber-Butin, 2001). Oospore, ki nastanejo ob spolni oploditvi po združitvi obeh starševskih celic (anteridija in oogonija), imajo debelo celično steno in omogočajo ohranjanje fitofora daljši čas, tudi v neugodnih razmerah (Erwin in Ribeiro, 1996).

Podatki, ki omogočajo identifikacijo *P. infestans* z morfometrijskimi in molekularnimi metodami, so na voljo tudi v javno dostopni evropski bazi škodljivcev in bolezni Q-bank.

Da so morfološke značilnosti vrste precej variabilne, je opazno iz primerjave podatkov, povzetih po Erwin in Ribeiro (1996) (preglednica 1), kjer so združeni podatki več raziskovalcev, in tistimi v bazi Q-bank, kjer se podatki nanašajo na meritve referenčnih izolatov v zbirki (Q-bank ... , 2015).

Preglednica 1: Nekateri morfološke značilnosti *P. infestans* (Erwin in Ribeiro, 1996)

Table 1: Some morphological characteristics of *P. infestans* (Erwin and Ribeiro, 1996)

Morfološka značilnost	Opis
Hifne zadebelitve	ne
Klamidospore	ne
Razvejanost sporangioforov	simpodij, sestavljeni simpodij; značilna odebelitev na sporangioforu pod sporangijem
Sporangiji odpadajo s sporangiofora	da
Dolžina pedicela sporangija ( $\mu\text{m}$ )	<3
Oblika sporangija	jajčasta, eliptična do limonasta
Dolžina sporangija ( $\mu\text{m}$ )	21–38
Širina sporangija ( $\mu\text{m}$ )	12–23
Povprečne mere sporangija ( $\mu\text{m}$ )	29 x 19
Razmerje dolžina:širina	1,6
Izraženost papile na sporangiju	SP (semipapila)
Nastanek oospor	heterotalična vrsta
Položaj anteridija	oogonij zraste skozi anteridij (amphigynous)
Velikost anteridija (povprečje, $\mu\text{m}$ )	17 x 16
Premer oogonija ( $\mu\text{m}$ )	31–50
Premer oospore ( $\mu\text{m}$ )	24–35 (povprečno 30) v tkivu listov, 24–56 na umetnem gojišču
Debelina stene oospore ( $\mu\text{m}$ )	3,5



Slika 1: Sporangiji in sporangiofor *P. infestans*

Figure 1: Sporangia and sporangiophore of *P. infestans*

### 2.2.3 Genom *P. infestans*

Genom *P. infestans* je v skupini Chromalveolata največji in najbolj kompleksen od doslej sekvenciranih in s približno 240 megabazami (Mb) mnogo večji od sorodnih vrst *Phytophthora sojae* (95 Mb) in *Phytophthora ramorum* (65Mb), ki sta tudi rastlinska patogena. Njegova obsežnost izhaja iz ponavljajočih se pomnožitev zaporedij DNK, vmeščenih med predele z ohranjenim zaporedjem genov in predstavljajo tri četrtine celotnega genoma. Na teh razširjenih dinamičnih regijah genoma so locirani efektorski geni, ki kodirajo izločanje proteinov pomembnih v patogenezi. Efektorski proteini spreminjajo fiziologijo gostitelja in omogočijo naselitev patogena. So zelo raznoliki in številni, kar verjetno igra ključno vlogo pri hitri prilagodljivosti *P. infestans* na gostiteljske rastline (Haas in sod., 2009). Podatki o genomu so uporabni pri raziskavah in razvoju novih metod za proučevanje *P. infestans*. Nekateri SSR markerji, ki se uporabljajo za analizo populacij *P. infestans*, so nastali z uporabo sekvenc genoma (Govers in Gijzen, 2006; Lees in sod., 2006).

### 2.2.4 Razmnoževanje *P. infestans*

Krompirjeva plesen se razmnožuje nespolno in spolno. Razlog, da lahko v kratkem času opustoši polja krompirja, je predvsem v njeni sposobnosti za hitro, ciklično, nespolno razmnoževanje, v katerem nastaja ogromno število sporangijev. Tako nastajajo potomstva klonov, ki vsa izvirajo iz ene rekombinacije, ki se je zgodila pri spolnem razmnoževanju. Osebki v potomstvu klona so si med seboj fenotipsko podobni. Med seboj se razlikujejo le zaradi mutacij ali mitotskih rekombinacij (Goodwin, 1997; Fry in sod., 2015). Nove, drugačne lastnosti nastajajo predvsem pri spolnem razmnoževanju.

#### 2.2.4.1 Paritveni tip in oploditev

Fitoftore so glede spolnega razmnoževanja lahko homotalične ali heterotalične. Heterotaličnost pomeni, da ima organizem moške in ženske spolne organe ločeno, vsakega na drugem talusu in sta oba potrebna, da pride do spolnega razmnoževanja (Ulloa in Hanlin, 2012). Večina avtosterilnih izolatov heterotaličnih vrst fitoftor oblikuje oospore z izolati nasprotnega paritvenega tipa, ki pripada isti vrsti, vendar lahko oospore nastanejo tudi pri parjenju s kompatibilnimi izolati drugih vrst. *P. infestans* je heterotalična vrsta in oospore nastanejo, če raste skupaj oba paritvena tipa, ki ju označujemo z A1 in A2. Več kot stoletje po odkritju, da *P. infestans* povzroča krompirjevo plesen, so si fitopatologi prizadevali najti njen spolni stadij (Galindo in Gallegly, 1960). Prvič so oba paritvena tipa našli v Mehiki v skoraj izenačenem razmerju, tako na različnih vrstah iz rodu *Solanum* na naravnih rastiščih kot na gojenem krompirju. Našli so tudi oospore v naravno okuženih listih krompirja (Gallegly in Galindo, 1958).

Zanimanje za spolno razmnoževanje *P. infestans* se je zelo povečalo po letu 1981, ko so prvi primer krompirjeve plesni paritvenega tipa A2 odkriti v Švici in sta o tem poročala Hohl in Iselin (1984). Pozneje je bil odkrit tudi na izolatu iz leta 1980 v Nemčiji (Daggett in sod., 1993). Dotlej je bil razširjen le paritveni tip A1, kar je izključevalo možnost spolnega razmnoževanja krompirjeve plesni. Predvideva se, da je bil paritveni tip A2 vnešen v letu 1976, ko so v Evropo zaradi slabe letine uvozili večje količine krompirja iz Mehike (Goodwin, 1997).

Da so opazili oospore v kulturah *P. infestans* in tudi na rastlinskem materialu, je v prvi polovici 20. stoletja poročalo več raziskovalcev v Evropi in ZDA, po čemer bi lahko sklepali, da je bil paritveni tip A2 navzoč v populaciji že prej (Schöber-Butin, 2001). Hipotezo, da je se je A2 paritveni tip lahko razvil iz potomstva A1 tipa po stimulaciji nastanka oospor s paritvenimi tipi A2 drugih vrst fitoflor ali zaradi kakšnih drugih dražljajev, je postavil Ko (1994). Mnenje o soobstoju obeh paritvenih tipov v populacijah *P. infestans* izven Mehike pred letom 1976 so zavrnili kot slabo dokumentirano in nedokazano. Obveljalo je, da paritveni tip A2 izvira iz Mehike, njegov pojav v Evropi in Severni Ameriki pa je povezan z migracijami krompirjeve plesni (Goodwin in Drenth, 1997).

Oploditev pri fitoflorah poteka tako, da konica hife, ki predstavlja ženski gametangij (oogonij), zraste skozi razširjeno hifo moškega gametangija (anteridij). Po mejozi jedro iz anteridija vstopi v oogonij in ta se poveča v okroglo strukturo, v kateri se nato oblikuje ena oospora s celično steno, ki je skoraj v celoti zgrajena iz glukanov (Erwin in Ribeiro, 1996). Nadaljnje raziskave pri parjenju obeh tipov po najdbi v Mehiki so pokazale, da je vsak izolat, ne glede na paritveni tip, dvospolen in lahko na enem talusu nastanejo tako anteridiji kot oogoniji in gre torej za fiziološki heterotalizem oziroma kompatibilnost (Galindo in Gallegly, 1960). Pozneje je bilo opravljenih še več raziskav o dedovanju paritvenega tipa in o mehanizmih uravnavanja procesa oploditve s paritvenimi hormoni (Fry in sod., 2015).

Razmerje med paritvenima tipoma je pomembno, saj večja izenačenost med obema poveča možnost spolnega razmnoževanja, s tem pa se poveča tudi variabilnost populacije. Možnost pojava agresivnih sevov je zato večja, hitreje se ustvarja odpornost na fungicide, hitrejše je tudi premagovanje gensko pogojene odpornosti sort krompirja (Fry in Goodwin, 1997). V mnogih državah so zato začeli z monitoringom populacij, da bi zaznali pojav paritvenega tipa A2 in ugotovili, kakšna je njegova zastopanost. Paritveni tip A2 je bil sprva v nekaterih delih Evrope, npr. v Veliki Britaniji in Franciji, na krompirju slabo zastopan (Shattock in sod., 1990; Cooke in sod., 1995; Knapova in Gisi, 2002; Cooke in sod., 2003; Day in sod., 2004; Duvauchelle in sod., 2009). V Angliji in Walesu je bil delež paritvenega tipa A2 med letoma 1985 in 1988 približno 10 % (Shattock in sod., 1990). Delež paritvenega tipa A2, ki je bil v Republiki Irski prvič najden v letu 1988, v naslednjih desetih letih ni presegel 4 odstotke letno (Dowley in sod., 2002). Prvi izolat *P. infestans*

paritvenega tipa A2 je bil v Severni Irski odkrit leta 1987 in do leta 1993 je bilo med izolati s krompirja le 3 % takšnih s paritvenim tipom A2, kar je nižja pojavnost, kot so jo zaznali v Angliji, Walesu ali Republiki Irski. Med odpornostjo proti metalaksilu in vrsto paritvenega tipa niso ugotovili nobene povezave (Cooke in sod., 1995).

V Evropi so veliko zastopanost A2 paritvenega tipa (44 %) najprej ugotovili na Poljskem leta 1989 in hkrati tudi povečano raznolikost genotipov ter velik delež edinstvenih genotipov, česar v populaciji, ki se razmnožuje vegetativno, ne bi pričakovali. Med izolati iz obdobja med letoma 1985 do 1987 še ni bilo paritvenega tipa A2, genotipi so pripadali dotlej v Evropi znanim potomstvom klonov (Sujkowski in sod., 1994). Pri ponovni analizi zastopanosti paritvenih tipov v letu 2009 je bilo 30 % paritvenega tipa A2 (Chmielarz in sod., 2014). Na severu Evrope (Norveška, Finska) je bil delež A2 tipa v letih 1993–1996 med 15 in 25 % (Hermansen in sod., 2000), pozneje pa za nordijske dežele (Danska, Finska, Norveška, Švedska) že približno 40 % (Lehtinen in sod., 2008; Brurberg in sod., 2011), kar je, glede na precej izenačeno razmerje med obema tipoma, ugodno za spolno razmnoževanje. Veliko nihanje deleža paritvenega tipa A2 med leti in območji (od 4 do 56 %) so sredi devetdesetih let 20. stoletja ugotavljali na Nizozemskem (Zwankhuizen in sod., 2000). Razmerje med paritvenima tipoma se v populaciji lahko zamenja v nekaj letih. Ni znano, kateri dejavniki vplivajo na selekcijo za paritveni tip, saj lastnosti, kot so odpornost na fungicid, agresivnost ali SSR genotip, niso genetsko povezane s paritvenim tipom (Gisi in sod., 2011).

Obstoj spolnega razmnoževanja so v nekaterih državah dokazali neposredno z najdbo oospor v listih krompirja in paradižnika ali v tleh na polju in z ugotavljanjem njihove funkcionalnosti, drugje so o njem sklepali posredno iz rezultatov genotipizacije (Gisi in sod., 2011).

#### 2.2.4.2 Značilnosti oospor

Oospore v tleh so pri *P. infestans* pomembne za dolgotrajno preživetje patogena, za neposredno okužbo gomoljev v tleh, kot primarni inokulum in za samo variabilnost populacije patogena (Andrison, 1995). Nastajajo pri temperaturah med 5 in 25 °C. Njihova številčnost v listih je bila največja (tudi do 6000 oospor na cm<sup>2</sup> lista), če so nastajale pri 10 °C. Preživetje oospor pri temperaturah od –80 do 35 °C je bilo dobro, toda pri 48 urni izpostavljenosti temperaturam nad 40 °C so izgubile vitalnost (Drenth in sod., 1995).

Pojavljane oospore na rastlinah so na vzorcih z več lokacij pri krompirju in paradižniku opazovali Turkensteen in sod. (2000). Kako neenakomerno so bile oospore zastopane v rastlinskih vzorcih, kažejo njihove ugotovitve. Na treh lokacijah od štirih so našli oospore v plodovih paradižnika (v 12 od 35 pregledanih plodov). Od 20 pregledanih lističev

paradižnika so bile oospore v osmih, pri krompirju pa le v štirih od 60 pregledanih. Pri krompirju za škrob je bilo 12 lističev z oosporami od 198. Pri samosevni krompirjih so bile oospore v 33 do 87 % lističev. V obdobju vzorčenja je bilo razmerje med A1 in A2 v populaciji 1:3.

Cohen in sod. (1997) so pri poskusih v laboratoriju ugotovili, da so nekateri pari A1 in A2 bolj fertilni kot drugi. V poskusih z mešanico sporangijev obeh tipov v različnih razmerjih so opazili, da že majhen delež enega paritvenega tipa (A1:A2=1:19 ali obratno) v inokulacijski suspenziji omogoči nastanek oospor v listih krompirja ali paradižnika. Na paradižniku je nastalo več oospor kot na krompirju. Optimalna temperatura za njihov razvoj je bila 8 do 15 °C. Prve so nastale v 8 do 10 dneh po inokulaciji, njihovo število pa je doseglo najvišjo raven po 17 do 23 dneh. Za nastanek oospor je bil pogoj neprekinjena visoka vlažnost, saj pri 50 do 80 % relativne zračne vlage niso nastale, čeprav so se na listih razvile značilne pege plesni. V okuženih listih, ki so plavali na površju vode, je nastalo največ oospor, tudi do 100 na mm<sup>2</sup>.

Preživetje oospor je trajalo v glinastih tleh 34 mesecev, v peščenih pa 48 mesecev. V glinastih tleh se je infektivnost zmanjševala hitreje kot v peščenih. Najvišja infektivnost, merjena s številom peg v testu z vabo, je bila ugotovljena v glinastih tleh po 7 mesecih in v peščenih po 28 mesecih. Sezonskega vpliva na infektivnost niso opazili (Turkensteen in sod., 2000). Oospore ostanejo vitalne, tudi če so izpostavljene nizkim temperaturam in sposobnost, da preživijo zimo v tleh, omogoča okužbe v novi rastni dobi, kar lahko pomembno vpliva na epifitotologijo in zatiranje bolezni (Lehtinen in Hannukkala, 2004; Andersson in sod., 1998). Oospore v naravno okuženem krompirju ali paradižniku so našli na Nizozemskem (Drenth in sod., 1995), v Nemčiji (Götz, 1991), na Švedskem (Andersson in sod., 1998), Norveškem (Hermansen in sod., 2000) in pozneje tudi v drugih državah.

### 2.2.5 Gostiteljske rastline

*P. infestans* je v primerjavi s številnimi drugimi vrstami iz rodu *Phytophthora* ozko specializirana predvsem na rastline iz družine razhudnikovk (Solanaceae). Za kmetijstvo sta pomembna gostitelja krompir (*Solanum tuberosum* L.) in paradižnik (*Solanum lycopersicum* L. (sin. *Lycopersicon esculentum* Mill.)). Za območje Slovenije v literaturi ni zapisov o najdbi *P. infestans* na kakšnem drugem gostitelju, razen na paradižniku in krompirju.

V obširnem seznamu gostiteljskih vrst (Erwin in Ribeiro, 1996) je navedenih kar 46 različnih vrst iz rodu *Solanum*, vrste iz rodov *Petunia*, *Datura*, *Physalis* in *Mirabilis* ter tudi vrste, ki niso iz družine razhudnikovk. Številne od teh vrst so bile prepoznane kot gostitelji na osnovi umetnih okužb, naravno okužene rastline pa niso bile nikoli najdene. Po umetni inokulaciji uspe okužba celo na listih javorja (*Acer* sp.), lipe (*Tillia* sp.) in bukve

(*Fagus* sp.) (Schöber-Butin, 2001). Zaradi morfološke podobnosti vrst nekateri podatki o gostiteljih temeljijo tudi na napačni določitvi vrste povzročitelja. V primeru plesni na navadni nočni lepotici (*Mirabilis jalapa* L.), ki je domorodna rastlina v Srednji Ameriki, v drugih delih sveta pa razširjena kot okrasna rastlina, je bilo ugotovljeno, da je povzročitelj bolezenskih znamenj, ki so ga sprva identificirali kot *P. infestans*, druga vrsta iz rodu *Phytophthora*. Izolati plesni s te rastline niso okužili krompirja in paradižnika, hkrati pa sta Galindo in Hohl (1985) zaznala tudi manjše morfološke razlike ter povzročitelja opisala kot novo vrsto *P. mirabilis* Galindo & H.R. Hohl. Da gre za samostojno vrsto in ne le podvrsto ali forma specialis *P. infestans*, je bilo pozneje potrjeno tudi z uporabo več molekularnih markerjev in ugotovitvijo, da poleg specializacije za gostitelja obstaja tudi mehanizem reproduktivne izolacije. Iz F1 interspecifičnih hibridov s *P. infestans* ni bilo možno dobiti F2 potomstva (Goodwin in sod., 1999). Podobno so iz vrste *P. infestans* izločili še vrste *P. ipomoeae* Flier & Grünwald (gostitelj *Ipomoea longipedunculata* M. Martens & Galeotti in *P. andina* Adler & Flier (gostitelj *Solanum betaceum* Cav.). Slednja je medvrstni hibrid *P. infestans* in druge neznane *Phytophthora* vrste (Lassiter in sod., 2015).

O okužbi jajčevca (*S. melongena* L.) s *P. infestans*, ki je v nekaterih delih sveta gospodarsko zelo pomembna gojena rastlina, je le malo starejših zapisov, čeprav je pogosto omenjen kot gostitelj (Hoffmann in Schmutterer, 1983; Erwin in Ribeiro, 1996). Nedavno je bil prvi pojav *P. infestans* na jajčevcu ugotovljen v Egiptu (El-Ganainy in sod., 2014), kjer se je bolezen dotlej pojavljala le na krompirju in paradižniku. Test patogenosti je pokazal, da je bil izolat z jajčevca virulenten tako za paradižnik kot za krompir.

Petunije in njihovi hibridi (*Petunia* Juss., *Petunia* x *hybrida* Hort.) so gostitelji za *P. infestans* in tudi škode, ki nastanejo ob okužbi, so lahko znatne. O tem sta v ZDA pisala Deahl in Fravel (2003) ob pojavu bolezni na petunijah v zavarovanem prostoru. Opozarjala sta na možnost prenosa bolezni na druge rastline iz družine razhudnikovk, saj so bili izolati *P. infestans* s petunij patogeni tudi za krompir in paradižnik. Okužbe petunij so ugotovili tudi v Južni Afriki, ravno tako v rastlinjaku (McLeod in Coertze, 2006).

Nekatere razhudnikovke so v Evropi razširjene tudi kot plevel, zato so bile predmet raziskave zaradi njihove morebitne vloge pri širjenju bolezni. Na Irskem so našli s *P. infestans* okužene rastline grenkoslada (*Solanum dulcamara* L.) v bližini krompirišč, kjer je bila plesen že razširjena. Genotip izolatov z grenkoslada je bil podoben genotipu *P. infestans* s krompirja na območju najdbe. Ocenili so, da ni dokazov, da bi okužba grenkoslada vplivala na prezimitev *P. infestans* (Cooke in sod., 2002). Tudi na Nizozemskem so našli pasje zelišče (*Solanum nigrum* L.), grenkoslad in trnati paradižnik (*S. sisymbriifolium* Lam.) s pegami, ki jih je povzročila *P. infestans*. Izolati so bili obeh paritvenih tipov in vsi patogeni za krompir in paradižnik. Ker so bile okužbe na polju

relativno redek pojav, so predvidevali, da plesen na teh gostiteljih ne more bistveno prispevati k razvoju bolezni na krompirju, vendar jih kljub temu lahko štejemo med alternativne gostitelje za *P. infestans*. V vseh treh gostiteljih so našli tudi oospore, ki so bile precej številne pri vrsti *S. sisymbriifolium*. Za oospore so domnevali, da bi lahko predstavljale vir za okužbe v naslednjih letih (Flier in sod., 2003). Raziskavo o okužbah grenkoslada s plesnijo so pozneje objavili še Golas in sod. (2010) in prišli do zaključka, da zaradi redkosti okužb in nesposobnosti prezimitve grenkoslad ne bi mogel vplivati na epidemiologijo krompirjeve plesni. V nekaterih državah Srednje in Južne Amerike, na Novi Zelandiji, v Avstraliji in Indiji je pomembno gojenje pepina (*Solanum muricatum* Ait.), v Kolumbiji pa gojenje perujskega volčjega jabolka (*Physalis peruviana* L.), ki sta prav tako gostitelja krompirjeve plesni (Mohan in sod., 2000; Adler in sod., 2002; Vargas in sod., 2007).

### 2.3 IZVOR IN MIGRACIJE *P. infestans*

Migracija krompirjeve plesni v 19. stoletju je bila pomemben mejnik v razvoju rastlinske patologije kot znanstvene discipline. Do odkritja, da krompirjevo plesen povzroča mikroorganizem, je prišlo 15 let pred potrditvijo Pasteurjeve teorije o mikrobih kot povzročiteljih bolezni in zavrnitvijo teorije o spontanem nastanku življenja (*generatio spontanea*) (Zadoks, 2008).

Prepričanje, da krompirjeva plesen izvira iz Mehike, se je utrdilo, ko sta bila tam najdena oba paritvena tipa v skoraj izenačenem razmerju (Gallegly in Galindo, 1958), dokončno pa je bilo potrjeno z obširnimi preučevanjem večjega števila izolatov *P. infestans* iz Andov in Mehike in s primerjavo z drugimi njej ozko sorodnimi vrstami (Goss in sod., 2014). Migracije krompirjeve plesni so pomemben vzrok za spremembe v populacijah. Do začetka osemdesetih let 20. stoletja je bila populacija v Evropi in tudi drugje po svetu homogena, prevladovalo je potomstvo enega klona (US-1). Ta genotip je bil edini, ki so ga našli pri izolatih, zbranih po letu 1950 (Goodwin in sod., 1994; Goodwin, 1997). Zanj so predvidevali, da je bil prenesen iz Mehike najprej v ZDA, kjer se je bolezen pojavila l. 1843, nato pa v Evropo in naj bi tudi povzročil prvi velik izbruh bolezni l. 1845. Iz Evrope, ki je s semenskim krompirjem oskrbovala dobršen del sveta, se je potomstvo tega klona razneslo na vse kontinente (Goodwin, 1997). Poznejše raziskave herbarijskega materiala so pokazale, da klon, ki je bil razširjen, ni enak tistemu, ki je povzročil zgodovinski izbruh bolezni v Evropi. Gre za soroden klon, ki so ga poimenovali HERB-1 (Yoshida in sod., 2013), plesen, ki je v Evropi prevladovala približno do leta 1980, pa je bila najverjetneje rezultat poznejših migracij. Novi genotipi *P. infestans*, ki so prišli v Evropo skupaj s paritvenim tipom A2 proti koncu 20. stoletja, ali so nastali s spolnim razmnoževanjem, so se hitro razširili v evropski populaciji (Dagget in sod., 1993; Drenth in sod., 1994) in se nato postopoma razširili s semenskim krompirjem po vsem svetu. Migracije krompirjeve

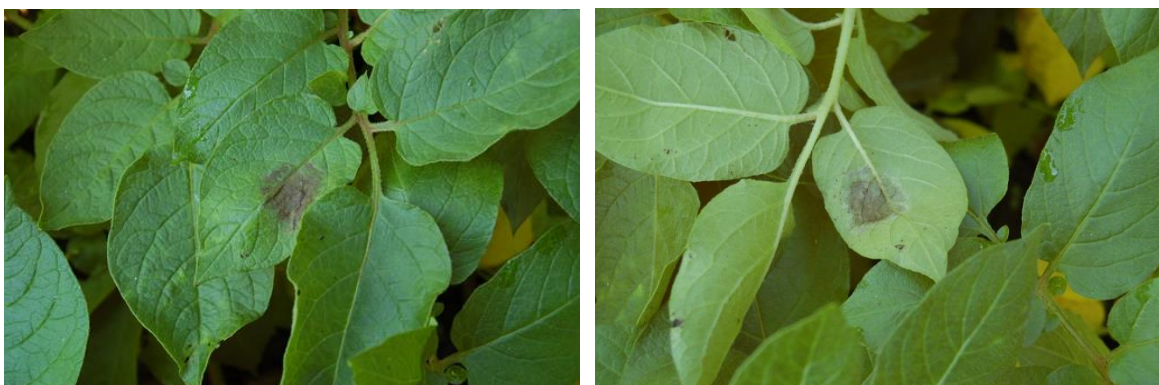


plesni se zaradi globalne trgovine dogajajo neprestano in tudi nenadzorovano. Semenski krompir je pogosto latentno okužen (Zellner in sod., 2011). Tako ni nenavadno, da so Chowdappa in sod. (2015) poročali o močnem izbruhu plesni na krompirju in paradižniku v južni Indiji, ki ga je povzročil agresiven klon z oznako EU\_13\_A2, razširjen v zadnjem desetletju v večjem delu zahodne Evrope. Do prenosa bolezni prihaja tudi s sadikami paradižnika (Fry in sod., 2015).

S sodobnimi metodami določanja genetske variabilnosti, kot je na primer analiza enostavnih ponovljivih sekvenc na več lokusih genoma, je omogočeno precej natančno sledenje posameznim genotipom *P. infestans*, kar je uporabno tudi pri nadzoru širjenja bolezni s sadilnim materialom.

## 2.4 BOLEZENSKA ZNAMENJA

Pri krompirju se na listih najprej pojavijo pege, ki izgledajo kot prepojene z vodo, največkrat na robovih spodnjih listov. Robovi peg niso ostro omejeni. V vlažnem vremenu se pege hitro večajo in porjavijo (Agrios, 2005). Na spodnji strani listov (slika 2) ob zadostni vlagi vidimo pege, obrobljene z belo plesnijo, ki jo sestavljajo trosonosci s trosovniki (sporangiji). V mokrem vremenu se bolezen širi okoli prvotne okužbe, ker veter raznese trosovnike po okolici. V nekaj dneh se posuši ali zgrije ves nasad. Okužen nasad oddaja vonj po plesni. Kadar je vreme suho, se pege posušijo in tudi bela plesen na robu peg se ne vidi več. Trosovniki, ki jih dež izpere v tla ali pa pridejo v stik z gomolji ob izkopu, okužijo gomolje in povzročijo njihovo gnitje (Janežič, 1951).



Slika 2: Znamenja okužbe s krompirjevo plesnijo na zgornji (desno) in spodnji strani (levo) krompirjevega lista

Figure 2: Late blight symptoms on the upper (left) and lower side (right) of potato leaf

Okužba stebel se pogosto začne na mestu, kjer listi izraščajo iz stebela (listna pazduha), ker se na tem mestu v vlažnem vremenu zadržujejo kaplje vode (slika 3). V njih zoosporangiji sprostijo zoospore, ki kalijo in prodrejo z infekcijsko hifo v tkivo. Patogen nato raste v listni pecelj in steblo, listi odpadejo ali pa se zasušijo in obvisijo na stebelu. Okužena stebela

so rjava do črna, vendar tkivo ostane suho in čvrsto, v nasprotju z bakterijskimi okužbami, kjer so stebela črna a mehka in povrhnjica zdrsne s stebela, če ga stisnemo s prsti. Poleg okužbe, ki se pričinja v zalistjih, se pojavlja tudi plesen na internodijih. Takšen tip bolezenskih znamenj se je pričel pogosteje pojavljati v devetdesetih letih 20. stoletja (Schöber-Butin, 2001). Po okužbi gomoljev nastanejo različno velike, rahlo uleknjene pege svinčeno sive barve in nepravilnih oblik. Pod pegami je meso gomolja rdečkasto rjavo in porjavelost se lahko širi vse do sredine gomolja (slika 4). Porjavelost mesa daje videz kosmičev ali pa je enakomerno razpršena in ni ostre meje med zdravim in obletim tkivom. Med skladiščenjem se bolezenska znamenja pod vplivom sekundarnih povzročiteljev gnitja spremenijo in cel gomolj postane mehka, kašasta gмота. Če je gomolj le malo okužen, bo rjavenje mesa v času skladiščenja napredovalo počasi (Hoffmann in Schmutterer, 1983).



Slika 3: Krompirjeva plesen na steblu krompirja  
Figure 3: Late blight on potato stem



Slika 4: Krompirjeva plesen povzroča gnilobo gomoljev  
Figure 4: Tuber rot caused by late blight

Pri paradižniku plesen okuži vse nadzemne dele. Majhne vodene pege se hitro razširijo v svetlo zelene in nato rjave lezije, ki prekrijejo cel list. Stebla porjavijo, cele rastline se lahko posušijo. Na plodovih so rjavkaste lise mastnega videza, ki se povečujejo, dokler ne zajamejo celega plodu (slika 5). Na plodovih se v vlažnem vremenu razvije plesniva prevleka (Jones in sod., 1991).

O bolezenskih znamenjih na jajčevcu ni veliko zapisov. Značilna bolezenska znamenja so v seznamu gostiteljskih rastlin *P. infestans* (Erwin in Ribeiro, 1996) opisana kot plesen na cvetni čaši in gniloba plodov. Avtorji preglednega članka o boleznih jajčevca v Indiji opisujejo bolezenska znamenja na listih kot sprva majhne temno zelene pege, ki izgledajo kot prepojene z vodo. Te se nato večajo, postanejo rjave in obdane z rumeno-zelenim robom. Okrog peg je na spodnji strani lista vidna bela plesniva obroba, na kateri nastajajo sporangiji. Ko bolezen napreduje, je rjavih peg vse več in vsa rastlina potemni in odmre. Rastlina, ki je močno okužena s plesnijo, ima značilen vonj, ki je rezultat nagle razgradnje listnega tkiva (Singh in sod., 2014). Pri pojavu plesni na jajčevcih v severnem Egiptu so El-Ganainy in sod. (2014) opisali bolezenska znamenja na listih kot značilne lezije v obliki črke »V«, okužene rastline pa so bile razporejene po polju v posameznih žariščih bolezni.



Slika 5: Krompirjeva plesen na paradižniku  
Figure 5: Late blight on tomato

## 2.5 RAZVOJ IN ŠIRJENJE BOLEZNI

Nespolno razmnoževanje je ključno za širjenje krompirjeve plesni. Ponavljajoči se nespolni ciklusi omogočajo hitro namnožitev in pojavljanje v obliki epifitocij. Temperatura in vlaga imata na razvoj in širjenje velik vpliv. V preglednici 2 so prikazane razmere, potrebne za procese rasti in razvoja *P. infestans*, kot jih je iz del več avtorjev zbrala Schöber-Butinova (2001). Kardinalne temperature za rast *P. infestans* so: minimum 4 °C, optimum 20 °C, maksimum 26 °C (Erwin in Ribeiro, 1996). Te temperature ne pomenijo,

da organizem izven tega temperaturnega območja ne more preživeti, saj ga je mogoče izolirati iz gomoljev, ki so bili ohlajeni na 1 °C in iz listov, ki so bili izpostavljeni temperaturi nad 30 °C (Schöber-Butin, 2001). Zmerne temperature med 10 in 25 °C, omočenost listov ali visoka zračna vlaga blizu 100 % so potreben pogoj za sporulacijo (Fry in sod., 2001). Sporangiji, ki prispejo na list, sprostijo zoospore, ki kalijo in prodrejo v tkivo. Do okužbe gomoljev pride s sporangiji, ki se v tla sperejo z lezij na listih ali steblih. Vir primarnih okužb v rastni dobi so poleg semenskega krompirja tudi samosevni krompirji in kupi odpadnega krompirja. V območjih, kjer se *P. infestans* razmnožuje spolno, so vir primarnih okužb tudi oospore v tleh (Fry in sod., 2001). Primarne okužbe se pojavijo relativno zgodaj v rastni dobi, prej kot sekundarne okužbe s sporangiji, ki se širijo po zraku. Primarni inokulum (kužilo), ki izvira neposredno z gomolja, se razvija že pred kalitvijo, predvsem takrat, kadar so vremenske razmere primerne za razvoj patogena in so tla vlažna, s temperaturami nad 10 °C (Powelson in sod., 2002). Raziskave, ki so temeljile na analizah DNK v gomoljih s tehniko PCR, so pokazale, da je v povprečju 10 % gomoljev semenskega krompirja v Evropi vidno ali latentno okuženih s *P. infestans* in kot taki potencialno vnašajo kužilo na polja (Zellner in sod., 2011).

Preglednica 2: Zahteve *P. infestans* po temperaturi in vlagi (Schöber-Butin, 2001)  
Table 2: Temperature and moisture requirements of *P. infestans* (Schöber-Butin, 2001)

	Temperatura	Vlaga	Čas
<b>Preživetje micelija</b>			
v listu	do 30 °C		24 do 36 ur pri 30 °C
v stebelu	do 34 °C		
v gomolju	0–43 °C		1 ura pri 43 °C
<b>Rast micelija</b>	4–26 °C	>85 %	
<b>Nastanek sporangijev</b>	2,7 °C	91–100 %	6 dni
	7,7–15 °C	91–100 %	24–48 ur
	16–22 °C	91–100 %	8–14 ur
<b>Kalitev sporangijev</b>			
s klično hifo	8,8–26 °C	100 %	8–32 ur
z zoosporami	10–15 °C	100 %, kaplje	1/2–2 uri
<b>Preživetje sporangijev</b>	20 °C	20–40 %	1–2 uri
	20 °C	50–80 %	3–6 ur
<b>Okužba</b>	10–25 °C	100 %	2–2 1/2 ur
	11,7 °C		53 dni
<b>Inkubacija</b>	15,6 °C		6 dni
	17,8–21,1 °C		3–5 dni
	20 °C		2–3 dni

Tudi če bi le iz 1 % okuženih gomoljev zrasle rastline z obolelimi kalčki, bi to na površini 1 ha pomenilo približno 40 žarišč okužbe, ob predpostavki gostote sajenja 40.000 rastlin/ha (Powelson in sod., 2002). Zwankhuizen in sod. (2000) so kot najpomembnejši vir okužbe pri tržni pridelavi krompirja na Nizozemskem prepoznali kupe odpadnega krompirja, temu viru je po pomenu sledil okužen semenski krompir.

Ko so zaznali, da je prišlo v evropski populaciji *P. infestans* do sprememb in so izbruhi bolezni postajali vse bolj intenzivni, so skušali ugotoviti ali se bolezen v rastni dobi pojavlja bolj zgodaj kot prej. Dokaze o tem je bilo mogoče dobiti le s pomočjo primerjave aktualnega stanja z dolgoletnimi nizi podatkov o pojavljanju plesni v preteklosti. Analiza podatkov o pojavljanju plesni na Finskem med letoma 1933 in 2002 je pokazala, da se je plesen v letih 1996–2002 pojavljala 2 do 4 tedne prej kot v letih 1933–1962. Podatki so bili zbrani na fiksnih opazovalnih točkah za spremljanje prvega pojava plesni, na poskusnih poljih in na poljih s pridelavo. Pomik začetka izbruha plesni v zgodnejše obdobje rasti krompirja v obdobju 1996–2002 so lahko le deloma pojasnili z vplivom višjih temperatur v začetku rastne dobe in večjim številom padavinskih dni (Hannukkala in sod., 2007). Na Švedskem so 30 let (1983–2012) spremljali čas prvega pojava krompirjeve plesni v 83 poskusih z dvema občutljivima sortama krompirja in ga zapisovali kot število dni po sajenju. Ta čas je bil daljši od 80 dni pri 28 % poskusov, med 60 in 79 dnevi pri 43 % in 40 do 59 dni pri 29 % poskusov. Vsa leta, ko se je okužba začela zgodaj (40 do 59 dni po sajenju) so bila po letu 1998 (Wiik, 2014).

Predpostavljali so tudi, da so sevi *P. infestans* po vnosu novih genotipov v evropsko populacijo postali bolj agresivni. Kot merilo pri ugotavljanju agresivnosti so uporabili učinkovitost okužbe, latentno dobo, stopnjo rasti in intenzivnost sporulacije (Day in Shattock, 1997; Flier in sod., 1998). V testu agresivnosti *P. infestans* na listih treh sort krompirja sta Day in Shattock (1997) skušala ugotoviti, ali so izolati nove populacije bolj agresivni od tistih iz preteklosti, ki so bili shranjeni v zbirkah. Rezultati so pokazali nekoliko manjšo agresivnost pri starih izolatih, vendar niso dali jasnega odgovora. Raziskovalci so kot oviro pri primerjavi starih in novih izolatov izpostavili dejstvo, da se patogenost izolatov pri daljšem shranjevanju pogosto zmanjša in neposredna primerjava z novimi izolati ni zanesljiva. S primerjavo starejših izolatov iz zbirke z izolati novejših populacij, so na Nizozemskem preučevali agresivnost *P. infestans* na gomoljih in ugotovili pri novih izolatih večjo agresivnost. Za okužbo gomoljev najbolj agresiven izolat stare populacije je bil primerljiv s povprečjem izolatov nove populacije. Med agresivnostjo na listih in na gomoljih ni bilo povezave. Tudi paritveni tip ni bil povezan z agresivnostjo (Flier in sod., 1998). Pri proučevanju agresivnosti izolatov *P. infestans* iz treh različnih regij so na listih krompirja v nadzorovanih razmerah ugotovili veliko variabilnost pri parametrih agresivnosti. Agresivnost se je med izolati znotraj vsake proučevane regije razlikovala in sklepali so, da je temu vzrok spolno razmnoževanje *P. infestans*. Delež paritvenega tipa A2 ni bil v korelaciji z agresivnostjo (Flier in Turkensteen, 1999).

Zaradi zelo agresivnega genotipa plesni EU\_13\_A2, ki se je v Veliki Britaniji razširil med letoma 2005 in 2008, so morali ponovno oceniti odpornost sortimenta krompirja. Nekatere sorte, ki so veljale za odporne, so namreč bile podvržene močnim okužbam. Odpornost večine sort, ki jo ocenjujejo z ocenami na lestvici od 1 do 9 (9 je ocena za najvišjo odpornost), je bila ob okužbi s *P. infestans* tega genotipa veliko manjša. Nekatere sorte na primer 'Sante', 'Romano', 'Escort' (pridelujemo jih tudi v Sloveniji), ki so imele prej ocene 6 ali 7, so bile po novem ocenjene z ocenami med 3,6 in 3,8. Odporna sorta 'Stirling', ki so jo uporabljali tudi za ekološko pridelavo, pa je padla z ocene 8 na 3,7 (Lees in sod., 2012).

Na Finskem so na poljih, kjer se je plesen pojavila vsaj v enem od zadnjih štirih let, opazovali zgoden pojav boleznih z značilnimi bolezenskimi znamenji okužbe z oosporami. Številne majhne pege plesni so se vedno pojavile na spodnjih listih, ki so najbližje tlem ali so z njimi v stiku (slika 6). S takih mest so vzeli vzorce zemlje in s testom z vabo na nekaterih poljih, kjer je bil krompir v kolobarju že več let zaporedoma, dokazali v tleh vitalne oospore (Lehtinen in Hannukkala, 2004). Tudi Widmark in sod. (2007) so natančno proučevali simptome, širjenje boleznih in genotipsko raznolikost *P. infestans* v žariščih okužbe, ki so izvirala iz oospor. Zaporedno pridelovanje krompirja v kolobarju je na Finskem po letu 1998 vplivalo na zgodnejši pojav boleznih v rastni dobi, kar bi lahko pripisali okužbi z oosporami iz tal ali večjemu vplivu samosevnih krompirjev (Hannukkala in sod., 2007). O možnem vplivu oospor na pojav in širjenje boleznih so pisali tudi Drenth in sod. (1995), Andrivon (1995), Andersson in sod. (1998), Hermansen in sod. (2000), Turkensteen in sod. (2000), Zwankhuizen in sod. (2000) in drugi.



Slika 6: Sum na okužbo s krompirjevo plesnijo z oosporami iz tal, Vodice, 9. julij 2010  
Figure 6: Late blight infection suspected to be caused by oospores, Vodice, 9<sup>th</sup> July 2010

## 2.6 VARSTVO PRED KROMPIRJEVO PLESNIJO

V klimi, ki je primerna za gojenje krompirja, ni mogoče doseči zanesljivih in dovolj velikih pridelkov brez uporabe kemičnih fungicidov. Žlahtnjenje na odpornost krompirja proti *P. infestans* je v prvi polovici 20. stoletja vzbujalo veliko upov, vendar so pristop z vgrajevanjem R genov za odpornost večinoma opustili v 60-tih letih. Spoznali so, da tudi kombinacijo večih R genov v rastlini patogen zlahka premaga. Napori žlahtniteljev so pozneje dali več sort z dobro raso nespecifično odpornostjo (imenovano tudi horizontalna ali poljska odpornost). Večina evropskih pridelovalcev je zaradi zahtev trga ostala zvesta občutljivim sortam. Integrirano varstvo krompirja pred plesnijo vključuje poleg izbora manj občutljivih sort predvsem skrb za nadzor nad viri okužbe, kot so semenski krompir, kupi odpadnega krompirja in samosevni krompir. V območjih, kjer je možna tudi okužba z oosporami, je preventivni ukrep kolobarjenje. Glavni steber varstva so fungicidi, uporabljeni v skladu z dobro kmetijsko prakso. Škropljenje pridelovalci prilagajajo infekcijskemu pritisku, pri čemer je ključno upoštevanje informacij, ki jih nudijo službe za napovedovanje bolezni in sistemi za pomoč pri odločanju. Pomembno je izvajanje strategije za preprečevanje pojavljanja odpornosti proti fungicidom, ki je prilagojena območju pridelave (Cooke in sod., 2011). Strategija temelji na smernicah, ki jih je oblikoval odbor Fungicide Resistance Action Committee (Brent in Hollomon, 2007) in določajo način in čas rabe fungicidov. Podrobneje so opisane v naslednjem poglavju.

## 2.7 ODPORNOST *P. infestans* PROTI FUNGICIDOM

### 2.7.1 Fungicidi za zatiranje krompirjeve plesni

S pojavom peronospore vinske trte v Sloveniji in uvajanjem bakreno apnene brozge (bordojske brozge) za njeno zatiranje po letu 1885 so z njo začeli škropiti tudi proti krompirjevi plesni, vendar so jo uporabljali le najbolj napredni kmetje (Maček, 1979). Vse do štiridesetih let 20. stoletja je kemično varstvo pred plesnijo temeljilo na anorganskih fungicidih, ki so jih največkrat pripravljali uporabniki sami (Morton in Staub., 2008). Še leta 1950 sta bila v Sloveniji edina priporočena pripravka za zatiranje plesni bakreno apnena brozga in bakreno apno (Janežič, 1951).

Med letoma 1940 in 1970 so razvili več novih kemijskih skupin fungicidov, najprej ditiokarbamate, pozneje ftalimide in klorotalonil, ki so pomenili veliko izboljšanje v primerjavi z anorganskimi fungicidi (preglednica 3). Boljši so bili tako po učinkovitosti kot tudi glede fitotoksičnosti in enostavnosti uporabe za pridelovalca. Po letu 1960 je začel trg s fungicidi hitro naraščati (Morton in Staub, 2008). Med najbolj učinkovitimi fungicidi za varstvo pred plesnivkami so bili tisti iz skupine fenilamidov (metalaksil, benalaksil, oksadiksil, ofurak), ki so v uporabi od leta 1977 dalje. So sistemski fungicidi s protektivnim, kurativnim in eradikativnim delovanjem (Gisi in Cohen, 1996).

Preglednica 3: Aktivne snovi fungicidov za zatiranje krompirjeve plesni in tveganje za pojav odpornosti (Morton in Staub, 2008; FRAC Code List, 2015)

Table 3: Fungicide active ingredients for late blight control and risk of resistance (Morton and Staub, 2008; FRAC Code List, 2015)

Ime skupine	Aktivna snov in leto začetka uporabe	Tveganje za razvoj odpornosti
Anorganski fungicidi	baker, po 1882	nizko
Ditiokarbamati	tiram, 1942 zineb, 1943 maneb, 1955 mankozeb, 1961	nizko
Ftalimidi	folpet, 1952	nizko
Organo-kositrne spojine	fentin acetat in fentin hidroksid, 1954	nizko do srednje
Kloronitrili (ftalonitrili)	klorotalonil, 1964	nizko
Fenilamidi	metalaksil, 1977 benalaksil, 1981 oksadiksil, 1983 metalaksil-M ali mefenoksam (izomera metalaksila), 1996	visoko  (odpornost in navzkrižna odpornost sta dobro znani pri različnih oomicetah, potrebno je upravljanje odpornosti)
CAA fungidici (amidi karboksilne kisline)	dimetomorf, 1988 iprovalikarb, 1998 bentiavalikarb, 2003 mandipropamid, 2005	nizko do srednje  (odpornost znana pri <i>Plasmopara viticola</i> a ne pri <i>Phytophthora infestans</i> , navzkrižna odpornost z vsemi snovmi v CAA, potrebno upravljanje odpornosti)
Cianoacetamidoksimi	cimoksanil, 1976	nizko do srednje
	fluazinam, 1992	nizko
Fosfonati	fosetil-Al, 1977	nizko
Zunanji inhibitorji kinona QoI	famoksadone, 1996 fenamidon, 1998	visoko  (navzkrižna odpornost v skupini, potrebno upravljanje odpornosti)
Karbamati	propamokarb, 1978	nizko do srednje  (potrebno upravljanje odpornosti)
Notranji inhibitorji kinona Qii	ciazofamid, 2001	tveganje ni znano
Benzamidi	zoksamid, 2001	nizko do srednje
Benzamidi	fluopikolid, 2006	odpornost ni znana
Zunanji inhibitorji kinona (QoSI)	ametoktradin, 2013	srednje do visoko (ni navzkrižne rezistence z skupino QoI, potrebno upravljanje odpornosti)



Fenilamidi so pomenili popolnoma novo raven varstva rastlin zaradi široke uporabnosti za tretiranje semena, tretiranje tal in nadzemnih delov rastlin, vendar je njihovo uporabnost kmalu začelo omejevati pojavljanje odpornosti proti njim (Morton in Staub, 2008).

### 2.7.2 Odpornost proti fungicidom iz skupine fenilamidov

Prvič so zaznali odpornost proti metalaksilu leta 1979 pri kumarni plesni (*Pseudoperonospora cubensis* (Berkeley & M.A. Curtis) Rostovtsev) na kumarah, gojenih v plastenjaki v Izraelu. Po odkritju odpornosti pri *P. infestans* leta 1980 se je odpornost leta 1983 pojavila tudi pri peronospori vinske trte (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni) v Franciji (Gisi in Cohen, 1996). Odpornost je navzkrižna in proti metalaksilu odporna krompirjeva plesen je odporna tudi proti drugim aktivnim snovem iz skupine fenilamidov - vse so specifični inhibitorji ribosomske RNK polimeraze v oomicetah (Gisi in Cohen, 1996). Micelij preneha rasti, ker je zaradi inhibicije encima ovirana sinteza proteinov v ribosomih. Fungicid, ki ga je list vsrkal, povzroči poškodbe micelija in prenehanje njegove rasti potem, ko je fitoftora že prodrla v list (Erwin in Ribeiro, 1996). Ker metalaksil ne vpliva na prodiranje v list in začetno naselitev, se na mestih okužbe pojavijo drobne omejene pege, ki pa se ne širijo in na njih ni sporulacije. Za najbolj učinkovito varstvo mora biti tretiranje rastlin opravljeno pred okužbo s *P. infestans* ali v času dveh dni po njej (Cohen in sod., 1979).

Dejstvo, da so zaradi navzkrižne rezistence med aktivnimi snovmi z enakim načinom delovanja ogroženi pripravki različnih proizvajalcev fitofarmaceutskih sredstev, je botrovalo njihovi združitvi v odbor Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). FRAC si s povezovanjem raziskovalnih rezultatov o mehanizmih odpornosti, načinu delovanja fungicidov in z monitoringom občutljivosti populacij gliv na polju prizadeva oblikovati strategije za zmanjševanje tveganja za pojav odpornosti (Morton in Staub, 2008).

Izraz »odpornost proti fungicidom ali rezistenca«, kot ga uporablja FRAC, se nanaša na pridobljeno, dedno zmanjšanje občutljivosti glive za specifični fungicid. Nekateri raziskovalci uporabljajo izraz »zmanjšana občutljivost ali toleranca«, kadar gre za zmanjšanje občutljivosti gliv, ki nima vpliva na praktično uporabo fungicida ali pa je ta vpliv majhen. Izraz »odpornost« uporabljajo, ko gre za takšno zmanjšanje občutljivosti posameznih sevov/izolatov gliv, ki bistveno vpliva na učinkovitost fungicida v praksi, kadar se ti sevi v populaciji patogena namnožijo (Brent in Hollomon, 2007).

V populaciji krompirjeve plesni so sevi, odporni proti fenilamidom, obstajali še preden so se ti uveljavili kot fungicidi, saj gre za naravno mutacijo. To so ugotovili z analizami izolatov *P. infestans*, ki so bili shranjeni v zbirkah še pred uvedbo teh fungicidov (Daggett in sod., 1993). Odporni izolati so rezultat naključne mutacije, ki nastane tudi v odsotnosti

fenilamidov. Z uporabo teh se frekvenca mutacij ne povečuje, vendar pa njihova uporaba omogoča selekcijo in povečuje se zastopanost odpornih osebkov, vse dokler takšna subpopulacija ne postane pomemben dejavnik v razvoju epifitocije (Gisi in sod, 1996). Na naraščanje števila odpornih osebkov v populaciji vpliva pogostejša uporaba fungicidov in tudi odmerki ali tehnika aplikacije, ki zagotavlja večjo učinkovitost. V primeru, da je pred uporabo fungicida populacija patogena že velika, je tveganje za nastanek odpornosti večje. Tudi lastnosti patogena, kot sta sposobnost tvorbe velikega števila spor in kratki razmnoževalni ciklusi, omogočajo hitrejša naraščanja odpornih osebkov (Brent in Hollomon, 2007).

Delovna skupina za fenilamide v okviru FRAC je ukepe za zmanjšanje pojave rezistence strnila v naslednje smernice: fenilamidi za foliarno uporabo morajo biti formulirani v pripravkih skupaj z dotikalnim fungicidom, uporabljati jih je treba preventivno v začetku rastne dobe, ko je rast bujna, število škropljenj v rastni dobi je omejeno, razmiki med posameznimi škropljenji ne smejo presegati 14 dni, odsvetuje se raba pri pridelovanju semenskega krompirja in pri razmnoževanju drugih rastlin (Brent in Hollomon, 2007).

Na Nizozemskem, kjer so v začetku osemdesetih let 20. stoletja pridelovali krompir na 25 % obdelovalnih površin, je bil metalaksil zelo dobro sprejet pri pridelovalcih in se je raba hitro uveljavila. Sistemsko delovanje je omogočalo večjo neodvisnost od vremenskih razmer (Davidse, 1985). Podobno je bilo tudi v drugih državah, na primer na Irskem, kjer je po letu 1977 metalaksil postal najbolj uporabljan fungicid proti krompirjevi plesni (Dowley in sod., 2002). Že v letu 1980 so pridelovalci v več območjih Nizozemske opazili slabo delovanje pripravka, ki je vseboval samo metalaksil, pa tudi pripravkov, ki so vsebovali metalaksil v kombinaciji z mankozebom, čeprav so bili uporabljeni v predpisanih odmerkih in intervalih. Nastala je znatna gospodarska škoda. Zaradi suma pojava odpornosti so iz vzorcev z okuženih polj izolirali *P. infestans* in izolate testirali glede občutljivosti za metalaksil. Na šestih od sedmih polj, kjer je bil uporabljen metalaksil, so našli izolate z visoko stopnjo odpornosti. Posledica je bil umik pripravkov z metalaksilom za varstvo krompirja iz prodaje. Ob pojavu zgodnjega in močnega pojava plesni v letu 1984 so metalaksil v kombinaciji z mankozebom ponovno uvedli za kurativno uporabo. Učinkovitost je bila dobra, vendar so ponovno zaznali odporne seve (Davidse, 1985).

Na Irskem, kjer so metalaksil uporabljali brez dodatka dotikalnega fungicida, je bil že v letu 1981 delež odpornih izolatov zelo velik. Krompirjeva plesen je bila proti metalaksilu odporna na 83 % njiv. Po tej ugotovitvi so fenilamide za tri leta umaknili iz prodaje in v tem obdobju se je odpornost zmanjšala in bila ugotovljena na 12 do 33 % njiv. Leta 1985 so metalaksil v mešanici z mankozebom ponovno dali v prodajo. Uporabljali so ga kurativno in v zelo velikem obsegu, saj je bil skoraj vsak nasad tretiran vsaj enkrat v rastni dobi. Delež njiv z odporno plesnijo je ponovno narasel in bil tri zaporedna leta okrog 80 %,

kar je pokazalo neposreden vpliv kurativne rabe na odpornost. Z intenzivno kampanjo za uporabo strategije zmanjševanja odpornosti proti fungicidom v 90-tih letih 20. stoletja se je stanje izboljšalo (45–56 % njiv z odporno plesnijo) in ostalo relativno stabilno tudi v naslednjih letih, kar je dokazalo učinkovitost strategije (Dowley in sod., 2002).

Fry in sod. (1991) so na poljih z intenzivno pridelavo krompirja, kjer je bila uporaba metalaksila redna, ugotovili odpornost pri 45 % izolatov, v povprečju pa je bila odpornost za vsa polja 35 %. Med izolati *P. infestans* s paradižnika z vrtov, kjer metalaksila niso uporabljali, ni bilo nobenega, ki bi bil odporen proti metalaksilu.

Odpornost je nestabilna lastnost v populaciji, ki je vsako leto podvržena novi selekciji (Gisi in Cohen, 1996). Da se delež proti metalaksilu odpornih izolatov v populaciji preko rastne dobe povečuje, so potrdili Dowley in sod. (2002). V obdobju 18 let so opazovali sezonsko variabilnost v pojavljanju odpornosti in ugotovili, da se je delež odpornih izolatov vedno povečeval od junija do avgusta. Domnevali so, da odporni sevi ne prezimijo tako učinkovito kot občutljivi.

Po prvem pojavu odpornosti so v Evropi potekale preiskave o stanju v populaciji in ugotovitve so se med leti in območji zelo spreminjale toda v večini populacij je bila navzoča krompirjeva plesen odporna proti fenilamidom. V raziskavi o odpornosti krompirjeve plesni proti metalaksilu na izolatih, nabranih v Srbiji v letu 2000, niso identificirali odpornih izolatov, temveč le srednje odporne (Ivanović in sod., 2003). V več evropskih državah so v letih 2006 in 2007 ugotovili, da je bilo od 65 do 85 % testiranih izolatov *P. infestans* s krompirja popolnoma odpornih proti metalaksilu (Gisi in sod., 2011).

Občutljivost *P. infestans* proti fungicidom so namenoma preizkušali v Mehiki na območju, kjer je center izvora tega patogena in je raznolikost populacije zaradi spolnega razmnoževanja velika. Ugotovili so širok spekter občutljivosti proti fungicidom fluazinam, cimoksanil, dimetomorf, propamokarb in metalaksil v populaciji, vendar so selekcijo v smeri odpornosti zaznali v obdobju ene rastne dobe le za metalaksil in cimoksanil. To pa ne pomeni, da se v daljšem obdobju in ob selekcijskem pritisku ne bi mogla razviti odpornost tudi proti drugim fungicidom (Grünwald in sod., 2006).

Od leta 2009 dalje na Nizozemskem zaznavajo tudi krompirjevo plesen z zmanjšano občutljivostjo za fungicid fluazinam, ki je eden temeljnih fungicidov za preventivno varstvo pred krompirjevo plesnijo (Schepers, 2013). Te izolate lahko v monitoringu populacije zaznajo, saj imajo značilen genotip (oznaka EU\_33\_A1). V letu 2011 je bil njegov delež v populaciji 20 %, po uvedbi protirezistenčne strategije pa je bil ta klon v letu 2013 pri vzorčenju v okviru mreže Euroblight najden v Evropi le enkrat (Potato ... in Europe - 2013, 2015).

## 2.8 METODE OPISOVANJA RAZNOLIKOSTI POPULACIJ *P. infestans*

### 2.8.1 Pomen raziskovanja raznolikosti populacij

Pri opazovanju populacij rastlinskih patogenov nas predvsem zanimajo lastnosti populacij, ki bi lahko imele vpliv na pridelavo kmetijskih rastlin ali v primeru invazivnih organizmov na ekosistem v celoti. V populaciji krompirjeve plesni zaradi narave povzročitelja in načina pridelovanja krompirja in paradižnika prihaja do emigracije in imigracije osebkov, kar lahko povzroči hitre spremembe v populaciji. Vsaka populacija je podvržena naravnim selekcijskim pritiskom, v kmetijskih sistemih pa na populacijo krompirjeve plesni vplivamo tudi z izborom sort, uporabo fitofarmaceutskih sredstev, kolobarjenjem in drugimi pridelovalnimi ukrepi.

Postopki spremljanja oziroma karakterizacije populacije temeljijo na zbiranju biološkega materiala. Pri patogenih gre največkrat za izolate iz vzorcev okuženih rastlin ali vzorce DNK, ki nato zastopajo populacijo na nekem območju. Pogosto je cilj spremljanja populacije preverjanje, ali so ukrepi za zatiranje bolezni, vključno s strategijami žlahtjenja, še primerni za trenutno populacijo. Ali bodo ukrepi za zatiranje bolezni dolgoročno učinkoviti, je v veliki meri odvisno od poznavanja patogena v določenem času (Cooke in Lees, 2004).

Za analiziranje populacije moramo imeti nek genetski marker (označevalec). Prvotno so bili markerji le fenotipski, z razvojem molekularne biologije pa so se začeli več uporabljati genotipski markerji (Fry in sod., 2009).

### 2.8.2 Markerji za raziskovanje populacij *P. infestans*

Markerji oziroma njihove kombinacije morajo biti primerni za primerjavo izolatov tako znotraj populacije kot med populacijami na lokalni in globalni ravni. Marker, ki ne omogoča razlikovanja in se izolati različnega genskega izvora kažejo kot identični, ni primeren. Prav tako niso primerni markerji, kjer ima velik delež izolatov v populaciji poseben DNK prstni odtis, kar vodi v nepregledno število genotipov (Cooke in Lees, 2004).

Nekatere od lastnosti dobrega molekularnega markerja so: dovolj velik polimorfizem, kodominantno dedovanje, ki pri diploidnih organizmih omogoča razlikovanje homozigotov od heterozigotov, dobra določljivost alelov in enakomerna razporeditev po vsem genomu. Biti mora takšen, da njegova uporaba temeljiti na tehnologiji, ki je široko dostopna in da je izvedljiva tudi avtomatizacija procesa, kar omogoča opravljanje velikega števila analiz v sprejemljivem času (Weising in sod., 2005). Poleg teh osnovnih zahtev Cooke in Lees

(2004) kot prednosti dobrega markerja za preiskave raznolikosti *P. infestans* navajata tudi možnost, da na enem izolatu hkrati analiziramo več lastnosti (multipleks zasnova) in da je uporaben tako za čiste kulture kot za rastlinski material, okužen s *P. infestans*.

Prva fenotipska markerja, ki so ju uporabljali za krompirjevo plesen, sta bila paritveni tip in specifična virulenca. Po pojavu odpornosti proti metalaksilu je tudi ta lastnost postala uporabna kot marker. Sledila je uporaba markerjev, osnovanih na polimorfizmu proteinov. Elektroforezo izoencimov *P. infestans* so za analizo populacij med prvimi uporabljali Tooley in sod. (1985) za primerjavo razlik med populacijami, ki se razmnožujejo spolno in nespolno. Shattock in sod. (1990) ter Fry in sod. (1991) so z njimi raziskovali genetsko strukturo populacije v Veliki Britaniji oziroma na Nizozemskem. Prednost izoencimov kot markerjev je v tem, da se dedujejo kodominantno in da je analiza enostavna za izvedbo. Njihova pomanjkljivost je omejeno število primernih lokusov v genomu in včasih tudi premajhna raznolikost (Weising in sod., 2005). Te omejitve je presešla uporaba DNA markerjev: polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP), mitohondrijski haplotip, polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP), mikrosateliti oziroma enostavne ponovljive sekvence (SSR), polimorfizem posameznih nukleotidov (SNP) (Fry in sod., 2009; Knapova in Gisi, 2002; Cooke in Lees, 2004). Z določitvijo celotnega genoma *P. infestans*, avtomatizacijo laboratorijskih procesov in razvojem informatike so bile dane možnosti za razvoj metod za hitro analiziranje kompleksnih markerjev osnovanih na DNA zapisu (Cooke in Lees, 2004).

Enostavne ponovljive sekvence (SSR) imajo veliko lastnosti, ki odlikujejo dober marker (Cooke in Lees, 2004). Za analizo populacije *P. infestans* v Franciji in Švici sta Knapova in Gisi (2002) uporabila SSR markerje na dveh lokusih. V naslednjih letih so Lees in sod. (2006) metodo razvijali dalje in dodali še 12 lokusov ter jih preizkusili na velikem številu izolatov *P. infestans*. Rezultat nadaljnje optimizacije in standardizacije te metode je protokol za genotipizacijo *P. infestans* z 12 izbranimi SSR markerji v multipleks zasnovi (Li in sod., 2013), ki ga uporabljajo tudi za analizo genotipov evropske populacije *P. infestans* v okviru Euroblight monitoringa. Merjenje raznolikosti populacij z različnimi markerji in ob različnih strategijah vzorčenja otežuje primerjavo podatkov skozi daljše časovno obdobje (Montes in sod., 2015), zato je poenotenje metod za analizo populacij pomembno za boljše razumevanje njihovega spreminjanja.

## 2.9 ZNAČILNOSTI EVROPSKIH POPULACIJ KROMPIRJEVE PLESNI

Do začetka osemdesetih let 20. stoletja sta bila kriterija za opisovanje populacije *P. infestans* le virulenca in agresivnost. S pojavom odpornosti na fenilamide in paritvenega tipa A2 se je število raziskav populacij v Evropi povečalo. Značilnosti populacij, ocenjene s fenotipskimi markerji, so opisane za posamezne regije, za države ali skupine več držav

(na primer za nordijske države), v številnih znanstvenih in strokovnih člankih. Z razvojem biokemijskih in molekularnih metod so se možnosti za ugotavljanje raznolikosti v populacijah zelo izboljšale (Cooke in Lees, 2004).

Kakšne spremembe v populacijah so se dogajale glede paritvenega tipa in odpornosti proti metalaksilu po spremembi populacije v začetku osemdesetih let 20. stoletja, je opisano že v prejšnjih poglavjih. V prvi raziskavi populacije na Nizozemskem z analizo izoencimov (Fry in sod., 1991) so ugotovili takšne genotipe, ki jih v populaciji pred letom 1980 ni bilo, značilni genotipi iz preteklega obdobja pa se skoraj niso več pojavljali. V populaciji sta bila oba paritvena tipa, vendar raziskava zaradi omejitev uporabljene metode, ki daje premalo možnosti za razlikovanje med genotipi, ni dala odgovora glede vloge spolnega razmnoževanja na raznolikost populacije. Nadaljnje raziskave populacij s proučevanjem polimorfizma restrikcijskih fragmentov (RFLP) so utemeljile predvidevanja o spolnem razmnoževanju *P. infestans* v Evropi (Drenth in sod., 1994; Sujkowski in sod., 1994).

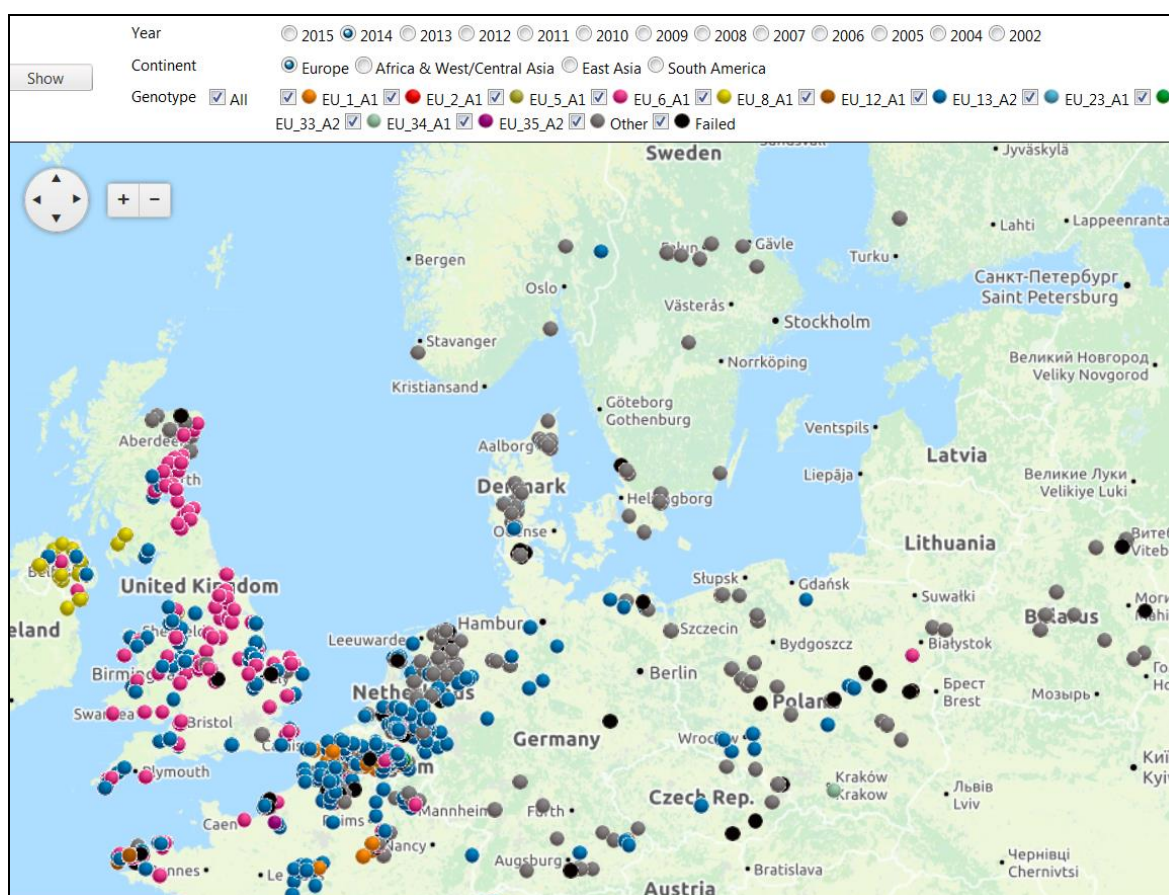
Do večje spremembe v populaciji *P. infestans* je v Evropi ponovno prišlo po letu 2004 zaradi širjenja dominantnega genotipa, ki se je najprej pojavil na Nizozemskem in se tam tudi razširil (Li in sod., 2012). Po analizi s SSR markerji in določitvi paritvenega tipa so genotip označili kot 13\_A2 (tudi blue-13 ali EU\_13\_A2). V Veliki Britaniji je po letu 2005 njegova frekvenca v populaciji v treh rastnih dobah narastla z 12 % na 71 %, razširil se je tudi v Franciji in Nemčiji (Fry in sod., 2009). Na Poljskem so ga našli v večjem obsegu v letu 2006. V populaciji se je sicer obdržal in so ga zaznali še leta 2009, vendar se ni razširil (Chmielarz in sod., 2014). Krompirjeva plesen z genotipom EU\_13\_A2 je v testiranjih v laboratoriju in na polju izkazovala večjo agresivnost v primerjavi z drugimi genotipi. Izrinila jih je iz populacije ter bila zelo kompetitivna tudi v hladnejših razmerah, pri temperaturi 13 °C. V Veliki Britaniji je med letoma 2003 in 2008 več kot 82 % izolatov pripadalo manj kot sedmim multilokus genotipom, delež edinstvenih genotipov, ki niso pripadali nobenemu dotlej znanemu potomstvu klona, pa je bil manjši od 10 %. Zaradi prevlade genotipa EU\_13\_A2 se je delež paritvenega tipa A2 v populaciji povečal z 10 % na 82,5 % (Cooke in sod., 2012a; Lees in sod., 2012).

Drugačno je stanje v nordijskih državah (Finska, Norveška, Švedska) ter v severovzhodnem delu Nizozemske, kjer populacijo sestavljajo številni edinstveni ali skoraj edinstveni genotipi (slika 7) in ne prevladujejo značilne klonske linije (Brurberg in sod., 2011; Li in sod., 2012). Podobno je bila velika genetska raznolikost ugotovljena tudi na Poljskem (Chmielarz in sod., 2014).

Evropski znanstveniki in strokovnjaki, ki delujejo v okviru mreže Euroblight so razvili sistem organiziranega vzorčenja, zbiranja podatkov o fenotipu in genotipu *P. infestans* in izdelave kart, ki prikazujejo geografsko razširjenost posameznih genotipov ter osnovala bazo podatkov. Spletna stran Euroblight omogoča vpogled v genetsko raznolikost

populacije v Evropi in nudi tudi številne uporabne informacije o uporabi fungicidov za zatiranje krompirjeve plesni in sistemih za napovedovanje pojava bolezni. Model spremljanja patogena s pomočjo FTA kartic in genotipiziranja s SSR markerji omogoča hiter, cenovno sprejemljiv in koordiniran pristop k razumevanju spreminjanja patogena v Evropi. Spremljanje poteka od leta 2012 (Meier-Runge in sod., 2014). Podatke o potomstvih dominantnih klonov posredujejo pridelovalcem, svetovalcem, žlahtniteljem in industriji fitofarmaceutskih sredstev z namenom praktičnega svetovanja glede varstva krompirja in paradižnika in za dolgoročno snovanje strategij (Cooke in sod., 2012b; Euroblight ..., 2015).

V letu 2014 je bila ugotovljena široka zastopanost dominantnih klonov v zahodni Evropi in več drugačnih, genetsko raznolikih izolatov na območjih srednje in vzhodne Evrope. Agresiven klon EU\_13\_A2 je predstavljal 36 % populacije in je bil navzoč od Kanarskih otokov do Norveške in na vzhodu do Romunije. Ta klon je zaradi agresivnosti in odpornosti na fungicide iz skupine fenilamidov težje zatirati kot druge.



Slika 7: Razširjenost genotipov *P. infestans* določenih s SSR markerji v Evropi v letu 2014, kot je prikazana na spletni strani Euroblight (Sampling ..., 2015)

Figure 7: Distribution of *P. infestans* genotypes determined by SSR markers in Europe in 2014 as shown on Euroblight web page (Sampling ..., 2015)

Drug agresiven klon EU\_6\_A1 je bil dominanten v Veliki Britaniji, navzoč v Franciji in Belgiji, zaznali so ga tudi na Poljskem. Genetsko raznoliki genotipi, ki ne pripadajo nobenemu od že znanih in karakteriziranih potomstev klonov, so predstavljali 23 % vseh preiskovanih genotipov. Čeprav so bili najdeni v mnogih območjih, se najbolj pogosto pojavljajo na severovzhodu in vzhodu Evrope. Za te genotipe ne vemo, kakšne so njihove lastnosti. Vsak od njih je nastal iz oospore v tleh in tveganje za okužbo s tovrstnimi različki krompirjeve plesni lahko zmanjšamo z daljšimi obdobji brez gostiteljskih rastlin v kolobarju (Potato ... in Europe - 2014, 2015).

## 2.10 GOSPODARSKI POMEN KROMPIRJEVE PLESNI

Krompirjeva plesen ogroža pridelavo krompirja povsod, kjer ga gojijo, posebej pomembna pa je v območjih z zmerno klimo in veliko padavinami ter tam, kjer krompir namakajo. Vsi deli krompirjeve rastline so občutljivi za okužbo in bolezen v obliki epifitocije lahko uniči nasade (Fry in sod., 2001). Podobno velja tudi za paradižnik (Jones in sod., 1991). Po oceni FAO je bila svetovna pridelava krompirja v letu 2013 okoli 365 milijonov ton. Kitajska in Indija, največji svetovni pridelovalki, sta pridelali 30 % skupne količine, sledi jima Rusija. V Evropi ga največ pridelajo Ukrajina, Poljska, Nemčija, Francija in Nizozemska. V zadnjem desetletju se je svetovna pridelava povečala za okoli 15 % predvsem zaradi držav v razvoju, kjer se povečujejo potrebe po proizvodih iz krompirja. Svetovni hektarski pridelek krompirja je okrog 18 t/ha, v kmetijsko najbolj naprednih državah Evrope 40 do 45 t/ha (FAOSTAT, 2015; FAO, 2008). V Evropski uniji pridelujejo krompir na skoraj 6 milijonih ha in ocenjena vrednost tega pridelka je blizu 6 milijard evrov (Haverkort in sod., 2008).

V Sloveniji je v petdesetih letih 20. stoletja krompir rasel na približno 60.000 ha njiv in je bil takrat živilo za zadovoljevanje osnovnih prehranskih potreb, z letno porabo preko 100 kg gomoljev na prebivalca. Pozneje sta se tako površina njiv s krompirjem kot tudi njegova poraba zmanjševala, pridelek pa je naraščal. Približno tri četrtine krompirja pridelamo v osrednji Sloveniji, najpogosteje v kolobarju s koruzo in pšenico. Nekaj krompirja pridelujejo tudi v monokulturi, kar še povečuje ogroženost pridelka zaradi boleznih in škodljivcev (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). V Sloveniji je bil v letih 2010–2014 povprečni pridelek 24 t/ha. Površine s krompirjem so se v Sloveniji po letu 1992 (takrat smo ga pridelovali še na približno 30.000 ha) zelo zmanjšale, na 3600 ha v letu 2014. V letu 2014 smo pridelovali krompir na 2 % vseh njivskih površin (Statistični urad RS, 2015).

Podatki o škodi, ki jo plesen lahko povzroči, so zelo različni. To je razumljivo zaradi njene velike odvisnosti od vremenskih razmer in pojavljanja v obliki epifitocij. Na izgube vpliva tudi način pridelave, zlasti uporaba fungicidov, pa tudi občutljivost sort. Zgodovinski zapisi iz časa prve epifitocije v Evropi v letih 1845 in 1846, ko ni bilo nobenih ukrepov za varstvo in so gojili zelo občutljive sorte, govorijo o izgubah treh četrtin pridelka ali več na



nekaterih območjih. V Belgiji so v nekaterih predelih pridelali le približno 9 % pričakovanega pridelka, na Nizozemskem 40 %. V Franciji so bile izgube pridelka zaradi gnitja gomoljev lokalno 90 do 100 %, na ravni države 22 % (Zadoks, 2008). Po prvih pojavih bolezni na slovenskih tleh v letih 1845 in 1846 so poročali o izgubah pridelka med 10 % pa vse do 75 % in več (Maček, 1979). Janežič (1951) je zapisal, da krompirjeva plesen uniči nasade vsako leto, razen v izrazito sušnih letih, in da je zato pridelek 30-50 % manjši. V vlažni in hladni klimi severne Evrope in Severne Amerike je povprečna ocenjena letna izguba pridelka od 8 do 10 %. V Veliki Britaniji dosežejo izgube v fitoftornih letih približno 16 %, v suhih letih 2 %. V primeru, da se bolezen neovirano širi, ker ni bilo ukrepov za varstvo, se pridelek lahko zmanjša do 70 % (Hoffmann in Schmutterer, 1983).

Med poljščinami je poraba fungicidov največja pri krompirju prav zaradi krompirjeve plesni. Ocenjuje se, da tržni pridelovalci krompirja v Sloveniji, odvisno od vremenskih razmer, opravijo v rastni dobi od štiri do sedem škropljenj s fungicidom in porabijo približno 7 kg aktivnih snovi fungicidov na hektar (Urek in sod., 2012).

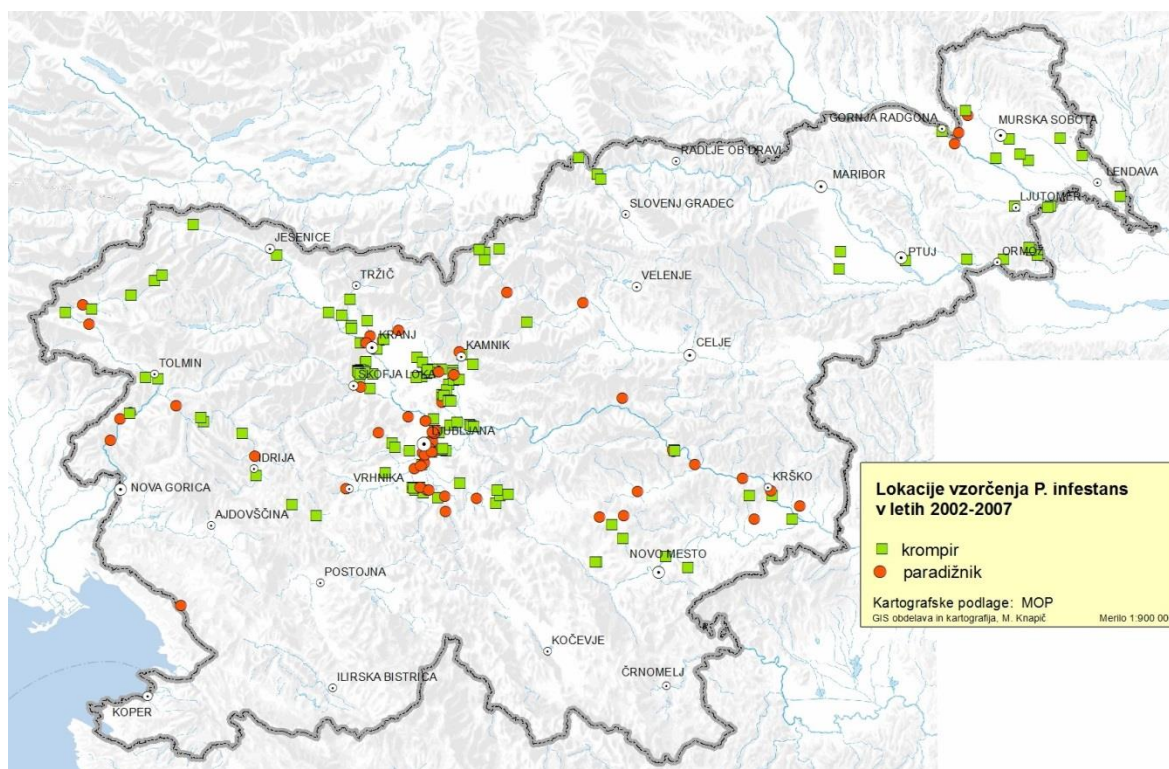
Haverkort in sod. (2008) so na modelu pridelovanja krompirja na Nizozemskem izdelali oceno stroškov, ki jih povzroči krompirjeva plesen. Upoštevali so stroške fungicidov, njihove aplikacije (mehanizacija, delo, gorivo), izgubo, ki nastane zaradi poškodb krompirja na voznih stezah pri nanosu fungicida in neposredno izgubo pridelka zaradi okužbe s plesnijo. Kot izgubo zaradi okužbe so navedli za Nizozemsko 5 % vrednosti pridelka na 10 % pridelovalnih površin na vsakih 5 let. S povprečnim številom 15 škropljenj v rastni dobi so izračunali, da so stroški zaradi plesni 15,8 % odkupne cene krompirja. To so posplošili na raven Evrope z razlago, da so v državah srednje in vzhodne Evrope stroški uporabe fungicidov sicer manjši zaradi manjšega števila škropljenj, vendar so zato neposredne izgube pridelka zaradi okužbe toliko večje. Ocenili so, da krompirjeva plesen v EU povzroči letno izgubo v višini od 900 do 1000 milijonov evrov.

Na osnovi izgub pridelka krompirja zaradi plesni v razponu od 5 do 78 % in glede na njegovo energijsko prehransko vrednost so Fisher in sod. (2012) izračunali, da je letna izguba krompirja zaradi plesni tolikšna, da bi z njim lahko nahranili najmanj 81 milijonov ljudi.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 ZBIRANJE VZORCEV

Vzorci krompirjevih listov in gomoljev ter paradižnikovih listov in plodov z bolezenskimi znamenji krompirjeve plesni smo nabirali pretežno v območjih z intenzivnim pridelovanjem krompirja. Da bi zajeli čim večjo raznolikost populacije, smo zajeli tudi nekatera območja, kjer je pridelava zelo razdrobljena (Posočje, Logarska dolina) ter vključili tudi vrtove. Na lokacijah vzorčenja na terenu nismo vpisovali geografskih koordinat. Zapisali smo geografsko ime naselja ali označili položaj mesta najdbe na karti v Atlasu Slovenije, pozneje pa smo tem lokacijam pripisali koordinate, kar je omogočilo grafični prikaz rezultatov (slika 8). Podatkov o sorti, izvoru semenskega krompirja in načinu varstva nismo zbirali. V posameznem letu smo začeli z vzorčenjem takoj ob prvih pojavih plesni, da bi dobili informacijo o morebitnih spremembah v populaciji med rastno dobo. V letih, ko se je plesen zaradi neugodnih razmer pojavila pozno v rastni dobi, je med vzorci prevladovala plesen s paradižnika. Vzorec listov smo izbrali tako, da so bile na listih dobro vidne posamezne pege. Pri gomoljih in plodovih smo izbrali takšne, kjer okužba še ni zajela celega gomolja ali plodu in so bili brez znamenj bakterijskega ali glivičnega gnitja.



Slika 8: Lokacije vzorčenja krompirjeve plesni v letih od 2002 do 2007, s katerih smo pridobili izolate  
Figure 8: Locations of late blight sampling for the isolation of *P. infestans* in the years from 2002 to 2007

### 3.1.1 Vzorci za izolacijo *P. infestans*

Vzorec rastlinskih delov z bolezenskimi znamenji smo ovili v papir in vstavili v papirnato ali PVC vrečko. Vzorce smo transportirali v hladilni torbi pri temperaturi od 10 do 15 °C, da smo ohranili vitalnost *P. infestans*, ki je občutljiva na visoke temperature in izsušitev. Vzorci so bili v laboratoriju sprejeti najpozneje 24 ur po nabiranju.

### 3.1.2 Vzorci za ugotavljanje oospor

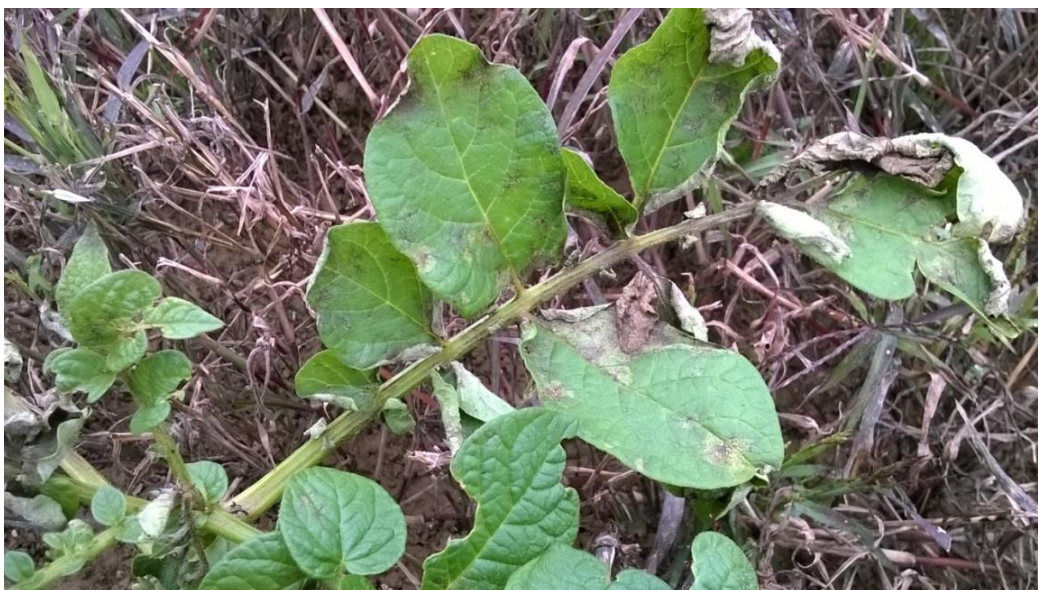
Proti koncu rastne dobe leta 2005 smo na trinajstih lokacijah nabrali liste krompirja in paradižnika na njivah in vrtovih, kjer je krompirjeva plesen rastline že močno prizadela in so bile na še zelenih delih vidne multiple okužbe (preglednica 4). Odbrali smo liste, ki so bili že močno plesnivi in so se pege združile med sabo, tako da je bilo tkivo v celoti odmrlo. Pripravili smo dvajset lističev za neposreden pregled z mikroskopom in na istem mestu nabrali tudi večjo količino listov za ekstrakcijo oospor. Ker smo želeli ugotoviti navzočnost oospor v naravnih razmerah, listov nismo dodatno inkubirali. Posušili smo jih na sobni temperaturi za poznejši pregled.

Preglednica 4: Vzorci za ugotavljanje navzočnosti oospor *P. infestans* v listih krompirja in paradižnika  
Table 4: Samples of tomato and potato leaves for detection of *P. infestans* oospores

Gostitelj	Lokacija	Datum vzorčenja	Masa zračno suhega vzorca (g)
Krompir	Brest	24. 8. 2005	20,0
Krompir	Komenda 1	24. 8. 2005	12,9
Krompir	Domžale	24. 8. 2005	15,0
Krompir	Komenda 2	24. 8. 2005	12,5
Krompir	Novo mesto	25. 8. 2005	8,3
Krompir	Rakičan	31. 8. 2005	6,7
Krompir	Ljubljana	29. 10. 2005	5,6
Paradižnik	Črna vas	24. 8. 2005	13,5
Paradižnik	Ig	24. 8. 2005	12,5
Paradižnik	Tomačevo	24. 8. 2005	10,4
Paradižnik	Tomišelj	24.8. 2005	9,5
Paradižnik	Moste pri Komendi	29.8. 2005	6,5
Paradižnik	Ljubljana	16. 10. 2005	15,0
Paradižnik	Sežana	21. 10. 2005	9,6

V marcu 2015 smo odvzeli 6 vzorcev tal (do globine 5 cm) z zemljišč, kjer je v letu 2014 rasel krompir ali paradižnik, okužen s krompirjevo plesnijo. Želeli smo ugotoviti, ali so v tleh vitalne oospore. Dva vzorca sta bila z vrtov, kjer je rasel paradižnik (Ljubljana 1, Ljubljana 2) in štirje z njiv s krompirjem (Vodice, Spodnji Brnik, Hrušica). Njive še niso bile preorane. Vzorca z lokacije Vodice sta bila z njive, kjer gojijo krompir v monokulturi že več let in smo v letu 2010 tudi opazili pojav bolezenskih znamenj, ki so vzbujala sum, da so okužbo povzročile oospore (slika 6). Vzorec z vrta (Ljubljana 2) je bil vzet na mestu, kjer je paradižnik rasel dve zaporedni leti. Na vseh mestih vzorčenja je bila v letu 2014 na rastlinah razširjena krompirjeva plesen.

V letu 2015 smo na njivi v Žejah pri Komendi, kjer je bil posajen zgodnji krompir in zatem korenje, našli dne 12. 10. 2015 veliko samosevcev krompirja (slika 9), ki so bili okuženi s krompirjevo plesnijo. Nabrali smo liste z multiplimi okužbami. Zložili smo jih v plastične pladnje (35 cm x 25 cm x 10 cm) na vlažne Negasoft krpice (Sanolabor), ki so bile položene na plastično rešetko tako, da je njihov rob segal v vodo, ki smo jo nalili pod rešetko. Pladnje smo zaprli v prozorno plastično vrečo in liste inkubirali 10 dni pri naravni osvetlitvi (ne izpostavljene direktnemu sončnemu sevanju) in temperaturi na vrtu Kmetijskega inštituta. Po 10 dnevih smo pladnje prenesli v laboratorij, jih odprli in pustili, da so se listi posušili na sobni temperaturi.



Slika 9: List samosevnega krompirja s številnimi lezijami krompirjeve plesni  
Figure 9: Volunteer potato leaf with multiple late blight lesions

### 3.1.3 Vzorci DNK *P. infestans* iz okuženih listov krompirja in paradižnika

Vzorčenje s FTA karticami (Whatman FTA<sup>®</sup> Mini Card) omogoča varno shranjevanje vzorcev v daljšem obdobju in poznejšo analizo DNK. Vzorec okuženega lista smo stisnili

ob površino kartice, ki je obdelana s kemikalijami. Vsebina celic *P. infestans* se vpije, sproščena DNK se veže in stabilizira, zaščiten je pred nukleazami in oksidacijo.



Slika 10 : FTA kartica z vzorcem DNK *P. infestans*  
Figure 10: FTA card with sample of *P. infestans* DNA

Z ene njive ali vrta smo vzeli dve posamični leziji (če je bilo mogoče z ene rastline) in ju odtisnili na eno kartico z dvema poljema. Lezija mora biti sveža, z vidnim micelijem. Suhi listi ali listi z več lezijami niso primerni, prav tako ne z vodo namočeni listi ali vidno okuženi z bakterijami. Ob robu lezije, kjer so opazni trosonosci s trosovníki, smo izrezali 2 cm<sup>2</sup> lista in izrez položili z delom, ki sporulira, navzdol na označeno polje za vzorec. Kartico smo zaprli in z drgnjenjem ali rahlim tolčenjem vtisnili ekstrakt *P. infestans* v podlago. Ostanek vzorca smo odstranili, kartico označili in jo sušili na sobni temperaturi eno uro (Protocol for sampling ..., 2014). Mesta vzorčenja v posameznih letih so prikazana na slikah 19, 20 in 21).

### 3.2 IZOLACIJA ORGANIZMA IN SHRANJEVANJE IZOLATOV

Za izolacijo smo v začetni fazi raziskave uporabljali gojišče imenovano V-8, ki je splošno gojišče za plesnivke iz rodu *Phytophthora* in vsebuje sok paradižnika in več vrst zelenjave (recept smo povzeli po Singletonu in sod., 1992) in rženo gojišče A (Rye A agar), ki sta ga prva opisala Caten in Jinks leta 1968, a je bilo v različnih laboratorijih pozneje precej spremenjeno in obstajajo številne različice priprave. Obema gojiščema smo za preprečevanje rasti bakterij dodajali antibiotike ampicilin, rifampicin in pimarcin v priporočenih odmerkih (Singleton in sod., 1992). Postopek priprave gojišč je opisan v prilogi A.

Glede na vrsto okuženega rastlinskega materiala smo uporabljali različne načine za prenos *P. infestans* na gojišče. S posamezne samostojne pege, na kateri je bila opazna sporulacija, smo prenesli sporangije ali sporangiofore s sporangiji na gojišče. To smo delali pod stereoskopskim zoom mikroskopom s pomočjo preparirne igle. S sterilno iglo smo na konico zajeli delček gojišča in se z njim dotaknili sporangijev na mestu, kjer ni bila opazna kontaminacija z drugimi glivami in nato delček, ki so se ga oprijeli sporangiji, prenesli na gojišče z dodatkom antibiotikov. Inkubacija je potekala pri temperaturi 18 do 20 °C. Kulture na gojiščih smo začeli pregledovati po dveh dneh. Kjer je bila opazna rast in ni bilo vidne okužbe z bakterijami ali glivami, smo prenesli micelij z roba kolonij na enako gojišče brez antibiotikov, v nasprotnem primeru pa smo jih ponovno prenesli na gojišče z antibiotikom, dokler nismo dobili čiste kulture. Če po sedmih dneh nismo opazili hif, značilnih za rod *Phytophthora*, smo poskus izolacije ocenili kot neuspešen. Iz gomoljev smo izolirali patogen z izrezovanjem koščkov obolelega tkiva in polaganjem na rženo A gojišče z antibiotiki. Podobno smo ravnali v primeru plodov paradižnika.

Z bakterijami kontaminirane kulture smo poskusili očistiti tako, da smo izrezali večji kos kolonije (do 4 cm<sup>2</sup>). Prenesli smo ga na sveže gojišče tako, da smo del z micelijem obrnili navzdol in počakali, da so se hife prebile skozi gojišče, bakterije pa so ostale spodaj. Trosonosce s trosovniki smo previdno prenesli v drugo petrijevko. Sledilo je določanje vrste na osnovi morfoloških značilnosti. V primerih, da po inkubaciji listov nismo opazili sporulacije, smo plesen poskušali izolirati s polaganjem koščkov okuženega lista na rženo A gojišče z antibiotiki. List smo pred tem spirali s tekočo vodo, nato s sterilno vodo in osušili v brezprašni komori. Če je bil vzorec listov v slabem stanju (opazna kontaminacija), smo delali tudi posredno izolacijo preko gomoljev občutljive sorte krompirja. Za ta namen smo uporabljali zdrave gomolje sorte 'Minerva'. Gomolje smo oprali, jih površinsko razkužili z 0,5 % raztopino natrijevega hipoklorita in posušili. Kožico gomolja smo površinsko poškodovali s skalpelom, dodali nekaj kapelj sterilne vode in položili na to mesto del lista s pego krompirjeve plesni in ga pritrdili s parafilmom. Gomolje smo inkubirali dva do štiri tedne pri visoki zračni vlagi in pri temperaturi 16 °C. Ko so se razvila znamenja okužbe, smo iz gomoljev sterilno izrezali koščke okuženega tkiva in jih prenesli na rženo A gojišče z antibiotiki.

Za krajši čas, od enega do treh mesecev, smo vzdrževali delovno zbirko na rženem A gojišču v petrijevkah pri temperaturi 5 do 10 °C. Za trajnejše hranjenje izolatov smo z inokulacijsko iglo ali skalpelom izrezali košček gojišča premera od 4 do 6 mm, dobro preraščenega z micelijem, in ga prenesli v epruveto ali stekleničko s sterilnim poševnim rženim A gojiščem. V prvem letu raziskave smo uporabljali standardne epruvete 160 x 16 mm, pokrite s čepom iz staničevine ali vate in kovinskim pokrovčkom, ki smo ga ovili s parafilmom pred shranitvijo v hladilnik. V naslednjih letih smo začeli uporabljati univerzalne stekleničke (Jencons, 30 ml) z ravnim dnom in pokrovčki iz polipropilena z navojem, s katerimi je bilo lažje rokovati. Po 10 do 14 dneh, ko je kolonija prerasla

poševno površino, smo na kolonijo s sterilno pipeto nanесли parafinsko olje v plasti debeli vsaj 1,0 do 1,5 cm nad najvišjim delom kolonije. Parafinsko olje smo pred uporabo avtoklavirali dvakrat po 30 minut pri 120 °C v časovnem intervalu 24 ur. Tako pripravljene izolate smo do naslednjega precepljanja hranili od 12 do 24 mesecev pri temperaturi 5 do 10 °C.

### 3.3 UGOTAVLJANJE PARITVENEGA TIPA IZOLATOV *P. infestans*

Paritveni tip smo določali z metodo parjenja *in vitro* z referenčnimi izolati *P. infestans* znanega paritvenega tipa. Krožni izsek iz roba kolonije neznanega tipa (uporabili smo 10 do 14 dni stare kulture, gojene na rženem A gojišču) smo položili v petrijevko na rženo B gojišče, v bližino fragmenta iz referenčnega izolata znanega spolnega tipa A1. V drugo petrijevko smo dali isti izolat skupaj z referenčnim izolatom spolnega tipa A2. Po inkubaciji v temi pri 18 do 19 °C so se oospore razvile v desetih do dvajsetih dneh. Gojišče je bilo dovolj prozorno, da je omogočalo pregled za navzočnost oospor pod mikroskopom na stiku hif dveh kolonij. Če so nastale oospore, smo neznan izolat označili kot spolni tip, nasproten znanemu tipu referenčnega izolata (Erwin in Ribeiro, 1996; Tooley in sod., 1989). Po končanih meritvah smo ves material uničili z avtoklaviranjem.

### 3.4 UGOTAVLJANJE ODPORNOSTI IZOLATOV *P. infestans* PROTI FUNGICIDU METALAKSILU

Odpornost (občutljivost) izolatov *P. infestans* proti fungicidu metalaksilu smo ocenjevali *in vitro* s primerjanjem rasti kolonije na trdnem gojišču brez metalaksila in z dodanim metalaksilom (Daggett in sod. 1993; Goodwin in sod., 1996). Glede na radialni prirast smo razvrstili izolate kot odporne, srednje odporne in občutljive.

Pripravili smo rženo A gojišče in pred nalivanjem v petrijevke, ko je temperatura gojišča dosegla 45 do 50 °C, dodali raztopino tehničnega metalaksila v odmerku, s katerim smo dosegli v gojišču koncentracijo 5 ppm in 100 ppm. Metalaksil smo pripravili v založni raztopini, ki je vsebovala 0,1 g čistega metalaksila ml<sup>-1</sup> raztopine. V 10 ml dimetildulfoksida (DMSO) smo raztopili 1,0406 g tehničnega metalaksila (96,1 %, Novartis, Švica). V gojiščih z različno koncentracijo metalaksila mora biti vedno enaka količina DMSO, tudi v gojišču brez metalaksila, da izenačimo njegov morebiten vpliv na rast micelija. Gojišče smo pred nalivanjem premešali na magnetnem mešalu. Za vsak izolat smo pripravili po dve petrijevki premera 90 mm za vsako od treh koncentracij metalaksila v gojišču. Petrijevke smo grafično označili s črtami ob strani na obeh delih petrijevke: 0 ppm z eno črto, 5 ppm z dvema in 100 ppm s tremi črtami. Z luknjačem smo iz aktivno rastoče kulture izrezali krožce enakega premera (8 mm) in jih položili na sredino petrijevke

z gojiščem. V vsako serijo preizkušanja smo vključili tudi standardni odporen (US 940480) in občutljiv izolat (US 940501).

Preglednica 5: Priprava gojišča za ugotavljanje odpornosti izolatov *P. infestans* proti metalaksilu  
Table 5: Medium preparation for testing resistance of *P. infestans* isolates to metalaxyl

Gojišče	Koncentracija metalaksila		
	0 ppm	5 ppm	100 ppm
Rye A agar	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Založna raztopina metalaksila (0,1 g/ml)	0 ml	0,05 ml	1,0 ml
DMSO	1,0 ml	0,95 ml	0 ml

Inokulirane agarne plošče smo inkubirali v rastni komori pri temperaturi 18 °C. Prvo meritev smo opravili po sedmih dneh. Pri izolatih s počasno rastjo, kjer premer kolonije po sedmih dneh še ni presegel 30 mm, smo prirast merili po 10-tih ali 14-tih dneh. Izračunali smo srednjo vrednost premera dveh meritev vsake kolonije v dveh petrijevkah (premer kolonije je bil izmerjen ob dveh pravokotnicah, ki se sekata v središču).

Kriterij za določitev odpornosti je bil:

- odporen izolat: pri koncentraciji 5 in 100 ppm je dosežena rast večja ali enaka 40 % rasti na gojišču brez metalaksila (0 ppm),
- srednje odporen izolat: pri koncentraciji 5 ppm je rast večja ali enaka kot 40 % rasti na 0 ppm, rast na 100 ppm pa manjša od 40 % rasti na 0 ppm,
- občutljiv izolat: rast pri koncentraciji 5 ppm in 100 ppm je manjša od 40 % rasti na 0 ppm.

Postopek smo ponovili, če so izolati na gojišču brez metalaksila kazali znake degeneracije ali so rasli zelo počasi. Po končanih meritvah smo ves material uničili z avtoklaviranjem.

### 3.5 UGOTAVLJANJE NAVZOČNOSTI OOSPOR V LISTIH IN TLEH

#### 3.5.1 Neposreden pregled listov z mikroskopom

Da so listi postali prosojni (slika 11) in primerni za mikroskopski pregled, smo jih 5 minut vrel v 96 % etanolu, nato pa 5 minut namakali v 2 % natrijevem hipokloritu, jih splaknili z vodo in odcedili, podobno kot so delali Drenth in sod. (1995) ter Lehtinen in Hannukkala (2004). Za liste paradižnika smo čas namakanja v natrijevem hipokloritu podaljšali na 8 minut.





Slika 11: List, pripravljen za pregledovanje za navzočnost oospor *P. infestans*  
Figure 11: Cleared potato leaf ready to be examined for oospore presence

### 3.5.2 Ekstrakcija oospor iz listov krompirja in paradižnika

Metodo smo povzeli po Van der Gaag in Frinking (1997) in Flier in sod. (2003). Iz nabranih vzorcev listov krompirja in paradižnika z multiplimi okužbami, ki smo jih prej posušili, smo odstranili listne peclje in natehtali 5 do 20 g materiala, odvisno od razpoložljive količine vzorca. Vzorce smo mleli v kuhinjskem mešalniku skupaj s 50 ml ledu in 100 ml mrzle vode (4 °C), nato smo jih prenesli v 500 ml steklenico in homogenizirali do spenjenja (90 sekund do 2 minuti) s homogenizatorjem (Ultra Turrax) pri 24000 rpm. Vzorec smo ohladili na 4 °C in ponovno homogenizirali z Ultra Turrax mešalcem 90 sekund. Dodali smo 5 mg celuloze (Duchefa C 8001) in 5 mg maceraze (Duchefa 8002) za vsak gram vzorca. Vzorec smo inkubirali na stresalniku pri sobni temperaturi 2 uri. Sledila je obdelava v ultrazvočni kopeli 2 x po 5 minut. Po 24 do 48 urah inkubacije smo vzorec spirali na sitih 250, 100, 75 in 20 µm. Obdržali smo le frakcijo na 20 µm situ. Sprali smo jo v epruveto in jo zgostili s centrifugiranjem. Usedlino smo razredčili z laktoglicerolom do volumna 5 ml do 20 ml, odvisno od njene količine. Suspenzijo smo pregledovali s hemocitometrom. Končni volumen razredčene usedline je pomemben, ker ob upoštevanju mase suhih listov pred ekstrakcijo in z uporabo hemocitometra lahko ocenimo, koliko oospor je v tkivu.

### 3.5.3 Test z vabo za ugotavljanje oospor v tleh

Pri kalitvi oospor se zoospore sproščajo v vodno raztopino. Test z vabo temelji na lastnosti zoospor, da se aktivno gibljejo v nasprotni smeri od gravitacijske sile proti površju vode (Carlile, 1983) in se v procesu encistiranja prilepijo na list, ki je primeren substrat za

kalitev in okužbo. Pri nizki temperaturi inkubacije (15 °C), ki je hkrati ugodna za aktivnost zoospor, list živi dovolj dolgo, da drugi organizmi (saprofitske glive in bakterije) niso konkurenčni *P. infestans*. Po metodi Drenth in sod. (1995) smo vzorec 1 kg tal prenesli v plastični pladenj z merami 35 x 25 x 10 cm in ga zmešali z 2 l vodovodne vode, pladenj prekrili s prozorno folijo in inkubirali 2 dni pri 15 °C. Nato smo položili na površje vode 20 lističev krompirja sorte 'Bintje', ki je občutljiva na krompirjevo plesen. Lističe smo položili z zgornjo stranjo navzdol in inkubirali pri isti temperaturi in 16 urni osvetlitvi še 5 dni. Po petih dneh smo pregledali ali so na lističih pege in če *P. infestans* sporulira. Kjer ni bilo peg, smo nadaljevali z inkubacijo še dva dni in nato končali s poskusom.

### 3.6 DOLOČANJE GENOTIPOV *P. infestans* Z METODO ENOSTAVNIH PONOVLJIVIH SEKVENC

Mikrosateliti ali enostavne ponovljive sekvence so posebna zvrst ponovljivih zaporedij DNK, ki vključujejo osnovni motiv 1 do 10 bp, ki se ponovi tudi do 100-krat in so razvrščeni na mnogih lokusih genoma. Navzoči so v genomih eukariontov in se uporabljajo za identifikacijo, teste starševstva, raziskave populacijske genetike, genomskega mapiranja in pregledovanje genskih knjižnic. Njihova zelo visoka stopnja mutacij jim daje visoko informativnost pri določanju sorodstvenih povezav (Bridge in sod., 1998).

Analiza genotipa *P. infestans* je bila opravljena v laboratoriju inštituta James Hutton (JHI) na Škotskem z metodo enostavnih ponovljivih sekvenc v multipleks zasnovi, ki so jo opisali Li in sod. (2013). V multipleks PCR reakciji so uporabili primerje za pomnožitev 12 SSR lokusov (Pi02, Pi04, Pi63, D13, Pi4B, PiG11, PinfSSR4, PinfSSR6, PinfSSR8, PinfSSR2, Pi70, PinfSSR11) z ustreznimi fluorescenčnimi barvili za vizualizacijo. PCR produkte so analizirali z avtomatskim kapilarnim sekvenatorjem. Za določanje velikosti alelov so uporabili programsko opremo GeneMapper, zatem pa so podatke pregledali še ročno. Rezultat je podatek o velikosti obeh alelov (število baznih parov) na posameznem lokusu (pri nekaterih vzorcih je navzoč tudi tretji alel). Z nadaljnjo analizo podatkov s programskimi orodji so ugotovili, ali kombinacija alelov na analiziranih lokusih ustreza kateremu od znanih potomstev klonov (clonal lineages) v zbirki podatkov o multilokus genotipih, ali pa gre za edinstven genotip, ki ga doslej v evropskih populacijah še niso zaznali. Na osnovi več markerjev (SSR, mitohondrijski haplotip, paritveni tip) genotipe po genetski sorodnosti združujejo v potomstva klonov in jih poimenujejo z dvema črkama, ki sta oznaka za geografsko območje, kjer je bil vzorec *P. infestans* nabran in zaporedno številko ter s paritvenim tipom (npr. EU\_34\_A1), vse ostale pa označijo kot drugačne (other).

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 VZORČENJE IN ZBIRKA IZOLATOV KROMPIRJEVE PLESNI

V vseh letih raziskave, ko smo za izolacijo *P. infestans* nabirali s krompirjevo plesnijo okužene dele rastlin krompirja in paradižnika, smo zbrali 285 vzorcev in iz njih pridobili skupno 229 izolatov za nadaljnje delo, 156 s krompirja in 73 s paradižnika (preglednica 6). Rastišče je bilo v večini primerov njiva (krompir) ali vrt (krompir in paradižnik), v posameznih primerih pa smo vzorec vzeli v skladišču (4 vzorci gomoljev), en vzorec paradižnika v rastlinjaku in en vzorec listov krompirja na kupu odpadnega krompirja. Časovna razporeditev vzorčenja preko rastne dobe ni bila enakomerna, saj je bila odvisna od začetka prvega pojava plesni in kako se je bolezen razvijala glede na vremenske razmere. V letih 2002 in 2007, ko se je plesen pojavila zgodaj (že ob koncu maja in v začetku junija), smo pri krompirju večino vzorcev zbrali že do konca julija (84 % v letu 2002 in vse vzorce v letu 2007). V letih 2004 in 2005, ko se je plesen pojavila pozneje, v drugi polovici junija oziroma v drugi polovici julija, smo veliko vzorcev nabrali še v avgustu. Leti 2003 in 2006 zaradi suhega in vročega vremena nista bili ugodni za razvoj plesni, zato smo v letu 2003 pridobili le pet izolatov in enega v letu 2006. Število zbranih vzorcev in izolatov in uspešnost izolacije po letih, razen za leto 2006, je prikazana v preglednici 6. Vremensko ekstremno je bilo leto 2003, ko se je plesen prvič pojavila šele konec avgusta na paradižniku. Večino vzorcev plesni s paradižnika smo zbrali v avgustu in septembru, več v letih, ko je bilo plesni na krompirju malo. Podatki o datumu in lokaciji vzorčenja, rastišču in gostitelju so za izolate *P. infestans* zbrani v prilogi B, skupaj z rezultati določitve paritvenega tipa in odpornosti proti metalaksilu.

Preglednica 6: Število vzorcev krompirjeve plesni in uspešnost izolacije *P. infestans*  
Table 6: Number of late blight samples and isolation success of *P. infestans*

Leto	2002	2003	2004	2005	2007
Število zbranih vzorcev	53	6	159	29	38
Število izolatov v delovni zbirki	38	5	130	23	33
Uspešnost izolacije (%)	71,6	83,3	81,8	79,3	86,8

Mesta, kjer smo jemali vzorce za izolacijo *P. infestans*, so prikazana na sliki 8. V različnih letih smo vzorčenje na nekaterih lokacijah ponovili, da bi ugotovili morebitno spremembo populacije med rastnimi dobami. Zaradi večje intenzivnosti pridelovanja krompirja na Gorenjskem je bilo to območje bolj podrobno obdelano. Med 156 izolati *P. infestans* s krompirja jih je 61 (39 %) izviralo z njiv na Gorenjskem. Vzorce krompirja smo jemali tudi na vrtovih, kjer je varstvo s fungicidi manj intenzivno (20 izolatov oziroma 13 %).

Vzrok za neuspešno izolacijo je bila pogosto kontaminacija vzorcev z bakterijami, saj kljub dodatku antibiotikov v gojišču ti niso zavrli rasti vseh vrst bakterij. Med glivami, ki so največkrat prerasle počasi rastoče kolonije *P. infestans*, so bile glive iz rodov *Alternaria* in *Fusarium*. Pri nekaterih vzorcih listov krompirja pri inkubaciji v vlažni komori nismo mogli izzvati sporulacije, čeprav so imeli listi značilna znamenja okužbe s krompirjevo plesnijo. Vzrok smo pripisovali predhodnemu tretiranju listov s fungicidi.

Po opravljenih opazovanjih in meritvah smo izolate shranili v steklene epruvete s poševnim rženim A gojiščem in jih zalili s parafinskim oljem. Zbirko smo precepljali na novo gojišče na 12 do 24 mesecev. Ob vsakem precepljanju smo del izolatov morali izločiti (10 do 20 %), bodisi ker niso bili več živi ali pa je prišlo do njihove kontaminacije. Leta 2012 smo imeli v zbirki še 95 izolatov, ki smo jih uporabili za nadaljnje analize genotipa.

V letih, ko smo vzorčili DNK s FTA karticami, smo zbrali skupno 120 odtisov *P. infestans*: 28 v letu 2012, 43 v letu 2014 in 49 v letu 2015. Vzorcev s krompirja je bilo 68 (57 %), s paradižnika 52 (43 %). Zaradi nepredvidljivega razvoja bolezni v posameznem letu se nismo držali načrta vzorčenja glede na gostitelja, po katerem smo letno predvideli 80 do 90 % vzorcev s krompirja in le manjši delež vzorcev paradižnika. V letu 2012 je bilo vzorcev s paradižnika 21 %, v letu 2014 pa 12 %. V letu 2015, ko se je razvoj bolezni na krompirju zaradi vročega vremena že v juniju prekinil in se razmere za razvoj plesni niso pojavile do konca spravila krompirja, smo imeli izjemoma 84 % vzorcev s paradižnika.

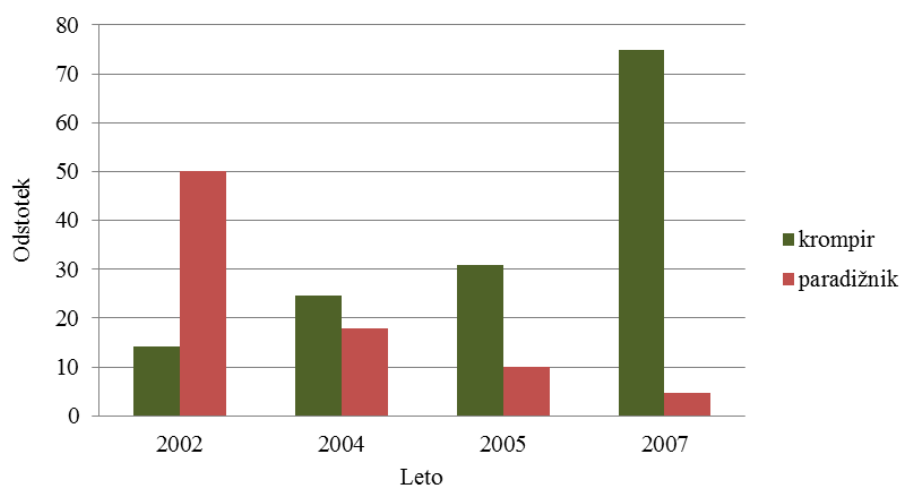
#### 4.2 PARITVENI TIP KROMPIRJEVE PLESNI

Paritveni tip smo določili pri 229 izolatih, 156 s krompirja in 73 s paradižnika. V letu 2002 smo našli en homotaličen izolat s krompirja, v letu 2004 pa dva. Označili smo jih A1A2. Vsi trije so tvorili oospore na rženem B gojišču brez navzočnosti nasprotnega paritvenega tipa, vendar je bila številnost teh manjša, kot če smo jih parili s katerim od znanih paritvenih tipov. Nekaj izolatov je z enim paritvenim tipom oblikovalo veliko oospor, z drugim pa le nekaj posameznih. Ker sami brez parjenja niso tvorili oospor, smo jih obravnavali kot tisti paritveni tip, ki je dal boljši rezultat pri parjenju. Na Finskem so v letu 2003 pri ugotavljanju paritvenih tipov ugotovili zelo velik delež avtofertilnih (24 %) izolatov. Izolati so bili pripravljene iz posameznih lezij in ne iz konic hif ali posameznih zoospor, zato je možno, da sta bila oba paritvena tipa prisotna že na pegi (Lehtinen in sod. 2008). Avtofertilni izolati so namreč lahko le mešanica hif A1 in A2 tipov (Fyfe in Shaw, 1992) ali pa na nekaterih gojiščih A2 izolati sami oblikujejo oospore brez parjenja z nasprotnim tipom (Smart in sod., 2000). Vzrokov za avtofertilnost pri naših izolatih s to lastnostjo ali izolatih, ki so kazali sposobnost parjenja z obema tipoma, nismo raziskali. Pri avtofertilnih izolatih obstaja možnost, da sta bila v izolatu dva seva.

Paritveni tip A2 je bil v populaciji *P. infestans* navzoč v vseh letih opazovanj, tako na krompirju kot na paradižniku, le v letu 2003, ko smo pregledali samo 5 izolatov, ga nismo zaznali (preglednica 7). Njegova zastopanost na krompirju se je od leta 2002 (14 %) povečevala in dosegla največjo vrednost v letu 2007, ko je bilo od 12 izolatov s krompirja 9 izolatov (75 %) s tem paritvenim tipom (slika 12). Nasprotno se je delež paritvenega tipa A2 pri paradižniku zmanjševal, vendar je zaradi majhnega števila vzorcev v letih 2002 in 2005 ta podatek manj zanesljiv. Težko ga posplošimo na celotno populacijo, razen za leto 2004, ko je bilo analiziranih 23 vzorcev. Mnogi raziskovalci so ugotavljali, da je razmerje med paritvenima tipoma zelo spremenljivo med leti in v prostoru (Zwankhuizen in sod., 2000; Hermansen in sod., 2000; Lehtinen in sod., 2008), kar velja tudi za opazovano populacijo v Sloveniji.

Preglednica 7: Paritveni tip pri izolatih *P. infestans* s krompirja in paradižnika, zbranih v letih 2002–2007  
Table 7: Mating type of *P. infestans* isolates from potato and tomato collected in the years 2002–2007

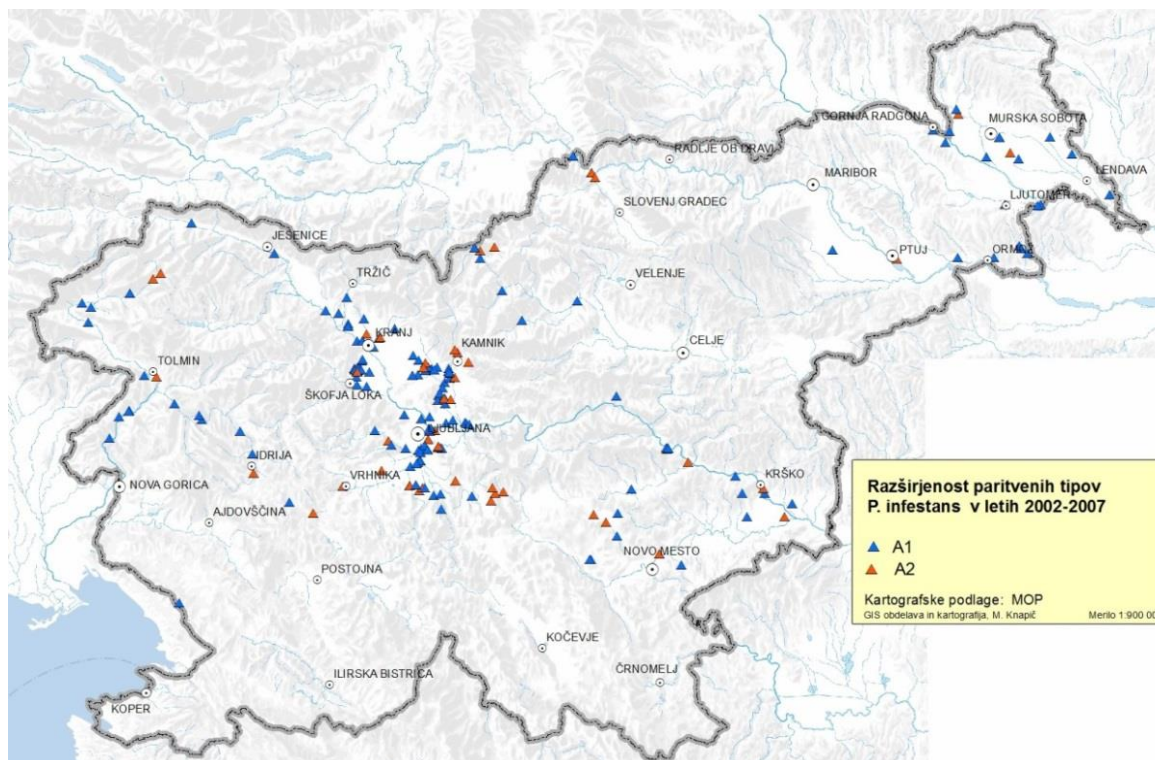
Leto	Število izolatov	Paritveni tip A1		Paritveni tip A2		Paritveni tip A1A2	
		Krompir	Paradižnik	Krompir	Paradižnik	Krompir	Paradižnik
2002	38	23	5	4	5	1	0
2003	5	1	4	0	0	0	0
2004	130	75	23	25	5	2	0
2005	23	9	9	4	1	0	0
2007	33	3	20	9	1	0	0



Slika 12: Zastopanost paritvenega tipa A2 v odstotkih med izolati *P. infestans* s krompirja in paradižnika, zbranih v Sloveniji v letih 2002–2007

Figure 12: Percentage of mating type A2 among the *P. infestans* isolates from potato and tomato collected in Slovenia in the years 2002–2007

V letu 2004, ko je bilo analiziranih več izolatov, smo opazili, da je v nekaterih območjih prevladoval paritveni tip A1 (Prekmurje, Gorenjska), drugje (del Dolenjske, Ljubljansko barje, Logarska dolina) pa je bil bolj razširjen A2 (slika 13).



Slika 13: Karta razširjenosti paritvenih tipov A1 in A2 *P. infestans* v Sloveniji v letih 2002–2007  
Figure 13: The distribution of *P. infestans* mating types A1 and A2 in Slovenia in the years 2002–2007

#### 4.3 ODPORNOST IZOLATOV *P. infestans* PROTI FUNGICIDU METALAKSILU

Testiranje za odpornost proti metalaksilu smo opravili za 228 izolatov: 155 (68 %) s krompirja in 73 (32 %) s paradižnika. Odpornost *P. infestans* proti metalaksilu se je pri krompirju pojavila vsako leto, vendar se je med leti delež odpornih izolatov spreminjal: najmanjši je bil v letu 2002 (14 %) in največji v letu 2007, ko je bilo med 12 pregledanimi izolati 9 (75 %) odpornih (preglednica 8, slika 14).

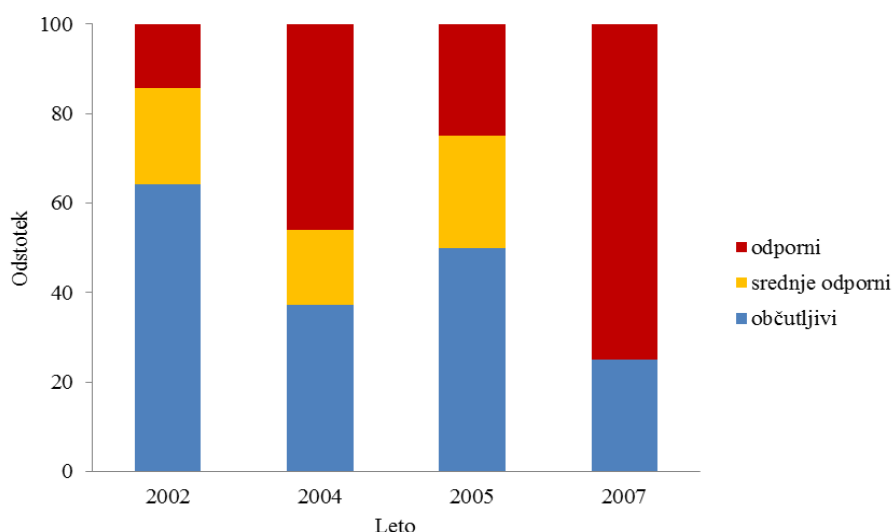
Pri krompirju so se vsa leta, razen v letu 2007, pojavljali tudi srednje odporni izolati. V letu 2004 je bilo več srednje odpornih izolatov na območju, kjer je bil bolj pogost paritveni tip A2 (sliki 13 in 16). Tudi pri paradižniku smo ugotovili srednje odporne izolate v letih 2002 in 2004, ko je bil delež paritvenega tipa A2 večji. Cooke in sod. (2003) so opazili veliko razliko v deležu srednje odpornih izolatov med leti. Več jih je bilo na poljih, kjer sta bila zastopana oba paritvena tipa.

Pri krompirju je bilo na njivah odvzetih 131 vzorcev, na vrtovih 20. Delež odpornih izolatov z njiv je bil večji (43 %) kot pri izolatih z vrtov (25 %). Vzrok za to razliko je, da se fungicid metalaksil na vrtovih le redko uporablja, kar omogoča sevom občutljivim za metalaksil, da se ohranijo. Podobne razlike med odpornostjo na poljih z intenzivno pridelavo in vrtovi so ugotovili tudi Fry in sod. (1991) in Cooke in sod (2003). Na paradižniku se je odpornost pojavila v vsem obdobju le pri enem izolatu v letu 2004 in dveh v letu 2007. V letu 2002 smo kljub majhnemu številu vzorcev pri treh izolatih s paradižnika ugotovili srednjo odpornost, v letu 2004 pri enem, v naslednjih letih pa pri nobenem (slika 15).

Preglednica 8: Število proti metalaksilu odpornih, srednje odpornih in občutljivih izolatov *P. infestans* s krompirja in paradižnika zbranih v letih 2002–2007

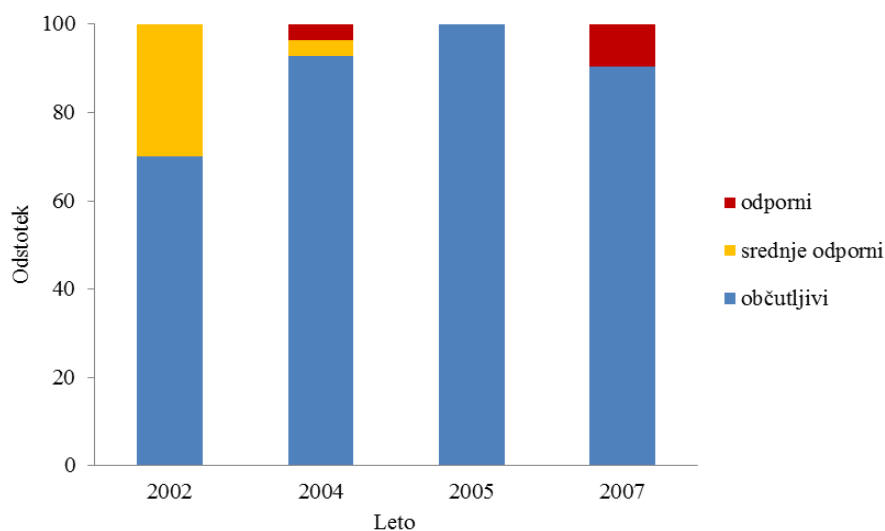
Table 8: Number of *P. infestans* isolates from potato and tomato with resistance, intermediate resistance or sensitivity to metalaxyl in the years 2002–2007

Leto	Število proti metalaksilu odpornih (R), srednje odpornih (I) in občutljivih (S) izolatov					
	Krompir			Paradižnik		
	R	I	S	R	I	S
2002	4	6	18	0	3	7
2003	1	0	0	0	0	4
2004	47	17	38	1	1	26
2005	3	3	6	0	0	10
2007	9	0	3	2	0	19
Skupaj	64	26	65	3	4	66

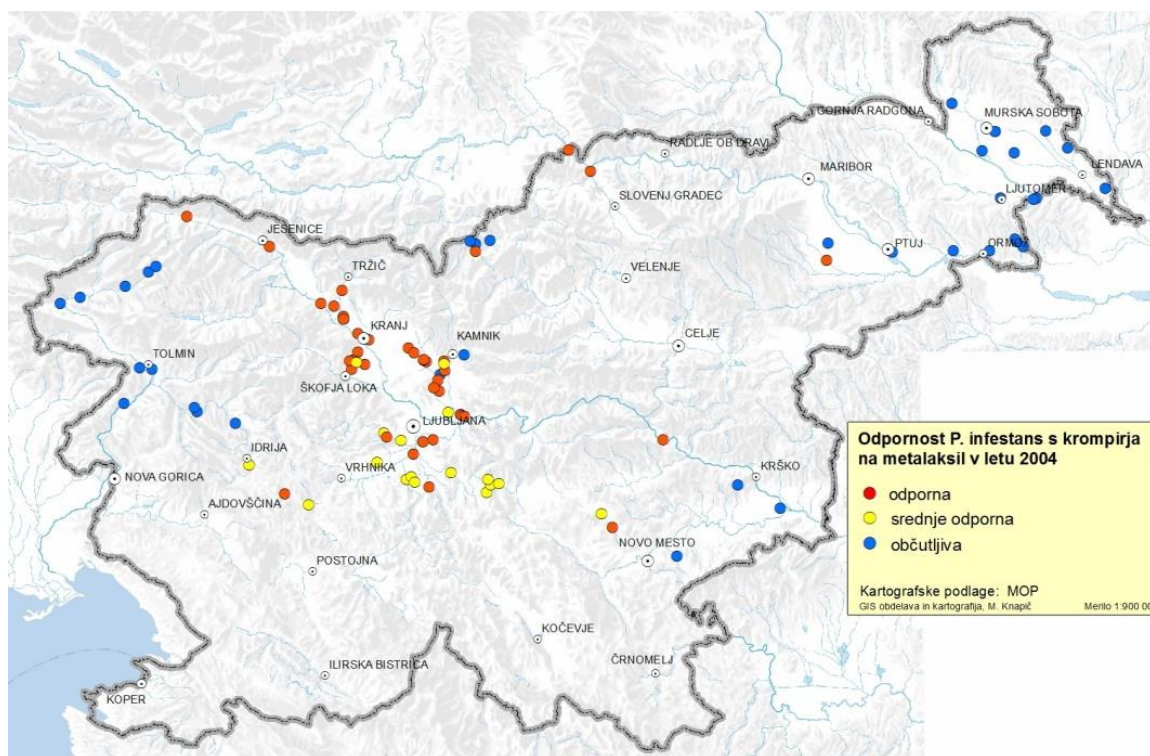


Slika 14: Odpornost izolatov *P. infestans* s krompirja proti fungicidu metalaksilu v letih 2002–2007

Figure 14: Resistance to metalaxyl of the *P. infestans* isolates from potato collected in the years 2002–2007



Slika 15: Odpornost izolatov *P. infestans* s paradižnika proti metalaksilu v letih 2002–2007  
Figure 15: Resistance to metalaxyl of the isolates from tomato collected in the years 2002–2007



Slika 16: Odpornost krompirjeve plesni proti metalaksilu v Sloveniji v letu 2004  
Figure 16: The distribution of late blight with resistance to metalaxyl in Slovenia in the year 2004

Ko smo grupirali podatke o odpornosti *P. infestans* glede na geografsko lego, kjer je bil vzorec nabran in smo se omejili na območje Gorenjske, je bil odstotek odpornih izolatov 66 % (povprečje za vsa leta vzorčenja za 61 njiv), kar je večje od povprečnega deleža odpornih izolatov na krompirju za celotno Slovenijo, ki je bil 41 %. Več odpornih izolatov



je izviralo tudi iz okolice Dravograda, z območja, kjer je pridelovanje krompirja intenzivno. Nasprotno je bila populacija plesni s krompirja v Pomurju in na Primorskem občutljiva za metalaksil, kar pripisujemo manjši rabi tega fungicida.

Day in Shattock (1997) sta ugotovila, da so izolati občutljivi za metalaksil na splošno bolj agresivni kot tisti popolnoma odporni. Pri sočasnem okuževanju gomoljev z izolati odpornimi proti metalaksilu in z občutljivimi, so se odporni izolati na skladiščenih gomoljih obdržali manj časa kot občutljivi (Kadish in Cohen, 1992). Z navedenimi dejstvi so utemeljevali, da je nadaljnja kontrolirana raba fenilamidov (omejeno število škropljenj in kombinacija metalaksila s protektivno delujočo aktivno snovjo) smiselna, ker odpornost v populaciji ni stabilna, ampak se odporni sevi vsako novo rastno dobo ponovno namnožijo v procesu selekcije in jih je v začetku rastne dobe manj. Da je sposobnost ohranjanja genov v populaciji manjša pri krompirjevi plesni odporni proti metalaksilu, so na osnovi monitoringa populacije sklepali tudi Dowley in sod. (2002). Primerjali so stopnje okužbe v nasadih tretiranih z fenilamidi in tistimi, kjer so bile uporabljene druge fungicidne aktivne snovi. V vseh letih so bili nasadi, tretirani s fenilamidi, manj okuženi in je torej uporaba fenilamidov, kljub vsakoletnemu pojavu odpornosti na 45 do 77 % njiv, omogočala dobro varstvo pred plesnijo na listih.

Te ugotovitve so bile veljavne za obstoječo populacijo v obdobju, ko so omenjene raziskave potekale in je bila populacija morda bolj heterogena. V primeru skoraj popolne prevlade enega genotipa *P. infestans* z odpornostjo proti metalaksilu, kot je to v primeru EU\_13\_A2, takšen način varstva ne bi bil uspešen.

Iz vzorcev gomoljev semenskega krompirja, pridelanega v letu 2002, ki smo jih vzeli v skladišču spomladi leta 2003, smo izolirali plesen paritvenega tipa A2, odporno proti metalaksilu. Tudi plesen, ki smo jo našli na kupu odpadnega krompirja pri Komendi v juniju leta 2005, je bila odporna proti temu fungicidu. Sklepamo, da so lahko v populaciji tudi ob začetku rastne dobe navzoči odporni sevi plesni na gomoljih. Prav tako nastajajo tudi pri spolnem razmnoževanju, saj se lastnost deduje. Pri uporabi fenilamidov je zato potrebna previdnost in popolna ukinitvev kurativne rabe.

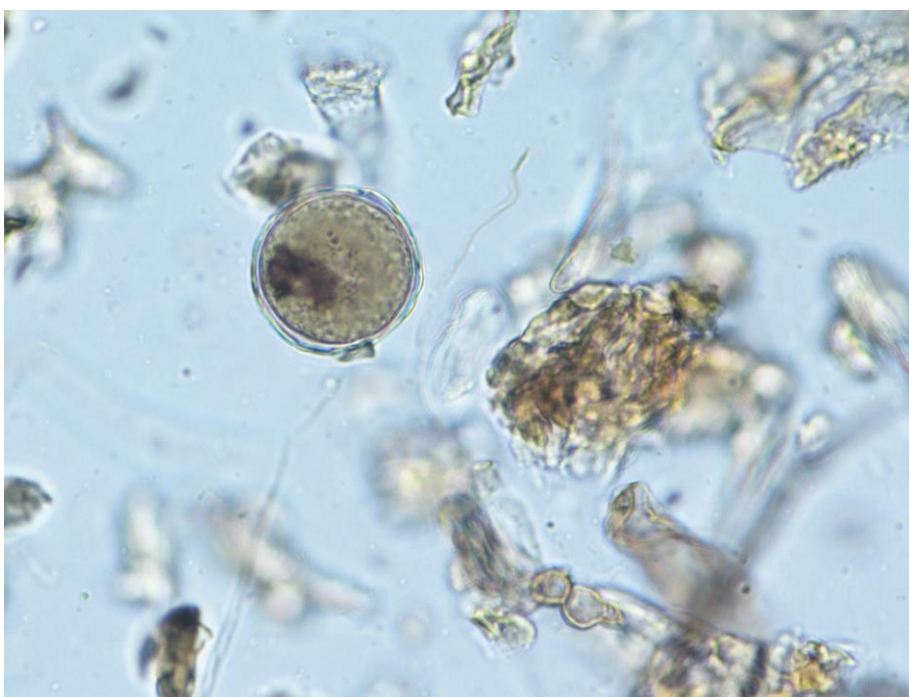
#### 4.4 NAVZOČNOST OOSPOR V LISTIH IN TLEH

##### 4.4.1 Oospore v listih

Lističe smo po presvetljevanju pregledovali z mikroskopom. Pregledali smo po dvajset lističev pri treh vzorcih krompirja z lokacij Komenda 2, Novo mesto in Ljubljana ter pri treh vzorcih paradižnika (Tomišelj, Ig, Ljubljana), vendar oospore nismo našli v nobenem. Opustili smo pregledovanje posamičnih lističev in iz 14 vzorcev ekstrahirali oospore.

V vzorcih listov paradižnika z lokacij Tomišelj in Črna vas smo našli oospore (slika 17). Povprečna velikost oospore (n=20) je bila 33  $\mu\text{m}$ . Po štetju s hemocitometrom smo v znanem volumnu suspenzije, v katero smo kvantitativno prenesli ves material posameznega vzorca z velikostjo delcev med 20 in 75  $\mu\text{m}$ , ocenili število oospor: v vzorcu iz Tomišlja na 70 oospor v gramu suhih listov in v vzorcu iz Črne vasi na 370 oospor v gramu suhih listov. V ekstraktu iz listov krompirja oospor ni bilo.

V listih samosevnih krompirjev, nabranih v letu 2015, smo po inkubaciji pri pregledu z mikroskopom našli posamezne oospore. Pregledali smo 18 presvetljenih listov in oospore našli le v enem.



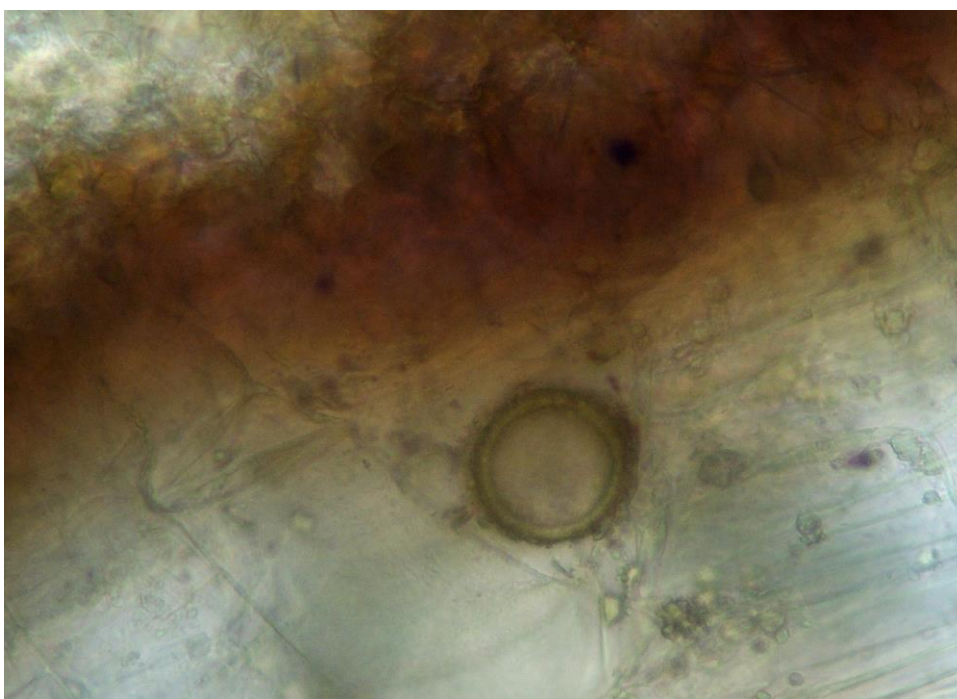
Slika 17: Oospora *P. infestans* v sedimentu po ekstrakciji iz listov paradižnika  
Figure 17: An oospore of *P. infestans* in the sediment after extraction from tomato leaves

V letu 2005, kljub obdelavi relativno velikih količin materiala, nismo uspeli ekstrahirati oospor iz listov krompirja, pri paradižniku pa je bil izplen zelo majhen. Vzrok je lahko v metodi, saj listov po nabiranju nismo inkubirali v prostoru nasičenem z vlago. Predpostavljali smo, da bi oospore morale biti navzoče že v času nabiranja. Inkubacija ob zadostni vlagi je eden ob pogojev za nastanek oospor (Cohen, 1997).

Nekateri raziskovalci so poročali, da več oospor nastane pri srednje odpornih sortah krompirja kot pri občutljivih (Drenth in sod., 1995; Hanson in Shattock, 1998). Izbor listov za analizo s polj in vrtov, kjer so bile rastline močno okužene, bi lahko bil neke vrste selekcija, s katero smo zbrali liste z manj oosporami. Učinkovitost nastajanja oospor je tudi

različna med različnimi A1 in A2 pari (Cohen, 1997) in so te lahko zelo neenakomerno razporejene po polju in na rastlinah, kar so ugotavljali tudi Turkensteen in sod. (2000). V primeru, da je število oospor v vzorcu zelo majhno, jih lahko spregledamo, saj mikroskopsko lahko pregledamo le omejeno količino listov.

V drugem poskusu iskanja oospor, ko smo liste 10 dni inkubirali, smo oospore našli tudi na krompirju, vendar tudi v tem primeru niso bile številne. Glede na velikost oospor predpostavljamo, da so te pripadale vrsti *P. infestans*, saj krompir in paradižnik nista gostitelja drugih vrst, ki bi tvorile takšne oospore. Pri oosporah nismo poskušali izzvati kalitve, da bi potrdili njihovo identiteto.



Slika 18: Oospora *P. infestans* ob žili v listu krompirja  
Figure 18: Oospore near the vein of potato leaf

#### 4.4.2 Oospore v tleh

V času trajanja poskusa s plavajočimi listi krompirja sorte 'Bintje' se niso pojavile lezije na listih oziroma smo proti koncu inkubacije pri nekaterih na listnih pecljih opazili rumenenje in bakterijsko gnitje. Pri maloštevilnih listih so se pojavile vodene pege, vendar sporulacije značilne za *P. infestans* ni bilo. Tkivo s teh peg smo prenesli na rženo A gojišče z antibiotiki, razvile so se kolonije *Pythium* sp. Pri nobenem od vzorcev ni prišlo do okužbe listov krompirja s *P. infestans*. Glede detekcije oospor v tleh sta bila Lehtinen in Hannukkala (2004), ki sta uporabljala modificirano metodo po Drenthu (1995), mnenja, da test z vabo morda ni dovolj občutljiv, da bi z njim zaznali inokulum, ki je sicer zadosten,

da povzroči v nasadu okužbo. Kot težavo sta navedla tudi shemo vzorčenja. Vzela sta vzorce s 16 žarišč bolezni, ki sta jih glede na način pojavljanja plesni ocenila kot mesta, kjer je do okužbe prišlo z oosporami, vendar sta jih v testu z vabo potrdila le v treh.

Zgolj navzočnost obeh paritvenih tipov še ni potrditev, da res prihaja do spolnega razmnoževanja, zato je najdba oospor pomembna. Glede na to, da smo večkrat opazili bolezenska znamenja, značilna za okužbo z oosporami, kot so jih opisali Lehtinen in Hannukkala (2004) in Widmark in sod. (2007), smo mnenja, da oospore predstavljajo vir okužbe in vplivajo na potek bolezni v Sloveniji.

V Mehiki, kjer je zastopanost obeh paritvenih tipov približno izenačena, so ugotovili, da je oosporulacija bolj intenzivna v razmerah, ki niso ugodne za hiter razvoj epifitocije. Nastanek oospor je bil večji, kadar je bil potek bolezni postopen in počasen, vendar z zadostno količino padavin. Suboptimalno tretiranje s fungicidi, ki širjenja bolezni ne prepreči, ampak ga le upočasni, je posredno prispevalo k številčnosti oospor v listih. Počasen razvoj epifitocije z dolgim trajanjem je značilen za tržno pridelavo v državah v razvoju kljub uporabi fungicidov (Romero-Montes in sod., 2008). Ta ugotovitev se deloma lahko nanaša tudi na uporabo fungicidov pri nas. Ta je v razdrobljeni, večinoma samooskrbni pridelavi krompirja na majhnih površinah (Urek in sod., 2012) drugačna kot pri intenzivni pridelavi. Število škropljenj je manjše in razmiki med njimi so dolgi, kar omogoča, da se plesen razvija, okužba pa ne doseže take stopnje, da bi ogrozila pridelek. V pridelavi, kot je znana pri nas pri maloštevilnih intenzivnih pridelovalcih in v državah z veliko tržno pridelavo krompirja v zahodni Evropi, je zatiranje plesni bolj natančno. Število škropljenj je veliko in razmiki med škropljenji kratki, saj je cilj varstva, da se plesen v nasadu pojavi čim kasneje v rastni dobi. Vpliv intenzivnosti varstva na spolno razmnoževanje *P. infestans* so komentirali tudi Li in sod. (2012). V večjem delu Nizozemske, kjer pridelujejo jedilni krompir, populacijo *P. infestans* sestavlja nekaj potomstev klonov in sklepajo, da se razmnožuje predvsem vegetativno. To pa ne velja za severovzhodni del države, kjer pridelujejo krompir za pridobivanje škroba in je populacija genetsko zelo raznolika (slika 7), kar je značilno za spolno razmnoževanje. Intenzivnost varstva pred plesnijo se med območjema razlikuje, saj pri pridelavi krompirja za škrob tolerirajo določeno stopnjo okužbe s plesnijo, zato škropijo manjkrat, z daljšimi presledki med škropljenji.

Na Poljskem so ugotovili precej izenačeno razmerje med paritvenima tipoma in veliko raznolikost genotipov v populaciji med prvimi v Evropi (Sujkowski in sod., 1994). Chmielarz in sod. (2014), ki so pozneje populacijo preučevali tudi z uporabo SSR markerjev, so to ponovno potrdili. Kot eno od razlag za spolno razmnoževanje in večjo raznolikost populacije so omenili tudi strukturo kmetijstva na Poljskem. Tam je veliko manjših njiv, kjer sadijo različne sorte in ne uporabljajo fungicidov proti krompirjevi

plesni ali pa le omejeno. Oblikujejo se manjše lokalne populacije, katerih širjenje ovirajo tudi gozdovi in geografske prepreke.

#### 4.5 GENOTIPI *P. infestans*

Iz 95 izolatov zbranih v letih od 2002 do 2007 (dva izolata sta bila dodana še iz leta 2010), iz katerih smo ekstrahirali skupno DNK, ki je bila nato analizirana v laboratoriju JHI, smo dobili podatke genotipiziranja z 12 SSR markerji za 94 izolatov, le pri enem analizi ni bila uspešna. V letih 2012, 2014 in 2015, ko smo vzorčili DNK s FTA karticami, smo zbrali skupno 120 odtisov *P. infestans*. Delež uspešnih analiz je bil v posameznem letu 93, 90 in 86 %, tako da je bil genotip določen pri 106 vzorcih. Vzrok neuspešnih analiz je bil mešanica genotipov (dva seva na isti leziji), premajhna vsebnost DNK ali pa je v odtisu ni bilo. Povprečna uspešnost pri monitoringu s FTA karticami v devetih evropskih državah v letu 2012 je bila 80 % (Meier-Runge in sod., 2014). Največ neuspešnih analiz pri nas je bilo v letu 2015, ko smo vzorčili pretežno paradižnik. Pri nekaterih vzorcih je bil sicer viden micelij ob robu lezij, vendar je bilo sporangijev malo. Raziskava genotipov je tako v vseh letih zajela skupno 200 vzorcev *P. infestans*: 133 s krompirja in 67 s paradižnika. Lokacije uspešnih vzorčenj so vrisane na kartah z rezultati razširjenosti genotipov (slike 19, 20, 21). Vzorčenje s FTA karticami za potrebe genotipiziranja je bilo pri našem vzorčenju uspešnejše kot pridobivanje izolatov v čisti kulturi (kjer je bilo od 71 do 86 % uspešnih izolacij). Pri vzorčenju s karticami je poraba časa veliko manjša. V kratkem obdobju lahko zberemo veliko vzorcev in pošiljanje v laboratorij je enostavno. Slaba lastnost takšnega načina je, da v primeru, ko bi pozneje želeli ugotoviti fenotipske lastnosti seva, ki smo ga genotipsko določili, tega ne moremo storiti, ker nimamo organizma.

Rezultate genotipizacije smo dobili v obliki tabele, kjer so za vsakega od 12 lokusov vpisane vrednosti za oba alela, izražene s številom baznih parov. Neredko so se na enem ali več lokusih pri nekaterih izolatih pojavili trije aleli, kar nakazuje, da gre v populaciji za različne stopnje ploidije. V takem primeru je vpisan v tabelo tudi tretji alel. Narejena je bila analiza genetske sorodnosti s primerjavo v podatkovni zbirki multilokus genotipov. Izolati so bili razdeljeni v skupine: če je bil njihov genotip prepoznan kot značilen za katero od znanih potomstev že opisanih klonov (clonal lineages), so bili poimenovani z imenom te skupine genotipov, sicer pa so dobili oznako 'other' (drugačni). Drugačne genotipe, ki so bili identični in so se večkrat pojavili, smo združili v podskupine lokalnih klonov. Genotipe, ki so se pojavili v populaciji le enkrat, smo poimenovali edinstveni genotipi.

Izsek iz tabele rezultatov v preglednici 9 prikazuje samo tri lokuse od dvanajstih pri nekaj izbranih vzorcih krompirjeve plesni. Enaki aleli so označeni z enako barvo za boljšo ponazoritev razlike med identičnimi genotipi, ki pripadajo istemu potomstvu klona (v

zgornjem delu preglednice) in drugačnimi, edinstvenimi genotipi, ki se vsi razlikujejo med seboj. Razmerja med posameznimi znanimi potomstvi klonov in skupino drugačnih genotipov so se med leti razlikovala (preglednica 10, slika 22).

Preglednica 9: Izsek iz tabele rezultatov SSR genotipiziranja *P. infestans* za tri lokuse

Table 9: The fragment from the table with results of SSR genotyping of *P. infestans* for three loci

Sample no.	SSR genotype	Locus D13	Locus D13	Locus D13	Locus G11	Locus G11	Locus G11	Locus SSR4	Locus SSR4	Locus SSR4
SI1405	EU_13_A2	136	154	0	154	160	0	284	294	0
SI1406	EU_13_A2	136	154	0	154	160	0	284	294	0
SI1421	EU_13_A2	136	154	0	154	160	0	284	294	0
SI1428	EU_23_A1	136	210	0	142	156	206	288	298	0
SI1437	EU_23_A1	136	210	0	142	156	206	288	298	0
SI1404	Other	118	136	0	154	154	0	284	284	0
SI1409	Other	152	154	0	162	162	0	284	294	0
SI1410	Other	118	136	0	160	162	0	284	288	0
SI1412	Other	134	136	0	142	162	0	288	292	0
SI1413	Other	136	154	0	142	154	160	284	294	0
SI1414	Other	136	136	0	162	206	0	284	284	0

Preglednica 10: Število vzorcev *P. infestans* z genotipi značilnimi za znana potomstva klonov in z edinstvenimi genotipi pri krompirju (K) in paradižniku (P) v letih 2002–2015

Table 10: Number of *P. infestans* samples with genotypes typical for some known clonal lineages and those with unique genotypes collected from potato (K) and tomato (P) plants in the years 2002–2015

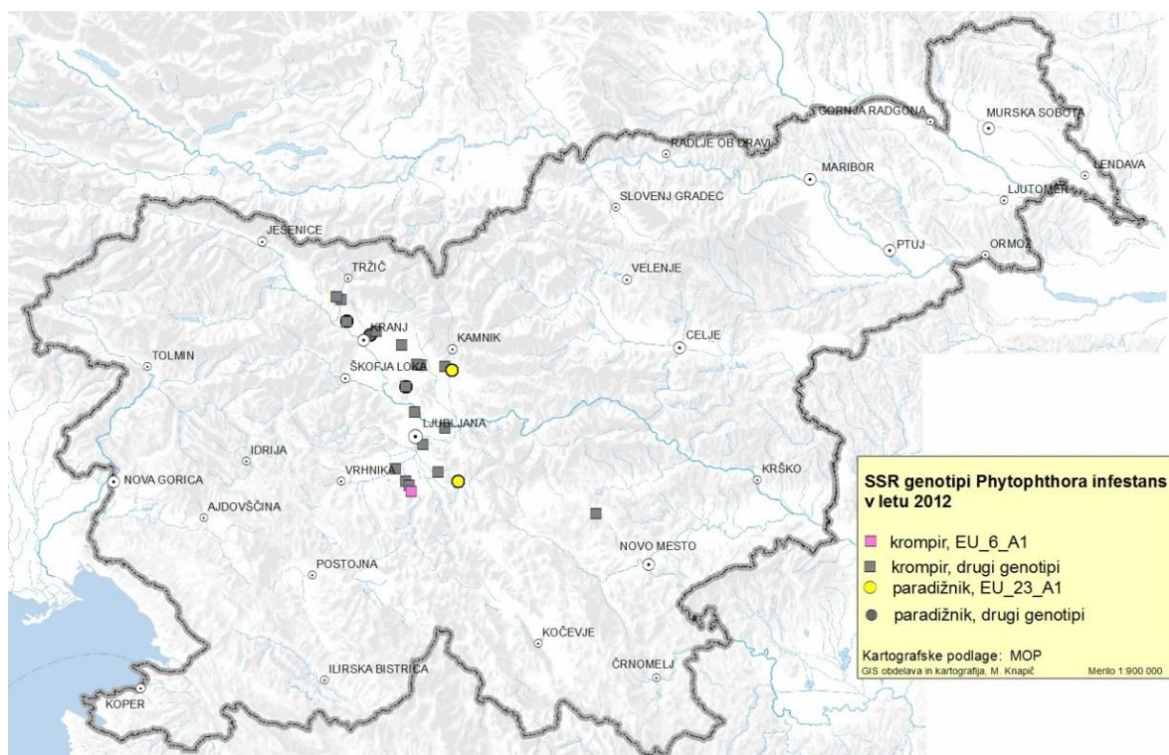
Potomstva klonov	2002		2004		2007		2012		2014		2015	
	K	P	K	P	K	P	K	P	K	P	K	P
EU-2_A1	2		23									
EU-23_A1			2	2		7		2		3	1	8
EU_34_A1			6		1				1			
EU_13_A2					6				4		1	
EU_6_A1							1					
Drugačni genotipi												
SI_14_klon1									9		2	
SI_14_klon2									4			
SI_15_klon											2	24
Edinstveni genotipi	7	3	19	9		2	20	3	16	1	2	2
Skupaj	9	3	50	11	7	9	21	5	34	4	8	34

V letu 2002 so prevladovali edinstveni genotipi. Leto 2003 je bilo glede vremenskih razmer zelo ekstremno. Visoke temperature in suša so popolnoma preprečile razvoj krompirjeve plesni do konca avgusta, kar je morda tudi vplivalo na pojav bolezní v letu 2004, ko je trem znanim potomstvom klonov pripadalo 60 % vzorcev. Predpostavljamo lahko, da semenski krompir domače pridelave ni bil okužen s plesnijo, okuženih samosevnih krompirjev ravno tako ni bilo. V začetku rastne dobe se je razširila plesen, ki je bila vnesena z gomolji semenskega krompirja iz drugih držav in pridružile so se še okužbe, ki so nastale z oosporami, ki so bile v tleh iz prejšnjih let. Potomstvo klona EU\_2\_A1, odporno proti metalaksilu, je bilo razširjeno v letih 2002 in 2004, najbolj na Gorenjskem, v naslednjih letih pa tega genotipa nismo več zaznali.

V letu 2004 je bil v Pomurju razširjen genotip EU\_34\_A1. Nekajkrat se je pojavil tudi drugje in se obdržal do leta 2014. Ta genotip se pojavlja na Poljskem že več let, v zahodni Evropi in na Britanskem otočju pa ga niso zaznali (Sampling ..., 2015). Prevladovanje plesni paritvenega tipa A1 v Pomurju (slika 13) in občutljivost za metalaksil v letu 2004 (slika 16) sta rezultat razširjenosti tega genotipa, saj sta to njegovi znani fenotipski značilnosti.

Tudi leto 2007, ko je v populaciji prevladala plesen potomstva klona z oznako EU\_13\_A2, je sledilo vročemu sušnemu letu. Semenski gomolji, ki so bili glede na veliko razširjenost genotipa EU\_13\_A2 v državah pridelovalkah semenskega krompirja v tem obdobju predvidoma močno okuženi s plesnijo (Gisi in sod., 2011), so bili glavni vir okužbe. Zwankhuizen in sod. (2000), ki so raziskovali vpliv virov inokuluma na širjenje krompirjeve plesni, so bili mnenja, da je v bolj suhih letih, ki sicer še omogočajo razvoj plesni, vpliv spolnega razmnoževanja na genotipsko sestavo populacije bolj očiten kot v mokrih. V mokrih pomladih se nekaj dominantnih genotipov razširi že zgodaj v rastni dobi in drugi genotipi, ki izvirajo iz spolnega razmnoževanja, ostanejo omejeni in v populaciji neopaženi. Inokulum plesni, ki izvira iz gomoljev, je bil že v prejšnji rastni dobi podvržen selekciji, zato je verjetnost, da okuži krompir in se razširi v nasadu večja kot pri inokulumu, ki izvira iz oospor (Widmark in sod., 2007). Kljub prevladi plesni z genotipom EU\_13\_A2 v letu 2007 ta v naslednjih letih ni predstavljala pomembnega deleža v populaciji, čeprav se je še pojavljala.

V letu 2012 so populacijo na krompirju sestavljali edinstveni genotipi (slika 19). Zaznali smo le en vzorec iz potomstva klona EU\_6\_A1. To je bil v Sloveniji edini primer najdbe *P. infestans* s tem genotipom, ki je bil sicer v letu 2012 dominanten v Veliki Britaniji, v naslednjih letih pa razširjen tudi v Belgiji in Franciji.



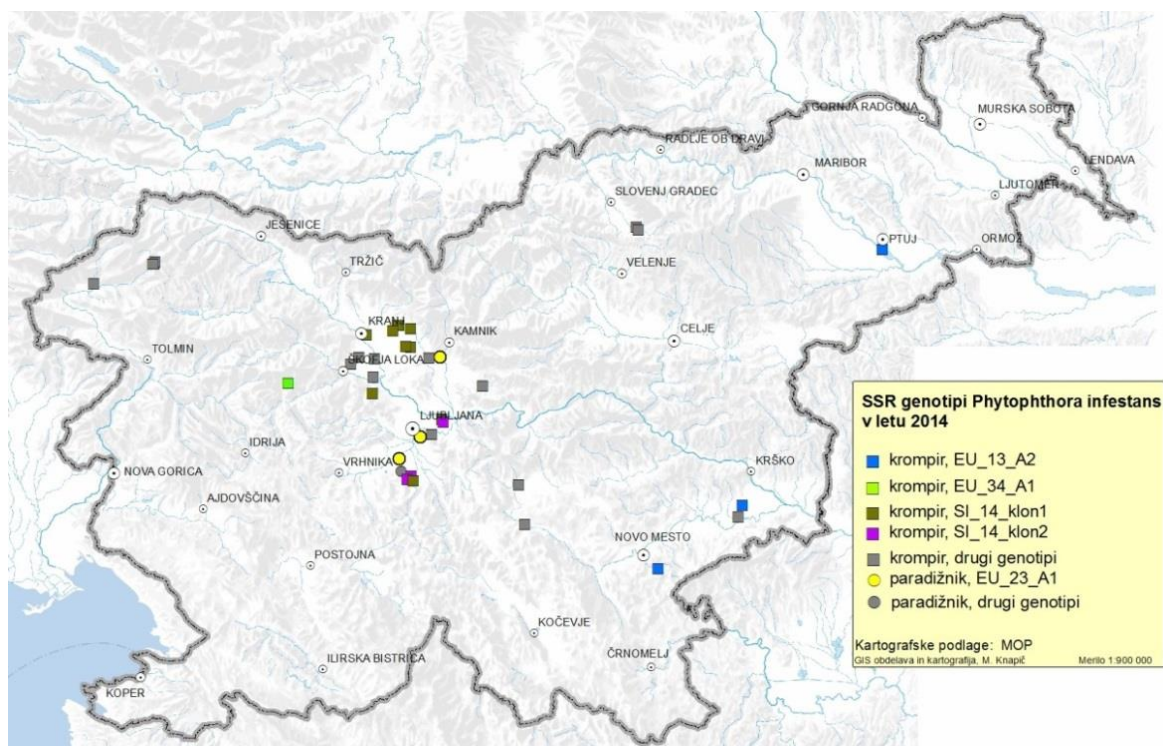
Slika 19: Razširjenost posameznih skupin genotipov *P. infestans* v letu 2012  
Figure 19: Distribution of some genotype groups of *P. infestans* in the year 2012

V letu 2014 je plesen z genotipom EU\_6\_A1 predstavljala 32 % evropske populacije (Meier-Runge in sod., 2014; Potato ... in Europe - 2014, 2015), vendar je treba poudariti, da so vzorci iz držav zahodne Evrope zastopani v raziskavi spremljanja populacije z večjim številom, kot iz drugih delov Evrope, kar lahko daje napačen vtis o razširjenosti. Ta genotip so našli tudi na Poljskem in Finskem, a se, enako kot pri nas, ni razširil.

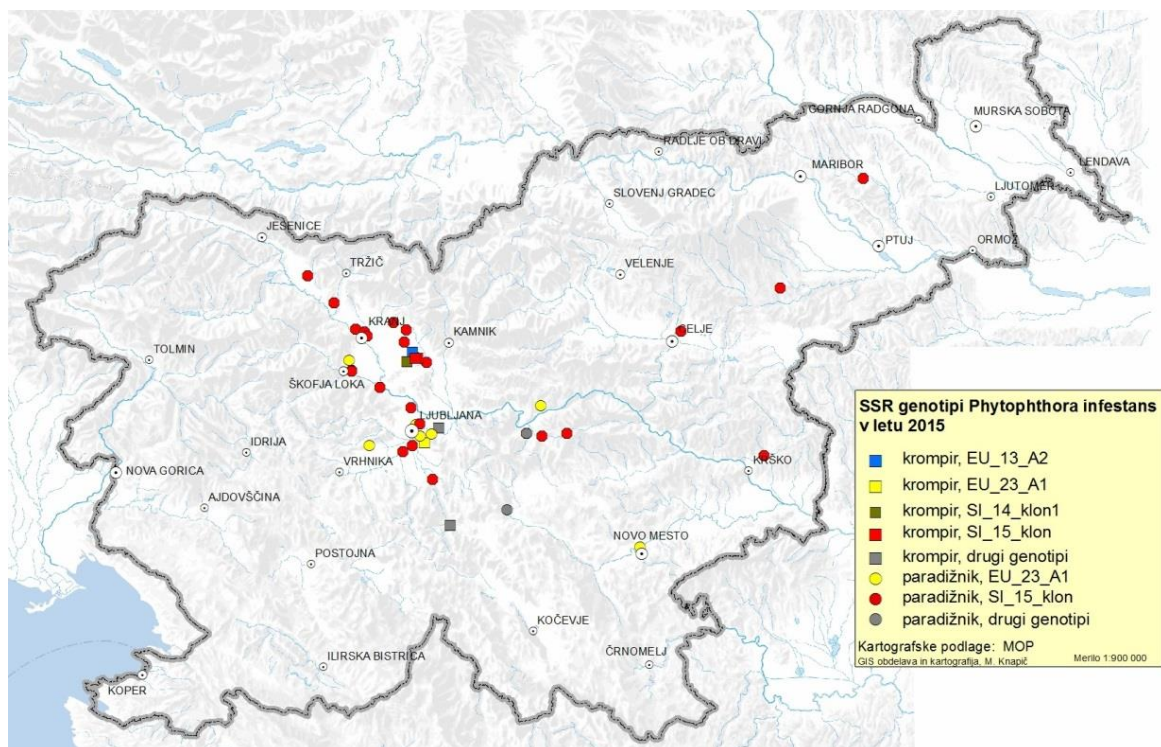
Tako v skupini izolatov iz let 2002 in 2004, kot pri tistih iz let 2012–2015 so po številu izstopali genotipi, katerih DNK prstni odtisi kažejo, da izvirajo iz populacije, v kateri so potekale spolne rekombinacije, saj so bili vzorci alelov na dvanajstih lokusih popolnoma različni in neponovljivi (slika 22). V celotnem obdobju od 2002 do 2015 je bilo med analiziranimi 200 vzorci 107 različnih genotipov *P. infestans*. Edinstven genotip je imelo 89 vzorcev (45 %). Med edinstvenimi genotipi lahko obstajajo sorodstvene povezave, česar nismo raziskali. V eno od petih skupin znanih potomstev klonov, znotraj katerih tudi obstaja določena variabilnost, je pripadal genotip 70 vzorcev (35 %). Trem še neopisanim lokalnim klonom je pripadalo 41 vzorcev (20 %).

Ti rezultati se razlikujejo od sestave populacije v zahodni Evropi, kjer prevladujejo potomstva klonov in so bolj podobni stanju v nordijskih državah (Brurberg in sod., 2011) in v vzhodni Evropi (Chmielarz in sod., 2014), kjer je v populaciji veliko različnih genotipov.





Slika 20: Razširjenost posameznih skupin genotipov *P. infestans* v letu 2014  
Figure 20: Distribution of some genotype groups of *P. infestans* in the year 2014



Slika 21: Razširjenost posameznih skupin genotipov *P. infestans* v letu 2015  
Figure 21: Distribution of some genotype groups of *P. infestans* in the year 2015

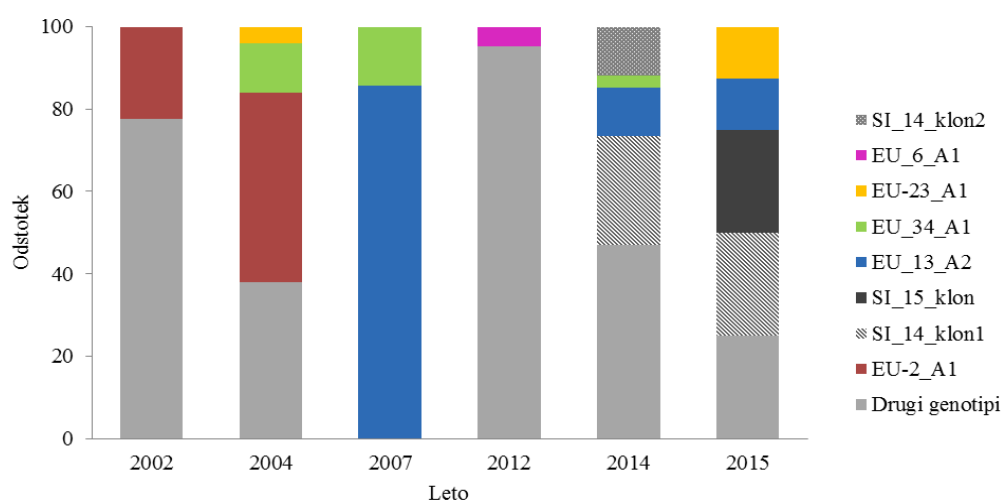
Edinstveni genotipi so se pojavljali vsa leta, tudi v letih 2005 in 2010 (priloga C), ko je bilo izoliranih le nekaj izolatov, ki niso prikazani v preglednici 10. Izjema je bilo leto 2007, ko so vsi vzorci *P. infestans* s krompirja imeli genotipe znanih potomstev klonov (slika 22). V skupino edinstvenih genotipov nismo prišteli vzorcev, ki so oblikovali lokalne klone, v katerih so bili vsi genotipi identični. Tak lokalni klon (označili smo ga SI\_14\_klon1) se je precej razširil v letu 2014 na krompirju na Gorenjskem (sliki 20 in 22), vzorca z enakim genotipom pa sta bila najdena tudi v Ljubljani in v Iški vasi. Na Gorenjskem se je v letu 2015 ponovno pojavil.

Med izolati *P. infestans* s krompirja, ki so imeli edinstvene genotipe (n=27) in so bili zbrani v obdobju med 2002 in 2007, je bilo odpornih proti metalaksilu 22 %. Paritveni tip A2 je bil zastopan s 44 %, pri čemer smo upoštevali avtofertilne izolate kot paritveni tip A2 (preglednica 11).

Preglednica 11: Paritveni tip in odpornost proti metalaksilu pri izolatih *P. infestans* z edinstvenimi genotipi, izoliranih s krompirja v letih 2002–2007

Table 11: Mating type and resistance to metalaxyl for *P. infestans* isolates with unique genotypes collected from potato in the years 2002–2007

Število izolatov	2002	2004	2005	2007	Skupaj
A1	5	10	0	0	15
A2	2	7	1	0	10
A1A2	0	2	0	0	2
Občutljivi	4	11	0	0	15
Srednje odporni	2	4	0	0	6
Odporni	1	4	1	0	6

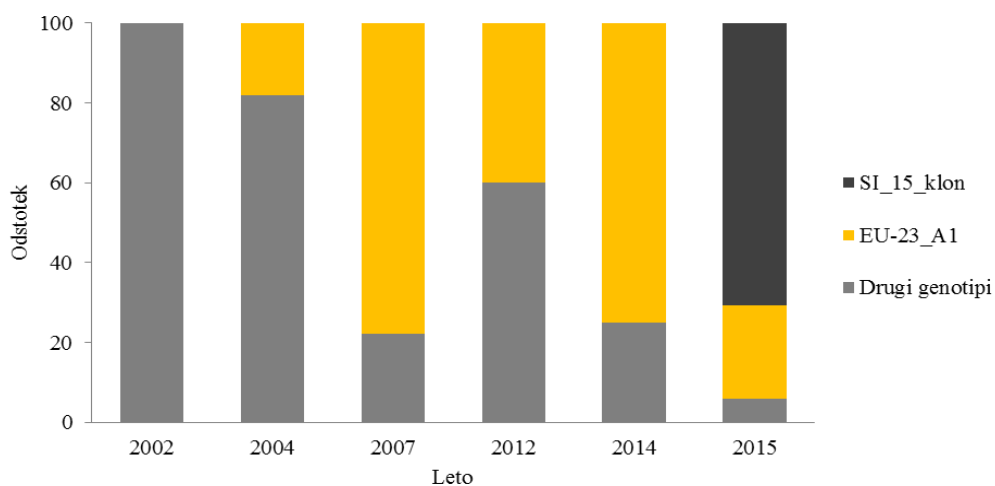


Slika 22: Pogostost genotipov v populaciji *P. infestans* s krompirja v letih med 2002 in 2015

Figure 22: Frequency of *P. infestans* genotypes collected from potato fields in the years 2002–2015

Na dveh bližnjih lokacijah v Ljubljani smo v letu 2014 našli vzorca, ki sta bila identična vzorcema, najdenima na Ljubljanskem barju v vaseh Vrbljene in Staje (slika 20). Takšen način pojavljanja kaže, da so bili izvor okužbe najverjetneje gomolji.

Pri paradižniku se je v populaciji pojavljalo pri 67 vzorcih 28 genotipov, od tega 22 takšnih, ki so bili zastopani le z enim vzorcem. V letu 2015, ko je med vzorci prevladovala *P. infestans* s paradižnika, je bil zelo dominanten genotip, ki ga v prejšnjih letih pri nas nismo zaznali, njegovih fenotipskih značilnosti še ne poznamo in ga tudi ni bilo v podatkovni zbirki genotipov. Razširjen je bil na Štajerskem, v Posavju, na Dolenjskem, v osrednji Sloveniji in na Gorenjskem od meseca maja do oktobra (slika 21). Plesen s tem genotipom smo našli tudi na sadikah paradižnika v začetku rastne dobe in jeseni na samosevni krompirjih. Njegova široka razširjenost in zgoden pojav kažeta na prenos s sadilnim materialom. V letu 2015 je ta klon skoraj izpodrinil potomstvo klona EU\_23\_A1, ki se je v Sloveniji prvič pojavilo leta 2004 na krompirju in paradižniku na Primorskem (Dolenja Trebuša, Bodrež, Ročinj), nato pa se je širilo skoraj izključno le na paradižniku in se pojavljalo vsa leta spremljanja (slika 23). Osebki s tem genotipom so paritvenega tipa A1 in praviloma občutljivi za metalaksil. Med 9 izolati s paradižnika, ki so imeli ta genotip in za katere imamo tudi podatek o odpornosti, je bilo 8 občutljivih in eden srednje odporen. Na paradižniku ni bilo drugih znanih potomstev klonov razen tega. Vsi ostali vzorci so imeli edinstvene genotipe.



Slika 23: Pogostost genotipov v populaciji *P. infestans* s paradižnika v letih med 2002 in 2015  
Figure 23: Frequency of *P. infestans* genotypes collected from tomato plants in the years 2002–2015

Potomstva klonov, ki so bila pogosta pri vzorcih plesni s krompirja, se nikoli niso pojavila na paradižniku, zato predpostavljamo, da imajo nekateri genotipi *P. infestans* preferenco za določenega gostitelja ali pa na zastopanost določenih genotipov vpliva način pridelave.

V Veliki Britaniji so Stroud in sod. (2015) primerjali populacijo *P. infestans* s krompirja s tisto na paradižniku in niso potrdili specializacije za gostitelja. Ugotovili so, da je

pogostost edinstvenih genotipov pri paradižniku večja kot pri krompirju v tržni pridelavi in zastopanost razširjenih potomstev klonov manjša. Toda primerjava *P. infestans* s paradižnika in *P. infestans* s krompirja, ki je rasel na vrtovih, je pokazala, da sta populaciji na obeh gostiteljih podobni in da je vir variabilnosti način pridelave in ne gostitelj.

Krompirjeva plesen na paradižniku zaradi večje agresivnosti povzročitelja postaja vse večja težava. V ZDA in Kanadi se soočajo z novimi sevi, ki povzročajo večjo gospodarsko škodo. Izpostavljajo pomen širjenja bolezni s sadikami (Fry in sod., 2015; Wijekoon in sod., 2014).

Razlogi, zakaj se potomstva klonov, ki so v nekaterih območjih zelo dominantna, v drugih ne širijo, so lahko klima, specifična raba fungicidov in genetska raznolikost populacije *P. infestans*, saj se posamezen genotip v pestri populaciji težje ohrani. Kjer uporaba metalaksila ni tako intenzivna, imajo sevi *P. infestans* z odpornostjo proti fungicidu manjšo možnost uveljavitve, kot tam, kjer zaradi pogoste uporabe pride do hitre selekcije (Chmielarz in sod., 2014). Widmark in sod. (2007) so mnenja, da v nordijskih deželah nizke temperature in dolgotrajno zmrznjena tla preprečujejo kalitev in biološko razgradnjo oospor med rastnimi dobami in je nato na voljo dovolj aktivnih oospor za primarne okužbe v začetku rasti krompirja, zaradi česar je genetska raznolikost *P. infestans* velika.

Metoda hitrega genotipiziranja ima praktično uporabnost. Ko poznamo razširjenost določenih genotipov in njihove fenotipske lastnosti, kot je npr. odpornost na fungicid ali agresivnost, lahko temu primerno izberemo fungicid in intenzivnost rabe pa tudi zasnujemo strategijo za preprečevanje pojava odpornosti. S to metodo so pri vzorčenju v okviru mreže Euroblight na Nizozemskem pravočasno odkrili večjo zastopanost sevov krompirjeve plesni z genotipom EU\_33\_A1, ki imajo zmanjšano občutljivost za fluazinam in so s spremenjenim načinom rabe fungicidov zmanjšali zastopanost tega genotipa v populaciji ter tako preprečili gospodarsko škodo (Potato ... in Europe - 2014, 2015).

Sčasoma bodo podatki o razširjenosti potomstev klonov lahko na voljo že v tekoči rastni dobi in bo mogoče sprotno prilagajanje ukrepov varstva, kot je to bil primer ob nenadnem izbruhu plesni na paradižniku v ZDA v letu 2009 (Fry in sod., 2015).

Spremembe v populaciji v Evropi se odražajo tudi v Sloveniji, kar dobro ponazarja primer prevlade potomstva agresivnega klona EU\_13\_A2 v populaciji v letu 2007. Zbiranje in izmenjava podatkov o populaciji na ravni Evrope in seznanjanje s stanjem v populaciji je zato ključnega pomena za izboljšanje ukrepov varstva.

Podatke o genotipih krompirjeve plesni v Sloveniji smo prispevali v podatkovno zbirko Euroblight.

## 5 SKLEPI

Krompirjeva plesen paritvenega tipa A2 je v Sloveniji razširjena. Zastopanost izolatov s paritvenim tipom A2 v populaciji se je med leti spreminjala in je bila v obdobju med 2002 in 2007 pri plesni s krompirja od 14 do 75 %. Oba paritvena tipa smo našli razpršeno po vsej Sloveniji, tako pri sevih plesni s krompirja kot s paradižnika.

Proti fenilamidom (metalaksilu) odporni izolati krompirjeve plesni so se pojavljali v vseh letih s krompirjevo plesnijo v obdobju med 2002 in 2007. Njihov delež se je med leti spreminjal in bil najvišji v letu 2007, ko je bilo odpornih 75 % izolatov. Krompirjeva plesen je bila bolj odporna na Gorenjskem, kjer je intenzivnost pridelave in uporabe fungicidov večja. Pri izolatih *P. infestans* s krompirja, ki smo jih vzeli na njivah, je bila odpornost bolj pogosta kot pri izolatih, ki so izvirali z vrtov. Glede na rezultate genotipiziranja sklepamo, da so bili odporni sevi *P. infestans* in takšni s paritvenim tipom A2 navzoči v populaciji tudi v obdobju med 2012 in 2015.

Velika raznolikost genotipov, trajna zastopanost obeh paritvenih tipov in navzočnost oospor v listih krompirja in paradižnika so dokaz, da se *P. infestans* v Sloveniji razmnožuje tudi spolno in je ta način širjenja boleznii pogost.

Populacija *P. infestans* v Sloveniji je genetsko zelo raznolika in v tem bolj podobna populacijam v vzhodni Evropi in nordijskih deželah, kjer je spolno razmnoževanje pomemben dejavnik razvoja in poteka boleznii. V večjem delu zahodne Evrope se krompirjeva plesen razmnožuje pretežno vegetativno in vsako leto prevladuje le nekaj potomstev klonov. Spremembe populacije v Evropi se odražajo tudi v Sloveniji, kar dobro ponazarja primer prevlade potomstva agresivnega klona EU\_13\_A2 v populaciji v letu 2007 in kaže na vpliv, ki ga ima pri širjenju boleznii semenski krompir. Kljub temu, da v populaciji zaznamo potomstva klonov, ki so razširjena v nekaterih evropskih državah, pa v večini let ne prevladajo v populaciji, saj ta ostaja heterogena in se njena raznolikost obnavlja s spolnim razmnoževanjem.

Metoda hitrega genotipiziranja s SSR markerji za spremljanje sprememb v populaciji daje informacije, ki so neposredno uporabne v praksi. Ko poznamo za določene genotipe *P. infestans* tudi njihove fenotipske lastnosti, kot je npr. odpornost proti fungicidu ali agresivnost, lahko njihovi razširjenosti primerno izberemo fungicid in intenzivnost škropljenj. Na osnovi podatkov o zastopanosti edinstvenih genotipov ocenimo obseg spolnega razmnoževanja z oosporami in to upoštevamo pri načrtovanju kolobarja. Zbiranje in izmenjava podatkov o populaciji na ravni Evrope lahko prispeva k izboljšanju strategij varstva pred boleznijo, zato smo podatke o genotipih krompirjeve plesni v Sloveniji prispevali v podatkovno zbirko Euroblight.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Krompirjeva plesen, ki jo povzroča plesnivka *Phytophthora infestans* (Stramenopiles, Oomycetes), je nevarna bolezen krompirja in paradižnika. Izgube pridelka in stroški povezani z njenim zatiranjem močno vplivajo na gospodarnost pridelovanja. Patogen *P. infestans* je heterotaličen organizem, pri katerem sta za spolno razmnoževanje potrebna dva paritvena tipa, A1 in A2, ki ob križanju tvorita oospore. Do začetka 80-tih let prejšnjega stoletja je bil povsod po svetu, razen v Mehiki, razširjen samo paritveni tip A1 in krompirjeva plesen se je razmnoževala le vegetativno. O pojavu paritvenega tipa A2 v Evropi so prvič poročali leta 1984 in sklepali, da je verjetno povezan z vnosom novih sevov *P. infestans* iz Mehike. Soobstoj obeh paritvenih tipov je omogočil spolno razmnoževanje krompirjeve plesni in nastajanje oospor, ki lahko preživijo obdobja neugodna za vegetativno rast. Ob koncu 70-tih let 20. stoletja so začeli za zatiranje krompirjeve plesni v Evropi intenzivno uporabljati sistemične fungicide iz skupine fenilamidov, najpogosteje aktivno snov metalaksil. Patogen je razvil odpornost proti tem fungicidom, kar je vodilo k manj učinkovitemu varstvu pred boleznijo. Odpornost proti fungicidom, spremenjena strategija preživetja in pojav spolnih rekombinacij so spremenili epidemiologijo patogena v Evropi.

Določanje razmerja med paritvenimi tipi omogoča napoved možnosti spolnega razmnoževanja in tveganja za tvorbo oospor. V številnih evropskih državah so raziskovali fenotipsko in genotipsko strukturo populacij krompirjeve plesni. Raziskave so pokazale velike razlike v zastopanosti obeh paritvenih tipov in odpornosti proti metalaksilu v času in prostoru. V letih 2004 do 2007 se je v Veliki Britaniji in v delu zahodne Evrope razširilo agresivno potomstvo klona z oznako EU\_13\_A2, odporno proti metalaksilu in v nekaterih letih skoraj popolnoma izrinilo drugačne genotipe krompirjeve plesni. Na širjenje patogena in na spremembe, ki nastajajo v populacijah, vpliva tudi izmenjava semenskega krompirja med državami. Pojavila se je potreba po bolj sistematičnem spremljanju populacije krompirjeve plesni v Evropi, da bi lažje razumeli spremembe, ki nastajajo, in tem prilagajali ukrepe za varstvo pred boleznijo. Razvoj učinkovite metode genotipiziranja z markerji za enostavne ponovljive sekvence (SSR) v multipleks zasnovi in bolj hiter in preprost način vzorčenja DNK z uporabo FTA kartic sta omogočila takšno spremljanje. Evropski znanstveniki in strokovnjaki, ki deluje v okviru mreže Euroblight so začeli v letu 2012 spremljati populacijo in podatke o genotipu zbirati v javno dostopni podatkovni zbirki.

V Sloveniji so razmere za razvoj krompirjeve plesni v večini let ugodne. V zadnjih desetletjih se je bolezen na krompirju in paradižniku na prostem pojavljala v rastni dobi prej. V nekaterih letih je ni bilo mogoče učinkovito zatreti s fungicidi iz skupine

fenilamidov. Namen tega dela je bil raziskati, kakšne so fenotipske in genotipske značilnosti populacije krompirjeve plesni v Sloveniji, da bi razumeli vzroke za spremembe v razvoju in širjenju bolezni.

V letih med 2002 in 2007 smo zbrali vzorce krompirjeve plesni s krompirja (156) in paradižnika (73) in izolirali povzročitelja v čisti kulturi. Največ smo jih zbrali v osrednji Sloveniji in na Gorenjskem, kjer je pridelovanje krompirja intenzivno. V letih 2003 in 2006 smo pridobili le nekaj vzorcev, saj se zaradi suhega in vročega vremena bolezen ni razširila. Paritveni tip *P. infestans* smo določali na gojišču s parjenjem izolatov z referenčnimi sevi znanega paritvenega tipa. Odpornost proti fungicidu metalaksil smo ugotavljali *in vitro* z merjenjem radialnega prirasta kolonij na rženem A gojišču z dodanim metalaksilom. Izolate smo opredelili kot odporne, srednje odporne in občutljive. V listih krompirja in paradižnika ter v vzorcih tal smo iskali oospore. Posamezne liste smo pregledovali z mikroskopom, iz večje količine listov pa smo oospore ekstrahirali s pomočjo encimov in sejanja na sitih. V vzorcih tal smo za detekcijo oospor kot vabo uporabili liste krompirja občutljive sorte.

V letih 2002, 2004, 2005 in 2007 je bil delež odporne *P. infestans* v populaciji na krompirju 14 , 46 , 25 in 75 %. V vseh letih, razen 2007, so bili najdeni tudi izolati s srednjo odpornostjo proti metalaksilu. Na območju Gorenjske je bila populacija *P. infestans* na krompirju v tem obdobju bolj odporna (66 %), kot je bilo povprečje za Slovenijo (41 %). Pri vzorcih z njiv je bila odpornost večja kot na vrtovih. Pri izolatih s krompirja je bil paritveni tip A2 zastopan letno s 14 do 31 %, izstopalo je leto 2007 s 75 odstotki. V celotnem obdobju so bili samo trije izolati *P. infestans* s paradižnika odporni proti metalaksilu. Paritveni tip A2 se je pojavil v posameznem letu pri 5 do 50 % pregledanih izolatov s paradižnika. V listih paradižnika in krompirja smo našli oospore, medtem ko nam v vzorcih tal z metodo, kjer smo kot vabo uporabili listi krompirja, ni uspelo dokazati njihove navzočnosti v tleh.

Iz kultur 94 izolatov iz te zbirke in iz 106 vzorcev listov s *P. infestans*, ki smo jih odvzeli s FTA karticami v letih 2012, 2014 in 2015, je bila izolirana DNK in opravljena analiza genotipa z 12 SSR markerji. Genotipe smo primerjali z multilokusnimi profili referenčnih evropskih genotipov *P. infestans* in jih glede na rezultate razvrstili v skupino znanih, v Evropi razširjenih potomstev klonov in v skupino drugih, edinstvenih genotipov, ki še niso bili opisani. Edinstven genotip, ki se je v raziskavi pojavil le enkrat in ni pripadal nobenemu znanemu potomstvu klona, je imelo 45 % (89 izolatov) analiziranih vzorcev. Na podvzorcju 27 izolatov *P. infestans* s krompirja iz let 2002 do 2007 s takšnimi genotipi je bilo odpornih proti metalaksilu 22 %, paritvenemu tipu A2 jih je pripadalo 44 %. Trije neopisani genotipi so se v letih 2014 in 2015 lokalno razširili in tem lokalnim klonom je pripadalo 41 vzorcev (20 %). Genotipi potomstev klonov, znanih iz drugih območij v Evropi, kot so EU\_2\_A1, EU\_13\_A2, EU\_34\_A1, EU\_23\_A1 in EU\_6\_A1 so

predstavljali 35 % populacije v celotnem preiskovanem obdobju. V letu 2004, ki je sledilo zelo suhemu letu brez krompirjeve plesni, so tri potomstva klonov sestavljala 60 % populacije. Mnogi izolati z Gorenjske so imeli genotip z oznako EU\_2\_A1, v Pomurju pa je bil bolj razširjen genotip EU\_34\_A1, ki je sicer razširjen le v vzhodni Evropi. Ta se je tudi obdržal v populaciji do leta 2014, medtem ko se je EU\_2\_A1 pojavljal le v letu 2002 in 2004. V letu 2007 smo prvič zaznali potomstvo klona EU\_13\_A2, ki je prevladalo v populaciji. Njegova navzočnost pojasnjuje velik porast izolatov z odpornostjo in paritvenim tipom A2 v tem letu. Krompirjevo plesen s tem genotipom smo zaznali v populaciji tudi še leta 2014 in 2015 vendar ne pogosto. Potomstvo klona EU\_23\_A1 se je prvič pojavilo na Primorskem na paradižniku in krompirju in se je nato pojavljalo v različnih delih države v vseh letih opazovanja, vendar skoraj izključno le na paradižniku. To je bilo do leta 2015 edino potomstvo klona na paradižniku saj so vsi ostali vzorci imeli edinstvene genotipe. V letu 2015 se je na paradižniku razširil nov klon s še neznanimi fenotipskimi značilnostmi. Pojavil se je že zgodaj v rastni dobi in je bil navzoč v različnih delih države, zato smo sklepali, da je širjenje potekalo s sadikami paradižnika. Potomstva klonov, razširjena na krompirju, se na paradižniku niso pojavila nobeno leto.

Populacija *P. infestans* v Sloveniji je genetsko zelo raznolika in v tem bolj podobna populacijam v vzhodni in severni Evropi kakor pa tistim na zahodu Evrope, kjer prevladuje manjše število potomstev klonov. Veliko število edinstvenih genotipov v obeh obdobjih vzorčenja kaže, da se *P. infestans* v Sloveniji v veliki meri razmnožuje spolno. Zaradi navzočnosti oospor bo to potrebno upoštevati tudi pri kolobarjenju. Metoda hitrega genotipiziranja ima praktično uporabnost. Ko poznamo razširjenost določenih genotipov in njihove fenotipske lastnosti, kot je npr. odpornost na fungicide ali agresivnost, lahko temu primerno izberemo fungicide in intenzivnost njihove rabe. Podatke o genotipih krompirjeve plesni v Sloveniji smo prispevali v podatkovno zbirko Euroblight.

## 6.2 SUMMARY

Late blight, caused by *Phytophthora infestans* (Stramenopiles, Oomycetes), is a devastating disease of potatoes and tomatoes. The costs of late blight control and yield losses have a significant impact on the potato industry. Sexually reproduced oospores develop from crosses of heterothallic *P. infestans* strains of mating types A1 and A2. Both mating types were known to occur in Mexico while only the mating type A1 in all other countries where the pathogen reproduced asexually until the early 1980s. Due to new introductions, most likely from Mexico, the mating type A2 strains were reported in Europe for the first time in 1984. The coexistence of both mating types enabled the pathogen to reproduce sexually and oospores can survive conditions unsuitable for vegetative growth. At around the same time, the pathogen developed resistance to metalaxyl (phenylamide class of systemic fungicides) introduced in the late 1970s and



widely used in Europe against late blight. It led to a less effective disease control. Fungicide resistance, changed survival strategies and occurrence of sexual recombination changed the epidemiology of the pathogen in Europe.

Determinations of mating type ratios allow the prediction of sexual recombination events and the risk of oospore formation. Numerous studies of the phenotypic and genotypic structure of *P. infestans* populations in Europe were performed. High spatial and temporal variations in the frequency of isolates resistant to metalaxyl and ratio between A1 and A2 mating types were reported. In the years between 2004 and 2007 an aggressive clonal lineage of *P. infestans* with resistance to metalaxyl, named 13\_A2, spread into some parts of Western Europe and over the UK replacing other genotypes almost entirely within some years. The dispersal of the pathogen and changes in the structure of populations may have been caused by the exchange of infected seed potatoes among different countries. In order to understand the population changes in Europe and adapt control strategies, a more systematic monitoring programme was required. This was mainly achieved through the development of efficient multiplex single sequence repeat (SSR) genotyping methods and the implementation of a fast and simple sampling technology for the analysis of late blight DNA with FTA cards. The Euroblight initiative started in 2012 to monitor the *P. infestans* population in Europe and to make genotype related data available in a public database.

In Slovenia, conditions have constantly been suitable for late blight development. In the last decades, potatoes and field grown tomatoes became infected earlier in the season. In some years it was not possible to control the disease effectively with phenylamide fungicides. The objective of this study was therefore to carry out a phenotypic and genotypic characterisation of the *P. infestans* population in Slovenia in order to recognise possible reasons for the observed changes.

Samples of late blight from potatoes (156) and tomatoes (73) were collected in Slovenia between 2002 and 2007 and the isolates of *P. infestans* were obtained. The majority of them originated from potato growing areas in central Slovenia and in the Gorenjska region. Only few samples were collected between 2003 and 2006 because the disease didn't spread due to hot and dry weather. Pairing the isolates with reference strains of either A1 or A2 allowed determinations of their mating types. Response to metalaxyl was estimated on the culture media. Radial growth of *P. infestans* isolates on rye A agar amended with metalaxyl was measured and isolates were classified as sensitive, intermediately resistant or resistant. The samples of potato and tomato leaves and soil samples were examined for the presence of oospores. Direct observation of leaves under the microscope and extraction from leaf tissues with enzymes followed by sieving was used for the detection of oospores in leaves. A baiting method with leaves of a susceptible potato variety was used to detect *P. infestans* in soil samples.

In the years 2002, 2004, 2005 and 2007, the frequency of resistant *P. infestans* isolates from potatoes was 14%, 46%, 25% and 75%, respectively. In every year but 2007 isolates with an intermediate resistance were also found. The frequency of resistance was higher in Gorenjska region (66%), where potato production is more intense. Less resistant isolates were observed on average for Slovenia (41%). The samples taken from potato fields were more often resistant than samples from private gardens. The proportion of strains of the A2 mating type was 14 to 31% in 2002, 2004 and 2005 but 75% in 2007. Most tomato strains were sensitive to metalaxyl; only 3 resistant isolates were found in the whole period. The percentage of isolates of mating type A2 ranged from 5 to 50% among the years. Oospores were detected in collected tomato and potato leaves but not in soil samples which were tested with baiting method.

DNA from cultures of 94 isolates that were collected in the years 2002–2007 and from FTA cards with 120 *P. infestans* samples collected in 2012, 2014 and 2015 was isolated and genotyped in a screening system with 12 SSR markers at James Hutton Institute, Scotland. Genotypes obtained this way were compared with reference samples from the database of European multi locus genotypes. Accordingly the strains from Slovenia were assigned either to already known clonal lineages common in Europe, or to unique genotypes that haven't been described yet. The proportion of unique genotypes, appearing only once and not belonging to any known clonal lineage, was 45% (89 strains). A subsample of 27 isolates with such genotypes, collected from potatoes between 2004 and 2007, consisted of 22% of resistant isolates and 44% of mating type A2. Additionally, three previously undescribed genotypes spread locally in the years 2014 and 2015: 41 samples (20%) belonged to such local clones. Genotypes known from other parts of Europe, namely clonal lineages EU\_2\_A1, EU\_13\_A2, EU\_34\_A1, EU\_23\_A1, and EU\_6\_A1 comprised 35% of the population. In the year 2004 – which followed a very dry year without late blight – 60% of the population consisted of only three clonal lineages. Many isolates from Gorenjska region belonged to the clonal lineage EU\_2\_A1, while the lineage EU\_34\_A1 prevailed in the Pomurje region. The latter genotype is commonly known only in Eastern Europe and was detected also in other years including 2014, while EU\_2\_A1 was only detected in 2002 and 2004. The clonal lineage EU\_13\_A2 was first observed in 2007. Its dominance may explain the high percentage of isolates resistant to metalaxyl and occurrence of strains of the A2 mating type in that year. It reappeared also in 2014 and 2015 but with low frequency. The clonal lineage EU\_23\_A1 was detected in the Primorska region on potatoes and tomatoes and has been found since then on tomatoes also in other regions of Slovenia every year. It was the only clonal lineage found on tomatoes, besides the isolates with unique genotypes, until 2015 when a new genotype with yet unknown phenotypic characteristics appeared and dominated the population. Because it was detected early in the season and present all over Slovenia, it is possible that it was newly introduced in 2015 with planting material. The clonal lineages of *P. infestans*

commonly occurring on potatoes were not detected on tomatoes in any of the observed years.

The genetically variable population of *P. infestans* in Slovenia resembles those in the countries in Eastern and Northern Europe, while the countries of Western Europe are mostly dominated by smaller numbers of clonal lineages. The high number of unique genotypes detected in both sampling periods indicates a high level of sexual recombination in Slovenia. Crop rotation practices will have to be adapted to the presence of oospores. The method of fast genotyping has practical implication in the management of the disease. The information about distribution of certain clonal lineages with known phenotypic traits, such as those that are aggressive or resistant, help to select proper fungicides and intensity of their use. The data about multi locus genotypes of *P. infestans* in Slovenia were entered into the Euroblight database.

## 7 VIRI

- Adler N.E., Chacón G., Flier W.G., Forbes G.A. 2002. The Andean fruit crop, pear melon (*Solanum muricatum*) is a common host for A1 and A2 strains of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Plant Pathology*, 51: 802
- Agrios G. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition. Academic Press: 922 str.
- Andersson B, Sandström M, Strömberg A. 1998. Indications of soil borne inoculum of *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 41: 305–310
- Andrivon D. 1995. Biology, ecology, and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology*, 85: 1053–1056
- Brent K.J., Hollomon D.W. 2007. Fungicide resistance, the assessment of risk. How can it be managed? Brussels, Fungicide Resistance Action Comitee (FRAC): 56 str. <http://www.frac.info/publications/downloads> (november 2015)
- Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A., Elander R.P. 1998. Applications of PCR in mycology. Wallingford, CAB international: 357 str.
- Brurberg M.B., Elameen A, Le V.H., Naerstad R., Hermansen A. 2011. Genetic analysis of *Phytophthora infestans* populations in the Nordic European countries reveals high genetic variability. *Fungal Biology*, 115: 335–342
- Carlile M.J. 1983. Motility, taxis and tropism in *Phytophthora*. V: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Bartnicki-Garcia S., Tsao P.H. (ed.). St. Paul, The American Phytopathological Society Press: 95–107
- Chmielarz M., Sobkowiak S., Dębski K., Cooke D.E.L., Brurberg M.B., Śliwka J. 2014. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland. *Plant Pathology*, 63, 1: 203–211
- Chowdappa P., Nirmal Kumar B.J., Madhura S., Mohan Kumar S.P., Myers K.L., Fry W.E., Cooke D.E.L. 2015. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in South India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Plant Pathology*, 64: 191–199
- Cohen Y., Reuveni M., Eyal H. 1979. The systemic antifungal activity of Ridomil against *Phytophthora infestans* on tomato plants. *Phytopathology*, 69: 645–649
- Cohen Y., Farkash S., Reshit Z., Baider A. 1997. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. *Phytopathology*, 87: 191–196
- Cooke D.E.L., Young V., Birch P.R.J., Toth R., Gourlay F., Day J.P., Carnegie S.F., Duncan J.M. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995–97). *Plant Pathology*, 52: 181–192
- Cooke D.E.L., Lees A.K. 2004. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology*, 53: 692–704
- Cooke D.E., Cano L.M., Raffaele S., Bain R.A., Cooke L.R., Etherington G.J., Deahl K.L., Farrer R.A., Gilroy E.M., Goss E.M., Grünwald N.J., Hein I., MacLean D., McNicol J.W., Randall E., Oliva R.F., Pel M.A., Shaw D.S., Squires J.N., Taylor M.C., Vleeshouwers V.G., Birch P.R., Lees A.K., Kamoun S. 2012a. Genome analyses of an

- aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathogens*, 8, 10: e1002940, doi: 10.1371/journal.ppat.1002940: 14 str.
- Cooke D.E.L., Lees A.K., Lassen P., Grønbech-Hansen J. 2012b. Making sense of *Phytophthora infestans* diversity at national and international scales. V: Thirteenth Euroblight workshop, PPO special report no. 15, St. Petersburg, Russia, 9–12 October 2011. PPO-Special report, 15: 37–44
- Cooke L.R., Swan R.E., Currie T.S. 1995. Incidence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* on potato crops in Northern Ireland. *Potato Research*, 38: 23–29
- Cooke L.R., Carlisle D.J., Wilson D.G., Deahl K.L. 2002. Natural occurrence of *Phytophthora infestans* on woody nightshade (*Solanum dulcamara*) in Ireland. *Plant Pathology*, 51: 392
- Cooke L.R., Schepers H.T.A.M., Hermansen A., Bain R., Bradshaw N., Ritchie F., Shaw D.S., Evenhuis A., Kessel G.J.T., Wander J.G.N., Andersson B., Hansen J.G., Hannukkala A., Naerstad R., Nielsen B. 2011. Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe. *Potato Research*, 54, 2: 183–222
- Daggett S.S., Götz E., Therrien C.D. 1993. Phenotypic changes in populations of *Phytophthora infestans* from eastern Germany. *Phytopathology*, 83: 319–323
- Davidse L.C. 1985. Resistance to acylalanines in *Phytophthora infestans* in The Netherlands. *Bulletin OEPP/EPPO*, 15: 403–409
- Day J.P., Shattock R.C. 1997. Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 379–391
- Day J.P., Wattier R.A.M., Shaw D.S., Shattock R.C. 2004. Phenotypic and genotypic diversity in *Phytophthora infestans* on potato in Great Britain, 1995–98. *Plant Pathology*, 53: 303–315
- Deahl K.L., Fravel D.R. 2003. Occurrence of leaf blight on petunia caused by *Phytophthora infestans* in Maryland. *Plant Pathology*, 87, 8: 1004
- Dowley L.J., Griffin D., O'Sullivan E. 2002. Two decades of monitoring Irish populations of *Phytophthora infestans* for phenylamide resistance. *Potato Research*, 45: 79–84
- Drenth A., Tas I.C.Q., Govers F. 1994. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 97–107
- Drenth A., Janssen E.M., Govers F. 1995. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathology*, 44: 86–94
- Duvauchelle S., Dubois L., Détourné D. 2009. Evolution of the population of *Phytophthora infestans* in France measured by epidemiologic and phenotypic markers. *Acta Horticulturae*, 834: 149–154
- El-Ganainy S.M., Ahmed Y.M., Soliman M.S., Cooke D.E.L., Tohamy A.M.M. 2014. The implications of eggplant as a host in late blight epidemiology in Egypt. V: Abstracts of APS.CPS Joint Meeting, August 9-13, 2014, Minneapolis, USA. *Phytopathology*, 104 (Suppl.3), 11: S3.37

- Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul, The American Phytopathological Society Press: 562 str.
- Euroblight. Potato late blight network for Europe.  
<http://euroblight.net/> (december 2015)
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organisation of the United nations. Statistic division.  
<http://faostat3.fao.org/home/E> (november 2015)
- FAO. 2008. Potato. International year of the potato. Food and Agriculture Organisation of the United nations.  
<http://www.potato2008.org> (november 2015)
- Fisher M.C., Henk D.A., Briggs C.J., Brownstein J.S., Madoff L.C., McCraw S.L., Gurr S.J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484: 186–194
- Flier W.G., Turkensteen L.J., Mulder A. 1998. Variation in tuber pathogenicity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Potato Research*, 41: 345–354
- Flier W.G., Turkensteen L.J. 1999. Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 99: 57–67
- Flier W.G., Van Den Bosch G.B.M., Turkensteen L.J. 2003. Epidemiological importance of *Solanum sisymbriifolium*, *S. nigrum* and *S. dulcamara* as alternative hosts for *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 52: 595–603
- FRAC. 2015. FRAC Code List.  
<http://www.frac.info/publications/downloads> (november 2015)
- Fry W.E., Drenth A., Spielman L., Mantel B.C., Davidse L.C., Goodwin S.B. 1991. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Phytopathology*, 81: 1330–1336
- Fry W.E., Goodwin S.B. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience*, 47: 363–371
- Fry W.E., Grünwald N.J., Cooke D.E.L., McLeod A., Forbes G.A., Cao K. 2009. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. V: Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions and research tools. Lamour K., Kamoun S. (ed.), New Jersey, Wiley-Blackwell: 139–164
- Fry W.E., Thurston H.D., Stevenson W.R. 2001. Late blight. V: Compendium of potato diseases, second edition. Stevenson W.R., Loria R, Franc G.D., Weingartner D.P. (ed.). St. Paul, American Phytopathological Society Press: 144 str.
- Fry W.E., Birch P.R., Judelson H.S., Grünwald N.J., Danies G., Everts K.L., Gevens A.J., Gugino B.K. 2015. Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. *Phytopathology*, 105, 7: 966–981
- Fyfe A.M., Shaw D.S. 1992. An analysis of self fertility in field isolates of *Phytophthora infestans*. *Mycological Research*, 96, 15: 390–394
- Galindo A.J., Hohl, H.R. 1985. *Phytophthora mirabilis*, a new species of *Phytophthora*. *Sydowia*, 38: 87–96

- Galindo A.J., Gallegly M.E. 1960. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 54: 123–128
- Gallegly M.E., Galindo A.J. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology*, 48: 274–277
- Gisi U., Cohen Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 549–572
- Gisi U., Walder F., Resheat-Eini Z., Edel D., Sierotzki H. 2011. Changes of genotype, sensitivity and aggressiveness in *Phytophthora infestans* isolates collected in European countries in 1997, 2006 and 2007. *Journal of Phytopathology*, 159: 223–232
- Godina-Golija M. 1998. Pomen uvajanja krompirja za spreminjanje prehrane na Slovenskem. *Zbornik Inštituta za slovensko narodopisje Traditiones*, 27: 25–38
- Golas T.M., van der Weerden G.M., van den Berg R.G., Mariani C., Allefs J.J.H.M. 2010. Role of *Solanum dulcamara* L. in potato late blight epidemiology. *Potato Research*, 53: 69–81
- Goodwin S.B., Cohen B.A., Legard D.E., Smart C.D., Levy M., 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: 11591–11595
- Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Fry W.E. 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and western Canada. *Phytopathology*, 86: 793–800
- Goodwin S.B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 87: 462–473
- Goodwin S.B., Drenth A. 1997. Origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology*, 87: 992–999
- Goodwin S.B., Legard D.E., Smart C.D., Levy M., Fry W.E. 1999. Gene flow analysis of molecular markers confirms that *Phytophthora mirabilis* and *P. infestans* are separate species. *Mycologia*, 91: 796–810
- Goss E.M., Tabima J.F., Cooke D.E., Restrepo S., Fry W.E., Forbes G.A., Fieland V.J., Cardenas M., Grünwald N.J. 2014. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 24: 8791–8796
- Govers F., Gijzen M. 2006. *Phytophthora* Genomics: The plant destroyers' genome decoded. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 12: 1295–1301
- Götz E. 1991. Untersuchungen zum Auftreten des A2-Paarungstyps bei *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ostdeutschland. *Potato Research*, 34: 233–237
- Grünwald N.J., Sturbaum A.K., Montes G.R., Serrano E.G., Lozoya-Saldaña H., Fry W.E. 2006. Selection for fungicide resistance within a growing season in field populations of *Phytophthora infestans* at the center of origin. *Phytopathology*, 96, 12: 1397–1403
- Haas B.J., Kamoun S., Zody M.C., Jiang R.H., Handsaker R.E., Cano L.M., Grabherr M., Kodira C.D., Raffaele S., Torto-Alalibo T., Bozkurt T.O., Ah-Fong A.M., Alvarado L.,

- Anderson V.L., Armstrong M.R., Avrova A., Baxter L., Beynon J., Boevink P.C., Bollmann S.R. et al. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461: 393–398
- Hannukkala A.O., Kaukoranta T., Lehtinen A., Rahkone A. 2007. Late blight epidemics on potato in Finland, 1933–2002; increased and earlier occurrence of epidemics associated with climate change and lack of rotation. *Plant Pathology*, 56: 167–176
- Hanson K., Shattock R.C. 1998. Formation of oospores of *Phytophthora infestans* in cultivars of potato with different levels of race-nonspecific resistance. *Plant Pathology*, 47: 123–129
- Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz B., Kessel G. 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research*, 51: 47–57
- Hermansen A., Hannukkala A., Naerstad R.H., Brurberg M.B. 2000. Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance, and virulence phenotype. *Plant Pathology*, 49: 11–22
- Hoffmann G.M., Schmutterer H. 1983. Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Stuttgart, Ulmer: 488 str.
- Hohl R.H., Iselin K. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. *Transactions of the British Mycological Society*, 83, 3: 529–530
- Ivanović M., Niepold F., Ivanović M. 2003 Survey of *Phytophthora infestans* populations in Serbia: mating type, metalaxyl resistance and virulence properties. *Potato Research*, 46: 39–45
- Janežič F. 1951. Varstvo rastlin pred boleznimi in škodljivci. Ljubljana, Državna Založba Slovenije: 567 str.
- Jones J.P., Stall R.E., Zitter T.A. (eds.). 1991. Compendium of tomato diseases, first edition. St. Paul, American Phytopathological Society Press: 100 str.
- Kadish D., Cohen Y. 1992. Overseasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers. *Phytopathology*, 82, 8: 887–889
- Knapova G., Gisi E. 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology*, 51: 641–653
- Ko W.H. 1994. An alternative possible origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology*, 84, 10: 1224–1227
- Kocjan Ačko D., Goljat A. 2005. Krompir. Ljubljana, Kmečki glas: 175 str.
- Lassiter E.S., Russ C., Nusbaum C., Zeng Q., Saville A.C., Olarte R.A., Carbone I., Hu C.H., Seguin-Orlando A., Samaniego J.A., Thorne J.L., Ristaino J.B. 2015. Mitochondrial genome sequences reveal evolutionary relationships of the *Phytophthora* 1c clade species. *Current Genetics*, 61,4: 567–577
- Lees A.K., Wattier R., Shaw D.S., Sullivan L., Williams N., Cooke D.E.L. 2006. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology*, 55: 311–319



- Lees A.K., Stewart J.A., Lynott J.S., Carnegie S.F., Campbell H., Roberts A.M.I. 2012. The effect of a dominant *Phytophthora infestans* genotype (13\_A2) in Great Britain on host resistance to foliar late blight in commercial potato cultivars. *Potato Research*, 55: 125–134
- Lehtinen A., Hannukkala A. 2004. Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland. *Agricultural and Food science*, 13: 399–410
- Lehtinen A., Hannukkala A., Andersson B., Hermansen A., Le V.H., Nærstad R., Brurberg M.B., Nielsen B.J., Hansen J.G., Yuen J. 2008. Phenotypic variation in Nordic populations of *Phytophthora infestans* in 2003. *Plant Pathology*, 57: 227–234
- Li Y., Cooke D.E.L., Jacobsen E., van der Lee T. 2013. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Microbiological Methods*, 92: 316–322
- Li Y., van der Lee T.A., Evenhuis A., van den Bosch G.B., van Bekkum P.J., Förch M.G., van Gent-Pelzer M.P., van Raaij H.M., Jacobsen E., Huang S.W., Govers F., Vleeshouwers V.G., Kessel G.J. 2012. Population dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands reveals expansion and spread of dominant clonal lineages and virulence in sexual offspring. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2, 12: 1529–1540
- Maček J. 1979. Izbruh in širjenje krompirjeve plesni (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) na Kranjskem v 19. stoletju. *Zbornik za zgodovino naravoslovja in tehnike*, 4: 237–244
- McLeod A., Coertze S. 2006. First report of *Phytophthora infestans* on *Petunia* × hybrida in South Africa. *Plant Disease*, 90, 12: 1550
- Meier-Runge F., Van der Bosch T., Förch M., Evenguis B., Kessel G. 2014. First results of an EU-wide monitoring of *Phytophthora infestans* using FTA cards. V: Fourteenth Euroblight workshop, PPO special report no. 16, Limassol, Cyprus, 12-15 May 2013, PPO-Special report: 75–81
- Mohan L., Paranidharan V., Murugesan R. 2000. New Records - On Pepino (*Solanum muricatum*). *Indian Phytopathology*, 53, 4: 495–497
- Montes M.S., Nielsen B.J., Schmidt S.G., Bødker L., Kjøller R., Rosendahl S. 2015. Population genetics of *Phytophthora infestans* in Denmark reveals dominantly clonal populations and specific alleles linked to metalaxyl-M resistance. *Plant Pathology*, doi: 10.1111/ppa.12462: 9 str.
- Morton V., Staub T. 2008. A short history of fungicides. *APSnet Features*. doi: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308  
<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx> (november 2015)
- Potato blight mapped in Europe - 2013. Euroblight. A potato late blight network for Europe.  
<http://euroblight.net/currently/news/archive/2014/april/> (december 2015)

- Potato blight mapped in Europe - 2014. Euroblight. A potato late blight network for Europe.  
<http://euroblight.net/currently/news/nyhed/artikel/potato-blight-mapped-in-europe-2014/> (december 2015)
- Powelson M.L., Ludy R., Partipilo H., Inglis D.A., Gundersen B., Derie M. 2002. Seed borne late blight of potato. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2002-0129-01-HM  
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/management/potatolate/> (julij 2015)
- Protocol for sampling *Phytophthora infestans* DNA using FTA cards. Euroblight. Potato late blight network for Europe.  
<http://euroblight.net/pathogen-characteristics-and-host-resistance/p-infestans-monitoring-europe/> (maj 2014)
- Q-bank, Comprehensive databases on quarantine pests and diseases.  
<http://www.q-bank.eu/Fungi/> (november 2015)
- Romero-Montes G., Lozoya-Saldaña H., Mora-Aguilera G., Fernández-Pavía S., Grünwald N.J. 2008. Environment and slow epidemics favor oosporeulation of *Phytophthora infestans* Mont. De Bary, on potato leaves in the Toluca Valley, México. *American Journal of Potato Research*, 85: 101–109
- Rossmann A.Y., Palm M.E. 2006. Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true Fungi? *Outlooks on pest Management*, 10: 217–219
- Sampling sites and genotype maps. Euroblight. A potato late blight network for Europe.  
<http://euroblight.net/pathogen-characteristics-and-host-resistance/sampling-sites-and-genotype-maps/> (november 2015)
- Schepers H. 2013. Reduced efficacy of fluazinam against some Green 33 isolates of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. V: Presentations and the associated proceeding papers from the EuroBlight Workshop, 12-15 May 2013, Limassol, Cyprus.  
<http://130.226.173.223/euroblight/Workshop/2013Limassol/PPTList.asp> (feb 2015)
- Schöber-Butin B. 2001. Die Kraut- und Braunfäule der Kartoffel und ihr Erreger *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Late blight of the potato und its causal agent. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 384. Berlin, Parey Buchverlag: 64 str.
- Shattock R.C., Shaw D.S., Fyfe A., Dunn J.R., Loney K.H., Shattock J.A. 1990. Phenotypes of *Phytophthora infestans* collected in England and Wales from 1985 to 1988: mating type, response to metalaxyl and isoenzyme analysis. *Plant Pathology*, 39: 242–248
- Singh B.K., Singh S., Singh B.K., Mal Yadav S. 2014. Some important plant pathogenic disease of brinjal (*Solanum melongena* L.) and their management. *Plant Pathology Journal*, 13: 208–213
- Singleton L.L., Mihail J.D., Rush C.M. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. St. Paul, APS press: 266 str.

- Smart C.D., Mayton H., Mizubuti E.S., Willmann M.R., Fry W.E. 2000. Environmental and genetic factors influencing self-fertility in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 90, 9: 987-994
- Statistični urad RS.  
<http://www.stat.si/StatWeb/glavnanavigacija/podatki/publikacije> (november 2015)
- Stroud J.A., Shaw D.S., Hale M.D., Steele K.A. 2016. SSR assessment of *Phytophthora infestans* populations on tomato and potato in British gardens demonstrates high diversity but no evidence for host specialisation. *Plant Pathology*, 65: 334-341
- Sujkowski L.S., Goodwin S.B., Dyer A.T., Fry W.E. 1994. Increased Genotypic Diversity via Migration and Possible Occurrence of Sexual Reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology*, 84, 2: 201-207
- Tooley P.W., Fry W.E., M.J. Villarreal Gonzalez. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *The Journal of Heredity*, 76: 431-435
- Tooley P.W., Therrien C.D., Ritch D.L. 1989. Mating type, race composition, nuclear DNA content, and isozyme analysis of Peruvian isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 79: 478-481
- Turkensteen L.J., Flier W.G., Wannigen R., Mulder A. 2000. Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 49: 688-696
- Ulloa M., Hanlin R.T. 2012. Illustrated dictionary of Mycology. Second edition. St. Paul, American Phytopathological Society Press: 784 str.
- Urek G., Knapič M., Urbančič Zemljič M., Škerlavaj V., Simončič A., Persolja J., Rak Cizej M., Radišek S., Lešnik M. 2012. Raba fitofarmaceutskih sredstev in preučitev možnosti za njihovo racionalnejšo uporabo v Sloveniji. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 163 str.
- Van der Gaag D.J., Frinking H.D. 1997. Extraction of oospores of *Peronospora viciae* from soil. *Plant Pathology*, 46: 675-679
- Vargas A.M., Correa A., Lozano D.C., González A., Bernal A.J., Restrepo S. 2007. First report of late blight caused by *Phytophthora infestans* on cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. *Plant Disease*, 91, 4: 464
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, 2nd edn. Boca Raton, CRC Press: 472 str.
- Widmark A.-K., Andersson B., Cassel-Lundhagen A., Sandström M., Yuen J.E. 2007. *Phytophthora infestans* in a single field in southwest Sweden early in spring: symptoms, spatial distribution and genotypic variation. *Plant Pathology*, 56: 573-579
- Wiik L. 2014. Potato late blight and tuber yield: results from 30 years of field trials. *Potato Research*, 57: 77-98
- Wijekoon C.P., Peters R.D., Al-Mughrabi K.I., Kawchuk L.M. 2014. First report of late blight caused by *Phytophthora infestans* clonal lineage US-23 on tomato and potato in Atlantic Canada. *Plant Disease*, 98: 426

- Yoshida K., Schuenemann V.J., Cano L.M., Pais M., Mishra B., Sharma R., Lanz C., Martin F.N., Kamoun S., Krause J., Thines M., Weigel D., Burbano H.A. 2013. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. eLife 2:e00731. doi: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00731>
- Zadoks J.C. 2008. The potato murrain on the European continent and the revolutions of 1848. Potato Research, 51: 5–45
- Zellner M., Keil S., Benker M. 2011. Latent infection rate of potato seed tubers with *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary – an underestimated problem. Journal für Kulturpflanzen, 63: 13–16
- Zwankhuizen M.J., Govers F., Zadoks J.C. 2000. Inoculum sources and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in Southern Flevoland, the Netherlands. European Journal of Plant Pathology, 106: 667–680

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mojim sodelavcem na Kmetijskem inštitutu Slovenije za mnoge prinesene vzorce krompirjeve plesni v dolgem obdobju te raziskave. Hvala Meti, Mateju, Hansu-Josefu in Danici za pomoč in nadvse potrebno spodbudo. Hvala Aleksandri za skrbno vzdrževanje zbirke izolatov.

Financiranje v okviru ciljnega raziskovalnega programa "Konkurenčnost Slovenije 2001–2006" je omogočilo, da sem začela z raziskovanjem populacije krompirjeve plesni, projekt Cropsustain (7. okvirni program EU) v letih od 2012 do 2016 pa nadaljevanje tega dela. Za obe priložnosti sem hvaležna. Še posebej dragoceno je bilo sodelovanje z The James Hutton Institute, kjer me je dr. David Cooke navdušil za nov pristop k spremljanju populacije, poskrbel za analize s SSR markerji v njihovem laboratoriju ter pomagal pri njihovi interpretaciji. Za pomoč se mu iskreno zahvaljujem.

Mentor prof. dr. Aco Celar je z razumevanjem spremljal dolgotrajno nastajanje tega dela, mi tehtno svetoval pri pisanju in bil vedno na voljo za razgovor. Hvala.

## PRILOGA A

### Gojišča za izolacijo, gojenje in shranjevanje *Phytophthora infestans*

#### Rženo gojišče A (Rye A agar)

##### SESTAVINE (za 1 liter gojišča)

Nerazkuženo rženo zrnje	60 g
Saharoza	20 g
Agar tehnični	15 g
Destilirana ali deionizirana voda (DV)	do 1000 ml

##### NAVODILO ZA PRIPRAVO

60 g rženega zrnja iz ekološke pridelave daj v pladenj in prelij s toliko DV, da ravno prekrije zrnje. Pladenj pokrij z Al-folijo in pusti 36 h na sobni temperaturi, da seme nabrekne.

Po 24 urah odlij vodo v čašo in jo shrani.

Seme daj v drugo čašo in nanj nalij toliko DV, da bo nivo vode 2,5 cm nad semenom. Na laboratorijskem homogenizatorju (ultra-turrax), ali s kuhinjskim paličnim mešalnikom drobno zmelji seme v vodi.

Zmleto zmes grej v vodni kopeli 1 h pri 68°C.

Toplo zmes stisni skozi 4 plasti gaze in filtratu dodaj vodo, ki si jo shranil po namakanju zrnja in prenesi v laboratorijsko steklenico za avtoklaviranje (Duran, 1 l). Ostanek semena v krpi zavrzi.

Pripravljeni tekočini (ržena voda) dodaj saharozo in agar, ter dopolni volumen v steklenici do 1000 ml z DV ter dobro premešaj na magnetnem mešalu.

Volumen pred avtoklaviranjem razdeli v dve laboratorijski steklenici volumna 1 l.

Avtoklaviraj 20 minut pri 121°C.

Med nalivanjem v petrijevke vsebino mešaj, da delci ne sedimentirajo.

##### Dodajanje antibiotikov:

Iz antibiotikov rifampicin, ampicilin in pimaricin pripravimo založno raztopino, ki jo dodajamo gojišču preko sterilnega filtra s porami 0,2 µm, ko je gojišče po avtoklaviranju ohlajeno na 45 do 50°C. Vsebnost antibiotikov v pripravljenem gojišču je: ampicilin 250 mg/l, pimaricin 10 mg/l in rifampicin 10 mg/l.

Vir: Erwin in Ribeiro, 1996; Singleton in sod., 1992

### Rženo gojišče B z večjo prosojnostjo (Rye B agar)

#### SESTAVINE (za 1 liter gojišča)

Nerazkuženo rženo zrnje	60 g
Saharoza	20 g
Agar tehnični	15 g
Deionizirana voda (DV)	do 1000 ml

#### NAVODILO ZA PRIPRAVO

Priprava se razlikuje od gojišča RYE A le v tem, da se zrnje namaka v vodi 36 ur nato pa ga pustimo vreti 1 uro v deionizirani vodi in ga ne meljemo. Kuhano zrnje precedimo skozi gazo in tekočini dodamo saharozo in agar ter dopolnimo do volumna 1 l ter avtoklaviramo 20 minut pri 121°C.

Vir: Erwin in Ribeiro, 1996

### Bistro gojišče iz soka Campbell V8 (V8 Juice Agar)

#### SESTAVINE (za 1 liter gojišča)

Campbell V8 juice	350 ml
Kalcijev karbonat / CaCO <sub>3</sub>	5 g
Agar tehnični	20 g
Deionizirana voda (DV)	do 1000 ml

#### NAVODILO ZA PRIPRAVO

V 500 ml čašo zliješ V8 sok, dodaš natehtan CaCO<sub>3</sub> in premešaš.  
Centrifugiraš 20 min pri 4000 rpm (centrifugirke ne smejo biti polne)  
Supernatant odliješ in ga odmeriš v 200 ml v reagenčno steklenico.  
Doliješ štirikratno količino DV in dodaš agar.  
Avtoklaviraj 20 minut pri 121°C.

Vir: Singleton in sod., 1992

## PRILOGA B

### Seznam izolatov *P. infestans* z rezultati odpornosti proti metalaksilu in paritvenim tipom

Št. izolata	Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina Decimalne stopinje	Zemljepisna dolžina Decimalne stopinje	Rastišče	Gostitelj	Del rastline	Odpornost proti metalaksilu S-občutljiv R-odporen I-srednje odporen	Paritveni tip
6_02	20.05.2002	Bizovik	46,0409	14,5688	vrt	paradižnik	list	I	A1
7_02	26.06.2002	Vodice	46,1871	14,5033	njiva	krompir	list	S	A1
9_02	26.06.2002	Jablje	46,1505	14,5596	njiva	krompir	list	S	A1A2
10_02	09.07.2002	Vodice	46,1845	14,4878	njiva	krompir	list	S	A1
11_02	09.07.2002	Dorfarje	46,1925	14,3264	njiva	krompir	list	S	A1
14_02	10.07.2002	Šmartno	46,0761	14,5524	njiva	krompir	list	S	A2
16_02	10.07.2002	Bizovik	46,0401	14,5727	njiva	krompir	list	S	A1
19_02	10.07.2002	Ljubljana_Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	krompir	list	S	A1
21_02	10.07.2002	Ljubljana	46,0359	14,5078	vrt	paradižnik	plod	S	A2
22_02	24.07.2002	Kamnik	46,2305	14,6164	njiva	krompir	list	S	A2
23_02	24.07.2002	Kamnik	46,2359	14,6088	vrt	paradižnik	list	S	A2
24_02	24.07.2002	Komenda	46,1975	14,5416	njiva	krompir	list	S	A1
25_02	24.07.2002	Križ pri Komendi	46,2012	14,5583	njiva	krompir	list	S	A1
26_02	24.07.2002	Tenetiše	46,2966	14,3456	vrt	krompir	list	S	A1
28_02	24.07.2002	Strahinj	46,2813	14,3000	njiva	krompir	list	S	A1
29_02	24.07.2002	Struževo	46,2529	14,3425	vrt	krompir	list	S	A1
30_02	24.07.2002	Struževo	46,2529	14,3425	vrt	paradižnik	plod	S	A1
31_02	24.07.2002	Srednje Bitnje	46,2128	14,3409	njiva	krompir	list	S	A1
33_02	24.07.2002	Godešič	46,1631	14,3555	njiva	krompir	list	R	A1
35_02	31.07.2002	Hrušica	46,0443	14,5626	njiva	krompir	list	S	A1
36_02	31.07.2002	Ljubljana_Moste	46,0574	14,5346	vrt	krompir	gomolj	R	A1
37_02	31.07.2002	Ljubljana_Tomačevo	46,0802	14,5420	njiva	krompir	list	I	A1
38_02	31.07.2002	Ljubljana_Črnuče	46,1036	14,5376	njiva	krompir	gomolj	I	A1
39_02	31.07.2002	Ljubljana_Podgorica	46,0905	14,5844	njiva	krompir	list	I	A1
41_02	31.07.2002	Ljubljana_Moste	46,0574	14,5346	vrt	paradižnik	plod	S	A2



Št. izolata	Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina Decimalne stopinje	Zemljepisna dolžina Decimalne stopinje	Rastišče	Gostitelj	Del rastline	Odpornost proti metalaksilu S-občutljiv R-odporen I-srednje odporen	Paritveni tip
42_02	01.08.2002	Srednji Lipovec	45,8200	15,0014	njiva	krompir	list	I	A1
43_02	01.08.2002	Srednji Lipovec	45,8195	15,9991	vrt	paradižnik	list	S	A2
44_02	02.08.2002	Krško	45,9511	15,5024	njiva	krompir	list	I	A1
45_02	02.08.2002	Krško	45,9605	15,4976	vrt	paradižnik	list	S	A2
46_02	23.08.2002	Šmarca	46,1941	14,5926	vrt	paradižnik	plod	I	A1
47_02	23.08.2002	Komenda	46,1930	14,5171	njiva	krompir	list	S	A1
48_02	30.08.2002	Gornja Radgona	46,6699	15,9986	vrt	krompir	list	I	A1
49_02	02.09.2002	Ljubljana	46,0402	14,5147	vrt	paradižnik	plod	S	A1
50_02	06.10.2002	Gornje Pijavško	45,9850	15,4179	vrt	paradižnik	plod	I	A1
51_02	21.02.2003	Dravograd	46,5890	15,0053	skladišče	krompir	gomolj	S	A1
52_02	18.03.2003	Dravograd	46,5890	15,0053	skladišče	krompir	gomolj	R	A2
53_02	18.03.2003	Dravograd	46,5890	15,0053	skladišče	krompir	gomolj	R	A2
1_03	29.8.2003	Ljubljana	46,0366	14,5312	vrt	paradižnik	plod	S	A1
2_03	2.9.2003	Komenda	46,2003	14,5187	njiva	krompir	list	R	A1
4_03	10.9.2003	Ljubljana	46,0354	14,5071	vrt	paradižnik	plod	S	A1
5_03	10.9.2003	Ljubljana	46,0354	14,5071	vrt	paradižnik	plod	S	A1
6_03	12.9.2003	Ljubljana	46,0802	14,5420	vrt	paradižnik	plod	S	A1
6_04	23.6.2004	Jablje (Groblje)	46,1394	14,5782	njiva	krompir	list	R	A1
9_04	30.6.2004	Komenda	46,1974	14,5407	njiva	krompir	list	R	A1
11_04	6.7.2004	Bitnje	46,2160	14,3429	njiva	krompir	list	R	A1
12_04	6.7.2004	Žabnica	46,1986	14,3359	njiva	krompir	list	R	A1
13_04	6.7.2004	Žabnica	46,1914	14,3630	njiva	krompir	list	R	A1
14_04	6.7.2004	Žabnica	46,1986	14,3359	njiva	krompir	list	R	A1
15_04	6.7.2004	Dorfarje	46,1925	14,3264	njiva	krompir	list	R	A1
16_04	6.7.2004	Dorfarje	46,1935	14,3297	njiva	krompir	list	R	A1
17_04	6.7.2004	Sveti Duh/Šk. Loka	46,1814	14,3262	njiva	krompir	list	R	A1
18_04	6.7.2004	Šutna	46,2000	14,3278	njiva	krompir	list	R	A1
19_04	6.7.2004	Mengeš	46,1721	14,5802	njiva	krompir	list	S	A1
20_04	6.7.2004	Mengeš	46,1602	14,5743	njiva	krompir	list	R	A1
21_04	13.7.2004	Ljubljana_Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	krompir	list	R	A1
22_04	14.7.2004	Spodnji Brnik	46,2254	14,4891	njiva	krompir	list	R	A1

Št. izolata	Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina Decimalne stopinje	Zemljepisna dolžina Decimalne stopinje	Rastišče	Gostitelj	Del rastline	Odpornost proti metalaksilu S-občutljiv R-odporen I-srednje odporen	Paritveni tip
23_04	14.7.2004	Strahinj	46,2813	14,3000	njiva	krompir	list	R	A1
24_04	15.7.2004	Ljubljana_Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	krompir	list	R	A1
25_04	15.7.2004	Zaboršt pri Dolu	46,0918	14,6389	njiva	krompir	list	R	A1
26_04	15.7.2004	Dol pri Ljubljani	46,0892	14,6446	njiva	krompir	list	R	A1
27_04	15.7.2004	Dol pri Ljubljani	46,0889	14,6515	njiva	krompir	list	R	A1
28_04	15.7.2004	Loka pri Mengšu	46,1451	14,5620	njiva	krompir	list	R	A1
29_04	16.7.2004	Duplicapri Kamniku	46,1995	14,5907	njiva	krompir	list	R	A1
30_04	16.7.2004	Rakičan	46,6525	16,1919	njiva	krompir	list	S	A1
31_04	16.7.2004	Ptuj	46,4140	15,8879	njiva	krompir	list	S	A2
32_04	19.7.2004	Dobrova	46,0546	14,4185	njiva	krompir	list	I	A2
33_04	19.7.2004	Draževnik	46,0463	14,4268	njiva	krompir	list	R	A1
34_04	19.7.2004	Ljubljana_Vič	46,0399	14,4693	vrt	krompir	list	I	A1
35_04	21.7.2004	Črna vas	46,0124	14,5041	njiva	krompir	list	R	A1
36_04	21.7.2004	Tomišelj	45,9665	14,4777	njiva	krompir	list	R	A1
37_04	21.7.2004	Tomišelj	45,9620	14,4850	vrt	krompir	list	I	A2
38_04	21.7.2004	Brest	45,9669	14,4985	njiva	krompir	list	I	A2
39_04	21.7.2004	Staje	45,9566	14,5082	njiva	krompir	list	I	A2
40_04	21.7.2004	Kremenica	45,9471	14,5512	njiva	krompir	list	R	A1
41_04	21.7.2004	Plešivica	45,9952	14,4007	njiva	krompir	list	I	A2
42_04	21.7.2004	Šmarje Sap	45,9752	14,6131	njiva	krompir	list	I	A2
43_04	21.7.2004	Velika Loka	45,9366	14,7145	njiva	krompir	list	I	A2
44_04	21.7.2004	Višnja Gora	45,9508	14,7276	njiva	krompir	list	I	A2
45_04	23.7.2004	Strahinj	46,2874	14,3009	njiva	krompir	list	R	A1
46_04	25.7.2004	Podova	46,4340	15,7029	njiva	krompir	list	S	A1
47_04	25.7.2004	Šikole	46,3997	15,6983	njiva	krompir	list	R	A1 A2
48_04	25.7.2004	Cvetkovci	46,4151	16,0640	njiva	krompir	list	S	A1
49_04	25.7.2004	Godeninci	46,4213	16,2664	njiva	krompir	list	S	A1
50_04	25.7.2004	Pavlovci	46,4147	16,1692	njiva	krompir	list	S	A1
51_04	25.7.2004	Ljutomer	46,5200	16,2038	njiva	krompir	list	S	A1
52_04	25.7.2004	Gibina	46,5194	16,3067	njiva	krompir	list	S	A1
53_04	25.7.2004	Gibina	46,5160	16,2987	njiva	krompir	list	S	A1

Št. izolata	Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina Decimalne stopinje	Zemljepisna dolžina Decimalne stopinje	Rastišče	Gostitelj	Del rastline	Odpornost proti metalaksilu S-občutljiv R-odporen I-srednje odporen	Paritveni tip
54_04	25.7.2004	Dolina pri Lendavi	46,5355	16,5082	njiva	krompir	list	S	A1
55_04	27.7.2004	Beltinci	46,6097	16,2453	njiva	krompir	list	S	A1
56_04	27.7.2004	Rakičan	46,6525	16,1919	njiva	krompir	list	S	A1
58_04	27.7.2004	Bakovci	46,6146	16,1518	njiva	krompir	list	S	A1
60_04	27.7.2004	Strukovci	46,7026	16,0656	vrt	paradižnik	list	S	A2
61_04	27.7.2004	Strukovci	46,7111	16,0665	njiva	krompir	list	S	A1
62_04	28.7.2004	Dorfarje	46,1974	14,3201	njiva	krompir	list	R	A1
63_04	29.7.2004	Podbrezje	46,3068	14,2731	njiva	krompir	list	R	A1
64_04	29.7.2004	Otoče	46,3121	14,2354	njiva	krompir	list	R	A1
65_04	29.7.2004	Kranj	46,2529	14,3429	vrt	krompir	list	R	A1
66_04	29.7.2004	Lahovče	46,2149	14,5040	njiva	krompir	list	R	A1
67_04	30.7.2004	Vrhovo	46,0414	15,2231	njiva	krompir	list	R	A2
68_04	29.7.2004	Vodranci	46,4321	16,2504	njiva	krompir	list	S	A1
69_04	29.7.2004	Dobrovnik	46,6533	16,3383	njiva	krompir	list	S	A1
70_04	29.7.2004	Genterovci	46,6174	16,4008	njiva	krompir	list	S	A1
71_04	30.7.2004	Komenda	46,2003	14,5322	njiva	krompir	gomolj	R	A1
72_04	3.8.2004	Hrušica	46,0415	14,5606	njiva	krompir	list	R	A1
73_04	4.8.2004	Pijava Gorica	45,9496	14,5705	vrt	paradižnik	list	R	A1
74_04	4.8.2004	Hrastnik	46,1457	15,0755	vrt	paradižnik	list	S	A1
75_04	4.8.2004	Libeliče	46,6217	14,9503	njiva	krompir	list	R	A1
76_04	4.8.2004	Dobrova pri Dravogradu	46,5800	15,0135	njiva	krompir	list	R	A2
78_04	4.8.2004	Vitan	46,4372	16,2447	njiva	krompir	list	S	A1
80_04	5.8.2004	Višnja Gora	45,9538	14,7512	njiva	krompir	list	I	A2
81_04	5.8.2004	Spodnje Brezovo	45,9627	14,7190	njiva	krompir	list	I	A2
82_04	7.8.2004	Skopice	45,9036	15,5574	njiva	krompir	list	S	A2
83_04	8.8.2004	Ivandol	45,9504	15,4370	njiva	krompir	list	S	A1
85_04	8.8.2004	Velike Brusnice	45,8091	15,2603	njiva	krompir	list	S	A1
86_04	8.8.2004	Biška vas	45,8674	15,0774	njiva	krompir	list	R	A1
87_04	8.8.2004	Dolenje Ponikve	45,8936	15,0450	njiva	krompir	list	I	A2
89_04	9.8.2004	Strahinj	46,2813	14,3000	njiva	krompir	steblo	R	A1

Št. izolata	Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina Decimalne stopinje	Zemljepisna dolžina Decimalne stopinje	Rastišče	Gostitelj	Del rastline	Odpornost proti metalaksilu S-občutljiv R-odporen I-srednje odporen	Paritveni tip
90_04	10.8.2004	Kranj	46,2408	14,3738	njiva	krompir	list	R	A1
91_04	11.8.2004	Pšata	46,0964	14,6051	njiva	krompir	list	I	A1
93_04	12.8.2004	Logatec	45,9089	14,2056	njiva	krompir	list	I	A2
94_04	12.8.2004	Hotedrščica	45,9307	14,1366	njiva	krompir	list	R	A1
95_04	12.8.2004	Podroteja/Idrija	45,9870	14,0323	njiva	krompir	list	I	A2
96_04	12.8.2004	Idrija	46,0261	14,0276	vrt	paradižnik	plod	S	A1
97_04	12.8.2004	Travnik	46,0710	13,9921	vrt	krompir	list	S	A1
98_04	12.8.2004	Stopnik	46,0937	13,8819	vrt	krompir	list	S	A1
99_04	12.8.2004	Dolenja Trebuša	46,1014	13,8726	vrt	krompir	list	S	A1
100_04	12.8.2004	Slap ob Idrijci	46,1235	13,8016	vrt	paradižnik	plod	S	A1
101_04	12.8.2004	Podljudinj	46,1767	13,7482	njiva	krompir	list	S	A2
102_04	12.8.2004	Tolmin	46,1794	13,7130	njiva	krompir	list	S	A1
106_04	12.8.2004	Trnovo ob Soči	46,2822	13,5493	vrt	paradižnik	plod	S	A1
107_04	12.8.2004	Žaga	46,3055	13,4819	vrt	krompir	list	S	A1A2
108_04	12.8.2004	Čezsoča	46,3189	13,5422	vrt	paradižnik	plod	S	A1
109_04	12.8.2004	Čezsoča	46,3187	13,5380	njiva	krompir	list	S	A1
110_04	12.8.2004	Soča	46,3422	13,6672	vrt	krompir	list	S	A2
111_04	12.8.2004	Spodnja Trenta	46,3707	13,7339	vrt	krompir	list	S	A2
112_04	12.8.2004	Zgornja Trenta	46,3823	13,7570	vrt	krompir	list	S	A2
113_04	12.8.2004	Gozd Martuljek	46,4839	13,8432	njiva	krompir	list	R	A1
114_04	12.8.2004	Javornik	46,4250	14,0852	njiva	krompir	list	R	A1
115_04	13.8.2004	Homec	46,1798	14,5940	njiva	krompir	list	R	A1
116_04	15.8.2004	Šmarca	46,1941	14,5926	njiva	krompir	list	I	A1
117_04	23.8.2004	Križe	46,3385	14,2962	njiva	krompir	list	R	A1
118_04	23.8.2004	Ljubljana Ižanska c.	46,0159	14,5113	vrt	paradižnik	plod	S	A1
119_04	23.8.2004	Kranj	46,2662	14,3541	vrt	paradižnik	list	S	A2
120_04	23.8.2004	Strahinj	46,2813	14,3000	njiva	krompir	list	R	A1
121_04	25.8.2004	Šmarca	46,1894	14,5950	vrt	paradižnik	plod	S	A1
122_04	25.8.2004	Trzin	46,1360	14,5606	vrt	paradižnik	plod	S	A1
123_04	25.8.2004	Zgornje Palovče	46,2121	14,6489	njiva	krompir	list	S	A2
124_04	25.8.2004	Podolševa	46,4340	14,6806	njiva	krompir	list	S	A2

Št. izolata	Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina Decimalne stopinje	Zemljepisna dolžina Decimalne stopinje	Rastišče	Gostitelj	Del rastline	Odpornost proti metalaksilu S-občutljiv R-odporen I-srednje odporen	Paritveni tip
125_04	25.8.2004	Sveti Duh (Logarska dolina)	46,4393	14,6661	njiva	krompir	list	S	A2
126_04	25.8.2004	Podolševa	46,4409	14,7222	vt	krompir	list	S	A2
127_04	25.8.2004	Sveti Duh (Logarska dolina)	46,4393	14,6661	vt	krompir	list	S	A1
129_04	25.8.2004	Solčava	46,4190	14,6815	njiva	krompir	gomolj	R	A1
130_04	25.8.2004	Luče	46,3545	14,7450	vt	paradižnik	plod	S	A1
131_04	25.8.2004	Deskle	46,0533	13,6168	vt	paradižnik	plod	S	A1
132_04	25.8.2004	Bodrež	46,0953	13,6429	vt	paradižnik	plod	S	A1
133_04	25.8.2004	Ročinj	46,1086	13,6723	vt	paradižnik	list	S	A1
134_04	25.8.2004	Ročinj	46,1075	13,6698	njiva	krompir	list	S	A1
135_04	25.8.2004	Vrhovlje	45,7279	13,8234	vt	paradižnik	list	S	A1
137_04	27.8.2004	Komenda	46,2024	14,5321	njiva	krompir	list	R	A1
138_04	30.8.2004	Vrhovo	46,0398	15,2201	vt	paradižnik	plod	S	A2
141_04	30.8.2004	Radenci	46,6448	16,0331	vt	paradižnik	list	S	A1
142_04	30.8.2004	Sodišinci	46,6663	16,0466	vt	paradižnik	list	S	A1
144_04	30.8.2004	Trebnje	46,9093	15,0132	vt	paradižnik	plod	S	A2
145_04	3.9.2004	Olševk	46,2779	14,4347	vt	paradižnik	list	S	A1
146_04	9.9.2004	Gržeča vas	45,9039	15,4494	rastl	paradižnik	plod	S	A1
147_04	9.9.2004	Gornji Lenart	45,9296	15,5806	njiva	paradižnik	plod	S	A1
148_04	10.9.2004	Ljubljana_ Hradetskega c.	46,0458	14,5235	vt	paradižnik	plod	S	A1
149_04	10.9.2004	Britof pri Kranju	46,2593	14,3887	njiva	paradižnik	plod	S	A1
150_04	17.9.2004	Ljubljana_ Ježica	46,0987	14,5132	vt	paradižnik	plod	S	A1
151_04	23.9.2004	Boštanj	46,0128	15,2808	vt	paradižnik	plod	S	A2
152_04	23.9.2004	Puščava pri Mokronogu	45,9596	15,1175	njiva	paradižnik	plod	S	A1
154_04	12.10.2004	Komenda	46,1949	14,3383	njiva	krompir	list	I	A1
1_05	8.6.2005	Komenda	46,1955	14,5248	odpadni krompir	krompir	list	R	A1
2_05	11.7.2005	Soča	46,3414	13,6683	njiva	krompir	list	S	A1

Št. izolata	Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina Decimalne stopinje	Zemljepisna dolžina Decimalne stopinje	Rastišče	Gostitelj	Del rastline	Odpornost proti metalaksilu S-občutljiv R-odporen I-srednje odporen	Paritveni tip
3_05	22.7.2005	Dorfarje	46,1971	14,3204	njiva	krompir	list	R	A1
4_05	27.7.2005	Loka pri Mengšu	46,1503	14,5657	njiva	krompir	list	S	A1
5_05	22.8.2005	Gornji grad	46,2960	14,8030	njiva	krompir	list	ni rezultata	A1
6_05	24.8.2005	Komenda	46,2003	14,5187	njiva	krompir	list	S	A2
7_05	24.8.2005	Ig	45,9612	14,5191	vrt	paradižnik	plod	S	A2
8_05	24.8.2005	Grosuplje	45,9462	14,6596	vrt	paradižnik	list	S	A1
9_05	24.8.2005	Ljubljana	46,0747	14,5378	vrt	paradižnik	plod	S	A1
10_05	24.8.2005	Ljubljana	46,0747	14,5378	vrt	paradižnik	plod	S	A1
11_05	23.8.2005	Vrhovo	46,0419	15,2181	vrt	paradižnik	plod	S	A1
12_05	24.8.2005	Črna vas	46,0044	14,4831	vrt	paradižnik	list	S	A1
13_05	25.8.2005	Novo mesto	45,8315	15,1979	njiva	krompir	list	R	A2
14_05	31.8.2005	Rakičan	46,6530	16,1909	njiva	krompir	list	S	A1
15_05	29.8.2005	Moste pri Komendi	46,1959	14,5506	rastlinjak	paradižnik	list	S	A1
16_05	24.8.2005	Tomišelj	45,9657	14,4803	njiva	paradižnik	plod	S	A1
17_05	24.8.2005	Komenda	46,2003	14,5187	njiva	krompir	list	I	A2
18_05	15.9.2005	Ljubljana	46,0158	14,5096	vrt	paradižnik	list	S	A1
19_05	15.9.2005	Dorfarje	46,1948	14,3218	skladišče	krompir	gomolj	I	A1
20_05	16.10.2005	Ljubljana	46,0366	14,5315	vrt	paradižnik	plod	S	A1
21_05	17.10.2005	Domžale	46,1404	14,5799	njiva	krompir	gomolj	S	A1
22_05	29.10.2005	Hrušica	46,0443	14,5625	njiva	krompir	list	I	A2
23_05	25.9.2005	Domžale	46,1404	14,5799	njiva	krompir	gomolj	S	A1
2_07	15.6.2007	Lipovci	46,6228	16,2229	njiva	krompir	list	R	A2
4_07	18.6.2007	Vrhovo	46,0409	15,2250	njiva	krompir	list	S	A1
5_07	19.6.2007	Novo mesto	45,8315	15,1979	njiva	krompir	list	R	A2
6_07	4.7.2007	Ljubljana_Brod	46,1074	14,4646	vrt	paradižnik	plod	S	A1
7_07	5.7.2007	Jablje	46,1394	14,5782	njiva	krompir	list	R	A2
8_07	5.7.2007	Domžale	46,1394	14,5854	njiva	krompir	list	R	A2
9_07	9.7.2007	Srednji Lipovec	45,8207	14,9984	njiva	krompir	list	S	A1
10_07	9.7.2007	Radomlje	46,1811	14,6097	njiva	krompir	list	R	A2
11_07	11.7.2012	Dorfarje	46,1915	14,3270	njiva	krompir	list	R	A2
12_07	17.7.2007	Britof pri Kranju	46,2602	14,3937	njiva	krompir	list	R	A2

Št. izolata	Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina Decimalne stopinje	Zemljepisna dolžina Decimalne stopinje	Rastišče	Gostitelj	Del rastline	Odpornost proti metalaksilu S-občutljiv R-odporen I-srednje odporen	Paritveni tip
13_07	17.7.2007	Ljubljana_Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	paradižnik	list	S	A1
14_07	17.7.2007	Ljubljana_Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	krompir	list	R	A2
15_07	25.7.2013	Tomišelj	45,9660	14,4814	njiva	krompir	list	S	A1
16_07	25.7.2013	Hrastenice	46,0745	14,3797	vrt	paradižnik	list	S	A1
17_07	25.7.2013	Tomišelj	45,9660	14,4814	njiva	krompir	list	R	A2
19_07	28.8.2007	Ljubljana Tomačevo	46,0776	14,5328	vrt	paradižnik	list	S	A1
20_07	29.8.2007	Ljubljana Ježica	46,0982	14,5134	vrt	paradižnik	list	S	A1
21_07	29.8.2007	Struževo	46,2529	14,3425	vrt	paradižnik	list	S	A1
22_07	29.8.2007	Struževo	46,2529	14,3425	vrt	paradižnik	list	S	A1
23_07	29.8.2007	Suha pri Škofji Loki	46,1647	14,3277	vrt	paradižnik	list	S	A1
24_07	29.8.2007	Vrhnika	45,9629	14,2881	vrt	paradižnik	list	S	A2
25_07	31.8.2007	Ljubljana_Livada	46,0354	14,5071	vrt	paradižnik	list	R	A1
26_07	31.8.2007	Ljubljana_Livada	46,0354	14,5071	vrt	paradižnik	list	R	A1
27_07	31.8.2007	Črna vas	46,0094	14,5005	vrt	paradižnik	list	S	A1
28_07	31.8.2007	Brest	45,9671	14,4981	vrt	paradižnik	list	S	A1
29_07	31.8.2007	Ig	45,9612	14,5237	vrt	paradižnik	list	S	A1
30_07	31.8.2007	Ljubljana_Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	paradižnik	list	S	A1
31_07	13.9.2007	Mozirje	46,3349	14,9634	vrt	paradižnik	list	S	A1
32_07	18.9.2007	Želumlje	45,9192	14,5731	vrt	paradižnik	plod	S	A1
33_07	21.9.2007	Ljubljana Ižanska	46,0318	14,5116	vrt	paradižnik	plod	S	A1
34_07	4.10.2007	Ljubljana_Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	paradižnik	list	S	A1
36_07	8.10.2007	Lipnik	45,9115	15,0784	vrt	paradižnik	list	S	A1
37_07	9.10.2007	Šmarca	46,1907	14,5932	vrt	paradižnik	plod	S	A1

## PRILOGA C

### Seznam izolatov *P. infestans* z rezultati genotipizacije s SSR markerji

Številka izolata	Datum vzorčenja			Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina (decimalne stopinje)	Zemljepisna dolžina (decimalne stopinje)	Rastišče	Gostitelj	Genotip
	Leto	Mesec	Dan						
SI_14_02	2002	7	10	Šmartno	46,0761	14,5524	njiva	krompir	drugo
SI_16_02	2002	7	10	Bizovik	46,0401	14,5727	njiva	krompir	drugo
SI_28_02	2002	7	24	Strahinj	46,2813	14,3	njiva	krompir	drugo
SI_29_02	2002	7	24	Struževo	46,2529	14,3425	vert	krompir	drugo
SI_30_02	2002	7	24	Struževo	46,2529	14,3425	vert	paradižnik	drugo
SI_36_02	2002	7	31	Ljubljana-Moste	46,0574	14,5346	vert	krompir	EU_2_A1
SI_37_02	2002	7	31	Ljubljana-Tomačevo	46,0802	14,542	njiva	krompir	drugo
SI_38_02	2002	7	31	Ljubljana-Črnuče	46,1036	14,5376	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_48_02	2002	8	30	Gornja Radgona	46,6699	15,9986	vert	krompir	drugo
SI_49_02	2002	9	2	Ljubljana	46,0402	14,5147	vert	paradižnik	drugo
SI_50_02	2002	10	6	Gornje Pijavško	45,985	15,4179	vert	paradižnik	drugo
SI_53_02	2003	3	18	Dravograd	46,5890	15,0053	odpadni krompir	krompir	drugo
SI_06_04	2004	6	23	Groblje	46,1394	14,5782	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_09_04	2004	6	30	Komenda	46,1974	14,5407	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_12_04	2004	7	6	Žabnica	46,1986	14,3359	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_14_04	2004	7	6	Žabnica	46,1986	14,3359	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_15_04	2004	7	6	Dorfarjo	46,1925	14,3264	njiva	krompir	drugo
SI_18_04	2004	7	6	Šutna	46,2	14,3278	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_21_04	2004	7	13	Ljubljana- Rakovnik	46,0366	14,5312	vert	krompir	EU_2_A1
SI_22_04	2004	7	14	Spodnji Brnik	46,2254	14,4891	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_23_04	2004	7	14	Strahinj	46,2813	14,3	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_24_04	2004	7	15	Ljubljana-Rakovnik	46,0366	14,5312	vert	krompir	drugo
SI_27_04	2004	7	15	Dol pri Ljubljani	46,0889	14,6515	njiva	krompir	EU_2_A1



Številka izolata	Datum vzorčenja			Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina (decimalne stopinje)	Zemljepisna dolžina (decimalne stopinje)	Rastišče	Gostitelj	Genotip
	Leto	Mesec	Dan						
SI_30_04	2004	7	16	Rakičan	46,6525	16,1919	njiva	krompir	drugo
SI_31_04	2004	7	16	Ptuj	46,414	15,8879	njiva	krompir	drugo
SI_33_04	2004	7	19	Draževnik	46,0463	14,4268	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_35_04	2004	7	21	Črna vas	46,0124	14,5041	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_36_04	2004	7	21	Tomišelj	45,9665	14,4777	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_43_04	2004	7	21	Velika Loka	45,9366	14,7145	njiva	krompir	drugo
SI_44_04	2004	7	21	Višnja Gora	45,9508	14,7276	njiva	krompir	drugo
SI_45_04	2004	7	23	Strahinj	46,2874	14,3009	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_46_04	2004	7	25	Podova	46,434	15,7029	njiva	krompir	EU_34_A1
SI_47_04	2004	7	25	Škole	46,3997	15,6983	njiva	krompir	drugo
SI_48_04	2004	7	25	Cvetkovci	46,4151	16,0640	njiva	krompir	EU_34_A1
SI_49_04	2004	7	25	Godeninci	46,4213	16,2664	njiva	krompir	drugo
SI_50_04	2004	7	25	Pavlovci	46,4147	16,1692	njiva	krompir	drugo
SI_51_04	2004	7	25	Ljutomer	46,5200	16,2038	njiva	krompir	drugo
SI_53_04	2004	7	25	Gibina	46,5160	16,2987	njiva	krompir	drugo
SI_56_04	2004	7	27	Rakičan	46,6525	16,1919	njiva	krompir	drugo
SI_61_04	2004	7	27	Strukovci	46,7111	16,0665	njiva	krompir	drugo
SI_64_04	2004	7	29	Otoče	46,3121	14,2354	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_66_04	2004	7	29	Lahovče	46,2149	14,5040	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_69_04	2004	7	29	Dobrovnik	46,6533	16,3383	njiva	krompir	EU_34_A1
SI_70_04	2004	7	29	Genterovci	46,6174	16,4008	njiva	krompir	EU_34_A1
SI_72_04	2004	8	3	Hrušica	46,0415	14,5606	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_75_04	2004	8	4	Libeliče	46,6217	14,9503	njiva	krompir	drugo
SI_78_04	2004	8	4	Vitan	46,4372	16,2447	njiva	krompir	EU_34_A1
SI_80_04	2004	7	5	Višnja Gora	45,9538	14,7512	njiva	krompir	drugo
SI_85_04	2004	8	8	Velike Brusnice	45,8091	15,2603	njiva	krompir	EU_34_A1
SI_87_04	2004	8	8	Dolenje Ponikve	45,8936	15,0450	njiva	krompir	drugo
SI_89_04	2004	8	9	Strahinj	46,2813	14,3	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_90_04	2004	8	10	Kranj	46,2408	14,3738	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_94_04	2004	8	12	Hotedrščica	45,9307	14,1366	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_96_04	2004	8	12	Idrija	46,0261	14,0276	vrt	paradižnik	drugo

Številka izolata	Datum vzorčenja			Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina (decimalne stopinje)	Zemljepisna dolžina (decimalne stopinje)	Rastišče	Gostitelj	Genotip
	Leto	Mesec	Dan						
SI_99_04	2004	8	12	Dolenja Trebuša	46,1014	13,8726	vrt	krompir	EU_23_A1
SI_112_04	2004	8	12	ZgornjaTrenta	46,3823	13,7570	vrt	krompir	drugo
SI_115_04	2004	8	13	Homec	46,1798	14,5940	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_118_04	2004	8	23	Ljubljana-Ižanska c.	46,0159	14,5113	vrt	paradižnik	drugo
SI_120_04	2004	8	23	Strahinj	46,2813	14,3	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_125_04	2004	8	25	Sveti Duh	46,4393	14,6661	njiva	krompir	drugo
SI_127_04	2004	8	25	Sveti Duh	46,4393	14,6661	vrt	krompir	drugo
SI_129_04	2004	8	25	Solčava	46,419	14,6815	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_132_04	2004	8	25	Bodrež	46,0953	13,6429	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI_133_04	2004	8	25	Ročinj	46,1086	13,6723	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI_134_04	2004	8	25	Ročinj	46,1075	13,6698	vrt	krompir	EU_23_A1
SI_137_04	2004	8	27	Komenda	46,2024	14,5321	njiva	krompir	EU_2_A1
SI_141_04	2004	8	30	Radenci	46,6448	16,0331	vrt	paradižnik	drugo
SI_142_04	2004	8	30	Sodišinci	46,6663	16,0466	vrt	paradižnik	drugo
SI_145_04	2004	9	3	Olševek	46,2779	14,4347	vrt	paradižnik	drugo
SI_146_04	2004	9	9	Gržeča vas	45,9039	15,4494	rastlinjak	paradižnik	drugo
SI_148_04	2004	9	10	Ljubljana	46,0458	14,5235	vrt	paradižnik	drugo
SI_151_04	2004	9	23	Boštanj	46,0128	15,2808	vrt	paradižnik	drugo
SI_152_04	2004	9	23	Puščava	45,9596	15,1175	njiva	paradižnik	drugo
SI_12_05	2005	8	24	Črna vas	46,0044	14,4831	vrt	paradižnik	drugo
SI_13_05	2005	8	25	Novo Mesto	45,8315	15,1979	njiva	krompir	drugo
SI_19_05	2005	9	25	Dorfarje	46,1925	14,3264	njiva	krompir	neuspešno
SI_03_06	2006	6	7	Čirče	46,2275	14,3658	njiva	krompir	drugo
SI_02_07	2007	6	15	Lipovci	46,6228	16,2229	njiva	krompir	EU_13_A2
SI_05_07	2007	6	19	Novo mesto	45,8315	15,1979	njiva	krompir	EU_13_A2
SI_07_07	2007	7	5	Jablje	46,1394	14,5782	njiva	krompir	EU_13_A2
SI_08_07	2007	7	5	Domžale	46,1394	14,5854	njiva	krompir	EU_13_A2
SI_09_07	2007	7	9	Srednji Lipovec	45,8207	14,9984	njiva	krompir	EU_34_A1
SI_10_07	2007	7	9	Radomlje	46,1811	14,6097	njiva	krompir	EU_13_A2
SI_14_07	2007	7	17	Ljubljana- Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	krompir	EU_13_A2
SI_19_07	2007	8	28	Ljubljana-Tomačevo	46,0776	14,5328	vrt	paradižnik	EU_23_A1

Številka izolata	Datum vzorčenja			Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina (decimalne stopinje)	Zemljepisna dolžina (decimalne stopinje)	Rastišče	Gostitelj	Genotip
	Leto	Mesec	Dan						
SI_24_07	2007	8	29	Vrhnika	45,9629	14,2881	vrt	paradižnik	drugo
SI_25_07	2007	8	29	Ljubljana-Livada	46,0354	14,5071	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI_27_07	2007	8	29	Črna vas	46,0094	14,5005	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI_29_07	2007	8	29	Ig	45,9612	14,5237	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI_30_07	2007	8	29	Ljubljana- Rakovnik	46,0366	14,5312	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI_32_07	2007	9	18	Želimlje	45,9192	14,5731	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI_33_07	2007	9	21	Ljubljana-Ižanska c.	46,0318	14,5116	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI_37_07	2007	10	9	Šmarca	46,1907	14,5932	vrt	paradižnik	drugo
SI_1_1_10	2010	7	9	Vodice	46,1955	14,5125	njiva	krompir	drugo
SI_1_15_10	2010	7	9	Vodice	46,1955	14,5125	njiva	krompir	drugo

Seznam vzorcev *P. infestans*, katerih DNK je bila odvzeta s FTA kartico v letih 2012, 2014 in 2015  
in rezultati genotipizacije s SSR markerji

Številka vzorca	Datum vzorčenja			Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina (decimalne stopinje)	Zemljepisna dolžina (decimalne stopinje)	Rastišče	Gostitelj	Genotip
	Leto	Mesec	Dan						
SI2012_1_1	2012	6	8	Ljubljana	46,07	14,5944	njiva	krompir	drugo
SI2012_1_2	2012	6	8	Ljubljana	46,07	14,5944	njiva	krompir	drugo
SI2012_1_3	2012	6	12	Ljubljana	46,0366	14,5312	vt	krompir	drugo
SI2012_1_4	2012	6	13	Kamnik	46,192	14,5937	vt	krompir	drugo
SI2012_2_1	2012	6	21	Ljubljana	46,0422	14,502	vt	paradižnik	neuspešno
SI2012_2_2	2012	7	24	Volčji potok	46,1852	14,6126	vt	paradižnik	EU_23_A1
SI2012_2_3	2012	7	27	Skaručna	46,1522	14,4822	vt	paradižnik	drugo
SI2012_2_4	2012	7	27	Strahinj	46,2809	14,3099	vt	paradižnik	drugo
SI2012_3_1	2012	7	27	Ježica	46,1013	14,5082	njiva	krompir	drugo
SI2012_3_2	2012	7	27	Ježica	46,1013	14,5082	njiva	krompir	drugo
SI2012_3_3	2012	7	27	Skaručna	46,1522	14,4822	njiva	krompir	drugo
SI2012_3_4	2012	7	27	Žiganja vas	46,3241	14,2948	njiva	krompir	drugo
SI2012_4_1	2012	7	27	Strahinj	46,28	14,3097	njiva	krompir	drugo
SI2012_4_2	2012	7	27	Brnik	46,2349	14,4687	njiva	krompir	drugo
SI2012_4_3	2012	7	27	Kranj	46,2543	14,3779	vt	paradižnik	drugo
SI2012_4_4	2012	7	31	Britof	46,2615	14,3952	njiva	krompir	drugo
SI2012_5_1	2012	7	28	Lipe	45,9884	14,4537	vt	krompir	drugo
SI2012_5_2	2012	7	28	Tomišelj	45,964	14,4825	vt	krompir	drugo
SI2012_5_3	2012	7	28	Vrbljene	45,9564	14,4939	njiva	krompir	drugo
SI2012_5_4	2012	7	28	Strahomer	45,9443	14,4998	njiva	krompir	EU_6_A1
SI2012_6_1	2012	7	28	Iška vas	45,9458	14,5109	njiva	krompir	neuspešno
SI2012_6_2	2012	7	28	Škofljica	45,9819	14,5763	vt	krompir	drugo
SI2012_6_3	2012	7	28	Šmarje sap	45,9649	14,6329	vt	paradižnik	EU_23_A1
SI2012_6_4	2012	7	30	Trebnje	45,901	15,0327	njiva	krompir	drugo
SI2012_7_1	2012	7	30	Komenda	46,1948	14,5246	njiva	krompir	drugo
SI2012_7_2	2012	7	30	Vodice	46,1955	14,5124	njiva	krompir	drugo
SI2012_7_3	2012	7	30	Zvirče	46,3289	14,2791	njiva	krompir	drugo

Številka vzorca	Datum vzorčenja			Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina (decimalne stopinje)	Zemljepisna dolžina (decimalne stopinje)	Rastišče	Gostitelj	Genotip
	Leto	Mesec	Dan						
SI2012_7_4	2012	7	30	Zvirče	46,3289	14,2791	njiva	krompir	drugo
SI1401	2014	6	17	Češnjevek	46,2599	14,469	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1402	2014	6	17	Češnjevek	46,2605	14,4641	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1403	2014	6	18	Dole pri Krašcah	46,1392	14,7121	njiva	krompir	drugo
SI1404	2014	7	2	Ljubljana_Snebrje	46,0719	14,5951	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1405	2014	7	2	Ptuj	46,4102	15,8759	njiva	krompir	EU_13_A2
SI1406	2014	7	2	Ptuj	46,4102	15,8759	njiva	krompir	EU_13_A2
SI1407	2014	7	2	Ptuj	46,4102	15,8759	njiva	krompir	neuspešno
SI1408	2014	7	3	Trenta	46,378	13,7543	njiva	krompir	drugo
SI1409	2014	7	3	Trenta	46,3823	13,7567	njiva	krompir	drugo
SI1410	2014	7	3	Kal Koritnica	46,3362	13,5784	njiva	krompir	drugo
SI1411	2014	7	3	Trenta-Na Logu	46,3779	13,7498	njiva	krompir	drugo
SI1412	2014	7	2	Ljubljana_Zalog	46,0657	14,5989	njiva	krompir	SI_14_klon2
SI1413	2014	7	9	Dovže	46,4592	15,1595	njiva	krompir	drugo
SI1414	2014	7	9	Praše	46,1935	14,3983	njiva	krompir	drugo
SI1415	2014	7	16	Zagradec	45,8613	14,8361	njiva	krompir	drugo
SI1416	2014	7	16	Malenski vrh	46,1421	14,1485	njiva	krompir	EU_34_A1
SI1417	2014	7	17	Ivančna gorica	45,9405	14,8179	njiva	krompir	drugo
SI1418	2014	7	9	Mislinja	46,4539	15,1653	njiva	krompir	drugo
SI1419	2014	7	9	Kandrše	46,1321	14,8482	njiva	krompir	neuspešno
SI1420	2014	7	22	Bizovik	46,0419	14,565	njiva	krompir	drugo
SI1421	2014	7	28	Jelše	45,899	15,4639	njiva	krompir	EU_13_A2
SI1422	2014	7	28	Malo Mraševo	45,8751	15,4521	njiva	krompir	drugo
SI1423	2014	7	28	Gorenji Maharovec	45,8393	15,3093	njiva	krompir	neuspešno
SI1424	2014	7	28	Verdun	45,7714	15,2203	njiva	krompir	EU_13_A2
SI1425	2014	7	29	Žlebe	46,1228	14,3939	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1426	2014	8	5	Hrušica	46,0443	14,5627	njiva	krompir	neuspešno
SI1427	2014	8	5	Lahovče	46,2164	14,5023	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1428	2014	8	6	Kamnik	46,1973	14,5887	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI1429	2014	8	6	Moste pri Komendi	46,1947	14,557	njiva	krompir	drugo
SI1430	2014	8	6	Spodnji Brnik	46,2179	14,4895	njiva	krompir	SI_14_klon1

Številka vzorca	Datum vzorčenja			Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina (decimalne stopinje)	Zemljepisna dolžina (decimalne stopinje)	Rastišče	Gostitelj	Genotip
	Leto	Mesec	Dan						
SI1431	2014	8	6	Cerklje	46,2531	14,5024	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1432	2014	8	6	Praprotna polica	46,2494	14,4506	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1433	2014	8	6	Kranj	46,2408	14,3744	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1434	2014	8	6	Žabnica	46,1948	14,3523	njiva	krompir	drugo
SI1435	2014	8	6	Sveti Duh	46,1815	14,3288	njiva	krompir	drugo
SI1436	2014	8	6	Zgornja Senica	46,1565	14,3943	njiva	krompir	drugo
SI1437	2014	8	11	Lipe	45,9933	14,4714	vt	paradižnik	EU_23_A1
SI1438	2014	8	11	Tomišelj	45,9671	14,4766	vt	paradižnik	drugo
SI1439	2014	8	11	Staje	45,9573	14,5074	njiva	krompir	SI_14_klon2
SI1440	2014	8	11	Vrbljene	45,95	14,4945	njiva	krompir	SI_14_klon2
SI1441	2014	8	11	Iška vas	45,9474	14,5138	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1442	2014	8	27	Ljubljana	46,0367	14,5312	vt	paradižnik	EU_23_A1
SI1443	2014	9	17	Ljubljana	46,0187	14,5101	vt	paradižnik	neuspešno
SI1501	2015	5	13	Maribor	46,5458	15,6152	rastlinjak	paradižnik	neuspešno
SI1502	2015	5	21	Ljubljana	46,0952	14,5066	vt	paradižnik	SI_15_klon
SI1503	2015	6	3	Rašica	45,8561	14,6211	njiva	krompir	drugo
SI1504	2015	6	5	Bizovik	46,0418	14,5654	njiva	krompir	drugo
SI1505	2015	7	2	Vodice	46,1956	14,5130	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1506	2015	7	2	Vodice	46,1956	14,5130	njiva	krompir	EU_13_A2
SI1507	2015	7	2	Vodice	46,1956	14,5130	njiva	krompir	SI_14_klon1
SI1508	2015	7	3	Ljubljana	46,0367	14,5313	vt	krompir	EU_23_A1
SI1509	2015	7	6	Ljubljana	46,0367	14,5313	vt	paradižnik	EU_23_A1
SI1510	2015	8	26	Novo mesto	45,8134	15,1728	vt	paradižnik	EU_23_A1
SI1511	2015	8	26	Črna vas	46,0051	14,4825	vt	paradižnik	SI_15_klon
SI1512	2015	8	31	Suhadole	46,1871	14,5504	vt	paradižnik	SI_15_klon
SI1513	2015	9	1	Dvorska vas	46,3604	14,2009	vt	paradižnik	SI_15_klon
SI1514	2015	9	1	Struževo	46,2528	14,3425	vt	paradižnik	EU_23_A1
SI1515	2015	9	1	Struževo	46,2531	14,3421	vt	paradižnik	SI_15_klon
SI1516	2015	9	2	Dragomer	46,0176	14,3835	vt	paradižnik	EU_23_A1
SI1517	2015	9	3	Trnovlje	46,2507	15,2940	vt	paradižnik	SI_15_klon
SI1518	2015	9	3	Šetarova	46,5568	15,8321	vt	paradižnik	SI_15_klon

Številka vzorca	Datum vzorčenja			Lokacija vzorčenja	Zemljepisna širina (decimalne stopinje)	Zemljepisna dolžina (decimalne stopinje)	Rastišče	Gostitelj	Genotip
	Leto	Mesec	Dan						
SI1519	2015	9	4	Šmartno pri Litiji	46,0431	14,8425	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1520	2015	9	4	Šmartno pri Litiji	46,0431	14,8425	vrt	paradižnik	drugo
SI1521	2015	9	6	Hošnica	46,3367	15,5857	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1522	2015	9	6	Leše	46,0999	14,8849	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI1523	2015	9	10	Selšak	46,0379	14,8816	vrt	paradižnik	neuspešno
SI1524	2015	9	10	Cerovica	46,0377	14,8857	vrt	paradižnik	neuspešno
SI1525	2015	9	10	Cerovica	46,0378	14,8868	vrt	paradižnik	neuspešno
SI1526	2015	9	10	Cerovica	46,0377	14,8857	vrt	paradižnik	neuspešno
SI1527	2015	9	10	Cerovica	46,0378	14,8873	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1528	2015	9	13	Ljubljana	46,0185	14,5097	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1529	2015	9	15	Bizovik	46,0418	14,5654	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI1530	2015	9	17	Spodnji Brnik	46,2274	14,4852	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1531	2015	9	17	Cerklje	46,2528	14,4902	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1532	2015	9	17	Velesovo	46,2674	14,4533	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1533	2015	9	17	Primskovo	46,2480	14,3678	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1534	2015	9	17	Forme	46,1899	14,3237	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI1535	2015	9	17	Suha	46,1690	14,3318	rastlinjak	paradižnik	SI_15_klon
SI1536	2015	9	17	Preska pri Medvodah	46,1357	14,4156	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1537	2015	9	18	Količevo	46,1575	14,6096	vrt	paradižnik	neuspešno
SI1538	2015	9	17	Suha	46,1684	14,3320	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1539	2015	9	20	Ravne pri Zdolah	45,9975	15,5355	rastlinjak	paradižnik	SI_15_klon
SI1540	2015	9	27	Pijava gorica	45,9496	14,5705	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1541	2015	9	29	Znojile pri Krki	45,8892	14,7860	vrt	paradižnik	drugo
SI1542	2015	9	28	Preska pri Litiji	46,0432	14,9613	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1543	2015	10	5	Kranj	46,2393	14,3765	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1544	2015	10	5	Podbrezje	46,3066	14,2783	vrt	paradižnik	SI_15_klon
SI1545	2015	10	5	Ovsiše	46,2885	14,2519	vrt	paradižnik	neuspešno
SI1546	2015	10	12	Ljubljana	46,0609	14,519	vrt	paradižnik	EU_23_A1
SI1547	2015	10	12	Žeje	46,1949	14,5250	samosevec	krompir	SI_15_klon
SI1548	2015	10	12	Vodice	46,1953	14,5167	samosevec	krompir	SI_15_klon
SI1549	2015	10	14	Ljubljana	46,0621	14,5313	vrt	paradižnik	SI_15_klon

Žerjav M. Značilnosti populacije krompirjeve plesni ... v Sloveniji v obdobju med 2002 in 2015.  
Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2016

---