

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Eva BLATNIK

**PREUČEVANJE ODPORNOSTI KROMPIRJA  
(*Solanum tuberosum*) PROTI KROMPIRJEVI  
PLESNI (*Phytophthora infestans*), POSREDOVANE Z  
GENOM Rpi-Smira2**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2023

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Eva BLATNIK

**PREUČEVANJE ODPORNOSTI KROMPIRJA (*Solanum tuberosum*)  
PROTI KROMPIRJEVI PLESNI (*Phytophthora infestans*),  
POSREDOVANE Z GENOM Rpi-Smira2**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**STUDY OF THE LATE BLIGHT (*Phytophthora infestans*)  
RESISTANCE IN POTATO (*Solanum tuberosum*) MEDIATED BY  
GENE Rpi-Smira2**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2023

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 19. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 24. 9. 2019 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Vladimir Meglič.

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študija programa Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje in Oddelku za varstvo rastlin Kmetijskega inštituta Slovenije, na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo in Katedri za lesne škodljivce, zaščito in modifikacijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jernej JAKŠE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Kristina GRUDEN  
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: dr. Saša ŠIRCA  
Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin

Datum zagovora: 13. januar 2023

Eva BLATNIK

## IZJAVA O AVTORSTVU

Rezultati, predstavljeni v doktorski disertaciji, so bili pridobljeni pod mentorstvom izr. prof. dr. Vladimirja Megliča na Oddelku za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje in Oddelku za varstvo rastlin Kmetijskega inštituta Slovenije. Del raziskav je bilo opravljenih na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo in Katedri za lesne škodljivce, zaščito in modifikacijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Doktorska naloga je bila financirana s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije v okviru programa Mladi raziskovalci, št. pogodbe 1000-22-0401. Del doktorske naloge je bil izveden v okviru projekta ECOBREED: Increasing the efficiency and competitiveness of organic crop breeding (Grant Agreement 771367), financiran s strani programa Obzorje 2020.



Izjavljam, da so rezultati, predstavljeni v doktorski disertaciji, plod lastnega dela, razen za sledeče:

- prava semena krompirja, iz katerih smo pridobili rastlinski material za uporabo v raziskavah odpornosti krompirja na krompirjevo plesen v okviru doktorske naloge, so bila pridobljena z ročnim križanjem, ki so potekala na Kmetijskem inštitutu Slovenije v rastlinjaku Infrastrukturnega centra Jablje v letih 2016 in 2017 pod vodstvom dr. Petra Dolničarja;
- bakterijska kultura *Agrobacterium tumefaciens* Agl1+VirG, transformirana s praznim vektorjem pK7WG2 ali z vektorjem pK7WG2 z vstavljenim efektorskim genom *Avr4* (PITG\_07387), je bila poslana s strani prof. dr. Francine Govers (Laboratorij za fitopatologijo, Oddelek za znanost rastlin, Univerza v Wageningnu);
- izolati *P. infestans* IPO-C in 90128 so bili poslani s strani inž. Trudy van den Bosch (Biointerakcije in zdravje rastlin, Raziskave rastlin Wageningen, Univerza v Wageningnu).

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 633.49:631.526.32:631.524.86:632.4:601.4:577.21(043.3)
- KG krompir, krompirjeva plesen, *Phytophthora infestans*, gen *Rpi-Smira2/R8*, Sárpo Mira, genotipi *R8*, genski markerji, stopnja odpornosti, AUDPC, rastlinske tkivne kulture
- AV BLATNIK, Eva, mag. mol. in funk. bio.
- SA MEGLIČ, Vladimir (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija
- LI 2023
- IN PREUČEVANJE ODPORNOSTI KROMPIRJA (*Solanum tuberosum*) PROTI KROMPIRJEVI PLESNI (*Phytophthora infestans*), POSREDOVANE Z GENOM Rpi-Smira2
- TD Doktorska disertacija
- OP XIX, 179, [6] str., 10 pregl., 69 sl., 5 pril., 306 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Krompirjevo plesen povzroča oomiceta *Phytophthora infestans*, ki močno ogroža globalno pridelavo krompirja. Sorta Sárpo Mira velja za eno izmed bolj odpornih krompirjevih sort proti *P. infestans*, h kateri naj bi najbolj prispeval gen *Rpi-Smira2/R8*. Iz populacije F1 križancev, med petimi občutljivimi sortami in sorto Sárpo Mira, smo z genskimi markerji in efektorsko agroinfiltracijo izbrali deset genotipov *R8*, ki so vsebovali le gen *Rpi-Smira2/R8*, in jih izpostavili štirim različno agresivnim izolatom *P. infestans*, da pri preučili doprinos gena *Rpi-Smira2/R8* k stopnji odpornosti proti krompirjevi plesni. Genotipe *R8* smo, skupaj s pripadajočimi starševskimi sortami, inokulirali z izolati *P. infestans* na ravni tkivnih kultur in na ravni celih rastlin v rastlinjaku. Izmed testiranih genotipov *R8* je genotip C571 izražal najvišjo stopnjo odpornosti, ki je bila po inokulaciji s tujimi izolati *P. infestans* primerljiva s starševsko sorto Sárpo Mira. V primeru genotipa C571 se je stopnja odpornosti ohranila tako pri inokulaciji tkivnih kultur kot tudi pri inokulaciji celih rastlin v rastlinjaku, medtem ko je bila sorta Sárpo Mira na ravni tkivnih kultur srednje odporna proti agresivnim tujim izolatom, na ravni celih rastlin v rastlinjaku pa je bila nanje popolnoma odporna. Z raziskavami v okviru doktorske disertacije smo tako pokazali, da gen *Rpi-Smira2/R8* doprinese k stopnji odpornosti proti krompirjevi plesni, vendar je le-ta nižja v primerjavi s sorto Sárpo Mira in je pod vplivom genetskega ozadja.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 633.49:631.526.32:631.524.86:632.4:601.4:577.21(043.3)
- CX potato, late blight, *Phytophthora infestans*, *Rpi-Smira2/R8* gene, Sárpo Mira, *R8* genotypes, genetic markers, resistance level, AUDPC, plant tissue culture
- AU BLATNIK, Eva
- AA MEGLIČ, Vladimir (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific field Biotechnology
- PY 2023
- TI STUDY OF THE LATE BLIGHT (*Phytophthora infestans*) RESISTANCE IN POTATO (*Solanum tuberosum*) MEDIATED BY GENE *Rpi-Smira2*
- DT Doctoral dissertation
- NO XIX, 179, [6] p., 10 tab., 69 fig., 5 ann., 306 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Late blight is caused by the oomycete *Phytophthora infestans* and is a major threat to the global potato production. Sárpo Mira cultivar is considered to be highly resistant to *P. infestans*, to which the *Rpi-Smira2/R8* gene is said to contribute the most. From the population of F1 progeny, between five susceptible cultivars and Sárpo Mira cultivar, we selected ten *R8* genotypes containing only the *Rpi-Smira2/R8* gene using genetic markers and effector agroinfiltration, and exposed them to four *P. infestans* isolates differing in their aggressiveness, to evaluate the contribution of the *Rpi-Smira2/R8* gene to the late blight resistance level. *R8* genotypes, together with the corresponding parental varieties, were inoculated with *P. infestans* isolates as tissue cultures and as whole plants in the greenhouse. Among the tested *R8* genotypes, the highest level of resistance was shown by genotype C571, which was comparable to the parental variety Sárpo Mira after inoculation with foreign isolates of *P. infestans*. In the case of genotype C571, the level of resistance was maintained both in tissue culture inoculation and in inoculation of whole plants in the greenhouse, while the Sárpo Mira cultivar was moderately resistant to aggressive foreign isolates at the level of tissue cultures and completely resistant as a whole plant in the greenhouse. With the research conducted in the scope of the doctoral dissertation, we have shown that the *Rpi-Smira2/R8* gene contributes to late blight resistance, however the level of resistance is lower compared to the Sárpo Mira cultivar and under influence of the genetic background.

## KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	IV
	KEY WORDS DOCUMENTATION .....	V
	KAZALO VSEBINE.....	VI
	KAZALO PREGLEDNIC.....	XI
	KAZALO SLIK.....	XII
	KAZALO PRILOG .....	XVI
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XVII
<b>1</b>	<b>UVOD S PREDSTAVITVIJO PROBLEMATIKE IN HIPOTEZ.....</b>	<b>1</b>
1.1	RAZISKOVALNI CILJI IN HIPOTEZE.....	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1	OOMICETA <i>Phytophthora infestans</i> .....	4
2.1.1	Taksonomska uvrstitev oomicete <i>P. infestans</i> .....	5
2.1.2	Življenjski cikel in razmnoževanje oomicete <i>P. infestans</i> .....	6
2.1.3	Izvor in širjenje oomicete <i>P. infestans</i> po svetu .....	9
2.2	INTERAKCIJA <i>P. infestans</i> Z RASTLINSKIM IMUNSKIM SISTEMOM. 11	
2.3	KROMPIR ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	16
2.3.1	Pridelava in prehranska vsebnost krompirja .....	16
2.3.2	Izvor, uvrstitev in udomačitev krompirja.....	17
2.3.2	Razvoj žlahtnjenja krompirja .....	18
2.3.4	Žlahtnjenje krompirjevih sort z odpornostjo proti krompirjevi plesni – vzpon genov <i>R</i> .....	20
2.3.5	Žlahtnjenje krompirjevih sort z odpornostjo proti krompirjevi plesni – padec genov <i>R</i> .....	22
2.3.6	Piramidenje genov <i>R</i> in razvoj sodobnih molekularskih tehnik.....	25
2.3.7	Razvoj in raziskave na sorti Sárpo Mira z visoko odpornostjo proti krompirjevi plesni .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>32</b>
3.1	RASTLINSKI MATERIAL .....	32
3.1.1	Ročna križanja in pridobitev pravih semen krompirja.....	32
3.1.2	Vzgoja križancev v rastlinjaku .....	33
3.1.3	Odbira genotipov <i>R8</i> iz populacije F1 križancev z genskimi markerji .....	36
3.1.3.1	Izolacija molekul DNA .....	36

3.1.3.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) z markerji za gene <i>R3a</i> , <i>R3b</i> , <i>Rpi-Smira1</i> in <i>Rpi-Smira2/R8</i> .....	37
3.1.4	<b>Odbira genotipov <i>R8</i> iz populacije F1 križancev z efektorsko agroinfiltracijo</b> .....	39
3.1.5	<b>Vnos genotipov <i>R8</i> v tkivne kulture in vzdrževanje</b> .....	41
3.2	<b>VZDRŽEVANJE OOMICETE <i>Phytophthora infestans</i> IN PRIPRAVA INOKULUMA</b> .....	43
3.2.1	<b>Gojenje micelija <i>P. infestans</i></b> .....	43
3.2.2	<b>Pridobivanje zoospor oomicete <i>P. infestans</i></b> .....	44
3.2.3	<b>Optimizacija vzbuditve virulence oomicete <i>P. infestans</i></b> .....	45
3.2.3.1	Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo odrezanih krompirjevih listov	45
3.2.3.2	Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo rezin krompirjevih gomoljev .	46
3.2.3.3	Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo krompirjevih rastlin v tkivni kulturi .....	49
3.3	<b>TESTIRANJE ODPORNOSTI GENOTIPOV <i>R8</i> NA KROMPIRJEVO PLESEN</b> .....	50
3.3.1	<b>Inokulacija celih rastlin genotipov <i>R8</i> in starševskih sort s <i>P. infestans</i> v rastlinjaku</b> .....	50
3.3.1.1	Ohranjanje visoke zračne vlage z meglilnim sistemom .....	50
3.3.1.2	Ohranjanje visoke zračne vlage z zavijanjem rastlin v plastične vreče .....	51
3.3.1.2.1	Statistična analiza pridobljenih podatkov.....	53
3.3.2	<b>Inokulacija odrezanih listov genotipov <i>R8</i> in starševskih sort s <i>P. infestans</i></b> .....	53
3.3.2.1	Testiranje različnih načinov površinske sterilizacije listov.....	53
3.3.2.2	Metoda DLA z odrezanimi listi v pladnjih.....	54
3.3.2.3	Metoda DLA na lističih v petrijevkah z vodnim agarjem.....	56
3.3.3	<b>Inokulacija tkivnih kultur genotipov <i>R8</i> in starševskih sort s <i>P. infestans</i></b>	56
3.3.3.1	Priprava rastlin in inokuluma ter postopek inokulacije.....	56
3.3.3.2	Statistična analiza pridobljenih podatkov.....	57
3.4	<b>IZRAŽANJE GENA <i>Rpi-Smira2/R8</i> V GENOTIPIH C419 IN C571 PO OKUŽBI S <i>P. infestans</i></b> .....	59
3.4.1	<b>Inokulacija genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira s <i>P. infestans</i></b> .....	59
3.4.2	<b>Izolacija molekul RNA</b> .....	59
3.4.3	<b>Razgradnja genomske DNA in reverzna transkripcija</b> .....	60
3.4.4	<b>Reakcija PCR v realnem času</b> .....	61



3.5	IDENTIFIKACIJA IN IZVOR KONTAMINACIJ .....	62
3.5.1	<b>Odprte petrijevke z gojiščem PDA v rastlinjaku in rastnih komorah .....</b>	<b>62</b>
3.5.2	<b>Odtisi nerazkuženih lističev na trdna gojišča PDA.....</b>	<b>63</b>
3.5.3	<b>Odtisi površinsko steriliziranih lističev na trdna gojišča PDA .....</b>	<b>63</b>
4	<b>REZULTATI .....</b>	<b>65</b>
4.1	ROČNA KRIŽANJA IN PRIDOBITEV PRAVIH SEMEN KROMPIRJA ...	65
4.2	ODBIRA GENOTIPOV <i>R8</i> IZ POPULACIJE F1 KRIŽANCEV .....	65
4.2.1	<b>Odbira genotipov <i>R8</i> z genskimi markerji.....</b>	<b>65</b>
4.2.2	<b>Selekcija z efektorsko agroinfiltracijo.....</b>	<b>66</b>
4.3	OPTIMIZACIJA VZBUDITVE VIRULENCE <i>P. infestans</i> .....	69
4.3.1	<b>Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo odrezanih krompirjevih listov.....</b>	<b>70</b>
4.3.2	<b>Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo rezin krompirjevih gomoljev .....</b>	<b>71</b>
4.3.3	<b>Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo tkivnih kultur .....</b>	<b>73</b>
4.4	TESTIRANJE ODPORNOSTI GENOTIPOV <i>R8</i> NA KROMPIRJEVO PLESEN .....	74
4.4.1	<b>Inokulacija celih rastlin genotipov <i>R8</i> in starševskih sort s <i>P. infestans</i> v rastlinjaku .....</b>	<b>74</b>
4.4.1.1	Ohranjanje visoke zračne vlage z meglilnim sistemom .....	74
4.4.2	<b>Inokulacija odrezanih listov genotipov <i>R8</i> in starševskih sort s <i>P. infestans</i> .....</b>	<b>76</b>
4.4.2.1	Testiranje razkuževanja listov za DLA .....	76
4.4.2.2	Metoda DLA z odrezanimi listi v pladnjih.....	77
4.4.2.3	Metoda DLA na lističih v petrijevkah z vodnim agarjem .....	81
4.4.3	<b>Inokulacija tkivnih kultur genotipov <i>R8</i> in starševskih sort s <i>P. infestans</i> .....</b>	<b>88</b>
4.4.3.1	Razlike v agresivnosti izolatov <i>P. infestans</i> .....	90
4.4.3.2	Odpornost genotipov <i>R8</i> na krompirjevo plesen v primerjavi s starševskimi sortami .....	91
4.4.4	<b>Ohranjanje visoke zračne vlage z zavijanjem rastlin v plastične vreče ....</b>	<b>99</b>
4.5	IZRAŽANJE GENA <i>Rpi-Smira2/R8</i> .....	106
4.6	IDENTIFIKACIJA IN IZVOR KONTAMINACIJ .....	108
4.6.1	<b>Odprte petrijevke z gojiščem PDA v rastlinjaku in rastnih komorah ....</b>	<b>108</b>
4.6.2	<b>Odtisi nerazkuženih lističev genotipov C419, C571 in starševskih sort Colomba in Sárpo Mira na trdna gojišča PDA .....</b>	<b>109</b>

4.6.3	Odtisi površinsko steriliziranih lističev na trdna gojišča PDA .....	111
5	RAZPRAVA.....	112
5.1	ROČNA KRIŽANJA IN ODBIRA GENOTIPOV R8 IZ POPULACIJE F1 KRIŽANCEV .....	112
5.1.1	Odbira genotipov R8 iz populacije F1 križancev z genskimi markerji...	112
5.1.2	Odbira genotipov R8 iz populacije F1 križancev z efektorsko agroinfiltracijo .....	113
5.2	OPTIMIZACIJA VZBUDITVE VIRULENCE OOMICETE <i>P. infestans</i> ....	114
5.2.1	Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo odrezanih krompirjevih listov .....	115
5.2.2	Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo rezin krompirjevih gomoljev .....	115
5.2.3	Vzbuditev virulence <i>P. infestans</i> z inokulacijo krompirjevih rastlin v tkivni kulturi .....	117
5.3	DOPRINOS GENA <i>Rpi-Smira2/R8</i> K ODPORNOSTI PROTI KROMPIRJEVI PLESNI .....	118
5.3.1	Odpornostni odziv genotipov R8 v tkivni kulturi.....	118
5.3.1.1	Razlike v agresivnosti izolatov <i>P. infestans</i> .....	121
5.3.1.2	Odpornost genotipov R8 na krompirjevo plesen v primerjavi s starševskimi sortami .....	125
5.3.1	Odpornostni odziv celih rastlin genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira v rastlinjaku.....	128
5.4	PRIMERJAVA DOPRINOSA GENA <i>Rpi-Smira2/R8</i> MED RAZLIČNIMI POGOJI INOKULACIJE .....	130
5.5	IZRAŽANJE GENA <i>Rpi-Smira2/R8</i> .....	135
5.6	INOKULACIJE GENOTIPOV R8 V RASTLINJAKU IN NA ODREZANIH LISTIH Z OOMICETO <i>P. infestans</i> .....	136
5.6.1	Inokulacija genotipov R8 in starševskih rastlin na ravni celih rastlin v rastlinjaku s <i>P. infestans</i> .....	136
5.6.2	Inokulacija odrezanih krompirjevih listov genotipov R8 in starševskih rastlin s <i>P. infestans</i> .....	136
5.6.3	Izvor kontaminacij .....	140
6	SKLEPI .....	144
7	POVZETEK (SUMMARY).....	147
7.1	POVZETEK .....	147
7.2	SUMMARY .....	150
8	VIRI .....	153

ZAHVALA

PRILOGE

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni genski markerji za selekcijo križancev <i>R8</i> z nukleotidnimi zaporedji začetnih oligonukleotidov, temperaturo prileganja ( $T_a$ ), dolžinami pomnoženih fragmentov in uporabljeni PCR reagenti .....	37
Preglednica 2: Reagenti Kapa3G Plant, uporabljeni v 15 $\mu$ l reakciji PCR .....	38
Preglednica 3: Reagenti Biotools, uporabljeni v 14,5 $\mu$ l reakciji PCR .....	38
Preglednica 4: Podatki o izolatih <i>P. infestans</i> , uporabljeni za inokulacijo genotipov <i>R8</i> .....	43
Preglednica 5: Reagenti, uporabljeni za pripravo reakcijske mešanice (Master Mix) za reverzno transkripcijo .....	61
Preglednica 6: Reagenti, uporabljeni za pripravo posamezne 10 $\mu$ l reakcije PCR v realnem času .....	62
Preglednica 7: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sonde za spremljanje izražanja gena <i>Rpi-Smira2/R8</i> v reakciji PCR v realnem času .....	62
Preglednica 8: Število pridobljenih pravih semen in število vzklilih rastlin za posamezno križanje .....	65
Preglednica 9: Povprečne ocene simptomov za vse genotipe <i>R8</i> in starševske sorte, razdeljene po križanjih, za vse štiri izolate <i>P. infestans</i> .....	92
Preglednica 10: Vrednosti POS genotipov C419, C571 in starševskih sort Colomba, Sárpo Mira po inokulaciji s štirimi izolati <i>P. infestans</i> v rastlinjaku .	103

## KAZALO SLIK

Slika 1: Biotrofični, nekrotrofični in hemibiotrofični življenjski cikel oomicet rodu <i>Phytophthora</i> (Fawke in sod., 2015).....	6
Slika 2: Nespolno razmnoževanje oomicete <i>P. infestans</i> (Fry, 2008) .....	8
Slika 3: Potek okužbe rastlinskega tkiva z oomiceto <i>P. infestans</i> (Judelson in Blanco, 2005) .....	9
Slika 4: Shematski prikaz rastlinskega imunskega sistema (»Cik-Cak« model) (Jones in Dangl, 2006) .....	12
Slika 5: Aktivacija proteinov R (Takken in Tameling, 2009).....	14
Slika 6: Herbarijski primerek divje vrste krompirja <i>Solanum demissum</i> (levo) in v naravnem okolju (desno) ( <i>Solanum Demissum</i> , 2022).....	21
Slika 7: Sajenje krompirjevih gomoljev na opeko v rastlinjaku KIS v Infrastruktornem centru Jablje .....	32
Slika 8: Postopek ročnega križanja in pridobivanja pravega semena krompirja.....	33
Slika 9: Vzgoja križancev v rastlinjaku.....	34
Slika 10: Postopek priprave krompirjevih potaknjencev .....	35
Slika 11: Gojenje bakterijske kulture <i>Agrobacterium tumefaciens</i> na trdnem (A) in v tekočem gojišču YEB (B) .....	40
Slika 12: Priprava odrezanih krompirjevih listov (A), primer zarez na posameznih lističih (B) in infiltracija bakterijske suspenzije <i>A. tumefaciens</i> na odrezanih listih (C) .....	41
Slika 13: Postopek vnosa genotipov <i>R8</i> v tkivne kulture.....	42
Slika 14: Sajenje tkivnih kultur genotipov <i>R8</i> v posamezne lonce v rastlinjak .....	43
Slika 15: Gojenje oomicete <i>Phytophthora infestans</i> na trdnem gojišču Rye-A in v viali s trdnim gojiščem Rye-A za trajno shranjevanje .....	44
Slika 16: Pridobivanje suspenzije zoospor <i>P. infestans</i> .....	44
Slika 17: Vzбудitev virulence <i>P. infestans</i> z uporabo odrezanih krompirjevih listov..	46
Slika 18: Vzбудitev virulence <i>P. infestans</i> z uporabo rezin krompirjevih gomoljev ...	48
Slika 19: Vzбудitev virulence <i>P. infestans</i> z uporabo krompirjeve sorte Dobrin v tkivni kulturi .....	49
Slika 20: Uporaba PVC vreč za vzdrževanje visoke relativne zračne vlage po inokulaciji genotipov <i>R8</i> in starševskih sort s <i>P. infestans</i> v rastlinjaku .....	52
Slika 21: Lestvica za ocenjevanje simptomov krompirjeve plesni na celih rastlinah (Cruickshank in sod., 1982) .....	52
Slika 22: Priprava odrezanih krompirjevih listov za testiranje različnih načinov površinske sterilizacije.....	54

Slika 23: Priprava odrezanih krompirjevih listov genotipov R8 in starševskih sort za testiranje odpornosti proti <i>P. infestans</i> .....	55
Slika 24: Inokulacija posameznih lističev s <i>P. infestans</i> v petrijevkah z vodnim agarjem .....	56
Slika 25: Inokulacija tkivnih kultur genotipov R8 in starševskih sort s <i>P. infestans</i> ....	57
Slika 26: Priprava posameznih nerazkuženih krompirjevih lističev za odtise na trdna gojišča PDA .....	63
Slika 27: Površinska sterilizacija krompirjevih lističev za odtis na trdna gojišča PDA	64
Slika 28: Primeri rezultatov agarozne elektroforeze .....	66
Slika 29: Poškodbe na listnem tkivu, nastale na mestih agroinfiltracije, opravljene na celih krompirjevih rastlinah .....	67
Slika 30: Reprezentativni rezultati agroinfiltracije efektorja <i>Avr4</i> .....	68
Slika 31: Produkti pomnoževanja genov <i>R3b</i> (A), <i>R3a</i> (B), <i>Rpi-Smira1</i> (C) in <i>Rpi-Smira2/R8</i> (D) v genotipih R8 in pripadajočih starševskih sort Rioja, Lusa, Colomba, Sylvana in Sárpo Mira.....	69
Slika 32: Vzбудitev virulence <i>P. infestans</i> z uporabo odrezanih krompirjevih listov – pomanjkljivosti .....	70
Slika 33: Testiranje treh različnih metod površinske sterilizacije krompirjevih gomoljev (A) in pojav kontaminacij (B in C).....	72
Slika 34: Vzбудitev virulence <i>P. infestans</i> z uporabo rezin krompirjevih gomoljev – pomanjkljivosti .....	73
Slika 35: Razraščeni virulentni micelij <i>P. infestans</i> po prenosu preraščenih listov sorte Dobrin v tkivni kulturi na trdna gojišča Rye-A <sup>+</sup> .....	74
Slika 36: Simptomi krompirjeve plesni na listih rastlin, inokuliranih v rastlinjaku po 4 dneh (A), po 6 dneh (B in C) ter 8 dneh (D).....	75
Slika 37: Učinkovitost različnih metod površinske sterilizacije odrezanih krompirjevih listov po enem tednu .....	77
Slika 38: Hipersenzitivni odziv na listnem tkivu po dveh dneh po inokulaciji <i>P. infestans</i> , viden pod stereomikroskopom.....	78
Slika 39: Primeri simptomov krompirjeve plesni na odrezanih krompirjevih listih po 3 dneh (A in B), po 5 dneh (C in D) ter 6 dneh (E in F) po inokulaciji s <i>P. infestans</i> .....	78
Slika 40: Pojav kontaminacij znotraj inokulacijskih točk po inokulaciji odrezanih krompirjevih listov s <i>P. infestans</i> .....	79
Slika 41: Pojav neželenih gliv znotraj inokulacijskih točk na odrezanih krompirjevih listih.....	80
Slika 42: Pojav kontaminacij znotraj inokulacijskih točk po 2 dneh (A in B), po 3 dneh (C) in 6 dneh (D in E) po inokulaciji posameznih odrezanih lističev v petrijevkah z vodnim agarjem.....	82

Slika 43: Inokulacija posameznih odrezanih krompirjevih lističev s <i>P. infestans</i> v petrijevkah brez vodnega agarja .....	83
Slika 44: Širjenje simptomov krompirjeve plesni od 1. dneva po inokulaciji (dpi) do 6. dneva po inokulaciji (dpi) na posameznih odrezanih lističih v petrijevkah brez vodnega agarja .....	83
Slika 45: Primeri simptomov krompirjeve plesni po inokulaciji posameznih odrezanih lističev s <i>P. infestans</i> v petrijevkah brez vodnega agarja.....	84
Slika 46: Priprava posameznih odrezanih lističev za inokulacijo s <i>P. infestans</i> v petrijevkah s koščki vodnega agarja .....	85
Slika 47: Primeri simptomov krompirjeve plesni po inokulaciji posameznih odrezanih lističev s <i>P. infestans</i> v petrijevkah s koščki vodnega agarja.....	86
Slika 48: Pojav kontaminacij znotraj inokulacijskih točk po inokulaciji posameznih odrezanih lističev s <i>P. infestans</i> v petrijevkah s koščki vodnega agarja.....	87
Slika 49: Lestvica simptomov krompirjeve plesni za ocenjevanje širjenja in razvoja <i>P. infestans</i> v tkivni kulturi .....	89
Slika 50: Vrednosti ploščin pod krivuljo razvoja bolezni (AUDPC) za vsak inokuliran izolat <i>P. infestans</i> (02_07, 09_07, 90128 in IPO-C).....	90
Slika 51: Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni v osmih dneh po inokulaciji s štirimi različnimi izolati <i>P. infestans</i> za skupino Rioja .....	93
Slika 52: Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni v osmih dneh po inokulaciji s štirimi različnimi izolati <i>P. infestans</i> za skupino Lusa .....	95
Slika 53: Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni v osmih dneh po inokulaciji s štirimi različnimi izolati <i>P. infestans</i> za skupino Colomba .....	96
Slika 54: Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni v osmih dneh po inokulaciji s štirimi različnimi izolati <i>P. infestans</i> za skupino Sylvana .....	98
Slika 55: Simptomi krompirjeve plesni, micelij ter sporangiji <i>P. infestans</i> po inokulaciji celih rastlin genotipov C419 in C571 ter starš. sort Colomba in Sárpo Mira v rastlinjaku po enem tednu .....	100
Slika 56: Reprezentativne slike celih krompirjevih rastlin s simptomi krompirjeve plesni po inokulaciji s <i>P. infestans</i> v rastlinjaku.....	101
Slika 57: Potrjena uspešna okužba vseh štirih izolatov <i>P. infestans</i> , 02_07 (A), 09_07 (B), 90128 (C) in IPO-C (D), po inokulaciji celih krompirjevih rastlin genotipov C419 in C571 ter starš. sort Colomba in Sárpo Mira v rastlinjaku .....	102
Slika 58: Povprečne ocene simptomov genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira po inokulaciji z izolati 02_07, 09_07, 90128 in IPO-C .....	103
Slika 59: Primera hipersenzitivnega odziva na genotipu C419 po inokulaciji z izolatom 02_07 (A) in na starševski sorti Sárpo Mira po inokulaciji z izolatom 09_07 (B) na ravni celih krompirjevih rastlin v rastlinjaku.....	104

Slika 60: Primeri simptomov krompirjeve plesni na starš. sorti Colomba po inokulaciji z izolatom 02_07 (A in B), na genotipu C419 po inokulaciji z izolatom 09_07 (C) ter na genotipu C571 po inokulaciji z izolatom 90128 (D) na ravni celih krompirjevih rastlin v rastlinjaku.....	104
Slika 61: Kontaminacije, vidne s prostim očesom na celih krompirjevih rastlinah inokuliranih s <i>P. infestans</i> v rastlinjaku.....	105
Slika 62: Kontaminacije, opažene pod stereomikroskopom po inokulaciji celih krompirjevih rastlin v rastlinjaku s <i>P. infestans</i> .....	106
Slika 63: Krivulje pomnoževanja gena <i>Rpi-Smira2/R8</i> z reakcijo PCR v realnem času v vzorcih genotipa C571 v času $t_0$ (A) in $t_2$ (B), v vzorcih starš. sorte Sárpo Mira v času $t_0$ (C) in $t_2$ (D) ter v vzorcih starš. sorte Colomba v času $t_0$ (E) in $t_2$ (F) .....	107
Slika 64: Zrastle kolonije gliv na trdnih gojiščih PDA, postavljene v rastlinjaku .....	108
Slika 65: Zrastle kolonije gliv rodu <i>Cladosporium</i> na trdnih gojiščih PDA, postavljene v rastni komori IZR.....	109
Slika 66: Zrastle kolonije gliv rodu <i>Penicillium</i> na trdnih gojiščih PDA, postavljene v rastni komori BINDER .....	109
Slika 67: Odtisi zgornje (leva petrijevka) in spodnje (desna petrijevka) strani lističev genotipov C419 in C571 ter starš. sort Colomba in Sárpo Mira, nabranih iz krompirjevih rastlin, gojenih v rastlinjaku, pred inokulacijo z inokulumom <i>P. infestans</i> .....	110
Slika 68: Pregled zrastle kolonij gliv na trdnih gojiščih PDA po odtisih lističev pod stereomikroskopom.....	110
Slika 69: Učinkovitost različnih metod površinske sterilizacije krompirjevih lističev glede na zrastle kolonije gliv po odtisu površinsko steriliziranih lističev na trdna gojišča PDA .....	111



## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Priprava gojišča s kvasnim in govejim ekstraktom (Yeast Extract Beef – YEB) za gojenje bakterije *Agrobacterium tumefaciens*
- PRILOGA B: Priprava gojišča N za tekoče vzdrževanje tkivnih kultur
- PRILOGA C: Priprava rženega gojišča Rye-A za gojenje oomicete *P. infestans*
- PRILOGA D: Priprava rženega gojišča Rye-A<sup>+</sup> z antibiotiki za gojenje virulentne oomicete *P. infestans*
- PRILOGA E: Priprava splošnega gojišča s krompirjevo dekstrozo (Potato Dextrose Agar – PDA) z antibiotikom za odtise krompirjevih lističev

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

18S	18S rRNA
ADP	adenozindifosfat
AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženega fragmenta, ang. amplified fragment length polymorphism
ATP	adenozintrifosfat
AVV	avtoklavirana vodovodna voda
AUDPC	ploščina pod krivuljo razvoja bolezni, ang. area under the disease progress curve
bp	bazni par
Ca <sup>2+</sup>	kalcijev ion
CAPS	razrezane pomnožene polimorfne sekvence, ang. cleaved amplified polymorphic sequences
cDNA	komplementarna DNA
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dH <sub>2</sub> O	deionizirana voda
DLA	test odrezanih listov, ang. detached leaf assay
dNTP	deoksinukleotid fosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ETI	z efektorji sprožena imunost, ang. effector triggered immunity
ETS	zaviranje imunskega sistema z efektorji, ang. effector triggered suppression
F	vodilni začetni oligonukleotid, ang. forward primer
F1	prva generacija križancev
gen R	odpornostni gen
gen <i>Rpi</i>	odpornostni gen proti <i>P. infestans</i>
GSO	gensko spremenjeni organizmi
GTP	gvanozintrifosfat
HR	hipersenzitivni odziv
LRR	z levcini bogata ponavljajoča domena
MAMPs	z mikrobi povezani molekularni motivi, ang. microbial associated molecular patterns
MAPK	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza, ang. mitogen-activated protein kinase
MAS	selekcija z genskimi markeji, ang. marker-assisted selection

MES	2-morfolinoetansulfonska kislina
MgCl <sub>2</sub>	magnezijev klorid
N	gojišče N za gojenje tkivnih kultur
NAA	α-naftalenocetna kislina
NaOCl	natrijev hipoklorid
NaOH	natrijev hidroksid
NB	nukletid-vezavna domena
NB-LRR	razred proteinov R
NTC	kontrola brez matrice, ang. non-template control
OD <sub>600</sub>	optična gostota pri 600 nm
PAMPs	s patogeni povezani molekularni motivi, ang. pathogen associated molecular patterns
PCR	verižna reakcija s polimerazo, ang. polymerase chain reaction
PDA	gojišče s krompirjevo dekstrozo
Pi	fosfat
PLRV	virus zvijanja krompirjevih listov
POS	povprečna ocena simptomov
protein R	odpornostni protein
PRR	motiv-prepoznavni receptorji, ang. pattern recognition receptors
PTI	s patogeno sprožena imunost, ang. pathogen triggered immunity
PVC	polivinil klorid
PVX	krompirjev virus X
PVY	krompirjev virus Y
QTL	lokus kvantitativne lastnosti, ang. quantitative trait locus
R	povratni začetni oligonukleotid, ang. reverse primer
RAPD	naključno pomnožena polimorfna DNA, ang. randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov, ang. restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonukleinska kislina
RNaza	encim za razgradnjo molekul RNA
RNAi	interferenčna RNA
rRNA	ribosomalna RNA
ROS	reaktivne kisikove spojine, ang. reactive oxygen species

RXLR	motiv aminokislinskega zaporedja arginin, neznana aminokislina, levcin, arginin
Rye-A	rženo gojišče A
Rye-A <sup>+</sup>	rženo gojišče A z antibiotiki
Rye-B	rženo gojišče B
SCAR	s sekvenco okarakterizirane pomnožene regije, ang. sequence characterized amplified region
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida, ang. single nucleotide polymorphism
SSR	enostavne ponovljive sekvence, ang. simple sequence repeats
T <sub>a</sub>	temperatura prileganja začetnih oligonukletidov
Tris-EDTA	raztopina Tris-HCl in EDTA
Tris-HCl	tris(hidroksimetil)aminometan in hidrokloridna kislina
WGS	sekvenciranje celotnega genoma, ang. whole-genome shotgun sequencing
YEB	gojišče s kvasnim in govejim ekstraktom

## 1 UVOD S PREDSTAVITVIJO PROBLEMATIKE IN HIPOTEZ

Krompir je bil po prenosu iz Južne Amerike v Evropo najprej obravnavan le kot eksotičen primerek rastline Novega sveta in je večinoma rasel le v botaničnih vrtovih in zasebnih zbirkah (Turner, 2005). Zaradi svoje visoke energijske vrednosti in relativno enostavne pridelave je kmalu postal zelo cenjena poljščina, danes pa se ga prideluje praktično po celem svetu (Bradshaw, 2021). Skupaj z evolucijskim razvojem krompirja, kot ga poznamo danes, je sočasno na izvornem območju v Južni in centralni Ameriki potekal tudi razvoj oomicete *Phytophthora infestans*, ki se je specializirala posebej za okuževanje rastlin iz družine razhudnikovk (Goss in sod., 2014).

Oomiceta *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary povzroča škodo v krompirjevih nasadih že vse od vnosa v Evropo in velike lakote na Irskem pred več kot 150 leti. Kot hemibiotrofični organizem lahko uspešno prodre v rastlinsko tkivo in z izločanjem efektorskih proteinov poskuša zaobiti rastlinski imunski sistem (Fawke in sod., 2015). S stalnim razvojem in modifikacijami odpornostnih (R) proteinov se lahko rastlina obrani pred širjenjem *P. infestans* in s hipersenzitivnim odzivom, obliko programirane celične smrti, popolnoma zaustavi patogen na lokalni ravni (Birch in sod., 2012). Od prvega odkritja odpornostnih (R) genov v divji vrsti krompirja *S. demissum* so se žlahtnitelji krompirja povsem osredotočili na prenos genov *R* iz divjih sorodnikov krompirja v nove krompirjeve sorte. Sprva je bila strategija uspešna in na trg so kmalu prišle nove odporne sorte, ki so se hitro razširile po Evropi in so imele visok potencial za trajno odpornost. Kmalu se je izkazalo ravno nasprotno, saj je bila odpornost, posredovana le z enim genom *R*, v nekaj letih povsem premagana in žlahtniteljski programi so kmalu izgubili prvoten zagon za razvijanje trajno odpornih sort (Turner, 2005). V mnogih predelih, ki jih je pestila krompirjeva plesen, so kot najbolj učinkovito strategijo zatiranja bolezni predstavljali sistemski fungicidi, ki jih je bilo potrebno nanašati precej pogosto, za sabo pa je to prineslo tako zajeten finančni zalogaj kot tudi obsežne posledice na okolje in zdravje ljudi (Ivanov in sod., 2021).

Žlahtniteljski programi so proti koncu prejšnjega stoletja pričeli z novo strategijo razvoja trajno odpornih krompirjevih sort. Poleg vključevanja t. i. poljske odpornosti širokega spektra iz divjih sorodnikov krompirja, ki je bila posredovana s kvantitativnimi lokusi (QTL) in zaradi česar je bil proces dolgotrajen in počasen, so žlahtnitelji pričeli tudi z vključevanjem več genov *R* v posamezno sorto oz. piramidenjem genov *R* (Turner, 2005). S to strategijo je v zadnjih tridesetih letih nastalo več različnih visoko odpornih krompirjevih sort, nekatere med njimi pa še danes izražajo visoko stopnjo odpornosti proti krompirjevi plesni.

Sorta Sárpo Mira je tako že od njenega nastanka pred tridesetimi leti poznana in uporabljena kot vir visoke odpornosti tudi proti zelo agresivnim izolatom *P. infestans*, ki

so se pričeli pojavljati proti koncu prejšnjega stoletja zaradi povečanega spolnega razmnoževanja oomicete. Kljub pogosti uporabi sorte Sárpo Mira (Abuley in Hansen, 2022) o izvoru in mehanizmu odpornosti proti krompirjevi plesni ni veliko znanega. Prvi preboj se je zgodil z raziskavo Rietman in sod., (2012), kjer so uspeli določiti vsebnost petih genov *R*, in sicer *R3a*, *R3b*, *R4*, *Rpi-Smira1* in *Rpi-Smira2*, za katerega je bilo kasneje dokazano, da gre za homolog bolj razširjenega gena *R8* (Jo, 2014). Glede na rezultate raziskav odpornosti diferencialnih rastlin z genom *R8* (*MaR8*), križancev in transgenih rastlin z genom *R8*, ki so v poljskih poskusih izražali primerljivo stopnjo odpornosti proti krompirjevi plesni kot sorta Sárpo Mira (Kim in sod., 2012; Rietman in sod., 2012; Vossen in sod., 2016), so žlahtnitelji in raziskovalci sklepali, da gen *Rpi-Smira2/R8* najbolj doprinese k visoki odpornosti sorte Sárpo Mira.

Raziskave o mehanizmu odpornosti sorte Sárpo Mira so pokazale tudi, da se stopnja odpornosti razlikuje glede na način inokulacije s *P. infestans*. V poljskih poskusih je bila sorta Sárpo Mira popolnoma odporna na agresiven izolat IPO-C, medtem ko je bila v testih na odrezanih listih občutljiva na *P. infestans* (Rietman in sod., 2012). Raziskovalci Orłowska in sod., (2012a) so želeli to razliko v stopnji odpornosti dodatno ovrednotiti in opredeliti, zato so sorto Sárpo Mira inokulirali s *P. infestans* na različne načine (cela rastlina, rastlina brez vrhnjega poganjka, rastlina brez korenin, odrezani listi in odrezani listi s stranskim poganjkom) ter ugotovili, da so meristemi in koreninski sistem ključni za odpornost sorte Sárpo Mira proti krompirjevi plesni, saj je le cela rastlina izražala polno odpornost.

V okviru doktorske disertacije nas je zanimal doprinos gena *Rpi-Smira2/R8* k odpornosti proti krompirjevi plesni, zato smo morali predhodno pridobiti krompirjeve rastline, ki bi izmed petih genov *R* iz odporne sorte Sárpo Mira vsebovali le gen *Rpi-Smira2/R8* ter jih nato izpostavili različno agresivnim izolatom *P. infestans*. Zanimalo nas je, ali se bodo te rastline (genotipi *R8*) med sabo razlikovale v stopnji odpornosti glede na to, da vsebujejo isti odpornostni gen. Poleg tega pa nas je tudi zanimalo, ali se bo stopnja odpornosti genotipov *R8* ohranila med različnimi načini inokulacije s *P. infestans* glede na to, da starševska sorta Sárpo Mira visoko stopnjo odpornosti izraža le na ravni celih rastlin.

## 1.1 RAZISKOVALNI CILJI IN HIPOTEZE

V doktorski nalogi smo zastavili naslednje raziskovalne hipoteze:

- 1) Rastline *R8*, razvite iz križanja med odporno sorto Sárpo Mira in občutljivimi sortami, bodo izražale odpornost proti oomiceti *Phytophthora infestans*. Zaradi različnega genskega ozadja križancev in razlik v ekspresiji gena *R8* bo prišlo do razlik v intenziteti odpornosti.

- 2) Rastline *R8* bodo izražale manjši nivo odpornosti v primerjavi s starševskim genotipom Sárpo Mira. Zaradi križanja z občutljivimi sortami in odsotnosti ostalih *R* genov bodo rastline *R8* izražale nižjo odpornost v primerjavi s Sárpo Miro kljub veliki vlogi gena *R8* pri odpornosti.
  
- 3) Odpornost rastlin *R8* se bo razlikovala glede na pogoje, pod katerimi bomo okuževali rastline s krompirjevo plesnijo; test odrezanih listov, cele rastline v rastlinjaku, poljski poskusi. Starševska rastlina Sárpo Mira svojo odpornost izraža le na nivoju cele rastline, saj meristemi in korenine prispevajo k sistemski odpornosti. Pričakujemo, da se bo ta lastnost s starševske rastline prenesla na potomce.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OOMICETA *Phytophthora infestans*

Oomiceta *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary je rastlinski patogen, ki povzroča bolezen, poimenovano krompirjeva plesen, in je sposobna okužiti preko 90 različnih rastlinskih vrst, večinoma iz družine razhudnikovk, najbolj pogosto pa napada krompir in paradižnik. Okuži lahko celo rastlino (liste, steblo), napade pa tudi gomolje in plodove (Erwin in Ribeiro, 1996).

*P. infestans* je najbolj poznana kot povzročiteljica velike lakote na Irskem, ki se je pojavila leta 1845 in je uničevala krompirjeve nasade vse do leta 1851 (Turner, 2005). V tistem obdobju je bil za Irce krompir osnovno živilo, saj je zelo dobro uspeval v irski vlažni zemlji, poleg tega pa je bil zelo hranilen in je revnim Ircem omogočal preživetje kljub skromni prehrani. Vlažna in hladnejša poletja na Irskem so po letu 1845 omogočila izjemno hitro širjenje virulentne krompirjeve plesni po obsežnih krompirjevih nasadih, na katerih je večinoma prevladovala le ena sorta, t. i. Irish Lumper (Irish Potato Famine, 2022). S tem so revni irski kmetje izgubili svoj glavni vir hrane, saj so kot podnajemniki na vlažnih in neravnih zemljiščih lahko pridelovali le krompir, medtem ko so bila ostala primernejša kmetijska zemljišča namenjena žitaricam in ostalim vrtninam, namenjenim le izvozu v Anglijo. Glavni lastniki irskih zemljišč so bili Britanci, ki so delovali kot odsotni najemodajalci, saj v veliki večini primerov na svoja zemljišča na Irskem niso nikoli stopili in so upravljanje pogosto prepustili več posrednikom, s čimer so se zemljišča razdrobila na številne manjše njive, namenjene najemu revnim irskim kmetom. Odsotni britanski veleposestniki prvih poročil o škodi, nastali zaradi krompirjeve plesni, niso jemali resno, britanska vlada pa je kljub propadu dveh zaporednih letin nadaljevala z izvozom hrane iz Irske v Anglijo. Britanska vlada je po letu 1846 sicer uvedla več ekonomskih ukrepov, npr. uvoz poceni pšenice, vendar je bila cena za mnoge obubožane Irce še vedno previsoka. Finančna pomoč je bila financirana iz davka, ki so ga lastniki zemljišč plačevali glede na število najemnikov, zato so mnogi lastniki izselili in odgnali svoje najemnike. Mnogi Irci so tako ostali brez zemljišč in so se lahko preživljali le z delom v t. i. ubožnicah ali preko javnih del, kjer so za svoje delo prejeli hrano in prenočišče (Irish Potato Famine, 2022). Velika lakota, ki je sledila kot posledica izgube več letin in zalog krompirja, prepoznanih in neučinkovitih ekonomskih in finančnih ukrepov, je povzročila množično izselitev skoraj milijona Ircev v tujino in več kot milijon smrti (Turner, 2005).

Drugod po Evropi krompirjeva plesen ni imela katastrofalnih posledic, saj evropski kmetje niso bili v tolikšni meri odvisni le od krompirjevega pridelka, temveč so gojili tudi druga osnovna živila, kot so rž, pšenica in oves. Kljub temu je v letih med 1845 in 1847 slaba letina žitaric v kombinaciji s krompirjevo plesnijo vodila v t. i. kontinentalno lakoto



(Zadoks, 2008). V tem obdobju smo posledice krompirjeve plesni občutili tudi na Slovenskem. Prvič se je bolezen pojavila leta 1844 v okolici Kranja in Kamnika, kasneje pa se je razširila po vsej Kranjski in leta 1846 je ponekod že povzročila izgubo polovico pridelka (Repanjšek, 1949).

### 2.1.1 Taksonomska uvrstitev oomicete *P. infestans*

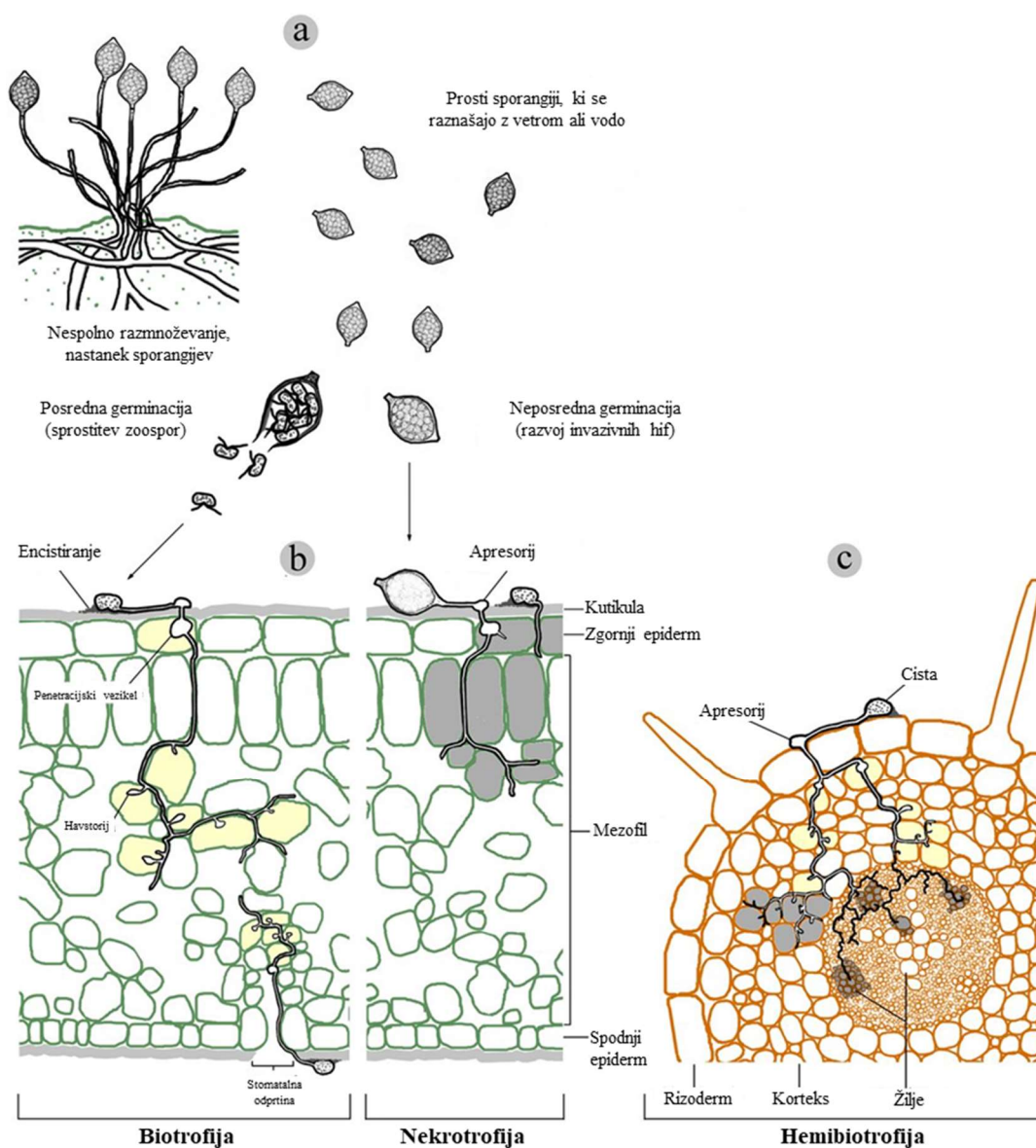
Izbruh krompirjeve plesni je sprožil preusmeritev številnih raziskav na iskanje vzroka in povzročitelja te bolezni. Leta 1845 je belgijska botaničarka in mikologinja Marie Anne Libert objavila raziskavo, kjer je kot povzročitelja krompirjeve plesni opisala glivo ter jo poimenovala *Botrytis vastatix*. Svoje opise in poimenovanja glive so v tem letu objavili tudi drugi raziskovalci, vendar je šele nemški zdravnik, botanik in mikolog Heinrich Anton de Bary v letih 1861 in 1863 podrobneje preučil prodor patogena v krompirjeve rastline in gomolje. Leta 1876 je Heinrich Anton de Bary na podlagi posebne morfologije sporangioforov, ki jih je opazil na glivi, osnoval nov rod *Phytophthora*, vrsto pa poimenoval *Phytophthora infestans* (Turner, 2005; Žerjav, 2016). Nedavne raziskave na herbarijskih vzorcih okuženih krompirjevih listov iz obdobja velike lakote na Irskem so pokazale, da je množični propad krompirjevih nasadov med veliko lakoto povzročil genotip *P. infestans*, poimenovan HERB-1, ki je bil nato na poljih prisoten še več kot 50 let. Genotip HERB-1 naj bi bil soroden genotipu US-1, s katerim naj bi imela tudi skupnega prednika, medtem ko se je od vseh današnjih genotipov izrazito razlikoval (Yoshida in sod., 2013).

Izvorno območje oomicete *P. infestans* naj bi bila centralna Mehika in ne območje Andov, kot so sprva predvidevali. V raziskavi Goss in sod. (2014) so pokazali, da so populacije *P. infestans* iz območja Andov izvirale iz mehiških populacij. Prve gostiteljske rastline *P. infestans* so tako bile divji sorodniki krompirja, ki so stalno razvijali mehanizme odpornosti, zaradi česar so divje vrste krompirja še danes ne povsem izkoriščen vir visoke in trajne odpornosti.

*P. infestans* spada med oomicete ali plesnivke (deblo Oomycota, red Pythiales) (Žerjav, 2016), ki večinoma vključujejo različne rastlinske patogene. Sprva so oomicete uvrščali med glive zaradi tvorbe nitastega micelija, vendar je bilo pred več desetletji dokazano, da spadajo v kraljestvo protistov (Judelson in Blanco, 2005). Čeprav se oomicete in glive v nekaterih morfoloških lastnostih ne razlikujejo, imajo oomicete določene svojevrstne značilnosti. Glavna komponenta celičnih sten oomicet je celuloza, medtem ko glive v celičnih stenah večinoma vsebujejo hitin. Oomicete imajo diploidne vegetativne hife oz. micelij, medtem ko so glive večinoma haploidne (Judelson in Blanco, 2005; Fawke in sod., 2015). Oomicete vsebujejo tudi večji genom v primerjavi z glivami in običajno ne vsebujejo pigmentov, medtem ko so hife gliv in spore lahko pigmentirane ter lahko vsebujejo melanin ali karotenoide (Judelson in Blanco, 2005).

## 2.1.2 Življenjski cikel in razmnoževanje oomicete *P. infestans*

Oomicete kot rastlinski patogeni imajo lahko biotrofični ali nekrotrofični življenjski cikel, lahko pa imajo tudi kombinacijo obeh. Takrat govorimo o hemibiotrofičnih organizmih, kamor spada tudi *P. infestans* (Slika 1) (Fawke in sod., 2015).



Slika 1: Biotrofični, nekrotrofični in hemibiotrofični življenjski cikel oomicet rodu *Phytophthora* (Fawke in sod., 2015)

a – Po sprostitvi sporangijev, ki se širijo z vodo ali vetrom, sledi posredna germinacija zoospor ali neposredna germinacija sporangijev.

b – Po prodoru apresorija v rastlinsko tkivo lahko oomiceta prične z biotrofično okužbo, kjer svojega gostitelja ohranja živega, ali z nekrotrofično okužbo, kjer se oomiceta prehranjuje z odmrlim rastlinskim tkivom.

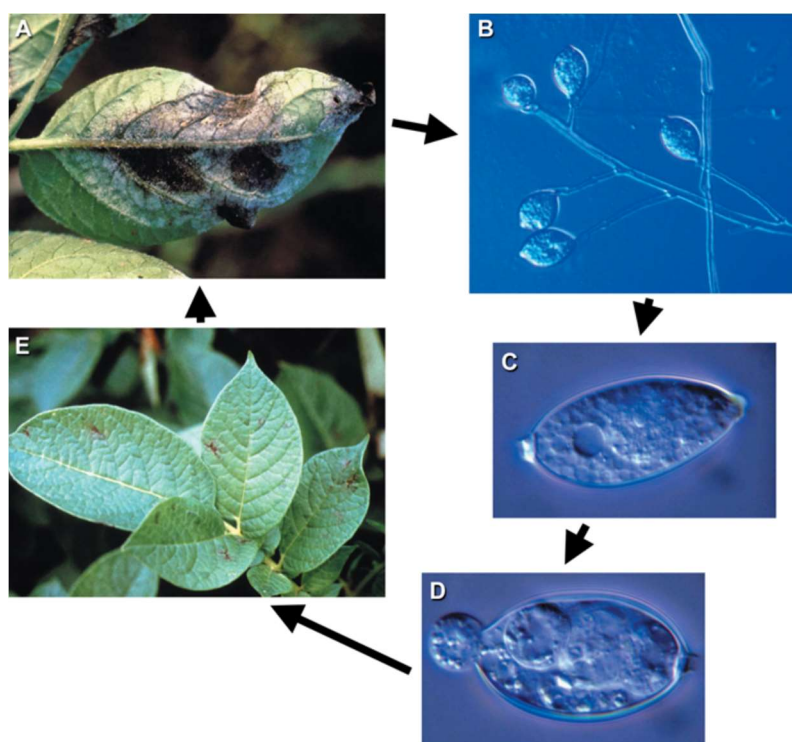
c – Oomiceta *Phytophthora infestans* svoj življenjski cikel prične kot biotrofični organizem, ko pa hife prodrejo v endoderm in žilno tkivo, prične z nekrotrofično fazo okužbe.

*P. infestans* tako svoj prodor v rastlinsko tkivo prične kot biotrofični organizem, pri čemer sprva ohranja svojega gostitelja živega. Ko se v tkivu dovolj razširi in hife *P. infestans* vstopijo v endoderm in žilno tkivo, patogen preide v nekrotrofično fazo, kjer encimi z razgradnjo celičnih sten povzročijo propad rastlinskih celic in s tem tvorbo nekrotičnega tkiva (Slika 1). *P. infestans* na odmrlem rastlinskem tkivu ne more preživeti daljše obdobje, kot je to značilno pri saprofitih, ampak mora za preživetje in širjenje tvoriti spore (Judelson in Blanco, 2005).

*P. infestans* se lahko razmnožuje nespolno ali spolno, pri slednjem morata biti prisotna oba paritvena tipa (A1 in A2), saj je *P. infestans* heterotaličen organizem. Paritveni tip ločimo glede na proizvodnjo specifičnih hormonov, ki sprožijo nastanek gametangijev bodisi enega bodisi drugega paritvenega tipa. V gametangijih nastajajo haploidna jedra in za uspešno združitve jeder morata biti na isti rastlini prisotna oba paritvena tipa, torej A1 in A2 (Žerjav, 2016). Ko se jedra združita, nastane oospora z diploidnim jedrom in odebeljeno celično steno, ki lahko zaradi svoje trdoživosti preživi dolgotrajne neugodne razmere v tleh ali v rastlini (Judelson in Blanco, 2005).

Pri nespolnem razmnoževanju *P. infestans*, ki najbolj prevladuje, se na koncu razvejanih specializiranih hif (sporangioforov ali trosonoscev) tvorijo sporangiji (trosovniki), ki vsebujejo šest ali več zoospor (Slika 2B-C) (Judelson in Blanco, 2005). Najbolj optimalna temperatura za razvoj sporangijev je med 18 in 22 °C (Jakić, 1987). Sporangiji se lahko z vetrom ali vodo odcepijo in razširijo več kilometrov daleč na gostiteljsko rastlinsko tkivo.

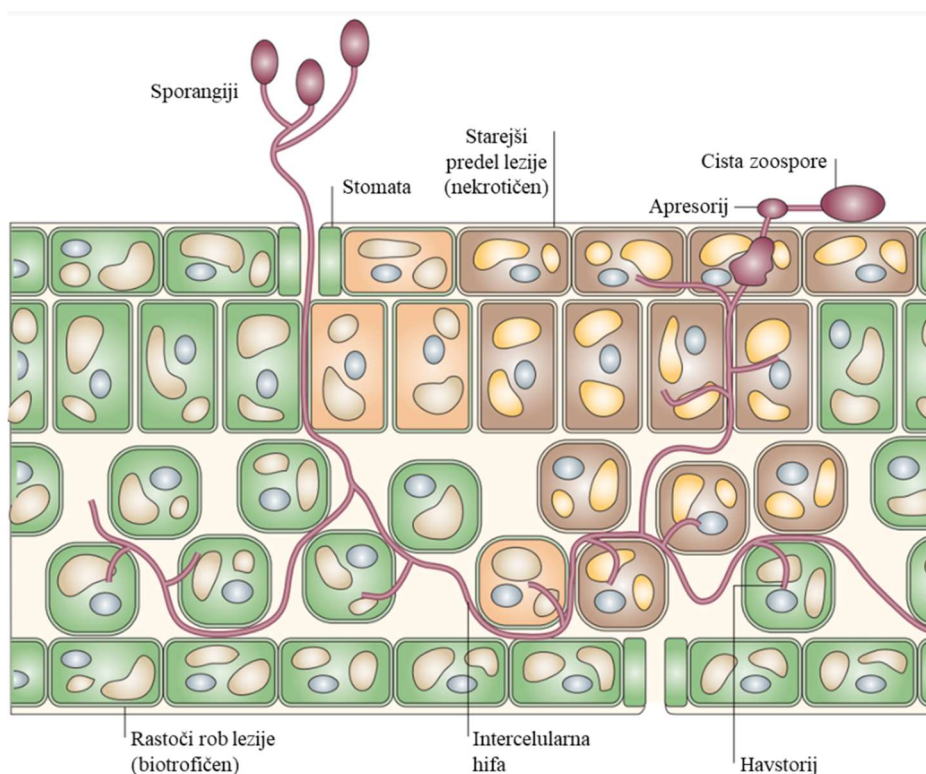
Po pristanku na rastlini lahko sporangiji kalijo neposredno ali posredno, pri čemer morajo biti sporangiji v obeh primerih obdani z vodo. Pri višjih temperaturah (nad 14 °C) sporangiji kalijo in vstopajo v tkivo neposredno preko listnih rež, dihalnih odprtin (lenticel) ali poškodb na površini rastlinskega tkiva. Pri nižjih temperaturah pa poteka posredna kalitev, kjer se iz sporangijev sprostijo gibljive zoospore z dvema bičkoma, pri čemer sprednji biček vleče zoosporo naprej, zadnji biček pa je namenjen usmerjanju (Slika 2D) (Judelson in Blanco, 2005).



**Slika 2: Nespolno razmnoževanje oomicete *P. infestans* (Fry, 2008)**

A – nekroze in sporangiofori na listnem tkivu; B – sporangiofore s sporangiji; C – sproščeni sporangiji v vodni kaplji; D – posredna germinacija s sproščanjem zoospor; E – prvi vidni simptomi okužbe s *P. infestans*.

Zoospore lahko rastlinsko tkivo najdejo z zaznavanjem specifičnih aminokislin, ki jih izloča rastlina na svoji površini in delujejo kot kemoatraktanti. Zatem zoospora izgubi svoja bička in se preoblikuje v cisto, ki se še dodatno prilepi na rastlinsko tkivo in takoj prične s kalitvijo (Slika 3). Konica kličnega mešička se razvije v apresorij, ki prodre skozi kutikulo v rastlinsko celico, od tu naprej pa se *P. infestans* z vegetativnimi hifami širi intercelularno po rastlinskem tkivu (Slika 3) (Judelson in Blanco, 2005). V tej fazi se patogen širi znotraj svojega gostitelja brez opaznih znakov ali simptomov na površini (Fry, 2008). Iz vegetativnih hif se ponekod lahko znotraj rastlinske celice razvijejo tudi t. i. sesalne bradavice ali havstoriji (Slika 3) (Jakić, 1987), s katerimi *P. infestans* črpa hranila in s tem povzroča odmiranje tkiva, kar se na rastlinah lahko opazi kot manjše nekroze približno dva dneva po prodoru zoospor v rastlinsko tkivo (Slika 2E). Ob prisotnosti zmernih temperatur in visoke zračne vlage se po dodatnih dveh dneh na površini listov pojavijo sporangiofori s številnimi sporangiji (Slika 2A in 3) (Fry, 2008).



Slika 3: Potek okužbe rastlinskega tkiva z oomiceto *P. infestans* (Judelson in Blanco, 2005)

Sporangiji se lahko nato z vetrom ali dežjem razširijo po okoliških krompirjevih rastlinah in nasadih, čemur pravimo tudi horizontalen prenos z rastline na rastlino znotraj iste sezone (Mariette in sod., 2016b), lahko pa se tudi sperejo v zemljo, kjer nato prodrejo v gomolje skozi lenticеле, očesca ali poškodbe. Simptomi se na gomoljih pojavijo v obliki vdratih peg svinčeno sive ali rjave barve, pod katerimi jasno vidimo odmrlo meso. Pege se lahko pri močnejših okužbah hitro razširijo in tako celoten gomolj propade že v zemlji. Okuženi gomolji, ki tekom skladiščenja ne propadejo in jih posadimo v naslednji sezoni, postanejo vir primarnih okužb s *P. infestans* v naslednji rasti sezoni (Jakić, 1987). Tovrstnemu prenosu rastlinskega patogena rečemo tudi vertikalni prenos patogena med sezonami, kjer se okužba z rastline prenese na gomolje, iz katerih nato naslednjo sezono zrastejo nove že okužene rastline (Mariette in sod., 2016b). Pri zelo agresivnih izolatih *P. infestans* do vertikalnega prenosa ne pride pogosto, saj močno prizadete rastline proizvedejo manjše gomolje, ki nato zaradi hude okužbe s *P. infestans* propadejo ali slabše vzkalijo (Pasco in sod., 2016).

### 2.1.3 Izvor in širjenje oomicete *P. infestans* po svetu

Z nespolnim razmnoževanjem, kjer se razvije večje število zoospor, se *P. infestans* lahko zelo hitro širi po krompirjevih nasadih. Do okrog leta 1980 se je v Evropi in drugod po svetu *P. infestans* širila izključno z nespolnim razmnoževanjem, saj je bil prisoten le paritveni tip A1 (Fry in sod., 1992; Drenth in sod., 1994; Mariette in sod., 2016b). Leta

1976 ali 1977 naj bi iz Mehike, od koder *P. infestans* izvira in sta od nekdaj bila prisotna oba paritvena tipa (Goss in sod., 2014), preko Severne Amerike v Evropo prispela obsežna pošiljka krompirja, okuženega s paritvenim tipom A2 (Mariette in sod., 2016b). Leta 1981 so paritveni tip A2 prvič zaznali v Švici in Veliki Britaniji, kasneje pa so ga odkrili tudi na Nizozemskem in v ostalih evropskih državah (Drenth in sod., 1994). S prisotnostjo obeh paritvenih tipov se je *P. infestans* pričela razmnoževati spolno in tvoriti oospore, s čimer se je močno povečala genetska variabilnost, kar so dokazali tudi v raziskavi Drenth in sod. (1994), kjer so z iskanjem prstnih odtisov DNA (ang. DNA fingerprinting) analizirali »stare« in »nove« nizozemske populacije *P. infestans*, izolirane pred letom 1980 oz. po letu 1980. V novih populacijah *P. infestans* so se pojavili novi virulentni faktorji, ki jih v starih niso zaznali, kar sovпада s pojavom paritvenega tipa A2 (Drenth in sod., 1994), poleg tega pa se je povečalo število poročil o prisotnosti oospor v zemlji ter pojavu rekombinantnih izolatov, kar nakazuje na pričetek spolnega razmnoževanja (Yuen in Andersson, 2013).

V primeru *P. infestans* je imelo spolno razmnoževanje bistvene prednosti, saj je z razvojem oospor lahko preživela v zemlji med rastnimi sezonami (vertikalni prenos) ter tako povečala možnosti za uspešno širjenje in kolonizacijo novih rastlin. S spolnim razmnoževanjem so se razvili številni raznoliki genotipi, ki so se lahko hitro prilagodili okoljskim spremembam in selekcijskim pritiskom ter razvili nove lastnosti (Drenth in sod., 1994). Ena izmed pridobljenih lastnosti novih populacij *P. infestans* je bila odpornost proti fungicidu metalaksil, ki se je pojavila okrog leta 1980 (Davidse in sod., 1981), v starejših populacijah *P. infestans* pa ni bila prisotna (Fry, 1993).

Za zatiranje krompirjeve plesni so sprva pridelovalci poznali le preventivne ukrepe, npr. sajenje gomoljev v grebene in naknadno osipavanje, kar je preprečilo spiranje sporangijev *P. infestans* z listov do gomoljev v zemlji ter s predhodno odstranitvijo krompirjeve cime pred pobiranjem gomoljev. Ključen preventivni ukrep je bilo tudi sprotno odstranjevanje okuženega rastlinskega materiala in gomoljev iz nasadov in skladišč, s čimer so preprečili vertikalni prenos patogena med rastnimi sezonami (Turner, 2005). Šele proti koncu 19. stoletja so na Univerzi Bordeaux razvili prvi fungicid na osnovi bakrovega sulfata, poimenovali so ga mešanica Bordeaux. V Sloveniji so uporabljali ime bordojska brozga (Jakić, 1987). Sprva se je bordojska mešanica uporabljala v francoskih vinogradih in se je šele kasneje uporabljala za škropljenje krompirjevih nasadov proti krompirjevi plesni, kjer je bila zelo učinkovita. V sredini prejšnjega stoletja (okrog leta 1950) so na trg prišli prvi organski fungicidi, ki so sčasoma nadomestili bordojsko mešanico. Do takrat so fungicidi delovali kot zaščitni ovoj na površinah rastlin, kasneje pa se je razvoj preusmeril v sistemske fungicide, ki so jih rastline lahko absorbirale v svoje tkivo in patogene napadle od znotraj, vendar je bil razvoj le-teh dolgotrajen. Prvi sistemski fungicid, z aktivno spojino furalaksil, je na trg prišel leta 1977, nekaj let kasneje pa še metalaksil (Turner, 2005). Fungicidi so v današnjem času vsesplošno in masovno uporabljeni v

krompirjevih nasadih, zaradi česar se ustvarja selekcijski pritisk na populacije *P. infestans*, da razvijejo odpornost. Ena izmed strategij upočasnjevanja razvoja odpornosti je uporaba kombinacij široko in ozko specifičnih fungicidov, npr. kombinacija površinskih in sistemskih fungicidov (Ivanov in sod., 2021).

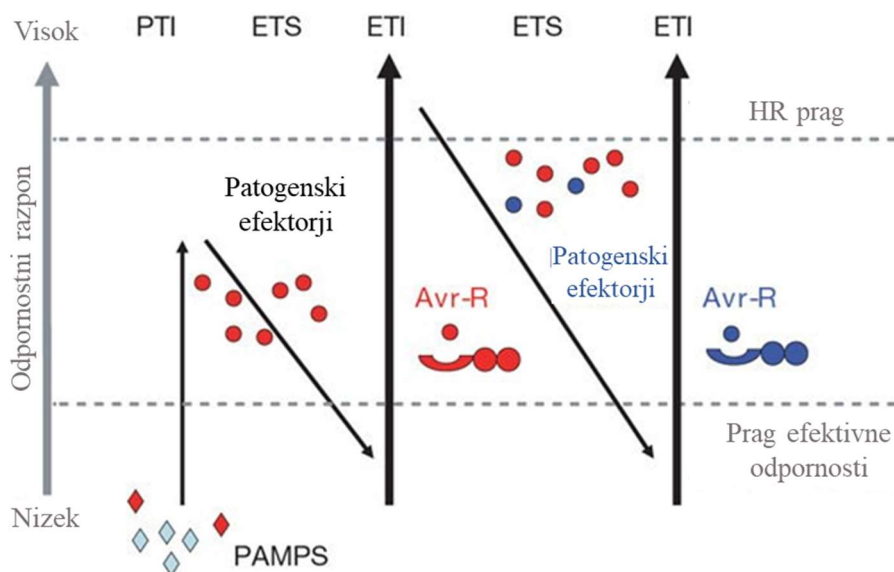
Nove populacije *P. infestans* so tako z leti nadomestile stare klonalne linije, kar je v letih med 1985 in 1995 v ZDA povzročilo velike izgube krompirjevega pridelka, saj je klonalna linija US-8 paritvenega tipa A1, ki je bila agresivna in odporna na metalaksil, popolnoma izpodrinila klonalno linijo US-1 (Cooke in sod., 2012). Za lažje spremljanje razvoja genetske raznolikosti različnih populacij *P. infestans* so Lees in sod., (2006) razvili mikrosatelitne markerje (ang. Simple Sequence Repeats – SSR), ki se še danes uporabljajo za določanje genotipov izolatov *P. infestans* (Cooke in sod., 2012; Žerjav, 2016). Eden izmed genotipov *P. infestans*, ki je bil opredeljen z mikrosatelitnimi markerji, je bil genotip EU\_13\_A2, poznan tudi z imenom Blue 13, ki je bil prvič identificiran na Nizozemskem leta 2004, leto kasneje pa tudi v Veliki Britaniji (Lees in sod., 2012). Genotip EU\_13\_A2 je zelo agresiven in tudi odporen na fungicid metalaksil, zaradi česar je na krompirjevih nasadih v Evropi prevladoval kar pet let, ko so ga pričeli nadomeščati drugi genotipi (EuroBlight, 2022). Zaradi transporta okuženega semenskega krompirja se je genotip EU\_13\_A2 razširil tudi izven Evrope, odkrili so ga na Kitajskem (Li in sod., 2013), v Indiji (Chowdappa in sod., 2013; Dey in sod., 2018) ter Alžiriji (Beninal in sod., 2022). Nedavne raziskave na več genotipih *P. infestans* na ravni genoma so pokazale, da je bil genotip EU\_13\_A2 skupaj z drugimi dominantnimi klonalnimi linijami triploiden in ne diploiden, kar mu je izboljšalo fitness in boljšo prilagodljivost na okoljske pogoje ter omogočilo agresivnejše širjenje (Li in sod., 2017). Spolno razmnoževanje *P. infestans* je omogočilo tudi razvoj novih virulentnih efektorjev, ki jih izloča ob vstopu v rastlinsko celico in s katerimi zaobide rastlinski imunski sistem po uspešni okužbi takrat ne več odpornih krompirjevih sort.

## 2.2 INTERAKCIJA *P. infestans* Z RASTLINSKIM IMUNSKIM SISTEMOM

Po uspešnem prodoru oomicete *P. infestans* v rastlinsko tkivo se iz vegetativnih hif razvijejo havstoriji, ki s svojim prodiranjem sprožijo invaginacijo protoplasta rastlinske celice. Pri tem se med membrano havstorija in membrano rastlinske celice ustvari prostor, poimenovan ekstrahavstorialni matriks, preko katerega potujejo efektorski proteini v rastlinsko celico, kjer nato vplivajo na delovanje rastlinskega imunskega sistema (Fawke in sod., 2015). Efektorji oz. avirulenčni proteini v rastlinski celici zavirajo signalne poti in delovanje imunskega odziva, pri čemer delujejo na procese, ki se dogajajo v jedru, endoplazmatskem retikulumu, veziklih, na rastlinski membrani ali v avtofagosomih (Whisson in sod., 2016).

Vsi do zdaj identificirani efektorski geni v oomicetah kodirajo proteine s signalnim peptidom, ki mu sledi motiv aminokislinskega zaporedja RXLR. Slednji je potreben za translokacijo efektorja v gostiteljsko rastlinsko celico (Birch in sod., 2009), njegov ključen pomen pa dokazujejo tudi rezultati sekvenciranja genoma *P. infestans*, kjer so odkrili več kot 500 potencialnih RXLR efektorskih genov (Haas in sod., 2009). Efektorje v rastlinskih celicah prepoznajo proteini R, kodirani z odpornostnimi (*R*) geni, ki so ključni akterji specifičnega rastlinskega imunskega sistema (Birch in sod., 2008).

Rastlinski imunski sistem sestavlja več ravni obrambe pred patogenimi organizmi. Poenostavljeno njegovo evolucijo poimenujemo »Cik-Cak« model evolucije imunskega sistema (Slika 4) (Jones in Dangl, 2006). V prvi fazi odpornosti, ki ji pravimo tudi osnovna, rastlina prepreči vstop patogenov v svoje tkivo bodisi fizično na površini, kjer sodelujejo epidermalne celice in citoskelet, bodisi kemično s fitoanticipini, ki so sekundarni antimikrobni metaboliti in so konstantno prisotni v rastlinskem tkivu (Anderson in sod., 2010).



Slika 4: Shematski prikaz rastlinskega imunskega sistema (»Cik-Cak« model) (Jones in Dangl, 2006)

V osnovni odpornosti delujejo tudi nespecifični obrambni sistemi, kjer splošne molekulske motive patogenov (ang. Microbial/Pathogen Associated Molecular Patterns – MAMPs, PAMPs) prepoznajo motiv-prepoznavni receptorji (ang. Pattern Recognition Receptors – PRRs) na površini celične membrane. Ta prepoznavna aktivira t. i. s patogeni sproženo imunost (ang. Pathogen Triggered Immunity – PTI) (Slika 4), ki s naslednjem signalnih poti vodi v obrambno stanje rastline (Boller in Felix, 2009). Med molekule MAMP oziroma PAMP spadajo različne mikrobne komponente ali molekule, ki jih patogeni izločajo v zunajcelični prostor, npr. bakterijski biček, elongacijski faktor TU, lipopolisaharidi, heptaglukozidi, glivni hitin in eksoskelet žuželk (Dangl in Jones, 2001).



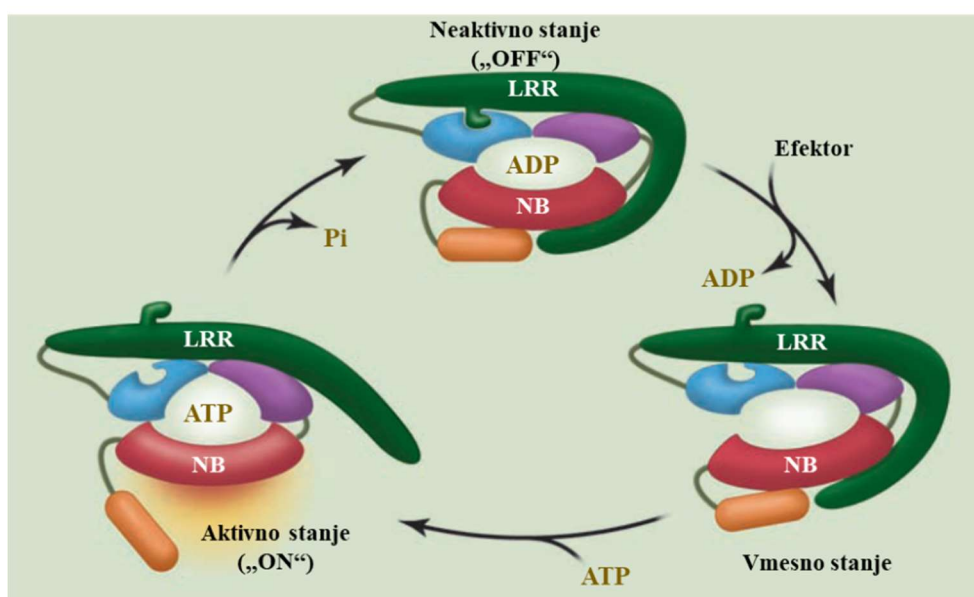
Oomicetne molekule MAMP so za razliko od bakterijskih in glivnih manj raziskane in točen potek prepoznavne molekul MAMP na površini rastlinskih celic in ter sledeče signalne transdukcije ni poznan (Newman in sod., 2013). Do sedaj najbolj raziskani oomicetni molekuli MAMP sta elicitorja eikozapolinojska kislina in razvejani  $\beta$ -1,3-glukani (Robinson in Bostock, 2015). Vloga eikozapolinojske kisline v interakciji med rastlino in patogenom je bila odkrita ravno pri interakciji med *P. infestans* in krompirjem, kjer so micelijski ekstrakti *P. infestans* v tkivu krompirjevih gomoljev sprožili sistemski odziv celic v obliki kopičenja seskviterpenoidnih fitoaleksinov, nalaganja lignina v celični steni in celične smrti (Bostock in sod., 1981). Delovanje razvejanih  $\beta$ -1,3-glukanov je bilo podrobneje raziskano v raziskavi Cheong in sod. (1991), kjer so v interakciji med patogenom *Phytophthora sojae* in sojo opazili izrazito kopičenje fitoaleksinov v rastlinskih celicah po prepoznavi razvejanih  $\beta$ -1,3-glukanov. Raziskave o vlogi razvejanih  $\beta$ -1,3-glukanov pri interakciji med *P. infestans* in krompirjem niso podale jasnih zaključkov, saj so omenjene molekule delovale kot sprožilci in tudi kot zaviralci aktivnosti ostalih elicitorjev *P. infestans* (Robinson in Bostock, 2015).

Na tej stopnji govorimo o splošni oz. nespecifični odpornosti, saj lahko odziv PTI deluje proti različnim skupinam patogenov (Anderson in sod., 2010), ki lahko na tej stopnji pridejo le v stik z rastlino, ne morejo pa je okužiti. Izjeme so parazitski organizmi, ki že sami po sebi lažje prebijejo prvo obrambno linijo imunskega sistema (Prell in Day, 2001). Po preboju imunosti PTI so patogeni razvili efektorje, ki motijo imunski odziv. Z izločanjem efektorjev, ki reagirajo s signalnimi molekulami PTI, zavirajo imunski odziv (ang. Effector Triggered Supression – ETS) ter s tem okužijo rastlino. V kolikor rastline v svojem genomu vsebujejo gene *R*, lahko proteini *R* te efektorje prepoznajo ter s tem sprožijo efektorsko imunost (ang. Effector-triggered immunity – ETI) (Slika 4).

Geni *R* so splošno prisotni v rastlinskem genomu in so običajno dominantni geni, ki vsebujejo zapis za polno ali vsaj delno odpornost (Kourelis in van der Hoorn, 2018) proti različnim bakterijam, glivam, oomicetam, nematodam in virusom (Nimchuk in sod., 2003). Posamezna rastlina lahko vsebuje več sto analogov genov *R* in za mnoge izmed njih raziskovalcem še ni uspelo ovrednotiti stopnje doprinosa k odpornosti (Kourelis in van der Hoorn, 2018). Poznamo več razredov proteinov *R*, izmed katerih je razred NB-LRR (ang. Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeat) najbolj številčen. Nukleotid-vezavna domena NB ima ključno vlogo pri vezavi molekul adenozintrifosfat (ATP) oz. gvanozintrifosfat (GTP) in je med proteini *R* dobro ohranjena. Nasprotno pa je z levcini bogata ponavljajoča domena LRR zelo variabilna tako v prostorski organizaciji kot tudi v dolžini, sodeluje pa pri interakcijah protein-protein in vezavah peptid-ligand (Knepper in Day, 2010).

Proteini *R* so v rastlinskem imunskem sistemu tisti, ki lahko aktivirajo programirano celično smrt, zato so strogo regulirani, saj morajo po eni strani ob napadu patogena hitro

sprožiti svoje delovanje, po drugi strani pa morajo biti ob odsotnosti patogena inhibirani (Balint–Kurti, 2019). Posledično so proteini R avtoinhibirani z intramolekularnimi interakcijami med različnimi domenami, pri čemer je bilo dokazano, da imata domeni NB in LRR ključno vlogo (Slika 5) (Takken in Tameling, 2009). Hidroliza molekule ATP naj bi pri tem delovala kot stikalo, pri čemer vezava molekule adenoindifosfat (ADP) inaktivira delovanje proteina R. Interakcija z efektorjem nato sproži vmesni korak aktivacije proteina R, kjer se molekule prerazporedijo in omogočijo zamenjavo molekule ADP z molekulo ATP, s čimer protein R postane aktiven in sproži nadaljnjo kaskado imunskega odziva (Wang in sod., 2019).



**Slika 5: Aktivacija proteinov R (Takken in Tameling, 2009)**

V odsotnosti efektorskega proteina je protein R v avtoinhibiranjem mirujočem stanju (»OFF«). Prepoznavna z efektorjem sproži prerazporeditev podenot proteina R (vmesno stanje), kar omogoči zamenjavo molekule ADP z ATP, s čimer se protein R aktivira (»ON«). Oznaka Pi pomeni fosfat.

Efektorji in proteini R interagirajo po principu »gen-za-gen« (Flor, 1971), kjer gre za zelo specifično interakcijo, saj lahko proteini R prepoznajo točno določen efektorski protein, le v redkih primerih dva, ki jih kodirajo efektorski geni (Nimchuk in sod., 2003). V kolikor pride do povezave med proteinom R in efektorjem, slednji ne more povzročiti bolezni, torej gre za nekompatibilno interakcijo med avirulentnim patogenom in odpornim gostiteljem. Kadar je gen *R* odsoten in rastlina ne vsebuje proteina R, ki bi lahko reagiral s specifičnim efektorjem, pa govorimo o kompatibilni interakciji med virulentnim patogenom in občutljivim gostiteljem (Glazebrook, 2005). Proteini R naj bi v rastlinskem imunskem sistemu delovali na devet različnih načinov, pri čemer se lahko protein R z efektorjem poveže neposredno ali posredno na celični površini ali v citoplazmi (Kourelis in van der Hoorn, 2018). Pri neposredni vezavi proteina R in efektorja naj bi bila domena LRR tista, ki se veže na efektorski protein (Nimchuk in sod., 2003; Takken in Tameling, 2009), medtem ko se efektorji pri posredni interakciji v citoplazmi povežejo

z oponašalnimi molekulami, ki preusmerijo efektorje nase in delujejo kot vaba ali straža po t. i. »Guard-Decoy« hipotezi (Nimchuk in sod., 2003; Jones in Dangl, 2006), to interakcijo pa nato prepoznajo proteini R.

Ne glede na način interakcije lahko aktivirani proteini R sprožijo več različnih imunskih odzivov, npr. nenaden dvig koncentracij reaktivnih kisikovih spojin (ang. Reactive Oxygen Species – ROS), povišane koncentracije kalcijevih ionov ( $\text{Ca}^{2+}$ ), kaskadne aktivacije encimov z mitogenom aktiviranih proteinskih kinaz (ang. Mitogen-Activated Protein Kinases – MAPK), transkripcijsko reprogramiranje in proizvodnjo fitohormonov (Cui in sod., 2015). Posledica omenjenih sproženih odzivov je nato kopičenje toksičnih sekundarnih metabolitov, kar ustvari negostoljubno okolje za patogen, ali programirana celična smrt oz. hipersenzitivni odziv (HR), s čimer se na lokalni ravni prepreči širjenje patogena v sosednje gostiteljske celice (Nimchuk in sod., 2003). Gre za obliko lokalne programirane celične smrti, ki se zgodi na mestu vstopa oz. okužbe s patogenom. Na ta način patogen hitro propade, saj ga rastlinske celice s tem zadržijo in preprečijo širjenje na ostale zdrave celice ter onemogočijo dostop do hranil (Balint–Kurti, 2019). S pomočjo naravne selekcije so patogeni razvili več načinov, kako se izogniti ali onesposobiti ETI: z izražanjem raznolikih efektorjev in zaviralcev programirane celične smrti ali z inhibicijo izražanja efektorjev, ki jih je večina gostiteljev že zmožna prepoznati (Jones in Dangl, 2006).

Odziv HR inhibira širjenje predvsem biotrofičnih patogenov, medtem ko pri nekrotrofičnih organizmih celo pospešuje širjenje, saj se nekrotrofični organizmi prehranjujejo z odmrlim gostiteljskim tkivom (Glazebrook, 2005). Hemibiotrofični organizmi, med katere spada tudi *P. infestans*, lahko s svojim prehodom iz biotrofične v nekrotrofično fazo zavedejo rastlinski imunski odziv (Vleeshouwers in Oliver, 2014) in izločajo efektorje glede na časovno fazo okužbe (Toruño in sod., 2016). Ker gre pri odzivu ETI za specifično odpornost, kjer proteini R prepoznavajo le točno določene efektorje, lahko patogen že z manjšimi spremembami obstoječih efektorskih proteinov zaobide odziv ETI in nadaljuje z okužbo gostitelja. Med rastlinami in patogeni tako poteka konstanten koevolucijski razvoj, kjer obe strani ustvarjata selekcijski pritisk. Patogeni z razvojem novih efektorskih proteinov ustvarjajo pritisk na gostitelja, ki sčasoma prepozna nove nastale seve patogenov, medtem ko zaradi pritiska gostitelja na patogene ti zaobidejo prepoznavne mehanizme gostitelja (Anderson in sod., 2010). Omenjen selekcijski pritisk, pričetek spolnega razmnoževanja in povečana genetska variabilnost oomicete *P. infestans* so močno vplivali na žlahtnjenje krompirjevih sort z vključevanjem genov R.

## 2.3 KROMPIR (*Solanum tuberosum*)

### 2.3.1 Pridelava in prehranska vsebnost krompirja

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je četrta najpomembnejša poljščina na svetu, ki ga po pridelavi prekašajo le koruza, riž in pšenica. Globalna pridelava krompirja je v letu 2020 dosegla skoraj 360 milijonov ton, od tega skoraj polovico v azijskih državah. Največ krompirja pridelajo na Kitajskem, sledijo ji Indija, Ukranija, Rusija in ZDA. V Evropi je pridelava krompirja v letu 2020 znašala skoraj 108 milijonov ton (FAOSTAT, 2022). V Sloveniji smo v letu 2021 pridelali skoraj 65 000 t krompirja na 2734 ha površine (SiStat, 2022).

V svetovnem merilu je povprečen pridelek suhe snovi krompirjevega pridelka (3,92 t/ha) primerljiva s povprečnim pridelkom suhe snovi pri glavnih treh žitaricah (3,88 t/ha) (Raigond in sod., 2020), zaradi česar je krompir eden izmed glavnih virov ogljikovih hidratov v obliki škroba, ki predstavlja do 80 % suhe snovi. Poleg donosnosti krompirjevega pridelka in visoke vsebnosti škroba je krompir tudi zelo hranilen, saj kar 10 % suhe snovi predstavljajo beljakovine, med katerimi najbolj prevladuje albumin. Krompir vsebuje tudi veliko prostih aminokislin, predvsem glutamin in asparagin, vendar so deleži posameznih prostih aminokislin močno pod vplivom sestave zemlje in uporabe gnojil med pridelavo ter se razlikujejo med sortami (Raigond in sod., 2020). Hkrati je krompir tudi pomemben vir vitamina C, tiamina (B<sub>1</sub>), B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, niacina (B<sub>3</sub>) in folata oz. folne kisline (B<sub>9</sub>) (Birch in sod., 2012; Raigond in sod., 2020). Zaradi pomanjkanja vitamina C lahko pride do razvoja bolezni skorbut, ki je na Irskem pred veliko lakoto niso poznali, saj so s krompirjem uspeli zadostiti dnevnim potrebam po vitaminu C, med veliko lakoto pa se je zaradi izgube celotnega pridelka krompirja skorbut med Irci močno razširil (Irish Potato Famine, 2022). Poleg vitaminov krompir vsebuje tudi pomembne minerale, kot so kalij, kalcij, fosfor, magnezij, jod, železo in cink (Raigond in sod., 2020) ter pigmente, ki določajo barvo mesa v gomolju. Glede na količino antocianov je meso gomoljev rdeče ali vijolično (Hung in sod., 1997; Brown in sod., 2005), glede na količino kartenoidov pa belo ali rumeno (Nesterenko in Sink, 2003; Brown in sod., 2005). Čeprav ima krompir visoko energijsko vrednost, le-ta izhaja v veliki meri le iz škroba, saj krompir vsebuje zelo malo maščob. V surovem krompirju je škrob težko prebavljiv, saj se nahaja v obliki škroba, odpornega na prebavo, ki se nato s toplotno obdelavo pretvori v hitro prebavljiv škrob (Raigond in sod., 2020: 15), kar poveča glikemični indeks, ki meri dvig ravni glukoze v krvi po zaužitju ogljikovih hidratov. Krompir spada med živila z visokim glikemičnim indeksom, kar pomeni hitro povišanje ravni glukoze v krvi (Birch in sod., 2012), vendar je zaradi vsebnosti ostalih hranilnih snovi, predvsem vitaminov in mineralov, zelo cenjeno živilo.

Pridelava krompirja poteka v več kot 140 državah po svetu in dobro uspeva v širokem razponu klimatskih pogojev, od nadmorske višine 0 m do 4000 m do območij s hladnimi poletji in obilo padavin ter sušnimi območji (Birch in sod., 2012). Krompir je zelo primerna poljščina za območja z omejeno površino zemljišč, saj omogoča pridelavo višjih pridelkov na pridelovalno enoto v primerjavi s pšenico, rižem ali koruzo, vendar je podvržen številnim boleznim, škodljivcem in abiotskim stresom. Zaradi plitvih korenin je krompir zelo občutljiv na sušni stres, zato ga je v mnogih predelih sveta potrebno namakati (Birch in sod., 2012). Pomanjkanje vode v zemlji vpliva tudi na dostopnost in absorpcijo hranil v rastlini (Li in sod., 2009), izmed katerih krompir najbolj potrebuje dušik, fosfor in kalij (Kus, 1987). Prav tako je krompir občutljiv na povišane temperature, saj se najbolj optimalne temperature za visok pridelek gibljejo med 14 in 22 °C, zato mnogi pridelovalci krompirjeva polja namakajo in s tem poskušajo omiliti vpliv visokih temperatur (Birch in sod., 2012). Poleg krompirjeve plesni (*Phytophthora infestans*) krompir napadajo še druge bolezni, npr. črna listna pegavost (gliva *Alternaria solani*), bela noga (gliva *Rhizoctonia solani*), prašnata (gliva *Spongospora subterranea*) in navadna krastavost (bakterije rodu *Streptomyces*) ter črna noga (bakterije rodu *Dickeya* in *Pectobacterium*) (Wale in sod., 2008; IVR, 2022). Veliko težav povzročajo virusne bolezni, ki jih povzročajo PVY (virus Y krompirja), PVX (krompirjev virus X) in PLRV (virus zvijanja krompirjevih listov) (Birch in sod., 2012; IVR, 2022). Najbolj pogosti škodljivci, ki jih najdemo na krompirjevih nasadih, so koloradski hrošč in strune, v zemlji pa krompir napadajo nematode (Wale in sod., 2008; Birch in sod., 2012; IVR, 2022).

### 2.3.2 Izvor, uvrstitev in udomačitev krompirja

Taksonomsko gledano krompir spada v družino razhudnikovk (Solanaceae), kamor uvrščamo tudi nekatere druge pomembne kmetijske rastline, kot npr. paradižnik (*Solanum lycopersicum*), jajčevac (*Solanum melongena*) in papriko (*Capsicum annuum*) (Machida-Hirano, 2015). Krompir in njegove sorodne divje vrste uvrščamo v rod *Solanum* (razhudnik), ki vsebuje več kot 1500 vrst. Rastline znotraj rodu *Solanum*, ki tvorijo gomolje, spadajo v skupino *Petota*, ki jo nadalje razdelimo na dve podskupini *Potatoe*, kamor uvrščamo krompir (Machida-Hirano, 2015) in *Estolonifera* (Hawkes, 1990). Skupina *Petota* obsega približno 190 različnih divjih vrst, ki tvorijo gomolje in rastejo na širokem jugozahodnem območju ZDA ter v mnogih državah Južne Amerike (Peru, Čile, Argentina, Venezuela), od koder krompir izvira (Birch in sod., 2012). Prve dokaze o uporabi divjih vrst krompirja za prehrano so odkrili v južnem predelu države Čile, datirajo pa 12 500 let pred našim štetjem (Bradshaw, 2021). Novejše raziskave so v ZDA na orodju za mletje odkrile ostanke škroba, ki datirajo v obdobje med 10 900 in 10 100 pred našim štetjem ter izhajajo iz vrste *S. jamesii* (Louderback in Pavlik, 2017).

Udomačenje krompirja naj bi se pričelo v južnem predelu Peruja z izvorno vrsto *S. bukasovii* (danes *S. candolleanum*) (Spooner in sod., 2005, 2014), preko katere je z

udomačitvijo nastala diploidna udomačena skupina *S. tuberosum* Stenotomum, iz katere izvirajo vse udomačene vrste krompirja (Bradshaw, 2021). Udomačene vrste krompirja so grobo razdeljene v štiri skupine, izmed katerih je najpomembnejša skupina Andigena s tetraploidnimi vrstami, saj so se te vrste v 16. stoletju razširile po celem svetu (Kingsbury, 2009). Španski osvajalci so bili leta 1537 prvi Evropejci, ki so opisali pridelavo krompirja na območju Inkov v današnji Kolumbiji (Hawkes, 1990). Krompir se iz Južne Amerike ni razširil neposredno v Evropo, ampak najprej na Tenerife in Kanarske otoke, od koder je nato v Evropo prispela prva pošiljka v Belgijo trideset let po prvem zapisu (leta 1567) (Hawkes in Francisco-Ortega, 1993). Prve vrste udomačenega krompirja so, kot rečeno, izhajale iz skupine Andigena, ki so bile prilagojene na krajše dneve na visokih nadmorskih višinah, zaradi česar so se v Evropi z dolgimi poletnimi dnevi gomolji razvijali šele jeseni, ko so bili dnevi krajši, vendar je rastline že ogrožala zmrzal. Krompir je tako dolgo časa po prvem pojavu v Evropi obstajal le kot eksotična rastlina v botaničnih zbirkah ali vrtovih, poleg tega pa so bili Evropejci skeptični do pridelovanja krompirja, saj so ga med drugim označili za strupenega (Kingsbury, 2009). Šele v 18. stoletju so krompir začeli ceniti, predvsem na območjih z milejšimi poletji in nizko pojavnostjo zmrzali, npr. na Irskem, kjer je krompir omogočil preživetje več milijonom Ircev (Irish Potato Famine, 2022). Tako so v 18. stoletju krompir postopoma pričeli sprejemati in pridelovati po vsej Evropi, v 19. stoletju pa je krompir postal ena glavnih poljščin v Evropi (Bradshaw, 2021). Tako kot drugod po Evropi je tudi na Slovenskem krompir sprva naletel na odpor, saj so o njem imeli precej predsodkov, poleg tega pa je bil do leta 1810 na Slovenskem razširjen rdeč krompir s slabim okusom. Na Slovenskem se je pridelava krompirja tako pričela v drugi polovici 18. stoletja, predvsem po zaslugi takrat ustanovljenih kmetijskih združb, ki so priporočale pridelavo krompirja (Stabej, 1977).

### 2.3.2 Razvoj žlahtnjenja krompirja

V 19. stoletju so v Evropo začele postopno prihajati nove čilenske sorte in vrste krompirja, ki so bile prilagojene na daljši dan in na podnebne razmere, primerljive z evropskimi razmerami, zaradi česar so jih evropski žlahtnitelji vključili v svoje programe (Bradshaw, 2021). Ena izmed teh čilenskih sort je bila t. i. Rough Purple Chili, ki jo je leta 1851 iz Paname uvozil C. E. Goodrich. Iz te sorte je v prvi generaciji naravne oprašitve pridobil sejanec, ki ga je poimenoval Garnet Chili. Iz sorte Garnet Chili so v letu 1861 razvili sorto Early Rose (Plaisted in Hoopes, 1989), ki se je med drugim razširila tudi na Slovenskem, znana z imenom Rani rožnik, ki so jo sadili še po 2. sv. vojni (Kus, 1987). Sorta Rough Purple Chili je prednik marsikaterih evropskih ali ameriških sort, saj je bila po letu 1850 pogosto uporabljena kot starševska rastlina pri križanju (Turner, 2005). Za pridelovanje krompirja v ZDA je bila Sorta Rough Purple Chili ključnega pomena, saj je le po treh generacijah naravne oprašitve, preko sorte Garnet Chili in nadalje sorte Early Rose, okrog leta 1871, na trg prišla sorta Russet Burbank (Plaisted in

Hoopes, 1989), ki je po 150 letih še vedno ena najbolj gojenih krompirjevih sort v ZDA, saj je zaradi svoje podolgovate oblike in visoke vsebnosti suhe snovi zelo primerna za pripravo pomfrija, vendar je ta sorta zelo občutljiva na krompirjevo plesen (Rommens in sod., 2006). Do 19. stoletja je žlahtnjenje krompirja temeljilo na naravno prisotni genetski variabilnosti potomcev, zrastle iz pravih semen, pridobljenih iz z žuželkami naravno oprašenih cvetov. Zrastle rastline so proizvedle gomolje, ki so jih žlahtnitelji nato posadili kot semenske gomolje in tako ohranili genetsko unikatnost vsakega pridobljenega potomca ter na podlagi zelenih lastnosti odbrali in vegetativno namnožili perspektivne klone (Bradshaw, 2021). Po letu 1807 se je postopno uveljavila umetna hibridizacija krompirjevih vrst, predvsem v Angliji, kjer je T. A. Knight prvi vpeljal metodo dvigovanja korenin krompirjevih rastlin iz zemlje, s čimer je spodbudil cvetenje in tako po križanjih pridobil več pravega semena (Glendinning, 1983). Sredi 19. stoletja so na Slovenskem že pridelovali več različnih sort krompirja, med njimi sorto Ribničan, ki je popolnoma izpodrinil prej neokusno rdečo sorto, ter Rani rožnik (Early Rose) in Oneida (Snowflake) (Kus, 1987).

S pojavom krompirjeve plesni leta 1846 v Evropi so morali žlahtnitelji svoj fokus preusmeriti v razvoj sort z odpornostjo proti oomiceti *P. infestans* (Bradshaw, 2021). Ker krompirjeva plesen do tedaj ni bila poznana, takrat razvite sorte niso bile testirane na odpornost proti tej bolezni, zato se je kakršnakoli odpornost iz prinesenih tujih krompirjevih vrst iz Južne Amerike sčasoma izgubila (Kingsbury, 2009). Z razvojem bordojske mešanice po letu 1885 se je potreba po odpornih krompirjevih sortah nekoliko zmanjšala, zato žlahtnjenje odpornih krompirjevih sort sprva ni bilo tako intenzivno. Na začetku 20. stoletja pa so se na krompirjevih nasadih pričele pojavljati nove krompirjeve bolezni, predvsem krompirjev rak (gliva *Synchytrium endobioticum*), črna noga (bakterije rodu *Erwinia*, danes rod *Dickeya* in *Pectobacterium*), virus zvijanja listov (PLRV) in bela trohnoba (*Fusarium spp.*), kar je ne samo spodbudilo žlahtnjenje odpornih sort, ampak tudi nastanek državno financiranih raziskovalnih ustanov za proučevanje in nadzor bolezni kmetijskih rastlin, ustanovitev inšpekcijskih služb ter sprejem ustrezne zakonodaje za omejitev uvoza in uvedbo karantene (Turner, 2005).

Sredi 19. stoletja so se pričeli zavedati pomena zdravega in certificiranega semenskega krompirja, kar je vodilo v ustanovitev državnih fitosanitarnih služb za potrjevanje semenskega krompirja (Turner, 2005). Mendlovo raziskovalno delo na področju križanja in dedovanja, ki je postalo cenjeno šele na začetku 20. stoletja, je močno vplivalo tudi na žlahtnjenje krompirjevih sort, saj so žlahtnitelji ugotovili, da se odpornosti proti boleznim dedujejo po Mendlovih zakonih, s čimer so se ponovno osredotočili na uporabo in vključevanje divjih vrst krompirja (Bradshaw, 2021). Potreba po popisu, sistematiziranju in evidentiranju divjih vrst krompirja je sprožila številne odrave v Centralno in Južno Ameriko, od koder so raziskovalci in žlahtnitelji prinesli nove genske vire, ki so jih pričeli hraniti v na novo ustanovljenih genskih bankah (Turner, 2005). Najbolj znana in obsežna

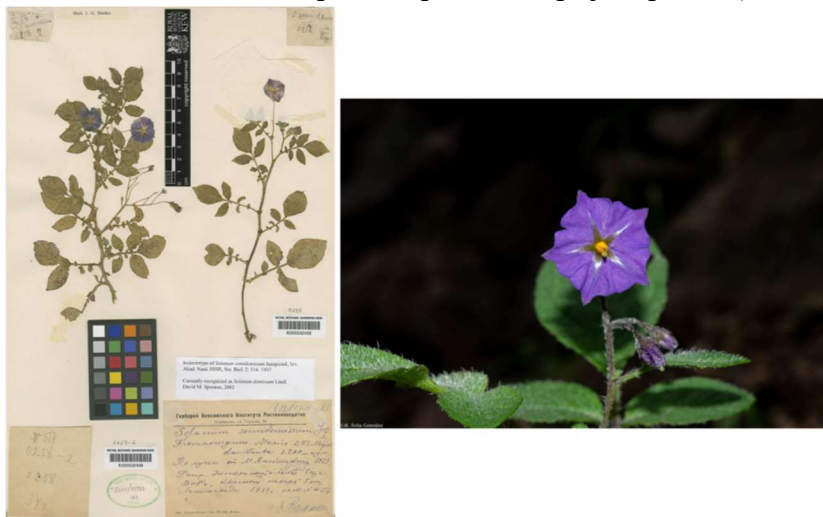
odprava po nove genske vire je bila Sovjetska odprava v letih med 1925 in 1932, ki jo je vodil Nikolaj Vavilov. V času svojega delovanja je opravil skoraj 200 ekspedicij, obiskal 65 držav, zbral približno 150 000 taksonomskih skupin in jih shranil v takrat poimenovan Vavilov vseruski inštitut rastlinskih genskih virov (ang. Vavilov All Russian Institute of Plant Genetic Resources - VIR) (Kingsbury, 2009). Inštitut VIR so med 2. sv. vojno zasedli nacisti in na položaje postavili nemške raziskovalce, ki so nato imeli dostop do obširne Vavilove zbirke. Del zbirke so nemški raziskovalci razposlali na inštitut Kaiser Wilhelm za žlahtnjenje rastlin v Münchenbergu, inštitut Kaiser Wilhelm za raziskave kmetijskih rastlin na Dunaju in na inštitut SS za rastlinsko genetiko blizu Gradca, del rastlinskega materiala, odvzet iz inštituta VIR, pa je ostal izgubljen. Velik del zbirke je kljub grozotam 2. sv. vojne preživel, saj so med obleganjem Leningrada (danes Sankt Peterburg) sovjetski inštitutski raziskovalci med napadi nacistov raje stradali, kot da bi jedli gomolje iz zbirke krompirja (Elina in sod., 2005). Do leta 2017 se je zbirka na inštitutu VIR povečala na več kot 330 000 akcesij iz skoraj 2200 rastlinskih vrst (Dzyubenko, 2018). V 20. stoletju so bile za namene shranjevanja, evidentiranja in raziskovanja genskih virov poleg inštituta VIR ustanovljene tudi druge inštitucije z genskimi bankami, npr. Mednarodni center za krompir v Peruju (ang. International Potato Center), Commonwealth zbirka krompirja na Škotskem (ang. Commonwealth Potato Collection), ki danes deluje v okviru inštituta James Hutton (The James Hutton Institute, 2022), zbirka krompirja Groß Lusewitz v Nemčiji (Groß Lusewitz Potato Collection), krompirjeva genska banka Združenih držav Amerike (ang. US Potato Genebank) in nizozemsko-nemška zbirka krompirja v Wageningnu na Nizozemskem (ang. Dutch-German Potato Collection) (Bradshaw in sod., 2009; Birch in sod., 2012).

#### **2.3.4 Žlahtnjenje krompirjevih sort z odpornostjo proti krompirjevi plesni – vzpon genov *R***

Žlahtnjenje krompirjevih sort z odpornostjo proti krompirjevi plesni se je pričelo na začetku 20. stoletja z angleškim žlahtniteljem Radcliffom Salamanom, ki je pri svojem žlahtnjenju krompirja uporabil rastlino *Solanum demissum* (Slika 6). Gre za divjo vrsto krompirja in majhno rastlino, ki razvije zelo podolgovate stolone in je prilagojena le na kratke dneve, zato je v Angliji, kjer je deloval Radcliffe Salaman, le redko proizvedla gomolje. Radcliffe Salaman je med svojim delom opazil, da je *S. demissum* izražala dokaj visoko odpornost proti krompirjevi plesni, v nekaterih primerih pa je bila praktično popolnoma odporna. Vrsto *S. demissum* je zato pričel pri svojih hibridizacijah uporabljati kot materno rastlino. Hibridi, ki so pri tem nastali, so razvili podolgovate stolone in majhne gomolje, ki so dozoreli pozno, s krajšanjem dolžine dneva; hkrati so izražali visoko odpornost proti krompirjevi plesni, na podlagi česar je Radcliffe Salaman sklepal, da je odpornost v *S. demissum* prisotna kot dominantna lastnost, ki se deduje po Mendlovih zakonih (Turner, 2005).



V tem obdobju so v Nemčiji v žlahtniteljskih programih ravno tako potekali hibridizacijski poskusi med komercialnimi sortami in divjimi vrstami krompirja. Pod vodstvom Karla Müllerja so prišli do enakega zaključka, da se odpornost deduje kot dominantna lastnost po Mendlovem dedovanju (Turner, 2005). Genetik William Black iz inštituta Scottish Plant Breeding Station (The James Hutton Institute, 2022) je pri svojem delu z divjo vrsto *S. demissum* odkril, da le-ta vsebuje najmanj štiri odpornostne gene (*R1*, *R2*, *R3* in *R4*), ki so se dedovali kot dominantni geni in so nato po prenosu v komercialne sorte izražali visoko odpornost proti krompirjevi plesni (Turner, 2005).



**Slika 6: Herbarijski primerek divje vrste krompirja *Solanum demissum* (levo) in v naravnem okolju (desno) (*Solanum Demissum*, 2022)**

S tem znanjem je bil tako glavni cilj žlahtniteljskih programov razviti krompirjeve sorte z odpornostjo proti krompirjevi plesni, medtem ko so bili pridelek in ostale agronomske lastnosti sekundarnega pomena. Hibridizacije komercialnih sort krompirja z divjimi vrstami so v tem obdobju bile glavna strategija razvoja novih krompirjevih sort, vendar so F1 križanci pogosto poleg odpornosti proti krompirjevi plesni izražali tudi neželene lastnosti starševskih divjih vrst, ki jih je bilo potrebno izriniti. V ta namen so se žlahtnitelji poslužili dveh metod povrnitve zelenih agronomskih lastnosti. Prva je bila samooprašitev perspektivnih hibridov, kjer so z vsako generacijo potomcev za nadaljnje samoopraševanje odbrali le tiste, ki so poleg visoke odpornosti imeli tudi dobre agronomske značilnosti. Najbolj perspektivno linijo hibridov so nato namnožili vegetativno in na trg uvedli novo krompirjevo sorto. Druga metoda povrnitve zelenih agronomskih lastnosti so bila povratna križanja, kjer so perspektivne hibride povratno križali s komercialnimi sortami z dobrimi agronomskimi lastnostmi. Pridobljene potomce so nato večkrat povratno križali s starševsko komercialno sorto, dokler niso pridobili potomca z dobrimi agronomskimi lastnostmi, ki je še vedno izražal odpornost proti krompirjevi plesni. Ta način je sicer omogočil določeno mero predvidljivosti v izraženih lastnostih, vendar je bil celoten postopek dolgotrajen in naporen, saj je bilo z vsako generacijo potrebno pregledati več tisoč sejancev tako za odpornost kot tudi za tvorbo in

obliko gomoljev ter količino pridelka. S postavitvijo in uporabo rastlinjakov so žlahtnitelji sejance umetno izpostavili rastlinskemu patogenu, s čimer niso bili več odvisni od naravnih okužb na polju, ter tako zmanjšali zahtevano količino dela. Celoten postopek s povratnimi križanji je kljub temu trajal najmanj deset let, preden so žlahtnitelji na trg sprostili novo krompirjevo sorto (Turner, 2005). Kljub napornemu in dolgotrajnemu razvoju odpornih krompirjevih sort je do leta 1952 iz različnih žlahtniteljskih programov na trg prišlo več kot dvajset novih sort, ki so vsebovale posamezne gene *R*, npr. Craigs Snow White z genom *RI* (Bradshaw, 2021) iz Škotske, Kennebec z genom *RI* iz ZDA in Pentland Ace z genom *R3* (Report to the Annual General Meeting, 1952), za katero je bilo nedavno dokazano, da je vsebovala dva gena *R3a* in *R3b* (Armstrong in sod., 2019).

Čeprav so sprva nove krompirjeve sorte izražale odpornost proti krompirjevi plesni, se je po letu 1932 pojavilo vedno več poročanj o nenadnem propadu do tedaj odpornih sort. Fitopatološke raziskave na krompirjevih nasadih so sočasno tako v Nemčiji kot tudi v Angliji potrdile odkritje novih sevov oomicet *P. infestans*, ki so lahko premagali bodisi posamezen gen *R* bodisi kombinacijo štirih do takrat poznanih genov *R* (Turner, 2005). Okrog leta 1952 sta William Black iz Škotske in Cees Mastenbroek iz Nizozemske pričela z natančnimi genetskimi raziskavami na divji vrsti *S. demissum*, hkrati pa sta želela razviti set krompirjevih rastlin, ki bi služile kot testne rastline za umetno inokulacijo s *P. infestans*, s čimer bi na podlagi odziva testiranih rastlin določili raso *P. infestans*. Nomenklatura ras *P. infestans* je bila tako določena glede na sposobnost okužbe rastlin s posameznim genom *R*. Rasa 2 je tako lahko premagala krompirjevo sorto, ki je vsebovala le gen *R2*, medtem ko je rasa 0 lahko uspešno okužila le sorte brez odpornostnih genov (Turner, 2005). Sčasoma so se razvile tudi populacije *P. infestans* t. i. kompleksnih ras, ki so lahko okužile več genov *R*, npr. rasa 1.2.3., ki je lahko napadala katerokoli kombinacijo genov *RI*, *R2* in *R3*. Do leta 1968 je bilo odkritih enajst genov *R* iz divje vrste *S. demissum*, iz katerih sta Black in Mastenbroek ločeno razvila svoj set t. i. diferencialnih rastlin, ki so vsebovale le posamezen gen *R* iz serije enajstih genov *R* (Mastenbroek, 1952; Black in sod., 1953) in so še danes uporabljene za določitev ras *P. infestans* ter pri raziskavah odpornosti krompirja proti krompirjevi plesni (Bradshaw, 2021). Čeprav bi morale diferencialne rastline vsebovati le posamezen gen *R*, je bilo leta 2012 v raziskavi Kim in sod. (2012) dokazano, da mnoge diferencialne rastline vsebujejo več genov *R*.

### **2.3.5 Žlahtnjenje krompirjevih sort z odpornostjo proti krompirjevi plesni – padec genov *R***

Z razvojem novih populacij *P. infestans*, ki so kmalu po pojavu odpornih krompirjevih sort le-te lahko kmalu popolnoma okužile, so žlahtnitelji postopoma pričeli dvomiti, da bi odpornost, posredovana s posameznimi geni *R*, lahko bila dolgotrajna. Dodaten

pesimističen pogled na odpornost genov *R* je podal tudi John Neiderhauser, ki je leta 1952 raziskoval populacije oomicete *P. infestans* in divje vrste krompirja ter njihovo odpornost proti krompirjevi plesni na območju Mehike, konkretno v dolini Toluca. Skupaj z Wilfordom Millsom sta odkrila, da ima dolina Toluca, ki se nahaja na približno 2500 m nadmorske višine in ima z obilno količino padavin ter hladnimi temperaturami ponoči med poletno deževno sezono, idealne pogoje za uspešno širjenje *P. infestans*. Mnoge divje vrste krompirja, npr. *S. demissum*, *S. cardiophyllum* in *S. bulbocastanum*, so na tem območju konstantno izpostavljene krompirjevi plesni. Z nadaljnjimi raziskavami odpornosti divjih vrst krompirja sta ugotovila, da je vrsta *S. demissum* na polju izražala simptome krompirjeve plesni le do določene mere, v rastlinjaku pa je *P. infestans* lahko uspešno okužila vse primerke te vrste (Turner, 2005). Ostale divje vrste krompirja so izražale višjo stopnjo odpornosti proti krompirjevi plesni kot *S. demissum*, vendar nobena izmed njih ni bila popolnoma odporna. Poleg tega pa najbolj perspektivnih divjih vrst krompirja, npr. *S. cardiophyllum* z visoko odpornostjo proti krompirjevi plesni (Thieme in sod., 2010), ni bilo mogoče uporabiti v žlahtnjenju krompirjevih sort, saj je bila večina križanj neuspešna (Jackson in Hanneman, 1999).

Posledično sta Neiderhauser in Mills prišla do pesimističnega zaključka, da je nepopolna odpornost divjih vrst krompirja največ, kar lahko žlahtnitelji dosežejo pri razvoju odpornih krompirjevih sort, saj obstaja zelo velika verjetnost, da bodo taiste rase *P. infestans*, ki imajo sposobnost okužiti divje vrste, lahko okužile tudi novo razvite krompirjeve sorte (Turner, 2005). Neiderhauser je zato predlagal, da se žlahtnitelji namesto genom *R* posvetijo t. i. delni oz. poljski odpornosti, saj so v tistem obdobju obstajale tudi sorte, ki niso vsebovale genov *R*, vendar so kljub temu izražale določeno variabilno stopnjo odpornosti proti krompirjevi plesni, ki ni bila definirana s hipersenzitivnim odzivom. Sicer o poljski odpornosti takrat ni bilo veliko poznanega in so jo smatrali kot stranski produkt pozne dozorelosti ter kot poligeno lastnost. Dodatno odkritje v sredini 20. stoletja je bila heterotaličnost oomicete *P. infestans* in definiranje dveh paritvenih tipov, A1 in A2. Na podlagi tega odkritja sta Neiderhauser in Mannon Gallegly testirala skoraj 150 izolatov *P. infestans* iz ZDA in Mehike, da bi poskušala pridobiti oospore in določiti paritveni tip. Ugotovila sta, da so vsi izolati iz ZDA pripadali le enemu paritvenemu tipu (A1), medtem ko so izolati iz Mehike pripadali obema. Nadaljnje raziskave so pokazale, da sta bila paritvena tipa pri izolatih iz Mehike razdeljena v razmerju blizu 1:1, kar je nakazovalo, da so se populacije *P. infestans* v Mehiki razmnoževale predvsem s spolnim razmnoževanjem preko oospor (Grünwald in sod., 2001; Flier in sod., 2003). Razlog, zakaj paritvenega tipa A2 ni bilo mogoče najti izven območja Mehike, pa so pripisali temu, da so okužene pošiljke krompirja vsebovale le paritveni tip A1 in nikoli tip A2 (Fry in sod., 1992). Kljub takrat skopemu znanju je poljska odpornost predstavljala potencial za razvoj trajno odpornih krompirjevih sort. Čeprav so divje vrste krompirja rastle na območju virulentnih populacij *P. infestans*, razvitih s spolnim razmnoževanjem, so še vedno izražale dobro stopnjo poljske

odpornosti, torej bi tudi novo razvite sorte krompirja s poljsko odpornostjo iz virov divjih vrst (*S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. verrucosum* in *S. phureja*) lahko izražale trajno t. i. horizontalno odpornost tudi proti kompleksnim rasam *P. infestans*. Poljski poskusi so pokazali, da so nove izboljšane sorte s trajno odpornostjo res imele nižjo stopnjo okuženosti ne glede na uporabljen izolat plesni (van der Plank, 1963), vendar kljub intenzivnemu žlahtnjenju popolna horizontalna odpornost nikoli ni bila dosežena.

Žlahtniteljski programi krompirja so se od sredine 20. stoletja spopadali z obsežnimi spremembami na področju pridelave krompirja. Razvoj novih sort s poljsko odpornostjo proti krompirjevi plesni je bilo vse prej kot enostavno, saj je določevanje stopnje poljske odpornosti lahko najbolj zanesljivo potekalo le na polju, kar je zahtevalo več delovne sile. Poleg tega so dodatno težavo predstavljale nove divje vrste krompirja, ki so bile večinoma diploidne in jih je bilo posledično bistveno težje križati v primerjavi z vrsto *S. demissum*. Z novimi metodami manipulacije ploidnosti so do določene mere lahko žlahtnitelji te težave premostili, vendar so po povratnih križanjih naleteli na nove ovire, saj se je poljska odpornost sicer dobro prenesla na generacijo F1, vendar je z vsako generacijo povratnega križanja vedno bolj izzvenela (Turner, 2005). S strani pridelovalcev se je povpraševanje po odpornih krompirjevih sortah zmanjšalo zaradi dveh razlogov, ki sta medsebojno vplivala drug na drugega. Prvi je bil razvoj novih fungicidov, ki so nadomestili škropilno bordojsko mešanico ter nekatere druge organske fungicide (Ivanov in sod., 2021). Med glavnimi novo razvitimi fungicidi so bili predvsem sistemski fungicid, sprva furalaksil, ki je na trg prispel leta 1977, in zatem metalaksil (Turner, 2005). Oba fungicida imata sposobnost prodiranja in širjenja po rastlinskem žilnem sistemu in tako lahko zaščitita tudi novo zrastle predele rastlin po aplikaciji (Ivanov in sod., 2021). Fungicidi so tako postali ključna strategija v boju proti krompirjevi plesni, s čimer se je potreba po odpornih krompirjevih sortah zmanjšala. Sočasno se je, predvsem v Severni Ameriki, industrija predelave krompirja hitro razširila in je s svojimi specifičnimi zahtevami o kvaliteti, obliki ter drugih predelovalnih lastnostih krompirja močno vplivala na pridelovalce in njihovo izbiro sort, ki so bile zelo občutljive na različne krompirjeve bolezni. Tipična primera tovrstne preusmeritve se je zgodila z že omenjeno sorto Russet Burbank iz ZDA in Bintje z Nizozemske z visoko občutljivostjo na krompirjevo plesen, ki sta se obe lahko na krompirjevih nasadih ohranili še več kot 100 let zaradi svoje visoke kvalitete in obstojnosti za predelavo ter zaradi obsežne uporabe fungicidov (Haverkort in sod., 2009). Nekateri žlahtniteljski programi, predvsem v državah v razvoju, npr. v Južni Ameriki, so v tem obdobju ohranjali svoj fokus na odpornost proti boleznim in škodljivcem, saj so ravno na teh območjih želeli okrečiti neodvisnost in izboljšati ekonomsko situacijo malih kmetov, ki bi sicer bili popolnoma odvisni od konstantne uporabe dragih fungicidov (Turner, 2005).

### 2.3.6 Piramidenje genov *R* in razvoj sodobnih molekularnih tehnik

Uporaba fungicidov za zatiranje krompirjeve plesni je sicer bila učinkovita, vendar je bila hkrati konkreten finančni zalogaj, med drugim tudi zaradi pogostosti škropljenja krompirjevih nasadov. Poleg čedalje bolj perečega vpliva prekomerne uporabe kemičnih sredstev na okolje in ljudi (Birch in sod., 2012) so se po letu 1977 predvsem v Evropi pričele pojavljati agresivne populacije *P. infestans* z odpornostjo na metalaksil (Mariette in sod., 2016b). Nove populacije *P. infestans* so se razvile kot posledica intenzivnega spolnega razmnoževanja zaradi pojava paritvenega tipa A2, ki je bil do tedaj razširjen le v Mehiki (Fry in sod., 1992) ter selekcijskega pritiska zaradi prekomerne uporabe fungicidov (Ivanov in sod., 2021). Potreba po odpornih krompirjevih sortah se je tako ponovno povečala, žlahtniteljski programi pa so se zaradi počasnega napredka pri razvoju sort s poljsko odpornostjo ponovno preusmerili na vključevanje genov *R* iz različnih divjih krompirjevih vrst in sort oz. t. i. piramidenje genov *R* (Machida-Hirano, 2015). Konec 20. in v začetku 21. stoletja so žlahtniteljski programi z vzponom novih hibridizacijskih tehnik, predvsem manipulacije ploidnosti in novih metod molekularne genetike na nivoju molekul DNA, v divjih vrstah krompirja odkrili nove vire genov *R* in jih vključili v križanja (Gebhardt in Valkonen, 2001). Z razvojem DNA markerjev, ki so bazirali na točkovnih mutacijah oz. polimorfizmi posameznega nukleotida (ang. Single Nucleotide Polymorphism – SNP), insercijah ali delecijah fragmentov DNA, so lahko analizirali celotne genome tako divjih vrst krompirja kot tudi pridelovalnih sort krompirja ter na podlagi rezultatov sestavili karte genske povezanosti (ang. linkage map).

Prve karte genske povezanosti so nastale z mapiranjem šestih spolno nekompatibilnih divjih vrst z uporabo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov oz. markerjev RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) (Gebhardt in sod., 1991). Kasneje so poleg markerjev RFLP za sestavo kart genske povezanosti uporabili tudi polimorfizme dolžin pomnoženih fragmentov oz. markerje AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP) (Collins in sod., 1999; Ghislain in sod., 2004), markerje RAPD oz. naključno pomnožena polimorfna DNA (ang. Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD) (Ghislain in sod., 2001) ter mikrosatelite ali enostavne ponovljive sekvence (ang. Simple Sequence Repeats – SSR) (Collins in sod., 1999; Ghislain in sod., 2004). Z uporabo kart genske povezanosti so tako lahko določili lokacije pomembnih lokusov, ki vsebujejo gene za monogene in poligene odpornosti proti različnim patogenom, med njimi tudi proti *P. infestans* (Gebhardt in Valkonen, 2001). Leta 2006 so van Os in sod. (2006) sestavili natančno in gosto karto genske povezanosti z uporabo več kot 10 000 markerjev AFLP. Prvi geni *R*, ki so bili locirani na kartah genske povezanosti, so izvirali iz divje vrste *S. demissum*, med njimi geni *R1*, *R2*, *R3*, *R6* in *R7*, kasneje so sledili tudi drugi (Śliwka in Zimnoch-Guzowska, 2013). Razvoj tehnik pozicijskega kloniranja je omogočil izolacijo posameznih genov *R* iz rodu *Solanum*, kar je nato omogočilo tudi kloniranje funkcionalnih alelov znotraj iste ali druge vrste, s čimer

so lahko določili frekvenco alelov znotraj genskega lokusa (Pel, 2010). Prvi klonirani geni *R* so bili geni *RI* (Ballvora in sod., 2002) in *R3a* iz vrste *S. demissum* (Huang, 2005a) ter *Rpi-blb1* in *Rpi-blb2* iz vrste *S. bulbocastanum* (Vossen in sod., 2003, 2005).

Identifikacija in izolacija genov *R* je omogočila razvoj specifičnih molekularnih markerjev, npr. s sekvenco okarakterizirane pomnožene regije (ang. Sequence Characterized Amplified Region – SCAR) in z razrezanimi pomnoženimi polimorfnimi sekvencami (ang. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – CAPS), ki so postali ključni elementi pri žlahtnjenju novih odpornih krompirjevih sort s pomočjo t. i. selekcije s pomočjo markerjev (ang. Marker-Assisted Selection – MAS) (Gebhardt in sod., 2004; Colton in sod., 2006; Wang in sod., 2008; Śliwka in sod., 2010; Tiwari in sod., 2013; Chen in sod., 2017; Islam in sod., 2018; Stefańczyk in sod., 2020; Beketova in sod., 2021). Z uporabo naštetih molekularnih metod je bilo do danes odkritih in mapiranih več kot 70 genov za odpornost proti *P. infestans* (geni *Rpi* – ang. Resistance against *P. infestans*) v 32 vrstah iz rodu *Solanum* (Paluchowska in sod., 2022), med njimi najbolj nedavno identificiran gen *Rpi-amr1* iz divje vrste *S. americanum* (Witek in sod., 2021). V zadnjih dvajsetih letih je bilo odkritih 34 divjih sorodnikov krompirja, ki izražajo visoko odpornost proti krompirjevi plesni, vendar pripadajoči geni *R* še niso bili identificirani (Paluchowska in sod., 2022).

Leta 2011 je bilo s sodelovanjem raziskovalcev v okviru Konzorcija za krompirjev genom prvič določeno zaporedje krompirjevega genoma z uporabo strategije t. i. Whole-Genome Shotgun Sequencing (WGS), kjer so našli 408 genov, ki kodirajo NB-LRR odpornostne proteine *R*. S primerjavo do zdaj poznanih zaporedij funkcionalnih genov *R* so odkrili, da je približno 39 % NB-LRR genov psevdogenov, ki so nastali z insercijami, delecijami ali premikom bralnega okvirja (ang. frameshift mutation), kar nakazuje na prilagoditev rastlinskih proteinov *R* na novo razvite efektorske proteine oomicete *P. infestans* (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011). Kasneje so v istem zaporedju krompirjevega genoma s pomočjo tehnologije sekvenciranja RenSeq (ang. Resistance Gene Enrichment and Sequencing) in anotacijo genov *R* identificirali več kot 750 NB-LRR genov (Jupe in sod., 2013).

Poleg določitve zaporedja genoma današnje tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (ang. Next Generation Sequencing – NGS) omogočajo hitrejšo identificiranje in mapiranje novih genov *R* predvsem v do zdaj še neraziskanih divjih vrstah krompirja, katerih zaporedja genomov še niso bila določena. Nedavni primer tovrstnih raziskav je identifikacija genov *Rpi-amr3* (Witek in sod., 2016) in *Rpi-amr1* (Witek in sod., 2021), kjer so z uporabo metod RenSeq ter SMRT sekvenciranja (ang. Single-Molecule Real-Time Sequencing) točno mapirali gene *R* v genomu divje vrste *S. americanum*. Z uporabo metod sekvenciranja RenSeq in GenSeq (ang. Generic-Mapping Enrichment Sequencing) pa so Chen in sod., (2018) uspešno identificirali, karakterizirali in mapirali gen *Rpi-ver1*

iz divje vrste *S. verrucosum* s širokim spektrom odpornosti (ang. broad-spectrum resistance).

Sočasno z razvojem metod molekularne genetike na strani rastlin oz. krompirja se je razvilo novo področje, ki temelji na osnovni interakciji gen-za-gen (Flor, 1971) med efektorji in proteini R, poimenovana efektoromika. Gre za visoko zmogljivo metodo funkcionalne genomike, kjer lahko z efektorji testiramo rastline za prisotnost genov *R* s pomočjo prehodne agroinfiltracije. Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* ob okužbi rastlin prenese gene, ki se nahajajo na regiji T-DNA, kamor lahko z manipulacijo molekule DNA vstavimo želeno zaporedje za efektorski gen. Z infiltracijo bakterijske suspenzije *A. tumefaciens* v liste testiranih rastlin se transgeni na regiji T-DNA prenesejo v jedro rastlinske celice, kjer se izražajo le za kratek, prehodni čas, običajno nekaj dni (Ran in sod., 2017).

Z določitvijo zaporedja genoma *P. infestans* (Haas in sod., 2009) je bilo možno identificirati več sto kandidatnih efektorskih genov, zato se je efektoromika sprva razvila ravno na interakciji med krompirjevimi rastlinami ter *P. infestans* (Vleeshouwers in Oliver, 2014). Efektoromika je pri žlahtnjenju odpornih krompirjevih sort uporabna na več načinov, med drugim pospešuje postopek kloniranja genov *R*, saj lahko hiter test funkcionalnosti genov *R* opravimo s prehodno agroinfiltracijo namesto na stabilno transformiranih rastlinah, katerih razvoj je časovno zelo zahteven. Poleg tega efektoromika omogoča lažjo identifikacijo in določitev funkcionalnih genov *R* tudi v divjih vrstah krompirja. Pogosto lahko določene gene *R* najdemo v vrstah, ki so spolno nekompatibilne z navadnim krompirjem, zato je prenos teh genov *R* otežen (Vleeshouwers in Oliver, 2014). Z agroinfiltracijo efektorjev lahko najdemo funkcionalne homologe istih genov v drugih divjih vrstah krompirja, ki so bolj kompatibilne za križanje (Vleeshouwers in sod., 2008). Najbolj uporabna aplikacija efektoromike je natančna določitev vsebnosti genov *R* v testiranih križancih, sortah in tudi divjih vrstah krompirja, pri čemer se je izkazala kot zelo zanesljiva metoda v primerjavi z uporabo setov diferencialnih rastlin, za katere je bilo leta 2012 dokazano z uporabo efektorjev, da ne vsebujejo le posameznih genov, kot je bilo sprva mišljeno ob njihovem razvoju (Kim in sod., 2012; Rietman in sod., 2012). Ena izmed predlaganih aplikacij efektoromike je tudi profiliranje populacije *P. infestans* za vsebnost efektorjev, na podlagi katerih se nato lahko odločimo, katere gene *R* vključiti v žlahtnjenje za razvoj trajne odpornosti s širokim spektrom (Vleeshouwers in sod., 2011; Vleeshouwers in Oliver, 2014).

S klasičnimi tehnikami žlahtnjenja so v zadnjih treh desetletjih nastale številne nove krompirjeve sorte s piramidenjem genov *R* in so izražale dobro odpornost proti krompirjevi plesni. Zaradi tetraploidnosti in visoke heterozigotnosti krompirja je klasično žlahtnjenje počasno, poleg tega pa pogosto vključuje divje sorodnike krompirja, katerih potomci pogosto izražajo mnogo »divjih« lastnosti. Krompirjevi sorti Toluca in Bionica,

ki vsebujeta gen *Rpi-blb2* in sta na trg prišli okrog leta 2006 in 2008, so s klasičnim žlahtnjenjem razvijali kar 46 let (Haverkort in sod., 2009).

Z razvojem modernih metod genske transformacije so se odprle nove možnosti za hitrejši razvoj odpornih krompirjevih sort s širokim spektrom odpornosti genov *R*, kloniranih iz številnih novo odkritih divjih vrst krompirja (Haesaert in sod., 2015). Leta 2011 je bila tako v Nemčiji razvita nova sorta Fortuna, kjer so z agrobakterijsko transformacijo vstavili gena *Rpi-blb1* in *Rpi-blb2* iz divje vrste *S. bulbocastanum* v sorto Fontane. V petletnih poljskih poskusih je bila sorta Fortuna vedno odporna proti krompirjevi plesni (Storck in sod., 2011). Zhu in sod. (2012) so v sorto Desiree uspešno vstavili kar tri gene *R* (*Rpi-sto1*, *Rpi-vnt1.1* in *Rpi-blb3*) iz divjih vrst *S. stoloniferum*, *S. venturii* in *S. bulbocastanum*. Haesaert in sod. (2015) so prav tako v sorto Desiree vstavili iste gene *R* ter uspešno transformirane rastline testirali v petletnih poljskih poskusih, kjer so izražale popolno stopnjo odpornosti tudi proti agresivnemu izolatu *P. infestans* IPO-C. Popolno odpornost proti krompirjevi plesni so v večletnih poljskih poskusih izražale tudi transformirane rastline sorte Desiree z vstavljenimi geni *RB*, *Rpi-blb2* in *Rpi-vnt1.1* (Ghislain in sod., 2019). Zhu in sod. (2015) so z uporabo genskih tehnologij razvili nov set diferencialnih rastlin s transformacijo sorte Desiree, s čimer so nadomestili do tedaj uporabljen set diferencialnih rastlin, razvit v 50. letih prejšnjega stoletja (Mastenbroek, 1952; Black in sod., 1953), izmed katerih so nekatere rastline vsebovale več genov *R* (Kim in sod., 2012).

Visok potencial za pridobitev odpornih transformiranih krompirjevih rastlin ima tudi strategija utišanja t. i. občutljivostnih genov (ang. susceptibility (*S*) genes), ki jih patogeni med svojo okužbo lahko izkoristijo za lažje širjenje (Eckardt, 2002). Na podlagi rezultatov raziskave Huibers in sod. (2013), kjer je utišanje dveh paradižnikovih genov *S* (*PMR4* in *DMR1*) privedlo do zmanjšane rasti in razmnoževanja patogena *Oidium neolycopersici*, so Sun in sod. (2016) identificirali ortologe genov *S* v krompirju. Utišanje petih izmed skupno enajstih genov *S*, je privedlo do popolne odpornosti proti *P. infestans*. Izguba funkcije genov *S* in z njo povezana odpornost se deduje recesivno, zato je to lastnost težko vključiti v žlahtnjenje avtotetraploidnega krompirja. Z razvojem novih tehnologij genske modifikacije predstavlja utišanje genov *S* nov vir visoke odpornosti krompirja proti krompirjevi plesni.

V okviru projekta DuRPh so znanstveniki na Nizozemskem razvili metodo genske transformacije rastlin, poimenovana cisgeneza, ki za razliko od transgeneze za vključitev v genom krompirja uporablja le gene *R*, pridobljene iz divjih vrst rodu *Solanum*, ki so spolno kompatibilni za križanje z navadnim krompirjem (Haverkort in sod., 2016). S cisgenezo se v transformirano rastlino vključi naravno pripadajoč promotor gena *R*, zato vstavljen gen ne vpliva na izražanje ostalih genov v transformirani rastlini. Poleg tega se za razliko od potomcev križanja v transformiranih rastlinah izražajo le tisti geni, ki so bili



vstavljeni s cisgenezo, medtem ko se pri potomcih klasičnega križanja lahko izražajo tudi druge neželene lastnosti, ki so jih podedovale iz divje starševske rastline (Haverkort in sod., 2008). Cisgene rastline so tako povsem primerljive s krompirjevimi rastlinami, pridobljene s klasičnimi tehnikami žlahtnjenja (Schouten in sod., 2006a, 2006b).

Poglavitna ovira pri razvoju gensko spremenjenih rastlin v Evropi je Direktiva o Gensko spremenjenih organizmih (GSO) 2001/18/EC, ki jo je izdal Evropski parlament 12. marca 2001 (Direktiva 2001/18/ES ..., 2001). Le-ta govori o namernem sproščanju GSO v okolje, pri čemer je transgene rastline označila kot enakovredne cisgenim rastlinam, čeprav cisgene rastline vsebujejo le gene iz istega genskega sklada, ki bi jih lahko vključili tudi s klasičnimi tehnikami križanja (Schouten in sod., 2006a, 2006b). Na pobudo Evropske komisije, na katero je bilo naslovljenih veliko kritik o enakovredno strogem obravnavanju cisgenih rastlin s transgenimi (Schouten in sod., 2006a, 2006b; Jacobsen in Schouten, 2007), pa je leta 2012 Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) izdala znanstveno mnenje o oceni varnosti gensko spremenjenih rastlin, razvitih s cisgenezo in intragenezo. EFSA je podala zaključek, da so tveganja cisgenih rastlin primerljiva s tveganji rastlin, razvitih s tradicionalnim žlahtnjenjem, vendar morajo še vedno biti regulirana enako kot transgene rastline (EFSA, 2012). Veliko novih možnosti in potenciala je odprla tudi nedavno razvita tehnologija CRISPR/Cas9, s katero so utišali občutljivostne gene v sortah Desiree in King Edward ter izboljšali njuno odpornost proti krompirjevi plesni (Kieu in sod., 2021). Toda 25. julija 2018 je Evropsko sodišče odločilo, da so rastline, razvite z metodami preciznega žlahtnjenja, med njimi tudi s tehnologijo CRISPR/Cas9, obravnavane kot GSO, in so posledično regulirane z Direktivo o GSO 2001/18/EC iz leta 2001 (Callaway, 2018). Evropska znanstvena skupnost je nato javno pozvala evropske institucije, naj sprejmejo ustrezne javne ukrepe oz. izključijo tehnologijo CRISPR/Cas9 iz direktive, tako kot to velja za tehnike žlahtnjenja z mutagenezo, saj tako kot mutageneza tudi metoda CRISPR/Cas9 povzroči le spremembo tarčnega genoma brez vnosa tujega genskega materiala (Callaway, 2018; Position Paper on the ECJ Ruling on CRISPR, 2019).

Ne glede na problematike, zaviranja in ovire, s katerimi se soočajo sodobne tehnike genskega manipuliranja in tradicionalni žlahtniteljski programi, so v zadnjih tridesetih letih s klasičnimi metodami hibridizacij in križanj na trg prišle krompirjeve sorte s trajno odpornostjo širokega spektra proti krompirjevi plesni (Abuley in Hansen, 2022). Nekatere izmed njih so nizozemske sorte Carolus (izšla leta 2012), Alouette (izšla leta 2014), Twinner (izšla leta 2016) in Twister (izšla leta 2017), francoski sorti Passion (izšla leta 2014) in Tentation (izšla leta 2015) ter v Veliki Britaniji registrirana sorta Sárpo Mira.

### 2.3.7 Razvoj in raziskave na sorti Sárpo Mira z visoko odpornostjo proti krompirjevi plesni

Sorta Sárpo Mira je bila razvita v 90. letih prejšnjega stoletja v okviru madžarskega žlahtniteljskega programa, ki ga je vodil Istvan Sárvári. Program je deloval že od 50. let prejšnjega stoletja in se je fokusiral predvsem na razvoj novih krompirjevih sort, odpornih proti krompirjevi plesni in virusom. Leta 1992 so škotski znanstveniki in pridelovalci pokazali izjemen interes za Sárvárijeve krompirjeve sorte, ki so bile takrat testirane v poljskem poskusu v Romuniji. Šele po dolgotrajnih pogajanjih zaradi nezaupljivosti s strani družine Sárvári do tujcev in predaje znanja so Sárvárijeve krompirjeve sorte postale del danskega podjetja Danespo. Sorte Sárpo, med njimi tudi sorta Sárpo Mira, so od takrat tržene iz Velike Britanije, zaslužek od prodaje pa se namenja družini Sárvári za nadaljnje raziskave in razvoj krompirjevih sort. Posledično rodovnik sorte Sárpo Mira ni bil nikoli poznan, zato se tudi ne ve, od kje izvira visoka odpornost sorte Sárpo Mira na *P. infestans*. Znano je le, da je prvotna skupina madžarskih žlahtniteljev pod vodstvom Sárvárija imela dostop do obsežne sovjetske Vavilove zbirke, ki je nastala v 20. letih prejšnjega stoletja in je vsebovala raznoliko zbirko divjih krompirjevih vrst iz Južne Amerike (Kingsbury, 2009).

Sorta Sárpo Mira med pridelovalci kljub visoki odpornosti proti krompirjevi plesni ni priljubljena zaradi ostalih manj primernih agronomskih lastnosti, npr. pozna dozorelost in rdeča kožica (Vossen in sod., 2016). Kljub temu je sorta Sárpo Mira predmet različnih raziskav izvora visoke odpornosti (White in Shaw, 2009, 2010; Rietman in sod., 2012; Orłowska, 2012a, 2012b; Tomczyńska in sod., 2014; Vossen in sod., 2016; Stefańczyk in sod., 2017; Xiao in sod., 2019), uporabljena pa je tudi kot standardna odporna sorta tako v poljskih kot tudi v laboratorijskih poskusih (Kim in sod., 2012; Haesaert in sod., 2015; Larsen in sod., 2016; Beketova in sod., 2021; Rogozina in sod., 2021; Abuley in Hansen, 2022). Vsebuje štiri kvalitativne *R* gene, *R3a*, *R3b*, *R4* in *Rpi-Smira1* ter en kvantitativni *R* gen, *Rpi-Smira2* (Rietman in sod., 2012), pri čemer je bilo za slednjega dokazano, da gre za homolog gena *R8* (Jo, 2014). Gen *R8* je prisoten tudi v diferencialni rastlini *MaR8* ter v sortah Jacqueline Lee, Missaukee, PB-06 in S-60. Vse omenjene sorte so v poljskih poskusih izražale podobno stopnjo odpornosti na krompirjevo plesen kot Sárpo Mira (Vossen in sod., 2016). Gen *Rpi-Smira2/R8* se nahaja na daljšem kraku kromosoma IX (Jo in sod., 2011) in naj bi najbolj prispeval k visoki stopnji odpornosti sorte Sárpo Mira. Raziskave na F1 potomcih sorte Sárpo Mira so pokazale srednjo ali visoko odpornost na krompirjevo plesen, vendar ni znano, koliko in katere izmed petih *R* genov iz odporne starševske sorte Sárpo Mira so vsebovali (Rietman in sod., 2012). Prav tako so F1 potomci diferencialne rastline *MaR8* kazali različno stopnjo odpornosti proti *P. infestans*, pri čemer je eden izmed F1 potomcev vseboval le gen *R8* in izražal primerljivo stopnjo odpornosti s sorto Sárpo Mira (Kim in sod., 2012). Raziskave na sorti Sárpo Mira so pokazale, da se stopnja odpornosti na *P. infestans* spreminja glede na pogoje, pod katerimi

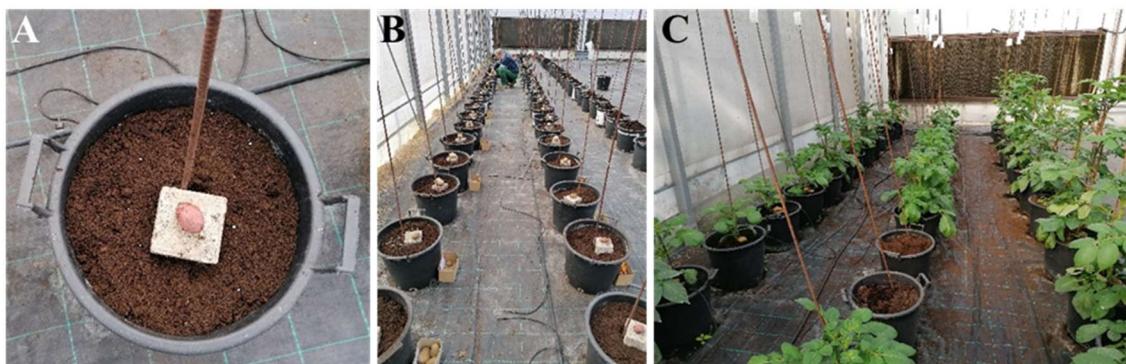
je sorta Sárpo Mira izpostavljena krompirjevi plesni. Tako so bili odrezani listi sorte Sárpo Mira občutljivi na agresiven izolat *P. infestans* IPO-C, medtem ko so cele rastline bile odporne (Rietman, 2011). Do podobnih zaključkov so prišli tudi Orłowska in sod. (2012a), kjer so poleg odrezanih listov brez stranskih poganjkov in celih rastlin sorte Sárpo Mira inokulirali tudi odrezane liste brez stranskih poganjkov, cele rastline brez korenin in cele rastline brez glavnega poganjka. Pokazali so, da korenine in meristemi (bodisi stranski bodisi glavni) vplivajo na stopnjo odpornosti sorte Sárpo Mira na krompirjevo plesen.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

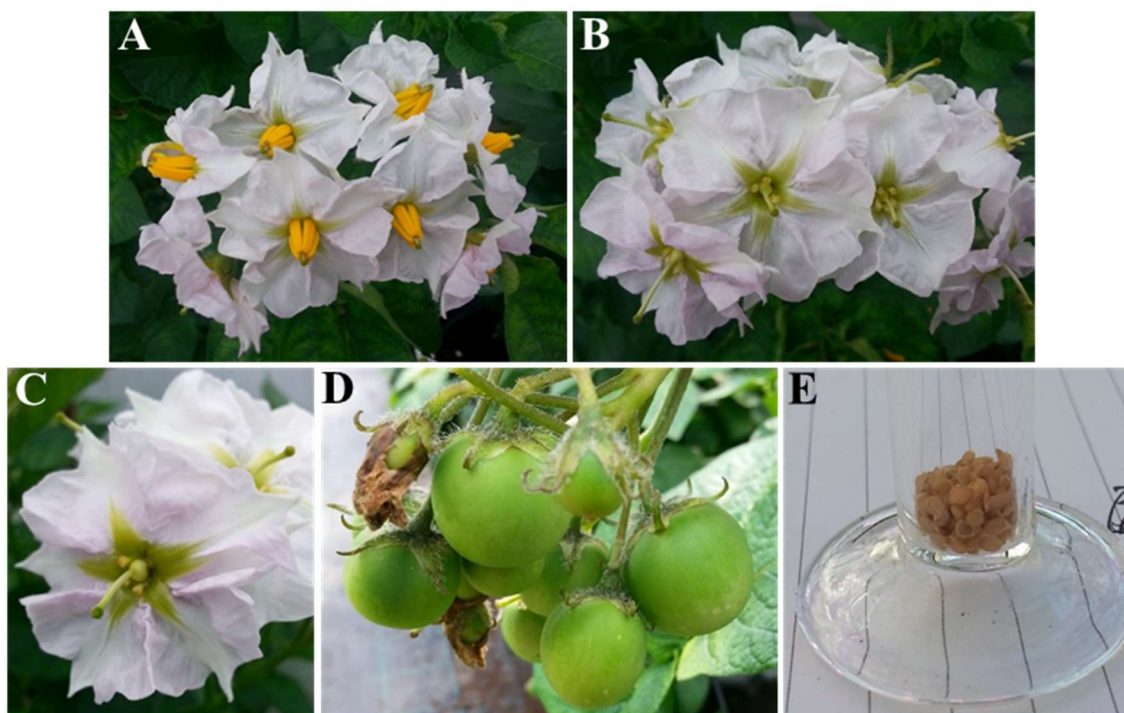
##### 3.1.1 Ročna križanja in pridobitev pravih semen krompirja

Za pridobitev krompirjevih rastlin z večjim številom socvetij smo v rastlinjaku Kmetijskega inštituta Slovenije v Infrastrukturnem centru Jablje v 30 l lonce (TEKU<sup>®</sup>, Pöppelman, Nemčija), napolnjene s komercialnim substratom (Potgrond P, Klasmann-Deilmann, Nemčija) in dodanim NPK (ENTEC Perfect, 14:07:17 (+2+22,5), 10 g/lonec, Royal Brinkam, Nizozemska), na opeko posadili gomolje starševskih sort Rioja, Lusa, Colomba, Bikini, Sylvana in Sárpo Mira (Slika 7A-B). Gomolje smo prekrili s substratom, ki smo ga po vzniku izprali z vodo. Tekom rasti na opeki smo rastlinam odstranjevali stolone ter tako spodbudili rast v višino in razvoj večjega števila socvetij, hkrati pa preprečili odpadanje cvetov in jagod. Rastline so bile namakane kapljično (Slika 7C) in redno škropljene s fungicidi in insekticidi.



**Slika 7:** Sajanje krompirjevih gomoljev na opeko v rastlinjaku KIS v Infrastrukturnem centru Jablje  
A – postavitve gomolja na opeko; B – priprava gomoljev različnih krompirjevih sort; C – zrastle krompirjeve rastline pred cvetenjem.

Sorte, občutljive na krompirjevo plesen (Rioja, Lusa, Colomba, Bikini, Sylvana), so bile določene za materne rastline, visoko odporna sorta Sárpo Mira pa za očetovsko rastlino. Za ročna križanja smo s kovinsko spatulo iz prašnikov očetovske rastline pridobili pelodna zrna in jih nato prenesli na brazdo pestiča materne rastline, pri čemer smo cvetovom maternih rastlin predhodno odstranili prašnike (Slika 8A-C). Ročna križanja med sortama Rioja in Sárpo Mira so potekala v juniju 2016, medtem ko so ostala križanja potekala v juniju 2017. Iz uspešno oplojenih cvetov so se razvile jagode, ki smo jih do končanega zorenja ovili v mrežaste vrečke (Slika 8D). Iz jagod smo nato izločili prava semena (Slika 8E), ki smo jih v avgustu sušili na sobni temperaturi v svetlem prostoru 14 dni.



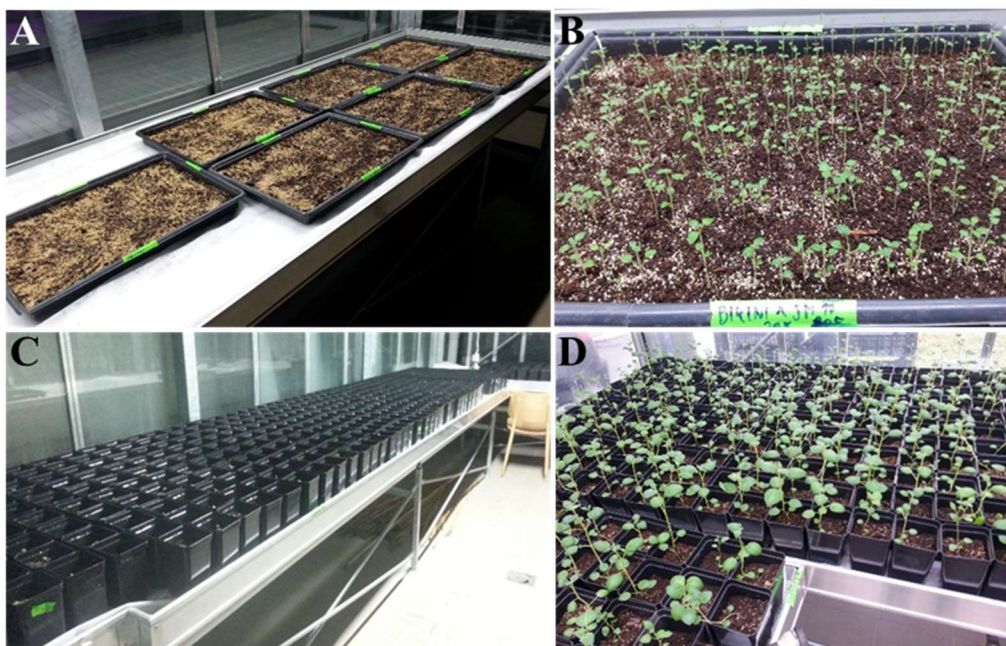
**Slika 8: Postopek ročnega križanja in pridobivanja pravega semena krompirja**

A in B – odstranitev prašnikov iz maternih rastlin; C – nanos pelodnih zrn na brazdo pestiča; D – jagode; E – pravo seme.

### 3.1.2 Vzgoja križancev v rastlinjaku

Prava semena krompirja so bila v novembru 2017 posejana v pladnje, napolnjene s komercialnim substratom (Potgrond P, Klasmann-Deilmann, Nemčija) z dodanim posipom Agra-vermikulit (Pšeno, d.o.o, Hrvaška) v rastlinjaku Kmetijskega inštituta Slovenije v Ljubljani (Slika 9A) z ravnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe (LED-svetila, REFLECTA, Avstrija) in temperaturo  $23 \pm 7$  °C.

Uspešno vzklike rastline (Slika 9B) smo nato presadili v posamične manjše lončke velikosti 10 cm × 10 cm × 20 cm (Slika 9C-D) in tako pridobili populacijo F1 križancev.



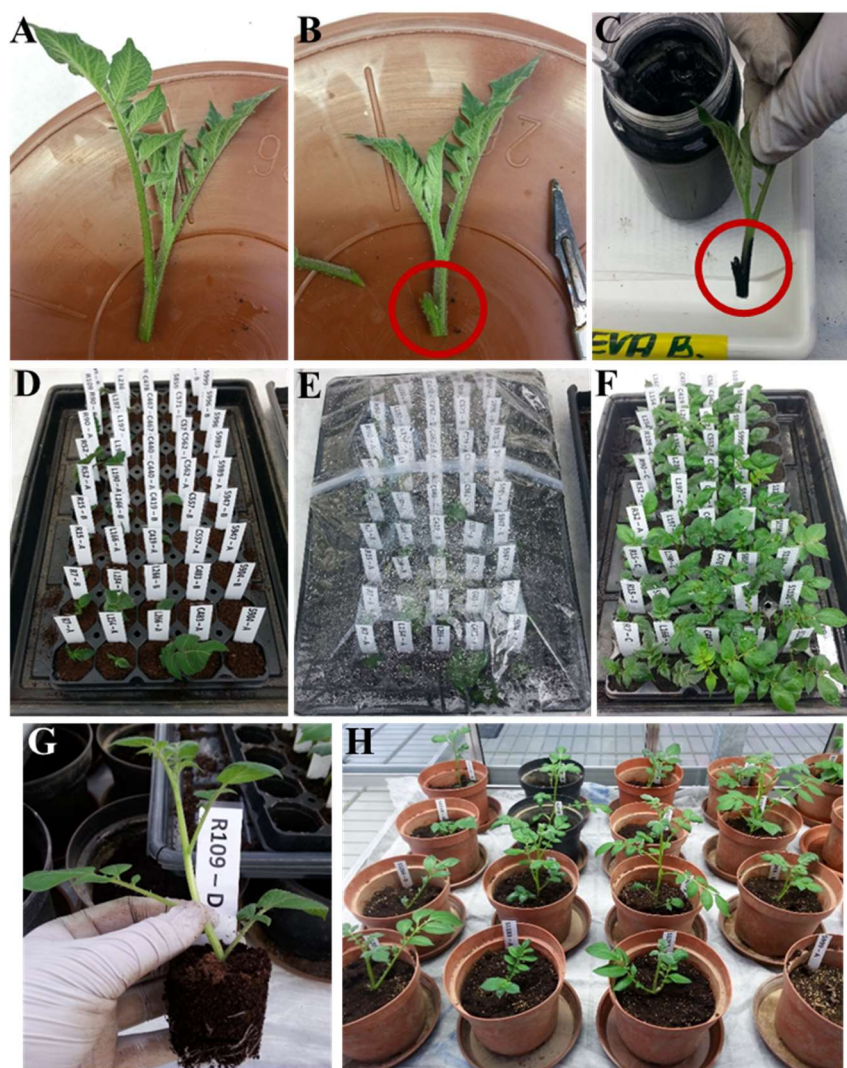
**Slika 9: Vzgoja križancev v rastlinjaku**

A – sajenje pravih semen krompirja v pladnje, napolnjene z zemljo; B – sejanci; C in D – presaditev sejancev v posamezne lonce.

Med odbiro F1 križancev smo odbrane krompirjeve rastline vegetativno namnoževali s stebelnimi potaknjenci z vrhnim (apikalnim) ali stranskim (aksilarnim) poganjkom (Brouwer in sod., 2004; Halterman in sod., 2010; Chen in Halterman, 2017) (Slika 10).

Pred pripravo stebelnih potaknjencev smo v laboratoriju namešali pasto za potaknjence, ki je vsebovala 30 mg  $\alpha$ -naftalenocetne kisline (NAA, Sigma-Aldrich, ZDA) oz. hormona avksin. Le-tega smo najprej raztopili v nekaj kapljicah 1 M NaOH (Merck, ZDA), nato dodali deionizirano vodo ( $dH_2O$ ) do volumna 100 ml in dobro premešali na magnetnem mešalu. Med mešanjem smo v raztopino hormona avksin postopno dodajali aktivno oglje, s katerim smo pasto zgostili do zelene gostote (pasta ne odteče od rastline po namakanju), hkrati pa je bilo dokazano, da spodbuja koreninjenje (Pan in van Staden, 2002).

V rastlinjaku smo odrasli rastlini odbranega križanca odrezali zgornji del, ki je vseboval apikalni meristem in najmanj pet nodijev. Iz takega odrezka stebra smo pridobili tri stebelne potaknjence. Prvi stebelni potaknjencec je vseboval apikalni meristem. Odrezali smo ga približno 0,5 cm pod prvim nodijem, ki smo mu odrezali celoten list (Slika 10A-B). Naslednji stebelni potaknjencec smo pripravili iz drugega nodija, tretjemu nodiju pa smo ponovno odrezali celoten list. Zadnji stebelni potaknjencec smo pripravili iz četrtega nodija, petemu pa smo ponovno odrezali list. Nodiji, ki smo jim odrezali liste, so predstavljali speče nodije, saj smo jih pred saditvijo dobro omočili v pasti za potaknjence s hormonom avksin (Slika 10C), ki spodbuja rast korenin, zavira pa rast poganjkov.



**Slika 10: Postopek priprave krompirjevih potaknjencev**

A – odrezan vrhni poganjek; B – potaknjencev z apikalnim meristemom; C – omočitev potaknjencev v raztopino hormona avksin; D in E – posaditev omočenih potaknjencev v sadilni pladenj in pokrivanje s prozorno folijo; F – zrastle potaknjencev po treh tednih; G in H – sajenje zrastleh potaknjencev v posamezne lonce.

S pasto omočene stebelne potaknjencev smo posadili v rastlinjak (z rastnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe (LED-svetila, REFLECTA, Avstrija), temperaturo  $23 \pm 7 \text{ }^\circ\text{C}$ ) v setvene platoje, napolnjene z dobro zalitim komercialnim substratom (Potgrond P, Klasmann-Deilmann, Nemčija) ter jih prekrili s prozorno polivinilkloridno (PVC) folijo za vzdrževanje visoke zračne vlage (Slika 10D-E). Po enem tednu smo PVC folijo odstranili (Slika 10F) in stebelne potaknjencev redno zalivali vsak drugi dan. Ko so stebelni potaknjencev razvili korenine, apikalni in aksilarni poganjki pa so vidno pričeli z rastjo (približno 14 dni), smo jih presadili v posamezne lonce premera 20 cm (TEKU<sup>®</sup>, Pöppelman, Nemčija) (Slika 10G-H).

### 3.1.3 Odbira genotipov *R8* iz populacije F1 križancev z genskimi markerji

Za pridobitev končne populacije rastlin, ki izmed petih odpornostnih genov iz odporne starševske sorte Sárpo Mira vsebujejo le gen *Rpi-Smira2/R8* (genotipi *R8*), smo F1 križance postopno analizirali z genskimi markerji za odpornostne (*R*) gene *R3a*, *R3b*, *Rpi-Smira1* ter *Rpi-Smira2/R8* in agroinfiltrirali efektorski gen *Avr4* za določitev prisotnosti gena *R4*.

#### 3.1.3.1 Izolacija molekul DNA

Izolacija molekul DNA je potekala s pomočjo aparature za izolacijo nukleinskih kislin MagMax™ Express (Applied Biosystems, ZDA), ki temelji na uporabi magnetnih delcev (ang. MagAttract Technology). S to tehnologijo izolacije nukleinskih kislin se DNA veže na magnetne delce (MagAttract Suspension G, Qiagen, ZDA), ki jih aparatura s pomočjo magnetnih palčk prestavlja v različne alkoholne pufre in absolutni etanol, s čimer se DNA očisti nečistoč ter na koncu eluira v Tris-EDTA pufri za nadaljnjo uporabo.

Za izolacijo molekul DNA iz rastlinskega tkiva smo uporabili komercialno dostopni komplet reagentov BioSprint 15 DNA Plant Kit (Qiagen, ZDA), vendar smo glede na količino uporabljenega rastlinskega materiala prilagodili volumne reagentov v analizi. Iz krompirjevih rastlin (vzgojenih v rastlinjaku, stare štiri tedne) smo odvzeli med 60 in 90 mg listnega tkiva v manjših koščkih, jih predstavili v mikrocentrifugirke ter jim dodali 150 µl lizacijskega pufra RLT in dve jekleni kroglici velikosti 5 mm. Mikrocentrifugirke z vzorci listnega tkiva smo predstavili v aparat za razkrojevanje tkiv TissueLyser (Retsch, Nemčija) za 5 min na maksimalno frekvenco (30 Hz), da so se vzorci homogenizirali. Sledilo je centrifugiranje vzorcev za 11 min pri relativni centrifugalni sili 12.000 g. V tem času smo si pripravili ploščo z vdolbinami (Applied Biosystems, ZDA), primerno za MagMax™ aparaturo in v posamezne vrstice odpipetirali naslednje reagente:

1. vrstica: 90 µl lizata vzorca, 80 µl 2-propanola (Honeywell, ZDA) in 10 µl magnetne suspenzije (MagAttract Suspension G, Qiagen, ZDA), ki smo jo predhodno premešali na stresalniku;
2. vrstica: 200 µl pufra RPW (BioSprint, Qiagen, ZDA) za izpiranje DNA (vsebuje 2-propanol in encim RNaza (BioSprint, Qiagen, ZDA));
3. vrstica: 200 µl absolutnega etanola (Honeywell, ZDA);
4. vrstica: 200 µl absolutnega etanola (Honeywell, ZDA);
5. vrstica: 80 µl Tris-EDTA pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] (Sigma-Aldrich, ZDA).

Vzorci z izoliranimi molekulami DNA smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Kvaliteto izoliranih molekul DNA smo preverili na elektroforezi z 1,4 % agaroznim



gelom. Pri vzorcih, kjer je bila količina pridobljenih molekul DNA manjša ali pa je bila močno fragmentirana, smo izolacijo molekul DNA ponovili.

### 3.1.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) z markerji za gene *R3a*, *R3b*, *Rpi-Smira1* in *Rpi-Smira2/R8*

Po izolaciji molekul DNA iz vzorcev rastlinskega materiala F1 križancev smo opravili verižno reakcijo s polimerazo (PCR) z markerji za štiri odpornostne gene (Preglednica 1). Analizo smo izvedli na dveh cikličnih termostatih, SureCycler 8800 (Agilent Technologies, ZDA) in Veriti (Applied Biosystems, ZDA), pri čemer smo glede na uporabljeni genski marker uporabili dva kompleta reagentov za reakcijo PCR, Kapa3G Plant Kit (Sigma-Aldrich, ZDA) in Biotools (Biotools, Španija) (Preglednica 1).

**Preglednica 1: Uporabljeni genski markerji za selekcijo križancev *R8* z nukleotidnimi zaporedji začetnih oligonukleotidov, temperaturo prileganja ( $T_a$ ), dolžinami pomnoženih fragmentov in uporabljeni PCR reagenti <sup>1</sup>(Huang in sod., 2005a); <sup>2</sup>(Kim in sod., 2012); <sup>3</sup>(Tomczyńska in sod., 2014); <sup>4</sup>(Jo in sod., 2011).**

Gen	Ime markerja	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	$T_a$ (°C)	Dolž. pomn. fr. (bp)	Reagenti	Vir
<i>R3a</i>	Sha	F ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT	60	982	Kapa3G Plant	1
		R CTTCAAGGTAGTGGGCAGTATGCTT				
<i>R3b</i>	R3b	F GTCGATGAATGCTATGTTTCTCGAGA	55	378	Biotools	2
		R ACCAGTTTCTTGCAATTCAGATTG				
<i>Rpi-Smira1</i>	45/XI	F AGAGAGGTTGTTCCGATAGACC	58	1000	Biotools	3
		R TCGTTGTAGTTGTCATTCCACAC				
<i>Rpi-Smira2/R8</i>	184-81	F CCACCGTATGCTCCGCCGTC	55	480 (RsaI)	Kapa3G Plant	4
		R GTTCCACTTAGCCTGTCTTGCTCA				

Reakcijsko mešanico PCR z reagenti Kapa3G Plant smo pripravili v končnem volumnu 14  $\mu$ l (Preglednica 2), mešanico PCR z reagenti Biotools pa v končnem volumnu 14,5  $\mu$ l (Preglednica 3). Program pomnoževanja je bil za oba kompleta reagentov enak, in sicer:

- začetna denaturacija – 4 min pri 95 °C;
- 35 ciklov pri pogojih:
  - 30 s denaturacije pri 95 °C;
  - 30 s prileganja začetnih oligonukleotidov pri temperaturi prileganja -  $T_a$  (Preglednica 1);
  - 1 min sinteze DNA pri 72 °C;
- zaključna elongacija – 5 min pri 72 °C;
- ohlajanje in vzdrževanje – 4 °C.

**Preglednica 2: Reagenti Kapa3G Plant, uporabljeni v 15 µl reakciji PCR**

Komponenta	Volumen reagenta na reakcijo (µl)	Končna koncentracija
Reakcijski pufer (2×)	7,50	1×
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,30	0,5 mM
Levi začetni oligonukleotid (10 µM)	0,75	0,5 µM
Desni začetni oligonukleotid (10 µM)	0,75	0,5 µM
Taq DNA polimeraza (2,5 U/µl)	0,12	0,3 U
Voda brez nukleaz	4,58	
DNA (20 ng/µl)	1,00	
<b>SKUPAJ (µl)</b>	<b>15,00</b>	

Produkte PCR pri markerju 184-81 za gen *Rpi-Smira2/R8* je bilo potrebno razrezati z restrikcijskim encimom RsaI (New England Biolabs, ZDA). Po končani reakciji PCR smo k 5 µl produkta PCR dodali 2,5 µl pufra rCutSmart™ in 0,5 µl encima RsaI ter vodo brez nukleaz do končnega volumna 25 µl. Reakcijsko mešanico smo nato inkubirali 15 min pri 37 °C, čemur je sledila 15 min deaktivacija encima pri 65 °C.

**Preglednica 3: Reagenti Biotools, uporabljeni v 14,5 µl reakciji PCR**

Komponenta	Volumen reagenta na reakcijo (µl)	Končna koncentracija
Reakcijski pufer (10×)	1,50	1×
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,60	2,0 mM
Deoksinukleotid fosfat (dNTP, Promega, ZDA) (10 µM)	0,30	0,2 mM
Levi začetni oligonukleotid (10 µM)	0,75	0,5 µM
Desni začetni oligonukleotid (10 µM)	0,75	0,5 µM
Taq DNA polimeraza (5 U/µl)	0,10	0,5 U
Voda brez nukleaz	9,50	
DNA (20 ng/µl)	1,00	
<b>SKUPAJ (µl)</b>	<b>14,50</b>	

Po končanih reakcijah PCR smo prisotnost pomnoženih fragmentov preverili na 1,4 % agarozni gelski elektroforezi in določili prisotnost oz. odsotnost odpornostnih genov v populaciji križancev. Pri vseh reakcijah PCR smo vključili tudi pozitivne in negativne kontrole za posamezno pomnoževanje *R* gena, in sicer krompirjeve sorte, za katere so predhodne analize z genskimi markerji (MAS – Marker Assisted Selection) v okviru programa žlahtnjenja krompirja na Kmetijskem inštitutu Slovenije pokazale, da posamezen *R* gen vsebujejo oz. ga ne vsebujejo:

- gen *R3b*:
  - pozitivna kontrola – sorta Bistra
  - negativna kontrola – sorta Pšata
- gen *R3a*:

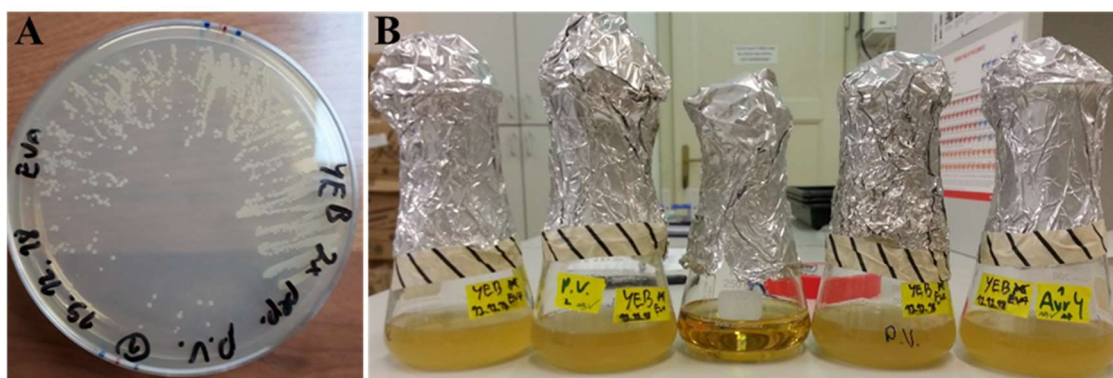
- pozitivna kontrola – sorta White Lady
- negativna kontrola – sorta Pšata
- gen *Rpi-Smira1*:
  - pozitivna kontrola – starševska sorta Sárpo Mira
  - negativna kontrola – sorta White Lady
- gen *Rpi-Smira2/R8*:
  - pozitivna kontrola – starševska sorta Sárpo Mira
  - negativna kontrola – sorta Pšata

Skupno je bilo v odbiro genotipov *R8* z genskimi markerji za gene *R3a*, *R3b*, *Rpi-Smira1* in *Rpi-Smira2/R8* vključenih 1213 F1 križancev, pri čemer smo analizo z reakcijami PCR opravili postopoma. Pričeli smo z markerjem za gen *R3b* in po končani reakciji PCR ter pregledu elektroforetskega gela odbrali le negativne vzorce. Le-te smo nato z reakcijami PCR nadaljnje analizirali na odsotnost genov *R3a* in *Rpi-Smira1* ter ponovno odbrali le negativne vzorce. Sledila je zadnja faza odbire z genskimi markerji, kjer smo z markerjem za gen *Rpi-Smira2/R8* določili prisotnost tega odpornostnega gena.

### 3.1.4 Odbira genotipov *R8* iz populacije F1 križancev z efektorsko agroinfiltracijo

Prisotnost oz. odsotnost odpornostnega gena *R4* v populaciji odbranih F1 križancev smo določili z efektorsko agroinfiltracijo, saj genski marker za ta gen ni na voljo. Uporabili smo bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* Agl1+VirG, ki je vsebovala ali prazen vektor pK7WG2 ali vektor pK7WG2 z vstavljenim efektorskim genom *Avr4* (PITG\_07387) (van Poppel in sod., 2009). Bakterijsko kulturo *A. tumefaciens* smo prejeli s strani Francine Govers iz Univerze Wageningen. Efektorsko agroinfiltracijo smo opravili na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo na Biotehniški fakulteti v laboratoriju 1. varnostne stopnje ter pri tem upoštevali vse varnostne ukrepe in navodila za delo z gensko spremenjenimi organizmi (GSO) v zaprtem sistemu.

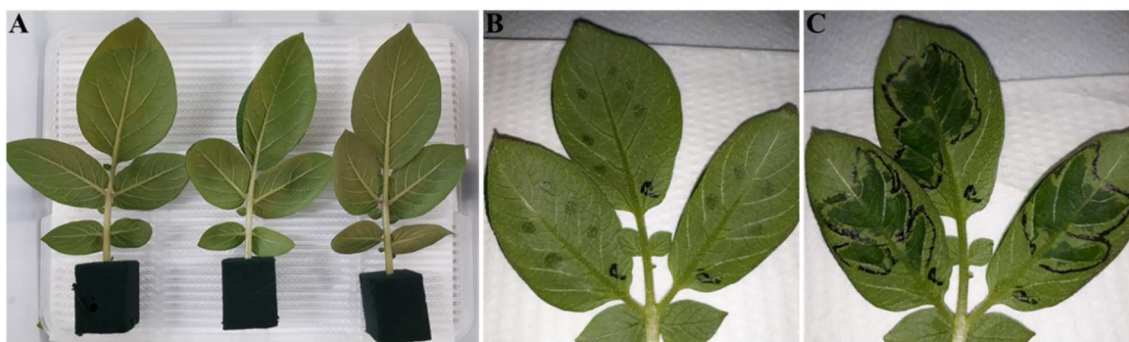
Bakterije *A. tumefaciens* smo vzdrževali na trdnem gojišču YEB (Slika 11A) (Priloga A) z dodanimi antibiotiki spektinomycin (100 µg/ml, Sigma-Aldrich, ZDA) in rifampicin (25 µg/ml, Sigma-Aldrich, ZDA) v inkubatorju pri temperaturi 28 °C ter jih precepljali vsaka 2 dneva.



Slika 11: Gojenje bakterijske kulture *Agrobacterium tumefaciens* na trdnem (A) in v tekočem gojišču YEB (B)

Pred agroinfiltracijo smo pripravili prekončno kulturo *A. tumefaciens*, in sicer smo s sterilnim pipetnim nastavkom bakterije, gojene na trdnem gojišču YEB, precepili v 100 ml tekočega gojišča YEB z dodanimi antibiotiki spektinomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) in rifampicin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) (Priloga A), 200  $\mu\text{M}$  acetosiringonom (Sigma-Aldrich, ZDA) ter 10 mM 2-morfolinoetansulfonska kislina (MES, Sigma-Aldrich, ZDA) in jih inkubirali čez noč na stresalniku pri 160 obratih/min in temperaturi 28  $^{\circ}\text{C}$  (Slika 11B). Naslednji dan smo s spektrofotometrom pomerili optično gostoto (OD) bakterijske suspenzije pri 600 nm valovne dolžine. V kolikor je vrednost  $\text{OD}_{600}$  dosegla 0.6, kar nakazuje na eksponentno fazo rasti bakterij, smo lahko nadaljevali s postopkom in bakterijsko suspenzijo koncentrirali. Centrifugirke (50 ml) z bakterijsko suspenzijo smo centrifugirali pri 3000 obratih/min 10 min, odstranili supernatant in usedlino bakterij resuspendirali v 15 ml infiltracijskega pufra, sestavljenega iz 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (Sigma-Aldrich, ZDA) in 10 mM MES. Bakterijski suspenziji smo ponovno izmerili  $\text{OD}_{600}$  in jo razredčili v infiltracijskem pufri na vrednost  $\text{OD}_{600}$  0,8 v končnem volumnu 45 ml. Končni bakterijski suspenziji smo dodali še 22,5  $\mu\text{l}$  acetosiringona (200  $\mu\text{M}$ ) in jo inkubirali 1 h v temi pri sobni temperaturi. Postopek priprave bakterijske suspenzije je bil enak tako za *A. tumefaciens* s praznim vektorjem kot tudi za *A. tumefaciens* z vektorjem z vstavljenim efektorskim genom *Avr4*.

Od vsake testirane krompirjeve rastline, vzgojene v rastlinjaku, stare pet tednov, smo odrezali tri liste z vsaj petimi lističi, pri čemer so listi izhajali iz sredinskega dela rastlin (med tretjim in petim stranskim poganjkom). Vsak list smo vstavili v prej namočeno cvetlično gobo (velikost cca. 3 cm  $\times$  3 cm  $\times$  3 cm) in jih prestavili v plastične posode s papirnatimi brisačkami in plastičnimi mrežami (Slika 12A). Na vsakem listu smo za agroinfiltracijo uporabili tri lističe. Vsakemu lističu smo pod stereomikroskopom s sterilno iglo poškodovali spodnjo (abaksialno) stran, ne da bi pri tem listič preluknjali. Na vsakem lističu smo na vsaj štirih točkah, levo in desno od sredinske žile, naredili približno 15 zarez v približnem premeru brizge (Slika 12B).



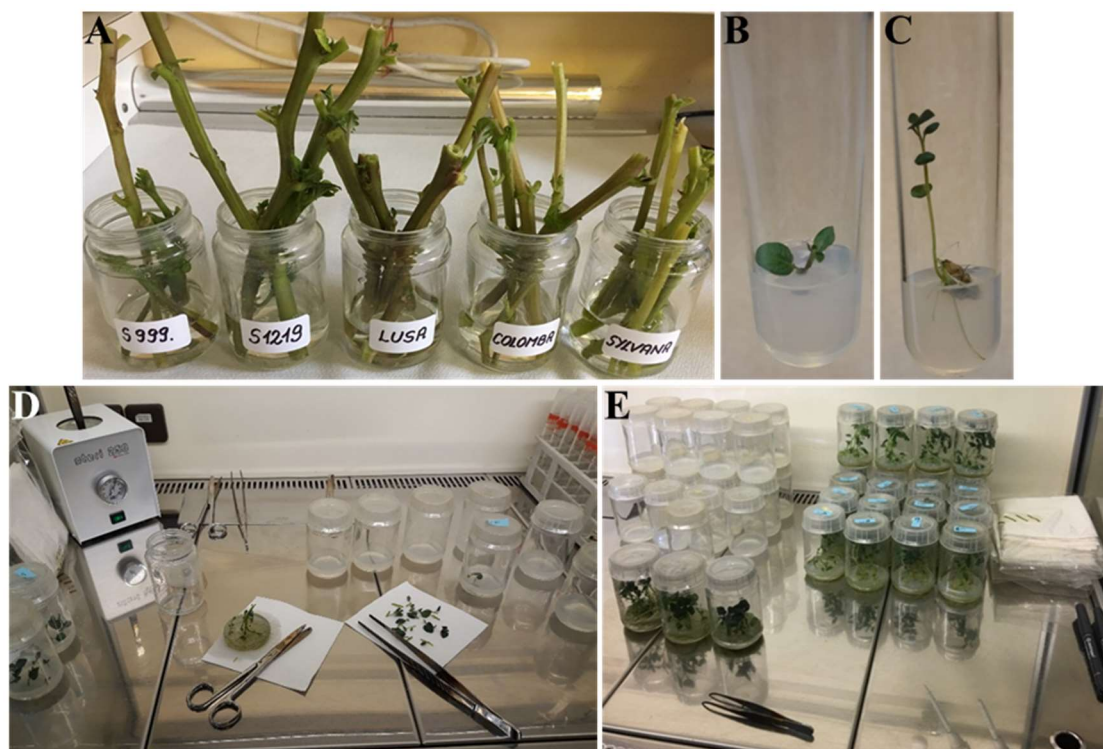
Slika 12: Priprava odrezanih krompirjevih listov (A), primer zarez na posameznih lističih (B) in infiltracija bakterijske suspenzije *A. tumefaciens* na odrezanih listih (C)

Na lističu enega lista smo z brizgo infiltrirali suspenzijo *A. tumefaciens* z vstavljenim efektorskim genom *Avr4* v vektorju, medtem ko smo na lističe drugega lista infiltrirali *A. tumefaciens* s praznim vektorjem (ang. mock control). Tretji list z lističi smo infiltrirali z avtoklavirano vodovodno vodo (AVV), kar je predstavljalo negativno kontrolo (Slika 12C). Po treh dneh smo vse liste preverili za prisotnost hipersenzitivnega odziva, ki je nakazoval na prisotnost odpornostnega gena *R4* v testiranem križancu. Posledično smo odbrali le križance brez hipersenzitivnega odziva, saj smo iskali rastline, ki ne vsebujejo gena *R4*.

### 3.1.5 Vnos genotipov *R8* v tkivne kulture in vzdrževanje

Po končani odbiri z genskimi markerji in efektorsko agroinfiltracijo smo pridobili končno populacijo križancev oz. genotipov, ki so od petih odpornostnih genov vsebovali le gen *Rpi-Smira2/R8*. Genotipe *R8* smo za lažje vzdrževanje in izvajanje poskusov predstavili iz rastlinjaka v tkivne kulture, hkrati pa smo v tkivne kulture vnesli tudi starševske sorte: občutljive sorte Rioja, Lusa, Colomba in Sylvana ter odporno sorto Sárpo Mira.

V rastlinjaku smo odrezali sredinske in zgornje dele stebel rastlin brez listov, jih označili in predstavili v laboratorij za tkivne kulture (Slika 13A). Stebla smo nato razrezali na posamezne nodije in jih za 20 s predstavili v erlenmajerico s 70 % etanolom. Sledilo je razkuževanje v drugi erlenmajerici z 0,5 % raztopino razkužila IZOSAN-G (PLIVA, Hrvaška), ki smo ji dodali dve kapljici surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA). Razkuževanje je potekalo na magnetnem mešalu 10 min. Nato smo razkužilo odlili, nodije pa dvakrat sprali v erlenmajerici s sterilno dH<sub>2</sub>O v brezprašni komori. Nodije smo s pinceto preložili na sterilno papirnato brisačko in s sterilnim skalpelom odstranili od razkuževanja prizadeto ali požgano tkivo ter vsak nodij posebej posadili v epruvete z gojiščem N (polovične koncentracije raztopin za gojišče Murashige-Skoog (Murashige in Skoog, 1962)) (Priloga B).



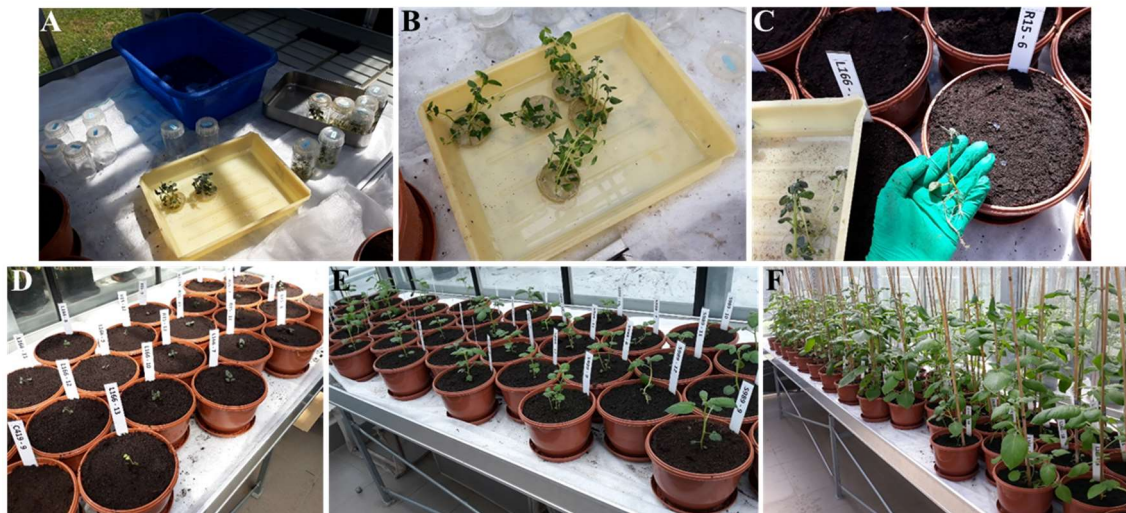
**Slika 13: Postopek vnosa genotipov R8 v tkivne kulture**

A – odrezana stebela rastlin genotipov R8 s stranskimi poganjki; B in C – uspešna rast rastlin v tkivni kulturi; D in E – namnoževanje genotipov R8 v tkivni kulturi.

Epruvete z nodiji smo prestavili v rastno komoro (IZR Škofja Loka, Slovenija) z rastnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe ter dnevno temperaturo 22 °C in nočno 20 °C. Po enem tednu smo epruvete pregledali ter odstranili vse okužene in propadle nodije. Uspešno vnesene nodije smo inkubirali v rastni komori še štiri tedne, da so zrastle. Nato smo jih prestavili v nove epruvete z gojiščem N. Pred prestavljanjem smo zrastle rastline najprej sprali s 70 % etanolom, nato pa jih za 5 min prestavili v sterilne petrijevke z 1 % razkužilom Antibiotic Antimycotic Solution 100x (Sigma-Aldrich, ZDA). Razkužene rastline smo razrezali na posamezne nodije in jih posadili v epruvete z gojiščem N (Slika 13B). V kolikor so iz nodijev pognale zdrave in neokužene rastline, se je vnos v tkivne kulture štel za uspešnega (Slika 13C). V nasprotnem primeru smo ponovno nabrali stebela z nodiji iz rastlinjaka in ponovili celoten postopek razkuževanja.

Po uspešnem vnosu genotipov R8 in starševskih sort v tkivne kulture smo nove nodije prestavili v steklene kozarčke premera 10 cm z gojiščem N, in sicer po pet nodijev v kozarček (Slika 11D-E). Prestavljanje tkivnih kultur je potekalo na vsake štiri do pet tednov. S tkivnimi kulturami smo vzdrževali in namnoževali potrebno število klonov genotipov R8 in pripadajočih starševskih sort, ki smo jih nato posadili v rastlinjak KIS v Ljubljani v lonce velikosti 20 cm (TEKU®, Pöppelman, Nemčija), napolnjene s komercialnim substratom (Potgrond P, Klasmann-Deilmann, Nemčija) (Slika 14A-E) za pridobivanje odrezanih listov za metodo inokulacije *P. infestans* na odrezanih listih (ang.

Detached Leaf Assay – DLA) ali direktno inokulacijo *P. infestans* na celih rastlinah (Slika 14F).



**Slika 14: Sajenje tkivnih kultur genotipov R8 v posamezne lonce v rastlinjak**

A in B – tkivne kulture smo pred sajenjem predstavili v pladenj napolnjen s toplo vodovodno vodo, da se je gojišče zmehčalo; C – posamezne rastline smo previdno ločili med sabo ter še posebno pazili, da nismo poškodovali korenin; D – vsako rastlino iz tkivnih kultur smo posadili v svoj lonec; E in F – po približno petih ali šestih tednih smo zrastle rastline uporabili za poskuse.

## 3.2 VZDRŽEVANJE OOMICETE *Phytophthora infestans* IN PRIPRAVA INOKULUMA

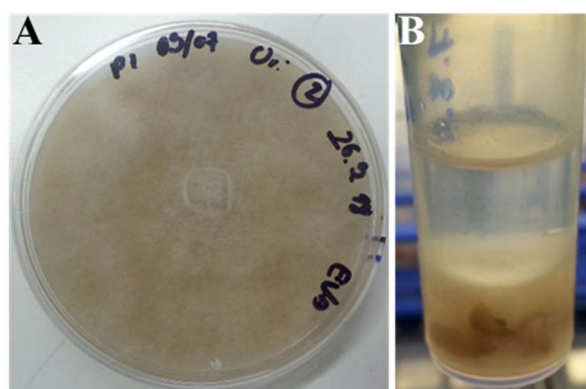
### 3.2.1 Gojenje micelija *P. infestans*

Uporabili smo štiri izolate *P. infestans* (02\_07, 09\_07, 90128 in IPO-C) (Preglednica 4), ki so se razlikovali po geografskem izvoru in genotipu. Izolata 02\_07 in 09\_07 smo pridobili iz trajne hrambe na Oddelku za varstvo rastlin Kmetijskega inštituta Slovenije in sta del zbirke slovenskih izolatov, nabranih v okviru populacijske študije krompirjeve plesni v Sloveniji med leti 2002 in 2015 (Žerjav, 2016). Izolata 90128 (rasa 1.3a.3b.4.6.7.8.10.11) in IPO-C (rasa 1.2.3a.3b.4.5.6.7.10.11) sta tuja izolata in smo ju prejeli s strani Trudy van den Bosch iz Univerze Wageningen.

**Preglednica 4: Podatki o izolatih *P. infestans*, uporabljeni za inokulacijo genotipov R8 <sup>1</sup>(Žerjav, 2016); <sup>2</sup>(Lokossou in sod., 2009)**

Izolat	Paritveni tip	Leto izolacije	Genotip / rasa	Izvor	Vir
02_07	A2	2007	EU_13_A2	Slovenija	1
09_07	A1	2007	EU_34_A1	Slovenija	1
90128	A2	1990	1.3a.3b.4.6.7.8.10.11	Nizozemska	2
IPO-C	A2	1982	1.2.3a.3b.4.5.6.7.10.11	Belgija	2

Oomiceto *P. infestans* smo gojili na trdnem rženem gojišču Rye-A (Priloga C) (Slika 15A) v inkubatorju v temi s temperaturo 21 °C in jo precepljali vsaka dva do tri tedne. Slovenska izolata 02\_07 in 09\_07 smo odvzeli iz vial za trajno shranjevanje v mineralnem olju (Slika 15B) (Sobkowiak in sod., 2012). Za oživitev izolatov smo iz vial odlili odvečno mineralno olje, nato pa s sterilno iglo odrezali manjše koščke rženega gojišča z micelijem in jih trikrat sprali z AVV. Koščke z micelijem smo nato predstavili v petrijevke s svežim gojiščem Rye-A, te pa v inkubator v temo pri temperaturi 21 °C, pri čemer smo petrijevke postavili pod manjšim kotom, da je odvečno mineralno olje odteklo, saj zavira rast *P. infestans*. Po 14 dneh smo preverili uspešnost oživitve izolatov in micelij precepili na sveže gojišče Rye-A.



Slika 15: Gojenje oomicete *Phytophthora infestans* na trdnem gojišču Rye-A in v viali s trdnim gojiščem Rye-A za trajno shranjevanje

### 3.2.2 Pridobivanje zoospor oomicete *P. infestans*

V petrijevke s preraščenim micelijem *P. infestans* smo odpipetirali 3 ml AVV in s sterilno kovinsko lopatko postrgali micelij z gojišča (Slika 16). Suspenzijo micelija s sporangiofori smo po strganju odpipetirali v 50 ml centrifugirko in odvzeli alikvot za štetje sproščenih sporangijev pod mikroskopom. Suspenzijo smo nato inkubirali 2 h v hladilniku pri temperaturi 6 °C, da so se iz sporangijev sprostile gibljive zoospore.



Slika 16: Pridobivanje suspenzije zoospor *P. infestans*



Med inkubacijo smo s pomočjo števne komore (hemocitometer, Neubauer Improved, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Nemčija) prešteli sporangije v alikvotu in določili njihovo koncentracijo. Alikvotu smo dodali barvilo Tripan modro (0,4 % v/v, Sigma-Aldrich, ZDA) v razmerju 1:1, premešali s pipetiranjem in odpipetirali 10 µl alikvota v oba predela hemocitometra. Pod mikroskopom smo nato prešteli sporangije na štirih kvadratih mreže hemocitometra in izračunali koncentracijo sporangijev po naslednji formuli:

$$\text{konc. sporang.} = \frac{\text{število sporangijev}}{\text{število prešteti kvadrati na mreži}} \times \text{redčitev} \times 10^4 \text{ [celic/ml]} \quad \dots (1)$$

Po končani inkubaciji v hladilniku smo suspenzijo zoospor prefiltrirali skozi 100 µm cedilo za celične kulture (Corning<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, ZDA), da smo odstranili odvečen micelij in sporangiofore ter ustrezno redčili z AVV in dodali 0,01 % (v/v) surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA).

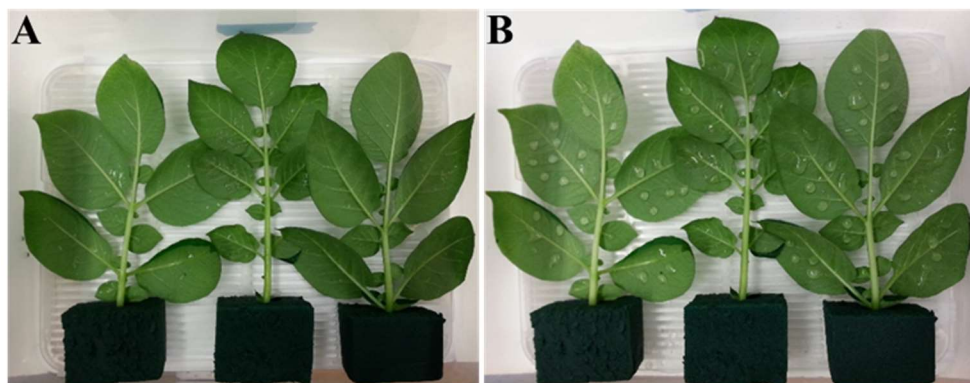
### 3.2.3 Optimizacija vzbuditve virulence oomicete *P. infestans*

Pred inokulacijo genotipov *R8* z oomiceto *P. infestans* je bilo potrebno vsem štirim izolatom vzbuditi virulenco. Tekom precepljanja na rženem gojišču se lahko virulenca *P. infestans* zmanjša, kar vpliva na sposobnost okužbe in posledično lahko po inokulaciji dobimo popačene rezultate o odpornosti testiranih rastlin (Fry in sod., 2019).

Za vzbuditev virulence *P. infestans* smo testirali tri različne metode: inokulacija odrezanih krompirjevih listov, inokulacija rezin krompirjevih gomoljev in inokulacija tkivnih kultur. Pri vseh metodah smo uporabili sorte, občutljive na krompirjevo plesen.

#### 3.2.3.1 Vzbuditev virulence *P. infestans* z inokulacijo odrezanih krompirjevih listov

Od krompirjevih rastlin sorte KIS Sora (Dolničar in Rudolf Piliš, 2012), gojenih v rastlinjaku, smo z razkuženimi škarjami odrezali liste z vsaj petimi lističi in jih prenesli v mikološki laboratorij. Liste smo sprali pod močnim curkom tekoče vode, nato pa še v dH<sub>2</sub>O in jih vstavili v predhodno namočene kocke cvetlične gobe velikosti cca. 3 cm × 3 cm.



**Slika 17: Vzbudivitev virulence *P. infestans* z uporabo odrezanih krompirjevih listov**

A – priprava odrezanih krompirjevih listov; B – točkovna inokulacija odrezanih listov s suspenzijo zoospor *P. infestans*.

Liste smo z abaksialno stranjo navzgor položili v plastično posodo, ki je na dnu vsebovala navlažene papirnate brisačke, na katerih so stale plastične mreže (Slika 17A). S tem smo se izognili direktnemu stiku inokuliranih listov z navlaženimi brisačkami. Na vsak listič smo levo in desno od glavne žile odpipetirali 20  $\mu$ l suspenzije zoospor *P. infestans* (Slika 17B), pripravljene kot opisano v poglavju 3.2.2. Posode z inokuliranimi krompirjevimi listi smo inkubirali na sobni temperaturi v mikološkem laboratoriju. Naslednji dan smo vse liste obrnili z abaksialno stranjo navzdol.

Ko se je na točkah inokulacije pojavil in razširil micelij *P. infestans*, smo ga poskušali izolirati. Na kovinsko iglo smo nataknili majhen košček rženega gojišča Rye-A<sup>+</sup> (Priloga D), ki je vsebovalo antibiotike ampicilin (250 mg/L, Sigma-Aldrich, ZDA), pimarin (10 mg/L, Sigma-Aldrich, ZDA) in rifampicin (10 mg/L, Sigma-Aldrich, ZDA), in pod stereomikroskopom postrgali micelij z inokuliranih krompirjevih listov ter ga prenesli na novo gojišče Rye-A<sup>+</sup> in inkubirali v inkubatorju v temi pri temperaturi 21 °C. Po enem tednu smo preverili uspešnost izolacije *P. infestans* in nekontaminirane petrijevke z oomiceto *P. infestans* inkubirali še nadaljnji teden ter jih uporabili za pripravo inokuluma za testiranje odpornosti genotipov R8 na krompirjevo plesen.

#### 3.2.3.2 Vzbudivitev virulence *P. infestans* z inokulacijo rezin krompirjevih gomoljev

Predhodno smo pripravili steklene petrijevke premera 15 cm, v katere smo položili papirnate brisačke in lesene palčke ter vse skupaj dvakrat toplotno sterilizirali v avtoklavu (Slika 18A). Uporabili smo gomolje sorte KIS Sora (Dolničar in Rudolf Piliš, 2012). Za površinsko sterilizacijo krompirjevih gomoljev smo testirali tri različne metode, ki so se razlikovale glede na to, ali smo gomolje pred sterilizacijo olupili ali pa smo jih poleg tretiranja z raztopino NaOCl tudi ožgali z absolutnim etanolom:

Metoda A (neolupljeni gomolji z ožiganjem s 96 % etanolom):

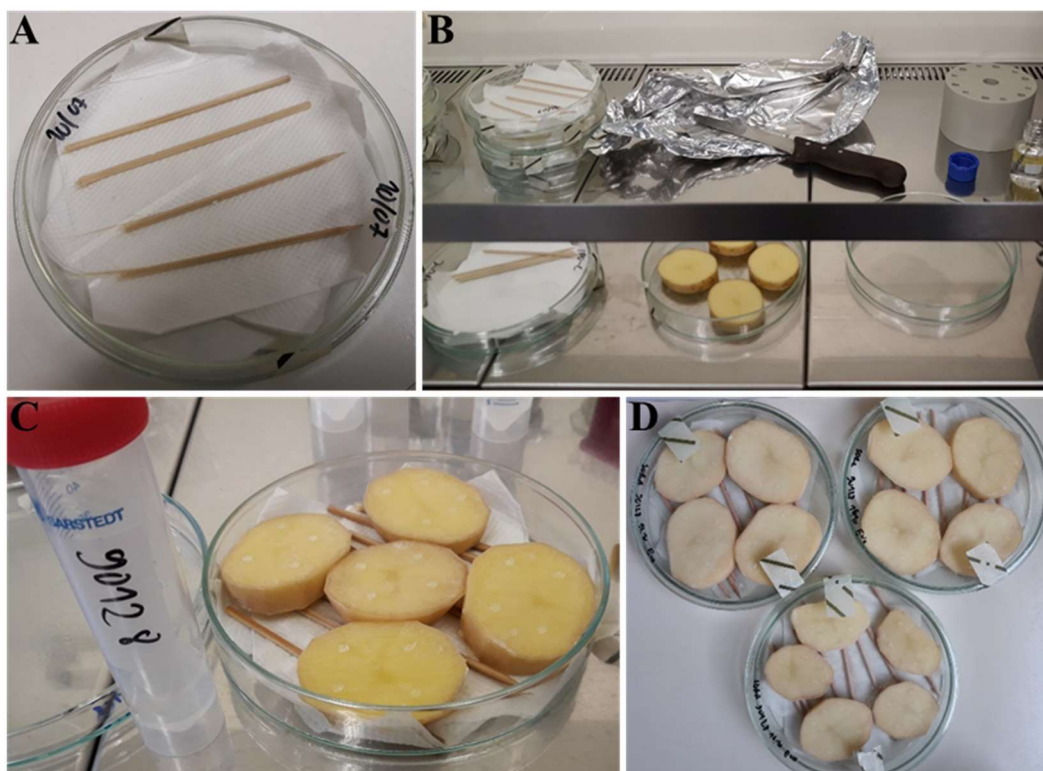
- čiščenje gomoljev pod tekočo vodo s krtačko in detergentom;
- 15 min razkuževanja v 3 % raztopini NaOCl (Kemika, Hrvaška) z dodatkom surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA);
- dvakratno spiranje v dH<sub>2</sub>O za 5 min;
- ožiganje s 96 % etanolom (Pharmachem, Slovenija);
- razrezanje s sterilnim nožem v brezprašni komori.

Metoda B (olupljeni gomolji brez ožiganja):

- čiščenje gomoljev pod tekočo vodo s krtačko in detergentom;
- lupljenje z lupilnikom, spranim v 70 % etanolu;
- 15 min razkuževanja v 3 % raztopini NaOCl (Kemika, Hrvaška) z dodatkom surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA);
- dvakratno spiranje v dH<sub>2</sub>O za 5 min;
- razrezanje s sterilnim nožem v brezprašni komori.

Metoda C (olupljeni gomolji z ožiganjem s 96 % etanolom):

- čiščenje gomoljev pod tekočo vodo s krtačko in detergentom;
- lupljenje z lupilnikom, spranim v 70 % etanolu;
- 15 min razkuževanja v 3 % raztopini NaOCl (Kemika, Hrvaška) z dodatkom surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA);
- dvakratno spiranje v dH<sub>2</sub>O za 5 min;
- ožiganje s 96 % etanolom (Pharmachem, Slovenija);
- razrezanje s sterilnim nožem v brezprašni komori.



Slika 18: Vzbudivanje virulence *P. infestans* z uporabo rezin krompirjevih gomoljev

Petrijevke z razkuženimi rezinami smo nato prestavili v inkubator v temo s temperaturo 21 °C. Po enajstih dnevih smo rezine pregledali pod stereomikroskopom za morebitno prisotnost kontaminacij in na podlagi tega izbrali najbolj primerno metodo za površinsko sterilizacijo rezin krompirjevih gomoljev. Najbolje se je obnesla metoda B (razkuževanje olupljenih gomoljev brez ožiganja).

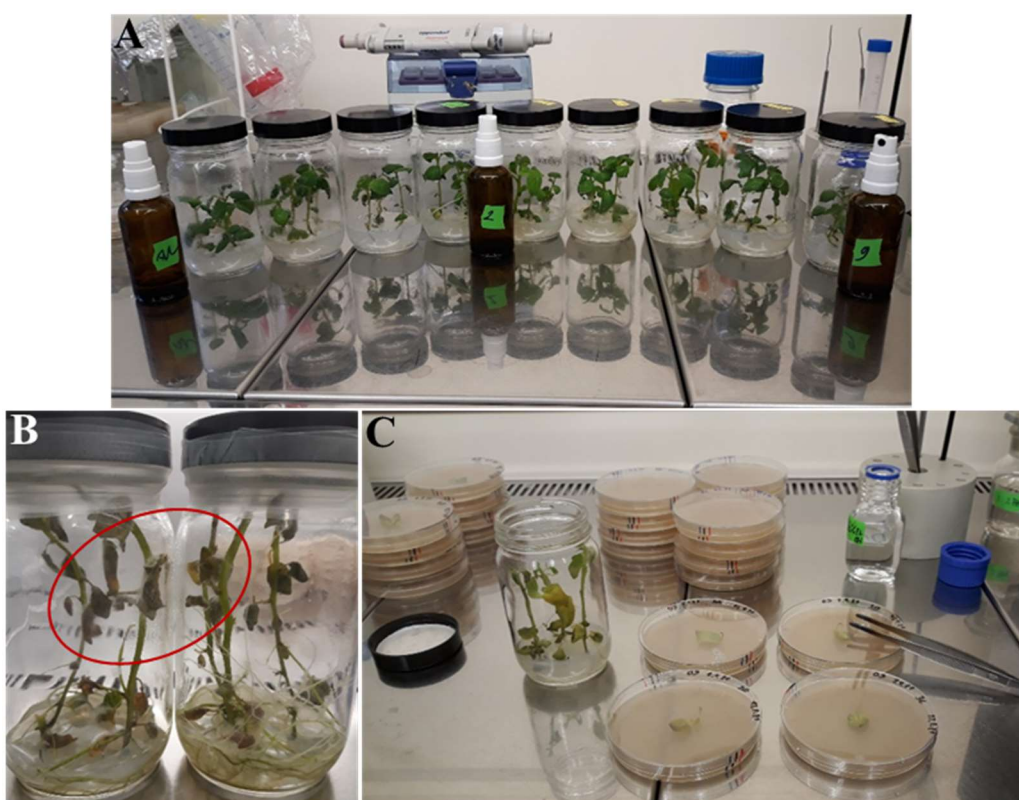
Iz preraščenih gojišč Rye-A smo pripravili suspenzijo zoospor *P. infestans*, kot je opisano v poglavju 3.2.2. Na vsako razkuženo krompirjevo rezino (po metodi B, Slika 18B) smo na pet točk odpipetirali 20 µl suspenzije zoospor (Slika 18 C). Nato smo namočili brisačke v petrijevkah z AVV za visoko zračno vlažnost tekom okužbe (Slika 18D). Petrijevke z inokuliranimi rezinami smo nato prestavili v inkubator v temo s temperaturo 21 °C za dva tedna.

Po dveh tednih smo v brezprašni komori pripravili suspenzijo virulentnih zoospor za poskuse. Vsako preraščeno rezino gomolja smo s kovinskimi pincetami prestavili v stekleno čašo s 100 ml AVV in s kovinsko lopatko postrgali micelij. Ko smo postrgali vse rezine, smo od suspenzije micelija in sporangijev odvzeli alikvot za štetje sproščenih sporangijev pod mikroskopom, celotno suspenzijo pa prestavili v hladilnik za 2 h na 6 °C, da so se iz sporangijev sprostile zoospore. Med inkubacijo smo v alikvotu s pomočjo hemocitometra določili koncentracijo sporangijev, kot je opisano v poglavju 3.2.2. Po končani inkubaciji v hladilniku smo suspenzijo zoospor prefiltrirali skozi 100 µm cedilo

za celične kulture (Corning®, Sigma-Aldrich, ZDA), da smo odstranili odvečen micelij in sporangiofore ter ustrezno redčili z AVV in dodali 0,01 % (v/v) surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA). Tako pripravljeno suspenzijo virulentnih zoospor *P. infestans* smo uporabili kot inokulum za testiranje odpornosti genotipov *R8* na krompirjevo plesen.

### 3.2.3.3 Vzбудitev virulence *P. infestans* z inokulacijo krompirjevih rastlin v tkivni kulturi

Uporabili smo od štiri do pet tednov stare krompirjeve rastline sorte Dobrin (Kus, 1987; Dolničar in Rudolf Pilih, 2012) v tkivni kulturi v steklenih kozarčkih premera 10 cm. Vsak kozarček je vseboval tri rastline (Slika 19).



**Slika 19: Vzбудitev virulence *P. infestans* z uporabo krompirjeve sorte Dobrin v tkivni kulturi**

A – uporaba pršilke za inokulacijo rastlin sorte Dobrin v tkivni kulturi; B – listi, preraščeni z micelijem in sporangiji *P. infestans* po petih dneh (označeni z rdečo elipso); C – prestavljanje preraščenih listov na trdna gojišča z antibiotiki Rye-A<sup>+</sup>.

Najprej smo razkužili pršilke; za 1 h smo jih potopili v 1 % raztopino NaOCl (Kemika, Hrvaška), nato pa dvakrat sprali z AVV. Suspenzijo zoospor smo pripravili iz preraščenih gojišč Rye-A, kot je opisano v poglavju 3.2.2, in jo odpipetirali v razkužene pršilke. V vsak kozarček smo po rastlinah sorte Dobrin enakomerno popršili suspenzijo zoospor (Slika 19A). Inokulirane tkivne kulture smo prestavili v rastno komoro (IZR Škofja Loka, Slovenija) z rastnimi pogoji 14 h dnevne svetlobe, temperaturo 21 °C in 75 % relativne zračne vlažnosti.

Po petih dneh oziroma ko je bila večina listov na rastlinah preraščena z micelijem *P. infestans* (Slika 19B), smo s sterilno pinceto odtrgali liste z micelijem in jih posamično predstavili v petrijevke z gojiščem z Rye-A<sup>+</sup> (Priloga D) (Slika 19C). Petrijevke s preraščenimi listi smo inkubirali v inkubatorju v temi pri temperaturi 21 °C. Po treh tednih smo iz preraščenih petrijevk Rye-A<sup>+</sup> pripravili suspenzijo virulentnih zoospor, kot je opisano v poglavju 3.2.2, in jo uporabili kot inokulum za testiranje odpornosti genotipov *R8* na krompirjevo plesen.

### 3.3 TESTIRANJE ODPORNOSTI GENOTIPOV *R8* NA KROMPIRJEVO PLESEN

Za določitev stopnje odpornosti in primerjavo genotipov *R8* skupaj s starševskimi sortami smo rastline izpostavili štirim izolatom *P. infestans* v treh različnih pogojih: cele rastline v rastlinjaku, na odrezanih listih (ang. Detached Leaf Assay – DLA) v rastni komori in v tkivni kulturi (*in vitro*). Na ta način smo želeli pokazati vpliv stanja, v katerem so bile rastline med okužbo s *P. infestans* (odrezani listi proti celi rastlini v rastlinjaku proti celi rastlini v tkivni kulturi) na stopnjo odpornosti genotipov *R8* proti krompirjevi plesni v primerjavi s starševskimi sortami.

#### 3.3.1 Inokulacija celih rastlin genotipov *R8* in starševskih sort s *P. infestans* v rastlinjaku

##### 3.3.1.1 Ohranjanje visoke zračne vlage z meglilnim sistemom

V rastlinjaku smo posadili od štiri do pet tednov stare tkivne kulture genotipov *R8* ter starševskih sort Rioja, Lusa, Colomba, Sylvana in Sárpo Mira (skupno 10 genotipov in 5 starševskih rastlin), kot opisano v poglavju 3.1.5. Vsak genotip oziroma starševska sorta je bila posajena v šestih ponovitvah za vsako testirano obravnavanje (dva izolata *P. infestans* in negativna kontrola). Skupno smo tako v komore v rastlinjaku KIS v Ljubljani posadili 270 rastlin (15 rastlin × 6 ponovitev × 3 obravnavanja) ter jih naključno razporedili znotraj vsakega obravnavanja. Krompirjeve rastline so rastle v pogojih 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 23 ± 7 °C. Nad vsako skupino rastlin smo namestili meglilni sistem za vzdrževanje visoke stopnje zračne vlažnosti. Meglilni sistem (Simple, Piro, Slovenija) je bil sestavljen iz cevi, dolžine 12 m in dvajset pršilnih šob premera 0,4 mm, razporejene z razmakom 60 cm. Delovni pult komore v rastlinjaku je meril 6 m, zato smo nad vsako skupino rastlin lahko meglilni sistem napeljali krožno ter tako postavili pršilno šobo na vsake 30 cm za boljšo pokritost z meglico.

Po petih tednih smo na rastline nanесли inokulum izolatov 90128 in IPO-C, pripravljen kot opisano v poglavju 3.2.3.2, za negativno kontrolo pa smo uporabili AVV z dodatkom 0,01 % (v/v) surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA). Inokulacijo *P. infestans* smo opravili v večernih urah. V mikološkem laboratoriju smo pripravili 1 L inokuluma s koncentracijo 2,5 × 10<sup>4</sup> sporangijev/ml, kot opisano v poglavju 3.2.3.2, in suspenzijo

pretočili v ročne tlačne pršilke (Alta Tech, Di Martino, Italija). Popršili smo zgornje in spodnje strani listov, pri tem pa pazili, da suspenzija ni pretirano odtekala s površine listov. Termin pršenja meglice smo nastavili na 1 min pršenja vsako uro. Tekom okužbe genotipov R8 in starševskih sort s *P. infestans* smo spremljali rastne pogoje v komorah rastlinjaka s pomočjo termometra in higrometra (Extech Datalogger, Extech, ZDA). Rastline so rastle v rastnih pogojih 16 h dnevne svetlobe (LED-svetila, REFLECTA, Avstrija) pri temperaturi  $23 \pm 7$  °C. Rastline smo dnevno pregledovali za pojav simptomov krompirjeve plesni.

### 3.3.1.2 Ohranjanje visoke zračne vlage z zavijanjem rastlin v plastične vreče

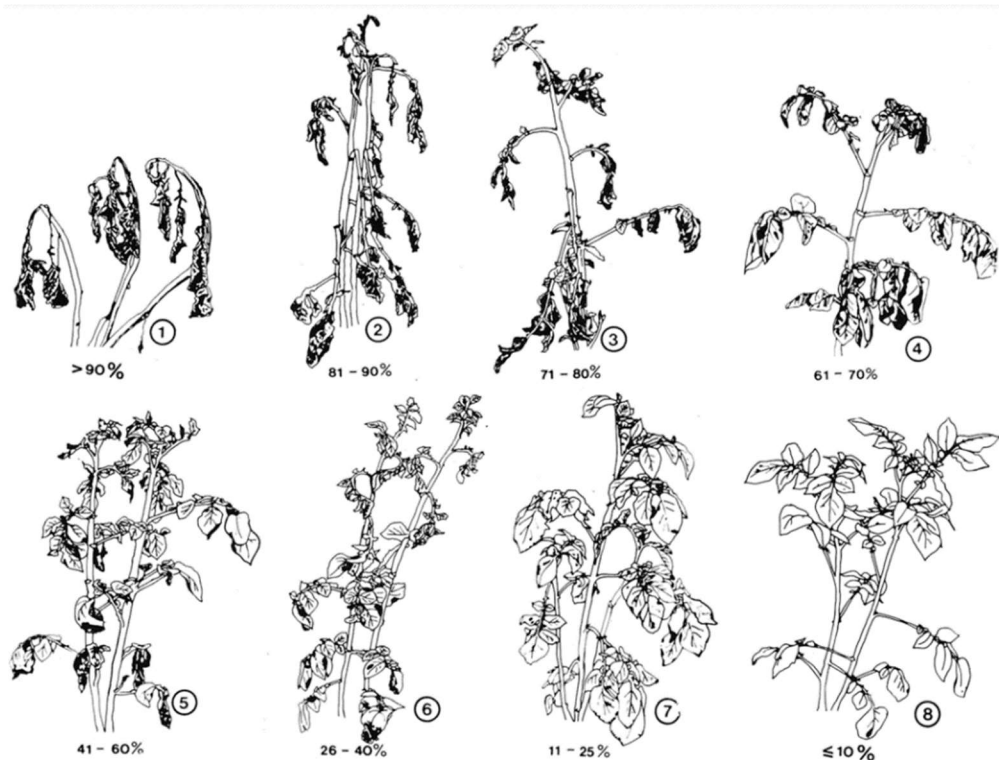
V rastlinjaku smo posadili pet tednov stare tkivne kulture genotipov C419, C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira, kot opisano v poglavju 3.1.5. Vsak genotip oz. starševska sorta je bila posajena v devetih ponovitvah za vsako testirano obravnavanje (štirje izolati *P. infestans* in negativna kontrola). Skupno smo posadili 180 rastlin (4 rastline  $\times$  9 ponovitev  $\times$  5 obravnavanj), ki smo jih naključno razporedili znotraj vsakega obravnavanja.

Po štirih tednih smo na odrasle rastline nanесли inokulum izolatov 02\_07, 09\_07, 90128 in IPO-C, pripravljen kot opisano v poglavju 3.2.3.3. Pri rastlinah, namenjenih za negativno kontrolo, smo uporabili AVV z dodatkom 0,01 % (v/v) surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA). Inokulacijo *P. infestans* smo opravili v večernih urah. V mikološkem laboratoriju smo pripravili 1 L inokuluma s koncentracijo  $1 \times 10^6$  sporangijev/ml (z izjemo izolata 02\_07, kjer smo uporabili koncentracijo  $4 \times 10^5$  sporangijev/ml) in suspenzijo pretočili v ročne tlačne pršilke (Alta Tech, Di Martino, Italija). Popršili smo zgornje in spodnje strani listov, pri tem pa pazili, da suspenzija ni pretirano odtekala s površine listov. Vsako rastlino smo nato zavili v (PVC) vrečo (dimenzije 32 cm  $\times$  60 cm), da so bile rastline v celoti pokrite, vendar vreč nismo neprodušno zaprli, da smo omogočili kroženje zraka (Slika 20). Rastline smo pustili pokrite 14 dni v rastnih pogojih 16 h dnevne svetlobe (LED-svetila, REFLECTA, Avstrija) pri temperaturi  $23 \pm 7$  °C.



Slika 20: Uporaba PVC vreč za vzdrževanje visoke relativne zračne vlage po inokulaciji genotipov *R8* in starševskih sort s *P. infestans* v rastlinjaku

Po 14 dneh smo vreče odstranili in pregledali vse rastline. Intenziteto simptomov smo določili po lestvici od 1 do 8 (Cruickshank in sod., 1982), pri čemer ocena 1 pomeni več kot 90 % propadlih listov, ocena 8 pa  $\leq 10$  % propadlih listov (Slika 21). Rastline s tipičnimi znaki krompirjeve plesni smo poslikali, slike pa nato obdelali s programom za obdelavo slik ImageJ (Schneider in sod., 2012). Slikam smo odstranili ozadje in nastavili črno barvo ozadja.



Slika 21: Lestvica za ocenjevanje simptomov krompirjeve plesni na celih rastlinah (Cruickshank in sod., 1982)



### 3.3.1.2.1 Statistična analiza pridobljenih podatkov

Skupno smo po 14 dneh pri genotipih C571 in C419 ter starševskih sortah Colomba in Sárpo Mira pridobili devet ocen intenzitete simptomov za vsak inokuliran izolat *P. infestans*. Izjemoma smo pri genotipu C419 po inokulaciji z izolatom IPO-C pridobili osem ocen. Izračunali smo povprečno oceno simptomov (POS) in standardno deviacijo za vsak genotip oz. starševsko sorto glede na inokuliran izolat *P. infestans* ter pridobljene rezultate prikazali v obliki točkovnega diagrama.

Za določitev statistično značilnega vpliva genotipa oz. starševske sorte na vrednosti POS za posamezen izolat *P. infestans* smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA), pri čemer je vrednost  $p < 0,05$  pomenila statistično značilen vpliv. Za post-hoc analizo smo uporabili Tukeyjev HSD test.

Statistično analizo smo opravili v programu R Studio (verzija 1.4.1717) s paketom »agricolae« (RStudio Team, 2022).

### 3.3.2 Inokulacija odrezanih listov genotipov R8 in starševskih sort s *P. infestans*

Test odrezanih listov temelji na inokulaciji *P. infestans* na odrezane krompirjeve liste namesto na celih rastlinah na polju ali v rastlinjaku, pri čemer testirane krompirjeve liste inkubiramo v rastnih komorah, kjer lahko natančno vzdržujemo optimalne pogoje za uspešno okužbo s *P. infestans*. Odrezane liste smo pridobili iz rastlin, gojenih v rastlinjaku, zato smo pred inokulacijo genotipov R8 z inokulumom *P. infestans* testirali več načinov površinske sterilizacije krompirjevih listov, da bi preprečili razvoj kontaminacij.

#### 3.3.2.1 Testiranje različnih načinov površinske sterilizacije listov

Od krompirjevih rastlin, vzgojenih v rastlinjaku, starih sedem tednov, smo odrezali po šest listov z vsaj petimi lističi za vsako testirano metodo površinske sterilizacije (skupno 36 listov). Testirali smo pet različnih metod razkuževanja listov, eno skupino listov pa smo uporabili kot negativno kontrolo (brez razkuževanja):

1. izpiranje listov pod tekočo vodo, ki mu je sledilo kratko namakanje v 1 % NaOCl (Kemika, Hrvaška), nato pa še kratko namakanje v AVV;
2. izpiranje listov pod tekočo vodo, ki mu je sledilo kratko namakanje v 0,5 % NaOCl (Kemika, Hrvaška), nato pa kratko namakanje v AVV;
3. izpiranje listov s tekočo vodo in nato kratko namakanje v AVV;
4. izpiranje listov samo s tekočo vodo;
5. kratko namakanje v AVV;

## 6. brez razkuževanja.

Po površinski sterilizaciji smo liste vstavili v predhodno namočene cvetlične gobe velikosti približno 3 cm × 3 cm × 3 cm (Slika 22). Cvetlične gobe z vstavljenimi listi smo položili v pladenj na plastične mreže, te pa na papirnate brisačke. Vsak pladenj smo zavili v PVC vrečo in ga prestavili v rastno komoro (IZR Škofja Loka, Slovenija) z ravnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 22 °C.



Slika 22: Priprava odrezanih krompirjevih listov za testiranje različnih načinov površinske sterilizacije

Naslednji dan smo na liste inokulirali 20 µl suspenzije zoospor *P. infestans* na spodnjo (abaksialno) stran lističev po eno inokulacijsko točko, vedno na levo polovico lističa. Z naknadno inokulacijo zoospor *P. infestans* smo preverili, ali metode površinske sterilizacije vplivajo na rast *P. infestans*.

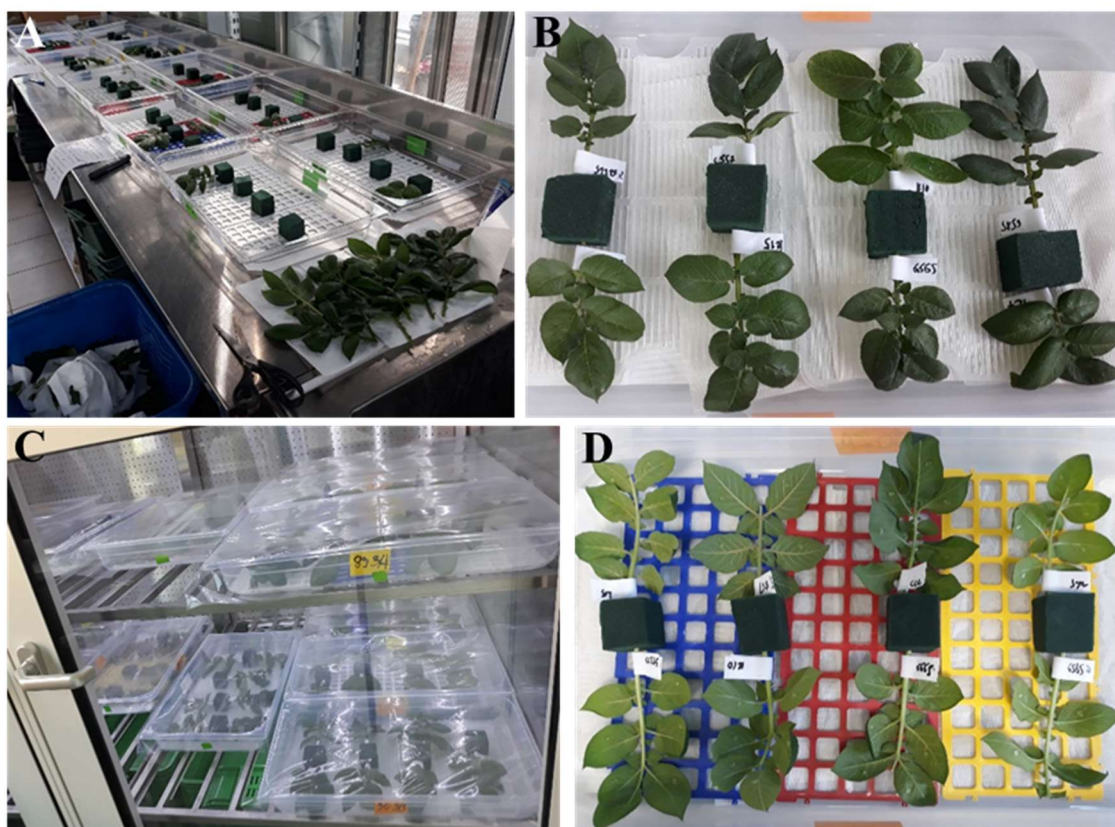
Po petih dneh smo vse površinsko sterilizirane liste pregledali in na podlagi odziva listnega tkiva na razkuževanje in na pojav morebitnih kontaminacij določili najbolj primerno metodo površinske sterilizacije. Najbolje se je obnesla metoda št. 3 (izpiranje listov s tekočo vodo in kratko namakanje v AVV).

### 3.3.2.2 Metoda DLA z odrezanimi listi v pladnjih

Inokulacijo genotipov *R8* in starševskih sort z inokulumom *P. infestans* na odrezanih listih (DLA) smo opravili po protokolu Vleeshouwers in sod. (1999).

Od krompirjevih rastlin genotipov *R8* in starševskih sort (Rioja, Lusa, Colomba, Sylvana in Sárpo Mira), vzgojenih v rastlinjaku, starih sedem tednov, smo s čistimi škarjicami odrezali liste z vsaj petimi lističi, pri čemer smo odrezali le sredinske liste (med tretjim in petim stranskim poganjkom rastline). Za vsak genotip *R8* in starševsko sorto smo pripravili po tri liste oz. ponovitve. Vse liste smo najprej sprali pod tekočo vodo, nato pa

dvakrat zaporedoma sprali v AVV (metoda št. 3, opisana v poglavju 3.3.2.1), pri čemer smo AVV med spiranjem genotipov redno menjavali. Liste smo nato osušili s papirnati brisačkami, jih vstavili v prej namočene cvetlične gobe (velikost cca. 3 cm × 3 cm × 3 cm) in naključno razporedili v plastične pladnje na plastične mreže (Slika 23 A-B). Liste smo obrnili z abaksialno stranjo navzdol in okrog listnega peclja nalepili nalepko z oznako genotipa. Vsak pladenj smo zavili v PVC vrečo ter jih čez noč prestavili v rastno komoro (IZR Škofja Loka, Slovenija) z ravnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 22 °C (Slika 23C).

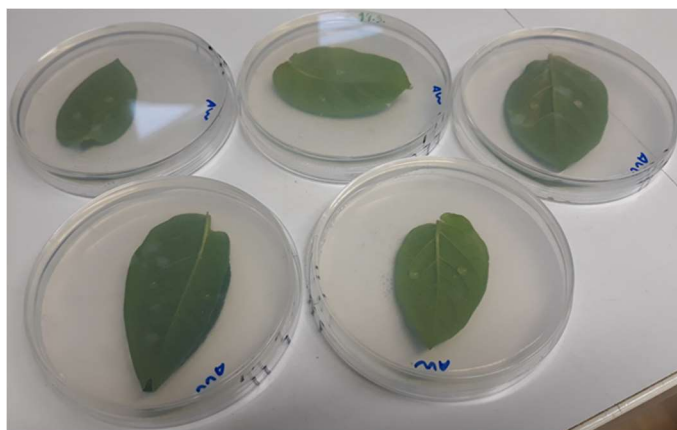


Slika 23: Priprava odrezanih krompirjevih listov genotipov R8 in starševskih sort za testiranje odpornosti proti *P. infestans*

Naslednji dan smo pripravili inokulum *P. infestans* v koncentraciji  $2,5 \times 10^4$  sporangijev/ml, kot opisano v poglavju 3.2.3.2. Liste v pladnjih smo obrnili in na vsak listič na abaksialno stran odpipetirali 20  $\mu$ l suspenzije virulentnih zoospor, in sicer vedno le na levo polovico lističa med robom in glavno listno žilo (Slika 23D). Za negativno kontrolo smo uporabili AVV z dodatkom 0,01 % (v/v) surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA). Liste smo pustili obrnjene z abaksialno stranjo navzgor in nadaljevali z inkubacijo v rastni komori. Naslednji dan smo liste obrnili z abaksialno stranjo navzdol in jih v rastni komori inkubirali še 7 dni, pri čemer smo dnevno spremljali pojav simptomov krompirjeve plesni in s kljunastim merilom merili velikost nastalih nekroz.

### 3.3.2.3 Metoda DLA na lističih v petrijevkah z vodnim agarjem

Metodo DLA na posamičnih lističih smo opravili po protokolu Li in sod., (2012). Pripravili smo petrijevke z 1,5 % vodnim agarjem (15 g agarja (Biolife Italiana, Italija) v 1 L dH<sub>2</sub>O) in jih obrnili z agarjem navzgor oz. s pokrovčkom petrijevke navzdol. V rastlinjaku smo iz šest tednov starih krompirjevih starševskih rastlin (Rioja, Lusa, Colomba, Sylvana, Sárpo Mira) s čistimi škarjicami odrezali posamezne lističe in jih prenesli v mikološki laboratorij. Lističe smo postavili na pokrovčke petrijevk z vodnim agarjem, tako da je bila abaksialna stran lističev obrnjena proti agarju (Slika 24).



Slika 24: Inokulacija posameznih lističev s *P. infestans* v petrijevkah z vodnim agarjem

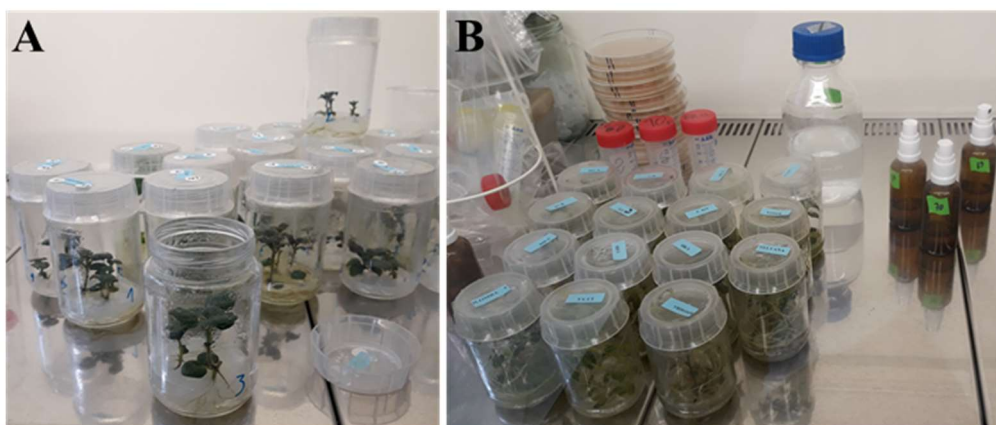
Nato smo pripravili inokulum *P. infestans*, kot opisano v poglavju 3.2.3.3, in na vsak listič na obe polovici odpipetirali 20  $\mu$ l suspenzije virulentnih zoospor. Za negativno kontrolo smo uporabili AVV z dodatkom 0,01 % surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA). Petrijevke z lističi smo prestavili v rastno komoro (BINDER GmbH, NEMčija) z rastnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 22 °C ter dnevno spremljali pojav simptomov krompirjeve plesni in s kljunastim merilom merili velikost nastalih nekroz.

### 3.3.3 Inokulacija tkivnih kultur genotipov R8 in starševskih sort s *P. infestans*

#### 3.3.3.1 Priprava rastlin in inokuluma ter postopek inokulacije

Uporabili smo od štiri do pet tednov stare tkivne kulture genotipov R8 in starševskih sort Rioja, Lusa, Colomba, Sylvana in Sárpo Mira. Vsak kozarček je vseboval tri rastline, za vsak genotip R8 oz. starševsko sorto pa smo uporabili po tri kozarčke za vsako obravnavanje (dva izolata *P. infestans* in negativna kontrola). Rastline smo ločeno inokulirali s slovenskima izolatoma (02\_07 in 09\_07) ter ločeno s tujima izolatoma (90128 in IPO-C). Inokulacijo tkivnih kultur genotipov R8 in starševskih sort smo neodvisno ponovili dvakrat za vsak par izolatov.

Inokulum *P. infestans* smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.2.3.3., in sicer v koncentraciji  $2,5 \times 10^4$  sporangijev/ml. Suspenzijo virulentnih zoospor smo predstavili v predhodno razkužene pršilke in enakomerno popršili rastline v vsakem kozarčku. Za negativno kontrolo smo uporabili AVV z dodatkom 0,01 % (v/v) surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA). Pokrovčke kozarčkov smo ovili s parafilmom za ohranjanje visoke stopnje vlažnosti. Kozarčke smo inkubirali 8 dni v rastni komori (IZR Škofja Loka, Slovenija) z rastnimi pogoji 14 h dnevne svetlobe pri temperaturi 21 °C in 75 % relativne zračne vlažnosti.



Slika 25: Inokulacija tkivnih kultur genotipov *R8* in starševskih sort s *P. infestans*

Inokulirane tkivne kulture smo dnevno pregledovali pod steromikroskopom in zabeležili pojav simptomov krompirjeve plesni. Stopnjo razvoja bolezni smo določili s pomočjo lestvice simptomov, pri čemer je vrednost 0 predstavljal zdrav list, brez simptomov, vrednost 8 pa močno razraščeni micelij *P. infestans* z veliko sporangiji na listnem tkivu (Slika 49, poglavje 4.4.3). Liste s tipičnimi znaki krompirjeve plesni smo poslikali z digitalnim mikroskopom Olympus DSX1000 (objektiv DSX10-SXLOB1X, delovna razdalja 51,7 mm) na Katedri za lesne škodljivce, zaščito in modifikacijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete. Slike listov smo obdelali s programom za obdelavo slik ImageJ (Schneider in sod., 2012), in sicer smo slikam odstranili ozadje in nastavili črno barvo ozadja.

### 3.3.3.2 Statistična analiza pridobljenih podatkov

Skupno smo z vsakim izolatom *P. infestans* za vsak genotip *R8* oz. starševsko sorto inokulirali po 6 kozarčkov s 3 rastlinami (3 kozarčki  $\times$  2 poskusa). Vsaki rastlini znotraj kozarčka smo dnevno določili oceno izraženih simptomov krompirjeve plesni s pomočjo lestvice, ki smo jo na podlagi preliminarnih poskusov določili posebej za vrednotenje simptomov krompirjeve plesni na rastlinah v tkivni kulturi (Slika 49, poglavje 4.4.3).

Za vsak inokuliran genotip *R8* oz. starševsko sorto smo dnevno pridobili 18 ocen (3 rastline × 6 kozarčkov), iz katerih smo za vsak dan po inokulaciji izračunali povprečno oceno simptomov (POS). Pridobljene vrednosti POS smo razdelili v štiri skupine, glede na križanja, iz katerih potomci izhajajo: skupina Rioja, skupina Lusa, skupina Colomba in skupina Sylvana. Dnevne vrednosti POS za vsako skupino smo prikazali s točkovnim diagramom, ločeno po izolatih *P. infestans*. Za primerjavo stopnje odpornosti med genotipi *R8* in starševskimi sortami smo uporabili le končne vrednosti POS po osmih dneh po inokulaciji. Na podlagi teh vrednosti POS smo genotipe *R8* in starševske sorte označili kot:

- odporne na *P. infestans*, če je vrednost POS po 8 dneh znašala med 0 in 3,9;
- srednje odporne, če je vrednost POS po 8 dneh znašala med 4,0 in 5,9;
- občutljive, če je vrednost POS po 8 dneh znašala med 6,0 in 8,0.

Za določitev statistično značilnega vpliva genotipa oz. sorte na vrednosti POS znotraj posamezne skupine rastlin smo uporabili enosmerno analizo ANOVA, pri čemer je vrednost  $p < 0,05$  pomenila statistično značilen vpliv. Za analizo post-hoc smo uporabili Tukeyjev HSD test, s katerim smo ugotovili, kateri genotipi *R8* oz. starševske sorte se statistično značilno razlikujejo, ter rezultate prikazali v obliki preglednice.

Za primerjavo agresivnosti med štirimi uporabljenimi izolati *P. infestans* smo za vsak izolat izračunali ploščino pod krivuljo razvoja bolezni (ang. Area Under the Disease Progress Curve – AUDPC) s trapezno metodo (Forbes in sod., 2014) za vse inokulirane rastline (potomci in starši skupaj, brez ločevanja po križanjih), kjer je spremenljivka  $y$  predstavljala vrednost POS za posamezno rastlino, medtem ko je spremenljivka  $t$  predstavljala čas, izražen v dnevih po inokulaciji:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) \quad \dots (2)$$

Za določitev statistično značilnega vpliva izolata *P. infestans* na vrednosti POS smo uporabili enosmerno analizo ANOVA in Tukeyjev HSD test za analizo post-hoc. Rezultate smo grafično predstavili s stolpčnim diagramom vrednosti AUDPC po izolatih.

Statistično analizo smo opravili v programu R Studio (verzija 1.4.1717) s paketom »agricolae« (RStudio Team, 2022).

#### 3.4 IZRAŽANJE GENA *Rpi-Smira2/R8* V GENOTIPIH C419 IN C571 PO OKUŽBI *S. P. infestans*

##### 3.4.1 Inokulacija genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira s *P. infestans*

Uporabili smo pet tednov stare tkivne kulture genotipov C419 in C571 ter pripadajočih starševskih sort Colomba in Sárpo Mira. Rastline v tkivni kulturi smo ločeno inokulirali s slovenskima izolatoma (02\_07 in 09\_07) ter ločeno s tujima izolatoma (90128 in IPO-C). Vsak kozarček je vseboval tri rastline, za vsak genotip oz. starševsko sorto pa smo inokulirali med štiri in šest kozarčkov za vsako časovno točko (0, 2 in 4 dnevi po inokulaciji) in inokuliran izolat. Skupno smo tako inokulirali najmanj 288 kozarčkov (4 kozarčki oz. ponovitve  $\times$  4 genotipi oz. starš. sorte  $\times$  3 časovne točke  $\times$  6 obravnavanj (4 inokulirani izolati in 2 negativni kontroli)).

Inokulum *P. infestans* smo pripravili, kot opisano v poglavju 3.2.3.3, v koncentraciji  $5 \times 10^4$  sporangijev/ml. Suspenzijo virulentnih zoospor smo predstavili v predhodno razkužene pršilke in enakomerno popršili rastline v vsakem kozarčku. Za negativno kontrolo smo uporabili AVV z dodatkom 0,01 % (v/v) surfaktanta Tween 20 (Sigma-Aldrich, ZDA). Pokrovčke kozarčkov smo ovili s parafilnom za ohranjanje visoke stopnje zračne vlažnosti, razen pri skupini kozarčkov, namenjenih pobiranju vzorcev v časovni točki 0 dni po inokulaciji, iz katerih smo takoj po inokulaciji z inokulumom *P. infestans* s čisto pinceto nabrali približno 100 mg listnega tkiva v mikrocentrifugirke in jih takoj zamrznili v tekočem dušiku. Kozarčke z inokuliranimi rastlinami smo predstavili v rastno komoro (BINDER GmbH, Nemčija) z rastnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 22 °C. Po dveh in štirih dneh po inokulaciji smo ponovno iz kozarčkov pobrali približno 100 mg listnega tkiva v mikrocentrifugirke in jih takoj zamrznili v tekočem dušiku. Vzorce listnega tkiva smo do izolacije molekul RNA shranili v zamrzovalni skrinji pri temperaturi -80 °C.

##### 3.4.2 Izolacija molekul RNA

Za izolacijo molekul RNA smo uporabili komercialni komplet reagentov za izolacijo molekul RNA iz rastlinskega materiala RNeasy Plant Kit (Qiagen, Nemčija). Vzorce listnega tkiva smo prenesli iz zamrzovalne skrinje pri -80 °C v genetski laboratorij ter v vsako mikrocentrifugirko dodali 4 jeklene kroglice premera 3 mm in 800  $\mu$ l pufru za liziranje celic RLT s predhodno dodanim 8  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptioetanolom (Sigma-Aldrich, ZDA). Listno tkivo smo strli z razkrojevalcem tkiv TissueLyser (Retsch, Nemčija) za 6 min na maksimalno frekvenco (30 Hz). Ker se je lizni pufer RLT po homogenizaciji močno spenil, smo mikrocentrifugirke z vzorci predstavili v manjšo namizno centrifugo in centrifugirali približno 1 min, da se je nastala pena posedla. Nato smo 700  $\mu$ l homogenizata odpipetirali v mikrocentrifugirko z lila obarvano kolono (priloženo v

kompletu) in centrifugirali 2 min pri 14 000 rpm. Supernatant smo prestavili v novo mikrocentrifugirko in dodali 0,5 volumna absolutnega etanola (Honeywell, ZDA), premešali s pipetiranjem in prestavili 700 µl mešanice v mikrocentrifugirko z roza obarvano kolono (priloženo v kompletu) in centrifugirali 30 s pri 10 000 rpm. Zaradi večjega volumna smo ta korak (dodatek 0,5 volumna etanola in centrifugiranje) še enkrat ponovili. Nato smo dodali 700 µl pufra RW1 za čiščenje na kolono vezanih molekul RNA ter ponovno centrifugirali 30 s pri 10 000 rpm. Kolono z vezanimi molekulami RNA smo prestavili v novo zbiralno mikrocentrifugirko volumna 2 ml (priloženo v kompletu) ter nanjo odpipetirali 500 µl pufra RPE. Mikrocentrifugirke smo ponovno centrifugirali 30 s pri 10 000 rpm. Iz zbiralne mikrocentrifugirke smo odlili odvečni pufer, na kolono pa ponovno odpipetirali 500 µl pufra RPE ter tokrat centrifugirali 2 min pri 10 000 rpm. Kolono z vezanimi molekulami RNA smo prestavili v novo mikrocentrifugirko ter ponovno centrifugirali 1 min pri 10 000 rpm, da smo s kolone odstranili vse ostanke pufrov. Kolono smo nato prestavili v novo sterilno mikrocentrifugirko in nanjo odpipetirali 40 µl vode brez nukleaz za elucijo molekul RNA. Mikrocentrifugirke smo centrifugirali 1 min pri 11 000 rpm, eluat pa nato ponovno odpipetirali na kolono in ponovili centrifugiranje. S tem smo povišali koncentracijo molekul RNA v eluatu.

Vzorci z izoliranimi celokupnimi molekulami RNA smo shranili v zamrzovalni skrinji pri temperaturi -80 °C. Kvaliteto in koncentracijo celokupnih molekul RNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop (ThermoFisher, ZDA) v Centru za funkcijsko genomiko in biočipe na Inštitutu za biokemijo in molekularno genetiko v Ljubljani. Vse vzorce RNA nato razredčili z vodo brez nukleaz na koncentracijo 100 ng/µl.

### **3.4.3 Razgradnja genomske DNA in reverzna transkripcija**

Pred reakcijo reverzne transkripcije smo vzorcem RNA odstranili genomsko DNA s komercialnim kompletom reagentov TURBO DNA-free™ (Invitrogen, ZDA). V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 20 µl RNA in dodali 2 µl 10× pufra TURBO DNase™ Buffer ter 0,5 µl encima TURBO DNase™. Vzorce smo prestavili v termoblok (Eppendorf, Nemčija) in inkubirali 30 min pri temperaturi 37 °C. Reakcijo razgradnje genomske DNA smo po inkubaciji ustavili z dodatkom 2 µl inaktivacijskega reagenta in vzorce pustili 5 min na sobni temperaturi, pri čemer smo vsebino mikrocentrifugirk občasno rahlo premešali. Po inaktivaciji encima smo vzorce centrifugirali 1,5 min pri hitrosti 10 000 rpm in odpipetirali supernatant, očiščeno celokupno RNA, v nove mikrocentrifugirke.

Za reverzno transkripcijo smo uporabili komercialni komplet reagentov High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, ZDA), pri čemer smo si vnaprej pripravili reakcijsko mešanico (ang. Master Mix), ki je vsebovala reagente, našete v preglednici 5.



**Preglednica 5: Reagenti, uporabljeni za pripravo reakcijske mešanice (Master Mix) za reverzno transkripcijo**

Komponenta	Volumen reagenta na reakcijo (μl)
Pufer RT (10×)	4,0
Mešanica deoksinukleotidnih fosfatov (dNTP) (100 mM)	1,6
Naključni začetni oligonukleotidi (10×)	4,0
Encim reverzna transkriptaza MultiScribe™ (50 U/μl)	2,0
Inhibitor RNaz	2,0
Voda brez nukleaz	6,4
<b>SKUPAJ (μl)</b>	<b>20,0</b>

Končni volumen reakcijske mešanice z ustreznimi volumni vsebujočih reagentov smo preračunali glede na število reakcij reverzne transkripcije oz. število vzorcev RNA, ki smo jih želeli prepisati v komplementarno DNA (cDNA). V vsak vzorec z 20 μl RNA smo odpipetirali 20 μl predhodno namešane reakcijske mešanice in jih predstavili v ciklični termostat SureCycler 8800 (Agilent Technologies, ZDA) ali Veriti (Applied Biosystems, ZDA) s programom:

- 10 min pri temperaturi 25 °C;
- 2 h pri temperaturi 37 °C;
- 5 min pri temperaturi 85 °C – inaktivacija encima reverzne transkriptaze.

Vzorci cDNA smo shranili v zamrzovalni omari pri temperaturi -20 °C.

### 3.4.4 Reakcija PCR v realnem času

Za reakcije PCR v realnem času smo za detekcijo pomnoženih fragmentov uporabili komercialni komplet reagentov TaqMan® (ThermoFisher, ZDA), pri čemer smo vnaprej pripravili ustrezní volumen reakcijske mešanice (ang. Master Mix) za vse analizirane vzorce cDNA. Ena reakcija v končnem volumnu 10 μl je vsebovala reagente, naštete v preglednici 6. Za spremljanje izražanja gena *Rpi-Smira2/R8* smo uporabili po naročilu pripravljene oligonukleotidne začetnike s sondami TaqMan® Gene Expression Assay (ThermoFisher, ZDA), katerih zaporedja so prikazana v preglednici 7.

Reakcijo PCR v realnem času smo opravili na aparaturi 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, ZDA) s pripadajočim programskim paketom 7500 Software (različica 2.0.6) (Applied Biosystems™, ZDA) na plošči s 96 vdolbinami (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems™, ZDA).

**Preglednica 6: Reagenti, uporabljeni za pripravo posamezne 10 µl reakcije PCR v realnem času**

Komponenta	Volumen reagenta na reakcijo (µl)
Univerzalna reakcijska mešanica TaqMan® II (2×)	5,0
TaqMan® Gene Expression Assay (levi in desni zač. oligonuk. ter sonda) (20×)	0,5
Voda brez nukleaz	3,5
cDNA	1,0
<b>SKUPAJ (µl)</b>	<b>10,0</b>

Vsak vzorec smo analizirali v dveh tehničnih ponovitvah, vključili pa smo tudi negativne kontrole (NonTemplate Control – NTC), kjer smo namesto cDNA v reakcijsko mešanico odpipetirali vodo brez nukleaz. Vzorce cDNA smo pomnoževali po programu:

- 2 min pri temperaturi 50 °C;
- 10 min pri temperaturi 95 °C (aktivacija polimeraze);
- 40 ciklov pri pogojih:
  - 15 s pri temperaturi 95 °C;
  - 1 min pri temperaturi 60 °C.

**Preglednica 7: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sonde za spremljanje izražanja gena *Rpi-Smira2/R8* v reakciji PCR v realnem času**

Tarčni gen	Zaporedje (5'-3')
Gen <i>Rpi-Smira2/R8</i>	F: TCCAAGGACAAGGAAGATGAGGTA R: CTCTTTCCCATTAGGCTTTTCCTCAA Sonda: FAM-CCTGTCAGCAAGTTTG

Začetni oligonukleotidi za spremljanje izražanja gena *Rpi-Smira2/R8* so bili oblikovani po naročilu s t. i. Custom TaqMan® Gene Expression Assay SM FAM (ThermoFisher Scientific, ZDA) na podlagi kodirajočega zaporedja gena *Rpi-Smira2/R8*, ki je objavljen in prosto dostopen v bazi GenBank pod identifikacijsko oznako KU530153.1 s polnim imenom »Solanum demissum Resistance protein Rpi-Smira2/R8«. Hkrati smo spremljali tudi izražanje referenčnega gena 18S rRNA s pomočjo komercialno dostopnega kompleta reagentov Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (Applied Biosystems™, ZDA)

### 3.5 IDENTIFIKACIJA IN IZVOR KONTAMINACIJ

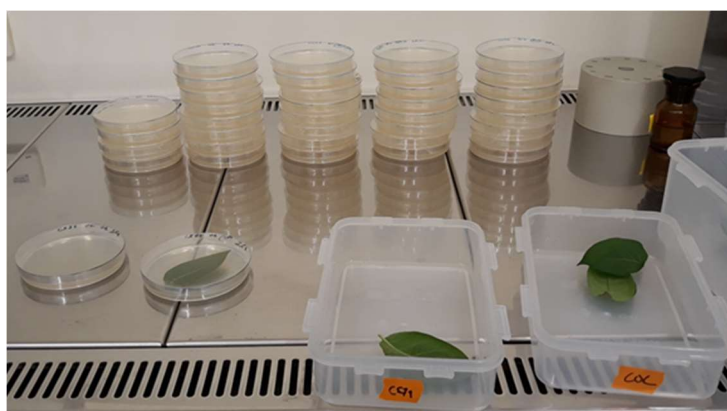
#### 3.5.1 Odprte petrijevke z gojiščem PDA v rastlinjaku in rastnih komorah

Da bi našli izvor kontaminacij, smo pripravili trdna krompirjeva gojišča (Potato Dextrose Agar – PDA, Biolife Italiana, Italija) z antibiotikom streptomycin (Streptomycin sulfat, Sigma-Aldrich, ZDA) v koncentraciji 55 mg/l (Priloga E). Petrijevke z gojiščem PDA smo postavili v rastlinjak in v vse rastne komore (IZR Škofja Loka, Slovenija in BINDER

GmbH, Nemčija), ki smo jih uporabili pri inokulacijah genotipov *R8* in starševskih rastlin, kot opisano v poglavjih 3.3.1, 3.3.2 in 3.3.4. V rastlinjaku smo petrijevke postavili med posajenimi rastlinami na razdaljo približno 1 m, medtem ko smo v rastnih komorah na vsako polico postavili eno petrijevko. Vse petrijevke v rastlinjaku in rastnih komorah smo pustili odprte 1 h, nato jih zaprli in inkubirali v rastni komori (IZR Škofja Loka, Slovenija in BINDER GmbH, Nemčija) z rastnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 22 °C. Petrijevke iz rastlinjaka smo pregledali v mikološkem laboratoriju pod stereomikroskopom po 4 dneh, petrijevke iz rastnih komor pa po 6 dneh. Na podlagi morfoloških značilnosti različnih micelijev smo identificirali rod gliv.

### 3.5.2 Odtisi nerazkuženih lističev na trdna gojišča PDA

Iz krompirjevih rastlin genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira, gojenih v rastlinjaku, starih štiri tedne smo s čistimi škarjicami odrezali posamezne lističe in jih prenesli v mikološki laboratorij. V brezprašni komori smo si pripravili petrijevke s trdnim gojiščem PDA z antibiotikom streptomycin v koncentraciji 100 mg/ml (Streptomycin sulfat, Sigma-Aldrich, ZDA) (Priloga E). Nabrane lističe smo brez predhodne površinske sterilizacije ali spiranja neposredno odtisnili na trdna gojišča PDA, pri čemer smo vsako stran lističa odtisnili v ločene petrijevke (Slika 26).



Slika 26: Priprava posameznih nerazkuženih krompirjevih lističev za odtise na trdna gojišča PDA

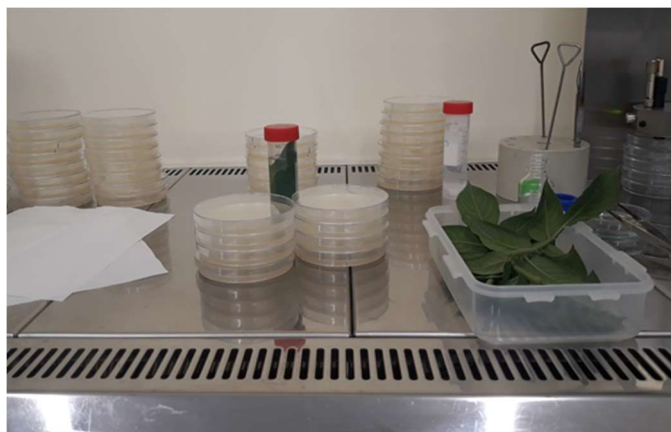
Petrievke z odtisi lističev smo nato prestavili v rastno komoro (BINDER GmbH, Nemčija) z rastnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 22 °C. Po 4 dneh smo vse petrijevke pregledali v mikološkem laboratoriju pod stereomikroskopom ter na podlagi morfoloških značilnosti različnih micelijev identificirali rod gliv.

### 3.5.3 Odtisi površinsko steriliziranih lističev na trdna gojišča PDA

Da bi preverili, ali različne metode površinske sterilizacije res odstranijo kontaminacije z listne površine, smo lističe po površinski sterilizaciji odtisnili na trdna gojišča PDA in

preverili učinkovitost razkuževanja. Testirali smo pet različnih metod površinske sterilizacije, kot je opisano v poglavju 3.3.2.1.

Iz krompirjevih rastlin, gojenih v rastlinjaku, starih sedem tednov, smo s čistimi škarjicami nabrali večje število listov in jih prenesli v brezprašno komoro v mikološki laboratorij. S sterilno pinceto smo odtrgali posamezne lističe, pri čemer smo za vsako metodo površinske sterilizacije uporabili 4 lističe, le pri negativni kontroli (brez površinske sterilizacije) smo uporabili 3 lističe. Za vsako metodo površinske sterilizacije smo v 50 ml centrifugirkah pripravili ločene raztopine NaOCl oz. tekočo vodo oz. AVV, da smo se izognili navzkrižnemu prenosu neuspešno odstranjenih kontaminacij (Slika 27).



**Slika 27: Površinska sterilizacija krompirjevih lističev za odtis na trdna gojišča PDA**

Po površinski sterilizaciji smo lističe osušili na toplotno steriliziranih papirnatih brisačkah. Lističe smo nato odtisnili na trdna gojišča PDA z dodanim antibiotikom streptomycin (55 mg/ml, Streptomycin sulfat, Sigma-Aldrich, ZDA) (Priloga E), pri čemer smo vsako stran lističa odtisnili na svoje gojišče PDA. Petrijevke smo nato inkubirali v rastni komori (BINDER GmbH, Nemčija) z rastnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 22 °C. Po 4 dneh smo vse petrijevke pregledali v mikološkem laboratoriju pod stereomikroskopom in preverili uspešnost različnih metod površinske sterilizacije.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ROČNA KRIŽANJA IN PRIDOBITEV PRAVIH SEMEN KROMPIRJA

Z ročnimi križanji med maternimi rastlinami, občutljivimi na krompirjevo plesen, in očetovsko odporno sorto Sárpo Mira smo uspeli pridobiti skupno 1420 semen (Preglednica 8). Največ pravih semen smo pridobili s križanjem med sortama Sylvana in Sárpo Miro, najmanj pa s križanjem med sortama Rioja in Sárpo Miro. Po sajenju pravih semen v pladnje, napolnjene s komercialnim substratom, v rastlinjak, jih je v sejančke vzklilo 85,4 % (Preglednica 8).

**Preglednica 8:** Število pridobljenih pravih semen in število vzklilih rastlin za posamezno križanje

Občutljiva sorta	Odporna sorta	Število pravih semen	Število vzklilih rastlin	Delež vzklilih rastlin [%]
Rioja		187	142	75,9
Lusa		257	223	86,8
Colomba	Sárpo Mira	287	269	93,7
Bikini		205	163	79,5
Sylvana		484	416	85,9
	<b>Skupno</b>	<b>1420</b>	<b>1213</b>	<b>85,4</b>

### 4.2 ODBIRA GENOTIPOV *R8* IZ POPULACIJE F1 KRIŽANCEV

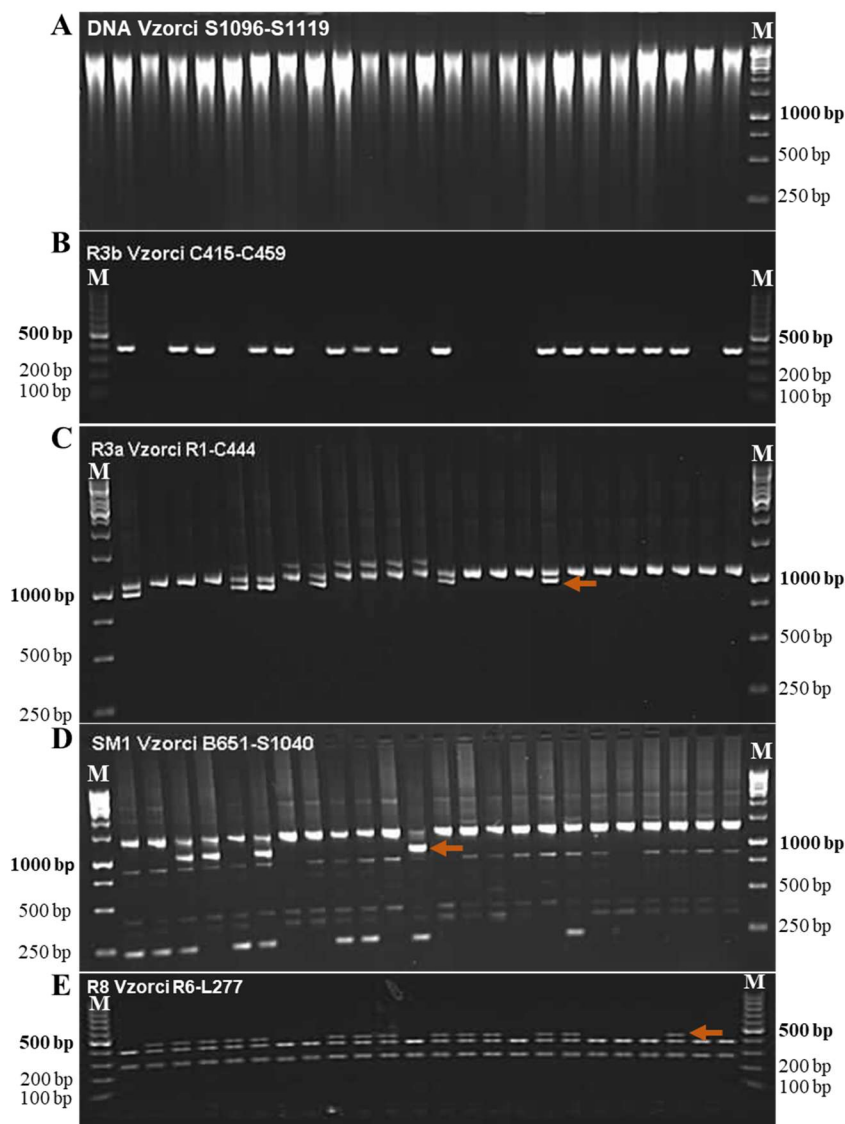
#### 4.2.1 Odbira genotipov *R8* z genskimi markerji

Iz vzklilih sejančkov populacije F1 križancev smo nabrali vzorce listnega tkiva, izolirali DNA in z metodo PCR določili prisotnost oz. odsotnost odpornostnih genov.

Da bi pridobili križance, ki vsebujejo le gen *Rpi-Smira/R8*, smo opravili postopno negativno odbiro z genskimi markerji za gene *R3b*, *R3a*, *Rpi-Smira1*, kot je opisano v poglavju 3.1.3. Najprej smo vseh 1213 vzorcev analizirali z genskim markerjem *R3b* za prisotnost gena *R3b* in odbrali le vzorce brez pomnoženega fragmenta PCR. Slednjih je bilo skupno 186, s katerimi smo nadaljevali analizo z markerji za gena *R3a* (marker Sha) in *Rpi-Smira1* (marker 45/XI) in pridobili 104 vzorce brez treh odpornostnih genov. Zadnja analiza z metodo PCR je potekala z molekulskim markerjem 184-81 za gen *Rpi-Smira2/R8*, kjer smo obdržali 36 vzorcev s pomnoženim fragmentom PCR. Reprezentativni elektroforetski geli produktov PCR za uporabljene genske markerje so prikazani na sliki 28.

Na tej točki so skozi opisani selekcijski postopek prešli le križanci štirih od skupno petih križanj. Potomci križanja med sortama Bikini in Sárpo Mira so prestali negativno selekcijo za odpornostne gene *R3b*, *R3a* in *Rpi-Smira1*, vendar nobeden izmed odbranih

potomcev sorte Bikini ni vseboval gena *Rpi-Smira2/R8* in posledično niso bili več vključeni v nadaljnje analize.



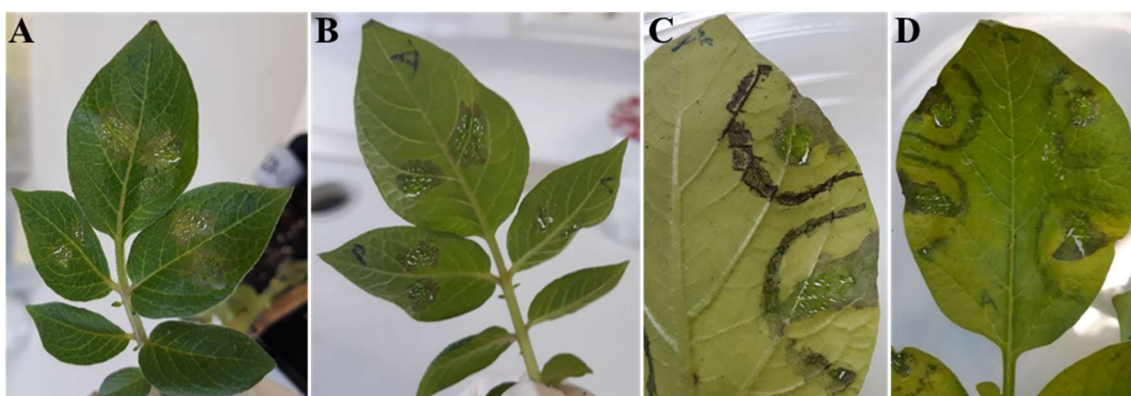
**Slika 28: Primeri rezultatov agarozne elektroforeze**

A – preverjanje uspešnosti izolacije molekul DNA; B – produkti pomnoževanja fragmentov gena *R3b* z dolžino 378 bp; C – produkti pomnoževanja fragmentov gena *R3a* z dolžino 982 bp; D – produkti pomnoževanja fragmentov gena *Rpi-Smiral* z dolžino 1000 bp; E – produkti pomnoževanja fragmentov gena *Rpi-Smira2/R8* po restrikciji z encimom *RsaI* z dolžino 480 bp.

#### 4.2.2 Selekcija z efektorsko agroinfiltracijo

Po selekciji z genskimi markerji smo pridobili 36 križancev, ki so vsebovali gen *Rpi-Smira2/R8*, njihov status glede odpornostnega gena *R4* pa je bil neznan, saj za omenjeni gen molekularni marker še ni razvit.

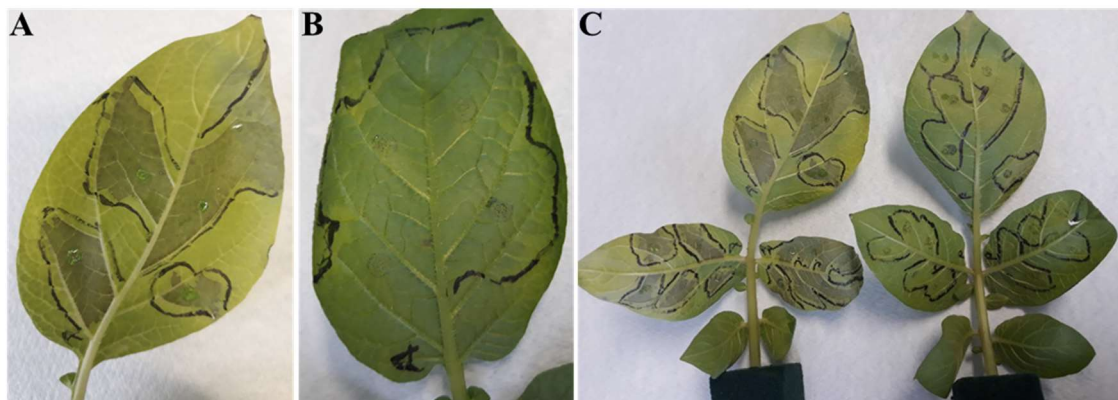
Skupno smo agroinfiltrirali 37 rastlin: 36 križancev in starševsko sorto Sárpo Mira, ki je predstavljala pozitivno kontrolo. Sprva smo agroinfiltracijo opravili na celih rastlinah, vendar je bila zaradi kompaktne strukture krompirjevih listov močno otežena. Za razliko od mehkih listov tobaka, na katerih se agroinfiltracija najpogosteje opravlja, so krompirjevi listi debelejši in čvrstejši, zaradi česar je bilo potrebno z infiltracijsko brizgo aplicirati precejšen pritisk za uspešno infiltracijo bakterijske suspenzije. Ob tem smo pogosto listno tkivo poškodovali do te mere, da je precejšnja količina bakterijske suspenzije odtekla skozi poškodbe mimo listnega tkiva, primerljivo s cedilom (Slika 29).



**Slika 29: Poškodbe na listnem tkivu, nastale na mestih agroinfiltracije, opravljene na celih krompirjevih rastlinah**

A in B – zgornja (A) in spodnja (B) stran lista agroinfiltriran z *A. tumefaciens* z vektorjem z vstavljenim genom *Avr4* (sredinski listič), z *A. tumefaciens* z vektorjem brez efektorskega gena (levi listič na Sliki B z oznako P) in z AVV (desni listič na Sliki B z oznako V); C in D – primera neučinkovite agroinfiltracije z *A. tumefaciens* z vektorjem z vstavljenim genom *Avr4*.

Postopek agroinfiltracije smo ponovili, vendar smo tokrat namesto celih rastlin uporabili le posamezne odrezane liste. S pomočjo stereomikroskopa smo lahko predhodno z iglo z izjemno natančnostjo zbadli le vrhnje plasti spodnje (abaksialne) strani listnega tkiva, kar je močno olajšalo infiltracijo bakterijske suspenzije v tkivo. Po treh dneh smo vse liste pregledali za prisotnost hipersenzitivnega odziva, kar je indikacija za prisotnost gena *R4* v testiranih rastlinah. Reprezentativni primer hipersenzitivnega odziva po agroinfiltraciji je prikazan na sliki 30. Od 36 testiranih rastlin se pri 10 križancih hipersenzitivni odziv ni pojavil, kar nakazuje na odsotnost gena *R4*.



**Slika 30: Reprezentativni rezultati agroinfiltracije efektorja Avr4**

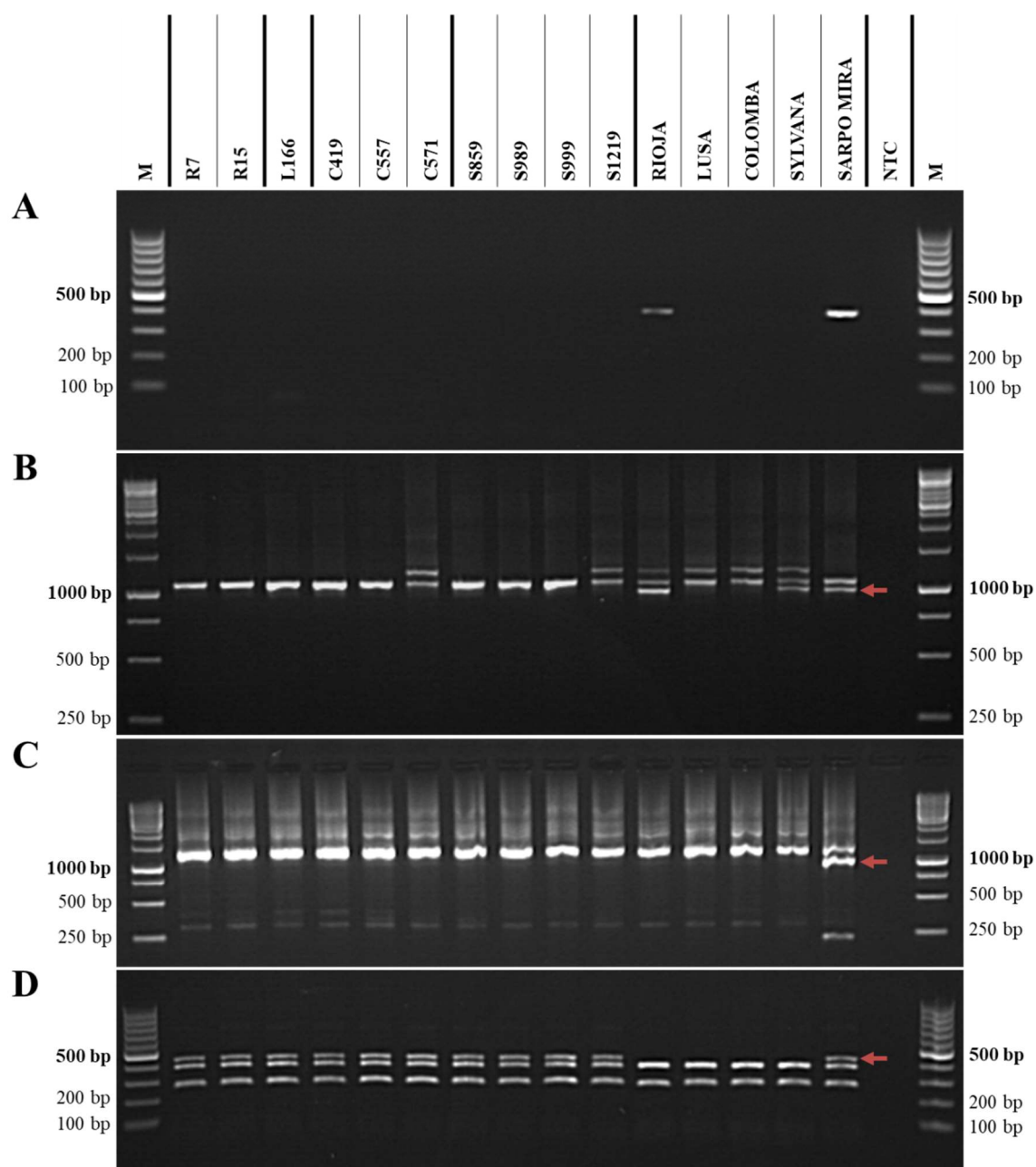
A – hiper-senzitivni odziv (HR) po infiltraciji bakt. suspenzije *A. tumefaciens* z vektorjem z vstavljenim genom *Avr4*; B – listič brez reakcije po infiltraciji bakt. suspenzije *A. tumefaciens* z vektorjem z vstavljenim genom *Avr4*; C – primerjava lista z odzivom HR (levo) z listom brez odziva (desno) infiltriranega z bakt. suspenzijo s praznim vektorjem (ang. mock control).

Po končanem odбору z genskimi markerji in efektorsko agroinfiltracijo smo iz populacije 1213 F1 križancev pridobili 10 križancev oz. genotipov *R8*, ki od petih odpornostnih genov starševske sorte Sárpo Mira vsebujejo le gen *Rpi-Smira2/R8*. Genotipi *R8* so izhajali iz štirih od skupno opravljenih petih križanj:

- genotipa R7 in R15 – starševski sorti Rioja in Sárpo Mira;
- genotip L166 – starševski sorti Lusa in Sárpo Mira;
- genotipi C419, C557 in C571 – starševski sorti Colomba in Sárpo Mira;
- genotipi S859, S989, S999 in S1219 – starševski sorti Sylvana in Sárpo Mira.

Končno populacijo genotipov *R8* smo nato skupaj s starševskimi sortami ponovno testirali z vsemi štirimi genskimi markerji ter tako potrdili odsotnost odpornostnih genov *R3a*, *R3b*, *Rpi-Smira1* in prisotnost gena *Rpi-Smira2/R8* (Slika 31). Starševska sorta Rioja je bila pozitivna na genska markerja za gena *R3b* in *R3a* (Slika 31A-B), starševska sorta Sylvana pa je bila pozitivna na genski marker za gen *R3a* (Slika 31B). Starševski sorti Lusa in Colomba sta bili na vse testirane genske markerje negativni, medtem ko je bila starševska sorta Sárpo Mira pozitivna na vse genske markerje (Slika 31).





**Slika 31: Produkti pomnoževanja genov *R3b* (A), *R3a* (B), *Rpi-Smira1* (C) in *Rpi-Smira2/R8* (D) v genotipih *R8* in pripadajočih starševskih sort Rioja, Lusa, Colomba, Sylvana in Sárpo Mira**  
A – produkti pomnoževanja genskega markerja R3b za gen *R3b* z dolžino 378 bp;  
B – produkti pomnoževanja genskega markerja SHa za gen *R3a* z dolžino 982 bp;  
C – produkti pomnoževanja genskega markerja 45/XI za gen *Rpi-Smira1* z dolžino 1000 bp;  
D – produkti pomnoževanja genskega markerja 184-81 za gen *Rpi-Smira2/R8* po restrikciji z encimom RsaI z dolžino 480 bp.

#### 4.3 OPTIMIZACIJA VZBUDITVE VIRULENCE *P. infestans*

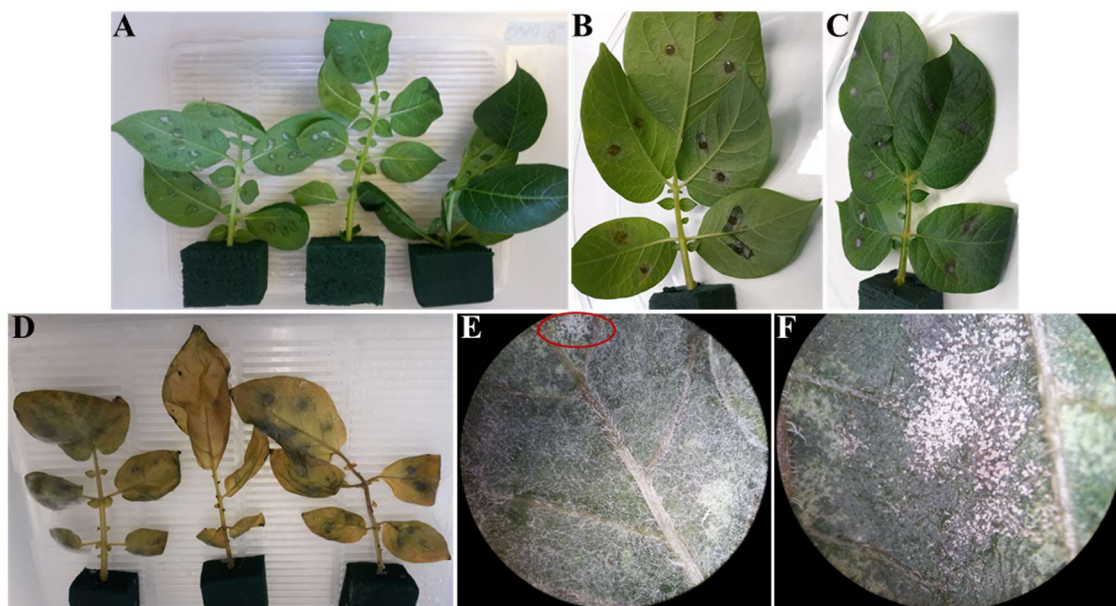
Pri pregledu literature smo zasledili in nato testirali tri različne načine vzbuditve virulence *P. infestans* ter se na podlagi uspešnosti, učinkovitosti ter prednosti in slabosti odločili za najbolj primerno metodo in jo uporabili pred inokulacijami genotipov *R8*. Priprava

suspenzije zoospor je bila pri vseh treh metodah enaka, kot opisano v poglavju 3.2.2, razlikovale so se le v rastlinskem materialu (odrezani listi, rezine krompirjevih gomoljev in tkivne kulture).

#### 4.3.1 Vzbuđenje virulence *P. infestans* z inokulacijo odrezanih krompirjevih listov

Eden izmed najbolj uporabljenih načinov vzbuđenja virulence *P. infestans* je inokulacija krompirjevih listov, občutljivih na krompirjevo plesen, na katere v več točkah odpipetiramo suspenzijo zoospor. Po nekaj dneh se na točkah inokulacije pojavijo prvi simptomi bolezni, kasneje pa se pojavijo še micelij in sporangiofori. Micelij z virulentnimi sporangiji lahko nato preprosto prenesemo na trdna gojišča Rye-A, te pa nato uporabimo za pripravo inokuluma *P. infestans* za testiranje odpornosti krompirjevih rastlin.

Ko smo odrezane krompirjeve liste inokulirali s *P. infestans*, kot opisano v poglavju 3.2.3.1, so se že naslednji dan na točkah inokulacije pojavili prvi simptomi v obliki manjših lokalnih nekroz (Slika 32A). Po štirih dneh so se nekroze razširile po listnem tkivu izven točke inokulacije, ponekod pa je bil viden tudi micelij (Slika 32B-C).



Slika 32: Vzbuđenje virulence *P. infestans* z uporabo odrezanih krompirjevih listov – pomanjkljivosti

Kasneje so se pokazale pomanjkljivosti te metode. Listi so postali vodeni in uveli, kar je oteževalo kakršno koli rokovanje in prestavljanje listov pod stereomikroskop (Slika 32D). Poleg tega smo pod stereomikroskopom opazili prisotnost kontaminacij, ki bi jih lahko razširili skupaj z micelijem *P. infestans* na trdna gojišča, saj se je v nekaterih primerih micelij kontaminacije prepletal z micelijem *P. infestans* (Slika 32E-F). Čeprav so izolati *P. infestans* uspešno rastle na inokuliranih krompirjevih listih, se je zaradi pogoste

prisotnosti kontaminacij metoda izkazala kot nezanesljiva in težavna za uspešno izolacijo in prenos virulentnega micelija *P. infestans* na sveža gojišča Rye-A.

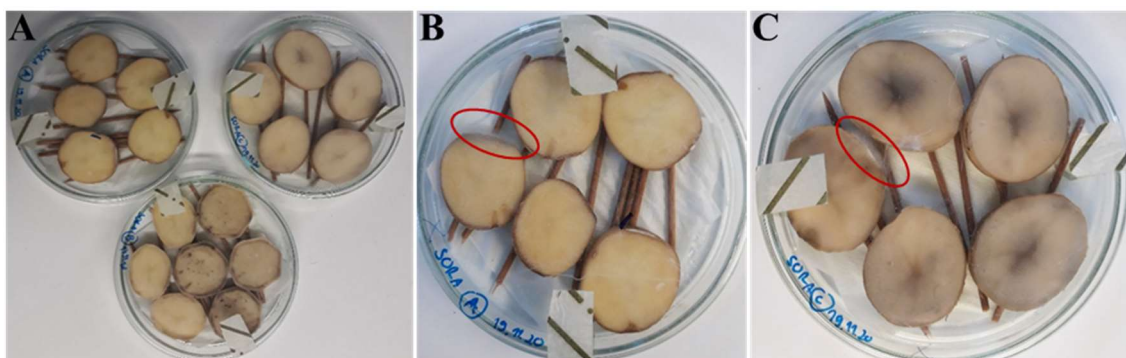
#### 4.3.2 Vzбудitev virulence *P. infestans* z inokulacijo rezin krompirjevih gomoljev

Nekoliko manj pogosto uporabljena metoda vzburitve virulence *P. infestans* je inokulacija rezin krompirjevih gomoljev, občutljivih na krompirjevo plesen. Preden smo gomolje lahko razrezali na rezine v sterilnem okolju, jih je bilo potrebno površinsko sterilizirati. Testirali smo tri različne metode površinske sterilizacije. Kot opisano v poglavju 3.2.3.2, so se razlikovale v tem, ali smo gomolje pred postopkom olupili ali pa smo gomolje pred rezanjem ožgali. Na tej točki rezin nismo inokulirali s *P. infestans*, ampak smo jih le položili na lesene palčke v steklenih petrijevkah in pustili v inkubatorju v temi enajst dni.

Po inkubaciji nas je zanimalo, ali so se na rezinah kljub površinski sterilizaciji pojavile kontaminacije in katera izmed testiranih metod se je najbolje izkazala (Slika 33A). Pri metodi A (neolupljeni gomolji z ožiganjem) je bilo meso gomoljev najmanj poškodovano, saj zaradi lupine raztopina NaOCl ni mogla prodreti v plasti pod lupino in poškodovati tkiva. Kljub kombiniranemu razkuževanju (raztopina NaOCl in 96 % etanol) so se na teh rezinah po končani inkubaciji pojavile kontaminacije (Slika 33B), zato smo metodo A označili kot neprimerno za uporabo.

Pri razkuževanju rezin z metodo B (olupljeni gomolji brez ožiganja) smo pričakovali, da bo metoda dovolj učinkovita, saj z lupljenjem gomoljev odstranimo glavni vir kontaminacij, hkrati pa z namakanjem v NaOCl dodatno razkužimo površino mesa gomoljev in tako uničimo kontaminacije, ki bi se lahko prenesle na meso med lupljenjem gomoljev. Po enajstih dneh inkubacije smo na robovih rezin opazili nekrotično tkivo, ki je verjetno nastalo kot posledica namakanja v visoki koncentraciji raztopine NaOCl (3 %) (Slika 33A). Kljub manjšim poškodbam so rezine ostale sterilne, zato smo metodo B površinske sterilizacije gomoljev označili kot uspešno in primerno za uporabo.

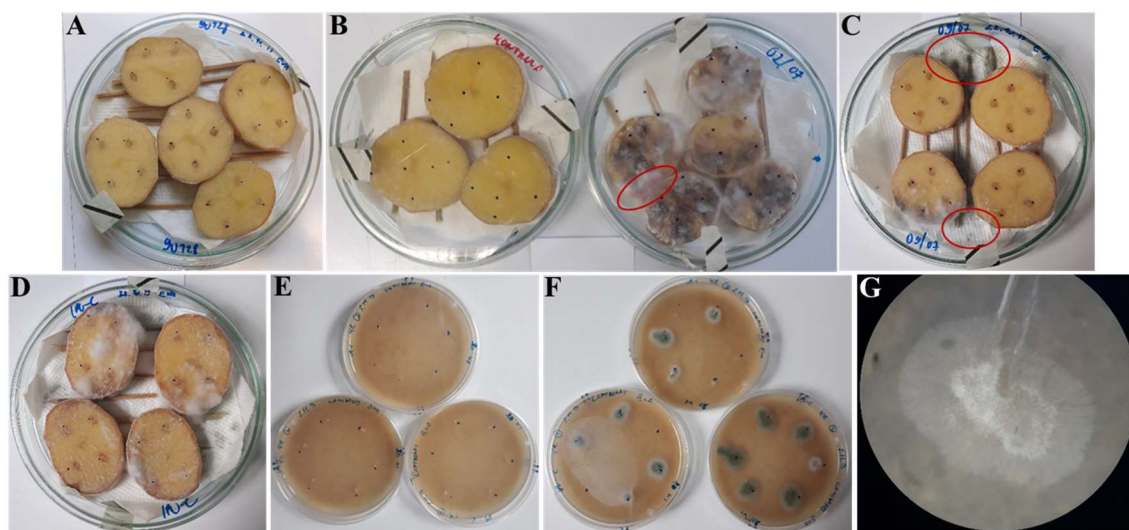
Metoda razkuževanja C (olupljeni gomolji z ožiganjem) je predstavljala nadgradnjo metode B, kjer smo kemičnemu razkuževanju z NaOCl dodali še toplotno sterilizacijo z ožiganjem s 96 % etanolom. Zaradi kombinacije odstranjene lupine, namakanja v raztopini NaOCl in ožiganja smo pri tej metodi pričakovali najvišjo učinkovitost. Kljub temu so se na teh rezinah pojavile kontaminacije, ožiganje s 96 % etanolom pa je povzročilo dodatne nekroze na robovih rezin (Slika 33C).



**Slika 33: Testiranje treh različnih metod površinske sterilizacije krompirjevih gomoljev (A) in pojav kontaminacij (B in C)**

Na podlagi rezultatov testiranja treh različnih metod površinske sterilizacije krompirjevih gomoljev smo za vzbuditev virulence *P. infestans* z rezinami krompirjevih gomoljev uporabili metodo razkuževanja B.

Po površinski sterilizaciji gomoljev z izbrano metodo in pripravi rezin smo naslednji dan na rezine inokulirali suspenzijo zoospor *P. infestans* (izolati 02\_07, 09\_07, 90128 in IPO-C), kot opisano v poglavju 3.2.3.2. Po dveh dneh inkubacije so se na rezinah na točkah inokulacije pojavile nekroze (Slika 34A), kar nakazuje na uspešen vdor patogena v tkivo gomolja. Po štirinajstih dneh so bile krompirjeve rezine v večini primerov preraščene z belim micelijem, smo pa na nekaterih rezinah opazili tudi kontaminacije (Slika 34B-D). Te rezine smo nato v brezprašni komori previdno odstranili iz petrijevk, da bi preprečili širjenje kontaminacij na ostale rezine. Da bi potrdili prisotnost *P. infestans* na inokuliranih rezinah, smo s sterilno iglo micelij iz rezin prenesli na trdna gojišča Rye-A (Slika 34E) in jih inkubirali v inkubatorju v temi pri temperaturi 21 °C. Po sedmih dneh smo pod stereomikroskopom pregledali točke na gojišču z izoliranim micelijem. V večini primerov je iz točk na gojišču zrastle gliva z modro obarvanim micelijem z belim robom (Slika 34F-G). Ne glede na izvorno inokulirano rezino in inokuliran izolat *P. infestans* je na točkah izoliranega micelija na gojišču rastle enaka gliva, kar nakazuje, da inokulirane rezine gomoljev niso bile preraščene z micelijem *P. infestans*, kot smo sprva predvidevali, temveč se je na njih razširila druga gliva.



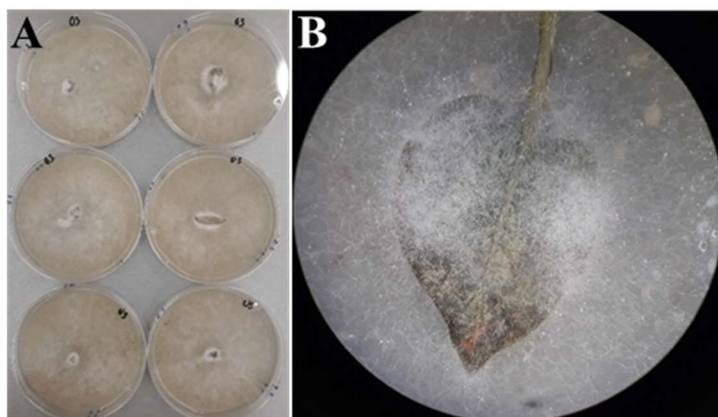
**Slika 34: Vzbuđenje virulence *P. infestans* z uporabo rezin krompirjevih gomoljev – pomanjkljivosti**  
A – pojav nekroz na inokulacijskih točkah 2 dni po inokulaciji *P. infestans*; B – primerjava inokuliranih rezin krompirjevih gomoljev s *P. infestans* in kontrolnimi rezinami inokuliranimi z AVV (z rdečo barvo označena kontaminacija); C – z rdečo barvo označene kontaminacije na inokuliranih rezinah 9 dni po inokulaciji s *P. infestans*; D – inokulirane rezine z belim micelijem glive 13 dni po inokulaciji s *P. infestans*; E, F in G – testna izolacija zrastlega micelija iz inokuliranih rezin (Slika 34D), za katerega se je izkazalo, da ni *P. infestans*, kar smo potrdili tudi pod stereomikroskopom.

Kljub večkratni ponovitvi celotnega postopka vzbuđenja virulence z rezinami gomoljev so se kontaminacije ponovno pojavile. Čeprav je v določenih primerih *P. infestans* na rezinah gomoljev uspešno zrastle, je bil micelij *P. infestans* pogosto v tesnem stiku z navidez zelo podobnim micelijem druge glive. Metoda vzbuđenja virulence z rezinami se je tako izkazala za preveč nezanesljivo, zato smo zaključili, da metoda ni primerna za uporabo.

#### 4.3.3 Vzbuđenje virulence *P. infestans* z inokulacijo tkivnih kultur

Tretja testirana metoda vzbuđenja virulence *P. infestans* je bila inokulacija sorte Dobrin v tkivni kulturi. Suspenzijo zoospor *P. infestans* smo pripravili enako kot pri odrezanih listih in krompirjevih rezinah (poglavje 3.2.2.), le da smo jo nato predstavili v razkužene pršilke in jo popršili po celotnem kozarčku z rastlinami, kot opisano v poglavju 3.2.3.3. Po treh dneh so se na listih že pojavili prvi simptomi krompirjeve plesni, po petih pa je bil razraščeni micelij na listih viden že s prostim očesom (Slika 19B).

Iz enega inokuliranega kozarčka s tremi rastlinami smo lahko pridobili veliko število preraščenih krompirjevih listov, ki smo jih nato v brezprašni komori predstavili na sveža trdna gojišča Rye-A<sup>+</sup>, kot opisano v poglavju 3.2.3.3. Z vseh preraščenih listov na gojišču Rye-A<sup>+</sup> se je oomiceta *P. infestans* uspešno razširila (Slika 35A), kar smo potrdili tudi s pregledom vseh petrijevk pod stereomikroskopom (Slika 35B). Pri vseh razraščeni petrijevkah je bila prisotna le oomiceta *P. infestans*, nikjer pa nismo zasledili morebitnih kontaminacij, s čimer se je ta metoda izkazala kot zelo zanesljiva.



**Slika 35:** Razraščeni virulentni micelij *P. infestans* po prenosu preraščenih listov sorte Dobrin v tkivni kulturi na trdna gojišča Rye-A<sup>+</sup>

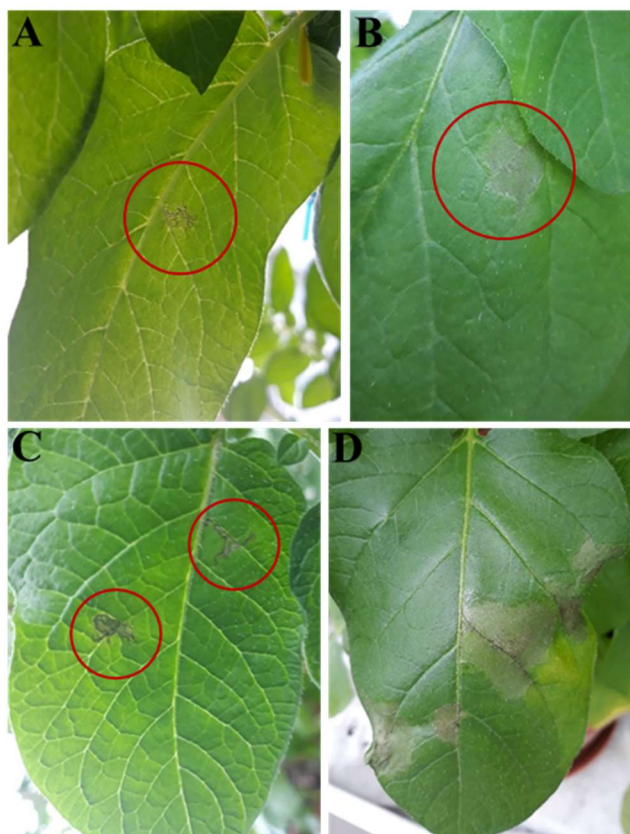
Zaradi visoke uspešnosti, učinkovitosti in zanesljivosti smo za vzbuditev virulence *P. infestans* pred testiranjem odpornosti genotipov *R8* uporabili metodo inokulacije tkivnih kultur. Izjemoma smo pri inokulaciji genotipov *R8* v rastlinjaku za pridobitev virulentnih zoospor uporabili rezine krompirjevih gomoljev (opisano v poglavju 3.3.1.1).

#### 4.4 TESTIRANJE ODPORNOSTI GENOTIPOV *R8* NA KROMPIRJEVO PLESEN

##### 4.4.1 Inokulacija celih rastlin genotipov *R8* in starševskih sort s *P. infestans* v rastlinjaku

###### 4.4.1.1 Ohranjanje visoke zračne vlage z meglilnim sistemom

Po inokulaciji celih rastlin genotipov *R8* in starševskih sort v rastlinjaku smo vsakodnevno spremljali razvoj prvih znakov krompirjeve plesni ter širjenja bolezni. Po štirih dneh so se pojavili prvi simptomi okužbe s *P. infestans*, vendar le na nekaterih rastlinah (Slika 36A). Po šestih dneh smo opazili nekoliko izrazitejše simptome okužbe (Slika 36B-C), toda ponovno le na posameznih krompirjevih rastlinah. Po osmih dneh smo le na eni rastlini opazili večje lezije (Slika 36D), medtem ko velika večina ostalih rastlin, vključno z občutljivimi starševskimi sortami, ni razvila simptomov krompirjeve plesni.



**Slika 36: Simptomi krompirjeve plesni na listih rastlin, inokuliranih v rastlinjaku po 4 dneh (A), po 6 dneh (B in C) ter 8 dneh (D)**

Kljub dodatni ponovitvi poskusa in uporabi agresivnih tujih izolatov 90128 in IPO-C inokulacija genotipov *R8* in starševskih sort v rastlinjaku ni uspela. Za pripravo inokuluma izolatov 90128 in IPO-C smo uporabili metodo inokulacije rezin krompirjevih gomoljev (opisano v poglavju 3.2.3.2). Med inkubacijo inokuliranih rezin se je pojavilo večje število kontaminacij, ki smo jih pravočasno in uspešno odstranili, vendar smo za pripravo inokuluma tako imeli na voljo le manjše število preraščenih rezin ter posledično pripravili nižje koncentracije inokuluma ( $2,5 \times 10^4$  sporangijev/ml).

Dodatno težavo je predstavljalo tudi vzdrževanje visoke relativne zračne vlage v komorah v rastlinjaku. Kljub uporabi meglilnega sistema z 1 min pršenja vsako uro je relativna zračna vlaga med okužbo s *P. infestans* precej nihala, saj je povprečna relativna zračna vlaga v komorah v obeh ponovitvah inokulacije znašala med 66 % in 70 %, predvsem v prvih dneh po inokulaciji pa mora biti relativna zračna vlaga čim višja, saj zoospore za uspešno pritrnitev in prodor v rastlinsko tkivo potrebujejo vodno okolje (Fry, 2008). Pretirano pršenje meglice med okužbo s *P. infestans* pa bi po drugi strani lahko spralo zoospore z listne površine.

## 4.4.2 Inokulacija odrezanih listov genotipov R8 in starševskih sort s *P. infestans*

### 4.4.2.1 Testiranje razkuževanja listov za DLA

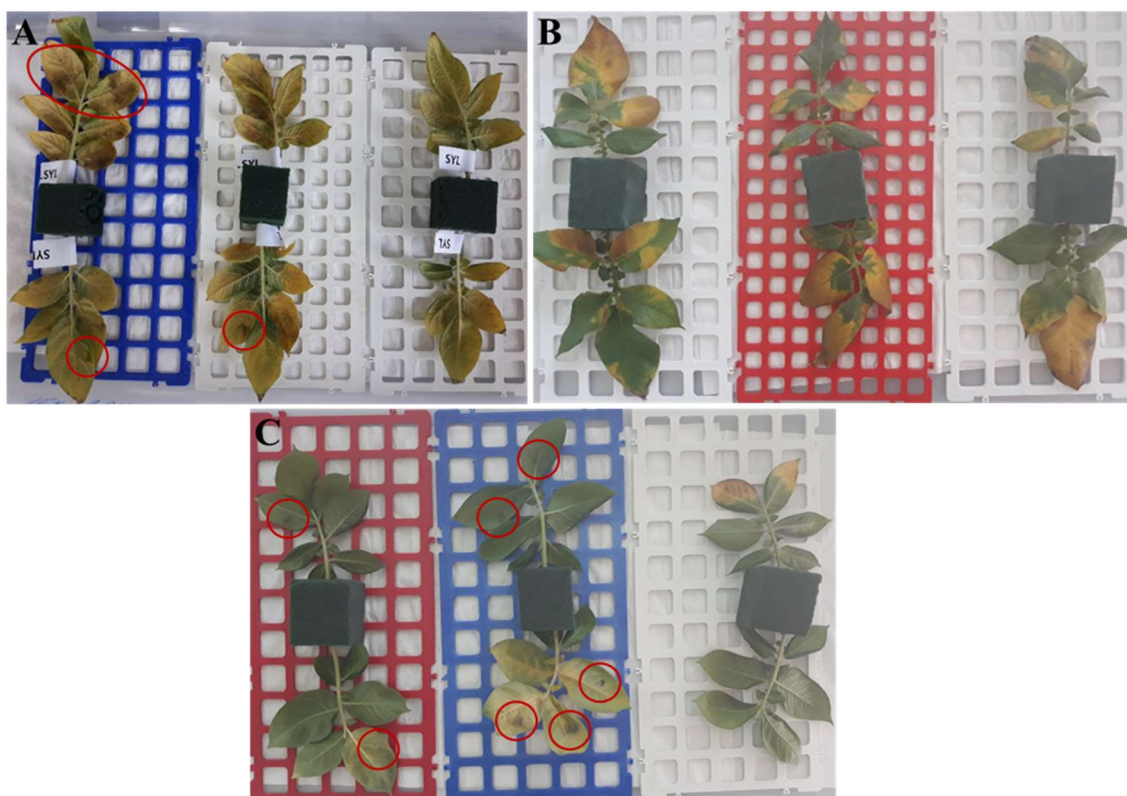
Testirali smo pet različnih načinov sterilizacije (opisano v poglavju 3.3.2.1), eno skupino listov iz rastlinjaka pa smo vstavili v cvetlične gobe neposredno brez površinske sterilizacije (metoda površ. sterilizacije št. 6).

Z metodama št. 1 in št. 2 smo testirali dve različni koncentraciji NaOCl (1 % in 0,5 %), pri čemer nas je zanimala sama učinkovitost sterilizacije ter ali uporabljeni koncentraciji raztopin NaOCl pri tem poškodujeta listno tkivo. Zanimalo nas je tudi, ali z naknadnim izpiranjem z AVV učinkovito odstranimo ostanke raztopine NaOCl ter tako preprečimo pretirane poškodbe listnega tkiva. Z metodami št. 3, št. 4 in št. 5 smo želeli preveriti učinkovitost posameznih načinov spiranja s tekočo vodo, AVV ali kombinacijo obeh ter ali bi že sami po sebi zadostovali za mehansko odstranitev neželenih mikroorganizmov. Po površinski sterilizaciji listov smo naslednji dan nanесли suspenzijo zoospor *P. infestans*, s čimer smo testirali, ali površinska sterilizacija vpliva naknadno na razvoj krompirjeve plesni, še posebej pri metodah št. 1 in št. 2, kjer bi lahko ostanki NaOCl zavirali rast *P. infestans*.

Površinska sterilizacija z NaOCl pri obeh uporabljenih koncentracijah je na listnem tkivu povzročila hudo razbarvanje listov (Slika 37A-B). Čeprav smo na točkah inokulacije opazili lezije, nastale zaradi *P. infestans*, so bile poškodbe na listnem tkivu ponekod preobsežne, da bi lahko jasno ločili simptome krompirjeve plesni od poškodb, nastalih zaradi površinske sterilizacije. Raztopina NaOCl v 0,5 % koncentraciji je sicer povzročila razbarvanje listov v manjšem obsegu kot pri 1 % koncentraciji, vendar so bile poškodbe na listu kljub temu preobsežne za uporabo pri poskusih inokulacije s *P. infestans* (Slika 37B).

Izmed vseh testiranih metod se je najbolje obnesla metoda št. 3 (izpiranje listov s tekočo vodo in kratko namakanje v AVV), saj po enem tednu na listih nismo opazili kontaminacij, ampak le simptome krompirjeve plesni (Slika 37C). Pri tej metodi je bilo mehansko spiranje dovolj intenzivna metoda za odstranjevanje neželenih mikroorganizmov s površine listnega tkiva, ne da bi ga pri tem poškodovali.





**Slika 37: Učinkovitost različnih metod površinske sterilizacije odrezanih krompirjevih listov po enem tednu**

A – metoda št. 1: površinska sterilizacija odrezanih krompirjevih listov z 1,0 % raztopino NaOCl;  
B – metoda št. 2: površinska sterilizacija odrezanih krompirjevih listov z 0,5 % raztopino NaOCl;  
C – metoda št. 3: spiranje odrezanih krompirjevih listov v tekoči vodi in AVV.

Pred inokulacijami *P. infestans* na odrezane krompirjeve liste (DLA) smo na podlagi učinkovitosti in nedestruktivnosti metode za mehansko čiščenje površine listov izbrali metodo št. 3 (spiranje v tekoči vodi in AVV).

#### 4.4.2.2 Metoda DLA z odrezanimi listi v pladnjih

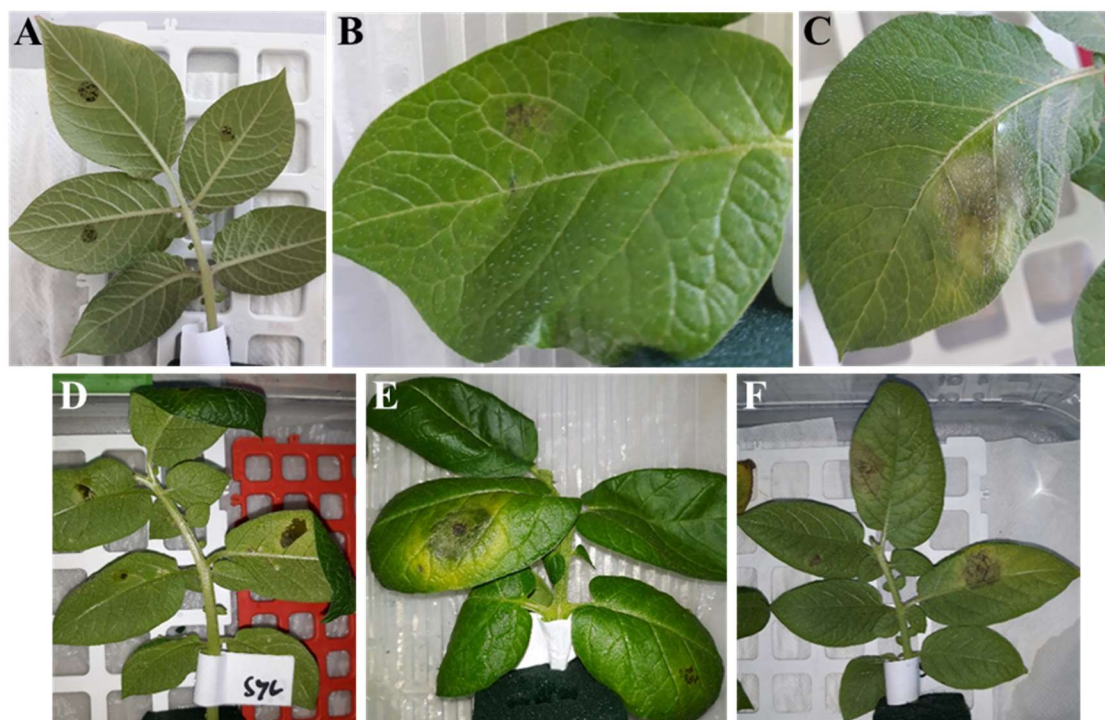
Da bi določili stopnjo odpornosti genotipov *R8* proti krompirjevi plesni, smo testiranim rastlinam odrezali posamezne liste z vsaj petimi lističi in jih točkovno inokulirali z inokulumom virulentnih zoospor *P. infestans* (opisano v poglavju 3.3.2.2). Vsakodnevno smo na genotipih *R8* in starševskih sortah spremljali, kdaj so se pojavili prvi simptomi ter kako se je bolezen širila po listnem tkivu. Točkovna inokulacija nam je pri tem olajšala spremljanja, saj smo lažje predvideli točno lokacijo nastanka prvih simptomov bolezni.

Inokulirane odrezane liste smo opazovali tudi pod stereomikroskopom. Prvi in drugi dan po inokulaciji so se znotraj točk inokulacije pojavile manjše nekroze, kar nakazuje na uspešen prodor zoospor *P. infestans* v listno tkivo in hkrati na aktiviranje rastlinskega imunskega sistema v obliki hipersenzitivnega odziva (HR) (Slika 38).



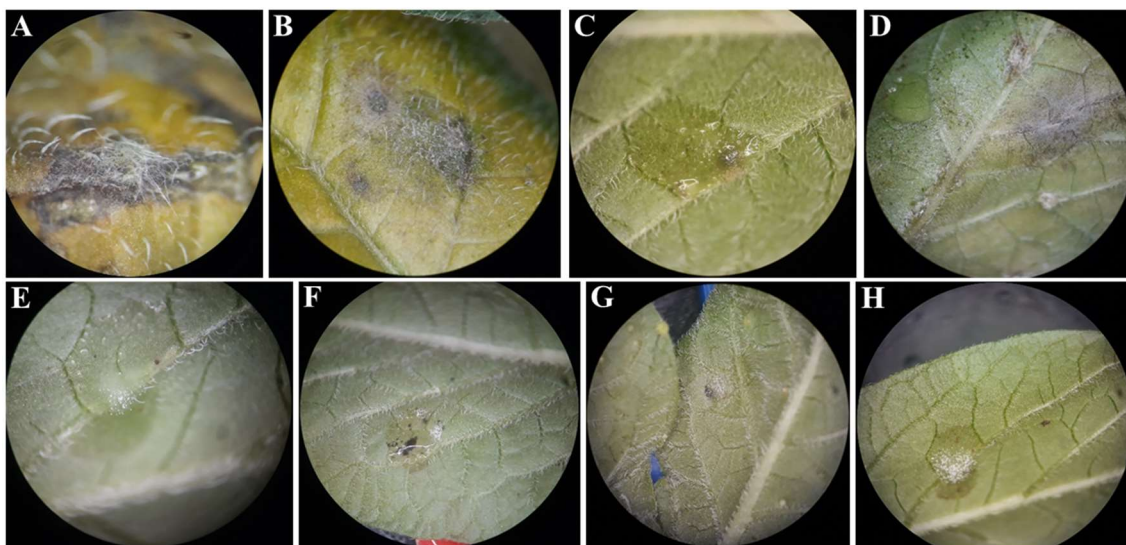
Slika 38: Hipersenzitivni odziv na listnem tkivu po dveh dneh po inokulaciji *P. infestans*, viden pod stereomikroskopom

Po treh in štirih dneh so se nekroze povečale in postale vidne s prostim očesom (Slika 39A-B), vendar se nekroze večinoma niso razširile izven dimenzij inokulacijske kaplje s suspenzijo. Po petih in šestih dneh so se nekroze razširile v skupno večjo lezijo, okrog katere je listno tkivo porumenelo (Slika 39C-F), lezija pa je bila po velikosti večja od dimenzij inokulacijske kaplje.

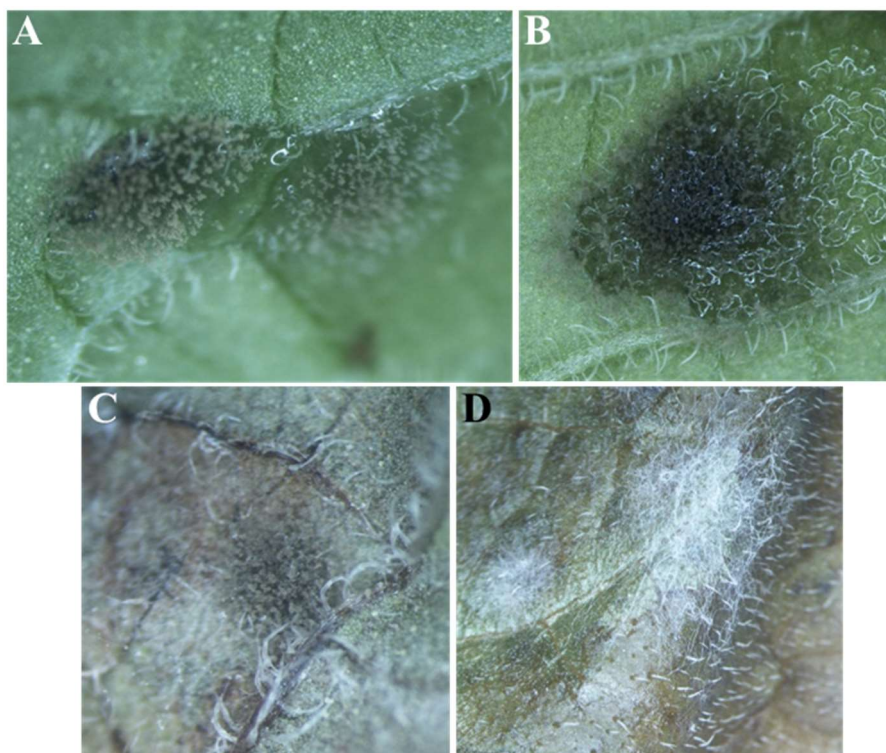


Slika 39: Primeri simptomov krompirjeve plesni na odrezanih krompirjevih listih po 3 dneh (A in B), po 5 dneh (C in D) ter 6 dneh (E in F) po inokulaciji s *P. infestans*

Čeprav smo pri večini inokuliranih odrezanih listov opazili tipičen pojav simptomov in razvoj krompirjeve plesni, je bila variabilnost pojava znakov okužbe znotraj ponovitev visoka. Poleg tega smo na listih v kasnejših dneh po inokulaciji pod stereomikroskopom v večini primerov opazili tudi obsežno prisotnost kontaminacij (Slika 40A), predvsem v točkah inokulacije s *P. infestans* (Slika 40B-D), čeprav so nekroze in lezije s prostim očesom izgledale kot tipični simptomi krompirjeve plesni. Zaradi prepletanja micelija *P. infestans* z micelijem neželenih gliv (Slika 40C) in pojava kontaminacij znotraj točk inokulacij smo težko določili pravega povzročitelja simptomov na listih (Slika 40E-H, Slika 41). Pri odrezanih listih iz skupine za negativno kontrolo (inokulacija z AVV) so se v nekaterih primerih prav tako pojavile kontaminacije, predvsem na listih, ki so se neposredno dotikali navlaženih brisačk pod plastičnimi mrežami. Opazili smo tudi, da so se kontaminacije pojavile tudi na nalepkah z oznakami listov in na kockah cvetlične gobe. Predvidevali smo, da je to vir kontaminacij, saj smo z vsakodnevnim odpiranjem vreč pri pregledovanju inokuliranih listov zlahka prenesli spore na predhodno očiščene odrezane liste na pladnju.



Slika 40: Pojav kontaminacij znotraj inokulacijskih točk po inokulaciji odrezanih krompirjevih listov s *P. infestans*



**Slika 41: Pojav neželenih gliv znotraj inokulacijskih točk na odrezanih krompirjevih listih**

Temne lise, vidne s prosim očesom, smo zmotno označili za simptome krompirjeve plesni, saj smo s pregledom inokulacijskih točk pod stereomikroskopom ugotovili, da gre za temno obarvan micelij neželene glive.

Poskus inokulacije genotipov *R8* in starševskih sort na odrezanih listih smo zato ponovili (opisano v poglavju 3.3.2.2), vendar smo tokrat toplotno sterilizirali na kocke narezano cvetlično gobo, nalepk za označevanje listov pa nismo uporabili. Tako kot pri prvi inokulaciji genotipov *R8* smo predhodno toplotno sterilizirali tudi plastične podstavke in papirnate brisačke, pladnje pa predhodno očistili s 70 % etanolom. Odrezane liste smo sprali pod tekočo vodo, nato pa še z AVV (opisano v poglavju 3.3.2.1). Inokulum je bil tako kot pri prvi inokulaciji pripravljen iz preraščenih rezin krompirjevih gomoljev (opisano v poglavju 3.2.3.2).

Kljub dodatnim ukrepom in toplotni sterilizaciji uporabljenih materialov so se po inokulaciji *P. infestans* na odrezanih listih pojavile enake kontaminacije tako izven kot tudi znotraj inokulacijskih točk. Za razliko od prejšnje inokulacije tokrat na odrezanih listih, inokuliranih z AVV (negativna kontrola), nismo opazili kontaminacij, kar pomeni, da je toplotna sterilizacija uporabljenih materialov in odstranitev nalepk pripomogla k manj intenzivnemu širjenju kontaminacij na listno tkivo pri skupini listov za negativno kontrolo.

Zaradi prisotnosti kontaminacij le pri odrezanih listih z inokulirano suspenzijo zoospor *P. infestans* smo predvidevali, da je inokulum vir kontaminacij. Inokulum smo pripravili

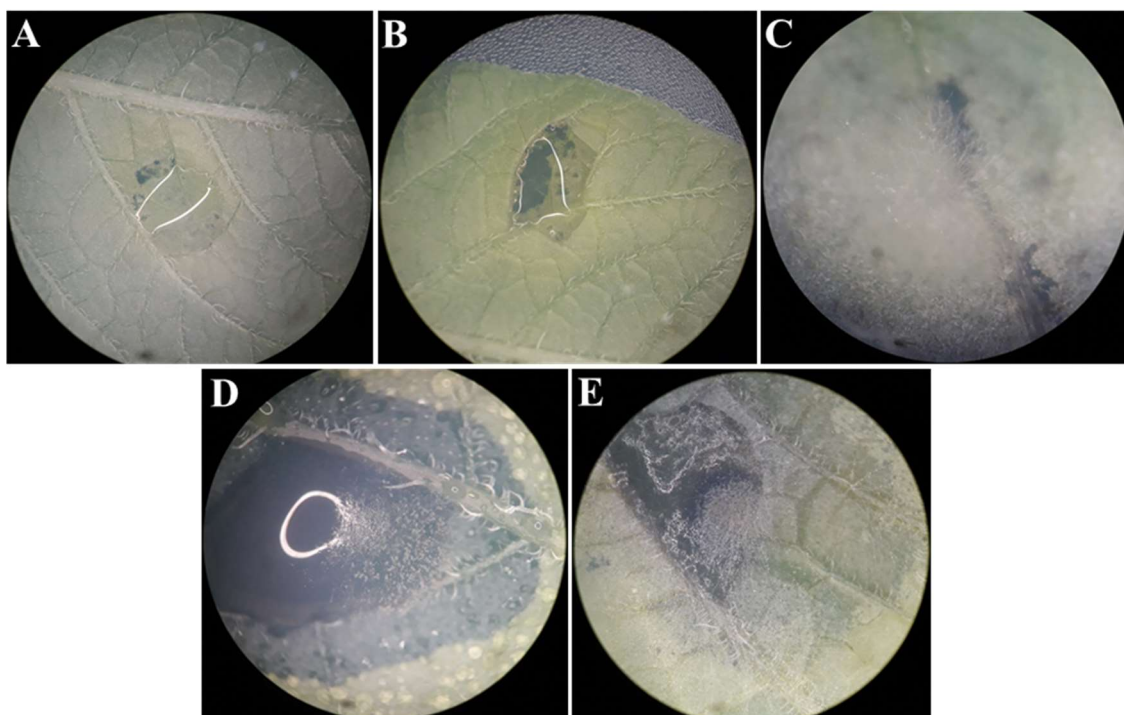
iz preraščenih rezin krompirjevih gomoljev (opisano v poglavju 3.2.3.2), kjer smo tudi med pripravo imeli težave s kontaminacijami (opisano v poglavju 4.3.2). Posledično smo tako metodo priprave virulentnega inokuluma *P. infestans* z rezinami gomoljev kot tudi metodo inokulacije odrezanih krompirjevih listov v pladnjih opustili. Namesto priprave inokuluma s preraščenimi rezinami gomoljev smo virulentne zoospore pridobili z inokulacijo tkivnih kultur (opisano v poglavju 3.3.2.3). Metodo DLA smo nadalje modificirali in optimizirali, da smo čim bolj zmanjšali tveganje za pojav kontaminacij po inokulaciji genotipov R8 s *P. infestans*.

#### 4.4.2.3 Metoda DLA na lističih v petrijevkah z vodnim agarjem

Zaradi težav s kontaminacijami pri metodi DLA z listi v pladnjih smo namesto odrezanih listov uporabili posamezne lističe, namesto pladnjev pa petrijevke premera 9 cm z 1,5 % vodnim agarjem (opisano v poglavju 3.3.2.3). Vodni agar namreč zagotavlja visoko zračno vlažnost, ki jo zoospore *P. infestans* potrebujejo za uspešen prodor v listno tkivo. Uporaba petrijevk izboljša sterilnost inokulacijskega poskusa, saj priprava petrijevk poteka v sterilnem okolju, v posamezni petrijevki pa se nahaja le en listič. Za razliko od odrezanih listov v pladnjih, kjer lahko potencialne kontaminacije razširimo na ostale čiste liste, so pri tej metodi lističi ločeni med sabo in tako lahko kontaminirane liste preprosto odstranimo brez prenašanja kontaminacij na ostale očiščene liste.

Iz krompirjevih rastlin občutljivih starševskih sort Rioja, Lusa, Colomba in Sylvana ter odporne starševske sorte Sárpo Mira smo nabrali več posameznih lističev, jih površinsko očistili s tekočo in sterilno vodo in položili v petrijevke z agarjem. Na vsako polovico lista (levo in desno od glavne listne žile) smo odpipetirali suspenzijo zoospor *P. infestans* (opisano v poglavju 3.3.2.3). Z uporabo občutljivih starševskih sort smo želeli povečati uspešnost okužbe s *P. infestans*.

Po dveh dneh smo opazili pojav lokalnih nekroz znotraj dimenzij inokulacijskih točk (Slika 42A-B), kar se sklada z začetnim razvojem simptomov krompirjeve plesni. Po treh dneh smo pri večini testiranih listov že opazili pojav kontaminacij znotraj inokulacijskih točk (Slika 42C). Po šestih dneh so bile inokulacijske točke preraščene s kontaminacijami, medtem ko so se lezije sicer razširile izven dimenzij inokulacijskih točk, vendar nikjer nismo opazili micelija *P. infestans* (Slika 42D-E). Pri negativni kontroli ponovno nismo opazili kontaminacij. Uporaba vodnega agarja je povzročila, da so bili inokulirani krompirjevi listi v nekaj dneh po inokulaciji prekriti z vodnimi kapljami zaradi kondenzacije zračne vlage. Na podlagi teh rezultatov smo predvidevali, da je visoka vlažnost v petrijevki lahko pripomogla k intenzivnejši rasti neželenih gliv.



**Slika 42: Pojav kontaminacij znotraj inokulacijskih točk po 2 dneh (A in B), po 3 dneh (C) in 6 dneh (D in E) po inokulaciji posameznih odrezanih lističev v petrijevkah z vodnim agarjem**

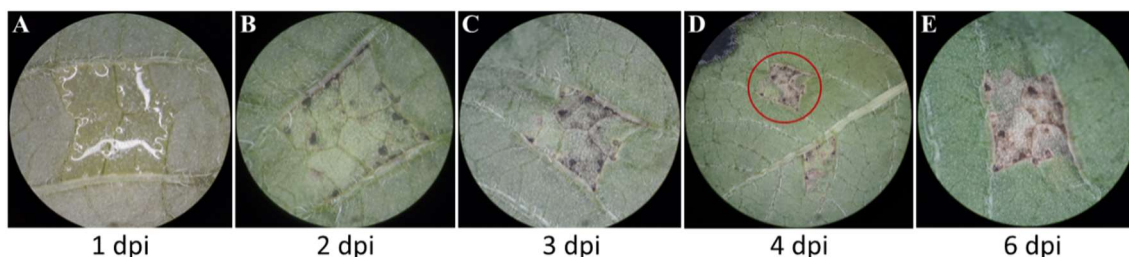
Da bi preverili vpliv visoke vlažnosti na pojav kontaminacij pri inokulaciji posamičnih lističev v petrijevkah z vodnim agarjem, smo ponovili poskus inokulacije zoospor *P. infestans* po enaki metodi, kot opisano v poglavju 3.3.2.3, vendar smo tokrat uporabili prazne petrijevke brez vodnega agarja. Inokulacijska kaplja s suspenzijo zoospor je bila tako edini vir vlage v petrijevkah.

Krompirjeve lističe, nabrane iz šest tednov starih rastlin starševskih sort (Rioja, Lusa, Colomba, Sylvana, Sárpo Mira), gojene v rastlinjaku, smo postavili direktno v petrijevke, brez površinskega spiranja, nanje pa inokulirali 30  $\mu$ l suspenzije zoospor *P. infestans* (Slika 43). Inokulirane lističe smo inkubirali pod enakimi pogoji kot petrijevke z vodnim agarjem in vsakodnevno pod stereomikroskopom spremljali razvoj simptomov.



**Slika 43:** Inokulacija posameznih odrezanih krompirjevih lističev s *P. infestans* v petrijevkah brez vodnega agarja

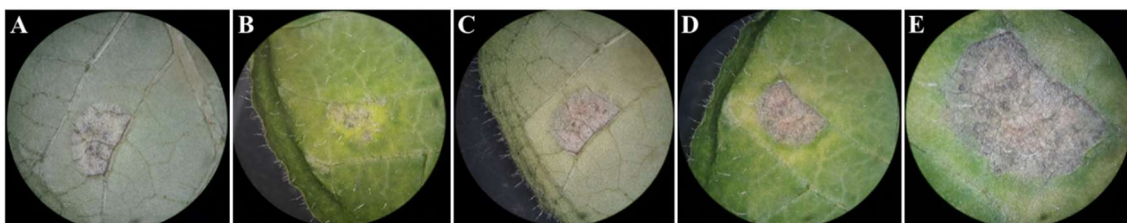
Slika 44 prikazuje potek in širjenje krompirjeve plesni po dnevih. Inokulacijske kaplje so se hitreje posušile kot na odrezanih listih v pladnjih ali v petrijevkah z vodnim agarjem in so večinoma izginile po treh dneh po inokulaciji. Simptomi so se kljub temu pojavili v dveh dneh po inokulaciji (Slika 44 in 45). Tekom inokulacije so se ponekod te posamične nekroze razširile v lezije (Slika 44 in 45), vendar je bilo to širjenje precej počasnejše kot pri odrezanih listih v pladnjih. Večinoma je širjenje simptomov ostalo na nivoju posameznih lezij znotraj dimenzij inokulacijskih točk. V primeru lističev občutljive sorte Lusa so se posamične nekroze razširile in prekrile celotno inokulacijsko točko (Slika 44E), okrog lezij pa je tkivo porumenelo, vendar so tudi te lezije po šestih dnevih ostale znotraj dimenzij inokulacijske kaplje. Zaradi pomanjkanja vlage so listi precej oveneli in se nagubali, nizka vlažnost pa je vplivala tudi na rast *P. infestans*, saj so se simptomi krompirjeve plesni počasneje širili v primerjavi z inokulacijami na odrezanih listih v pladnjih in na posamičnih lističih v vodnem agarju. Glavna razlika od ostalih inokulacij na odrezanih listih oz. lističih je bila popolna odsotnost kontaminacij, čeprav so lističe nabrali v rastlinjaku in prestavili neposredno v petrijevke brez površinskega spiranja ali razkuževanja.



**Slika 44:** Širjenje simptomov krompirjeve plesni od 1. dneva po inokulaciji (dpi) do 6. dneva po inokulaciji (dpi) na posameznih odrezanih lističih v petrijevkah brez vodnega agarja

S tem smo pokazali, da je visoka relativna zračna vlaga ključna za pojav kontaminacij, zato lahko z znižanjem zračne vlažnosti v celoti preprečimo rast neželenih gliv na listnem

tkivu. Nizka zračna vlaga v petrijevkah je imela hkrati tudi neželen učinek na *P. infestans*, saj so simptomi krompirjeve plesni v večini primerov obstali na ravni posameznih nekroz znotraj dimenzij inokulacijske točke, čeprav smo uporabili lističe občutljivih starševskih sort. Prav tako niti pri bolj razširjenih lezijah nismo opazili micelija ali sporangijev *P. infestans*, ki bi nakazovala na uspešno okužbo listnega tkiva s *P. infestans*.



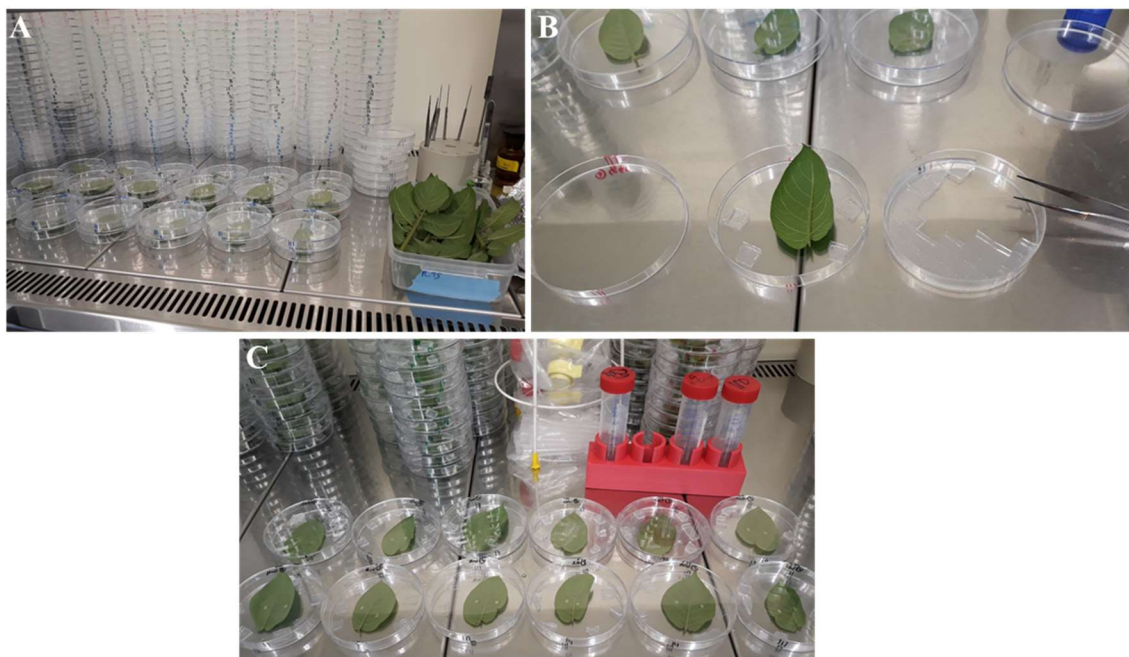
**Slika 45: Primeri simptomov krompirjeve plesni po inokulaciji posameznih odrezanih lističev s *P. infestans* v petrijevkah brez vodnega agarja**

A in B – spodnja (A) in zgornja (B) stran lističa s simptomi krompirjeve plesni 4 dni po inokulaciji s *P. infestans*; C in D – spodnja (C) in zgornja (D) stran lističa s simptomi krompirjeve plesni 6 dni po inokulaciji s *P. infestans*; E – slika D pod 60 $\times$  povečavo.

Glavni zaključek rezultatov obeh metod DLA na posamičnih lističih bodisi z višjo bodisi z nižjo vlažnostjo je zagotovitev optimalne stopnje zračne vlage med okužbo s *P. infestans*, ki bi bila dovolj nizka, da bi zavirala širjenje kontaminacij, ter hkrati dovolj visoka za uspešen prodor in rast *P. infestans* v listnem tkivu. Na podlagi teh rezultatov smo nato preizkusili metodo, ki združuje oba aspekta: inokulacija zoospor *P. infestans* na posamičnih lističih v petrijevkah, ki smo jim dodali nekaj koščkov agarja za vzdrževanje zmerne relativne vlažnosti.

V rastlinjaku smo od enajst tednov starih rastlin genotipov *R8* in starševskih rastlin nabrali po trideset lističev, ki smo jih inokulirali s štirimi izolati *P. infestans* (02\_07, 09\_07, 90128 in IPO-C), pri čemer smo uporabili šest lističev za vsako obravnavanje (štirje izolati in skupina za negativno kontrolo). Skupno smo nabrali 420 lističev (14 rastlin  $\times$  6 lističev  $\times$  5 obravnavanj). Lističe smo iz rastlinjaka predstavili neposredno v petrijevke, brez površinskega spiranja, da so bili lističi čim manj vlažni (Slika 46A). V vsako petrijevko smo nato s sterilno pinceto okrog lističa položili od štiri do šest koščkov 1,5 % agarja (velikosti približno 1 cm), pri čemer smo pazili, da se koščki niso dotikali listov (Slika 46B). Na vsak listič smo inokulirali po 30  $\mu$ l suspenzije virulentnih zoospor *P. infestans*, pripravljene kot opisano v poglavju 3.2.3.3., levo in desno od glavne listne žile (Slika 46B). Vse petrijevke smo inkubirali v rastni komori (BINDER GmbH, Nemčija) z rastnimi pogoji 16 h dnevne svetlobe pri temperaturi 22  $^{\circ}$ C in 75 % relativne zračne vlage. Inokulirane liste smo 8 dni vsakodnevno opazovali pod stereomikroskopom in spremljali pojav simptomov krompirjeve plesni.

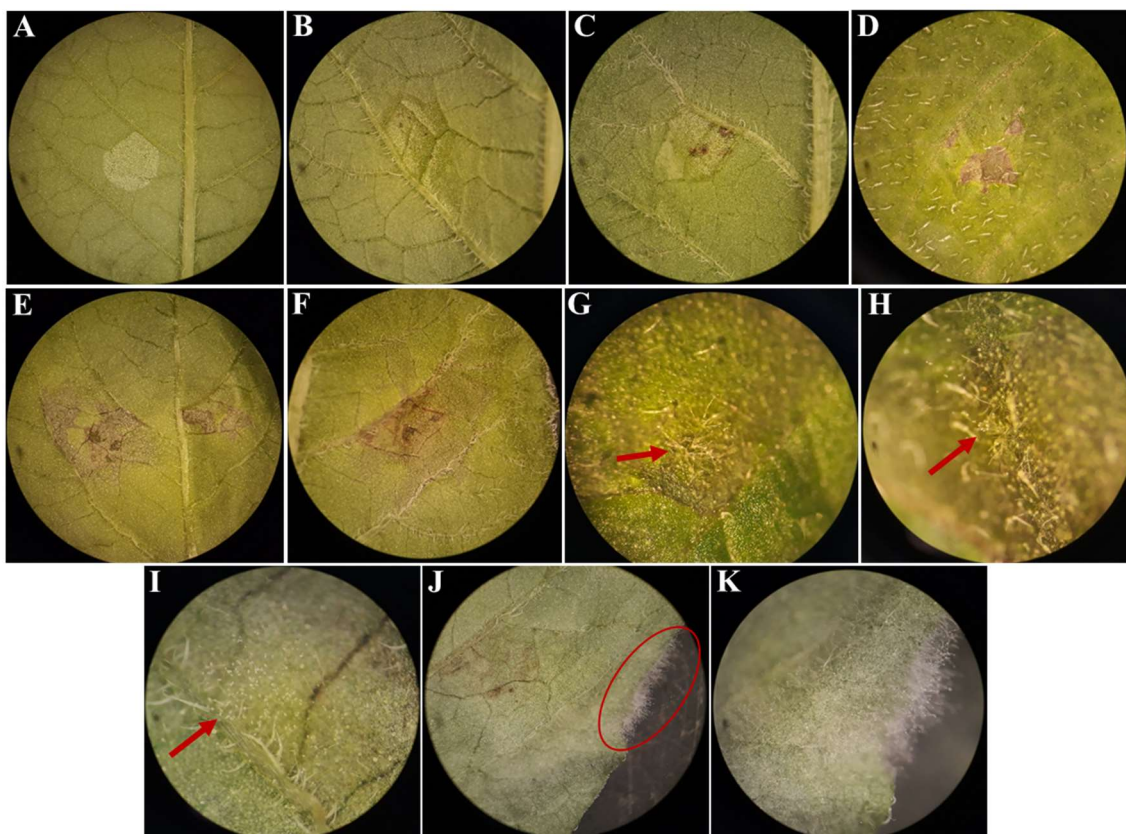




**Slika 46: Priprava posameznih odrezanih lističev za inokulacijo s *P. infestans* v petrijevkah s koščki vodnega agarja**

Po inokulaciji s slovenskim izolatom 02\_07 smo v večini primerov opazili le posamične lokalne nekroze, ki se v celotnem času okužbe niso razširile, kar je značilno za hipersenzitivni odziv (Slika 47A-B). V redkih primerih so se nekroze nekoliko razširile, vendar so ostale znotraj dimenzij inokulacijskih točk. Ti rezultati nakazujejo, da so bili genotipi *R8* in starševske sorte odporne na izolat 02\_07, saj je hipersenzitivni odziv preprečil širjenje bolezni. Podoben razvoj simptomov smo opazili tudi pri tujem izolatu 90128, kar ni bilo povsem v skladu s pričakovanji, saj je izolat 90128 eden izmed agresivnejših izolatov *P. infestans*.

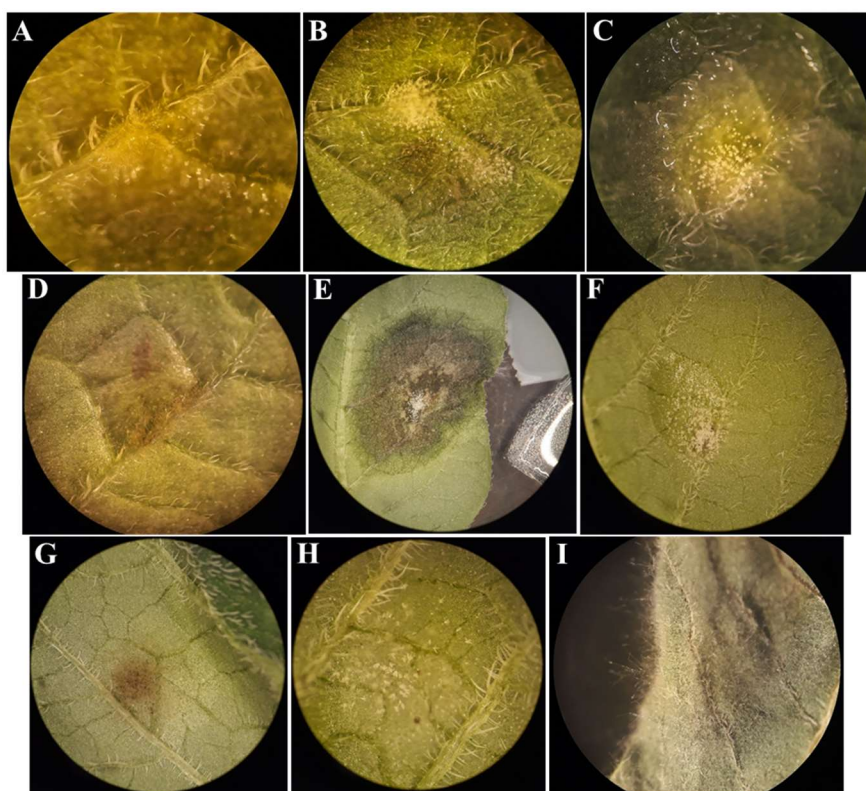
Po inokulaciji s slovenskim izolatom 09\_07 in tujem izolatom IPO-C so se simptomi krompirjeve plesni ponekod uspešno razvili do pojava micelija (Slika 47G-H), v primeru izolata 09\_07 so se pojavili tudi sporangiji (Slika 47I-J), vendar je bila taka intenziteta simptomov značilna le za določen del inokuliranih lističev.



**Slika 47: Primeri simptomov krompirjeve plesni po inokulaciji posameznih odrezanih lističev s *P. infestans* v petrijevkah s koščki vodnega agarja**

Rdeče puščice na slikah G, H in I označujejo micelij *P. infestans* z manjšim številom sporangijev, ki se je pojavil 4 dni (G) oz. 5 dni (H, I) po inokulaciji z inokulumom *P. infestans*. Z rdečo elipso na Sliki J so označeni sporangiji *P. infestans*, ki so se pojavili po 6 dneh po inokulaciji z inokulumom *P. infestans* in so na Sliki K prikazani pod večjo povečavo stereomikroskopa.

V primerih, kjer se je okužba z izolatom 09\_07 razvila do pojava micelija, so se simptomi razširili izven dimenzij inokulacijske točke (Slika 47). Pri inokulaciji z izolatom IPO-C so bili simptomi krompirjeve plesni najbolj pogosti in so se v večini primerov razvili do stopnje večjih lezij obdane s porumenelim listnim tkivom. Lezije so se razširile tudi izven dimenzij inokulacijske točke (Slika 47E-F).



Slika 48: Pojav kontaminacij znotraj inokulacijskih točk po inokulaciji posameznih odrezanih lističev s *P. infestans* v petrijevkah s koščki vodnega agarja

Za razliko od inokulacij posamičnih lističev brez dodanega vira vlage smo pri inokuliranih lističih z dodanimi koščki agarja po nekaj dneh tudi opazili kontaminacije, vendar so bile sprva redke. Po petih dneh se je pogostost pojava kontaminacij znotraj inokulacijskih točk povečala, kar je precejšen zamik od inokuliranih lističev z vodnim agarjem, kjer so se kontaminacije pri večini listov pojavile že po treh dneh. To nakazuje, da zmanjšanje zračne vlažnosti v petrijevkah upočasni širjenje kontaminacij, hkrati pa še vedno omogoča rast in širjenje *P. infestans*. Kljub temu metode DLA v petrijevkah z dodanimi koščki agarja nismo obravnavali kot povsem uspešno, saj je bila variabilnost simptomov znotraj ponovitev genotipov *R8* ali starševskih sort previsoka, da bi lahko zanesljivo določili stopnjo odpornosti genotipov *R8* na krompirjevo plesen. V nekaterih primerih je bilo težko ločiti med micelijem neznane glive in micelijem *P. infestans* (Slika 48I), kar je močno otežilo ovrednotenje simptomov krompirjeve plesni. Kontaminacije so se pojavile neodvisno od inokuliranega izolata *P. infestans* in ne glede na testiran genotip *R8* ali starševsko sorto, za razliko od lističev inokuliranih z AVV, kjer tako kot pri ostalih negativnih kontrolah pri metodah DLA na posamičnih lističih nismo zasledili kontaminacij.

#### 4.4.3 Inokulacija tkivnih kultur genotipov R8 in starševskih sort s *P. infestans*

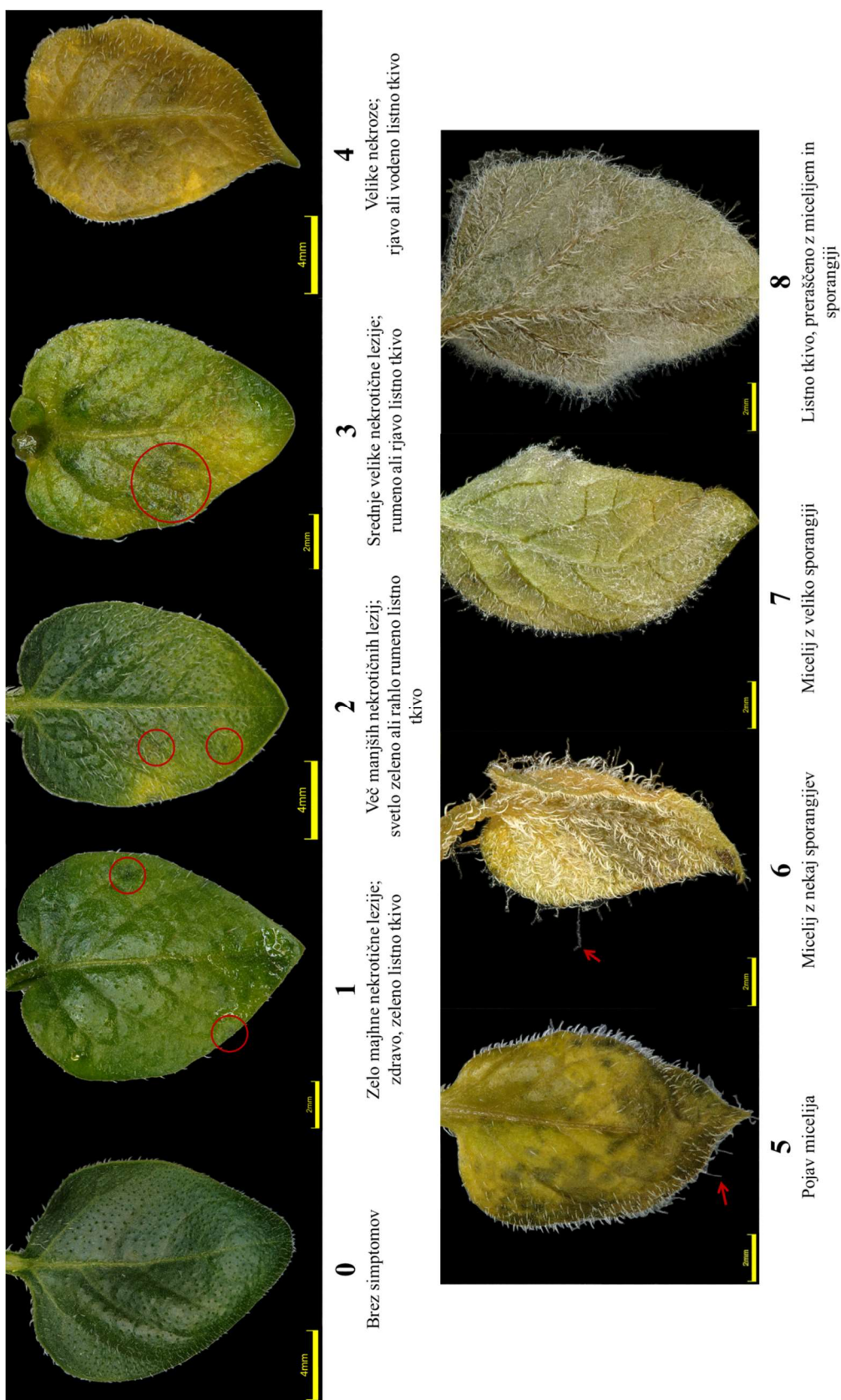
Inokulacija tkivnih kultur genotipov R8 se je izkazala za najbolj uspešno metodo inokulacije *P. infestans* v primerjavi z inokulacijami v rastlinjaku in na odrezanih listih, saj smo lahko zagotovili visoko raven sterilnosti skozi celoten postopek inokulacije; od priprave inokuluma na sorti Dobrin v tkivni kulturi (poglavje 3.2.3.3) do pršenja inokuluma v kozarčke z rastlinami v brezprašni komori (poglavje 3.3.3).

Inokulirali smo devet od desetih odbranih genotipov R8, saj je genotip S1219 v tkivni kulturi slabo rasel in smo ga izločili iz obravnavanja. Hkrati smo inokulirali tudi štiri občutljive starševske sorte (Rioja, Lusa, Colomba in Sylvana) in odporno sorto Sárpo Mira. Starševske sorte so nam služile kot kontrola, saj smo zanje pričakovali občutljiv odziv oz. v primeru sorte Sárpo Mira odporen odziv in smo jih lahko primerjali z odzivom genotipov R8.

Tekom okužbe s *P. infestans* smo pod stereomikroskopom dnevno spremljali pojav in razvoj simptomov krompirjeve plesni, ki so se pojavili na listih rastlin v tkivni kulturi. Intenziteto simptomov smo ocenili s pomočjo lestvice za krompirjevo plesen, ki smo jo razvili na podlagi razvoja simptomov krompirjeve plesni v preliminarnih poskusih na tkivnih kulturah. Lestvica je obsegala vrednosti med 0 in 8, pri čemer so posamezne ocene predstavljale:

- 0) Brez simptomov.
- 1) Zelo majhne nekrotične lezije; zdravo, zeleno listno tkivo.
- 2) Več manjših nekrotičnih lezij; svetlo zeleno ali rahlo rumeno listno tkivo.
- 3) Srednje velike nekrotične lezije; rumeno ali rjavo listno tkivo.
- 4) Velike nekroze; rjavo ali vodeno listno tkivo.
- 5) Pojav micelija *P. infestans*.
- 6) Micelij z nekaj sporangijev.
- 7) Micelij z veliko sporangiji.
- 8) Listno tkivo, preraščeno z micelijem in sporangiji.

Liste s tipičnimi znaki in različnimi stopnjami simptomov krompirjeve plesni smo poslikali z mikroskopom na Katedri za lesne škodljivce, zaščito in modifikacijo lesa, Oddelka za lesarstvo, Biotehniška fakulteta (Slika 49).

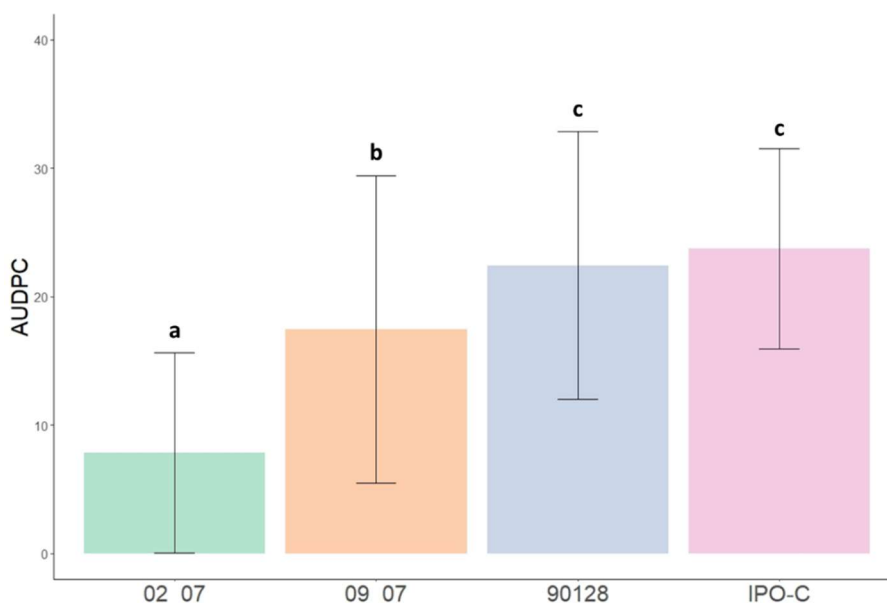


Slika 49: Lestvica simptomov krompirjeve plesni za ocenjevanje širjenja in razvoja *P. infestans* v tkivni kulturi

#### 4.4.3.1 Razlike v agresivnosti izolatov *P. infestans*

Genotipe *R8* in starševske sorte smo inokulirali z dvema slovenskima (02\_07, 09\_07) in dvema tujima izolatoma (90128, IPO-C). Tekom okužbe smo med izolati opazili razlike v rasti in razvoju. Slovenski izolat 02\_07 je ob uspešni okužbi, ki sicer ni bila pogosta, tvoril veliko micelija, vendar je hkrati slabo sporuliral, v kasnejših dneh okužbe smo opazili le majhno število sporangijev. Podobno je tudi tuji izolat 90128 tvoril veliko micelija, preden je pričel s sporulacijo, vendar je povzročil hujše simptome kot izolat 02\_07 in je pogosteje uspešno okužil rastline. Pri izolatih 09\_07 in IPO-C smo že kmalu po pojavu posameznih hif na listnem tkivu opazili manjše število sporangijev. Z razraščanjem micelija se je sporulacija močno povečala, oba izolata sta proizvedla večje število sporangijev.

Za vsak uporabljen izolat smo izračunali vrednost AUDPC, pri čemer smo uporabili ocene vseh inokuliranih genotipov *R8* in starševskih rastlin, inokulirane z dotičnim izolatoma, pridobljene skozi vseh osem dni trajanja okužbe (opisano v poglavju 3.3.3.2), rezultate pa smo prikazali s stolpčnim diagramom (Slika 50).



**Slika 50: Vrednosti ploščin pod krivuljo razvoja bolezni (AUDPC) za vsak inokuliran izolat *P. infestans* (02\_07, 09\_07, 90128 in IPO-C)**

Vrednosti AUDPC vključujejo ocene simptomov krompirjeve plesni za vse genotipe *R8* in starševske sorte. Različne črke nad stolpci in standardnimi deviacijami označujejo statistično značilno različne vrednosti AUDPC.

#### 4.4.3.2 Odpornost genotipov *R8* na krompirjevo plesen v primerjavi s starševskimi sortami

Vsaki rastlini znotraj vsakega kozarčka v tkivni kulturi (genotipi *R8* in starševske rastline), inokulirani z enim od štirih izolatov *P. infestans*, smo dnevno ocenili stopnjo razvoja simptomov krompirjeve plesni s pomočjo lestvice za ocenjevanje (Slika 49) (opisano v poglavju 3.3.3). Vse pridobljene podatke smo razdelili glede na pripadajoča križanja, iz katerih so genotipi *R8* izhajali, ter glede na izolat *P. infestans*, s katerim so bili inokulirani. Tako smo pridobili štiri skupine podatkov:

- skupina Rioja je vsebovala podatke genotipov R7 in R15 ter starševski sorti Rioja in Sárpo Mira za vse štiri izolate *P. infestans*;
- skupina Lusa je vsebovala podatke za genotip L166 in pripadajoči starševski sorti Lusa in Sárpo Mira;
- skupina Colomba je vsebovala podatke za genotipe C419, C557 in C571 ter starševski sorti Colomba in Sárpo Mira;
- skupina Sylvana je vsebovala podatke za genotipe S859, S989 in S999 ter pripadajoči starševski sorti Sylvana in Sárpo Mira.

Potek širjenja krompirjeve plesni za posamezno skupino podatkov smo prikazali v obliki točkovnega diagrama po dnevih in po inokuliranih izolatih (Slika 51-54), da bi opredelili razlike v odpornosti rastlin na krompirjevo plesen znotraj in med posameznimi skupinami rastlin. Zanimalo nas je, kako se odpornost genotipov *R8* razlikuje od pripadajočih starševskih sort glede na inokuliran izolat *P. infestans*. Statistično analizo pridobljenih podatkov smo opravili le na vrednosti POS po osmih dneh okužbe (opisano v poglavju 3.3.3.2), podatke in rezultate statistične analize pa smo prikazali v Preglednici 9.

#### **Skupina Rioja**

Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni na genotipih R7 in R15 ter starševskih sort Rioja in Sárpo Mira v osmih dneh po inokulaciji s štirimi izolati je prikazan na Sliki 51.

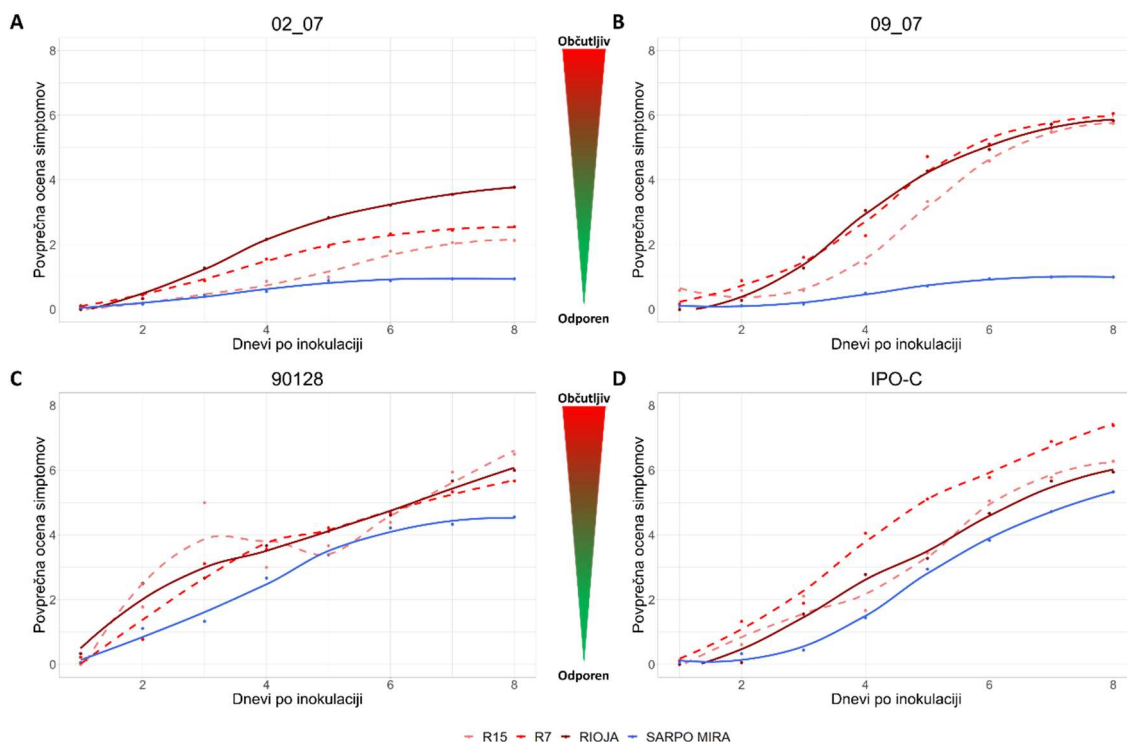
Po inokulaciji z izolatom 02\_07 so simptomi genotipov R7 in R15 po osmih dneh dosegli vrednosti POS 2,56 oz. 2,13, medtem ko je starševska sorta Rioja imela najvišjo vrednost POS (3,28), starševska sorta Sárpo Mira pa najnižjo vrednost POS (0,94) (Preglednica 9). Analiza ANOVA in Tukeyjev HSD test sta pokazala, da vrednosti POS genotipov R7 in R15 nista statistično značilno različni od vrednosti POS obeh starševskih sort ( $p > 0,05$ ). Statistično značilno sta se razlikovali le vrednosti POS sort Rioja in sort Sárpo Mira ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9). Na podlagi vrednosti POS po osmih dneh, ki so bile pri vseh nižje od 3,99, smo (opisano v poglavju 3.3.3.2) oba genotipa R7 in R15 ter sorti Rioja in Sárpo Mira odpredelili kot odporne na slovenski izolat 02\_07.

**Preglednica 9: Povprečne ocene simptomov za vse genotipe R8 in starševske sorte, razdeljene po križanjih, za vse štiri izolate *P. infestans***

	<b>Izolati <i>Phytophthora infestans</i></b>			
	<b>02_07</b>	<b>09_07</b>	<b>90128</b>	<b>IPO-C</b>
Rioja	3,28 <sup>a</sup>	5,83 <sup>a</sup>	6,00 <sup>ab</sup>	5,94 <sup>ab</sup>
R7	2,56 <sup>ab</sup>	6,00 <sup>a</sup>	5,67 <sup>ab</sup>	7,39 <sup>a</sup>
R15	2,13 <sup>ab</sup>	5,75 <sup>a</sup>	6,50 <sup>a</sup>	6,28 <sup>ab</sup>
Sárpo Mira	0,94 <sup>b</sup>	1,00 <sup>b</sup>	4,56 <sup>b</sup>	5,33 <sup>b</sup>
Lusa	1,72 <sup>b</sup>	4,89 <sup>a</sup>	5,89 <sup>a</sup>	6,82 <sup>a</sup>
L166	3,33 <sup>a</sup>	5,22 <sup>a</sup>	6,44 <sup>a</sup>	6,13 <sup>ab</sup>
Sárpo Mira	0,94 <sup>b</sup>	1,00 <sup>b</sup>	4,56 <sup>b</sup>	5,33 <sup>b</sup>
Colomba	2,06 <sup>a</sup>	6,33 <sup>a</sup>	7,44 <sup>a</sup>	7,94 <sup>a</sup>
C419	1,33 <sup>a</sup>	4,33 <sup>ab</sup>	5,72 <sup>bc</sup>	7,22 <sup>a</sup>
C557	0,78 <sup>a</sup>	5,39 <sup>ab</sup>	6,61 <sup>ab</sup>	7,61 <sup>a</sup>
C571	2,33 <sup>a</sup>	3,39 <sup>bc</sup>	5,22 <sup>bc</sup>	5,61 <sup>b</sup>
Sárpo Mira	0,94 <sup>a</sup>	1,00 <sup>c</sup>	4,56 <sup>c</sup>	5,33 <sup>b</sup>
Sylvana	2,78 <sup>a</sup>	7,17 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>	7,40 <sup>a</sup>
S859	1,56 <sup>a</sup>	5,67 <sup>ab</sup>	5,00 <sup>ab</sup>	6,72 <sup>ab</sup>
S989	1,83 <sup>a</sup>	4,56 <sup>b</sup>	5,89 <sup>ab</sup>	7,06 <sup>ab</sup>
S999	2,27 <sup>a</sup>	4,11 <sup>b</sup>	6,28 <sup>ab</sup>	7,06 <sup>ab</sup>
Sárpo Mira	0,94 <sup>a</sup>	1,00 <sup>c</sup>	4,56 <sup>b</sup>	5,33 <sup>b</sup>

Po inokulaciji z drugim slovenskim izolatom 09\_07 so bili simptomi krompirjeve plesni pri skupini Rioja izrazitejši, razen pri sorti Sárpo Mira, kjer so povprečne ocene simptomov vseskozi ostale pri vrednosti  $\leq 1,00$ . Pri genotipih R7 in R15 ter sorti Rioja so se simptomi širili v obliki sigmoidne krivulje, ki je značilna oblika za krivulje napredovanja bolezni (Slika 51B) (Madden in sod., 2007). Po osmih dneh okužbe so se vrednosti POS med genotipoma R7 (POS = 6,00), R15 (POS = 5,75) in sorto Rioja (POS = 5,83) nekoliko razlikovale, vendar te razlike niso bile statistično značilne ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9); so pa se vse tri vrednosti POS statistično značilno razlikovale od vrednosti POS sorte Sárpo Mira (POS = 1,00) (Preglednica 9), ki je bila odporna na slovenski izolat 09\_07, saj je bila vrednost POS manjša od 3,99. Genotip R7 je bil glede na vrednost POS občutljiv (POS  $\geq 6,00$ ) na izolat 09\_07, genotip R15 in sorta Rioja pa sta bila srednje odporna ( $4,00 \leq \text{POS} \leq 5,99$ ).





**Slika 51: Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni v osmih dneh po inokulaciji s štirimi različnimi izolati *P. infestans* za skupino Rioja**

A – izolat 02\_07; B – izolat 09\_07; C – izolat 90128; D – izolat IPO-C.

Legenda krivulj: temno rdeča polna krivulja – starš. sorta Rioja, temno modra polna krivulja – starš. sorta Sárpo Mira, svetlo rdeča prekinjena krivulja – genotip R15, rdeča prekinjena krivulja – genotip R7.

Po inokulaciji s tujim izolatom 90128 se simptomi krompirjeve plesni niso širili po tipični sigmoidni krivulji, temveč so se širili v obliki linearne premice (Slika 51C), kar ni povsem značilno za razvoj bolezni. Izjema je bila le krivulja genotipa R15, kjer pri časovni točki 3 dni po inokulaciji zaradi tehnične napake nismo uspeli oceniti vseh inokuliranih rastlin. Vrednost POS je po 8 dneh pri sorti Rioja dosegla 6,00, pri genotipih R7 in R15 5,67 oz. 6,50, pri čemer je genotip R15 imel najvišjo vrednost POS in se je tudi statistično značilno razlikoval od sorte Sárpo Mira (POS = 4,56). Sorta Rioja in genotip R7 se nista statistično značilno razlikovala ne od genotipa R15 ne od sorte Sárpo Mira ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9). Glede na vrednosti POS sta bila sorta Sárpo Mira in genotip R7 srednje odporna na izolat 90128 ( $4,00 \leq \text{POS} \leq 5,99$ ), medtem ko sta bila genotip R15 in sorta Rioja občutljiva na izolat 90128 ( $\text{POS} \geq 6,00$ ).

Širjenje simptomov po inokulaciji tujega izolata IPO-C je potekalo podobno kot pri izolatu 90128, kar se je odražalo tudi na krivuljah razvoja bolezni, saj so se simptomi pri genotipih R7 in R15 ter sorti Rioja širili linearno namesto po tipični sigmoidni krivulji, kot v primeru sorte Sárpo Mira (Slika 51) (Madden in sod., 2007). Pri genotipih R7 in R15 sta bili vrednosti POS po osmih dneh 7,39 oz. 6,28 in med njima ni bilo statistično

značilnih razlik. Prav tako se vrednost POS sorte Rioja (5,94) ni statistično značilno razlikovala od ostalih rastlin znotraj skupine ( $p > 0,05$ ). Statistično značilno sta se razlikovala le genotip R7, ki je imel najvišjo vrednost POS, in sorta Sárpo Mira (POS = 5,33) (Preglednica 9). Glede na vrednosti POS sta bila genotipa R7 in R15 občutljiva na izolat IPO-C (POS  $\geq 6,00$ ), starševski sorti Rioja in Sárpo Mira pa srednje odporni ( $4,00 \leq \text{POS} \leq 5,99$ ).

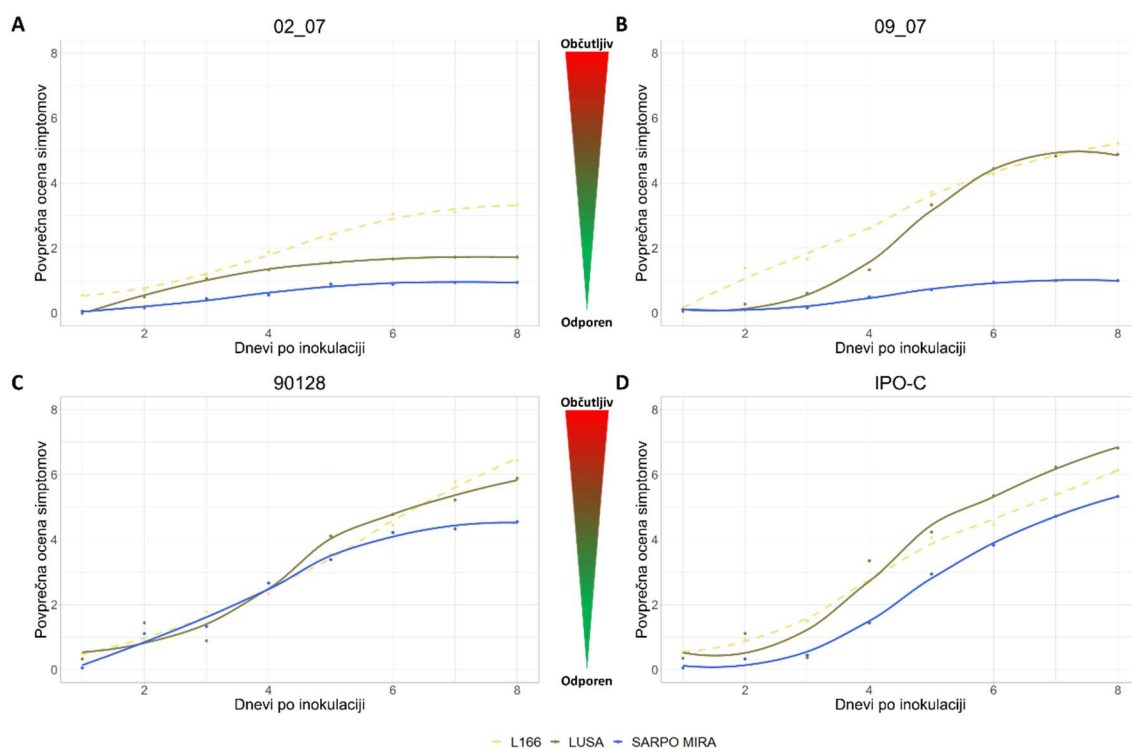
### Skupina Lusa

Skupina Lusa je vsebovala le en genotip (L166) in je bila edina skupina, kjer je genotip R8 med okužbo s *P. infestans* pri treh od štirih izolatov izražal hujše simptome v primerjavi z občutljivo starševsko sorto.

Simptomi krompirjeve plesni so bili po inokulaciji s slovenskim izolatom 02\_07 šibki (Slika 52), podobno kot pri skupini Rioja, saj so bile vse rastline znotraj skupine Lusa glede na vrednosti POS odporne na izolat 02\_07 (POS  $\leq 3,99$ ); sta pa bili vrednosti POS sort Lusa (1,72) in Sárpo Mira (0,94) statistično značilno različni od vrednosti POS genotipa L166 (3,33,  $p < 0,05$ ), ki je imela najvišjo vrednost POS pri tem izolatu (Preglednica 9).

Po inokulaciji z drugim slovenskim izolatom 09\_07 so se simptomi krompirjeve plesni pri sorti Lusa širili v obliki sigmoidne krivulje, medtem ko so se pri genotipu L166 simptomi širili linearno (Slika 52). Ponovno je genotip L166 imel po osmih dneh najvišjo vrednost POS (5,22), medtem ko je starševska sorta Lusa imela nižjo POS (4,89) in sta bila oba statistično značilno različna od sorte Sárpo Mira ( $p < 0,05$ ) z vrednostjo POS 1,00 (Preglednica 9). Glede na vrednosti POS sta bila genotip L166 in sorta Lusa srednje odporna na izolat 09\_07 ( $4,00 \leq \text{POS} \leq 5,99$ ), medtem ko je bila starševska sorta Sárpo Mira odporna (POS  $\leq 3,99$ ).

Po inokulaciji s tujim izolatom 90128 so se simptomi krompirjeve plesni pri vseh testiranih rastlinah znotraj skupine Lusa širili po linearni premici (Slika 52). Ponovno je genotip L166 imel najvišjo vrednost POS po osmih dneh (6,44). Sledila je sorta Lusa z vrednostjo POS 5,89, pri čemer sta bila oba statistično značilno različna ( $p < 0,05$ ) od sorte Sárpo Mira (POS = 4,56) (Preglednica 9). Glede na vrednosti POS je bil genotip L166 občutljiv na tuji izolat 90128 (POS  $\geq 6,00$ ), starševski sorti Lusa in Sárpo Mira pa sta bili srednje odporni ( $4,00 \leq \text{POS} \leq 5,99$ ).



**Slika 52: Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni v osmih dneh po inokulaciji s štirimi različnimi izolati *P. infestans* za skupino Lusa**

A – izolat 02\_07; B – izolat 09\_07; C – izolat 90128; D – izolat IPO-C.

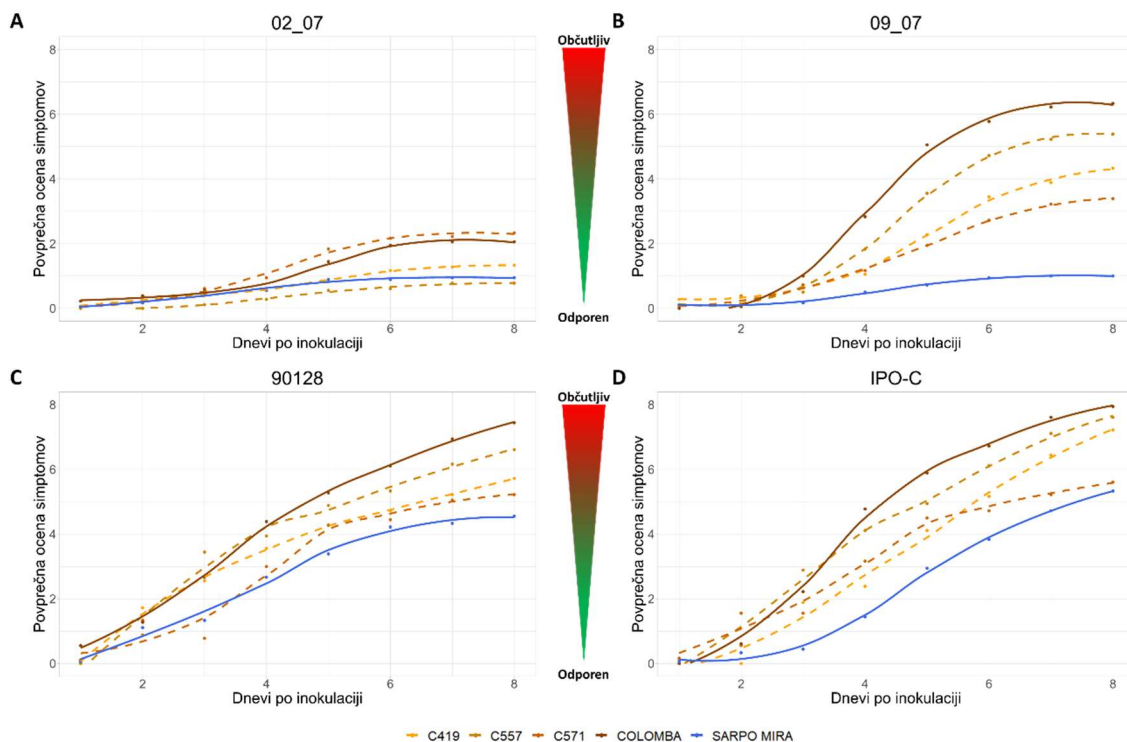
Legenda krivulj: temna kasi polna krivulja – starš. sorta Lusa, temno modra polna krivulja – starš. sorta Sárpo Mira, svetla kasi prekinjena krivulja – genotip L166.

Okužba s tujim izolatom IPO-C se je pri vseh rastlinah znotraj skupine Lusa širila po bolj položni in ne povsem izraziti sigmoidni krivulji (Slika 52). Za razliko od ostalih izolatov je po inokulaciji z izolatom IPO-C sorta Lusa imela najvišjo vrednost POS po osmih dneh (6,82), medtem ko je imel genotip L166 vrednost POS 6,13. Vrednosti POS sorte Lusa (6,82) in Sárpo Mira (5,33) sta bili med sabo statistično značilno različni ( $p < 0,05$ ), medtem ko se vrednost POS genotipa L166 ni statistično značilno razlikovala od nobene starševske sorte ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9). Na podlagi vrednosti POS smo genotip L166 in starševsko sorto Lusa uvrstili med občutljive na izolat IPO-C ( $POS \geq 6,00$ ), starševsko sorto Sárpo Mira pa med srednje odporne ( $4,00 \leq POS \leq 5,99$ ).

### Skupina Colomba

Po inokulaciji s slovenskim izolatom 02\_07 so bili simptomi krompirjeve plesni pri skupini Colomba zelo šibki, krivulje širjenja simptomov pa so bile precej položne (Slika 53). Po osmih dneh so genotipi C419, C557 in C571 dosegli vrednosti POS 1,33, 0,78 in 2,33, starševski sorti Colomba in Sárpo Mira pa 2,06 in 0,94 (Preglednica 9). Med vsemi testiranimi genotipi in starševskima sortama znotraj skupine Colomba po inokulaciji z

izolatom 02\_07 ni bilo statistično značilnih razlik ( $p > 0,05$ ), glede na vrednosti POS pa so bili vsi odporni na izolat 02\_07 ( $POS \leq 3,99$ ).



**Slika 53: Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni v osmih dneh po inokulaciji s štirimi različnimi izolati *P. infestans* za skupino Colomba**

A – izolat 02\_07; B – izolat 09\_07; C – izolat 90128; D – izolat IPO-C.

Legenda krivulj: temno rjava polna krivulja – starš. sorta Colomba, temno modra polna krivulja – starš. sorta Sárpo Mira, svetlo oranžna prekinjena krivulja – genotip C419, oranžna prekinjena krivulja – genotip C557, temno oranžna prekinjena krivulja – genotip C571.

Po inokulaciji s slovenskim izolatom 09\_07 so se simptomi krompirjeve plesni pri genotipih C419, C557 in C571 ter pri sorti Colomba širili v obliki sigmoidne krivulje. Starševska sorta Sárpo Mira je skozi potek okužbe z izolatom 09\_07 izražala šibke simptome (Slika 53). Po osmih dneh je sorta Colomba imela najvišjo vrednost POS (6,33), sorta Sárpo Mira najnižjo ( $POS = 1,00$ ), genotipi R8 pa so si po vrednosti POS sledili: C557 z vrednostjo 5.39, C419 z vrednostjo 4.33 in C571 z vrednostjo 3,39 (Preglednica 9). Sorte Colomba ter genotipa C419 in C557 so se statistično značilno razlikovali od starševske sorte Sárpo Mira ( $p < 0,05$ ). Čeprav sta genotipa C419 in C557 imela nižje vrednosti POS v primerjavi s sorto Colomba, je bila razlika statistično značilna le v primeru genotipa C419 ( $p < 0,05$ ). Vrednost POS pri genotipu C571 se je statistično značilno razlikovala od starševske sorte Colomba ( $p < 0,05$ ), medtem ko se vrednosti POS med genotipi C419, C557 in C571 niso statistično značilno razlikovale ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9). Glede na vrednosti POS po osmih dneh je bila starševska sorta Colomba občutljiva na slovenski izolat 09\_07 ( $POS \geq 6,00$ ), medtem ko sta bila genotipa

C419 in C557 srednje odporna ( $4,00 \leq \text{POS} \leq 5,99$ ). Genotip C571 in starševska sorta Sárpo Mira sta bila glede na vrednosti POS odporna na izolat 09\_07 ( $\text{POS} \leq 3,99$ ).

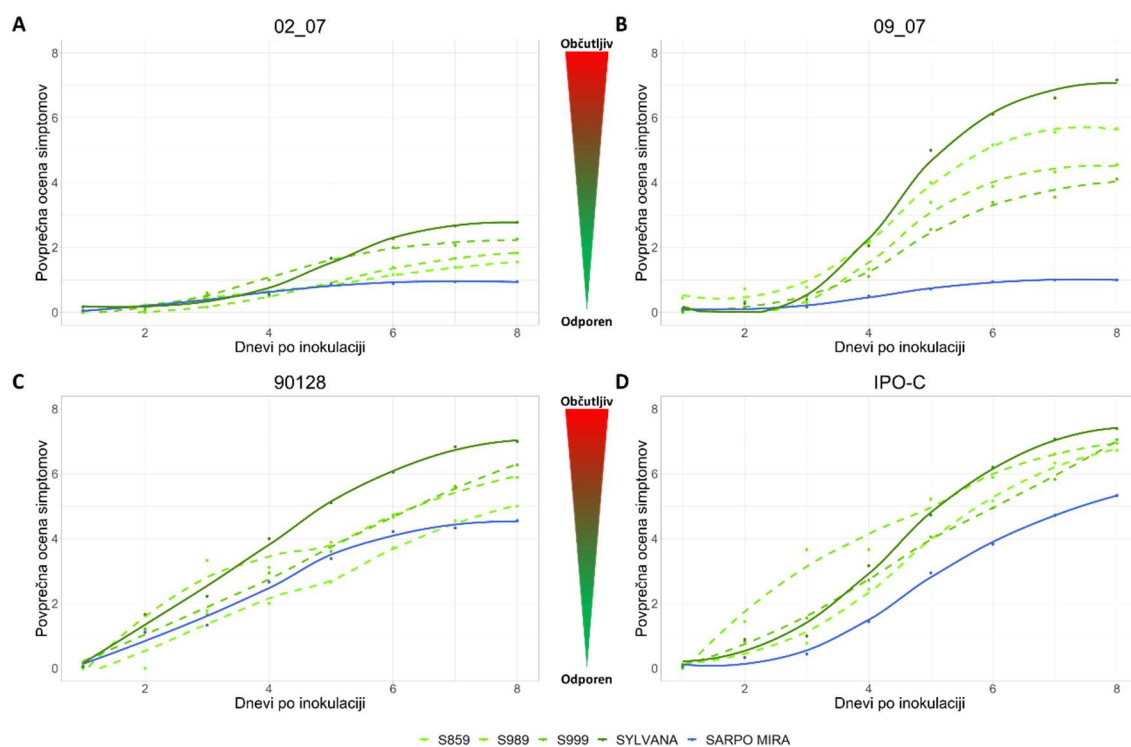
Po inokulaciji s tujim izolatom 90128 so se simptomi krompirjeve plesni pri vseh rastlinah znotraj skupine Colomba stopnjevali linearno, z izjemo starševske sorte Sárpo Mira (Slika 53). Sorta Colomba je imela po osmih dneh najvišjo vrednost POS (7,44), genotipi R8 pa so si sledili: C557 z vrednostjo POS 5,39, genotip C419 z vrednostjo POS 4,33 in genotip z vrednostjo POS 3,39 (Preglednica 9). Vrednosti POS sorte Colomba in genotipa C557 sta se statistično značilno razlikovali od sorte Sárpo Mira ( $p < 0,05$ ) in sta bila glede na vrednosti POS občutljiva na izolat 90128 ( $\text{POS} \geq 6,00$ ). Vrednosti POS genotipov C419 in C571 sta bili statistično značilno različni od vrednosti POS sorte Colomba ( $p < 0,05$ ) in sta bila srednje odporna na izolat 90128 tako kot starševska sorta Sárpo Mira z vrednostjo POS 4,56 ( $4,00 \leq \text{POS} \leq 5,99$ ) (Preglednica 9).

Po inokulaciji s tujim izolatom IPO-C so se simptomi krompirjeve plesni ravno tako stopnjevali linearno, razen pri sorti Sárpo Mira (Slika 53). Najvišjo vrednost POS po osmih dneh je ponovno imela sorta Colomba (7,94). Tako kot pri izolatu 90128 so si tudi pri izolatu IPO-C vrednosti POS genotipov R8 sledili: C557 z vrednostjo POS 7,61, C419 z vrednostjo POS 7,22 in genotipi C571 z vrednostjo POS 5,61 (Preglednica 9). Vrednosti POS med sorto Colomba ter genotipoma C419 in C557 se med sabo niso statistično značilno razlikovali ( $p > 0,05$ ); so pa bili vsi trije statistično značilno različni od genotipa C571 in sorte Sárpo Mira ( $p < 0,05$ ). Med vrednosti POS genotipa C571 in sorte Sárpo Mira ni bilo statistično značilnih razlik (Preglednica 9). Starševska sorta Colomba ter genotipa C419 in C557 so bili glede na vrednosti POS občutljivi na tuji izolat IPO-C ( $\text{POS} \geq 6,00$ ), medtem ko sta bila genotip C571 in starševska sorta Sárpo Mira srednje odporna ( $4,00 \leq \text{POS} \leq 5,99$ ).

Genotip C571 je izmed vseh genotipov R8 imel najnižje vrednosti POS po osmih dneh okužbe z izolati 09\_07, 90128 in IPO-C (izjema je genotip S859, ki je imel le pri izolatu 90128 nižjo vrednost POS v primerjavi s C571) in je izražal stopnjo odpornosti na krompirjevo plesen primerljivo s starševsko sorto Sárpo Mira (Preglednica 9).

### **Skupina Sylvana**

Po inokulaciji s slovenskim izolatom 02\_07 so bili simptomi krompirjeve plesni, podobno kot pri ostalih skupinah, tudi pri rastlinah skupine Sylvana zelo šibki (Slika 54). Najvišje vrednosti POS je dosegla starševska sorta Sylvana (2,78), sledili so ji genotipi S999 (2,27), S989 (1,83), S859 (1,56) ter Sárpo Mira (0,94), pri čemer med genotipi in sortama ni bilo statistično značilnih razlik ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9). Glede na vrednosti POS so bili vsi genotipi in obe starševski sorti odporni na slovenski izolat 02\_07 ( $\text{POS} \leq 3,99$ ).



**Slika 54: Potek širjenja simptomov krompirjeve plesni v osmih dneh po inokulaciji s štirimi različnimi izolati *P. infestans* za skupino Sylvana**

A – izolat 02\_07; B – izolat 09\_07; C – izolat 90128; D – izolat IPO-C.

Legenda krivulj: temno zelena polna krivulja – starš. sorta Sylvana, temno modra polna krivulja – starš. sorta Sárpo Mira, svetlo zelena prekinjena krivulja – genotip S859, zelena prekinjena krivulja – genotip S989, temno zelena prekinjena krivulja – genotip S999.

Po inokulaciji z drugim slovenskim izolatom 09\_07 so se simptomi krompirjeve plesni stopnjevali v obliki sigmoidne krivulje, z izjemo starševske sorte Sárpo Mira, kjer se vrednosti POS niso dvignile nad 1,00 (Slika 54). Sorta Sylvana je imela po osmih dneh najvišjo vrednost POS (7,17), sledili so ji genotip S859 (5,67), genotip S989 (4,56) ter genotip S999 (4,11), pri čemer sta se le genotipa S989 in S999 statistično značilno razlikovala od sorte Sylvana ( $p < 0,05$ ), medtem ko genotip S859 ni bil statistično značilno različen niti od sorte Sylvana niti od genotipov S989 in S999 ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9). Vsi trije genotipi in sorta Sylvana so bili statistično značilno različni od sorte Sárpo Mira ( $p < 0,05$ ), ki je imela najnižjo vrednost POS (1,00) (Preglednica 9). Glede na vrednosti POS smo starševsko sorto Sylvana opredelili kot občutljivo na slovenski izolat 09\_07 ( $POS \geq 6,00$ ), medtem ko so bili vsi trije genotipi S859, S989 in S999 srednje odporni ( $4,00 \leq POS \leq 5,99$ ). Starševska sorta Sárpo Mira je bila glede na vrednosti POS odporna na izolat 09\_07 ( $POS \leq 3,99$ ).

Po inokulaciji s tujim izolatom 90128 so se tako kot pri ostalih skupinah simptomi krompirjeve plesni stopnjevali linearno, z izjemo sorte Sárpo Mira, kjer so se simptomi širili po sigmoidni krivulji (Slika 54). Najvišjo vrednost POS po osmih dneh je imela sorta Sylvana (7,00), vrednosti POS genotipov R8 pa so si sledili po naslednjem redu: genotip

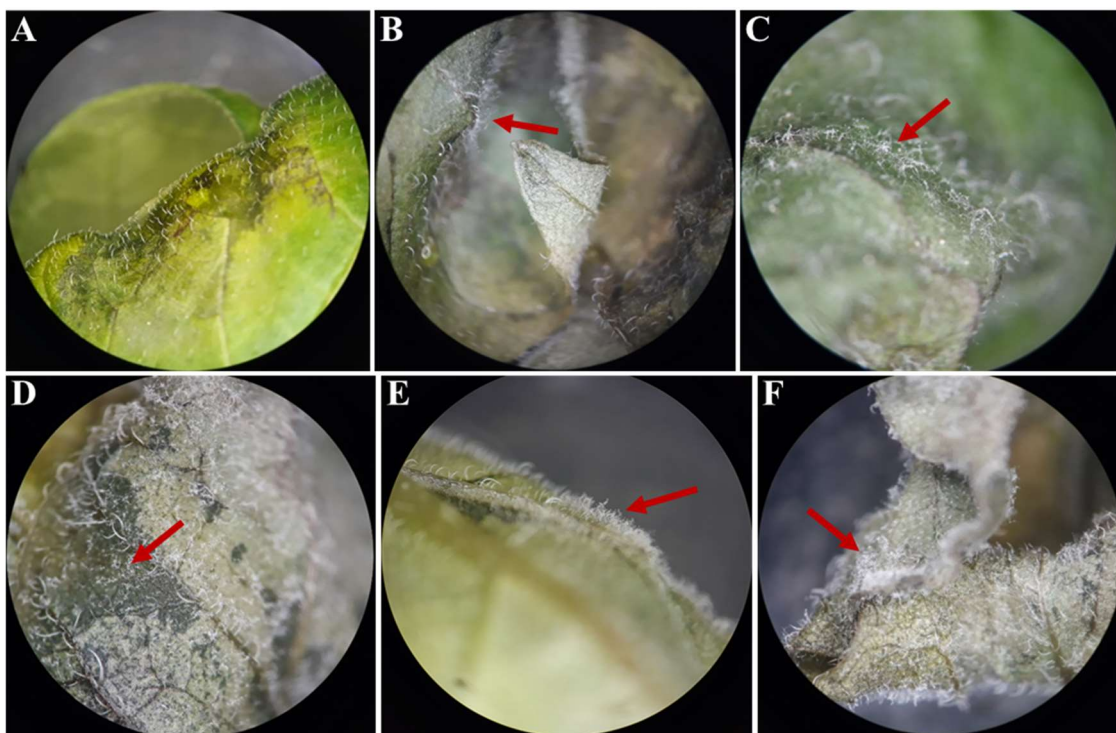
S999 z vrednostjo POS 6,28, genotip S989 z vrednostjo POS 5,89 in genotip S859 z vrednostjo POS 5,00 (Preglednica 9). Razlika v vrednosti POS med sortama Sylvana in Sárpo Mira je bila statistično značilno različna ( $p < 0,05$ ), medtem ko vrednosti POS vseh treh genotipov *R8* niso bili statistično značilno različni niti od sorte Sylvana niti od sorte Sárpo Mira ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9). Glede na vrednosti POS sta bila sorta Sylvana in genotip S999 občutljiva na tuji izolat 90128 ( $POS \geq 6,00$ ), medtem ko so bili starševska sorta Sárpo Mira in genotipa S859 in S989 srednje odporni ( $4,00 \leq POS \leq 5,99$ ).

Po inokulaciji z drugim tujim izolatom IPO-C so se simptomi krompirjeve plesni pri genotipih S989 in S999 stopnjevali po linearni premici, medtem ko so se simptomi pri sortah Sylvana in Sárpo Mira ter genotipu S859 stopnjevali po bolj položni sigmoidni krivulji (Slika 54). Odziv genotipov in starševskih sort je bil podoben kot pri izolatu 90128, saj je sorta Sylvana imela najvišjo vrednost POS po osmih dneh (7,40); sledili so genotipi S989 (7,06), S999 (7,06) in S859 (6,72) ter sorta Sárpo Mira (5,33). Vrednosti POS med sortama Sylvana in Sárpo Mira sta bili statistično značilno različni ( $p < 0,05$ ), medtem ko se vrednosti POS vseh treh genotipov niso statistično razlikovale ne od sorte Sylvana niti od sorte Sárpo Mira ( $p > 0,05$ ) (Preglednica 9). Za razliko od odziva po inokulaciji z 90128 so bili glede na vrednosti POS vsi trije genotipi in starševska sorta Sylvana občutljivi na izolat IPO-C ( $POS \geq 6,00$ ), medtem ko je bila le starševska sorta Sárpo Mira srednje odporna ( $4,00 \leq POS \leq 5,99$ ).

#### 4.4.4 Ohranjanje visoke zračne vlage z zavijanjem rastlin v plastične vreče

Na podlagi rezultatov inokulacije genotipov *R8* v tkivni kulturi smo ponovno opravili inokulacijo celih rastlin v rastlinjaku, vendar tokrat na manjšem obsegu rastlin (opisano v poglavju 3.3.1.2). V testiranje odpornosti celih rastlin na krompirjevo plesen smo vključili genotip C571, ki je izmed vseh testiranih genotipov *R8* v tkivni kulturi izražal najvišjo stopnjo odpornosti, poleg tega pa smo vključili tudi genotip C419, ki je izhajal iz iste skupine rastlin (skupina Colomba). Zanimalo nas je, ali bomo podobno razliko med genotipoma C571 in C419 po inokulaciji s *P. infestans* v tkivni kulturi opazili tudi po inokulaciji celih rastlin v rastlinjaku. Vključili smo tudi starševski sorti Colomba in Sárpo Mira za primerjavo stopnje odpornosti genotipov *R8* z občutljivo in odporno sorto. Inokulum *P. infestans* smo pripravili z inokulacijo sorte Dobrin v tkivni kulturi ter gojenjem z micelijem in sporangiji preraščenih listov na trdnem gojišču (opisano v poglavju 3.2.3.3).

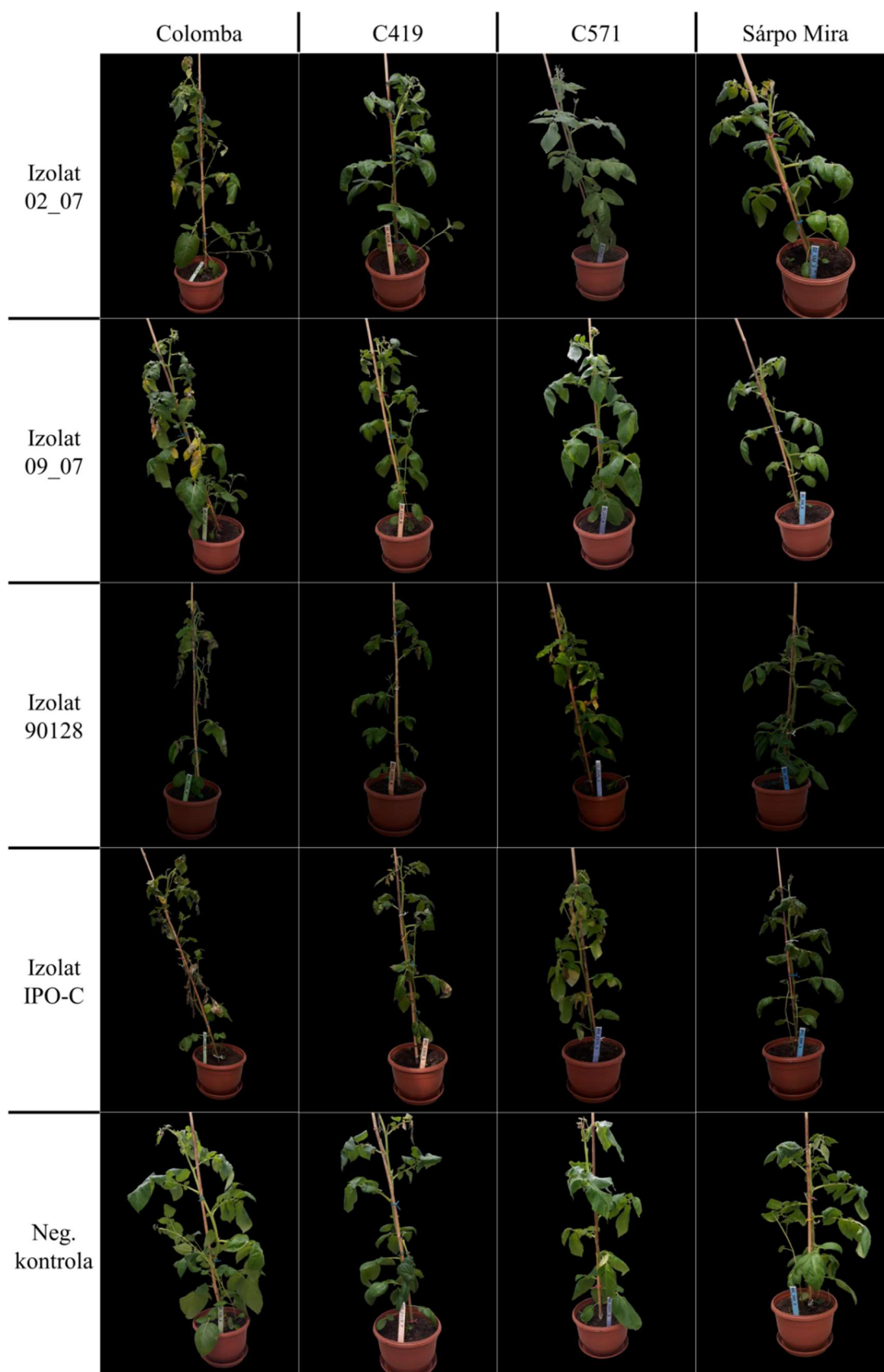
Po enem tednu okužbe s *P. infestans* smo pri skupini rastlin, inokuliranih z agresivnima tujima izolatom 90128 in IPO-C, opazili prve simptome krompirjeve plesni (Slika 55A). Na vzorcih listov z izraženimi simptomi smo pod stereomikroskopom videli tudi micelij in sporangije (Slika 55B-F).



Slika 55: Simptomi krompirjeve plesni, micelij ter sporangiji *P. infestans* po inokulaciji celih rastlin genotipov C419 in C571 ter starš. sort Colomba in Sárpo Mira v rastlinjaku po enem tednu.

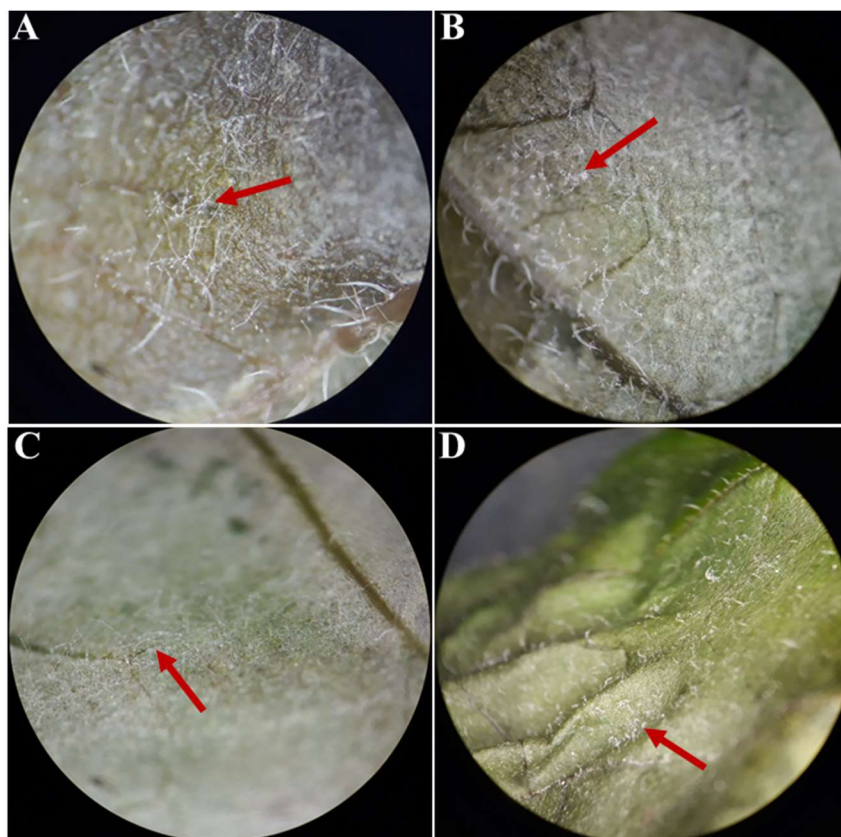
Štirinajst dni po okužbi smo vse inokulirane rastline pregledali in ocenili intenziteto simptomov na podlagi lestvice (Cruickshank in sod., 1982). Rastline s tipičnim odzivom na krompirjevo plesen smo poslikali in predstavili po genotipih oz. sorti in po inokuliranih izolatih (Slika 56).





Slika 56: Reprezentativne slike celih krompirjevih rastlin s simptomi krompirjeve plesni po inokulaciji s *P. infestans* v rastlinjaku

Izolati *P. infestans* so si po intenziteti povzročenih simptomov sledili: izolat 02\_07, ki je povzročil najšibkejše simptome, izolat 09\_07 z nekoliko intenzivnejšimi simptomi, ter tuja izolata 90128 in IPO-C, ki sta povzročila primerljivo hude simptome krompirjeve plesni (Slika 56 in 58). Agresivnosti izolatov nismo mogli določiti, saj smo rastline ocenili le v končni časovni točki. Od rastlin z izrazitimi simptomi krompirjeve plesni smo nabrali vzorce listov in jih predstavili v mikološki laboratorij, da smo pod stereomikroskopom za vsak izolat potrdili uspešno okužbo. Pri vzorcih listov vsake skupine rastlin smo našli tako micelij kot tudi sporangije za vsak inokuliran izolat ter tako potrdili uspešno okužbo s *P. infestans* (Slika 57).



**Slika 57:** Potrjena uspešna okužba vseh štirih izolatov *P. infestans* 02\_07 (A), 09\_07 (B), 90128 (C) in IPO-C (D), po inokulaciji celih krompirjevih rastlin genotipov C419 in C571 ter starš. sorta Colomba in Sárpo Mira v rastlinjaku

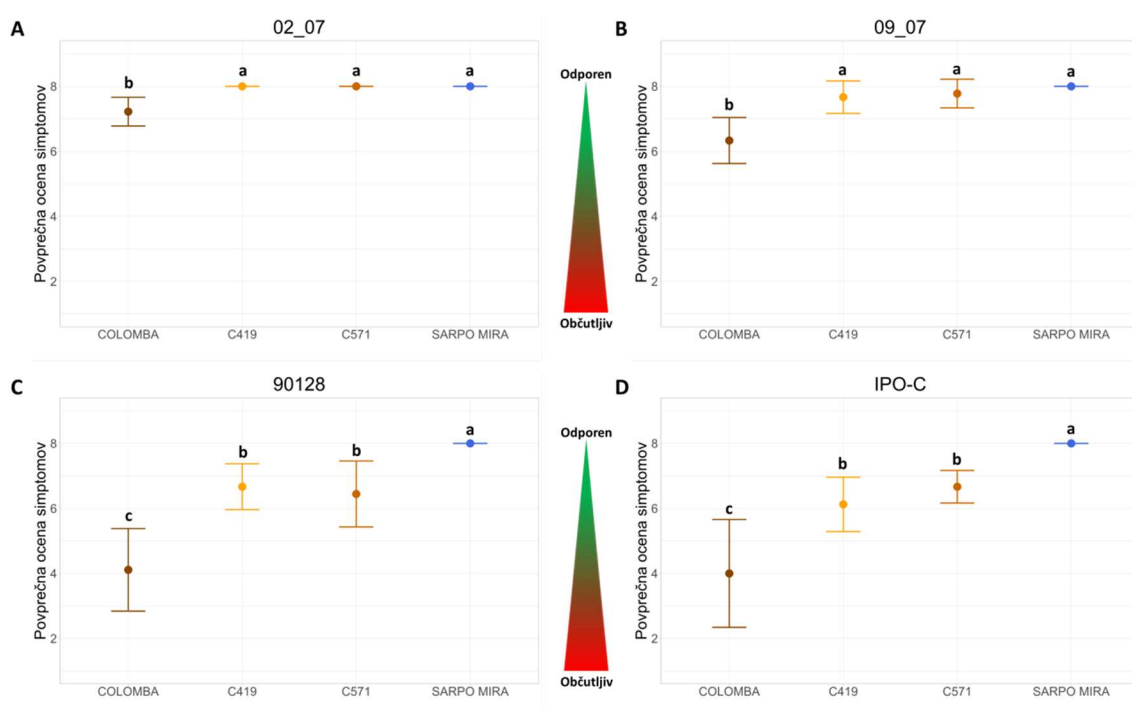
Za vsak genotip oz. sorto smo pridobili devet ocen, z izjemo genotipa C419 pri izolatu IPO-C, kjer smo pridobili osem ocen, ter izračunali vrednosti POS (opisano v poglavju 3.3.1.2.1). Podatke smo prikazali v obliki točkovnega diagrama, razdeljene po inokuliranih izolatih (Slika 58).

Po štirinajstih dneh okužbe s slovenskim izolatom 02\_07 je le sorta Colomba izražala simptome krompirjeve plesni, pri čemer je delež nekrotičnega tkiva ostal pod 25 % (Slika 56, 58A in 60A-B) (Preglednica 10). Genotipa C419 in C571 ter sorta Sárpo Mira so

izražali le hipersenzitivni odziv (Slika 59A) in so bili na izolat 02\_07 popolnoma odporni (Slika 58A). Vrednost POS sorte Colomba se je statistično značilno razlikovala od vrednosti POS obeh genotipov in sorte Sárpo Mira (Slika 58A) (Preglednica 10).

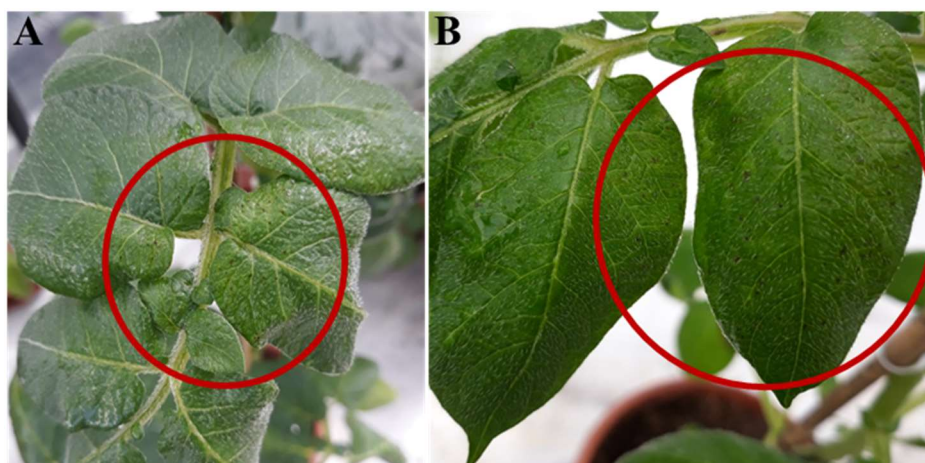
**Preglednica 10:** Vrednosti POS genotipov C419, C571 in starševskih sort Colomba, Sárpo Mira po inokulaciji s štirimi izolati *P. infestans* v rastlinjaku

	Izolati <i>Phytophthora infestans</i>			
	02_07	09_07	90128	IPO-C
Colomba	7,22 <sup>b</sup>	6,33 <sup>b</sup>	4,11 <sup>c</sup>	4,00 <sup>c</sup>
C419	8,00 <sup>a</sup>	7,67 <sup>a</sup>	6,67 <sup>b</sup>	6,13 <sup>b</sup>
C571	8,00 <sup>a</sup>	7,78 <sup>a</sup>	6,44 <sup>b</sup>	6,67 <sup>b</sup>
Sárpo Mira	8,00 <sup>a</sup>	8,00 <sup>a</sup>	8,00 <sup>a</sup>	8,00 <sup>a</sup>



**Slika 58:** Povprečne ocene simptomov genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira po inokulaciji z izolati 02\_07, 09\_07, 90128 in IPO-C

Po inokulaciji z drugim slovenskim izolatom 09\_07 je sorta Colomba izmed testiranih rastlin izražala največ simptomov (Preglednica 10), ki so bili intenzivnejši kot pri izolatu 02\_07. Genotipa C419 in C571 sta v nekaterih primerih na posameznih listih izražala simptome krompirjeve plesni (Slika 60C), vendar se vrednosti POS obeh genotipov nista statistično značilno razlikovala od vrednosti POS sorte Sárpo Mira, ki je izražala le hipersenzitivni odziv (Slika 58B in 59B) (Preglednica 10). Vrednost POS sorte Colomba se je statistično značilno razlikovala od vrednosti POS genotipov C419 in C571 ter sorte Sárpo Mira (Preglednica 10).



Slika 59: Primeri hipersenzitivnega odziva na genotipu C419 po inokulaciji z izolatoma 02\_07 (A) in na starševski sorti Sárpo Mira po inokulaciji z izolatoma 09\_07 (B) na ravni celih krompirjevih rastlin v rastlinjaku



Slika 60: Primeri simptomov krompirjeve plesni na starš. sorti Colomba po inokulaciji z izolatoma 02\_07 (A in B), na genotipu C419 po inokulaciji z izolatoma 09\_07 (C) ter na genotipu C571 po inokulaciji z izolatoma 90128 (D) na ravni celih krompirjevih rastlin v rastlinjaku

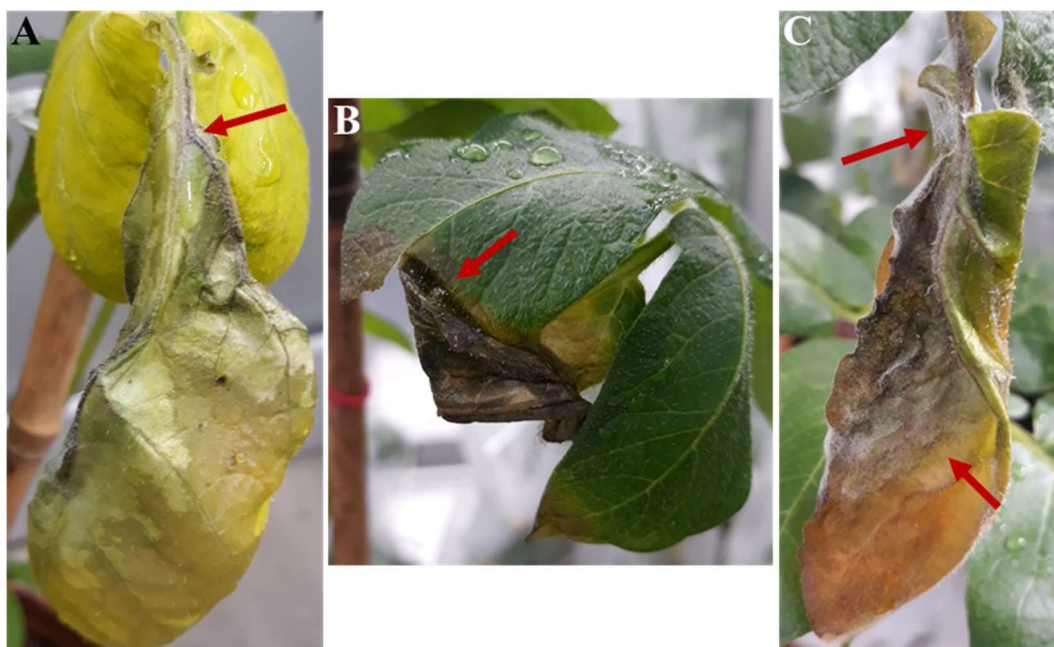
Po štirinajstih dneh okužbe s tujim izolatoma 90128 je sorta Colomba ponovno izražala največ simptomov krompirjeve plesni. Znaki okužbe so bili zelo intenzivni, saj je v določenih primerih propadlo tudi do 80 % listov (Slika 56 in Slika 58). Vrednost POS je znašala 4,11 in se je statistično značilno razlikovala tako od genotipov C419 in C571 kot tudi od sorte Sárpo Mira. Genotipa C419 in C571 sta izražala primerljivo intenziteto simptomov (Slika 56, 58 in 60D) in dosegla vrednosti POS 6,67 oz. 6,44 (Preglednica 10), kar na podlagi lestvice za ocenjevanje okužbe *P. infestans* po Cruickshank in sod. (1982) pomeni med 26 % in 40 % propadlih listov. Med vrednostmi POS obeh genotipov ni bilo statistično značilnih razlik, sta se pa vrednosti POS statistično značilno razlikovali od vrednosti POS sorte Sárpo Mira (Preglednica 10), ki je tako kot pri slovenskih izolatih izražala le hipersenzitivni odziv (Slika 56 in 58).

Tako kot pri ostalih izolatih *P. infestans* je tudi po okužbi z drugim tujim izolatoma IPO-C sorta Colomba izražala najhujše simptome krompirjeve plesni, ki je v nekaterih primerih povzročala propad tudi 90 % listov (Slika 56). Vrednost POS sorte Colomba, ki

je bila najnižja izmed vseh vrednosti POS, pridobljenih pri inokulaciji celih rastlin v rastlinjaku, se je statistično značilno razlikovala od vrednosti POS obeh genotipov in sorte Sárpo Mira (Preglednica 10). Podobno kot pri izolatu 90128 sta tudi pri izolatu IPO-C genotipa C419 in C571 imela primerljivo intenziteto simptomov s primerljivim deležem propadlih listov (med 26 % in 40 %), pri čemer se vrednosti POS (6,13 in 6,67) med sabo nista statistično značilno razlikovali. Ponovno sta se vrednosti POS obeh genotipov statistično značilno razlikovali od vrednosti POS sorte Sárpo Mira, ki je ponovno izražala le hipersenzitivni odziv (Slika 56) (Preglednica 10).

Med pregledovanjem in ocenjevanjem inokuliranih krompirjevih rastlin s prostim očesom in pod stereomikroskopom smo pogosto opazili tudi kontaminacije, ki so prevladovali na listih z izrazitimi simptomi krompirjeve plesni (Slika 61 in 62).

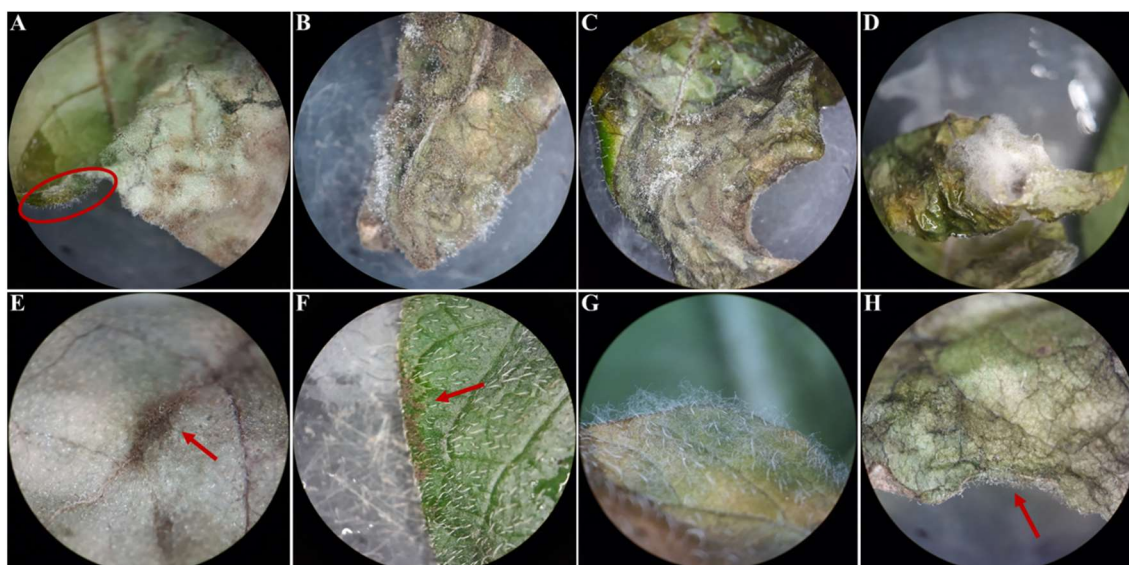
Čeprav smo sprva domnevali, da smo na listih z intenzivnimi znaki okužbe s prostim očesom opazili micelij *P. infestans*, smo z natančnejšim pregledom vzorcev listov pod stereomikroskopom to domnevo ovrgli (Slika 61 in 62). V določenih primerih se je micelij *P. infestans* prepletal ali pa bil v zelo tesnem stiku z micelijem neželenih gliv (Slika 62A), kar je oteževalo vrednotenje in ocenjevanje intenzitete simptomov krompirjeve plesni.



**Slika 61:** Kontaminacije, vidne s prostim očesom na celih krompirjevih rastlinah inokuliranih s *P. infestans* v rastlinjaku

Največ kontaminacij smo opazili pri tujih izolatih 90128 in IPO-C, kjer so bili znaki okužbe najbolj intenzivni, kontaminacije pa so popolnoma prerastle odmirajoče listno tkivo (Slika 62B-D). Posledično je bilo kljub izrazitim simptomom, tipičnih za

krompirjevo plesen, težko potrditi uspešno okužbo *P. infestans* na rastlinah, saj smo le redko opazili micelij in sporangije *P. infestans* (Slika 62E-F). Na testnih listnih vzorcih, nabranih po enem tednu z manj intenzivnimi simptomi krompirjeve plesni, smo pri vzorcih inokuliranih s tujima izolatoma, opazili bistveno več micelija sporangijev *P. infestans* ter praktično nič ali zelo malo kontaminacij. Težavni so bili tudi primeri vzorcev listov, kjer smo pod stereomikroskopom opazili micelij, na videz podoben *P. infestans*, vendar zaradi odsotnosti značilnih sporangijev *P. infestans* nismo uspeli zanesljivo ločiti micelija *P. infestans* od kontaminacije (Slika 62G-H).



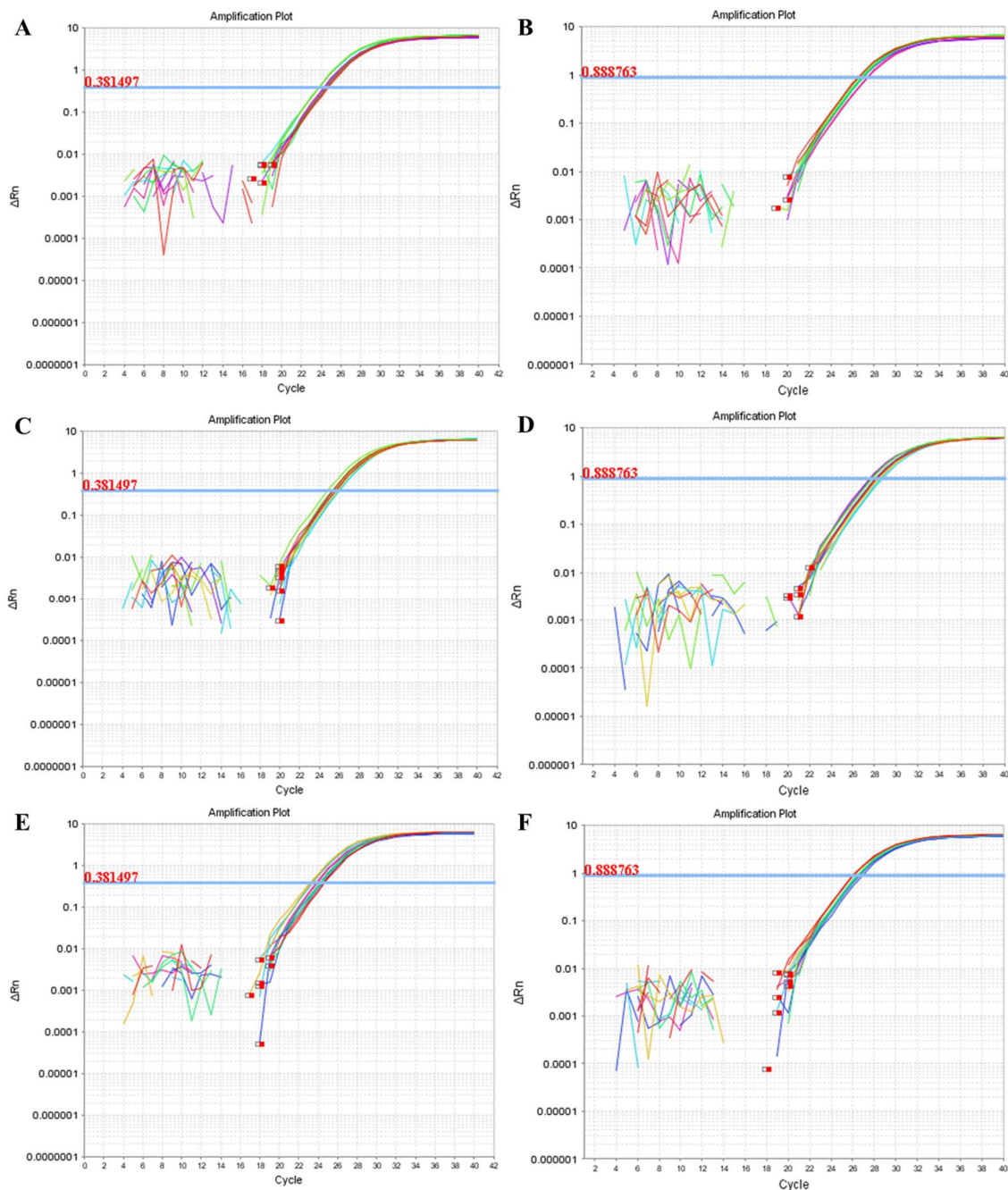
Slika 62: Kontaminacije, opažene pod stereomikroskopom po inokulaciji celih krompirjevih rastlin v rastlinjaku s *P. infestans*

Skupna značilnost kontaminacij je bila, da so se pojavile le na listih z izrazitimi simptomi krompirjeve plesni in na propadajočem listnem tkivu. Na rastlinah, inokuliranih z AVV (negativna kontrola), kontaminacij nismo zasledili. Prav tako so bile popolnoma brez kontaminacij vse rastline sorte Sárpo Mira, ki niso izražale znakov okužbe s krompirjevo plesnijo, ne glede na inokuliran izolat *P. infestans*.

#### 4.5 IZRAŽANJE GENA *Rpi-Smira2/R8*

Po inokulaciji genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira v tkivni kulturi smo v treh časovnih točkah (takoj po inokulaciji ( $t_0$ ), 2 dni ( $t_2$ ) in 4 dni po inokulaciji) nabrali vzorce listnega tkiva, iz katerih smo izolirali celokupno RNA, jo prepisali v molekule cDNA ter nato opravili reakcijo PCR v realnem času. Po pregledu amplifikacijskih krivulj (Slika 63) smo opazili, da je do pomnoževanja prišlo tudi v vzorcih listnega tkiva sorte Colomba (Slika 63E-F), ki nam je služila kot negativna kontrola, saj smo z analizo z genskimi markerji dokazali, da sorta Colomba ne vsebuje gena *Rpi-Smira2/R8* (Slika 31). Posledično smo skleпали, da je tudi pri reakcijah PCR v

realnem času vzorcev genotipa C571 (Slika 63A-B) in sorte Sárpo Mira (Slika 63C-D) prišlo do nespecifičnega pomnoževanja.



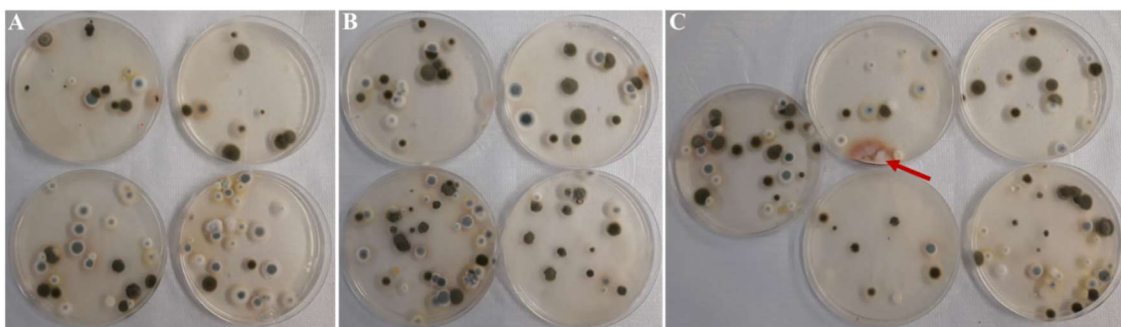
Slika 63: Krivulje pomnoževanja gena *Rpi-Smira2/R8* z reakcijo PCR v realnem času v vzorcih genotipa C571 v času  $t_0$  (A) in  $t_2$  (B), v vzorcih starš. sorte Sárpo Mira v času  $t_0$  (C) in  $t_2$  (D) ter v vzorcih starš. sorte Colomba v času  $t_0$  (E) in  $t_2$  (F)

#### 4.6 IDENTIFIKACIJA IN IZVOR KONTAMINACIJ

Zaradi vseh težav s kontaminacijami pri inokulaciji odrezanih listov in inokulacijah na celih rastlinah v rastlinjaku, ki so motile ocenjevanje in določanje stopnje odpornosti genotipov R8 na krompirjevo plesen, nas je zanimalo, od kod te kontaminacije izhajajo, saj se jih kljub razkuževanju nismo uspeli znebiti, pa tudi zanimalo nas je, za katere kontaminacije gre ter ali vplivajo na rast *P. infestans* ali pa celo sami povzročajo nekroze in lezije na listnem tkivu. Zato smo preverili, kaj se nahaja v zraku v rastlinjaku in uporabljenih rastnih komorah. Preverili smo, kaj se nahaja na listih rastlin, vzgojenih v rastlinjaku, saj smo od tu pridobili rastlinski material za inokulacijo na celih rastlinah in odrezanih listih; in ali z metodami površinske sterilizacije uporabljene pri razkuževanju listov za inokulacijo odrezanih listov (opisano v poglavju 3.3.2.1), res odstranimo kontaminacije.

##### 4.6.1 Odprte petrijevke z gojiščem PDA v rastlinjaku in rastnih komorah

Kolonije, zrastle na trdnih gojiščih PDA, postavljenih v rastlinjak za eno uro, so bile med sabo podobne ne glede na lokacijo v rastlinjaku. Na podlagi morfoloških značilnosti zrastlega micelija smo identificirali tri rodove: *Cladosporium* (rjavo obarvan micelij), *Penicillium* (modro obarvan micelij z belim robom) in *Fusarium* (rdeče obarvan micelij) (Slika 64).

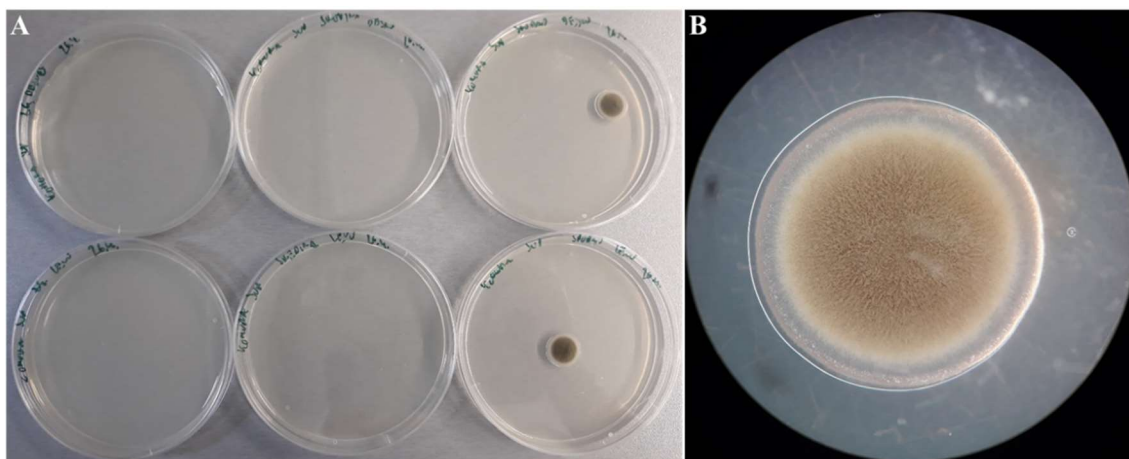


Slika 64: Zrastle kolonije gliv na trdnih gojiščih PDA, postavljene v rastlinjaku

Pri inokulacijah odrezanih listov smo uporabili dve rastni komori različnih proizvajalcev (IZR Škofja Loka, Slovenija in BINDER GmbH, Nemčija). Tako kot v rastlinjaku smo tudi v obe rastni komori postavili odprta trdna gojišča PDA za eno uro in jih nato po sedmih dneh pregledali.

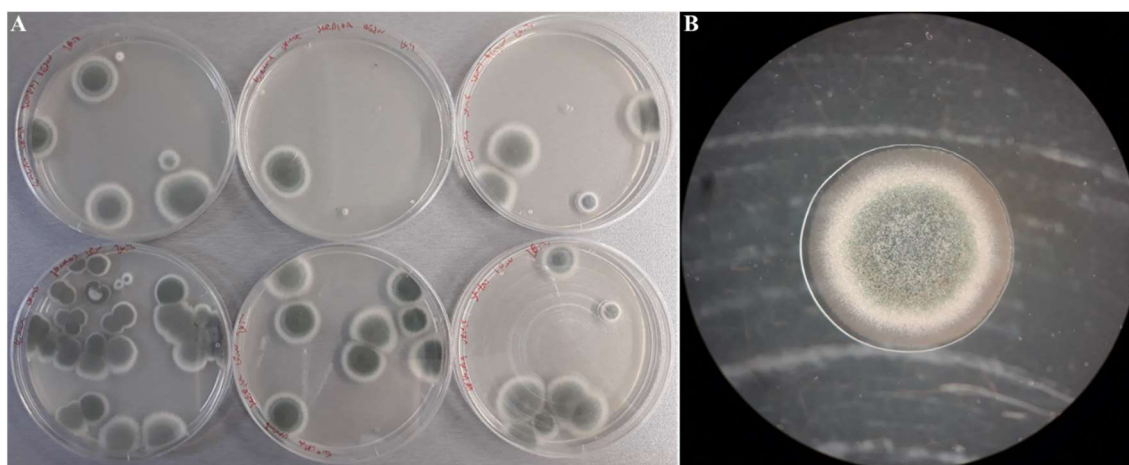
Večina trdnih gojišč iz rastne komore IZR (IZR Škofja Loka, Slovenija) je bila praznih, le dve petrijevki sta imeli po eno kolonijo *Cladosporium* spp. (Slika 65), kar nakazuje na majhno vsebnost spor gliv v zraku.





Slika 65: Zrastle kolonije gliv rodu *Cladosporium* na trdnih gojiščih PDA, postavljene v rastni komori IZR

V komori BINDER (BINDER GmbH, Nemčija) je na trdnih gojiščih PDA zrastle več kolonij, vendar izključno iz rodu *Penicillium* (Slika 66).

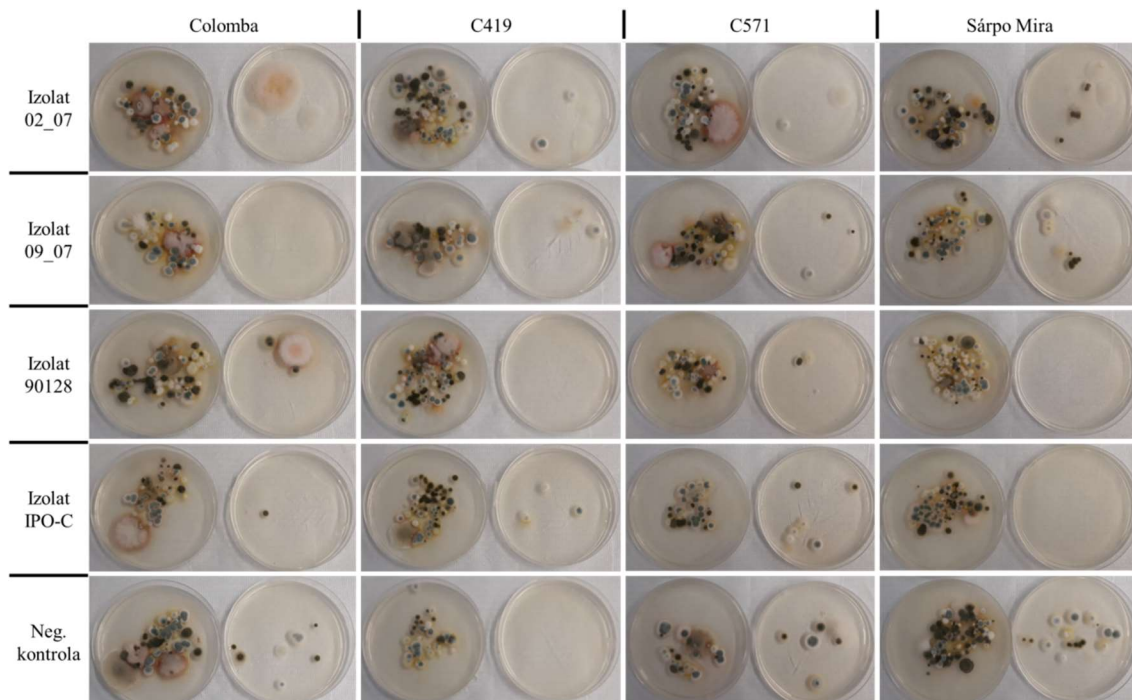


Slika 66: Zrastle kolonije gliv rodu *Penicillium* na trdnih gojiščih PDA, postavljene v rastni komori BINDER

#### 4.6.2 Odtisi nerazkuženih lističev genotipov C419, C571 in starševskih sort Colomba in Sárpo Mira na trdna gojišča PDA

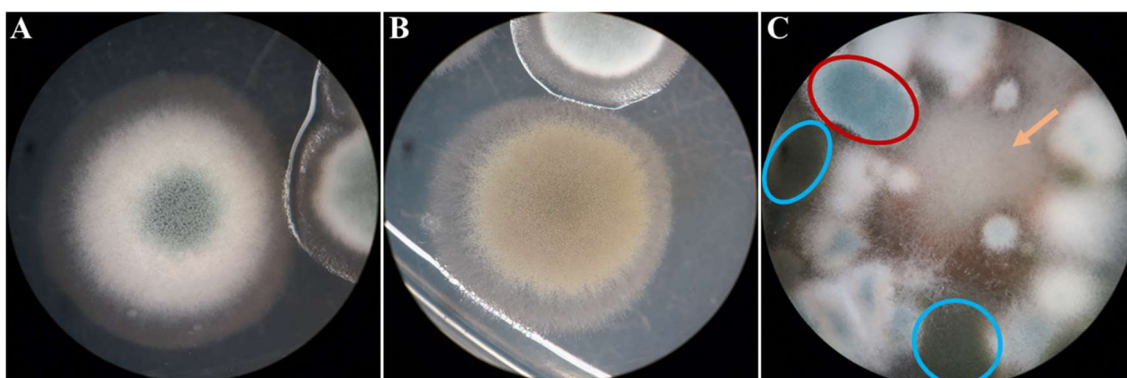
Pred inokulacijo genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira na ravni celih rastlin v rastlinjaku smo nabrali posamezne lističe za vsak tip inokulirane krompirjeve rastline (genotip oz. starševska sorta) in za vsak inokuliran izolat *P. infestans* ter jih odtisnili na trdna gojišča PDA. Zanimalo nas je, katere glive lahko najdemo na površini lističev, preden jih inokuliramo z inokulumom *P. infestans*, pri čemer nas je zanimala tako spodnja kot zgornja stran lističev.

Na podlagi zrastle kolonij gliv po nekajdnevni inkubaciji trdnih gojišč PDA smo opazili, da med posameznimi lističi ni bilo razlik v vsebnosti gliv na listni površini ne glede na tip in skupino inokuliranih rastlin (Slika 67). Vsi odtisnjeni lističi so imeli več gliv na zgornji kot na spodnji strani, kjer v določenih primerih glive niso bile prisotne (Slika 67).



Slika 67: Odtisi zgornje (leva petrijevka) in spodnje (desna petrijevka) strani lističev genotipov C419 in C571 ter starš. sort Colomba in Sárpo Mira, nabranih iz krompirjevih rastlin, gojenih v rastlinjaku, pred inokulacijo z inokulumom *P. infestans*

Zrastle kolonije gliv na trdnih gojiščih PDA smo pregledali tudi pod stereomikroskopom in določili rod posameznih zrastle gliv. Prevladovale so glive rodov *Penicillium* in *Cladosporium*, v redkih primerih smo opazili tudi glive rodu *Fusarium* (Slika 67 in 68).



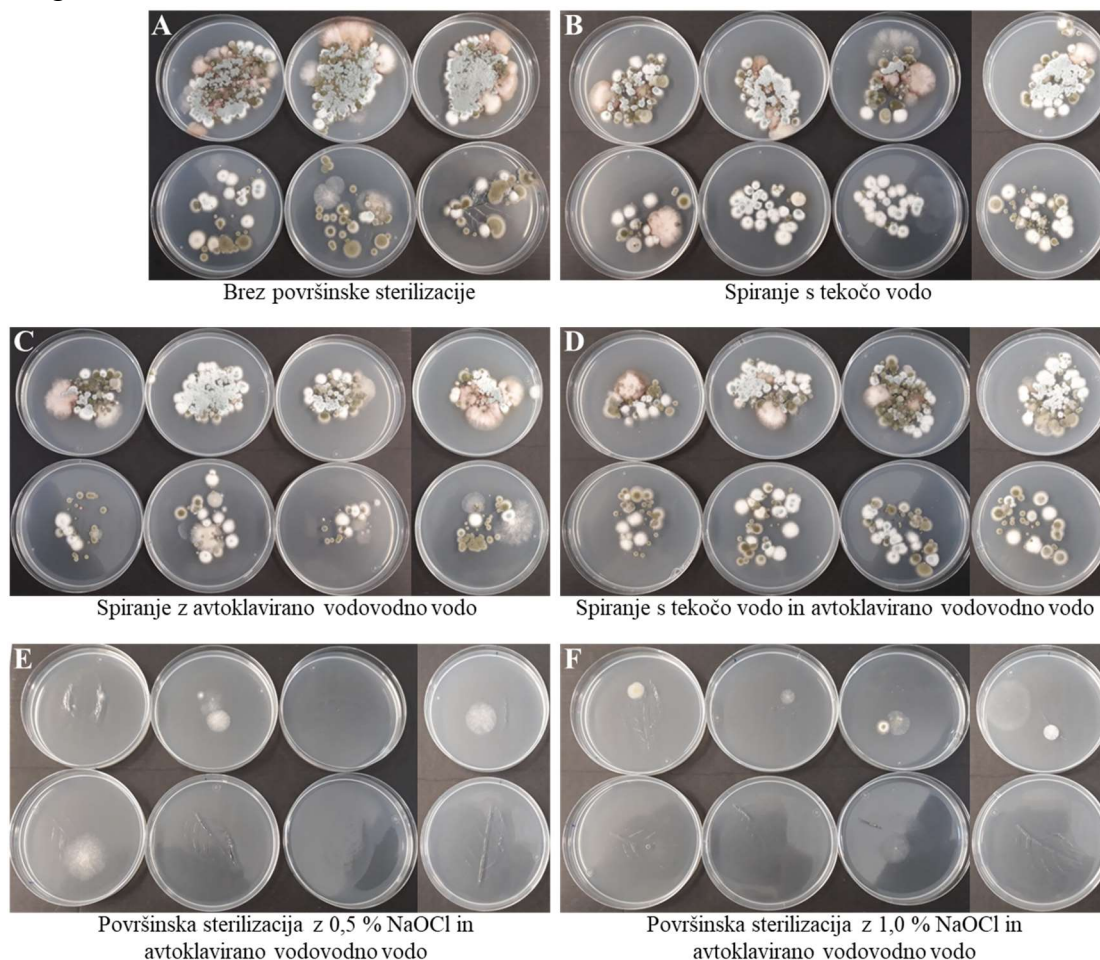
Slika 68: Pregled zrastle kolonij gliv na trdnih gojiščih PDA po odtisih lističev pod stereomikroskopom

A – gliva rodu *Penicillium*; B – gliva rodu *Cladosporium*; C – skupek kolonij gliv rodu *Cladosporium* (modra oznaka), rodu *Penicillium* (rdeča oznaka) in rodu *Fusarium* (oranžna puščica).

### 4.6.3 Odtisi površinsko steriliziranih lističev na trdna gojišča PDA

Ko smo določili prisotnost različnih rodov gliv na površini listov rastlin, gojenih v rastlinjaku, nas je zanimalo, ali bi tovrstne glive lahko odstranili s površinsko sterilizacijo ali spiranjem listov. Iz rastlin, gojenih v rastlinjaku, smo odrezali posamezne lističe in jih površinsko sterilizirali oz. sprali na pet različnih načinov (opisano v poglavjih 3.3.2.1 in 3.4.3). Površinsko tretirane liste smo nato odtisnili na trdna gojišča PDA in po nekaj dneh pregledali uspešnost in učinkovitost tretiranja (Slika 69).

Najbolj učinkoviti metodi površinske sterilizacije sta bili metodi z 0,5 % in 1,0 % raztopino NaOCl, saj je po tretiranju zrastle le posamična ali pa le nekaj kolonij gliv v primerjavi z odtisi listov brez površinske sterilizacije (Slika 69E-F). Različne metode spiranja bodisi le s tekočo vodo bodisi le z AVV bodisi s kombinacijo obeh se med sabo niso razlikovale v učinkovitosti, saj je po vseh treh tretmajih zrastle večje število kolonij gliv in se niso bistveno razlikovale od listov brez površinske sterilizacije (Slika 69A-B). Prevladovali so glive rodov *Penicillium* in *Cladosporium*, v redkih primerih smo opazili tudi glive rodu *Fusarium*.



**Slika 69: Učinkovitost različnih metod površinske sterilizacije krompirjevih lističev glede na zrastle kolonije gliv po odtisu površinsko steriliziranih lističev na trdna gojišča PDA**

## 5 RAZPRAVA

Žlahtnjenje proti krompirjevi plesni visoko odpornih krompirjevih sort intenzivno poteka od začetka 20. stoletja, v zadnjih 30 letih pa so različni žlahtniteljski programi uspeli razviti nove sorte z visoko odpornostjo širokega spektra, saj so nekatere izmed njih še danes odporne tudi na kompleksne in agresivne izolate *P. infestans*. Poleg sort Twister, Twinner, White Lady, Carolus in Alouette mednje spada tudi sorta Sárpo Mira, ki vsebuje pet odpornostnih genov *R3a*, *R3b*, *R4*, *Rpi-Smira1* in *Rpi-Smira2/R8* (Rietman in sod., 2012). Slednji naj bi najbolj prispeval k visoki odpornosti sorte Sárpo Mira, vendar točen mehanizem delovanja gena *Rpi-Smira2/R8* še ni poznan (Kim in sod., 2012). V doktorski disertaciji Jo (2014) je bilo odkrito, da je gen *Rpi-Smira2* homolog gena *R8*, ki izraža visoko in trajno odpornost proti krompirjevi plesni. V raziskavi Kim in sod. (2012) so pokazali, da je F1 potomec diferencialne rastline *Mar8*, ki je vseboval le gen *R8*, izražal primerljivo stopnjo odpornosti kot starševska diferencialna rastlina *Mar8* in sorta Sárpo Mira. Vossen in sod. (2016) pa so gen *R8* z gensko transformacijo vstavili v občutljivo sorto Desiree, ki je na polju izražala visoko odpornost širokega spektra na agresiven izolat IPO-C. Posledično naj bi poglavitni vir visoke odpornosti sorte Sárpo Mira bil gen *Rpi-Smira2/R8*.

Cilj doktorske naloge je bil pokazati doprinos gena *Rpi-Smira2/R8* k odpornosti proti krompirjevi plesni, pri čemer smo najprej želeli pridobiti populacijo F1 križancev med občutljivimi sortami in sorto Sárpo Mira, ki bi izmed petih *R* genov iz odporne starševske sorte vsebovali le gen *Rpi-Smira2/R8*, brez vpliva ostalih štirih *R* genov. Populacijo F1 križancev smo odbrali s pomočjo genskim markerjev in efektorsko agroinfiltracijo ter tako uspešno pridobili deset genotipov *R8*, ki smo jih nato izpostavili različno agresivnim izolatom *P. infestans*. Zanimalo nas je, ali se bo stopnja odpornosti genotipov *R8* razlikovala glede na inokuliran izolat *P. infestans* (vpliv doprinosna gena *Rpi-Smira2/R8*) ter ali se bodo genotipi *R8* med sabo razlikovali v stopnji odpornosti glede na križanje, iz katerega izhajajo (vpliv genetskega ozadja). Glede na to da se je v raziskavi Orłowska in sod. (2012a) odpornost sorte Sárpo Mira razlikovala glede na način inokulacije, pri čemer so odrezani listi sorte Sárpo Mira izgubili odpornost na izolat IPO-C v primerjavi s celo rastlino v poljskih poskusih, nas je zanimalo, ali bomo ta pojav opazili tudi pri direktnih potomcih sorte Sárpo Mira, genotipih *R8*.

### 5.1 ROČNA KRIŽANJA IN ODBIRA GENOTIPOV *R8* IZ POPULACIJE F1 KRIŽANCEV

#### 5.1.1 Odbira genotipov *R8* iz populacije F1 križancev z genskimi markerji

Iz populacije 1213 vzklilih rastlin smo s pomočjo genskih markerjev odbrali rastline, ki vsebujejo le *Rpi-Smira2/R8*. Za razliko od programov žlahtnjenja, kjer želimo s selekcijo s pomočjo genskih markerjev (ang. MAS) najti genotipe z največ *R* geni v okviru

piramidenja genov, smo v naši raziskavi uporabili postopno negativno selekcijo. Na ta način smo zmanjšali število analiz, saj smo vsako naslednjo analizo opravili na manjšem številu vzorcev.

Na podlagi rezultatov, pridobljenih tekom odbire z genskimi markerji, ne moremo ničesar sklepati o dedovanju *R* genov iz Sárpo Mire, saj smo le z markerjem za gen *R3b* opravili analizo na celotni populaciji vzklilih rastlin (1213). Glavni geni *R*, med katere spada vseh 11 genov *R* iz divje vrste *S. demissum*, se dedujejo kot dominantni monogeni, medtem ko je rasno-nespecifična odpornost kvantitativna lastnost in se deduje poligeno. Gen *R8* iz diferencialne rastline *MaR8* naj bi se dedoval kot dominanten monogen na podlagi segregacije odpornosti proti krompirjevi plesni F1 križancev *MaR8* na poljskih poskusih (Jo in sod., 2011). Kim in sod. (2012) so prav tako inokulirali F1 potomce diferencialne rastline *MaR8*, kjer je odpornost ravno tako segregirala v razmerju 1:1, značilno za dominantno monogeno dedovanje, vendar le na poljskih poskusih. Na testu odrezanih listov so bili namreč le nekateri F1 potomci odporni na *P. infestans*. Kim in sod. (2012) ter Vossen in sod. (2016) so na podlagi svojih rezultatov o doprinosu gena *R8* zaključili, da genetsko ozadje zelo vpliva na aktivnost gena *R8* ne glede na način dedovanja.

### 5.1.2 Odbira genotipov *R8* iz populacije F1 križancev z efektorsko agroinfiltracijo

Po selekciji z genskimi markerji smo iz populacije 1213 F1 križancev odbrali 36 rastlin, za katere smo vedeli, da vsebujejo gen *Rpi-Smira2/R8*, status gena *R4* pa ni bil poznan, saj zanj genski marker še ni bil razvit. Z agroinfiltracijo efektorskega gena *Avr4* v odrezane liste testiranih rastlin smo na podlagi odsotnosti hipersenzitivnega odziva uspešno odbrali deset rastlin, ki so izmed petih genov *R* iz starševske sorte Sárpo Mira vsebovale le gen *Rpi-Smira2/R8*. Sam postopek agroinfiltracije smo zaradi pretiranih poškodb na listnem tkivu pri infiltraciji suspenzije bakterij na celih rastlinah morali prilagoditi in agroinfiltracijo opraviti na odrezanih listih. Na ta način smo lahko liste predhodno rahlo naluknjali pod stereomikroskopom ter povečali samo natančnost, predvsem pa učinkovitost metode. Agroinfiltracijo se najpogosteje izvaja na modelni rastlini *Nicotiana benthamiana* (Goodin in sod., 2008), saj je zelo dovzetna za gensko manipulacijo (Leuzinger in sod., 2013), tanka struktura listov pa omogoča visoko učinkovitost in uspešnost postopka, za razliko od krompirjevih listov, kjer je potrebno za uspešno agroinfiltracijo pripraviti večji volumen bakterijske suspenzije (Du in sod., 2014). Manjše žile krompirjevih listov tudi otežujejo agroinfekcijo virusov zvijanja listov krompirja (PLRV), kar vpliva na uspešnost infekcije (Kawchuk in sod., 2002).

Morebiten razlog za neuspešno efektorsko agroinfiltracijo na celih rastlinah 36 F1 križancev bi lahko pripisali starosti uporabljenih krompirjevih rastlin. V raziskavi (Bhaskar in sod., 2009) so pri optimizaciji agroinfiltracije genskih konstruktov za utišanje genov na osnovi interferenčne RNA (RNAi) ugotovili, da se je učinkovitost

agroinfiltracije signifikantno zmanjšala, v kolikor so uporabili liste krompirjevih rastlin, starih od tri do štiri tedne, medtem ko je bila učinkovitost agroinfiltracije konsistentno najvišja pri listih, pridobljenih od rastlin, starih od pet do šest tednov. Čeprav je v našem primeru k uspešnosti in učinkovitosti efektorske agroinfiltracije najverjetneje pripomogla sama uporaba odrezanih listov namesto celih rastlin ter natančno in rahlo poškodovanje zgornjih plasti abaksialne strani listov, je fiziološka starost rastlin ravno tako lahko vplivala na neuspešnost metode. Pri agroinfiltraciji celih rastlin smo namreč uporabili tri tedne stare rastline, medtem ko smo naknadno odrezane liste pridobili iz pet tednov starih krompirjevih rastlin.

Efektorska agroinfiltracija se običajno izvaja na celih rastlinah (Vleeshouwers in sod., 2008; Bhaskar in sod., 2009; Du in sod., 2014), vendar ima uporaba odrezanih listov svoje prednosti. Poleg natančnejše kontrole nad samo infiltracijo bakterijske suspenzije v kompaktnjšo listno tkivo nam efektorska agroinfiltracija na odrezanih listih omogoča opravljanje postopka v laboratoriju z ustreznim varnostnim in zaprtim sistemom za delo z GSO, namesto v rastlinjaku zaprtega sistema z zahtevnejšo in težko dostopno infrastrukturo. Efektorska agroinfiltracija je zaradi svojih številnih prednosti ter visoke uporabnosti v raziskavi interakcij med rastlinami in patogeni vodila v razvoj efektoromike, področje visoko zmogljive funkcionalne genomike, ki omogoča hitro identifikacijo genov *R* v testiranih rastlinah in zaznavanje funkcionalnih proteinov *R* s komplementarnimi efektorskimi proteini. V raziskavi (Rakosy-Tican in sod., 2020) so z uporabo genskih markerjev v potomcih povratnih križanj identificirali gen *R3a*, vendar po agroinfiltraciji efektorja *Avr3a* ni prišlo do hipersenzitivnega odziva. Podobne rezultate so pridobili tudi pri nekaterih ostalih testiranih genih *R* in komplementarnih genih *Avr*, kar so pojasnjevali z inaktivnostjo testiranih oz. iskanih genov *R*, genski markerji pa so zaznali njihove analoge. Uporaba efektorske agroinfiltracije se posledično razširja, s tem pa se hkrati razvija tudi efektoromika, ki je bila med drugim uporabljena tudi za detekcijo genov *R* v sorti Sárpo Mira (Rietman in sod., 2012) ter detekcijo dodatno prisotnih genov *R* v diferencialnih rastlinah *MaR1 – MaR11* (Kim in sod., 2012).

## 5.2 OPTIMIZACIJA VZBUDITVE VIRULENCE OOMICETE *P. infestans*

Za namene raziskav se oomiceto *P. infestans* goji na trdnih gojiščih, kot so Rye-A (Caten in Jinks, 1968), Rye-B (Caten in Jinks, 1968; Kato in sod., 1997), V8 (Spielman in sod., 1989; Andrivon, 1994; Andreu in sod., 1998; Lebreton in sod., 1999; Gold in sod., 2020a), rženo-grahovo in grahovo gojišče (Carlisle in sod., 2002; Montarry in sod., 2007; Andrivon in sod., 2011), kar poenostavi vzdrževanje in omogoča pridobivanje višjih koncentracij patogena, potrebnih za uspešno inokulacijo rastlin. Dolgotrajnejše vzdrževanje *P. infestans* na trdnih gojiščih lahko povzroči zmanjšanje sposobnosti povzročanja bolezni in s tem nejasne rezultate pri testiranju odpornosti krompirjevih rastlin, kar je bilo omenjeno že v raziskavi (Jinks in Grindle, 1963), kjer je inokulum *P.*

*infestans*, pridobljen iz grahovitih trdnih gojišč, imel slabšo stopnjo rasti na inokuliranih krompirjevih gomoljih, kot pa inokulum *P. infestans*, ki je pred inokulacijo rasel na krompirjevih gomoljih. V raziskavi (Fry in sod., 2019) so natančneje testirali ter primerjali virulenco izolatov *P. infestans*, gojenih na trdnih gojiščih, in izolatov, gojenih na paradižnikovih listih. Ugotovili so, da so bili sporangiji, gojeni na trdnih gojiščih, manj agresivni, saj so povzročali manjše lezije, hkrati pa se jim je sposobnost indirektna germinacije bistveno zmanjšala.

### **5.2.1 Vzбудitev virulence *P. infestans* z inokulacijo odrezanih krompirjevih listov**

Na podlagi pregleda literature smo za vzбудitev virulence oomicete *P. infestans* testirali dve metodi, in sicer z uporabo odrezanih listov občutljive sorte ter z uporabo rezin krompirjevih gomoljev. Sprva so se krompirjevi listi in gomolji uporabljali za vzdrževanje in namnoževanje *P. infestans* (Toxopeus, 1954; Lapwood, 1965) pred razvojem in uveljavitvijo umetnih trdnih gojišč (Caten in Jinks, 1968). Z izpostavitvijo pomislekov glede vpliva trajnega namnoževanja na umetnih gojiščih (Jinks in Grindle, 1963; Al-Kherb in sod., 1995) so se krompirjevi listi ponovno vključili v pripravo virulentnega inokuluma *P. infestans* (Colon in sod., 1995; Dorrance in Inglis, 1997, 1998; Carlisle in sod., 2002; Porter in Johnson, 2007; Johnson in Cummings, 2009; Tomczyńska in sod., 2014). Najpogosteje so se uporabljali listi sorte Bintje (Flier in sod., 2001; Andrivon in sod., 2011; Jo in sod., 2011; Mariette in sod., 2016a, 2016b) in Craigs Royal (Samen in sod., 2003; Andrivon in sod., 2011; Cooke in sod., 2012; Michalska in sod., 2016), ki ne vsebujeta glavnih genov *R*. Za pripravo virulentnega inokuluma uporabljenih izolatov *P. infestans* v okviru doktorske naloge smo uporabili občutljivo sorto KIS Sora (Dolničar in Rudolf Piliš, 2012).

Prednosti uporabe krompirjevih listov za vzbuditev virulence so predvsem preprosta priprava in hitro širjenje *P. infestans* na listnem tkivu – micelij s sporangiji se pojavi že v nekaj dneh. Dodatna prednost je tudi razpoložljivost velike količine rastlinskega materiala – iz le nekaj rastlin, vzgojenih v rastlinjaku, lahko pridobimo večje število listov. Prav tako lahko to metodo uporabimo večkrat zaporedoma – rastline lahko gojimo v rastlinjaku daljše časovno obdobje, listi so tako razpoložljivi dlje časa. Pomanjkljivosti metode, ki so se izkazale tekom testiranja, so bile visoko tveganje za pojav kontaminacij, ki so bile pogosto v stiku s *P. infestans*, ter hitro propadanje listnega tkiva, kar je onemogočalo enostavno rokovanje in pridobivanje višjih koncentracij sporangijev, potrebnih za pripravo inokuluma.

### **5.2.2 Vzбудitev virulence *P. infestans* z inokulacijo rezin krompirjevih gomoljev**

Druga testirana metoda vzбудitve virulence oomicete *P. infestans* je bila z uporabo rezin krompirjevih gomoljev, ki se sicer pogosteje uporabljajo za določanje odpornosti

gomoljev različnih križancev ali sort proti krompirjevi plesni (Bhatia in Young, 1985; Kadish in Cohen, 1988; Swiezynski in sod., 1991; Pieterse in sod., 1994; Niepold in Schöber-Butin, 1995; Andreu in sod., 1998; Dorrance in Inglis, 1998; Johnson in Cummings, 2009; Olivieri in sod., 2009; Sharma in sod., 2013; Brylińska in Śliwka, 2017). Pred razvojem umetnih trdnih gojišč so se rezine gomoljev uporabljale tudi za namnoževanje in vzdrževanje oomicete *P. infestans* (McKee, 1964; Lapwood, 1965), sčasoma pa so se zaradi izgube virulence, kot posledica trajnega namnoževanja na umetnih trdnih gojiščih, rezine gomoljev pričele uporabljati kot eden izmed načinov vzbuditve virulence inokuluma *P. infestans* (Kadish in Cohen, 1988; Swiezynski in sod., 1991; Birhman in Singh, 1995; Dorrance in Inglis, 1997; Ordonez in sod., 1997, 1998; Flier in sod., 2001; Olivieri in sod., 2009; Najdabbasi in sod., 2020; Rakosy-Tican in sod., 2020). Tako kot pri odrezanih listih smo tudi pri tej metodi uporabili gomolje občutljive sorte KIS Sora (Dolničar in Rudolf Piliš, 2012).

Uporaba rezin krompirjevih gomoljev nam je omogočila boljši nadzor nad pogoji inkubacije, saj smo petrijevke z rezinami po inokulaciji s *P. infestans* lahko inkubirali v inkubatorju pod optimalnimi in kontroliranimi pogoji. Hkrati so zasedle manj prostora, predvsem pa smo glede na količino inokuliranega materiala lahko pridobili višje koncentracije sporangijev *P. infestans* kot pri odrezanih listih. Glavno prednost pa smo videli v tem, da smo s preraščenimi rezinami lahko enostavno rokovali, saj so rezine kljub visoki preraščenosti ohranile svojo kompaktno strukturo za razliko od krompirjevih listov. Ključna pomanjkljivost je bila tako kot pri odrezanih listih pojav kontaminacije, ki je bila s prostim očesom podobna oomiceti *P. infestans* in smo jo lahko odkrili šele po testni izolaciji na trdnem rženem gojišču.

V izogib pojavu kontaminacije smo testirali tri različne načine površinske sterilizacije, ki so vključevale kombinacijo odstranjevanja lupine, namakanja v raztopino NaOCl ter ožiganje z absolutnim etanolom, izmed katerih se je najbolje obnesla metoda z olupljenimi gomolji, namočenimi v raztopini NaOCl brez ožiganja. Omenjeno metodo smo modificirali po protokolu, opisanem v raziskavi Bhatia in Young (1985), kjer so sicer uporabili višjo koncentracijo raztopine NaOCl (5 % namesto 3 %), vendar je bil čas namakanja za 5 min krajši. Podoben postopek površinske sterilizacije sta uporabili tudi Dorrance in Inglis (1998), kjer sta, v primerjavi z našo metodo, gomolje namakali v 5 % raztopini NaOCl 5 min dlje (20 min), nato pa sta jih še dodatno namočili v 70 % etanolu za 1 min. Kljub večkratni ponovitvi celotnega postopka priprave rezin krompirjevih gomoljev ter dvakratni toplotni sterilizaciji vseh uporabljenih materialov in orodja težav s kontaminacijami nismo uspeli popolnoma odpraviti. Uporaba rezin krompirjevih gomoljev za vzbuditev virulence se tako ni izkazala kot povsem zanesljiva metoda.



### 5.2.3 Vzbuditev virulence *P. infestans* z inokulacijo krompirjevih rastlin v tkivni kulturi

Zaradi prevelike nezanesljivosti obeh najpogosteje uporabljenih metod za vzbuditev virulence smo se nato poslužili uporabe tkivnih kultur za vzbuditev virulence *P. infestans*. Med pregledom literature smo sicer zasledili nekaj raziskav, kjer so tkivne kulture uporabili za testiranje virulence *P. infestans* ali za neposredno inokulacijo krompirjevih križancev in sort v tkivni kulturi (Al-Kherb in sod., 1995; Huang in sod., 2005b; Vleeshouwers in sod., 2008; Andrivon in sod., 2011; Verzaux in sod., 2011; Orłowska in sod., 2012a, 2012b; Sedlák in sod., 2017; Duan in sod., 2020; Zheng in sod., 2020; Dufková in sod., 2021), vendar nikjer nismo zasledili uporabe tkivnih kultur za namen vzbuditve virulence *P. infestans*.

V preliminarnih testiranjih smo preizkusili in določili najbolj primerno krompirjevo sorto v tkivni kulturi, občutljivo na krompirjevo plesen. Odločili smo se za sorto Dobrin (Kus, 1987; Dolničar in Rudolf Pilih, 2012), ki jo hranijo v Kmetijskem inštitutu Slovenije v tkivni kulturi v okviru slovenske genske banke krompirja, zanjo pa smo se odločili predvsem zaradi dobre rasti v tkivni kulturi, saj tvori velike liste, ki so pomembni za uspešno inokulacijo s *P. infestans*.

Inokulirane in preraščene rastline sorte Dobrin v tkivni kulturi same po sebi ne bi zadostovale za pridobitev višjih koncentracij sporangijev *P. infestans*, saj so rastline manjše in bi potrebovali precejšnje število inokuliranih rastlin. Poleg tega pa, podobno kot pri uporabi odrezanih listov za vzbuditev virulence, rastlinsko tkivo postane vodeno in uvelo, kar bi oteževalo rokovanje in uspešno pridobivanje sporangijev, zato smo namesto celih rastlin v tkivni kulturi uporabili le preraščene liste in jih s sterilno pinceto predstavili na trdno rženo gojišče z antibiotiki. Virulenten micelij *P. infestans* se je tako iz preraščenega lista enostavno razširil po trdnem gojišču, pri čemer smo iz posameznega inokuliranega kozarčka pridobili veliko število preraščenih listov, iz teh pa smo nacepili veliko število petrijev s trdnim gojiščem, kar nam je omogočilo hitro in enostavno pridobitev ustrezno visokih koncentracij sporangijev *P. infestans*. Morebitna kontaminirana gojišča smo preprosto odstranili, ne da bi pri tem ogrozili sterilnost preostalih petrijev. Trdna gojišča s preraščenimi listi smo inkubirali pod optimalnimi in kontroliranimi pogoji.

Z uporabo tkivnih kultur smo zagotovili najvišjo možno sterilnost celotnega postopka, saj je že sama priprava suspenzije *P. infestans* potekala sterilno, zaradi sterilnosti tkivnih kultur pa se je krompirjeva plesen uspešno razrastla brez kompeticije ostalih mikroorganizmov. Z uporabo predhodno razkuženih pršilk smo zagotovili enakomeren nanos suspenzije zoospor na listno površino. V primeru potencialne rasti kontaminacij na

rastlinah ali gojišču se le-te razširijo le znotraj posameznega kozarčka, ki ga lahko odstranimo, in s tem ne vplivamo na ostale inokulirane rastline v tkivni kulturi.

Na podlagi prednosti, pomanjkljivosti in uspešnosti vseh treh testiranih metod vzbuditve virulence *P. infestans* (uporaba odrezanih krompirjevih listov, rezin krompirjevih gomoljev in tkivnih kultur) smo se za pripravo virulentnega inokuluma za inokulacije genotipov *R8* odločili za metodo vzbuditve virulence s tkivnimi kulturami.

### 5.3 DOPRINOS GENA *Rpi-Smira2/R8* K ODPORNOSTI PROTI KROMPIRJEVI PLESNI

#### 5.3.1 Odpornostni odziv genotipov *R8* v tkivni kulturi

Da bi lahko določili doprinos gena *Rpi-Smira/R8* k odpornosti proti oomiceti *P. infestans*, smo odbrane genotipe *R8* izpostavili štirim različnim izolatom *P. infestans*, ki so se razlikovali tako po geografskem izvoru kot tudi po agresivnosti. Na ta način smo želeli preveriti, kako se bo stopnja genotipov *R8* razlikovala v primerjavi tako z občutljivimi starševskimi sortami kot tudi z odporno starševsko sorto, glede na to da vsebujejo glavni gen *R*, ki naj bi najbolj prispeval k visoki odpornosti starševske sorte Sárpo Mira. Poleg tega nas je tudi zanimalo, ali se bodo genotipi *R8* med sabo razlikovali v stopnji odpornosti glede na to, da izhajajo iz štirih različnih križanj in imajo posledično različno genetsko ozadje.

Izmed treh testiranih načinov in pogojev inokulacije s *P. infestans* (cele rastline v rastlinjaku, odrezani listi in cele rastline v tkivni kulturi) je bila najbolj ponovljiva in uspešna okužba s *P. infestans* na ravni celih rastlin v tkivni kulturi. Enakomeren nanos inokuluma s pršenjem, visoka zračna vlažnost, optimalna temperatura ter visoka raven sterilnosti so omogočili najbolj primerne pogoje za uspešno okužbo rastlin v tkivni kulturi, ki sicer niso najbolj pogosto uporabljene za določanje stopnje odpornosti proti krompirjevi plesni.

Tkivne kulture so se v raziskavah odpornosti krompirja proti krompirjevi plesni sprva pogosto uporabljale za odbiranje kalusa, odpornega na različne filtrate kulture *P. infestans*, iz katerega so nato poskušali z regeneracijo pridobiti krompirjeve rastline v tkivni kulturi, odporne na krompirjevo plesen (Behnke, 1979, 1980). Tehnike, uporabljene v tkivnih kulturah, so pogosto podale nepredvidljive rezultate, nemalokrat pa se visoke stopnje odpornosti rastlin v tkivni kulturi niso prenesle na raven celih rastlin v poljskih poskusih (Cerato in sod., 1993). Prva inokulacija rastlin v tkivni kulturi s pršenjem suspenzije sporangijev *P. infestans* je bila opravljena v raziskavi (Tegera in Meulemans, 1985), kjer so odbrane odporne rastline izražale primerljivo odpornost tudi

naknadno v poljskih poskusih. V kasnejših letih so se tkivne kulture uporabljale predvsem za hitro namnoževanje večje količine rastlinskega materiala, namenjenega za testiranje odpornosti rastlin v rastlinjaku ali na odrezanih listih (Gibson in sod., 1988; Helgeson in sod., 1998; Vleeshouwers in sod., 1999; van Poppel, 2009; Jo in sod., 2011, 2015; Gold, in sod., 2020a, 2020b; Gu in sod., 2020; Najdabbasi in sod., 2021), za efektoromiko (Zhu in sod., 2015; Yin in sod., 2017; Elnahal in sod., 2020), testiranje virulence *P. infestans* (Al-Kherb in sod., 1995; Andrivon in sod., 2011; Sedlák in sod., 2017) ter za transformacijo rastlin (Heeres in sod., 2002; Banerjee in sod., 2006; Jo in sod., 2014; Chen in Halterman, 2017; Domazakis in sod., 2017).

Nedavno je metoda neposredne inokulacije na rastlinah v tkivni kulturi ponovno prišla v uporabo v raziskavi Huang in sod. (2005b), kjer so metodo s tkivnimi kulturami primerjali z že uveljavljeno metodo inokulacije na odrezanih listih. Po inokulaciji testiranih rastlin z inokulumom *P. infestans* so se lokalne nekroze kot posledica hipersenzitivnega odziva pojavile med dva in štirimi dnevi po inokulaciji, medtem ko so se večje lezije razvile med tremi in petimi dnevi po inokulaciji. Podoben potek širjenja simptomov krompirjeve plesni smo opazili tudi pri inokulaciji genotipov *R8*, kjer so se lokalne nekroze najbolj izrazito pojavile po dveh ali treh dneh po inokulaciji, večje lezije pa so se razvile po treh ali štirih dneh po inokulaciji, vendar je tak potek razvoja simptomov veljal le za izolate 09\_07, 90128 in IPO-C. V raziskavi Huang in sod. (2005b) je do popolnega propada inokuliranih rastlin prišlo v roku dveh tednov, česar ne moremo povsem primerjati z inokulacijo genotipov *R8* v tkivni kulturi, saj smo širjenje simptomov spremljali le osem dni. V teh osmih dneh sta starševski sorti Colomba in Sylvana skoraj popolnoma propadli, medtem ko so ostale starševske sorte in genotipi *R8* imeli šibkejša simptoma krompirjeve plesni. Glede na to da je bila večina genotipov *R8* in starševskih sort po okužbi z agresivnima tujima izolatom 90128 in IPO-C občutljivih ter so imeli kar nekaj z micelijem preraščenih listov, lahko predvidevamo, da bi v roku dodatnega tedna dni propadle tudi te rastline. Po okužbi z izolatom 09\_07 pa bi bil delež propadlih rastlin po dveh tednih verjetno manjši, saj je bila večina starševskih sort in genotipov *R8* srednje odpornih na dotični inokuliran izolat.

V raziskavi Huang in sod. (2005b) so preliminarno tudi dokazali, da je koncentracija inokuluma  $2,5 \times 10^4$  sporangijev/ml najbolj primerna za inokulacijo rastlin v tkivni kulturi. Na podlagi teh rezultatov smo tudi v naši raziskavi uporabili omenjeno koncentracijo, vendar smo pri nanašanju inokuluma *P. infestans* rastline popršili s pršilkami, medtem ko so Huang in sod. (2005b) uporabili točkovno inokulacijo posameznih listov rastlin v tkivni kulturi. Pri neposrednih inokulacijah rastlin v tkivni kulturi se uporabljata tako pršenje inokuluma (Orłowska in sod., 2012a, 2012b; Zheng in sod., 2020) kot tudi točkovna inokulacija posameznih listov (Vleeshouwers in sod., 2008; Verzaux in sod., 2011; Dufková in sod., 2021). Točkovna inokulacija ima svojo glavno prednost predvsem v tem, da je lažje predvideti točno začetno lokacijo nastanka prvih

simptomov. Po inokulaciji pa je potrebno previdno rokovati z inokuliranimi rastlinami, saj mora inokulacijska kaplja s suspenzijo zoospor ostati na mestu dovolj dolgo časa, da lahko zoospore uspejo prodreti v listno tkivo. Z enakomernim pršenjem suspenzije po celotnih rastlinah v tkivni kulturi povečamo verjetnost za uspešno okužbo, hkrati pa je rokovanje z rastlinami lažje, saj prodor patogena ni odvisen le od ene inokulacijske točke. Slednje nam je omogočilo lažje in natančnejše spremljanje rastlin za pojav in razvoj simptomov krompirjeve plesni pod stereomikroskopom.

Iz preliminarnih inokulacij na tkivnih kulturah smo ugotovili, da običajne lestvice, ki se uporabljajo za ocenjevanje intenzitete simptomov krompirjeve plesni, ne bodo primerne za natančno določanje manjših razlik v stopnji odpornosti med genotipi R8. Pri ostalih primerljivih raziskavah z inokulacijami tkivnih kultur so uporabili različne lestvice ocen intenzivnosti simptomov krompirjeve plesni. Huang in sod. (2005b) ter Duan in sod. (2020) so uporabili lestvico z ocenami od 1 (oz. A) do 5 (oz. E), kjer je ocena 1 (oz. A) predstavljala razširjene lezije z močno sporulacijo, ocena 5 (oz. E) pa lokalizirane nekroze oz. hipersenzitivni odziv ali pa simptomov ni bilo. Orłowska in sod. (2012a) so uporabili le štiristopenjsko lestvico, kjer so ločili med zdravimi rastlinami brez simptomov, rastline s hipersenzitivnim odzivom, rastline s simptomi krompirjeve plesni brez sporangijev in rastline z vodenimi lezijami, micelijem in sporangiji. Za oba primera lestvic z ocenami smo bili mnenja, da sta bili premalo natančni za jasno razločevanje med različnimi stopnjami razvoja simptomov pri vsakodnevem ocenjevanju, še zlasti, ker smo med genotipi R8 pričakovali razlike v razvoju simptomov in smo jih želeli natančneje preučiti. V raziskavi Verzaux in sod. (2011) so uporabili lestvico z ocenami od 1 do 9, slednja je pomenila najvišjo odpornost, ki je sicer na prvi pogled delovala natančnejša, vendar v opisu uporabljenih metod niso podali natančne obrazložitve, kaj posamezne ocene predstavljajo. Zheng in sod. (2020) so intenziteto simptomov na inokuliranih tkivnih kulturah predstavili z deleži prizadetega listnega tkiva. Čeprav se tovrstno ocenjevanje pogosto uporablja pri določanju intenzitete simptomov krompirjeve plesni v poljskih poskusih (Stewart in Brandshaw, 2001; Orłowska in sod., 2012a; Jo, 2014) ali na ravni celih rastlin v rastlinjaku (Cruickshank in sod., 1982; Stewart in Brandshaw, 2001; Bradshaw in sod., 2006), kjer smo jo uporabili tudi pri inokulacijah genotipov R8 v rastlinjaku, smo bili skeptični glede uporabe deležev prizadetega tkiva v tkivnih kulturah. V preliminarnih poskusih smo namreč občasno opazili primere, ko je bilo listno tkivo precej porumenelo, porjavelo ter poškodovano, nismo pa opazili ne micelija ne sporangijev *P. infestans*, ki sta ključna pokazatelja uspešne okužbe. Lokossou in sod. (2010) so sicer opravljali okužbo na odrezanih krompirjevih listih, vendar so uporabili dokaj natančno lestvico z ocenami od 1 do 8, kjer so ocene med 1 in 3 predstavljale lezije z zelo močno sporulacijo in lezije z malo sporulacije, ocene med 4 in 5 so pomenile nejasen kvantitativni odziv, ocene med 6 in 8 pa so predstavljale manjše lezije hipersenzitivnega odziva v dimenzijah  $\geq 10$  mm oz.  $\leq 4$  mm. Lestvico ocen intenzitete simptomov smo tako razvili na podlagi Lokossou in sod. (2010), vendar smo jo prilagodili

glede na potek razvoja okužbe v preliminarnih poskusih in izključili velikosti lezij, saj na inokuliranih genotipih *R8* v tkivni kulturi ni bilo mogoče meriti velikosti nastalih lezij. Z razvojem večstopenjske natančne lestvice z ocenami intenzitete simptomov smo po okužbi tkivnih kultur s *P. infestans* na dnevni ravni podrobno primerjali odpornostni odziv genotipov *R8* s starševskimi sortami, hkrati pa smo lahko primerjali širjenje izolatov *P. infestans* med sabo.

### 5.3.1.1 Razlike v agresivnosti izolatov *P. infestans*

Za inokulacijo genotipov *R8* in starševskih sort smo uporabili štiri različne izolate *P. infestans* (02\_07, 09\_07, 90128, IPO-C), ki so se razlikovali v agresivnosti, geografskem izvoru in rasti. Agresivnost izolata je definirana kot kvantitativna lastnost patogena, ki opisuje intenzivnost povzročenih simptomov na dovzetnem gostitelju (Andrison, 1993). Agresivnost izolatov lahko določimo s kombinacijo meritev različnih parametrov: z neposrednim merjenjem velikosti nastalih lezij, z merjenjem latentne periode (čas od inokulacije do začetka sporulacije), s frekvenco okužbe (delež uspešnih inokulacij) in produkcijo sporangijev (Carlisle in sod., 2002; Cooke in sod., 2012; Mariette in sod., 2016b). Med okužbo genotipov *R8* v tkivni kulturi opisane meritve niso bile možne, saj bi lahko ogrozili sterilnost tkivnih kultur, ki je bila ključna prednost pred ostalimi metodami inokulacije v okviru doktorske naloge (inokulacija celih rastlin v rastlinjaku in na odrezanih listih), še posebno pri določanju latentne periode in gostote sporangijev, kjer bi bilo potrebno odvzeti ustrezno količino inokuliranega listnega materiala. Zaradi manjših listov rastlin v tkivni kulturi v primerjavi z listi rastlin, gojenimi v rastlinjaku, bi bilo neposredno merjenje velikosti lezij precej težavno, saj bi ravno tako lahko ogrozili sterilnost okolja, meritve pa bi bile bistveno manj natančne kot pri inokulaciji odrezanih listov. Za tovrstne meritve je tudi primernejša točkovna inokulacija inokuluma *P. infestans*, saj lahko zaradi pričakovane lokacije pričetka razvoja simptomov pridobimo natančnejše meritve dimenzij predvsem v začetnih fazah širjenja simptomov.

Za določanje stopnje intenzitete simptomov krompirjeve plesni se pogosto iz podatkov o deležih prizadetega rastlinskega tkiva skozi čas izračuna vrednost AUDPC (Shaner, 1977), ki se jo najpogosteje uporablja pri inokulacijah s *P. infestans* v poljskih poskusih ali rastlinjaku (Fry, 1978; Birhman in Singh, 1995; Jeger in Viljanen-Rollinson, 2001; Yuen in Forbes, 2009; White in Shaw, 2010; Sedláková in sod., 2011; Verzaux in sod., 2011; Orłowska in sod., 2012a; Rietman in sod., 2012; Sharma in sod., 2013; Forbes in sod., 2014; Jo, 2014; Meade in sod., 2020; Najdabbasi in sod., 2020; Rogozina in sod., 2021; Abuley in Hansen, 2022). Namesto deležev prizadetih rastlin se lahko uporabijo tudi druga merila, npr. površina lezij (Sharma in sod., 2010), velikost lezij (Lebreton in sod., 1999), delež prizadetega listnega tkiva na odrezanih listih (Andersen in Ospina-Giraldo, 2011) za primerjavo med izolati *P. infestans* in med sortami oz. križanci. Podobno kot v raziskavi Gold in sod. (2020a, 2020b) smo za primerjavo agresivnosti

štirih inokuliranih izolatov *P. infestans* izračunali vrednosti AUDPC iz ocen osemstopenjske lestvice simptomov vseh inokuliranih krompirjevih rastlin skozi vseh osem dni okužbe za posamezen izolat *P. infestans*.

Tuja izolata 90128 in IPO-C spadata med kompleksne izolate zaradi sposobnosti okuževanja skoraj vseh Mastenbroek/Black diferencialnih rastlin (Mastenbroek, 1952; Black in sod., 1953; Lokossou in sod., 2009) in se pogosto uporabljata v raziskavah odpornosti sort proti krompirjevi plesni in virulence *P. infestans* (Vleeshouwers in sod., 1999, 2000; Huang, 2005a; Tian in sod., 2007; Lokossou in sod., 2009, 2010; Jo in sod., 2011, 2015; Verzaux in sod., 2011; Kim in sod., 2012; Duan in sod., 2020). Na podlagi rezultatov vrednosti AUDPC po inokulaciji genotipov *R8* sta se oba tuja izolata uvrstila med najbolj agresivne izolate, uporabljene v doktorski nalogi, med njima pa ni bilo statistično značilnih razlik, kar je tudi v skladu z rezultati raziskave Verzaux in sod. (2011), kjer so oba izolata inokulirali na odrezanih krompirjevih listih in sta povzročila primerljivo intenzivne simptome. Med razvojem okužbe smo opazili razliko v rasti med izolatoma 90128 in IPO-C. Pri izolatu 90128 smo po uspešni okužbi opazili veliko količino micelija, vendar manj sporangioforov, medtem ko je izolat IPO-C po pojavu micelija kmalu intenzivno sporuliral. Omenjenih razlik v rasti obeh izolatov pri pregledu literature nismo zasledili. Po definiciji virulentnosti (Zhan in McDonald, 2013) sta bila oba tuja izolata virulentna na vse testirane genotipe *R8* in starševske sorte v tkivni kulturi.

V okviru doktorske naloge smo prvič določili stopnjo agresivnosti slovenskih izolatov 02\_07 in 09\_07, ki sta bila nabrana in izolirana z okuženih krompirjevih nasadov v letu 2007 v okviru populacijske raziskave o značilnosti izolatov *P. infestans* v Sloveniji (Žerjav, 2016). Vsi nabrani izolati *P. infestans* so bili testirani na odpornost na fungicid metalaksil in genotipizirani z mikrosatelitnimi markerji, z metodo parjenja z referenčnimi izolati pa so jim določili tudi paritveni tip. Izolat 02\_07 tako pripada paritvenemu tipu A2 ter je odporen na metalaksil, medtem ko izolat 09\_07 pripada paritvenemu tipu A1 in je občutljiv na metalaksil. Analiza z mikrosatelitnimi markerji (markerji SSR) je pokazala, da izolat 02\_07 pripada genotipu EU\_13\_A2, izolat 09\_07 pa pripada genotipu EU\_34\_A1 (Žerjav, 2016).

Kljub pripadnosti enemu izmed bolj agresivnih genotipov je izolat 02\_07 izmed štirih uporabljenih izolatov *P. infestans* v inokulacijah genotipov *R8* povzročal najšibkejše simptome, kar se ne sklada povsem z rezultati drugih raziskav o genotipu EU\_13\_A2. V letih med 2004 in 2017 je genotip EU\_13\_A2 prevladoval v Zahodni Evropi (EuroBlight, 2022), saj ga je bilo zaradi svoje agresivnosti in odpornosti na metalaksil težko zatirati (White in Shaw, 2010; Lees in sod., 2012; Žerjav, 2016). V raziskavi Cooke in sod. (2012) je imel izolat genotipa EU\_13\_A2 najkrajšo latentno periodo in je povzročal največje lezije na vseh testiranih krompirjevih rastlinah. Izmed testiranih genotipov *R8* in sort sta najbolj intenzivne simptome krompirjeve plesni izražala le starševski sorti Rioja in

Sylvana, kjer je izolat 02\_07 le v nekaterih primerih sporuliral. Za genotip EU\_13\_A2 je namreč bilo dokazano, da lahko povzroča večje lezije na rastlinah in ima lahko tudi do petkrat višjo sporulacijo v primerjavi z ostalimi genotipi *P. infestans* (Najdabbasi in sod., 2020).

Podobno odstopanje v agresivnosti genotipa EU\_13\_A2 so zasledili tudi v raziskavi Mariette in sod. (2016b), kjer so analizirali genotipske in fenotipske podatke več kot 1200 izolatov *P. infestans*, nabranih v Franciji v letih od 2001 do 2008. Izolati genotipa EU\_13\_A2, nabrani v letih 2004 in 2005, so povzročili največje lezije, a imeli nižjo produkcijo spor, medtem ko so izolati istega genotipa, nabrani v letih od 2006 do 2008, povzročali najmanjše lezije. Podobno kot mi so pričakovali, da bo genotip EU\_13\_A2 najbolj agresiven, vendar se je v primerjavi s preostalimi genotipi *P. infestans* v raziskavi izkazal za nizko agresivnega. Mariette in sod. (2016b) to razliko pojasnjujejo s fenotipsko variabilnostjo med izolati znotraj iste klonalne linije, zaradi česar je potrebno v raziskavo vključiti večje število izolatov za pridobitev zanesljivejših podatkov. Drugi razlog za to fenotipsko variabilnost je lahko sam geografski izvor izolatov, saj se razlike v okoljskih pogojih lahko odrazijo v virulenci patogena. Tretji razlog bi lahko bili tudi sami eksperimentalni pogoji, saj je genotip EU\_13\_A2 najbolj agresiven v suboptimalnih temperaturnih pogojih, vsi izolati v omenjeni raziskavi pa so bili testirani pri optimalni temperaturi, kar se je pokazalo kot nižja stopnja agresivnosti pri genotipu EU\_13\_A2.

Nadaljnje raziskave na genotipu EU\_13\_A2 (Mariette in sod., 2016a) so pokazale, da so izolati prilagojeni na temperaturo okolja, iz katerega so bili izolirani. Tako so npr. nordijski izolati imeli najvišji fitnes pri temperaturi 10 °C, medtem ko so mediteranski izolati imeli najvišji fitnes pri 24 °C. Enako prilagoditev na temperaturo glede na geografski izvor so zasledili tudi pri genotipu EU\_13\_A2, saj so genotipi EU\_13\_A2, izolirani v Zahodni Evropi, povzročili večje lezije pri nižji temperaturi, genotipi, izolirani v mediteranskih državah, pa so povzročili večje lezije pri višji temperaturi. Mariette in sod. (2016a, 2016b) so predvidevali, da nizka agresivnost genotipa EU\_13\_A2 pravzaprav olajša učinkovito širjenje, saj so genotipi z najvišjo sposobnostjo sporulacije v nekaj letih skoraj izginili iz populacije, medtem ko se je delež genotipov z manjšo sporulacijo in manjšimi povzročenimi lezijami vztrajno povečeval. S temi raziskavami so ovrgli hipotezo, da visoka agresivnost pomeni tudi višjo invazivnost genotipa (Cooke in sod., 2012).

V raziskavi Cooke in sod. (2012) so izolate genotipa EU\_13\_A2 izpostavili enajstim diferencialnim rastlinam (*MaR1 – MaR11*), pri čemer je bila okužba neuspešna le pri diferencialnih rastlinah *MaR8* in *MaR9*. Na podlagi teh podatkov bi lahko sklepali, da je slovenski izolat 02\_07 eden izmed manj agresivnih izolatov genotipa EU\_13\_A2, ki še ni uspel premagati odpornosti, posredovani z geni *R8* in *R9*, saj okužba genotipov *R8* ni bila uspešna. Po drugi strani pa izolat 02\_07 hkrati ni uspel okužiti niti občutljivih

starševskih sort, z izjemo sort Rioja in Sylvana, vendar je izolat 02\_07 le redko sporuliral. Posledično bi bil pravilnejši sklep, da je slovenski izolat 02\_07 neagresiven izolat kljub pripadnosti genotipu EU\_13\_A2. Da bi ta sklep dodatno preverili, bi genotipe *R8* in starševske sorte lahko inokulirali z drugimi izolati, nabranimi v populacijski raziskavi (Žerjav, 2016) v istem letu kot izolat 02\_07, ki ravno tako pripadajo genotipu EU\_13\_A2, kar so predlagali tudi Mariette in sod. (2016b), saj lahko tako lažje sklepamo o variabilnosti populacije znotraj iste klonalne linije. Po definiciji virulentnosti (Zhan in McDonald, 2013) je bil slovenski izolat 02\_07 avirulenten na vse genotipe *R8* in na starševski sorti Lusa in Colomba. Virulenten je bil na starševskih sortah Rioja in Sylvana, kjer je, sicer v redkih primerih, uspešno sporuliral. Izolat 02\_07 je bil avirulenten tudi na odporno starševsko sorto Sárpo Mira, kar se sicer sklada z drugimi raziskavami v poljskih poskusih, kjer je bila sorta Sárpo Mira odporna proti genotipu EU\_13\_A2 (White in Shaw, 2010; Lees in sod., 2012). Za razliko od omenjenih poljskih poskusov je sorta Sárpo Mira odpornost proti genotipu EU\_13\_A2 izgubila v testih na odrezanih listih, saj je kar 12 od 13 testiranih izolatov genotipa EU\_13\_A2 bilo virulentnih na sorto Sárpo Mira (Janiszewska in sod., 2021). Glede na to da je izolat 02\_07 kljub pripadanju agresivnemu genotipu EU\_13\_A2 povzročal najšibkejšo simptome na vseh genotipih *R8* in starševskih sortah, tovrstne primerjave o stopnji odpornosti sorte Sárpo Mira proti genotipu EU\_13\_A2 z ostalimi raziskavami niso povsem primerljive.

Slovenski izolat 09\_07 na podlagi analize z mikrosateliti pripada genotipu EU\_34\_A1, ki je bil v Evropi prvič uradno izoliran in zabeležen v Sloveniji v Pomurju leta 2004 (Žerjav, 2016; Janiszewska in sod., 2021; EuroBlight, 2022). Janiszewska in sod. (2021) so kasneje z gensko analizo zbirke izolatov *P. infestans* z mikrosateliti v letih od 2000 do 2014 ugotovili, da je bil genotip EU\_34\_A1 na Poljskem prisoten že leta 2002, najbolj razširjen pa je bil v letih od 2007 do 2009 ter nato še v letu 2011. V literaturi konkretnih podatkov o agresivnosti genotipa EU\_34\_A1 nismo zasledili. Med okužbo genotipov *R8* z izolatom 09\_07 smo opazili visoko sporulacijo takoj po tvorbi micelija v tkivni kulturi, vendar te lastnosti nismo kvantitativno opredelili. Janiszewska in sod. (2021) so skupno 82 izolatov *P. infestans* genotipa EU\_34\_A1 inokulirali na enajstih diferencialnih rastlinah (*MaR1* – *MaR11*). Rezultati so pokazali, da je bil genotip EU\_34\_A1 najbolj virulenten na diferencialne rastline *MaR1*, *MaR3*, *MaR4*, *MaR7*, *MaR10* in *MaR11*. Na diferencialno rastlino *MaR8* je bilo virulentnih le 21 od 82 izolatov genotipa EU\_34\_A1. Po inokulaciji genotipov *R8* v tkivni kulturi je bil slovenski izolat 09\_07 virulenten na vse genotipe *R8* z izjemo genotipa C571. Na podlagi naših rezultatov težko primerjamo ugotovitve o virulentnosti genotipa EU\_34\_A1 v raziskavi Janiszewska in sod. (2021), saj smo v okviru doktorske naloge uporabili le en izolat genotipa EU\_34\_A1, medtem ko so jih Janiszewska in sod. (2021) uporabili kar 82. Podobno kot pri slovenskem izolatu 02\_07 bi tudi v primeru izolata 09\_07 lahko dodatno inokulirali genotipe *R8* z izolati iz populacijske raziskave (Žerjav, 2016), izoliranih v istem letu, ki prav tako pripadajo genotipu EU\_34\_A1.



Izolat 09\_07, uporabljen v naši raziskavi, je bil virulenten tudi na vse občutljive starševske sorte, medtem ko je bil avirulenten na odporno starševsko sorto Sárpo Mira. Za razliko od genotipov *R8* se ta rezultat ujema z raziskavo Janiszewska in sod. (2021), kjer je bilo kar 53 izolatov genotipa EU\_34\_A1 od skupno 69 izolatov avirulentnih na sorto Sárpo Mira. Na podlagi značilnosti rasti izolata 09\_07 (hitra in visoka sporulacija) ter na podlagi srednje stopnje agresivnosti, ki smo jo določili z vrednostmi AUDPC iz ocen intenzitete simptomov, bi lahko izolat 09\_07 označili kot invaziven izolat.

Prvotna hipoteza o širjenju različnih klonalnih linij *P. infestans* je predvidevala, da imajo agresivnejše klonalne linije večjo selekcijsko prednost pred ostalimi, saj naj bi pri tekmovanju za omejeno količino gostitelja (v tem primeru krompirjeva cima) kratka latentna perioda, visoka produkcija sporangijev ter visoka stopnja rasti lezij ključno pripomogle k intenzivnejšemu širjenju agresivnih klonalnih linij (Cooke in sod., 2012). V obsežni populacijski študiji francoskih klonalnih linij *P. infestans*, opravljeni s strani Mariette in sod. (2016b), so to hipotezo ovrgli, saj se je ravno pri klonalnih linijah s srednjo ali nizko stopnjo agresivnosti z leti povečal njihov delež oz. pogostnost v populaciji. Ne glede na kazatelje visoke invazivnosti izolata 09\_07 bi morali za točno določitev invazivnosti posameznega izolata *P. infestans* (uporabljeni v doktorski nalogi), le-te natančneje kvantificirati z meritvami latentne periode, stopnje širjenja lezij, količine proizvedenih sporangijev ter kapacitete sporulacije (Mariette in sod., 2016b).

#### 5.3.1.2 Odpornost genotipov *R8* na krompirjevo plesen v primerjavi s starševskimi sortami

Gen *R8* je poznan že več desetletij iz seta enajstih diferencialnih rastlin (*MaR8*) kot vir trajne kvantitativne odpornosti na krompirjevo plesen (Swiezyński in sod., 2000; Vossen in sod., 2016). Različne raziskave virulenc izolatov *P. infestans* še danes uporabljajo diferencialne rastline za določanje rase in virulence izolatov *P. infestans*, pri čemer sta diferencialni rastlini *MaR8* in *MaR9* (obe vsebujeta gen *R8* (Kim in sod., 2012)), redko premagani (Swiezyński in sod., 2000; Haynes in sod., 2002; Zhang in Kim, 2007; Jo in sod., 2011; Vossen in sod., 2016). Gen *R8* je tako asociiran z visoko in trajnostno odpornostjo (Vossen in sod., 2016). Določene raziskave o doprinosu gena *R8* na odpornost na *P. infestans* so že bile opravljene, vendar so bili v testiranje vključeni ali transgeni organizmi (Zhu in sod., 2015; Vossen in sod., 2016) ali pa le po en genotip *R8*, ki so ga nato primerjali bodisi z diferencialno rastlino *MaR8* ali s starševsko sorto Sárpo Mira (Kim in sod., 2012).

V naši doktorski nalogi smo z namenom odbrali več genotipov *R8*, ki izhajajo iz različnih križanj med starševskimi sortami, da bi jih lahko primerjali med sabo in ugotovili, ali je doprinos gena *R8* enak ne glede na genetsko ozadje ali pa se doprinos razlikuje. Podobno

raziskavo so opravili že Jo in sod. (2011) ter Rietman in sod. (2012), kjer so v prvem primeru testirali stopnjo odpornosti F1 potomcev diferencialne rastline *MaR8*, medtem ko so v raziskavi Rietman in sod. (2012) testirali F1 potomce sorte Sárpo Mira. V obeh primerih F1 potomci niso bili analizirani z genskimi markerji in odbrani za prisotnost le posameznih genov, da bi lahko stopnjo odpornosti pripisali le genu *R8* oz. genu *Rpi-Smira2*.

Po inokulaciji genotipov *R8* v tkivni kulturi s *P. infestans* so se genotipi razlikovali v stopnji odpornosti na krompirjevo plesen tako glede na inokuliran izolat kot tudi glede na križanje, iz katerega izhajajo, pri čemer so se razlikovali tudi znotraj križanja. Glede na vrednosti POS po osmih dneh so bili vsi genotipi *R8* odporni na slovenski izolat 02\_07, medtem ko so bili na ostale tri izolate *P. infestans* (09\_07, 90128 in IPO-C) bodisi srednje odporni bodisi občutljivi.

Genotip L166 iz skupine Lusa je bil edini izmed genotipov *R8*, ki je izražal hujše simptome v primerjavi s pripadajočo občutljivo starševsko sorto Lusa v primerih izolatov 02\_07, 09\_07 in 90128, vendar je bila ta razlika statistično značilno različna le pri najmanj agresivnem izolatu 02\_07. Tovrstna razlika v izražanju simptomov med starševsko sorto in direktnim F1 potomcem je po naših podatkih unikaten pojav, saj so v primerljivi raziskavi Rietman in sod. (2012) vsi F1 potomci odporne sorte Sárpo Mira in občutljive sorte RH izražali srednje stopnje odpornosti in nobeden izmed potomcev ni izražal hujših simptomov od občutljive starševske sorte po inokulaciji z izolatom IPO-C v poljskih poskusih. Ob tem je potrebno upoštevati, da je bila sorta RH, uporabljena v raziskavi Rietman in sod. (2012), popolnoma občutljiva na izolat IPO-C, medtem ko je sorta Lusa, uporabljena v okviru doktorske naloge, sicer bila občutljiva na izolat IPO-C, vendar so bile vrednosti POS manjše v primerjavi s sortama Colomba in Sylvana, ki sta bili praktično popolnoma občutljivi. Genotip L166 je sicer po okužbi z izolatom IPO-C izražal nekoliko šibkejšo simptome v primerjavi s starševsko sorto Lusa.

Genotipa *R8* iz skupine Rioja (R7 in R15) se po inokulacijah z izolati 09\_07, 90128 in IPO-C nista statistično značilno razlikovala od pripadajoče starševske sorte Rioja. Oba genotipa in starševska sorta Rioja so bili ali srednje odporni ali pa občutljivi na omenjene izolate *P. infestans*. Starševska sorta Rioja je bila po analizi z genskimi markerji pozitivna na markerje za gena *R3a* in *R3b*, ki sta kvalitativna gena (Rietman in sod., 2012) in po okužbi s *P. infestans* vodita v hipersenzitivni odziv (Huang, 2005a). Prisotnost obeh genov *R* bi lahko vplivala na odpornostni odziv starševske sorte Rioja, s čimer bi lahko bila sorta Rioja bolj ali pa primerljivo odporna kot genotipa R7 in R15, ki imata le gen *R8/Rpi-Smira2*. Sorta Rioja je izražala šibkejšo simptome v primerjavi s starševskima sortama Colomba in Sylvana, vendar hujše simptome kot starševska sorta Lusa, za katero smo dokazali, da ne vsebuje testiranih odpornostnih genov. Na podlagi tega lahko sklepamo, da gena *R3a* in *R3b* ne prispevata ali pa prispevata zelo malo k imunskemu

odzivu sorte Rioja na izolate, uporabljene v inokulaciji tkivnih kultur. Starševska sorta Sylvana je prav tako vsebovala gen *R3b*, kar smo pokazali z analizo z genskimi markerji, vendar sta bili skupaj s sorto Colomba najbolj občutljivi starševski sorti, testirani v okviru doktorske naloge, kar nakazuje na majhen ali zanemarljiv doprinos gena *R3b*. Skupaj s sorto Rioja je sorta Sylvana izražala simptome krompirjeve plesni tudi po inokulaciji z najšibkejšim izolatom 02\_07, kljub temu da obe sorti vsebujeta *R* gene. Gena *R3a* in *R3b*, ki se nahajata znotraj lokusa *R3* na kromosomu XI (Huang, 2005a), sta bila ena izmed prvih odpornostnih genov, vključenih v introgresijo genov *R* iz divje vrste *S. demissum*. Leta 1951 so na inštitutu Scottish Plant Breeding Station, današnji inštitut James Hutton (The James Hutton Institute, 2022), razvili novo sorto Pentland Ace (Report to the Annual General Meeting, 1952), ki je vsebovala gena *R3a* in *R3b* (Armstrong in sod., 2019), vendar sta bila oba gena hitro premagana s strani *P. infestans* (Bradshaw, 2021). Gena *R3a* in *R3b* danes štejeta kot gena z omejenim razponom odpornosti oz. rasno specifično odpornostjo (Bradshaw, 2021), kar se je pokazalo tudi v naši raziskavi, saj ne posamezen gen (sorta Sylvana) ne kombinacija obeh (sorta Rioja) nista bistveno doprinesla k odpornosti proti tem štirim uporabljenim izolatom *P. infestans*.

Določeni genotipi *R8*, ki izhajajo iz skupine Colomba in Sylvana, so izražali statistično značilno višjo odpornost na krompirjevo plesen v primerjavi s pripadajočima občutljivima starševskima sortama Colomba in Sylvana. V primeru skupine Sylvana sta bila genotipa S989 in S999 statistično značilno odpornejša na izolat 09\_07 v primerjavi s sorto Sylvana, a hkrati tudi statistično značilno manj odporna v primerjavi s sorto Sárpo Mira. To nakazuje, da je gen *R8/Rpi-Smira2* doprinesel k odpornosti genotipov S989 in S999 na izolat 09\_07, vendar ta doprinos ni bil primerljiv z odpornostjo sorte Sárpo Mira, ki je izražala le hipersenzitivni odziv. Po inokulaciji s tujima izolatom 90128 in IPO-C se genotipi S859, S989 in S999 niso statistično značilno razlikovali v imunskem odzivu in so bili vsi občutljivi ali srednje odporni.

Genotip C571 iz skupine Colomba je bil edini genotip *R8*, ki je bil v primerih inokulacij s tujima izolatom 90128 in IPO-C primerljiv z odpornostjo starševske sorte Sárpo Mira. Po inokulaciji z izolatom IPO-C med genotipom C571 in sorto Sárpo Mira ni bilo statistično značilne razlike, kar bi lahko nakazovalo na primerljiv srednje odporen odziv in s tem na primerljiv doprinos gena *Rpi-Smira2/R8* v potomcu sorte Sárpo Mira. Na tej točki je potrebno poudariti, da je sorta Sárpo Mira po inokulaciji s tujima izolatom imela višje vrednosti POS in je izražala srednjo odpornost na izolata 90128 in IPO-C za razliko od ostalih raziskav, kjer je bila sorta Sárpo Mira visoko odporna na oba izolata (Kim in sod., 2012; Rietman in sod., 2012). V primeru slovenskega izolata 09\_07, kjer je sorta Sárpo Mira izražala le hipersenzitivni odziv, je genotip C571 izražal hujše simptome kot sorta Sárpo Mira in se ni statistično značilno razlikoval od genotipov C419 in C557, ki sta imela še hujše simptome. Kljub temu se je genotip C571 na podlagi vrednosti POS po inokulaciji z izolatom 09\_07 edini izmed genotipov *R8* uvrstil med odporne odzive tako

kot sorta Sárpo Mira. Čeprav je primerljiva odpornost med genotipom C571 in sorto Sárpo Mira lahko nastala kot posledica višjih vrednosti POS sorte Sárpo Mira pri izolatih 90128 in IPO-C, je genotip C571 med vsemi testiranimi genotipi *R8* imel najnižje vrednosti POS po inokulaciji z izolati 09\_07, 90128 in IPO-C, zaradi česar smo ga označili kot najbolj perspektivni genotip *R8*.

Inokulacija genotipov *R8* v tkivni kulturi je tako pokazala različen doprinos gena *Rpi-Smira2/R8* k odpornosti na krompirjevo plesen, saj se je med devetimi genotipi *R8* pokazal širok razpon stopnje odpornosti; od občutljivega odziva pri genotipu L166, ki je bil višji od pripadajoče občutljive starševske sorta Lusa, do odpornega oz. srednje odpornega odziva, ki je bil primerljiv z odporno starševsko sorto Sárpo Mira. Ti rezultati se le delno skladajo z rezultati Vossen in sod. (2016), kjer so v transgenih Desiree rastlinah z vstavljenim genom *R8* opazili razpon od srednje odpornih do polne odpornosti na izolat IPO-C. V naši raziskavi je po okužbi z izolatom IPO-C le genotip C571 izražal srednjo odpornost, skupaj s starševsko sorto Sárpo Mira. Po okužbi z ostalimi izolati smo opazili širši razpon, od občutljivih do srednje odpornih ter do odpornih odzivov na *P. infestans*. Vossen in sod. (2016) so te razlike sicer pripisali različnemu izražanju gena *R8* v transgenih rastlinah ali pa številu kopij T-DNA po transgenezi; so pa dodali, da na gen *R8* izven transgeneze zelo vpliva genetsko ozadje.

### **5.3.1 Odpornostni odziv celih rastlin genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira v rastlinjaku**

Na podlagi rezultatov okužbe s štirimi izolati *P. infestans* na genotipih *R8* v tkivni kulturi je genotip C571 imel najnižje ocene intenzitete simptomov krompirjeve plesni in je tako kazal najvišjo odpornost izmed devetih testiranih genotipov *R8*. To stopnjo odpornosti, primerljivo s starševsko sorto Sárpo Mira, smo želeli preveriti tudi na ravni cele rastline v rastlinjaku, pri čemer smo uporabili iste štiri izolate *P. infestans*. Zraven smo vključili tudi genotip C419, ki je »sokrižanec« genotipa C571 oz. pripada isti skupini genotipov z isto občutljivo starševsko sorto Colomba. Na ravni tkivnih kultur je genotip C419 izražal nekoliko hujše simptome kot genotip C571, vendar še vedno šibkejše od ostalih genotipov *R8*. Zanimalo nas je, ali se bo ta razlika med genotipoma C419 in C571 ohranila na ravni celih rastlin v rastlinjaku. Za primerjavo odpornostnih odzivov obeh genotipov smo v testiranje stopnje odpornosti s *P. infestans* vključili tudi obe starševski sorti Colomba in Sárpo Mira.

Za pripravo virulentnega inokuluma *P. infestans* smo tokrat uporabili metodo inokulacije občutljive sorte Dobrin v tkivni kulturi, ki nam je omogočila povsem sterilno pripravo inokuluma, hkrati pa smo lahko iz večjega števila preraščenih trdnih gojišč pripravili višje koncentracije sporangijev, potrebnih za pripravo večjega volumna inokuluma. Po inokulaciji smo vse rastline prekrili s PCV vrečami (Islam in sod., 2018), s katerimi smo

lažje vzdrževali visoko zračno vlago pri posamezni inokulirani rastlini ter tako omogočili optimalnejše pogoje za uspešno okužbo. Edina pomanjkljivost prekrivanja rastlin z vrečami je ta, da so oteževale vsakodnevno spremljanje razvoja simptomov krompirjeve plesni, saj se je vlaga kondenzirala na vrečah, skozi katere opazovanje ni bilo možno. Z vsakodnevnim odkrivanjem rastlin bi lahko pretirano poškodovali rastline z lomljenjem listnih pecljev, kar bi lahko vplivalo na odpornostni odziv krompirjevih rastlin.

Intenziteta povzročenih simptomov krompirjeve plesni je bila pri vseh štirih izolatih *P. infestans* primerljiva z intenziteto simptomov pri okužbah tkivnih kultur, torej je slovenski izolat 02\_07 povzročal najšibkejše simptome, drugi slovenski izolat 09\_07 je povzročal nekoliko hujše simptome, medtem ko sta oba tuja izolata povzročala najhujše simptome krompirjeve plesni in se med sabo nista bistveno razlikovala. Na tej točki ne moremo govoriti o agresivnosti izolatov, saj poteka okužbe nismo spremljali v več časovnih točkah in razen določanja ocen intenzitete povzročenih simptomov nismo spremljali drugih kvantitativnih lastnosti, ki bi opisovale agresivnost posameznega izolata (latentna perioda, produkcija sporangijev, stopnja rasti lezij) (Andrison, 1993).

Izmed štirih inokuliranih genotipov *R8* in starševskih sort je sorta Colomba pri vseh štirih izolatih izražala najhujše simptome krompirjeve plesni, pri čemer je pri okužbi z izolatom 02\_07 sorta Colomba edina izražala simptome okužbe s *P. infestans*. Genotipa C419 in C571 sta bila skupaj s starševsko sorto Sárpo Mira popolnoma odporna na izolat 02\_07, po okužbi z izolatom 09\_07 pa sta sicer izražala šibke simptome krompirjeve plesni, vendar sta bila še vedno odporna na izolat 09\_07 tako kot starševska sorta Sárpo Mira. Na tuja izolata 90128 in IPO-C sta bila oba genotipa srednje odporna in sta se po stopnji odpornosti uvrstila med občutljivo sorto Colomba in odporno sorto Sárpo Mira. Čeprav sta genotipa C419 in C571 pri okužbi v tkivnih kulturah izražala različen odpornostni odziv, ki je bil sicer statistično značilen le pri izolatu IPO-C, pri okužbi v rastlinjaku med obema genotipoma ni bilo izrazitih razlik. Ob tem je potrebno upoštevati tudi način ocenjevanja intenzitete simptomov krompirjeve plesni, saj smo lahko z lestvico ocen simptomov v tkivnih kulturah natančneje razločili tudi manjše razlike v intenziteti simptomov, medtem ko posamezna ocena na lestvici po Cruickshank in sod. (1982) vsebuje nekoliko širši razpon deležev prizadetega listnega tkiva, kar omejuje natančno razločevanje manjših razlik. Kljub temu smo uspeli z okužbo vseh štirih izolatov *P. infestans* na celih rastlinah v rastlinjaku pokazati, da genotipa C419 in C571 z genom *Rpi-Smira2/R8* izražata srednjo stopnjo odpornosti v primerjavi s starševsko sorto Sárpo Mira, ki je bila na vse štiri inokulirane izolate *P. infestans* popolnoma odporna. Slednje se ujema z nekaterimi drugimi raziskavami, kjer je bila sorta Sárpo Mira ravno tako odporna na izolata 90128 in IPO-C, vendar so bile te inokulacije opravljane v poljskih poskusih (Kim in sod., 2012; Rietman in sod., 2012). Posledično ti rezultati med sabo niso povsem primerljivi. Pri pregledu literature nismo zasledili raziskave, ki bi testirala

odpornost sorte Sárpo Mira na nivoju cele rastline v rastlinjaku z izolatoma 90128 in IPO-C.

#### 5.4 PRIMERJAVA DOPRINOSA GENA *Rpi-Smira2/R8* MED RAZLIČNIMI POGOJI INOKULACIJE

Na podlagi rezultatov okužbe genotipov C419 in C571 na nivoju celih rastlin v tkivni kulturi in rastlinjaku lahko sklepamo, da se doprinos gena *Rpi-Smira2/R8* delno ohranja med različnimi načini inokulacije.

Genotipa C419 in C571 sta bila na obeh ravneh odporna na najmanj agresiven slovenski izolat 02\_07, pri čemer smo na ravni rastlinjaka na obeh genotipih opazili le hipersenzitivni odziv. Po okužbi z drugim slovenskim izolatom 09\_07 v tkivni kulturi sta se genotipa razlikovala v stopnji odpornosti, in sicer je bil genotip C419 srednje odporen na izolat 09\_07, genotip C571 pa je bil odporen. Na ravni rastlinjaka sta oba genotipa po okužbi z izolatom 09\_07 izražala le šibke simptome krompirjeve plesni in sta bila nanj odporna. Po okužbi s tujim izolatom 90128 v tkivni kulturi sta oba genotipa izražala izrazitejšje simptome in sta bila srednje odporna na izolat 90128, kar je bilo primerljivo tudi s stopnjo odpornosti v rastlinjaku, kjer sta bila prav tako srednje odporna. Po okužbi z drugim tujim izolatom IPO-C v tkivni kulturi se je med genotipoma C419 in C571 pokazala večja razlika, saj je bil genotip C419 občutljiv na izolat IPO-C, medtem ko je bil genotip C571 srednje odporen. Ta razlika v stopnji odpornosti med genotipoma se na ravni rastlinjaka ni pokazala, saj sta bila oba genotipa srednje odporna na izolat IPO-C. V primeru genotipa C419 se stopnja odpornosti tako ni povsem ohranila med različnimi pogoji inokulacije, saj je v tkivni kulturi izražal hujše simptome kot na ravni cele rastline v rastlinjaku. Pri genotipu C571 se je stopnja odpornosti dobro ohranila, saj je bil na obeh ravneh odporen na izolat 09\_07, na oba tuja izolata 90128 in IPO-C pa je bil srednje odporen.

Občutljiva starševska sorta Colomba je na obeh ravneh izražala najhujše simptome krompirjeve plesni, vendar o ohranjanju stopnje občutljivosti med obema ravnema težko sklepamo, saj je bila v okužbo v rastlinjaku vključena le ena od štirih občutljivih starševskih sort. Na ravni tkivnih kultur je bila sorta Colomba najbolj občutljiva na okužbo s *P. infestans* v primerjavi z ostalimi občutljivimi sortami, medtem ko na ravni rastlinjaka tega ne moremo trditi, kljub temu da so bile rastline sorte Colomba močno prizadete. Po drugi strani se je pri odporni starševski sorti Sárpo Mira stopnja odpornosti le delno ohranila med obema ravnema, saj je bila na nivoju tkivnih kultur le srednje odporna na tuja izolata 90128 in IPO-C, medtem ko je bila v rastlinjaku na oba tuja izolata popolnoma odporna in je izražala le hipersenzitivni odziv. Pri okužbi s slovenskima izolatoma 02\_07 in 09\_07 se je stopnja odpornosti sorte Sárpo Mira ohranila, saj je bila tako v rastlinjaku kot tudi v tkivni kulturi odporna na oba izolata.

Na podlagi rezultatov obeh načinov inokulacije genotipov *R8* in starševskih sort s *P. infestans* tako lahko sklepamo, da se stopnja odpornosti, posredovana z genom *Rpi-Smira2/R8*, ne ohranja med različnimi načini inokulacije, kar so opazili tudi v nekaterih drugih raziskavah (Jo in sod., 2011; Kim in sod., 2012; Orłowska in sod., 2012a; Rietman in sod., 2012; Vossen in sod., 2016), vendar so obravnavali druge načine inokulacije. Da bi lahko natančneje in zanesljivejše opredelili ohranjanje stopnje odpornosti med inokulacijo tkivnih kultur in celih rastlin v rastlinjaku, bi bilo potrebno v inokulacije v rastlinjaku vključiti tudi ostale genotipe *R8*, vendar zaradi tehničnih omejitev rastlinjaka, težav pri zagotavljanju visoke zračne vlage in prostorske stiske to ni bilo možno.

V raziskavi Jo in sod. (2011) so F1 potomce diferencialne rastline *MaR8* inokulirali z izolatom IPO-C v poljskih poskusih, kjer je bila približno polovica potomcev odpornih, polovica pa občutljivih na inokuliran izolat *P. infestans*. V testih na odrezanih listih pa nobeden izmed potomcev ni izražal jasne odpornosti proti krompirjevi plesni, vendar so pri omenjeni metodi opazili slabo ponovljivost rezultatov. Diferencialna rastlina *MaR8* je bila odporna na izolat IPO-C na obeh ravneh, kar je lahko posledica prisotnosti dodatnih genov *R3a*, *R3b* in *R4* poleg gena *R8* (Kim in sod., 2012). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Kim in sod. (2012), kjer so F1 potomca (*R8-18*) diferencialne rastline *MaR8*, ki je vseboval le gen *R8*, ravno tako inokulirali z izolatom IPO-C na ravni poljskih poskusov in na ravni odrezanih krompirjevih listov. Genotip *R8-18* je bil v testih na odrezanih listih občutljiv na izolat IPO-C, medtem ko je bil v poljskih poskusih nanj odporen. Starševska diferencialna rastlina *MaR8* je bila tako kot v raziskavi Jo in sod. (2011) odporna na izolat IPO-C na obeh ravneh. Kim in sod. (2012) so genotip *R8-18* in diferencialno rastlino *MaR8* izpostavili tudi izolatu 90128, vendar le v testih na odrezanih listih, pri čemer sta bila oba občutljiva. V inokulacijske poskuse so vključili tudi diferencialno rastlino *MaR9* z dokazano prisotnostjo gena *R8*, ki je bil odporen tako na izolat 90128 v testih na odrezanih listih kot tudi na izolat IPO-C na ravni poljskih poskusov in odrezanih listov. F1 potomce diferencialne rastline *MaR8* so obravnavali tudi v raziskavi Vossen in sod. (2016), ki so jih prav tako inokulirali z izolatom IPO-C, vendar na ravni poljskih poskusov in na ravni rastne komore. Za razliko od ostalih raziskav so se stopnje odpornosti v tem primeru ohranile, saj so odporni F1 potomci v poljskih poskusih bili odporni tudi v rastnih komorah. Ohranila se je tudi stopnja odpornosti starševske diferencialne rastline *MaR8* ter transgene rastline sorte Desiree z vstavljenim genom *R8*, ki sta bili na obeh ravneh odporni na izolat IPO-C. Za razliko od ostalih raziskav so Rietman in sod. (2012) z izolatom IPO-C v poljskih poskusih in na odrezanih listih inokulirali sorto Sárpo Mira in njene F1 potomce. Hkrati so jih v testih na odrezanih listih inokulirali tudi z izolatom 90128. F1 potomci so po okužbi z izolatom 90128 na odrezanih listih izražali različne stopnje odpornosti (občutljiv, srednje odporen, odporen), medtem ko so bili vsi F1 potomci, vključno s starševsko sorto Sárpo Mira, občutljivi na izolat IPO-C v testih na odrezanih listih. V poljskih poskusov pa so F1 potomci izražali

različne stopnje odpornosti v razponu med popolnoma občutljivo starševsko sorto RH in odporno sorto Sárpo Mira.

Razlog, zakaj prihaja do takega odstopanja v stopnji odpornosti, posredovani z genom *Rpi-Smira2/R8*, med odrezanimi listi in celimi rastlinami v poljskih poskusih, medtem ko se med celimi rastlinami v poljskih poskusih in rastnih komorah stopnja odpornosti ohranja, je lahko zaradi odsotnosti koreninskega sistema in meristemov pri testih na odrezanih listih, ki ključno prispevajo k odpornosti celotne rastline, kar so v svoji raziskavi pokazali Orłowska in sod. (2012a). V obdobju med leti 2004 in 2011 so v poljskih poskusih testirali stopnjo odpornosti sorte Sárpo Mira in enajst diferencialnih rastlin (*MaR1 – MaR11*), pri čemer so bili sorta Sárpo Mira ter diferencialni rastlini *MaR8* in *MaR9*, ki vsebujeta gen *R8* (Kim in sod., 2012), popolnoma odporni na mešanico izolatov *P. infestans*. Sorto Sárpo Mira so nato dodatno inokulirali v tkivnih kulturah kot celo rastlino, rastlino brez vrhnjega poganjka, rastlino brez koreninskega sistema ter odrezane liste z ali brez stranskega poganjka. Ugotovili so, da je bil delež prizadetega rastlinskega tkiva pri rastlinah brez koreninskega sistema in z vsemi poganjki bistveno nižji kot pri obeh tipih odrezanih listov. Pri rastlinah brez vrhnjega poganjka in s koreninskim sistemom pa so bili nizki deleži prizadetih tkiv primerljivi z nizkim deležem pri celih rastlinah, s čimer so pokazali pomemben vpliv tako meristemov kot tudi koreninskega sistema pri celostni odpornosti sorte Sárpo Mira.

Na podlagi rezultatov ostalih opisanih raziskav lahko sklepamo, da se je stopnja odpornosti genotipov *R8* delno ohranila pri obeh načinih inokulacij zaradi prisotnosti tako meristemov kot koreninskega sistema v rastlinah v tkivni kulturi, torej smo na obeh ravneh inokulirali cele rastline z intaktnim odpornostnim odzivom. Čeprav tkivne kulture niso pogosto uporabljene za neposredno inokulacijo s *P. infestans*, smo v okviru doktorske naloge pokazali, da predstavljajo zanesljivo in dobro ponovljivo metodo inokulacije krompirjevih rastlin s *P. infestans* ter hkrati omogočajo vzdrževanje optimalnih pogojev za uspešno okužbo *P. infestans*. Huang in sod. (2005b) so v svoji raziskavi prvi vzpostavili neposredno inokulacijo tkivnih kultur s *P. infestans* kot dobro alternativo ostalim inokulacijskim testom, saj omogoča uporabo izenačenega ter sterilnega rastlinskega materiala. Poleg tega so v tej raziskavi tudi dokazali, da je inokulacija tkivnih kultur podala zanesljive in ponovljive rezultate, ki so bili primerljivi z metodo inokulacije na odrezanih listih. Edine pomanjkljivosti uporabe tkivnih kultur so zahteva po posebni laboratorijski opremi (brezprašna komora, rastne komore, ločenost prostorov in ohranjanje čistega laboratorijskega okolja), časovno zahteven vnos rastlinskega materiala v tkivne kulture ter omejena možna količina testiranih krompirjevih rastlin. Slednjo pomanjkljivost smo še posebej opazili pri inokulacijah *P. infestans* v okviru doktorske naloge, saj so zoospore *P. infestans* v virulentnem inokulumu viabilne le omejeno število ur, zaradi česar je potrebna skrbna časovna



organizacija pri inokulacijah večjega števila rastlin v tkivni kulturi z več različnimi izolati *P. infestans*.

Za razliko od raziskave Huang in sod. (2005b) pa so v raziskavi Verzaux in sod. (2011) po inokulacijah na tkivnih kulturah, odrezanih listih in v poljskih poskusih prišli do neujemajočih rezultatov. Po inokulaciji različnih genotipov *Solanum avilesii* z izolatom 90128 v tkivni kulturi in na odrezanih rastlinah so določeni genotipi, odporni na ravni tkivnih kultur, nato v testih na odrezanih listih izražali hujše simptome krompirjeve plesni, medtem ko so določeni občutljivi genotipi v tkivni kulturi nato na odrezanih listih izražali manj simptomov. Prav tako se stopnja odpornosti genotipov ni ohranila po inokulaciji z izolatom IPO-C v testih na odrezanih listih in v poljskih poskusih, pri čemer so genotipi v testih na odrezanih listih izražali hujše simptome. Nasprotno so se rezultati inokulacij tkivnih kultur in odrezanih listov s *P. infestans* v raziskavi Vleeshouwers in sod. (2008) med seboj ujemali. Skupina Vleeshouwers in sod. (1999) je predhodno že pokazala, da rezultati inokulacij na odrezanih listih dobro korelirajo z rezultati poljskih poskusov ter da se krompirjeve rastline na okužbo s *P. infestans* odzovejo enako ne glede na to, ali gre za poljski poskus ali za inokulacijo v rastni komori. Do podobnih zaključkov glede inokulacij v poljskih poskusih in v rastnih komorah so prišli tudi Sharma in sod. (2013) ter Jo in sod. (2015), kjer so rezultati inokulacij na ravni rastlinjaka boljše korelirali z rezultati poljskih poskusov kot rezultati inokulacij na odrezanih listih.

Nasprotno rezultati poljskih poskusov in inokulacij v rastlinjaku v raziskavi Stewart in sod. (1983) niso povsem korelirali med sabo, saj so se odporne krompirjeve sorte v rastlinjaku odrezale slabše, medtem ko so občutljive krompirjeve sorte v rastlinjaku imele boljše ocene. Najboljšo korelacijo so dosegli med rezultati zaporednih poljskih poskusov, medtem ko so rezultati zaporednih inokulacij v rastlinjaku imeli slabšo korelacijo. Stewart in sod. (1983) so te neskladnosti pripisali slabšim približkom naravnih pogojev v rastlinjaku, predvsem pri temperaturnem režimu in starosti rastlin ob inokulaciji s *P. infestans* v primerjavi s poljskimi poskusi. Posledično so predlagali, da se v primeru neskladnosti rezultatov poljskih poskusov in inokulacij v rastlinjaku upošteva rezultate poljskih poskusov, saj se v tovrstnih pogojih odpornost najboljše izraža. Raziskovalki Dorrance in Inglis (1997) sta v poljskih poskusih prav tako opazili statistično značilen vpliv starosti rastlin ob inokulaciji s *P. infestans*. Rezultati poljskih poskusov so sicer bili primerljivi z rezultati inokulacij v rastlinjaku, vendar le pri končni uvrstitvi sort v odporne, srednje odporne ali občutljive. Sicer pa sta med ponovitvami inokulacij v rastlinjaku opazili statistično značilne razlike v intenziteti simptomov krompirjeve plesni, kar nakazuje na slabo ponovljivost metode, vendar sta to variabilnost primerjali z variabilnostjo večletnih poljskih poskusov, na katere močno vplivajo sezonske razlike v okoljskih pogojih.

Dorrance in Inglis (1997) sta kljub slabši ponovljivosti rezultatov inokulacij v rastlinjaku videli določene prednosti tega načina inokulacije, predvsem za namene raziskav dedovanja odpornosti ter identifikacije potencialnih novih starševskih linij. Podobno imajo inokulacije na odrezanih listih prednosti le pri določanju posameznih komponent okužbe *P. infestans*, npr. pri določanju sposobnosti sporulacije ali učinkovitosti okužbe, vendar ne toliko pri ovrednotenju same odpornosti krompirjevih rastlin. Posledično tako inokulacije v rastlinjaku kot tudi na odrezanih listih ne morejo povsem nadomestiti zanesljivejših in izrazitejših rezultatov poljskih poskusov. Sta pa Dorrance in Inglis (1997) predlagali vključitev krompirjevih sort z znano stopnjo odpornosti ali občutljivosti na krompirjevo plesen kot standarde pri vseh načinih inokulacije *P. infestans* za lažjo določitev primerljivosti rezultatov. Prav tako so tudi v raziskavi Brouwer in sod. (2004), kjer so z inokulacijami paradižnikovih rastlin s *P. infestans* iskali regije z lokusi kvantitativne lastnosti (ang. Quantitative Trait Loci – QTL) za kvantitativno odpornost proti krompirjevi plesni, pokazali, da inokulacije v rastlinjaku in na odrezanih listih ne morejo povsem nadomestiti poljskih poskusov za določanje kvantitativne odpornosti proti krompirjevi plesni. Podobno so tudi v raziskavi Foolad in sod. (2015) inokulirali paradižnikove rastline na ravni poljskih poskusov in rastlinjaka ter rezultate primerjali z inokulacijami na odrezanih listih, pri čemer so bili simptomi na odrezanih listih intenzivnejši, vendar se niso statistično značilno razlikovali ne od rezultatov poljskih poskusov ne od rezultatov inokulacij v rastlinjaku. Foolad in sod. (2015) so tako pokazali, da rezultati inokulacij na odrezanih listih dobro korelirajo tako s poljskimi poskusi kot tudi z inokulacijami v rastlinjaku ter posledično predstavljajo učinkovito, preprosto in zanesljivo metodo za določanje stopnje odpornosti večje populacije krompirjevih rastlin. Raziskovalci inštituta James Hutton na Škotskem so poročali, da so za identifikacijo genov *R* in virulenčne lastnosti izolatov *P. infestans* pridobili zanesljivejše rezultate pri inokulacijah celih rastlin v rastlinjaku kot pri inokulacijah odrezanih listov (Bradshaw, 2021: 253).

Glede na rezultate inokulacij genotipov *R8* s *P. infestans* v okviru doktorske naloge in glede na rezultate drugih primerljivih raziskav lahko vidimo, da je potrebno za zanesljivo in natančno ovrednotenje stopnje odpornosti proti krompirjevi plesni inokulacijo s *P. infestans* opraviti na več načinov, v kolikor nam razpoložljiva infrastruktura in prostorske kapacitete to omogočajo. Hkrati pa je priporočljivo v testiranje ter določanje odpornosti krompirjevih rastlin vključiti tudi set krompirjevih sort z znano in dokazano stopnjo odpornosti kot standardne sorte, s pomočjo katerih bi lahko ocenili in določili primerljivost različnih načinov inokulacij med sabo ter posledično zanesljivost pridobljenih rezultatov.

## 5.5 IZRAŽANJE GENA *Rpi-Smira2/R8*

Na podlagi rezultatov inokulacij genotipov *R8* z inokulumom *P. infestans* v tkivni kulturi nas je zanimalo, kako se gen *Rpi-Smira2/R8* izraža po okužbi s patogenom, zato smo genotipa C419 in C571, slednji kot najbolj odporen genotip *R8*, ter starševski sorti Colomba in Sárpo Mira inokulirali z vsemi štirimi izolati *P. infestans* (02\_07, 09\_07, 90128 in IPO-C). Predvsem nas je zanimalo, kako se gen *Rpi-Smira2/R8* izraža pred pojavom s prostim očesom opaznih simptomov krompirjeve plesni ter ali se izraža konstitutivno ali po stiku s patogenom pride do spremembe v izražanju, zato smo vzorce inokuliranega listnega tkiva nabrali v treh časovnih točkah: takoj po inokulaciji ( $t_0$ ), 2 dneva po inokulaciji in 4 dneve po inokulaciji.

Po opravljeni reakciji PCR v realnem času se je izkazalo, da uporabljeni začetni oligonukleotidi niso bili primerni za spremljanje izražanja gena *Rpi-Smira2/R8*. Geni *R* kodirajo proteine NB-LRR, pri čemer je domena NB med proteini *R* dobro ohranjena, medtem ko je domena LRR zelo variabilna (Knepper in Day, 2010). Da bi lahko točno določili stopnjo izražanja gena *Rpi-Smira2/R8*, bi bilo potrebno na podlagi nukleotidnega zaporedja kodirajoče regije identificirati fragment, ki bi bil specifičen le za gen *Rpi-Smira2/R8*. Specifičnost na novo oblikovanih začetnih oligonukleotidov bi bilo potrebno testirati tudi na vzorcih drugih krompirjevih sort, ki vsebujejo gen *R8*, npr. diferencialni rastlini *MaR8* in *MaR9* ter sorti Jacqueline Lee in Missaukee (Vossen in sod., 2016) ter tudi na vzorcih krompirjevih sort, za katere je bilo dokazano, da ne vsebujejo genov *R*, npr. Bintje (Kim in sod., 2012).

Primerljivih raziskav, kjer bi spremljali izražanje gena *Rpi-Smira2/R8* po inokulaciji krompirjevih rastlin s *P. infestans*, med pregledom literature nismo zasledili. Stefańczyk in sod. (2017) so spremljali izražanje gena *Rpi-phu1* in opazili razliko v izražanju med kompatibilno (uspešna okužba) in nekompatibilno interakcijo (neuspešna okužba) *P. infestans* in krompirjevih križancev. Pri nekompatibilni interakciji se je gen *Rpi-phu1* izražal konstitutivno in je ostal na nižji ravni izražanja do zaključka spremljanja odpornostnega odziva. Ti rezultati so bili primerljivi tudi z rezultati raziskave Śliwka in Zimnoch-Guzowska (2013), kjer so ravno tako med okužbo opazili stabilno izražanje gena *Rpi-phu1* ter rezultati spremljanja izražanja gena *R3a* v raziskavi Huang in sod. (2005a), ki se je ravno tako izražal konstitutivno pri nekompatibilni interakciji. Pri kompatibilni interakciji, kjer je *P. infestans* uspešno okužila krompirjeve rastline, je izražanje gena *Rpi-phu1* po petih dneh povečala za 48× (Stefańczyk in sod., 2017). O povečanem izražanju gena *RB* pri kompatibilni interakciji so poročali tudi Kramer in sod. (2009), kjer so spremljali izražanje odpornostnih genov v transgenih krompirjevih rastlinah. Raziskovalci Śliwka in Zimnoch-Guzowska (2013) ter Kramer in sod. (2009) so pri spremljanju izražanja odpornostnih genov naleteli na zanimiv pojav, in sicer je bilo bazalno izražanje opazovanih genov *R* višje pri divjih vrstah krompirja, iz katerih so geni

izhajali, gen *Rpi-phu1* in divje vrste *S. phureja* in gen *RB* iz divje vrste *S. bulbocastanum*. Stefańczyk in sod. (2017) so v svoji raziskavi dokazali, da je na izražanje gena *Rpi-phu1* vplivalo tudi genetsko ozadje, saj so testirani genotipi izhajali iz istega križanja, vendar so se razlikovali v stopnji izražanja. Glede na to da smo tudi v okviru doktorske naloge dokazali vpliv genetskega ozadja na odpornostni odziv genotipov *R8* na krompirjevo plesen, bi morda to razliko na transkripcijski ravni opazili tudi v naših rezultatih.

## 5.6 INOKULACIJE GENOTIPOV *R8* V RASTLINJAKU IN NA ODREZANIH LISTIH Z OOMICETO *P. infestans*

### 5.6.1 Inokulacija genotipov *R8* in starševskih rastlin na ravni celih rastlin v rastlinjaku s *P. infestans*

Prve okužbe s *P. infestans* na ravni celih rastlin v rastlinjaku, kjer smo želeli testirati vseh deset genotipov *R8* skupaj s petimi pripadajočimi starševskimi sortami, nam niso uspeli. Pri določenih rastlinah smo videli posamezne simptome krompirjeve plesni, vendar večina rastlin, vključno z občutljivimi starševskimi sortami, ni kazala simptomov. Razlogi za neuspešno inokulacijo so lahko bili prenizka koncentracija virulentnih sporangijev in prenizka relativna zračna vlaga. Na tej točki smo za pripravo inokuluma *P. infestans* uporabljali rezine krompirjevih gomoljev, ki so se kasneje izkazale za precej nezanesljivo metodo zaradi prisotnosti kontaminacij in slabe rasti *P. infestans*, kljub prednostim, opisanih v poglavju 5.2.2. Posledično smo lahko pripravili le omejeno količino inokuluma, kar je lahko vplivalo na uspešno okužbo *P. infestans*. V raziskavi Brouwer in sod. (2004) so sicer uporabili primerljivo nizko koncentracijo sporangijev ( $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$  sporangijev/ml) za inokulacijo paradižnikovih rastlin v rastlinjaku, vendar je v njihovem primeru okužba s *P. infestans* uspela.

Največja tehnična omejitev, ki bi v vsakem primeru močno vplivala na izid poskusa, tudi če bi uporabili višjo koncentracijo virulentnih zoospor, je bilo vzdrževanje visoke relativne vlažnosti v zraku. Rastlinjak na Kmetijskem inštitutu Slovenije ni omogočal nadzora in vzdrževanja točne relativne zračne vlažnosti, zato smo nad rastlinami napeljali sistem, ki je meglico pršil vsako uro. Pršenje smo nastavili na 1 min, saj bi sicer lahko zoospore sprali z listne površine in onemogočili uspešno inokulacijo. Zaradi visokih temperatur v juniju in avgustu 2020 smo v rastlinjaku težko vzdrževali ustrezno visoko zračno vlago, ne da bi pri tem pretirano spirali zoospore s površin listov.

### 5.6.2 Inokulacija odrezanih krompirjevih listov genotipov *R8* in starševskih rastlin s *P. infestans*

Metoda temelji na inokulaciji odrezanih krompirjevih listov s *P. infestans*, ki jih nato inkubiramo v kontroliranih laboratorijskih pogojih in je ena najbolj uporabljenih metod za testiranje odpornosti krompirjevih genotipov, sort ali križancev na krompirjevo

plesen, saj ima številne prednosti. Iz ene krompirjeve rastline, gojene v rastlinjaku, lahko pridobimo veliko število listov in tako hkrati testiramo odpornost na več izolatov *P. infestans*. S kontroliranimi pogoji rastne komore lahko zagotovimo optimalne pogoje za uspešno okužbo s *P. infestans* in tako povečamo ponovljivost metode/rezultatov, točkovna inokulacija suspenzije zoospor *P. infestans* pa nam omogoča natančno spremljanje nastanka in razvoja simptomov krompirjeve plesni, saj vemo, kje na listni površini bo prišlo do vstopa patogena v rastlinsko tkivo (Carlisle in sod., 2002). Z merjenjem velikosti nastalih nekroz tekom inokulacije lahko pridobimo tudi podatke o hitrosti širjenja simptomov in patogena v listnem tkivu ter tako primerjamo testirane izolate *P. infestans* med sabo.

V literaturi obstaja več različic protokola inokulacije odrezanih krompirjevih listov, med katerimi je najpogosteje uporabljena metoda s postavitvijo odrezanih listov v zaprte pladnje z vlažnimi krpami za zagotavljanje visoke zračne vlažnosti (Umaerlis in Ihnell, 1976; Tooley, 1990; Swiezynski in sod., 1991; Day in Shattock, 1997; Brouwer in sod., 2004; Colon in sod., 2004; Cooke in sod., 2012; Sobkowiak in sod., 2012; Sharma in sod., 2013; Brylińska in Śliwka, 2017; Yin in sod., 2017; Elnahal in sod., 2020; Gu in sod., 2020; Monino-Lopez in sod., 2021; Sabbadin in sod., 2021). V doktorski nalogi smo uporabili metodo, opisano po Pieterse in sod. (1994) ter Vleeshouwers in sod. (1999), ki se od ostalih razlikujeta v tem, da so odrezane liste vstavili v navlažene kocke cvetlične gobe. Tako modificiran protokol nam je omogočil, da so listi ohranili svoj turgor med celotnim potekom okužbe in listi niso propadali na račun pomanjkanja vode.

Preden smo odrezane liste inokulirali s suspenzijo zoospor *P. infestans*, jih je bilo potrebno površinsko sterilizirati. Pri pregledu literature nismo zasledili omembe predhodne površinske sterilizacije, razen v primeru Sharma in sod. (2013), kjer so liste pred inokulacijo sprali s sterilno dH<sub>2</sub>O, in v primeru Raza in sod. (2021), kjer so liste sprali pod vodovodno vodo in osušili s papirnatimi brisačkami, zato smo testirali pet različnih načinov površinske sterilizacije oz. spiranja listov. Z naknadno inokulacijo suspenzije zoospor *P. infestans* smo želeli preveriti, ali smo uspešno odstranili neželene mikroorganizme in ostanke raztopine NaOCl, ki bi preprečili rast *P. infestans* po površinski sterilizaciji. Najbolj učinkovito površinsko sterilizacijo smo pričakovali pri razkuževanju z raztopino NaOCl, saj se jo pogosto uporablja pri inokulacijah odrezanih listov (Akhtar in sod., 2011; Boydom, 2015; Chethana in sod., 2017; Patial in sod., 2017; El-Mor in sod., 2018; Aregbesola in sod., 2020; Saldierna Guzmán in sod., 2020; Ahn in sod., 2021). Izkazalo se je, da sta obe uporabljeni koncentraciji raztopine NaOCl (0,5 % in 1 %) povzročili preveč poškodb na površini listnega tkiva, kar bi onemogočilo jasno razločevanje med simptomi krompirjeve plesni in poškodbami zaradi razkuževanja. Na nekaterih testiranih odrezanih listih smo na točkah inokulacije zasledili simptome krompirjeve plesni, kar pomeni, da smo v teh primerih uspešno sprali ostanke raztopine NaOCl.

Za spiranje odrezanih krompirjevih listov pred inokulacijami s suspenzijo zoospor *P. infestans* smo na podlagi testiranih metod izbrali spiranje s tekočo in sterilno vodovodno vodo. Čeprav se je izkazala za najbolj optimalno metodo odstranjevanja neželenih mikroorganizmov z listne površine, so se tekom poskusov inokulacije na odrezanih listih genotipov R8 v velikem obsegu pojavile kontaminacije. Tudi pri odrezanih listih iz skupine za negativno kontrolo (inokulacija s sterilno vodovodno vodo) so se v nekaterih primerih pojavile podobne kontaminacije, predvsem pri listih, ki so se neposredno dotikali navlaženih brisačk pod plastičnimi podstavki. O podobnih težavah je poročal že Toxopeus (1954), ki je prvi uvedel to metodo. Sprva je inokulirane odrezane lističe postavil neposredno na navlažene krpe v kovinskih pladnjih in kmalu opazil prezgodnje propadanje lističev zaradi tesnega stika z vlažnimi krpami. Lističe je nato s kovinskimi iglami pričvrstil na leseni okvir, položen na navlažene krpe v pladnju, vendar so tudi v tem primeru nekateri lističi propadli, saj je lesen okvir vpil vlago iz krp. Težavo s propadanjem listov je nato rešil z uporabo kositrne mreže, ki je lističe popolnoma ločila od navlaženega lesa.

Predhodna toplotna sterilizacija uporabljenega materiala (cvetlična goba, plastični podstavki, papirnate brisačke) ni bistveno pripomogla k zmanjšanju pojava kontaminacij, zato je bilo potrebno protokol inokulacije odrezanih listov modificirati. V literaturi smo zasledili protokol, kjer so namesto pladnjev uporabili steklene ali plastične petrijevke z navlaženimi papirnatimi brisačkami, s katerimi so vsak testiran odrezan list lahko ločeno inokulirali s suspenzijo zoospor *P. infestans* ter tudi ločeno inkubirali v rastnih komorah (Kuhl in sod., 2001; Samen in sod., 2003; Zoteyeva in sod., 2014; Chen in sod., 2017a, 2017b; Sedlák in sod., 2017; Najdabbasi in sod., 2020). Čeprav bi že s to modifikacijo lahko omejili širjenje kontaminacij le na nekaj posameznih listov, namesto na celoten pladenj, smo bili glede uporabe navlaženih papirnatih brisačk skeptični, saj smo predvidevali, da je to naš vir kontaminacij.

Nekoliko manj razširjena modifikacija protokola inokulacije odrezanih listov je inokulacija odrezanih posamičnih lističev v t. i. vodnih komorah, kjer lističe položimo v narobe obrnjene plastične petrijevke z vodnim agarjem nad lističi za zagotavljanje vlage (Tooley in sod., 1986; Spielman in sod., 1989; Wenzel in Foroughi-Wehr, 1990; Legard in sod., 1995; Dorrance in Inglis, 1997; Kato in sod., 1997; Ordonez in sod., 1997, 1998; Mizubuti in Fry, 1998; van Raaij in sod., 2007; Halterman in sod., 2010; Li in sod., 2012; Mariette in sod., 2016a, 2016b; Ah-Fong in sod., 2017). Prednost uporabe vodnih komor je predvsem v popolni sterilnosti uporabljenega materiala, z izjemo rastlinskega, in inokulacije v sterilnem okolju brezprašne komore, kar pri inokulacijah v pladnjih ni bilo mogoče. Glede na rezultate smo predvidevali, da je pojav kontaminacij pogojen z visoko vlažnostjo, saj so se kontaminacije pojavile v večjem obsegu kot pri prvem uporabljenem protokolu. Poleg tega pa pri lističih, inokuliranih s sterilno vodo (negativna kontrola),

kontaminacij nismo zaznali, zato smo predvidevali, da sam rastlinski material ni potencialni vir kontaminacij.

Z uporabo plastičnih petrijevk brez vodnega agarja smo zračno vlago močno znižali, vlažnost listne površine pa omejili le na kapljo inokulirane suspenzije zoospor *P. infestans*. S tem smo zelo učinkovito odpravili kontaminacije, saj jih med testno inokulacijo nismo zasledili niti znotraj inokulacijskih kapljic, čeprav odrezanih lističev pred testno inokulacijo nismo površinsko sterilizirali. Znižanje zračne vlage v petrijevkah je hkrati imelo zavirajoč učinek na rast in širjenje *P. infestans*. Med testno inokulacijo smo opazili simptome krompirjeve plesni, saj je inokulacijska kaplja v prvih urah inkubacije priskrbelo potrebno vodno okolje za uspešen prodor zoospor *P. infestans* (Hartill in sod., 1990), vendar so se širili bistveno počasneje kot pri klasični inokulaciji odrezanih listov in so se le v posameznih primerih razširili izven dimenzij inokulacijske točke. Posledično nismo mogli zanesljivo izmeriti in ovrednotiti hitrosti širjenja krompirjeve plesni na odrezanih lističih. Oomiceta *P. infestans* za razvoj sporangioforov in sporangijev potrebuje visoko zračno vlago ali pa visoko stopnjo vlažnosti listnega tkiva (Becktell in sod., 2005; Fry, 2008), zato tudi po enem tednu po inokulaciji *P. infestans* na odrezanih listih z izrazitimi simptomi krompirjeve plesni nismo zasledili pojava sporangijev.

Z inokulacijo posameznih lističev z dodanimi koščki vodnega agarja smo želeli ubrati srednjo pot med pretirano vlažnostjo listne površine, ki omogoča hitro širjenje kontaminacij, in dovolj visoko zračno vlago v petrijevki za uspešno rast in sporulacijo *P. infestans*. Dodani koščki vodnega agarja niso zadostno pripomogli k dvigu relativne zračne vlage, saj so se simptomi v večini primerov zaustavili na ravni manjših lokalnih nekroz in se je *P. infestans* le v redkih primerih razširila izven dimenzij inokulacijske točke in uspešno sporulirala. Kljub suhi listni površini so se tako izven kot tudi znotraj inokulacijskih točk pojavile kontaminacije, ki so ponovno onemogočile zanesljivo ovrednotenje širjenja simptomov krompirjeve plesni.

Inokulacija odrezanih listov je zelo razširjena metoda za testiranje odpornosti rastlin na različne rastlinske patogene (Akhtar in sod., 2011; Boydom, 2015; Chethana in sod., 2017; Patial in sod., 2017; El-Mor in sod., 2018; Aregbesola in sod., 2020; Saldierna Guzmán in sod., 2020), saj omogoča hitro in obsežno testiranje rastlinskih genotipov, sort ali križancev na več izolatov ali sevov patogena vzporedno. Kljub validiranosti in razširjenosti metode so se nam v okviru doktorske naloge pokazale tudi pomanjkljivosti uporabe odrezanih listov, predvsem visoka variabilnost v odzivu listnega tkiva na inokulacijo s *P. infestans*. Znotraj ponovitev genotipov R8 smo tako zaznali širok razpon v odzivu na inokulacijo; od hitrega propadanja celotnega lista do povsem zdravega listnega tkiva. Simptomi, ki so se pojavili na listnem tkivu in so sprva izgledali kot krompirjeva plesen, so se ob natančnem pregledu pod stereomikroskopom izkazali za

dvoumne, saj so kontaminacije pogosto rastle znotraj inokulacijskih točk, s čimer so jemale prostor *P. infestans*. Kljub različnim modifikacijam protokola, ki smo jih zasledili v literaturi, je problem kontaminacij ostal. S testno inokulacijo brez vlage smo pokazali, da je odsotnost zračne vlage ključna za zaviranje rasti kontaminacij, a hkrati zavira tudi rast *P. infestans*. Namesto točkovne inokulacije suspenzije zoospor *P. infestans* bi lahko protokol dodatno modificirali in s pršilkami inokulirali celotno površino odrezanih listov ali lističev (Stewart, 1990; Kuhl in sod., 2001; van Raaij in sod., 2007; Andrivon in sod., 2011; Zhu in sod., 2015; Bryliška in Śliwka, 2017). Na ta način bi povečali uspešnost okužbe s *P. infestans* in zmanjšali pojav kontaminacij, saj bi jim s tem odvzeli prostor. Sicer ne bi mogli spremljati velikosti in širjenja lezij ter s tem pridobiti podatkov o hitrosti širjenja krompirjeve plesni kot pri točkovnih inokulaciji, vendar bi na ta način pridobili vsaj osnovne podatke o odpornosti genotipov *R8* na *P. infestans* v testih na odrezanih listih. O pomanjkljivostih metode inokulacije odrezanih listov so poročali le Pristou in Gallegly, (1956), Goodwin in sod. (1995) ter Jo in sod. (2011). Pristou in Gallegly (1956) sta v preliminarnih raziskavah inokulacij na odrezanih krompirjevih listih ugotovila, da je metoda premalo zanesljiva, medtem ko so Goodwin in sod. (1995) ter Jo in sod. (2011) poročali o težavah s ponovljivostjo metode, pri čemer so Goodwin in sod. (1995) to rešili s ponovitvami poskusov, dokler niso pridobili konsistentnih rezultatov. Wenzel in Foroughi-Wehr (1990) sta, glede na pridobljene rezultate inokuliranih odrezanih listov, zaključila, da bi bilo za pridobitev zanesljivih in natančnih rezultatov o stopnji odpornosti testiranih rastlin potrebno vključiti 100 ponovitev uniformnih odrezanih listov, kar bi občutno povečalo tako časovno kot delovno zahtevnost in sama metoda ne bi bila več praktična.

### 5.6.3 Izvor kontaminacij

Zaradi obsežnih težav s kontaminacijami tako pri inokulacijah v rastlinjaku kot tudi na odrezanih listih nas je poleg njihovega izvora zanimalo tudi, s katerimi rodovi gliv smo imeli opravka. Glede na to da je bila priprava inokuluma *P. infestans* pri obeh načinih inokulacije v celoti opravljena v sterilnem okolju brezprašne komore s pomočjo sorte Dobrin v tkivni kulturi ter so bila vsa uporabljena preraščena trdna gojišča z micelijem *P. infestans* pregledana pod stereomikroskopom pred uporabo, smo predvidevali, da je vir kontaminacij lahko bil bodisi rastlinski material bodisi komora oz. prostor, v katerem je okužba s *P. infestans* potekala.

Z nastavljanjem odprtih trdnih gojišč PDA, ki se splošno uporabljajo za gojenje gliv (Black, 2020) v rastlinjaku in vseh uporabljenih rastnih komorah, smo želeli preveriti prisotnost mikroorganizmov v zraku, na podlagi morfoloških lastnosti zrastle mikroorganizmov na trdnem gojišču pa smo jih želeli tudi primerjati s kontaminacijami, prisotnimi med okužbo rastlin s *P. infestans*. Dodatni korak so bili tudi odtisi lističev rastlin v rastlinjaku pred inokulacijo s *P. infestans*, s katerimi smo prav tako želeli



preveriti, kateri mikroorganizmi se nahajajo na listni površini, v kolikšnem številu ter ali se ujemajo s kontaminacijami, ki smo jih opazili pri inokulacijah rastlin v rastlinjaku in na odrezanih listih, saj so le-ti ravno tako izhajali iz rastlinjaka.

Ugotovili smo, da je bilo v rastni komori IZR (IZR Škofja Loka, Slovenija) prisotnih zelo malo mikroorganizmov, saj je bila večina trdnih gojišč prazna, medtem ko se je le na dveh gojiščih pojavila posamezna kolonija, ki smo jo na podlagi morfoloških značilnosti micelija in sporangioforov pod stereomikroskopom identificirali kot glivo, pripadajočo rodu *Cladosporium*. V drugi komori je bilo posameznih kolonij na trdnih gojiščih več, prisotne so bile na vseh nastavljenih gojiščih, vendar so za razliko od prve rastne komore prisotne le glive rodu *Penicillium*. Nasprotno je bilo na trdnih gojiščih PDA iz rastlinjaka prisotnih bistveno več kolonij na vseh nastavljenih gojiščih in so vsebovale tako glive rodu *Penicillium* kot tudi rodu *Cladosporium*, v redkih primerih pa smo zasledili tudi glive rodu *Fusarium*. Primerjava slik kontaminacij, ki smo jih opazili tako pri okužbi rastlin v rastlinjaku kot tudi pri okužbi odrezanih listov, s slikami kolonij, zrastleh na trdnih gojiščih PDA, je pokazala, da je v primeru kontaminacij šlo za glive rodu *Penicillium* in *Cladosporium*. Na podlagi teh rezultatov smo sklepali, da je rastlinjak poglaviti vir neželenih kontaminacij z glivami, saj sta bila v rastlinjaku prisotna oba rodova gliv v velikem številu. Ker smo odrezane liste za inokulacijo pridobili iz krompirjevih rastlin, gojenih v rastlinjaku, smo te kontaminacije nato prenesli tudi v laboratorij, kjer jih kljub površinskemu spiranju nismo uspeli odstraniti. Izvor kontaminacij smo potrdili tudi z odtisi lističev na trdna gojišča PDA pred inokulacijo rastlin v rastlinjaku, saj je na gojišču zrastle veliko število kolonij gliv rodu *Penicillium*, *Cladosporium* in v redkejših primerih tudi glive rodu *Fusarium*. Pod stereomikroskopom smo na podlagi morfoloških lastnosti micelija in sporangijev lahko identificirali le rod zrastleh gliv. Za bolj natančno določanje in identifikacijo posameznih vrst gliv bi bilo potrebno posamezne kolonije izolirati s selektivnimi gojišči ter opraviti tudi vizualni pregled hif, sporangioforov in sporangijev pod svetlobnim mikroskopom. Najbolj zanesljivo identifikacijo posameznih vrst gliv pa bi lahko opravili s pomočjo molekulskih tehnik (Gherbawy in Voigt, 2010), vendar je bilo za namene določanja izvora kontaminacij in njihovega vpliva na rast in širjenje *P. infestans* v listnem tkivu dovolj identificirati rod zrastleh kontaminacij oz. gliv tekom inokulacijskih poskusov.

Glive rodu *Penicillium* in rodu *Cladosporium* so vsesplošno prisotne v različnih okoljih (Altaf in sod., 2018) in v različnih klimatskih pogojih (Pepeljnjak in Šegvic, 2003) ter jih med drugim lahko najdemo v rastlinjakih (Rodolfi in sod., 2003; Punja in sod., 2019), v skladiščih (Chatterton in sod., 2012), na sveži zelenjavi (Tournas, 2005), v zračnikih (Wilson in sod., 2007) in celo na Mednarodni vesoljski postaji (ang. International Space Station – ISS) (Novikova in sod., 2006). Splošno gledano so glive rodu *Penicillium* poznane kot razkrojevalke organskega materiala (Frisvad in Samson, 2004), nekatere vrste pa lahko proizvajajo različne mikotoksine (Frisvad in sod., 2004). Glive rodu

*Penicillium* imajo lahko tudi endofitski odnos z rastlinami (Srinivasan in sod., 2020), kar pomeni, da kolonizirajo zdravo rastlinsko tkivo inter- in/ali intracelularno, pri čemer ne povzročajo vidnih znakov ali bolezenskih simptomov (Nair in Padmavathy, 2014), lahko pa delujejo tudi antagonistično na določene rastlinske patogene, npr. pepelnata plesen (Kiss, 2003; Alam in sod., 2011) in sprožijo odpornostni odziv v rastlini (Hossain in sod., 2007). Tudi med glivami rodu *Cladosporium* lahko najdemo endofitske vrste, ki prav tako same po sebi ne poškodujejo rastlinskega tkiva (Räut in sod., 2021). Oba rodova gliv proizvajata veliko število spor, ki se širijo po zraku in dobro rastejo v pogojih z visoko zračno vlago (Rodolfi in sod., 2003), posledično jih pogosto najdemo v rastlinjakih (Punja in sod., 2019). To se sklada z našimi rezultati zrastleh kolonij na nastavljenih trdnih gojiščih v rastlinjaku, saj so bile glive rodu *Penicillium* in *Cladosporium* prisotne v največjem številu.

Na trdnih gojiščih PDA z odtisi lističev pred inokulacijo s *P. infestans* smo opazili, da je po odtisih spodnjih strani lističev zrastle bistveno manjše število kolonij kot pri odtisih zgornjih strani lističev. To razliko v številu zrastleh kolonij smo pripisali manjši izpostavljenosti spodnjih strani lističev prosto gibljivim sporam v zraku v rastlinjaku, zato so na svoji listni površini vsebovale manjše število spor. Te razlike niso bistveno vplivale na kasnejšo odsotnost oz. prisotnost kontaminacij po inokulaciji odrezanih listov s *P. infestans*, saj smo inokulacije vedno opravljali na spodnji (abaksialni) strani lističev, kontaminacije pa so se kljub temu pojavile.

Na koncu nas je tudi zanimalo, ali bi lahko spore omenjenih rodov gliv sprali z listne površine oz. ali bi jih odstranili s površinsko sterilizacijo listov, zato smo testirali enake metode površinskega spiranjeaz. sterilizacije, kot smo jih uporabili v preliminarnih testih razkuževanja pri odrezanih listih pred inokulacijo s *P. infestans*. Po površinskem spiranju oz. sterilizaciji lističev smo le-te odtisnili na trdna gojišča PDA (zgornjo in spodnjo stran lističev) ter po nekaj dneh primerjali število zrastleh kolonij z odtisi nerazkuženih lističev. Le površinska sterilizacija z raztopino NaOCl (0,5 % in 1,0 %) je imela konkreten dezinfekcijski učinek, saj so bila trdna gojišča po odtisih prazna ali pa so vsebovala le posamezne kolonije. Kakršno koli spiranje s sterilno ali tekočo vodo ali kombinacijo obeh je imelo le minimalen učinek na zmanjšanje števila spor gliv na listni površini, saj se število kolonij ni bistveno razlikovalo od odtisov nerazkuženih lističev. Prisotnost kontaminacij po okužbi tako celih listov kot posameznih lističev s *P. infestans* lahko pripišemo neučinkovitemu spiranju spor z listne površine. Na podlagi teh rezultatov bi tako za visoko učinkovito površinsko sterilizacijo listne površine morali uporabiti raztopino NaOCl, vendar kot smo opazili pri preliminarnih testiranjih različnih metod površinske sterilizacije odrezanih listov, sta obe koncentraciji raztopine NaOCl močno poškodovali listno tkivo.

Z določitvijo rodu zrastlih kolonij gliv na trdnih gojiščih PDA smo tako uspešno identificirali tudi kontaminacije, zaradi katerih inokulacije odrezanih listov *P. infestans* niso uspele, po okužbi rastlin v rastlinjaku pa so močno ovirale potrditev uspešne okužbe s *P. infestans*. Po pregledu literature o glivah rodu *Penicillium* in *Cladosporium* smo ugotovili, da gre za splošno prisotne glive, katerih spore se zelo učinkovito lahko širijo po zraku in lahko vplivajo na rast rastlin v rastlinjaku (Punja in sod., 2019). Ker so posmezne vrste gliv znotraj obeh rodov poznane tako kot razkrojevalci organskega materiala (saprofiti) kot tudi kot endofiti v rastlinskem tkivu, smo zaključili, da same kontaminacije med okužbo s *P. infestans* niso neposredno vplivale na rast in širjenje krompirjeve plesni, temveč so le razkrajale nekrotično tkivo, ki je nastalo kot posledica nekrotične faze *P. infestans*. V primerih okužb rastlin z agresivnimi tujimi izolati je bila pogostost kontaminacij precej višja, saj sta izolata 90128 in IPO-C povzročala hude nekrotične simptome na rastlinah, s čimer sta omogočila rast saprofitov. Ta zaključek potrjuje tudi dejstvo, da na rastlinah oz. na listih, ki smo jih inokulirali z avtoklavirano vodovodno vodo za negativno kontrolo, nismo zasledili nobenih kontaminacij, saj je listno tkivo v obeh primerih ostalo nepoškodovano in zdravo, zaradi česar glive niso prodrle v listno tkivo oz. niso mogle razgraditi nekrotičnega tkiva. Visoka zračna vlaga, ki smo jo morali vzdrževati za uspešno okužbo *P. infestans* tako v rastlinjaku kot tudi pri inokulaciji odrezanih listov, je hkrati omogočila tudi izrazito širjenje gliv rodu *Penicillium* in *Cladosporium*, ki za svojo rast potrebujejo visoko zračno vlago (Rodolfi in sod., 2003). Posledično je po inokulaciji rastlin s *P. infestans* in po razširitvi simptomov krompirjeve plesni potrebno uspešno okužbo, torej pojav micelija in sporangijev *P. infestans*, dokazati s pregledom okuženega rastlinskega materiala pod svetlobnim mikroskopom ali stereomikroskopom.

## 6 SKLEPI

V doktorski disertaciji smo želeli preučiti doprinos gena *Rpi-Smira2/R8*, ki izhaja iz odporne sorte Sárpo Mira, k odpornosti krompirja na oomiceto *Phytophthora infestans*, za kar smo najprej morali pridobiti populacijo potomcev odporne sorte Sárpo Mira, ki so izmed petih odpornostnih genov vsebovali le gen *Rpi-Smira2/R8*.

Z ročnimi križanji med petimi občutljivimi starševskimi sortami Rioja, Lusa, Colomba, Bikini in Sylvana smo pridobili F1 populacijo križancev, izmed katerih smo s pomočjo genskih markerjev uspešno odbrali manjšo populacijo F1 križancev, ki so vsebovali gen *Rpi-Smira2/R8*, prisotnost gena *R4* pa ni bila potrjena. Z modificirano metodo efektorske agroinfiltracije na odrezanih krompirjevih listih smo uspešno odbrali deset F1 križancev, ki so vsebovali le gen *Rpi-Smira2/R8*, ter jih poimenovali genotipi *R8*.

Zaradi izgube virulence izolatov *P. infestans*, do katere lahko pride zaradi predolgotrajnega vzdrževanja izolatov na trdnih gojiščih, smo morali pred inokulacijami genotipov *R8* vsem uporabljenim izolatom *P. infestans* vzbuditi virulenco z inokulacijo občutljivega rastlinskega materiala. Testirali smo več v literaturi uporabljenih metod vzbuditve virulence *P. infestans*, vendar so se zaradi svojih pomanjkljivosti izkazale za nezanesljive. Posledično smo na podlagi ovir in opaženih slabosti razvili novo metodo vzbuditve virulence izolatov *P. infestans*: suspenzijo zoospor smo popršili na krompirjeve rastline občutljive sorte v tkivni kulturi. Po pojavu s prostim očesom vidnega micelija s sporangiji smo preraščene liste predstavili na trdna ržena gojišča. Preraščena trdna ržena gojišča smo nato uporabili kot vir virulentnega inokuluma za testiranje stopnje odpornosti genotipov *R8*.

Zaradi zapletov pri inokulacijah genotipov *R8* na ravni celih rastlin v rastlinjaku in v testih na odrezanih krompirjevih listih smo se poslužili redko uporabljene metode inokulacije krompirjevih rastlin v tkivni kulturi. Z njimi smo lahko celoten postopek inokulacije genotipov *R8* s *P. infestans* opravili v popolnoma sterilnem okolju: od priprave virulentnega inokuluma s tkivnimi kulturami do priprave sterilnega rastlinskega materiala ter nanosa virulentnega inokuluma na krompirjeve rastline v tkivni kulturi. Poleg tega so tkivne kulture omogočile najbolj optimalne okoljske pogoje za uspešno okužbo *P. infestans*, predvsem visoka stopnja relativne zračne vlage, ki se je izkazala za ključen pogoj uspešne okužbe. Hkrati smo za namen natančne določitve odpornostnega odziva genotipov *R8* na različno agresivne izolate *P. infestans* razvili osemstopenjsko lestvico intenzitet simptomov krompirjeve plesni, ki smo jo opremili z reprezentativnimi slikami znakov okužbe.

Inokulacijo genotipov *R8* smo uspešno opravili na dveh ravneh, in sicer na rastlinah v tkivni kulturi in, v sicer manjšem obsegu, na ravni celih rastlin v rastlinjaku, kjer smo pri

slednjem uspešno vzdrževali visoko stopnjo relativne zračne vlage ter tako vzpostavili potrebne pogoje za uspešen prodor patogena v rastlinsko tkivo.

Glede na doslej zbrano znanje o doprinosu gena *Rpi-Smira2/R8* smo si v okviru doktorske disertacije zastavili tri hipoteze, ki smo jih z opravljenim raziskovalnim delom naslovili:

- 1) Rastline *R8*, razvite iz križanja med odporno sorto Sárpo Mira in občutljivimi sortami, bodo izražale odpornost proti oomiceti *Phytophthora infestans*.

Na podlagi rezultatov inokulacij genotipov *R8* z oomiceto *P. infestans* hipotezo v celoti potrjujemo, saj so genotipi *R8* izražali manj simptomov v primerjavi s pripadajočimi občutljivimi starševskimi sortami. Čeprav te razlike niso bile statistično značilne pri vseh genotipih *R8*, so določeni genotipi *R8* izražali statistično značilno višjo odpornost tudi po inokulaciji z agresivnimi izolati. Najbolj izrazite razlike med genotipi *R8* in starševskimi sortami so se pokazale po inokulaciji s srednje agresivnim slovenskim izolatom 09\_07. Genotip C571 je imel izmed vseh testiranih genotipov *R8* v tkivni kulturi najvišjo odpornost na krompirjevo plesen, ki je bila najbolj primerljiva z odpornostjo starševske sorte Sárpo Mira. Genotipa C419 in C571 sta izražala odpornost na *P. infestans* tudi po inokulaciji v rastlinjaku, ki se je tudi statistično značilno razlikovala od občutljive starševske sorte Colomba.

- 2) Rastline *R8* bodo izražale manjši nivo odpornosti v primerjavi s starševskim genotipom Sárpo Mira.

Zastavljeno hipotezo v celoti potrjujemo, saj so genotipi *R8* izražali več simptomov krompirjeve plesni v primerjavi s starševsko sorto Sárpo Mira, ne glede na inokuliran izolat *P. infestans*. Čeprav so genotipi *R8* vsebovali gen *Rpi-Smira2/R8*, ki naj bi najbolj prispeval k visoki odpornosti sorte Sárpo Mira, smo uspeli pokazati, da samo gen *Rpi-Smira2/R8* ne uspe doseči te visoke stopnje odpornosti, kar nakazuje na pomemben vpliv ostalih *R* genov, ki so prisotni v sorti Sárpo Mira. Genotip C571 je bil edini izmed genotipov *R8* s stopnjo odpornosti, najbližji sorti Sárpo Mira po inokulaciji z izolati 09\_07, 90128 in IPO-C, pri čemer je bil ta približek najbolj reprezentativen pri izolatu 09\_07, saj se je za tuja agresivna izolata izkazalo, da nista najbolj primerna za uporabo v raziskavah stopnje odpornosti na *P. infestans* zaradi intenzivnosti nastalih simptomov.

- 3) Odpornost rastlin *R8* se bo razlikovala glede na pogoje, pod katerimi bomo okuževali rastline s krompirjevo plesnijo; test odrezanih listov, cele rastline v rastlinjaku, poljski poskusi.

Zastavljeno hipotezo lahko le delno potrdimo, saj inokulacij genotipov *R8* s *P. infestans* nismo uspeli opraviti pod vsemi zastavljenimi pogoji. Pri inokulaciji genotipov *R8* na

odrezanih listih nismo uspeli pridobiti ponovljivih in zanesljivih rezultatov o stopnji odpornosti genotipov *R8* na krompirjevo plesen, saj je prisotnost kontaminacij močno ovirala vrednotenje simptomov in razvoja bolezni. Kljub ponovitvam poskusov in modificiranju protokolov pojava kontaminacij nismo uspeli preprečiti. Namesto inokulacij na odrezanih listih smo genotipe *R8* inokulirali v tkivnih kulturah, ki so omogočile sterilno okolje in optimalne pogoje za razvoj simptomov krompirjeve plesni. Na podlagi rezultatov inokulacij tkivnih kultur smo za inokulacije v rastlinjaku odbrali manjše število genotipov *R8*, ki so izražali višje stopnje odpornosti na *P. infestans*, saj smo zaradi tehničnih omejitev poskuse inokulacije lahko opravili le na manjšem številu rastlin. Rezultati inokulacij genotipov *R8* na tkivnih kulturah in v rastlinjaku so pokazali, da se v primeru odbranih genotipov C419 in C571 stopnja odpornosti ohranja med pogoji inokulacije, saj sta oba izražala višjo stopnjo odpornosti v primerjavi z občutljivo starševsko sorto Colomba in hkrati nižjo stopnjo odpornosti v primerjavi z odporno starševsko sorto Sárpo Mira. Nasprotno pa smo pri odporni sorti Sárpo Mira potrdili dognanja ostalih primerljivih raziskav, saj se je stopnja odpornosti sorte Sárpo Mira razlikovala glede na to, ali smo inokulirali celo rastlino v rastlinjaku ali v tkivni kulturi. Po inokulaciji z agresivnima tujima izolatom 90128 in IPO-C v tkivni kulturi je sorta Sárpo Mira izražala srednje odporen odziv, pri čemer smo opazili micelij in sporangije *P. infestans*, medtem ko je bila sorta Sárpo Mira na oba tuja izolata v rastlinjaku popolnoma odporna in je izražala le hipersenzitivni odziv.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) spada med razhudnikovke (Solanaceae) in je ena najbolj razširjenih poljščin na svetu, vendar pridelavo krompirja močno ogroža krompirjeva plesen, ki jo povzroča oomiceta *Phytophthora infestans*. Vzgoja proti krompirjevi plesni odpornih sort je pomemben način preprečevanja okužb in širjenja krompirjeve plesni. Sorta Sárpo Mira še danes velja za eno najbolj odpornih sort, saj je med drugim odporna tudi na agresivne izolate (White in Shaw, 2010; Tomczyńska in sod., 2014; Abuley in Hansen, 2022). Sárpo Mira vsebuje štiri kvalitativne *R* gene, *R3a*, *R3b*, *R4* in *Rpi-Smira1* ter en kvantitativni *R* gen, *Rpi-Smira2* (Rietman in sod., 2012), pri čemer je bilo za slednjega dokazano, da naj bi najbolj prispeval k visoki stopnji odpornosti sorte Sárpo Mira.

Iz ročnih križanj med petimi občutljivimi krompirjevih sortami (Rioja, Lusa, Colomba, Bikini in Sylvana) in odporno sorto Sárpo Mira smo pridobili populacijo rastlin F1 križancev, izmed katerih smo želeli pridobiti le križance, ki od petih genov *R* iz starševske sorte Sárpo Mira vsebujejo le gen *Rpi-Smira2/R8*. Z uporabo genskih markerjev smo opravili postopno negativno selekcijo, kjer smo odbrali le križance, negativne na gene *R3a*, *R3b* in *Rpi-Smira1*, oz. v primeru gena *Rpi-Smira2/R8* križance, pozitivne na prisotnost gena. Na podlagi »gen-za-gen« interakcije med proteini R in efektorskimi proteini smo se za določitev prisotnosti gena *R4* poslužili metode efektorske agroinfiltracije. Odbrali smo le rastline, ki niso izražale hipersenzitivnega odziva ter tako pridobili končno populacijo desetih genotipov *R8*, ki smo jih vnesli in vzdrževali v tkivnih kulturah kot vir rastlinskega materiala za eksperimentalno delo.

Uporabili smo štiri izolate *P. infestans* (02\_07, 09\_07, 90128 in IPO-C), ki so se razlikovali po geografskem izvoru. Zaradi dokazane zmanjšane sposobnosti okužbe po dolgotrajnem vzdrževanju na trdnih gojiščih smo vse uporabljene izolate inokulirali na občutljiv rastlinski material pred uporabo v inokulacijskih poskusih genotipov *R8*. Testirali smo dve splošno uporabljene metodi vzbuditve virulence, inokulacijo odrezanih krompirjevih listov in inokulacijo rezin krompirjevih gomoljev. Pri obeh metodah so se pokazale določene pomanjkljivosti, predvsem z zagotavljanjem sterilnosti in zanesljivosti samih metod. Posledično smo razvili novo metodo vzbuditve virulence *P. infestans* z inokulacijo občutljive krompirjeve sorte Dobrin v tkivni kulturi in prestavljanjem z micelijem preraščenenih listov na trdna ržena gojišča z antibiotiki, ki smo jih nato uporabili kot vir virulentnega inokuluma *P. infestans* za različne načine inokulacije genotipov *R8*.

Genotipe *R8* v tkivni kulturi smo posadili v rastlinjak, kjer smo namnožili rastlinski material za inokulacijo s *P. infestans* na ravni celih rastlin v rastlinjaku ter za pridobitev

materiala za inokulacijo odrezanih krompirjevih listov. Zaradi tehničnih težav inokulacija genotipov *R8* z inokulumom *P. infestans* ni uspela, saj smo kljub uporabi meglilnega sistema težko zagotovili visoko stopnjo relativne zračne vlage, ki je ključna za uspešen prodor *P. infestans* v rastlinsko tkivo. Pri inokulacijah odrezanih listov genotipov *R8* smo v redkih primerih opazili tipičen razvoj in širjenje simptomov krompirjeve plesni, vendar so bili rezultati znotraj ponovitev genotipov *R8* zelo variabilni, dodatno težavo pa so nam povzročale tudi kontaminacije, ki so se pogosto razvile znotraj inokulacijskih točk ter motile natančno in zanesljivo določitev intenzitete simptomov krompirjeve plesni.

Genotipe *R8* smo nato inokulirali na ravni tkivnih kultur skupaj s starševskimi sortami, ki so nam služile kot kontrole občutljivega oz. odpornega odziva na krompirjevo plesen ter s katerimi smo pripadajoče genotipe *R8* lahko primerjali. Za natančno določitev intenzitete simptomov krompirjeve plesni in spremljanja poteka okužbe s *P. infestans* smo razvili lestvico ocen intenzitete simptomov krompirjeve plesni, s katero smo vsakodnevno genotipom *R8* in starševskim sortam določili ocene širjenja bolezni. Tuja izolata 90128 in IPO-C sta povzročala najhujše simptome in sta bila najbolj agresivna, medtem ko sta se slovenska izolata 02\_07 in 09\_07 statistično značilno razlikovala od tujih izolatov ter med sabo. Izolat 02\_07 je povzročal najšibkejše simptome, čeprav pripada genotipu EU\_13\_A2 (Žerjav, 2016), znanemu po svoji agresivnosti. Genotipi *R8* so se v svojem odpornostnem odzivu razlikovali med sabo, saj so nekateri izmed njih imeli statistično značilno manj izrazite simptome krompirjeve plesni v primerjavi s pripadajočimi občutljivimi starševskimi sortami, vendar se je to najbolj izrazito pokazalo po inokulaciji s srednje agresivnim slovenskim izolatom 09\_07, saj sta oba tuja izolata 90128 in IPO-C pri vseh inokuliranih rastlinah povzročila hude simptome krompirjeve plesni. Najvišjo stopnjo odpornosti je izražal genotip C571, ki se je po inokulacijah z izolati 09\_07, 90128 in IPO-C statistično značilno razlikoval od občutljive starševske sorte Colomba in izražal primerljivo intenziteto simptomov kot odporna sorta Sárpo Mira.

Na podlagi rezultatov inokulacij genotipov *R8* na ravni tkivnih kultur smo ponovili poskus inokulacije na ravni celih rastlin v rastlinjaku v manjšem obsegu. Genotipa C419 in C571 ter starševski sorti Colomba in Sárpo Mira smo inokulirali z istimi izolati *P. infestans* (02\_07, 09\_07, 90128, IPO-C) ter vsako rastlino po inokulaciji zavili v PVC vrečo za zagotavljanje visoke relativne zračne vlage. Po dveh tednih smo s pregledom krompirjevih listov z znaki okužbe pod stereomikroskopom potrdili uspešno okužbo *P. infestans*. Slovenski izolat 02\_07 je tako kot pri inokulacijah na ravni tkivnih kultur tudi v rastlinjaku povzročal najšibkejše simptome. Sledil mu je drugi slovenski izolat 09\_07, tuja izolata 90128 in IPO-C pa sta ponovno povzročila najhujše simptome. Pri slovenskih izolatih je simptome krompirjeve plesni izražala le občutljiva starševska sorta Colomba, medtem ko sta bila genotipa C419 in C571 odporna na oba slovenska izolata. Po inokulaciji tujih izolatov *P. infestans* je občutljiva starševska sorta Colomba izražala hude simptome krompirjeve plesni, medtem ko sta se genotipa C419 in C571 po izraženi



stopnji odpornosti uvrstila med obe starševski sorti in sta izražala srednjo odpornost. Starševska sorta Sárpo Mira je po inokulacijah vseh izolatov *P. infestans*, tudi tujih agresivnih, izražala le hipersenzitivni odziv in je bila popolnoma odporna na vse izolate *P. infestans*.

S testiranjem stopnje odpornosti genotipov *R8* na različno agresivne izolate *P. infestans* smo pokazali, da gen *Rpi-Smira2/R8* do določene mere doprinese k odpornosti krompirja proti krompirjevi plesni ter da na to odpornost vpliva genetsko ozadje, saj so se genotipi *R8*, čeprav so vsi vsebovali isti gen *R* odporne starševske sorte Sárpo Mira, med sabo razlikovali v odpornostnem odzivu tudi znotraj istega križanja. Prav tako smo pokazali, da so genotipi *R8* izražali nižjo stopnjo odpornosti proti krompirjevi plesni v primerjavi z odporno starševsko sorto Sárpo Mira. Izjema je bil le genotip C571, ki je po inokulaciji s tujima izolatoma 90128 in IPO-C v tkivni kulturi izražal primerljivo srednjo stopnjo odpornosti kot sorta Sárpo Mira, vendar sta na tej ravni oba izolata uspešno okužila sorto Sárpo Mira, saj sta v nekaterih primerih tudi sporulirala. Z inokulacijo genotipov C419 in C571 ter starševskih sort Colomba in Sárpo Mira na ravni celih rastlin v rastlinjaku pa smo pokazali, da se odpornost, posredovana z genom *Rpi-Smira2/R8*, ne izraža enako glede na različni način inokulacije. Genotip C571 je na obeh ravneh izražal srednje odporen ali odporen odziv, medtem ko je odpornost genotipa C419 na ravneh tkivnih kultur variirala med občutljivo in srednjo stopnjo, na ravni rastlinjaka pa je variirala med srednjo in odporno stopnjo. V primeru starševske sorte Sárpo Mira pa smo potrdili ugotovitve drugih raziskav, kjer se je odpornost sorte Sárpo Mira razlikovala glede na način inokulacije, saj je v naši raziskavi srednje oz. odporna na *P. infestans* na ravni tkivnih kultur, medtem ko je bila na vse inokulirane izolate na ravni celih rastlin v rastlinjaku popolnoma odporna.

Raziskave doprinosa gena *Rpi-Smira2/R8* k odpornosti proti krompirjevi plesni in pridobljeni rezultati v okviru doktorske naloge tako predstavljajo dodaten vpogled v mehanizem odpornosti kvantitativnih genov, kot je *Rpi-Smira2/R8*, ter ključne nove razvite in vzpostavljene metode inokulacij in spremljanja razvoja krompirjeve plesni na ravni tkivnih kultur za natančno določitev in opredelitev stopnje odpornosti testiranih krompirjevih križancev in sort. Prav tako naše raziskave dodatno potrjujejo uporabo sorte Sárpo Mira kot pomemben vir trajne odpornosti širokega spektra v žlahtniteljskih programih za razvoj novih elitnih krompirjevih sort, ki bodo pripomogle k zmanjšanju uporabe kemičnih sredstev in trajnostnemu razvoju kmetijstva.

## 7.2 SUMMARY

Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) belong to the Solanaceae family and are one of the most widely grown crops in the world, but potato production is severely threatened by late blight caused by the oomycete *Phytophthora infestans*. Breeding cultivars resistant to late blight is an important way to prevent infection and the spread of late blight. The cultivar Sárpo Mira is still considered one of the most resistant cultivars, as it is also resistant to aggressive isolates (White and Shaw, 2010; Tomczyńska et al., 2014; Abuley and Hansen, 2022). Sárpo Mira contains four qualitative *R* genes, *R3a*, *R3b*, *R4*, and *Rpi-Smira1*, and one quantitative *R* gene, *Rpi-Smira2* (Rietman et al., 2012), the latter of which has been shown to be the main contributor to the high resistance of Sárpo Mira.

From manual crosses between five susceptible potato cultivars (Rioja, Lusa, Colomba, Bikini, and Sylvana) and the resistant cultivar Sárpo Mira, we obtained a population of F1 hybrids, from which we aimed to obtain only hybrids containing only the *Rpi-Smira2/R8* gene of the five *R* genes of the parent cultivar Sárpo Mira. Using genetic markers, we performed a stepwise negative selection, selecting only progeny negative for the *R3a*, *R3b*, and *Rpi-Smira1* genes. In the case of the *Rpi-Smira2/R8* gene, progeny that were positive for the presence of this gene were selected. Based on the "gene-by-gene" interaction between R proteins and effector proteins, we used effector agroinfiltration methods to determine the presence of the *R4* gene. We selected only plants that did not express the hypersensitive response, resulting in a final population of ten *R8* genotypes that we introduced and maintained in tissue culture as a source of plant material for experimental work.

We used four *P. infestans* isolates (02\_07, 09\_07, 90128, and IPO-C) that differed by their geographic origin. Because of the demonstrated reduced infectivity after long-term storage on solid media, all isolates used were inoculated onto susceptible plant material prior to use in the inoculation experiments of the *R8* genotypes. We tested two common methods for inducing virulence, inoculation of cut potato leaves and inoculation of slices of potato tubers. Both methods had certain shortcomings, especially in ensuring sterility and reliability of the methods themselves. Therefore, we developed a new method for inducing virulence of *P. infestans* by inoculating the susceptible potato cultivar Dobrin in tissue cultures and transferring the mycelium-covered leaves to solid rye culture media containing antibiotics, which were then used as a source of virulent inoculum of *P. infestans* for inoculation of *R8* genotypes at different levels.

*R8* genotypes in tissue culture were grown in a greenhouse, where we propagated plant material for inoculation of whole plants in the greenhouse with *P. infestans* and to obtain material for inoculation of detached potato leaves. Due to technical problems, inoculation of *R8* genotypes with *P. infestans* failed because, despite the use of a misting system, it

was difficult to maintain high relative humidity, which is critical for successful penetration of *P. infestans* into plant tissue. During inoculations on detached leaves of genotype *R8*, we observed the typical development and spread of late blight symptoms in rare cases. However, results within replicates of genotype *R8* were highly variable, and additional problems were caused by contamination that often developed within inoculation points and interfered with accurate and reliable determination of the intensity of late blight symptoms.

The *R8* genotypes were then inoculated in tissue culture along with parent cultivars that served as controls for susceptibility or resistance to late blight and with which we could compare the progeny of the *R8* genotypes. To accurately determine late blight symptom intensity and monitor progression of *P. infestans* infection, we also developed a late blight symptom intensity rating scale that allowed us to determine disease spread for the *R8* genotype and parent cultivars on a daily basis. Foreign isolates 90128 and IPO-C caused the worst symptoms and were the most aggressive, while Slovenian isolates 02\_07 and 09\_07 were statistically significantly different from the foreign isolates and from each other. Isolate 02\_07 caused the weakest symptoms, although it belongs to genotype EU\_13\_A2 (Žerjav, 2016), which is known for its aggressiveness. The *R8* genotypes differed in their resistance response, as some of them showed statistically significantly less pronounced late blight symptoms compared to the corresponding susceptible parent cultivars. However, this was most evident after inoculation with the moderately aggressive Slovenian isolate 09\_07, as both the foreign isolates 90128 and IPO-C caused severe late blight symptoms in all inoculated plants. The highest level of resistance was exhibited by genotype C571, which was statistically significantly different from the susceptible parent cultivar Colomba after inoculation with isolates 09\_07, 90128, and IPO-C and showed comparable symptom intensity to the resistant cultivar Sárpo Mira.

Based on the results of inoculating *R8* genotypes in tissue culture, we repeated the inoculation experiment at the whole-plant level in the greenhouse on a smaller scale. Genotypes C419 and C571 and parent cultivars Colomba and Sárpo Mira were inoculated with the same isolates of *P. infestans* (02\_07, 09\_07, 90128, IPO-C) and each plant was wrapped in a plastic bag after inoculation to ensure high relative humidity. After two weeks, we confirmed successful infection with *P. infestans* by examining potato leaves that showed signs of infection under a stereomicroscope. Slovenian isolate 02\_07 caused the weakest symptoms in the greenhouse, as it did in the tissue culture inoculations. It was followed by the second Slovenian isolate 09\_07, while the foreign isolates 90128 and IPO-C again caused the worst symptoms. Of the Slovenian isolates, only the susceptible parental cultivar Colomba showed late blight symptoms, while genotypes C419 and C571 were resistant to both Slovenian isolates. After inoculation of foreign isolates of *P. infestans*, the susceptible parental cultivar Colombo showed severe late blight symptoms, while genotypes C419 and C571 ranked between the two parental cultivars in terms of

the resistance level and showed intermediate resistance. The parent cultivar Sárpo Mira showed only hypersensitive reaction after inoculation with all isolates of *P. infestans*, including the aggressive foreign isolates, and was completely resistant to all isolates of *P. infestans*.

By testing the level of resistance of *R8* genotypes to different aggressive *P. infestans* isolates, we showed that the *Rpi-Smira2/R8* gene contributes to some extent to late blight resistance in potato and that this resistance is influenced by genetic background, because the *R8* genotypes, although they all contained the same *R* gene from the resistant parental cultivar Sárpo Mira, responded differently to resistance even within the same cross. We also showed that the *R8* genotypes had lower resistance to potato blight compared to the resistant parent cultivar Sárpo Mira. The only exception was genotype C571, which had a comparable intermediate level of resistance to the Sárpo Mira cultivar after inoculation with the foreign isolates 90128 and IPO-C in tissue culture, but at this level both isolates successfully infected the Sárpo Mira cultivar as they also sporulated in some cases. By inoculating genotypes C419 and C571 and the parent cultivars Colombo and Sárpo Mira at the whole-plant level in the greenhouse, we showed that the resistance mediated by the *Rpi-Smira2/R8* gene was not uniformly expressed at the different levels of inoculation. Genotype C571 showed an intermediate or resistant response at both levels, whereas resistance of genotype C419 varied between susceptible and intermediate at the tissue culture level and between intermediate and resistant at the greenhouse level. For the parent cultivar Sárpo Mira, we confirmed the results of other studies in which its resistance varied according to the level of inoculation, as it was intermediate or resistant to *P. infestans* at the tissue culture level in our study, whereas it was completely resistant to all inoculated isolates at the whole-plant level in the greenhouse.

Thus, the study of the contribution of the gene *Rpi-Smira2/R8* to late blight resistance and the results obtained in this dissertation provide additional insight into the resistance mechanism of quantitative genes such as *Rpi-Smira2/R8* and the main newly developed and established methods for inoculating and monitoring late blight development at the tissue culture level to accurately determine and define the resistance level of the tested potato hybrids and cultivars. In addition, our research confirms the use of the Sárpo Mira variety as an important source of durable broad-spectrum resistance in breeding programs for the development of new elite potato varieties that will help reduce the use of chemical inputs and promote more sustainable agricultural development.

## 8 VIRI

- Abuley I. K., Hansen J. G. 2022. Characterization of the Level and Type of Resistance of Potato Varieties to Late Blight ( *Phytophthora infestans* ). *Phytopathology*, 112, 9: 1917-1927
- Ah-Fong A. M. V., Kim K. S., Judelson H. S. 2017. RNA-seq of life stages of the oomycete *Phytophthora infestans* reveals dynamic changes in metabolic, signal transduction, and pathogenesis genes and a major role for calcium signaling in development. *BMC Genomics*, 18, 1: 198-219
- Ahn E., Fan F., Magill C. 2021. Effect of Leaf Age, Leaf Segments and Surface Treatments on Pathogenicity Levels of *Colletotrichum sublineola* in Sorghum and Johnson Grass. *Crops*, 1: 111-117
- Akhtar K.P., Sarwar N., Saleem M.Y., Asghar M. 2011. *Convolvulus arvensis*, a new host for *Alternaria solani* causing early blight of *Solanum lycopersicum* in Pakistan. *Australasian Plant Disease Notes*, 6: 84-86
- Alam S.S., Sakamoto K., Inubushi K. 2011. Biocontrol efficiency of Fusarium wilt diseases by a root-colonizing fungus *Penicillium* sp. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57: 204-212
- Al-Kherb S. M., Fininsa C., Shattock R. C., Shaw D. S. 1995. The inheritance of virulence of *Phytophthora infestans* to potato. *Plant Pathology*, 44: 552-562
- Altaf M. M., Imran M., Abulreesh H. H., Khan M. S. A., Ahmad I. 2018. Diversity and Applications of *Penicillium* spp. in Plant-Growth Promotion. V: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Gupta V. K., Rodriguez-Couto S. (ur.). Elsevier B. V.: 261-276
- Andersen K., Ospina-Giraldo M. D. 2011. Assessment of the Effect of Temperature on the Late Blight Disease Cycle Using a Detached Leaf Assay. *Journal of the Pennsylvania Academy of Science*, 85: 165-173
- Anderson J. P., Gleason C. A., Foley R. C., Thrall P. H., Burdon J. B., Singh K. B. 2010. Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Functional Plant Biology*, 37, 6: 499-512
- Andreu A., Tonon C., Damme M. V., Huarte M., Daleo G. 1998. Effect of glucans from different races of *Phytophthora infestans* on defense reactions in potato tuber. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 777-783
- Andrivon D. 1993. Nomenclature for Pathogenicity and Virulence: The need for Precision. *Phytopathology*, 83: 889-890

- Andrivon D. 1994. Dynamics of the survival and infectivity to potato tubers of sporangia of *Phytophthora infestans* in three different soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 945-952
- Andrivon D., Avendaño-Córcoles J., Cameron A. M., Carnegie S. F., Cooke L. R., Corbière R., Detourné D., Dowley L. J., Evans D., Forisekova K., Griffin D. G., Hannukkala A., Lees A. K., Lebecka R., Niepold F., Polgar Z., Shaw D. S., Thompson J., Trognitz B., van Raaij H. M. G., Zimnoch-Guzowska E. 2011. Stability and variability of virulence of *Phytophthora infestans* assessed in a ring test across European laboratories: Virulence ring test for *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 60: 556-565
- Aregbesola E., Ortega-Beltran A., Falade T., Jonathan G., Hearne S., Bandyopadhyay R. 2020. A detached leaf assay to rapidly screen for resistance of maize to *Bipolaris maydis*, the causal agent of southern corn leaf blight. *European Journal of Plant Pathology*, 156: 133-145
- Armstrong M. R., Vossen J., Lim T. Y., Hutten R. C. B., Xu J., Strachan S. M., Harrower B., Champouret N., Gilroy E. M., Hein I. 2019. Tracking disease resistance deployment in potato breeding by enrichment sequencing. *Plant Biotechnology Journal*, 17: 540-549
- Balint-Kurti P. 2019. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, 20, 8: 1163-1178
- Ballvora A., Ercolano M. R., Weiss J., Meksem K., Bormann C. A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. 2002. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *The Plant Journal*, 30: 361-371
- Banerjee A. K., Prat S., Hannapel D.J. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Science*, 170: 732-738
- Becktell M. C., Daughtrey M. L., Fry W. E. 2005. Temperature and Leaf Wetness Requirements for Pathogen Establishment, Incubation Period, and Sporulation of *Phytophthora infestans* on *Petunia × hybrida*. *Plant Disease*, 89: 975-979
- Behnke M. 1979. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 55: 69-71
- Behnke M. 1980. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theoretical and Applied Genetics*, 56: 151-152
- Beketova M. P., Chalaya N. A., Zoteyeva N. M., Gurina A. A., Kuznetsova M. A., Armstrong M., Hein I., Drobyazina P. E., Khavkin E. E., Rogozina E. V. 2021.

Combination Breeding and Marker-Assisted Selection to Develop Late Blight Resistant Potato Cultivars. *Agronomy*, 11: 2192-2207

- Beninal L., Bouznad Z., Corbière R., Belkhiter S., Mabon R., Taoutaou A., Keddad A., Runno-Paurson E., Andrivon D. 2022. Distribution of major clonal lineages EU\_13\_A2, EU\_2\_A1, and EU\_23\_A1 of *Phytophthora infestans* associated with potato late blight across crop seasons and regions in Algeria. *Plant Pathology*, 71: 458-469
- Bhaskar P. B., Venkateshwaran M., Wu L., Ané J.-M., Jiang J. 2009. *Agrobacterium*-Mediated Transient Gene Expression and Silencing: A Rapid Tool for Functional Gene Assay in Potato. *PLoS ONE*, 4: e5812, doi.org/10.1371/journal.pone.0005812: 8 str.
- Bhatia S. K., Young R. J. 1985. Reaction of potato tuber slices to *Phytophthora infestans* in relation to physiological age. *American Potato Journal*, 62: 471-478
- Birch P. R., Boevink P. C., Gilroy E. M., Hein I., Pritchard L., Whisson S. C. 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 373-379
- Birch P. R. J., Armstrong M., Bos J., Boevink P., Gilroy E. M., Taylor R. M., Wawra S., Pritchard L., Conti L., Ewan R., Whisson S. C., van West P., Sadanandom A., Kamoun S. 2009. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1133-1140
- Birch P. R. J., Bryan G., Fenton B., Gilroy E. M., Hein I., Jones J. T., Prashar A., Taylor M. A., Torrance L., Toth I. K. 2012. Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable? *Food Security*, 4: 477-508
- Birhman R. K., Singh B. P. 1995. Path-coefficient analyses and genetic parameters of the components of field resistance of potatoes to late blight. *Annals of Applied Biology*, 127: 353-362
- Black W., Mastenbroek C., Mills W. R., Peterson L. C. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica*, 2: 173-179
- Black W. D. 2020. A comparison of several media types and basic techniques used to assess outdoor airborne fungi in Melbourne, Australia. *PLOS ONE*, 15: e0238901, doi.org/10.1371/journal.pone.023890: 25 str.
- Boller T., Felix G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 379-406

- Bostock R. M., Kuč J. A., Laine R. A. 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*, 212: 67-69
- Boyd A. 2015. Evaluation of Detached Leaf Assay for Assessing Leaf Rust (*Puccinia triticina* Eriks.) Resistance in Wheat. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 4, 5: e1000176, doi.org/10.4172/2157-7471.1000176: 4 str.
- Bradshaw J. E., Bryan G. J., Lees A. K., McLean K., Solomon-Blackburn R. M. 2006. Mapping the *R10* and *R11* genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present in the potato (*Solanum tuberosum*) *R*-gene differentials of Black. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 744-751
- Bradshaw J. E., Dale M. F. B., Mackay G. R. 2009. Improving the yield, processing quality and disease and pest resistance of potatoes by genotypic recurrent selection. *Euphytica*, 170: 43-46
- Bradshaw J. E. 2021. *Potato Breeding: Theory and Practice*. Springer: 569 str.
- Brouwer D. J., Jones E. S., Clair D. A. S. 2004. QTL analysis of quantitative resistance to *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato and comparisons with potato. *Genome*, 47: 475-492
- Brown C. R., Culley D., Yang C.-P., Durst R., Wrolstad R. 2005. Variation of Anthocyanin and Carotenoid Contents and Associated Antioxidant Values in Potato Breeding Lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 174-180
- Brylińska M., Śliwka J. 2017. Laboratory Assessment of Potato Resistance to *Phytophthora Infestans*. *Plant Breeding and Seed Science*, 76: 17-23
- Callaway E. 2018. EU law deals blow to CRISPR crops. *Nature*, 560: 16-16
- Carlisle D. J., Cooke L. R., Watson S., Brown A. E. 2002. Foliar aggressiveness of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* on detached leaflets of three potato cultivars. *Plant Pathology*, 51: 424-434
- Caten C. E., Jinks J. L. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Canadian Journal of Botany*, 46: 329-348
- Cerato C., Manici L. M., Borgatti S., Alicchio R., Ghedini R., Ghinelli A. 1993. Resistance to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) of potato plants regenerated from *in vitro* selected calli. *Potato Research*, 36: 341-351
- Chatterton S., Wylie A. C., Punja Z. K. 2012. Fruit infection and postharvest decay of greenhouse tomatoes caused by *Penicillium* species in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34: 524-535



- Chen S., Borza T., Byun B., Coffin R., Coffin J., Peters R., Wang-Pruski G. 2017. DNA Markers for Selection of Late Blight Resistant Potato Breeding Lines. *American Journal of Plant Sciences*, 8: 1197-1209
- Chen Y., Halterman D. A. 2017. Determination of virulence contribution from *Phytophthora infestans* effector IPI-O4 in a resistant potato host containing the *RB* gene. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100: 30-34
- Chen X., Lewandowska D., Armstrong M. R., Baker K., Lim T.-Y., Bayer M., Harrower B., McLean K., Jupe F., Witek K., Lees A. K., Jones J. D., Bryan G. J., Hein I. 2018. Identification and rapid mapping of a gene conferring broad-spectrum late blight resistance in the diploid potato species *Solanum verrucosum* through DNA capture technologies. *Theoretical and Applied Genetics*, 131: 1287-1297
- Chethana K. W. T., Zhou Y., Zhang W., Liu M., Xing Q. K., Li X. H., Yan J. Y., Chethana K. W. T., Hyde K. D. 2017. *Coniella vitis* sp. nov. Is the Common Pathogen of White Rot in Chinese Vineyards. *Plant Disease*, 101: 2123-2136
- Cheong J. J., Birberg W., Fügedi P., Garegg P. J., Hong N., Ogawa T., Hahn M. G. 1991. Structure-Activity Relationship of Oligo- $\beta$ -glucoside Elicitors of Phytoalexin Accumulation in Soybean. *The Plant Cell*, 3: 127-136
- Chowdappa P., Kumar N. B. J., Madhura S., Kumar M. S. P., Myers K. L., Fry W. E., Squires J. N., Cooke D. E. L. 2013. Emergence of 13\_A2 Blue Lineage of *Phytophthora infestans* was Responsible for Severe Outbreaks of Late Blight on Tomato in South-West India. *Journal of Phytopathology*, 161: 49-58
- Collins A., Milbourne D., Ramsay L., Meyer R., Chatot-Balandras C., Oberhagemann P., Jong W. D., Gebhardt C., Bonnel E., Waugh R. 1999. QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Molecular Breeding*, 5: 387-398
- Colon L. T., Turkensteen L. J., Prummel W., Budding D. J., Hoogendoorn J. 1995. Durable resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in old potato cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 101: 387-397
- Colon L., Nielsen B., Darsow U., Lees R. A., Lees A. 2004. Detached leaf test for foliage blight resistance. Euroblight Protocol. Euroblight.  
<https://agro.au.dk/forskning/internationale-platforme/euroblight/protocols> (21. maj 2022)
- Colton L. M., Groza H. I., Wielgus S. M., Jiang J. 2006. Marker-Assisted Selection for the Broad-Spectrum Potato Late Blight Resistance Conferred by Gene *RB* Derived from a Wild Potato Species. *Crop Science*, 46: 589-594
- Cooke D. E. L., 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. A. A., Birch P. R. J., Lees A. K., Kamoun S. 2012. Genome Analyses of an Aggressive and Invasive Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen. *PLoS Pathogens*, 8: e1002940, doi.org/10.1371/journal.ppat.1002940: 14 str.
- Cruickshank G., Stewart H. E., Wastie R. L. 1982. An illustrated assessment key for foliage blight of potatoes. *Potato Research*, 25: 213-214
- Cui H., Tsuda K., Parker J. E. 2015. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 487-511
- Dangl J. L., Jones J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826-833
- Davidse L. C., Looijen D., Turkensteen L. J., Wal D. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 65-68
- 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
- Dey T., Saville A., Myers K., Tewari S., Cooke D. E. L., Tripathy S., Fry W. E., Ristaino J. B., Guha Roy S. 2018. Large sub-clonal variation in *Phytophthora infestans* from recent severe late blight epidemics in India. *Scientific Reports*, 8: 4429-4441
- Direktiva 2001/18/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 12. marca 2001 o namernem sproščanju gensko spremenjenih organizmov v okolje in razveljavitvi Direktive Sveta 90/220/EGS. 2001. Evropski Parlament.  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02001L0018-20210327&from=en> (3. sept. 2022)
- Dolničar P., Rudolf Piliš K. 2012. Genska Banka In Žlahtnjenje Krompirja V Sloveniji / Gene Bank and Potato Breeding in Slovenia. *Acta agriculturae Slovenica*, 99: 377-386
- Domazakis E., Lin X., Aguilera-Galvez C., Wouters D., Bijsterbosch G., Wolters P. J., Vleeshouwers V. G. A. A. 2017. Effectoromics-Based Identification of Cell Surface Receptors in Potato. V: *Plant Pattern Recognition Receptors, Methods in Molecular Biology*. Shan L., He P. (ur.), New York Springer: 337-353
- Dorrance A. E., Inglis D. A. 1997. Assessment of Greenhouse and Laboratory Screening Methods for Evaluating Potato Foliage for Resistance to Late Blight. *Plant Disease*, 81: 1206-1213
- Dorrance A. E., Inglis D. A. 1998. Assessment of Laboratory Methods for Evaluating Potato Tubers for Resistance to Late Blight. *Plant Disease*, 82: 442-446

- 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
- Du J., Rietman H., Vleeshouwers V. G. A. A. 2014. Agroinfiltration and PVX Agroinfection in Potato and *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Visualized Experiments*, e50971, doi.org/10.3791/50971: 7 str.
- Duan Y., Duan S., Armstrong M. R., Xu J., Zheng J., Hu J., Chen X., Hein I., Li G., Jin L. 2020. Comparative Transcriptome Profiling Reveals Compatible and Incompatible Patterns of Potato Toward *Phytophthora infestans*. *Genes Genomes Genetics*, 10: 623-634
- Dufková H., Berka M., Greplová M., Shejbalová Š., Hampejsová R., Luklová M., Domkářová J., Novák J., Kopačka V., Brzobohatý B., Černý M. 2021. The Omics Hunt for Novel Molecular Markers of Resistance to *Phytophthora infestans*. *Plants*, 11: e61, doi.org/10.3390/plants11010061: 17 str.
- Dzyubenko N. I. 2018. Vavilov's Collection of Worldwide Crop Genetic Resources in the 21st Century. *Biopreservation and Biobanking*, 16: 377-383
- Eckardt N. A. 2002. Plant Disease Susceptibility Genes? *The Plant Cell*, 14: 1983-1986
- EFSA. 2012. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal*, 10: 2561-2594
- Elina O., Heim S., Roll-Hansen N. 2005. Plant Breeding on the Front: Imperialism, War, and Exploitation. *Osiris*, 20: 161-179
- El-Mor I. M., Fowler R. A., Platz G. J., Sutherland M. W., Martin A. 2018. An Improved Detached-Leaf Assay for Phenotyping Net Blotch of Barley Caused by *Pyrenophora teres*. *Plant Disease*, 102: 760-763
- Elnahal A. S. M., Li J., Wang X., Zhou C., Wen G., Wang J., Lindqvist-Kreuzer H., Meng Y., Shan W. 2020. Identification of Natural Resistance Mediated by Recognition of *Phytophthora infestans* Effector Gene *Avr3aEM* in Potato. *Frontiers in Plant Science*, 11: e919, doi.org/10.3389/fpls.2020.00919: 12 str.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. Minnesota, APS Press: 562 str.
- EuroBlight 2022. Genotype Frequency Chart, EuroBlight.  
<https://agro.au.dk/forskning/internationale-platforme/euroblight/pathogen-monitoring/genotype-frequency-chart/> (3. maj 2022)
- FAOSTAT 2022. Crops and livestock products. FAOSTAT.  
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (3. maj 2022)

- Fawke S., Doumane M., Schornack S. 2015. Oomycete Interactions with Plants: Infection Strategies and Resistance Principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79: 263-280
- Flier W. G., Turkensteen L. J., Van Den Bosch G. B. M., Vereijken P. F. G., Mulder A. 2001. Differential interaction of *Phytophthora infestans* on tubers of potato cultivars with different levels of blight resistance. *Plant Pathology*, 50: 292-301
- Flier W. G., Grünwald N.J., Kroon L. P. N. M., Sturbaum A. K., van den Bosch T. B. M., Garay-Serrano E., Lozoya-Saldaña H., Fry W. E., Turkensteen L. J. 2003. The Population Structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of Central Mexico Suggests Genetic Differentiation Between Populations from Cultivated Potato and Wild *Solanum* spp. *Phytopathology*, 93: 382-390
- Flor H. H. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296
- Foolad M. R., Sullenberger M. T., Ashrafi H. 2015. Detached-Leaflet Evaluation of Tomato Germplasm for Late Blight Resistance and Its Correspondence to Field and Greenhouse Screenings. *Plant Disease*, 99: 718-722
- Forbes G. A., Perez W., Andrade-Piedra J. 2014. Field assessment of resistance in potato to *Phytophthora infestans*: International cooperators guide. International Potato Center; 40 str.  
<https://doi.org/10.4160/9789290604402> (3. sept. 2022)
- Frisvad J. C., Samson R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49: 1-174
- Frisvad J. C., Smedsgaard J., Larsen T. O., Samson R. A. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49: 201-241
- Fry W. E. 1978. Quantification of General Resistance of Potato Cultivars and Fungicide Effects for Integrated Control of Potato Late Blight. *Phytopathology*, 68: 1650-1655
- Fry W. E., Goodwin S. B., Matuszak J. M., Spielman L. J., Milgroom M. G., Drenth A. 1992. Population Genetics and Intercontinental Migrations of *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology* 30, 107-130
- Fry W. E. 1993. Historical and Recent Migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathways, and Implications. *Plant Disease*, 77: 653-661
- Fry W. E. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and *R* gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 9: 385-402

- Fry W. E., Patev S. P., Myers K. L., Bao K., Fei Z. 2019. *Phytophthora infestans* Sporangia Produced in Culture and on Tomato Leaflet Lesions Show Marked Differences in Indirect Germination Rates, Aggressiveness, and Global Transcription Profiles. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32: 515-526
- Gebhardt C., Ritter E., Barone A., Debener T., Walkemeier B., Schachtschabel U., Kaufmann H., Thompson R. D., Bonierbale M. W., Ganal M. W., Tanksley S. D., Salamini F. 1991. RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 49-57
- Gebhardt C., Valkonen J. P. T. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 79-102
- Gebhardt C., Ballvora A., Walkemeier B., Oberhagemann P., Schüler K. 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding*, 13: 93-102
- Gherbawy Y., Voigt K. (Eds.) 2010. *Molecular Identification of Fungi*. Springer Berlin Heidelberg: 511 str.
- Ghislain M., Trognitz B., Herrera Ma. del R., Solis J., Casallo G., Vásquez C., Hurtado O., Castillo R., Portal L., Orrillo M. 2001. Genetic loci associated with field resistance to late blight in offspring of *Solanum phureja* and *S. tuberosum* grown under short-day conditions: *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 433-442
- Ghislain M., Spooner D. M., Rodríguez F., Villamón F., Núñez J., Vásquez C., Waugh R., Bonierbale M. 2004. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 881-890
- Ghislain M., Byarugaba A. A., Magembe E., Njoroge A., Rivera C., Román M. L., Tovar J. C., Gamboa S., Forbes G. A., Kreuze J. F., Barekye A., Kiggundu A. 2019. Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. *Plant Biotechnology Journal*, 17: 1119-1129
- Gibson R. W., Jones M. G. K., Fish N. 1988. Resistance to potato leaf roll virus and potato virus Y in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 113-117
- Glazebrook J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205-227
- Glendinning D. R. 1983. Potato Introductions and Breeding Up To the Early 20th Century. *New Phytologist*, 94: 479-505

- Gold K. M., Townsend P. A., Chlus A., Herrmann I., Couture J. J., Larson E. R., Gevens A.J. 2020a. Hyperspectral Measurements Enable Pre-Symptomatic Detection and Differentiation of Contrasting Physiological Effects of Late Blight and Early Blight in Potato. *Remote Sensing*, 12: e286, doi:10.3390/rs12020286: 21 str.
- Gold K. M., Townsend P. A., Larson E. R., Herrmann I., Gevens A. J. 2020b. Contact Reflectance Spectroscopy for Rapid, Accurate, and Nondestructive *Phytophthora infestans* Clonal Lineage Discrimination. *Phytopathology*, 110: 851-862
- Goodin M. M., Zaitlin D., Naidu R. A., Lommel S. A. 2008. *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 1015-1026
- Goodwin S. B., Sujkowski L. S., Fry W. E. 1995. Rapid Evolution of Pathogenicity Within Clonal Lineages of the Potato Late Blight Disease Fungus. *Phytopathology*, 85: 669-676
- Goss E. M., Tabima J. F., Cooke D. E. L., 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*, 111: 8791-8796
- Grünwald N. J., Flier W. G., Sturbaum A. K., Garay-Serrano E., van den Bosch T. B. M., Smart C. D., Matuszak J. M., Lozoya-Saldaña H., Turkensteen L. J., Fry W. E. 2001. Population Structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley Region of Central Mexico. *Phytopathology*, 91: 882-890
- Gu B., Cao X., Zhou X., Chen Z., Wang Q., Liu W., Chen Q., Zhao H. 2020. The Histological, Effectoromic, and Transcriptomic Analyses of *Solanum pinnatisectum* Reveal an Upregulation of Multiple NBS-LRR Genes Suppressing *Phytophthora infestans* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: e3211, doi.org/10.3390/ijms21093211: 17 str.
- Haas B. J., Kamoun S., Zody M. C., Jiang R. H. Y., Handsaker R. E., Cano L. M., Grabherr M., Kodira C. D., Raffaele S., Torto-Alalibo T., Bozkurt T. O., Ah-Fong A. M. V., Alvarado L., Anderson V. L., Armstrong M. R., Avrova A., Baxter L., Beynon J., Boevink P. C., Bollmann S. R., Bos J. I. B., Bulone V., Cai G., Cakir C., Carrington J. C., Chawner M., Conti L., Costanzo S., Ewan R., Fahlgren N., Fischbach M. A., Fugelstad J., Gilroy E. M., Gnerre S., Green P. J., Grenville-Briggs L. J., Griffith J., Grünwald N. J., Horn K., Horner N. R., Hu C.-H., Huitema E., Jeong D.-H., Jones A. M. E., Jones J. D. G., Jones R. W., Karlsson E. K., Kunjeti S. G., Lamour K., Liu Z., Ma L., MacLean D., Chibucos M. C., McDonald H., McWalters J., Meijer H. J. G., Morgan W., Morris P. F., Munro C. A., O'Neill K., Ospina-Giraldo M., Pinzón A., Pritchard L., Ramsahoye B., Ren Q., Restrepo S., Roy S., Sadanandom A., Savidor A., Schornack S., Schwartz D. C., Schumann U. D., Schwessinger B., Seyer L., Sharpe T., Silvar C., Song J., Studholme D. J., Sykes S., Thines M., van de Vondervoort P. J. I., Phuntumart V., Wawra S., Weide R., Win J., Young C., Zhou S., Fry W., Meyers B. C., van West P., Ristaino J., Govers F., Birch

- P. R. J., Whisson S. C., Judelson H. S., Nusbaum C. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461: 393-398
- Haesaert G., Vossen J. H., Custers R., De Loose M., Haverkort A., Heremans B., Hutten R., Kessel G., Landschoot S., Van Droogenbroeck B., Visser R. G. F., Gheysen G. 2015. Transformation of the potato variety Desiree with single or multiple resistance genes increases resistance to late blight under field conditions. *Crop Protection*, 77: 163-175
- Halterman D. A., Chen Y., Sopee J., Berduo-Sandoval J., Sánchez-Pérez A. 2010. Competition between *Phytophthora infestans* Effectors Leads to Increased Aggressiveness on Plants Containing Broad-Spectrum Late Blight Resistance. *PLoS ONE* 5, e10536, doi.org/10.1371/journal.pone.0010536: 10 str.
- Hartill W. F. T., Young K., Allan D. J., Henshall W. R. 1990. Effects of temperature and leaf wetness on the potato late blight. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 18: 181-184
- Haverkort A. J., Boonekamp P. M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L. A. P., Kessel G. J. T., Visser R. G. F., van der Vossen E. A. G. 2008. Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Research*, 51: 47-57
- Haverkort A. J., Boonekamp P. M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L. A. P., Kessel G. J. T., Vossen J. H., Visser R. G. F. 2016. Durable Late Blight Resistance in Potato Through Dynamic Varieties Obtained by Cisgenesis: Scientific and Societal Advances in the DuRPh Project. *Potato Research*, 59: 35-66
- Haverkort A. J., Struik P. C., Visser R. G. F., Jacobsen E. 2009. Applied Biotechnology to Combat Late Blight in Potato Caused by *Phytophthora Infestans*. *Potato Research*, 52: 249-264
- Hawkes J. G. 1990. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Washington, D.C. : Smithsonian Institution Press: 259 str.
- Hawkes J. G., Francisco-Ortega J. 1993. The early history of the potato in Europe. *Euphytica*, 70: 1-7
- Haynes K. G., Christ B. J., Weingartner D. P., Douches D. S., Thill C. A., Secor G., Fry W. E., Lambert D. H. 2002. Foliar resistance to late blight in potato clones evaluated in national trials in 1997. *American Journal of Potato Research*, 79: 451-457
- Heeres P., Schippers-Rozenboom M., Jacobsen E., Visser R. G. F. 2002. Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica*, 124: 13-22

- Helgeson J. P., Pohlman J. D., Austin S., Haberlach G. T., Wielgus S. M., Ronis D., Zambolim L., Tooley P., McGrath J. M., James R. V., Stevenson W. R. 1998. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight: Theoretical and Applied Genetics, 96: 738-742
- Hossain M. M., Sultana F., Kubota M., Koyama H., Hyakumachi M. 2007. The Plant Growth-Promoting Fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 Induces Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Activation of Multiple Defense Signals. Plant and Cell Physiology, 48: 1724-1736
- Huang S., Van Der Vossen E. A. G., Kuang H., Vleeshouwers V. G. A. A., Zhang N., Borm T. J. A., Van Eck H. J., Baker B., Jacobsen E., Visser R. G. F. 2005a. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato: Cloning the potato late blight *R3a* gene by synteny. The Plant Journal, 42: 251-261
- Huang S., Vleeshouwers V. G. A. A., Visser R. G. F., Jacobsen E. 2005b. An Accurate In Vitro Assay for High-Throughput Disease Testing of *Phytophthora infestans* in Potato. Plant Disease, 89: 1263-1267
- Huibers R. P., Loonen A. E. H. M., Gao D., Van den Ackerveken G., Visser R. G. F., Bai Y. 2013. Powdery Mildew Resistance in Tomato by Impairment of *SIPMR4* and *SIDMRI*. PLoS ONE, 8, 6: e67467, doi:10.1371/journal.pone.0067467: 8 str.
- Hung C., Murray J. R., Ohmann S. M., Tong C. B. S. 1997. Anthocyanin Accumulation during Potato Tuber Development. Journal of American Society for Horticultural Science, 122: 20-23
- Irish Potato Famine. 2022. The History Place  
<https://www.historyplace.com/worldhistory/famine/index.html> (5. maj 2022)
- Islam S., Raihan A., Nahiyani A. S. M., Siddique M. A., Rahman L. 2018. Field Screening and Marker Assisted Selection of Late Blight Resistant Potato Lines. International Journal of Plant & Soil Science, 25: 1-12
- Ivanov A. A., Ukladov E. O., Golubeva T. S. 2021. *Phytophthora infestans*: An Overview of Methods and Attempts to Combat Late Blight. Journal of Fungi, 7, 12: e1071, doi.org/10.3390/jof7121071: 19 str.
- IVR 2022. Škodljivi organizmi v kmetijski pridelavi., Integrirano varstvo rastlin.  
<https://www.ivr.si/podrocja-delovanja/skodljivi-organizmi/dolocanje-in-obvladovanje-so/> (5. sept. 2022)
- Jackson S. A., Hanneman R. E. Jr. 1999. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanums*. Euphytica, 109: 51-67
- Jacobsen E., Schouten H. J. 2007. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. Trends in Biotechnology, 25: 219-223



- Jakić O. 1987. Krompirjeva plesen. Tehnološki list No. 2/1987. Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana.
- Janiszewska M., Sobkowiak S., Stefańczyk E., Śliwka J. 2021. Population Structure of *Phytophthora infestans* from a Single Location in Poland Over a Long Period of Time in Context of Weather Conditions. *Microbial Ecology*, 81: 746-757
- Jeger M. J., Viljanen-Rollinson S. L. H. 2001. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars: *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 32-40
- Jinks J. L., Grindle M. 1963. Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity*, 18: 245-264
- Jo K. R., Arens M., Kim T.-Y., Jongsma M. A., Visser R. G. F., Jacobsen E., Vossen J. H. 2011. Mapping of the *S. demissum* late blight resistance gene *R8* to a new locus on chromosome IX. *Theoretical and Applied Genetics*, 123: 1331-1340
- Jo K. R. 2014. Unveiling and deploying durability of late blight resistance in potato: from natural stacking to cisgenic stacking: doktorsko delo. Wageningen, Wageningen University: 168 str.
- Jo K. R., Kim C.-J., Kim S.-J., Kim T.-Y., Bergervoet M., Jongsma M. A., Visser R. G., Jacobsen E., Vossen J. H. 2014. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnology*, 14: 50-60
- Jo K. R., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. 2015. Characterisation of the late blight resistance in potato differential *MaR9* reveals a qualitative resistance gene, *R9a*, residing in a cluster of *Tm-2 2* homologs on chromosome IX. *Theoretical and Applied Genetics*, 12: 931-941
- Johnson D. A., Cummings T. F. 2009. Latent Infection of Potato Seed Tubers by *Phytophthora infestans* During Long-Term Cold Storage. *Plant Disease*, 93: 940-946
- Jones J. D. G., Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329
- Judelson H. S., Blanco F. A. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 47-58
- Jupe F., Witek K., Verweij W., Sliwka J., Pritchard L., Entherrington G. J., Maclean D., Cock P. J., Leggett R. M., Bryan G. J., Cardle L., Hein I., Jones J. D. G. 2013. Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations. *The Plant Journal*, 76: 530-544
- Kadish D., Cohen Y. 1988. Competition between metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in the absence of metalaxyl. *Plant Pathology*, 37: 558-564

- Kato M., Mizubuti E. S., Goodwin S. B., Fry W. E. 1997. Sensitivity to Protectant Fungicides and Pathogenic Fitness of Clonal Lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology*, 87: 973-978
- Kawchuk L., Jaag H. M., Toohey K., Martin R., Rohde W., Prüfer D. 2002. In planta agroinfection by Canadian and German *Potato leafroll virus* full-length cDNAs <sup>1</sup>. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 239-243
- Kieu N. P., Lenman M., Wang E. S., Petersen B. L., Andreasson E. 2021. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Scientific Reports*, 11: e4487, doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w: 12 str.
- Kim H. J., Lee H. R., Jo K. R., Mortazavian S. M. M., Huigen D. J., Evenhuis B., Kessel G., Visser R. G. F., Jacobsen E., Vossen J. H. 2012. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants *MaR8* and *MaR9* is conferred by multiple stacked *R* genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 124: 923-935
- Kingsbury N. 2009. *Hybrid: the history and science of plant breeding*. University of Chicago Press, Chicago: 493 str.
- Kiss L. 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science*, 59: 475-483
- Knepper C., Day B. 2010. From Perception to Activation: The Molecular-Genetic and Biochemical Landscape of Disease Resistance Signaling in Plants. *The Arabidopsis Book* 8, e012, doi.org/10.1199/tab.0124: 17 str.
- Kourelis J., van der Hoorn R. A. L. 2018. Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *The Plant Cell*, 30: 285-299
- Kramer L. C., Choudoir M. J., Wielgus S. M., Bhaskar P. B., Jiang J. 2009. Correlation Between Transcript Abundance of the *RB* Gene and the Level of the *RB* -Mediated Late Blight Resistance in Potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 447-455
- Kuhl J., Hanneman R., Havey M. 2001. Characterization and mapping of *Rpi1*, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 265: 977-985
- Kus M. 1987. *Krompir*. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 206 str.
- Lapwood D. H. 1965. Laboratory assessments of the susceptibility of potato-tuber tissue to blight (*Phytophthora infestans*). *European Potato Journal*, 8: 215-229
- Larsen M. K. G., Jørgensen M. M., Bennike T. B., Stensballe A. 2016. Time-course investigation of *Phytophthora infestans* infection of potato leaf from three cultivars by quantitative proteomics. *Data in Brief*, 6: 238-248

- Lebreton L., Lucas J.-M., Andrivon D. 1999. Aggressiveness and Competitive Fitness of *Phytophthora infestans* Isolates Collected from Potato and Tomato in France. *Phytopathology*, 89: 679-686
- Lees A. K., Wattier R., Shaw D. S., Sullivan L., Williams N. A., 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
- Legard D. E., Lee T. Y., Fry W. E. 1995. Pathogenic Specialization in *Phytophthora infestans*: Aggressiveness on Tomato. *Phytopathology*, 85: 1356-1361
- Leuzinger K., Dent M., Hurtado J., Stahnke J., Lai H., Zhou X., Chen Q. 2013. Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *Journal of Visualized Experiments*, e50521, doi.org/10.3791/50521: 9 str.
- Li S.-X., Wang Z.-H., Malhi S. S., Li S.-Q., Gao Y.-J., Tian X.-H. 2009. Nutrient and Water Management Effects on Crop Production, and Nutrient and Water Use Efficiency in Dryland Areas of China. *Elsevier*, 102: 223-265
- Li Y., van der Lee T. A. J., Evenhuis A., van den Bosch G. B. M., van Bekkum P. J., Förch M. G., van Gent-Pelzer M. P. E., van Raaij H. M. G., Jacobsen E., Huang S. W., Govers F., Vleeshouwers V. G. A. A., Kessel G. J. T. 2012. Population Dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands Reveals Expansion and Spread of Dominant Clonal Lineages and Virulence in Sexual Offspring. *Genes Genomes Genetics*, 2: 1529-1540
- Li Y., van der Lee T., Zhu J. H., Jin G. H., Lan C. Z., Zhu S. X., Zhang R. F., Liu B. W., Zhao Z. J., Kessel G., Huang S. W., Jacobsen E. 2013. Population structure of *Phytophthora infestans* in China - geographic clusters and presence of the EU genotype Blue\_13. *Plant Pathology*, 62: 932-942
- Li Y., Shen H., Zhou Q., Qian K., van der Lee T., Huang S. 2017. Changing Ploidy as a Strategy: The Irish Potato Famine Pathogen Shifts Ploidy in Relation to Its Sexuality. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30: 45-52
- Lokossou A. A., Park T., van Arkel G., Arens M., Ruyter-Spira C., Morales J., Whisson S. C., Birch P. R. J., Visser R. G. F., Jacobsen E., van der Vossen E. A. G. 2009. Exploiting Knowledge of *R/Avr* Genes to Rapidly Clone a New LZ-NBS-LRR Family of Late Blight Resistance Genes from Potato Linkage Group IV. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 630-641
- Lokossou A. A., Rietman H., Wang M., Krenek P., van der Schoot H., Henken B., Hoekstra R., Vleeshouwers V. G. A. A., van der Vossen E. A. G., Visser R. G. F.,

- Jacobsen E., Vosman B. 2010. Diversity, Distribution, and Evolution of *Solanum bulbocastanum* Late Blight Resistance Genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 1206-1216
- Louderback L. A., Pavlik B.M. 2017. Starch granule evidence for the earliest potato use in North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 7606-7610
- Machida-Hirano R. 2015. Diversity of potato genetic resources. *Breeding Science*, 65: 26-40
- Madden L. V., Hughes G., van den Bosch F. 2007. Temporal Analysis I: Quantifying and Comparing Epidemics. V: The Study of Plant Disease Epidemics. Madden L. V., Hughes G., van den Bosch F. (ur.). The American Phytopathological Society: 54 str.
- Mariette N., Androdias A., Mabon R., Corbière R., Marquer B., Montarry J., Andrivon D. 2016a. Local adaptation to temperature in populations and clonal lineages of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Ecology and Evolution*, 6: 6320-6331
- Mariette N., Mabon R., Corbière R., Boulard F., Glais I., Marquer B., Pasco C., Montarry J., Andrivon D. 2016b. Phenotypic and genotypic changes in French populations of *Phytophthora infestans*: are invasive clones the most aggressive? *Plant Pathology*, 65: 577-586
- Mastenbroek C. 1952. Investigations into the inheritance of the immunity from *Phytophthora infestans* de b. of *Solanum demissum* Lindl. *Euphytica*, 1: 187-198
- McKee R. K. 1964. Observations on infection by *Phytophthora infestans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 47: 365-374
- Meade F., Hutten R., Wagener S., Prigge V., Dalton E., Kirk H. G., Griffin D., Milbourne D. 2020. Detection of Novel QTLs for Late Blight Resistance Derived from the Wild Potato Species *Solanum microdontum* and *Solanum pampasense*. *Genes*, 11: e732, doi:10.3390/genes11070732: 18 str.
- Michalska A. M., Sobkowiak S., Flis B., Zimnoch-Guzowska E. 2016. Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity. *European Journal of Plant Pathology*, 144: 325-336
- Mizubuti E. S. G., Fry W.E. 1998. Temperature Effects on Developmental Stages of Isolates from Three Clonal Lineages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 88: 837-843
- Monino-Lopez D., Nijenhuis M., Kodde L., Kamoun S., Salehian H., Schentsnyi K., Stam R., Lokossou A., Abd-El-Haliem A., Visser R. G. F., Vossen J.H. 2021. Allelic variants of the NLR protein *Rpi-*chc1** differentially recognize members of the

- Phytophthora infestans* PexRD12/31 effector superfamily through the leucine-rich repeat domain. *The Plant Journal*, 107: 182-197
- Montarry J., Corbiere R., Andrivon D. 2007. Is there a trade-off between aggressiveness nad overwinter survival in *Phytophthora infestans*? *Functional Ecology*, 21: 603-610
- Murashige T., Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Nair D. N., Padmavathy S. 2014. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-11
- Najdabbasi N., Mirmajlessi S. M., Dewitte K., Landschoot S., Mänd M., Audenaert K., Ameye M., Haesaert G. 2020. Biocidal activity of plant-derived compounds against *Phytophthora infestans*: An alternative approach to late blight management. *Crop Protection*, 138: e105315, doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105315: 10 str.
- Najdabbasi N., Mirmajlessi S. M., Dewitte K., Ameye M., Mänd M., Audenaert K., Landschoot S., Haesaert G. 2021. Green Leaf Volatile Confers Management of Late Blight Disease: A Green Vaccination in Potato. *Journal of Fungi*, 7: e312, doi.org/10.3390/jof7040312: 19 str.
- Nesterenko S., Sink K. C. 2003. Carotenoid Profiles of Potato Breeding Lines and Selected Cultivars. *HortScience*, 38, 6: 1173-1177
- Newman M. A., Sundelin T., Nielson J. T., Erbs G. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 139: 1-14
- Niepold F., Schöber-Butin B. 1995. Application of the PCR technique to detect *Phytophthora infestans* in potato tubers and leaves. *Microbiological Research*, 150: 379-385
- Nimchuk Z., Eulgem T., Holt III B. F., Dangl J. L. 2003. Recognition and Response in the Plant Immune System. *Annual Review of Genetics*, 37: 579-609
- Novikova N., De Boever P., Poddubko S., Deshevaya E., Polikarpov N., Rakova N., Coninx I., Mergeay M. 2006. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Research in Microbiology*, 157: 5-12
- Olivieri F. P., Lobato M. C., González Altamiranda E., Daleo G. R., Huarte M., Guevara M. G., Andreu A. B. 2009. BABA effects on the behaviour of potato cultivars infected by *Phytophthora infestans* and *Fusarium solani*. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 47-56
- Ordonez M. E., Forbes G. A., Trognitz B. R. 1997. Resistance to late blight in potato. A putative gene that suppresses *R* genes and is elicited by specific isolates. *Euphytica*, 95: 167-172

- Ordonez M. E., Forbes G. A., Trognitz B. 1998. Relationship between ineffective *R*-genes and expansion rate of lesions on potato leaves, caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 47: 130-136
- Orłowska E., Basile A., Kandzia I., Llorente B., Kirk H. G., Cvitanich C. 2012a. Revealing the importance of meristems and roots for the development of hypersensitive responses and full foliar resistance to *Phytophthora infestans* in the resistant potato cultivar Sarpo Mira. *Journal of Experimental Botany*, 63: 4765-4779
- Orłowska E., Fiil A., Kirk H. G., Llorente B., Cvitanich C. 2012b. Differential gene induction in resistant and susceptible potato cultivars at early stages of infection by *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Reports*, 31: 187-203
- Paluchowska P., Śliwka J., Yin Z. 2022. Late blight resistance genes in potato breeding. *Planta*, 255: e127, doi.org/10.1007/s00425-022-03910-6: 21 str.
- Pan M., van Staden J. 2002. The effect of activated charcoal and auxins on root formation by hypocotyl segments of *Daucus carota*. *South African Journal of Botany*, 68: 349-356
- Pasco C., Montarry J., Marquer B., Andrivon D. 2016. And the nasty ones lose in the end: foliar pathogenicity trades off with asexual transmission in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans*. *New Phytologist*, 209: 334-342
- Patial M., Kumar J., Pal D. 2017. Detached leaf assay for evaluating resistance to leaf rust Pst. 104-2 in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Experimental Biology*, 55: 789-794
- Pel M. A. 2010. Mapping, isolation and characterization of genes responsible for late blight resistance in potato: doktorsko delo. Wageningen, Wageningen University: 210 str.
- Pepeljnjak S., Šegvic M. 2003. Occurrence of fungi in air and on plants in vegetation of different climatic regions in Croatia. *Aerobiologia*, 19: 11-19
- Pieterse M. J., Derksen A.-M. C. E., Folders J., Govers F. 1994. Expression of the *Phytophthora infestans* *ipiB* and *ipiO* genes *in planta* and *in vitro*. *Molecular Genetics and Genomics*, 244: 269-277
- Plaisted R. L., Hoopes R. W. 1989. The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. *American Potato Journal*, 66: 603-627
- Porter L. D., Johnson D. A. 2007. Survival of Sporangia of New Clonal Lineages of *Phytophthora infestans* in Soil Under Semiarid Conditions. *Plant Disease*, 91: 835-841
- Position paper on the ECJ ruling on CRISPR. 2019. Nacionalni inštitut za biologijo. <http://www.nib.si/images/SP/Position-paper-on-the-ECJ-ruling-on-CRISPR.pdf> (5. sept. 2022)

- Prell H. H., Day P. 2001. Plant-Fungal Pathogen Interaction. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 217 str.
- Pristou R., Gallegly M. E. 1956. Differential reaction of potato hosts to foreign and domestic potato physiologic races of *Phytophthora infestans*. American Potato Journal, 33: 287-295
- Punja Z. K., Collyer D., Scott C., Lung S., Holmes J., Sutton D. 2019. Pathogens and Molds Affecting Production and Quality of *Cannabis sativa* L. Frontiers in Plant Science, 10: e1120, doi.org/10.3389/fpls.2019.01120: 23 str.
- Raigond P., Singh B., Dutt S., Chakrabarti S. K. (Eds.) 2020. Potato: Nutrition and Food Security. Springer Singapore, Singapore: 301 str.
- Rakosy-Tican E., Thieme R., König J., Nachtigall M., Hammann T., Denes T.-E., Kruppa K., Molnár-Láng M. 2020. Introgression of Two Broad-Spectrum Late Blight Resistance Genes, *Rpi-Blb1* and *Rpi-Blb3*, From *Solanum bulbocastanum* Dun Plus Race-Specific *R* Genes Into Potato Pre-breeding Lines. Frontiers in Plant Science, 11: e699, doi.org/10.3389/fpls.2020.00699: 17 str.
- Ran Y., Liang Z., Gao C. 2017. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. Science China Life Sciences, 60: 490-505
- Răut I., Călin M., Capră L., Gurban A.-M., Doni M., Radu N., Jecu L. 2021. *Cladosporium* sp. Isolate as Fungal Plant Growth Promoting Agent. Agronomy, 11: e392, doi.org/10.3390/agronomy11020392: 17 str.
- Raza W., Ghazanfar M. U., Sullivan L., Cooke D. E. L., Cooke L. R. 2021. Mating Type and Aggressiveness of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Potato-Growing Areas of Punjab, Pakistan, 2017-2018 and Identification of Genotype 13\_A2 in 2019-2020. Potato Research, 64: 115-129
- Repanjšek V. 1949. Gojimo krompir. Celje, Celjska tiskarna: 144 str.
- Report to the Annual General Meeting. 1952. Scottish Plant Breeding Station: 44 str.
- Rietman H. 2011. Putting the *Phytophthora infestans* genome sequence at work; multiple novel avirulence and potato resistance gene candidates revealed. Doktorsko delo. Wageningen, Wageningen University: 169 str.
- Rietman H., Bijsterbosch G., Cano L. M., Lee H.-R., Vossen J. H., Jacobsen E., Visser R. G. F., Kamoun S., Vleeshouwers V. G. A. A. 2012. Qualitative and Quantitative Late Blight Resistance in the Potato Cultivar Sarpo Mira Is Determined by the Perception of Five Distinct RXLR Effectors. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25: 910-919
- Robinson S. M., Bostock R. M. 2015.  $\beta$ -glucans and eicosapolyenoic acids as MAMPs in plant-oomycete interactions: past and present. Frontiers in Plant Science: 5, 797: 1-14

- Rodolfi M., Lorenzi E., Picco A. M. 2003. Study of the Occurrence of Greenhouse Microfungi in a Botanical Garden. *Journal of Phytopathology*, 151: 591-599.
- Rogozina E. V., Beketova M. P., Muratova O. A., Kuznetsova M. A., Khavkin E. E. 2021. Stacking Resistance Genes in Multiparental Interspecific Potato Hybrids to Anticipate Late Blight Outbreaks. *Agronomy*, 11, e115, doi.org/10.3390/agronomy11010115: 31 str.
- Rommens C. M., Ye J., Richael C., Swords K. 2006. Improving Potato Storage and Processing Characteristics through All-Native DNA Transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9882-9887
- RStudio Team 2022. RStudio: Integrated Development for R. <https://www.rstudio.com/> (20. maj 2022)
- Sabbadin F., Urresti S., Henrissat B., Avrova A.O., Welsh L. R. J., Lindley P. J., Csukai M., Squires J. N., Walton P. H., Davies G. J., Bruce N. C., Whisson S.C., McQueen-Mason S. J. 2021. Secreted pectin monooxygenases drive plant infection by pathogenic oomycetes. *Science*, 373: 774-779
- Saldierna Guzmán J. P., Nguyen K., Hart S. C. 2020. Simple methods to remove microbes from leaf surfaces. *Journal of Basic Microbiology*, 60: 730-734
- Samen F. M. A.-E., Secor G. A., Gudmestad N. C. 2003. Variability in Virulence Among Asexual Progenies of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 93: 293-304
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9: 671-675
- Schouten H. J., Krens F. A., Jacobsen E. 2006a. Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nature Biotechnology*, 24: 753-753
- Schouten H. J., Krens F.A., Jacobsen E. 2006b. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO Reports*, 7: 750-753
- Sedlák P., Mazáková J., Sedláková V., Ryšánek P., Vejl P., Doležal P. 2017. Virulence and Mating Type of *Phytophthora infestans* Isolates in the Czech Republic. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48: 185-192
- Sedláková V., Dejmalová J., Hausvater E., Sedlák P., Doležal P., Mazáková J. 2011. Effect of *Phytophthora infestans* on potato yield in dependence on variety characteristics and fungicide control. *Plant, Soil and Environment*, 57: 486-491
- Shaner G. 1977. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology*, 77: 1051-1056



- Sharma K., Butz A. F., Finckh M. R. 2010. Effects of host and pathogen genotypes on inducibility of resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) to *Phytophthora infestans*: Induced late blight resistance in tomato. *Plant Pathology*, 59: 1062-1071
- Sharma B. P., Forbes G. A., Manandhar H. K., Shrestha S. M., Thapa R. B. 2013. Determination of Resistance to *Phytophthora infestans* on Potato Plants in Field, Laboratory and Greenhouse Conditions. *Journal of Agricultural Science*, 5, 5: 148-157
- SiStat 2022. Pridelava poljščin (ha, t, t/ha), Slovenija, letno. SiStat.  
<https://pxweb.stat.si/SiStat/sl> (6. sept. 2022)
- Śliwka J., Jakuczun H., Kamiński P., Zimnoch-Guzowska E. 2010. Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying *Rpi-phul*, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans*. *Journal of Applied Genetics*, 51: 133-140
- Śliwka J., Zimnoch-Guzowska E. 2013. Resistance to Late Blight in Potato. In: Varshney, R.K., Tuberosa, R. (Eds.), *Translational Genomics for Crop Breeding*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK: 19 str.
- Sobkowiak S., Zarzycka H., Śliwka J. 2012. The influence of long-term storage in liquid nitrogen on survival and pathogenicity of *Phytophthora Infestans* isolates. *Journal of Plant Protection Research*, 52: 479-485
- Solanum demissum*. 2022. Plants of the World Online.  
<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:331077-2/images> (3. sept. 2022)
- Spielman L. J., McMaster B. J., Fry W. E. 1989. Dominance and recessiveness at loci for virulence against potato and tomato in *Phytophthora infestans*. *Theoretical And Applied Genetics*, 77: 832-838
- Spooner D. M., McLean K., Ramsay G., Waugh R., Bryan G. J. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 14694-14699
- Spooner D. M., Ghislain M., Simon R., Jansky S. H., Gavrilenko T. 2014. Systematics, Diversity, Genetics, and Evolution of Wild and Cultivated Potatoes. *The Botanical Review*, 80: 283-383
- Srinivasan R., Prabhu G., Prasad M., Mishra M., Chaudhary M., Srivastava R. 2020. *Penicillium*. V: Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Amaresan N., Kumar M. S., Annapurna K., Kumar K., Sankaranarayanan A. (ur.) Elsevier: 651-667
- Stabej J. 1977. Kruh ubogih: Kulturnozgodovinski in jezikovni začet zgodovine krompirja na Slovenskem. Slovenska akademija znanosti in umetnosti v Ljubljani: 96 str.

- Stefańczyk E., Sobkowiak S., Brylińska M., Śliwka J. 2017. Expression of the Potato Late Blight Resistance Gene *Rpi-phul* and *Phytophthora infestans* Effectors in the Compatible and Incompatible Interactions in Potato. *Phytopathology*, 107: 740-748
- Stefańczyk E., Plich J., Janiszewska M., Smyda-Dajmund P., Sobkowiak S., Śliwka J. 2020. Marker-assisted pyramiding of potato late blight resistance genes *Rpi-rzcl* and *Rpi-phul* on di- and tetraploid levels. *Molecular Breeding*, 40: e89, doi.org/10.1007/s11032-020-01169-x: 12 str.
- Stewart H. E., Flavelle P. H., McCalmont D. C., Wastie R. L. 1983. Correlation between glasshouse and field tests for resistance to foliage blight caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 26: 41-48
- Stewart H. E. 1990. Effect of plant age and inoculum concentration on expression of major gene resistance to *Phytophthora infestans* in detached potato leaflets. *Mycological Research*, 94: 823-826
- Stewart H. E., Brandshaw J. E. 2001. Assessment of the field resistance of potato genotypes with major gene resistance to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) using inoculum comprised of two complementary races of the fungus. *Potato Research*, 44: 41-52
- Storck T., Böhme T., Schultheiss H. 2011. Fortuna et al. Status and perspectives of GM approaches to fight late blight. V: Thirteenth EuroBlight Workshop, St. Petersburg, 9. – 12. oktober 2011: 45-48
- Sun K., Wolters A.-M. A., Vossen J. H., Rouwet M. E., Loonen A. E. H. M., Jacobsen E., Visser R. G. F., Bai Y. 2016. Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic Research*, 25: 731-742
- Swiezynski K. M., Siczka M. T., Sujkowski L. S., Zarzycka H., Zimnoch-Guzowska E. 1991. Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato Genotypes Originating from Wild Species. *Plant Breeding*, 107: 28-38
- Swiezynski K. M., Domanski L., Zarzycka H., Zimnoch-Guzowska E. 2000. The reaction of potato differentials to *Phytophthora infestans* isolates collected in nature. *Plant Breeding*, 119: 119-126
- Takken F. L. W., Tameling W. I. L. 2009. To Nibble at Plant Resistance Proteins. *Science*, 324: 744-746
- Tameling W. I. L., Vossen J. H., Albrecht M., Lengauer T., Berden J. A., Haring M. A., Cornelissen B. J. C., Takken F. L. W. 2006. Mutations in the NB-ARC Domain of I-2 That Impair ATP Hydrolysis Cause Autoactivation. *Plant Physiology*, 140: 1233-1245
- Tegera P., Meulemans M. 1985. Dual culture of in vitro micropropagated potato plantlets with *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and assessment of general resistance of

- potato cultivars to the late blight fungus. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit*, 50: 1069-1080
- The James Hutton Institute. 2022. History. James Hutton Institute.  
<https://www.hutton.ac.uk/about/history> (10. sept. 2022)
- The Potato Genome Sequencing Consortium 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475: 189-195
- Thieme R., Rakosy-Tican E., Nachtigall M., Schubert J., Hammann T., Antonova O., Gavrilenko T., Heimbach U., Thieme T. 2010. Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* Lindl. and two commercial potato cultivars. *Plant Cell Reports*, 29: 1187-1201
- Tian M., Win J., Song J., van der Hoorn R., van der Knaap E., Kamoun S. 2007. A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiology*, 143: 364-377
- Tiwari J. K., Siddappa S., Singh B. P., Kaushik S. K., Chakrabarti S. K., Bhardwaj V., Chandel P. 2013. Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update. *Plant Breeding*, 132: 237-245
- Tomczyńska I., Stefańczyk E., Chmielarz M., Karasiewicz B., Kamiński P., Jones J. D. G., Lees A. K., Śliwka J. 2014. A locus conferring effective late blight resistance in potato cultivar Sárpo Mira maps to chromosome XI. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 647-657
- Tooley P. W., Sweigard J. A., Fry W. E. 1986. Fitness and Virulence of *Phytophthora infestans* Isolates from Sexual and Asexual Populations. *Phytopathology*, 76: 1209-1212
- Tooley P. W. 1990. Variation in resistance to *Phytophthora infestans* among 21 *Solanum verrucosum* plant introductions. *American Potato Journal*, 67: 491-498
- Toruño T. Y., Stergiopoulos I., Coaker G. 2016. Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54: 419-441
- Tournas V. H. 2005. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 71-77
- Toxopeus H. J. 1954. Leaf testing as a method of genetical analysis of immunity from *Phytophthora infestans* in potatoes. *Euphytica*, 3: 233-240
- Turner R. Steven 2005. After the famine: Plant pathology, *Phytophthora infestans*, and the late blight of potatoes, 1845-1960. *Historical Studies in the Physical and Biological Sciences*, 35: 341-370

- Umaerlis V., Ihnell D. I. 1976. A laboratory method for measuring the degree of attack by *Phytophthora infestans*. Potato Research, 19: 91-107
- van der Plank J. E. 1963. Plant Diseases: Epidemics and Control. New York and London, Academic Press: 349 str.
- van der Vossen E., Sikkema A., Hekkert B. te L., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. 2003. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. The Plant Journal, 36: 867-882
- Van Der Vossen E. A. G., Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A., Allefs S. 2005. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. The Plant Journal, 44: 2008-222
- van Os H., Andrzejewski S., Bakker E., Barrena I., Bryan G.J., Caromel B., Ghareeb B., Isidore E., de Jong W., van Koert P., Lefebvre V., Milbourne D., Ritter E., van der Voort J. N. A. M. R., Rousselle-Bourgeois F., van Vliet J., Waugh R., Visser R. G. F., Bakker J., van Eck H. J. 2006. Construction of a 10,000-Marker Ultradense Genetic Recombination Map of Potato: Providing a Framework for Accelerated Gene Isolation and a Genomewide Physical Map. Genetics, 173: 1075-1087
- van Poppel P.M.J.A. 2009. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *PiAvr4* and its potato counterpart *R4*. Doktorsko delo. Wageningen, Wageningen University: 170 str.
- van Poppel P. M. J. A., Huigen D. J., Govers F. 2009. Differential Recognition of *Phytophthora infestans* Races in Potato *R4* Breeding Lines. Phytopathology, 99: 1150-1155
- van Raaij H. M. G., Evenhuis A., Van Den Bosch G. B. M., Forch M. G., Spits H. G., Kessel G. J. T., Flier W. G. 2007. Monitoring virulence and mating type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands in 2004 and 2005. V: Tenth Workshop of an European Network for development of an Integrated Control Strategy of potato late blight, Italija 2007: 281-284
- Verzaux E., Budding D., de Vetten N., Niks R. E., Vleeshouwers V. G. A. A., van der Vossen E. A. G., Jacobsen E., Visser R. G. F. 2011. High Resolution Mapping of a Novel Late Blight Resistance Gene *Rpi-avl1*, from the Wild Bolivian Species *Solanum avilesii*. American Journal of Potato Research, 88: 511-519
- Vleeshouwers V. G. A. A., Dooijeweert W., Keizer L. C. P., Sijpkens L., Govers F., Colon L.T. 1999. A Laboratory Assay for *Phytophthora infestans* Resistance in Various *Solanum* Species Reflects the Field Situation. European Journal of Plant Pathology, 105: 241-250

- Vleeshouwers V. G. A. A., Dooijeweert W. van, Govers F., Kamoun S., Colon L.T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*, 210: 853-864
- Vleeshouwers V. G. A. A., Rietman H., Krenek P., Champouret N., Young C., Oh S.-K., Wang M., Bouwmeester K., Vosman B., Visser R. G. F., Jacobsen E., Govers F., Kamoun S., Van der Vossen E. A. G. 2008. Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and *Phytophthora Infestans* Avirulence Genes. *PLoS ONE*, 3: e2875, doi.org/10.1371/journal.pone.0002875: 10 str.
- Vleeshouwers V. G. A. A., Raffaele S., Vossen J. H., Champouret N., Oliva R., Segretin M. E., Rietman H., Cano L. M., Lokossou A., Kessel G., Pel M. A., Kamoun S. 2011. Understanding and Exploiting Late Blight Resistance in the Age of Effectors. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 507-531
- Vleeshouwers V. G. A. A., Oliver R. P. 2014. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27: 196-206
- Vossen J. H., van Arkel G., Bergervoet M., Jo K. R., Jacobsen E., Visser R. G. F. 2016. The *Solanum demissum* R8 late blight resistance gene is an *Sw-5* homologue that has been deployed worldwide in late blight resistant varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 129: 1785-1796
- Wale S., Platt B. H. W., Cattlin N. D. 2008. Diseases, pests and disorders of potatoes: a colour handbook, Plant protection handbooks series. London, Manson: 177 str.
- Wang M., Allefs S., van den Berg R. G., Vleeshouwers V. G. A. A., van der Vossen E.A.G., Vosman B. 2008. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 933-943
- Wang J., Wang J., Hu M., Wu S., Qi J., Wang G., Han Z., Qi Y., Gao N., Wang H. W., Zhou J. M., Chai J. 2019. Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*, 364: eaav5868, 10.1126/science.aav5868: 12 str.
- Wenzel G., Foroughi-Wehr B. 1990. Progeny tests of barley, wheat, and potato regenerated from cell cultures after *in vitro* selection for disease resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 359-365
- Whisson S. C., Boevink P. C., Wang S., Birch P. R. 2016. The cell biology of late blight disease. *Current Opinion in Microbiology*, 34: 127-135
- White S., Shaw D. 2010. Breeding for host resistance: the key to sustainable potato production. V: Twelfth EuroBlight Workshop, Arras, Francija, 3. – 6. maj 2010: 125-132

- White S., Shaw D. 2009. The Usefulness of late-blight resistant Sarpo Cultivars - a case study. *Acta Horticulturae*, 834: 161-166
- Wilson S. C., Palmatier R. N., Andriychuk L. A., Martin J. M., Jumper C. A., Holder H. W., Straus D. C. 2007. Mold Contamination and Air Handling Units. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 4: 483-491
- Witek K., Jupe F., Witek A. I., Baker D., Clark M. D., Jones J. D. G. 2016. Accelerated cloning of a potato late blight-resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing. *Nature Biotechnology*, 34: 656-660
- Witek K., Lin X., Karki H. S., Jupe F., Witek A. I., Steuernagel B., Stam R., van Oosterhout C., Fairhead S., Heal R., Cocker J. M., Bhanvadia S., Barrett W., Wu C.-H., Adachi H., Song T., Kamoun S., Vleeshouwers V. G. A. A., Tomlinson L., Wulff B. B. H., Jones J. D. G. 2021. A complex resistance locus in *Solanum americanum* recognizes a conserved *Phytophthora* effector. *Nature Plants*, 7: 198-208
- Xiao C., Gao J., Zhang Y., Wang Z., Zhang D., Chen Q., Ye X., Xu Y., Yang G., Yan L., Cheng Q., Chen J., Shen Y. 2019. Quantitative Proteomics of Potato Leaves Infected with *Phytophthora infestans* Provides Insights into Coordinated and Altered Protein Expression during Early and Late Disease Stages. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: e136, doi.org/10.3390/ijms20010136: 25 str.
- Yin J., Gu B., Huang G., Tian Y., Quan J., Lindqvist-Kreuze H., Shan W. 2017. Conserved RXLR Effector Genes of *Phytophthora infestans* Expressed at the Early Stage of Potato Infection Are Suppressive to Host Defense. *Frontiers in Plant Science*, 8: e2155, doi.org/10.3389/fpls.2017.02155: 11 str.
- 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.org/10.7554/eLife.00731: 25 str.
- Yuen J. E., Forbes G. A. 2009. Estimating the Level of Susceptibility to *Phytophthora infestans* in Potato Genotypes. *Phytopathology*, 99: 782-786
- Yuen J. E., Andersson B. 2013. What is the evidence for sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Europe? *Plant Pathology*, 62: 485-491
- Zadoks J. C. 2008. The Potato Murrain on the European Continent and the Revolutions of 1848. *Potato Research*, 51: 5-45
- Zhan J., McDonald B. A. 2013. Experimental Measures of Pathogen Competition and Relative Fitness. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 131-153
- Zhang X.-Z., Kim B.-S. 2007. Physiological Races of *Phytophthora infestans* in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 23, 3: 219-222

- Zheng J., Duan S., Armstrong M. R., Duan Y., Xu J., Chen X., Hein I., Jin L., Li G. 2020. New Findings on the Resistance Mechanism of an Elite Diploid Wild Potato Species JAM1-4 in Response to a Super Race Strain of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 110: 1375-1387
- Zhu S., Li Y., Vossen J. H., Visser R. G. F., Jacobsen E. 2012. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Research*, 21: 89-99
- Zhu S., Vossen J. H., Bergervoet M., Nijenhuis M., Kodde L., Kessel G. J. T., Vleeshouwers V., Visser R. G. F., Jacobsen E. 2015. An updated conventional- and a novel GM potato late blight *R* gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans*. *Euphytica*, 202: 219-234
- Zoteyeva N., Meřaka I., Vilcâne D., Carlson-Nilsson U., Skrabule I., Rostoks N. 2014. Assessment of Genes *R1* and *R3* Conferring Resistance to Late Blight and of Gene *RYsto* Conferring Resistance to Potato Virus Y in Two Wild Species Accessions and their Hybrid Progenies. *Natural, Exact, and Applied Sciences*, 68: 133-141
- Žerjav M. 2016. Značilnosti populacije krompirjeve plesni (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) v Sloveniji v obdobju med 2002 in 2015: magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 104 str.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se dr. Petru Dolničarju, slovenskemu strokovnjaku na področju krompirja, za redno spremljanje in spodbujanje mojega napredka pri doktorski nalogi ter za vse nasvete in diskusije, za katero si je bil vedno pripravljen vzeti čas.

Zahvala gre tudi članom komisije; prof. dr. Jerneju Jakšetu, prof. dr. Kristini Gruden in dr. Saši Širca za pregled doktorske disertacije, za diskusijo in nasvete.

Iskrena hvala Elizabeti Komatar, da me je brez vprašanja sprejela v svoj laboratorij ter me s predanostjo, srčnostjo in potrpežljivostjo uvedla v rastlinske tkivne kulture. Z vsako zrastle rastlino je zrastle tudi močna prijateljska vez, koščki čokolade pa so pri tem nedvomno tudi nekaj malega pripomogli. Hvala tudi Mirjam, da mi je proti koncu, ko bi morala biti hkrati na dveh mestih, nemudoma priskočila na pomoč pri namnoževanju rastlin. Njena dobrotljivost in natančnost mi bosta vedno v navdih.

Iskrena hvala tudi pisarniški in MR cimri Ani. Z njenim prihodom se je vzdušje v pisarni občutno izboljšalo, prav tako pa tudi stanje MR na oddelku. Hvala za poslušanje mojih monologov, za mnoge spodbudne besede in za ves čas, ki sva ga preživeli skupaj, tako na inštitutu kot tudi izven.

Hvala tudi Teji, da je vedno skrbela za pozitivno in sproščeno vzdušje v genetskem laboratoriju, zaradi česar je bilo delo v laboratoriju nadvse prijetno in zabavno.

Obsežen del doktorske naloge ne bi bil možen brez odličnega medoddelčnega sodelovanja s sodelavci Oddelka za varstvo rastlin na KIS-u.

Hvala mikologom, mag. Metki Žerjav, dr. Janji Zajc, dr. Hans-Josefu Schroersu in Aleksandri Podboj Ronta, da so me sprejeli v mikološki laboratorij. Metki in Janji iskrena hvala za vse napotke, usmeritve in diskusije. Vsem pa hvala za veliko potrpežljivosti, ko sem zasedala vedno več prostora v laboratoriju.

Iskrena hvala dr. Ireni Mavrič Pleško za pomoč pri poskusih ekspresije, za nasvete, diskusijo in ogromno spodbudnih besed. Hvala tudi ostalim virologom, Tanji Kokalj, Barbari Grubar in Aljoši Beber, na katere sem se lahko vedno obrnila, ko se mi je med delom kje zataknilo, ter seveda za odlično vzdušje v laboratorijih.

Hvala tudi entomologom, dr. Jaki Razingerju, dr. Špeli Modic in Evi Praprotnik, ki so mi za zajeten čas prijazno odstopili prostor v rastni komori, kljub svoji prostorski stiski, da sem lahko opravila ključne eksperimente za svojo nalogo.

Hvala tudi Tadeju Galiču za vse pripravke za delo v rastlinjaku, s katerimi sem lahko svoje krompirje ohranjala kolikor toliko zdrave.

Iskrena hvala sodelavcem Službe za uradno potrjevanje, ki so mi nadvse prijazno odstopili svojo rastno komoro za izvedbo poskusov in pri katerih sem se vedno počutila dobrodošlo. Vsi skupaj z ekipnim duhom, zagnanostjo, optimizmom in dobro voljo ustvarjajo odličen kolektiv, ki mi bo vedno v navdih.

Hvala doc. dr. Sabini Berne ter Marinki Horvat za pomoč pri agroinfiltraciji rastlin. Marinki se zahvaljujem za praktične nasvete in spremljanje med laboratorijskim delom ter da mi je bila vedno pripravljena pomagati. Sabini hvala za vso diskusijo in pomoč, tudi ko je bilo laboratorijsko delo že opravljeno, predvsem pa za ključno spodbudo. Celotni Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete se zahvaljujem, da so me med opravljanjem laboratorijskega dela gostoljubno sprejeli.

Še posebej bi se rada zahvalila mojim najbližjim; staršema, bratu z družino ter priženjeni družini, ki so me na tej poti tako ali drugače vseskozi podpirali, spremljali, spodbujali in mi omogočili, da sem lahko sledila svojim ciljem.

Na koncu pa največja zahvala mojemu možu. Žiga, težko opišem z besedami, koliko mi pomeni tvoja podpora. Hvala, da tako kot ob prvem dnevu, še vedno neomajno verjameš vame in mi stojiš ob strani. Tvoja radovednost, razgledanost ter navdušenje nad odkrivanjem novih znanj me vsak dan znova navdihujejo. Ob tebi sem boljša oseba in zmorem vse! In ja, si imel prav ☺



## PRILOGE

### PRILOGA A

Priprava gojišča s kvasnim in govejim ekstraktom (Yeast Extract Beef - YEB) za gojenje bakterije *Agrobacterium tumefaciens*

Komponente (za 1 L gojišča):

- 5,0 g govejega ekstrakta (Biolife Italiana, Italija)
- 1,0 g kvasnega ekstrakta (Biolife Italiana, Italija)
- 5,0 g peptona (Sigma-Aldrich, ZDA)
- 5,0 g saharoze (Kemika, Hrvaška)
- 0,3 g magnezijevega sulfata heptahidrata ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, ZDA)
- 20 g bakteriološkega agarja (Oxoid, Velika Britanija)
- 1000 ml deionizirane vode ( $\text{dH}_2\text{O}$ )

Antibiotiki:

- spektinomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma-Aldrich, ZDA)
- rifampicin (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma-Aldrich, ZDA)

Za pripravo trdnega gojišča smo v  $\text{dH}_2\text{O}$  med konstantnim mešanjem dodali goveji ekstrakt, kvasni ekstrakt, pepton, saharozo, magnezijev sulfat heptahidrat in na koncu še bakteriološki agar ter umerili končni volumen gojišča do 1 L. Gojišče smo toplotno sterilizirali z avtoklaviranjem, nato pa v nekoliko ohlajeno gojišče dodali še ustrezen volumen založnih raztopin antibiotikov spektinomycin in rifampicin. Gojišče smo razlili v petrijevke premera 9 cm.

Za pripravo tekočega gojišča YEB smo uporabili enak postopek priprave, le da smo korak dodajanja bakteriološkega agarja izpustili.

## PRILOGA B

### Priprava gojišča N za tekoče vzdrževanje tkivnih kultur

Komponente (za 1 L gojišča):

- 2,2 g (polovična koncentracija) komercialnega gojišča Murashige and Skoog Basal Medium v prahu (Sigma-Aldrich, ZDA)
- 30 g saharoze (Kemika, Hrvaška)
- 8 g tehničnega agarja (Biolife Italiana, Italija)
- 1000 ml dH<sub>2</sub>O

Za pripravo gojišča N smo v dH<sub>2</sub>O med konstantnim mešanjem dodali komercialno pripravljeno gojišče Murashige and Skoog Basal Medium in saharozo. Nato smo s pH metrom umerili pH na vrednost 6,0 ter nato v hladno gojišče dodali še tehnični agar. Gojišče smo prestavili na električni kuhalnik ter ga segreli, da se je agar raztopil. Toplo gojišče smo prelili v steklene kozarčke premera 10 cm, približno 20 ml na kozarček, in toplotno sterilizirali z avtoklaviranjem.

## PRILOGA C

### Priprava rženega gojišča Rye-A za gojenje oomicete *P. infestans*

Komponente (za 1 L gojišča):

- 60 g rženih semen
- 12,5 g saharoze (Kemika, Hrvaška)
- 12,5 g trsnega sladkorja
- 15 g tehničnega agarja (Biolife Italiana, Italija)
- 1000 ml dH<sub>2</sub>O

Za pripravo gojišča Rye-A smo najprej čez noč v dH<sub>2</sub>O namočili ržena semena. Naslednji dan smo nabrekli ržena semena dobro zmeli s paličnim mešalnikom in jih nato precedili skozi kovinsko cedilo ter ponovili postopek mletja in precejanja z nezmletimi koščki semen. Rženi kaši smo dodali trsni sladkor ter jo prestavili v vodno kopel za 1 h pri temperaturi 68 °C. Sledila je prva toplotna sterilizacija z avtoklaviranjem. Rženo kašo smo zatem prestavili na magnetno mešalo ter postopoma dodali saharozo, agar in dH<sub>2</sub>O do prostornine 1 L. Rženo gojišče smo ponovno toplotno sterilizirali z avtoklaviranjem in ga razlili v plastične petrijevke premera 9 cm.

## PRILOGA D

Priprava rženega gojišča Rye-A<sup>+</sup> z antibiotiki za gojenje virulentne oomicete *P. infestans*

Komponente (za 1 L gojišča):

- 60 g rženih semen
- 12,5 g saharoze (Kemika, Hrvaška)
- 12,5 g trsnega sladkorja
- 15 g tehničnega agarja (Biolife Italiana, Italija)
- 1000 ml dH<sub>2</sub>O

Antibiotiki:

- ampicilin (250 mg/l) (Sigma-Aldrich, ZDA)
- piramicin (10 mg/l) (Sigma-Aldrich, ZDA)
- rifampicin (10 mg/l) (Sigma-Aldrich, ZDA)

Gojišče Rye-A<sup>+</sup> smo pripravili po enakem postopku kot gojišče Rye-A (Priloga C), le da smo po drugem avtoklaviranju v nekoliko ohlajeno rženo gojišče dodali ustrezen volumen založnih raztopin antibiotikov ampicilin, piramicin in rifampicin. Rženo gojišče Rye-A<sup>+</sup> smo razlili v plastične petrijevke premera 9 cm.

## PRILOGA E

Priprava splošnega gojišča s krompirjevo dekstrozo (Potato Dextrose Agar - PDA) z antibiotikom za odtise krompirjevih lističev

Komponente (za 1 L gojišča):

- 42 g komercialnega gojišča s krompirjevo dekstrozo (PDA) v prahu (Biolife Italiana, Italija)
- 1000 ml dH<sub>2</sub>O

Antibiotik:

- streptomycin sulfat (50 mg/l) (Sigma-Aldrich, ZDA)

Za pripravo gojišča PDA smo natehtali ustrezno količino komercialnega gojišča PDA v prahu in dodali dH<sub>2</sub>O do prostornine 1 L. Gojišče PDA smo toplotno sterilizirali z avtoklaviranjem. V nekoliko ohlajeno gojišče PDA smo dodali ustrezen volumen založne raztopine antibiotika streptomycin sulfat ter ga razlili v plastične petrijevke premera 9 cm.