

Rozprawa doktorska pt.:
Zróźnicowanie zdolności chorobotwórczych patogenów ziemniaka:
***Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary i *Fusarium* spp.**
(zbiór 3 publikacji)

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

1. **Stefańczyk Emil**, Sobkowiak Sylwester, Brylińska Marta, Jadwiga Śliwka (2016) Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. European Journal of Plant Pathology 145: 871 – 884 DOI 10.1007/s10658-016-0875-0
2. **Stefańczyk Emil**, Sobkowiak Sylwester, Brylińska Marta, Jadwiga Śliwka (2017) Expression of the potato late blight resistance gene *Rpi-phu1* and *Phytophthora infestans* effectors in the compatible and incompatible interactions in potato. Phytopathology 107: 740 – 748 DOI 10.1094/PHYTO-09-16-0328-R
3. **Stefańczyk Emil**, Brylińska Marta, Brurberg May Bente, Naerstad Ragnhild, Elameen Abdelhameed, Sobkowiak Sylwester, Jadwiga Śliwka (2018) Diversity of *Avr-vnt1* and *AvrSmira1* effector genes in Polish and Norwegian populations of *Phytophthora infestans*. Plant Pathology 67: 1792 – 1802 DOI 10.1111/ppa.12875

Promotor prof. dr hab. Jadwiga Śliwka, prof. IHAR-PIB

STRESZCZENIE

Celem pracy była ocena zróźnicowania izolatów grzybów z rodzaju *Fusarium*, sprawców suchej zgnilizny bulw ziemniaka oraz grzybopodobnego organizmu *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, wywołującego zarazę ziemniaka, wraz z określeniem wpływu ich zmienności na interakcje z gospodarzem. Choroby powodowane przez obydwie patogeny są przyczyną znacznych strat w uprawie ziemniaka.

Przynależność gatunkową grzybów z rodzaju *Fusarium* wyizolowanych z bulw ziemniaka z objawami suchej zgnilizny oznaczono na podstawie sekwencjonowania fragmentów trzech genów. Ich potencjalną zdolność do syntezy wybranych mykotoksyn oceniono z użyciem markerów PCR. Wśród 149 izolatów zidentyfikowano łącznie 12 gatunków *Fusarium*, z czego najliczniej reprezentowany był *F. oxysporum*. Testując bulwy ziemniaka wykazano patogeniczność izolatów należących do czterech gatunków *Fusarium*, niezależnie od ich potencjalnej zdolności do syntezy mykotoksyn. Jednak nie wszystkie izolaty tych czterech gatunków wywołały objawy suchej zgnilizny bulw w teście laboratoryjnym.

W badaniach dotyczących *P. infestans* testowano odporność linii hodowlanych ziemniaka pochodzących z krzyżowań donorów dwóch genów odporności: *Rpi-phu1* oraz *Rpi-Smira1*. W testach listkowych użyto czterech izolatów *P. infestans*. Zmiany ekspresji genu *Rpi-phu1* analizowano metodą qPCR w wybranych liniach ziemniaka w interakcjach z *P. infestans* prowadzących do infekcji lub odporności. W tym samym układzie śledzono także poziom transkryptu trzech genów efektorowych *P. infestans*, z których *Avr-vnt1* i *AvrSmira1* kodują

produkty rozpoznawane przez produkty genów, odpowiednio, *Rpi-phu1* i *Rpi-Smira1*. Przeprowadzono analizę zróżnicowania sekwencji nukleotydowych efektorów *Avr-vnt1* i *AvrSmira1*.

Odporność linii hodowlanych ziemniaka z dwoma genami, *Rpi-phu1* i *Rpi-Smira1*, nie została przełamana pomimo użycia izolatu *P. infestans* wirulentnego wobec roślin z każdym z tych genów osobno. Obserwacja ta mogła wynikać z interakcji między dwoma białkami R lub z przeniesienia innych genów odporności z linii rodzicielskich. Gen odporności *Rpi-phu1* wykazywał dwa odmienne wzory ekspresji, w zależności od tego czy interakcja z patogenem prowadziła do infekcji czy odporności rośliny. Badając poziom transkryptu *Avr-vnt1* wykazano, że strategią unikania rozpoznania patogenu przez rośliny z genem *Rpi-phu1* jest wyłączenie ekspresji tego efektora w dwóch pierwszych dniach infekcji. Zdolności tej nie udało się jednak powiązać z sekwencją kodującą efektor *Avr-vnt1* w żadnym z badanych izolatów *P. infestans*. Obecność aminokwasów M¹⁵⁶ i R¹⁷⁰ w efektorze *AvrSmira1* może być związana z wirulencją, jednak nie stanowi jedyne mechanizmu unikania rozpoznania. Analiza sekwencji efektorów 96 izolatów *P. infestans* wykazała działanie doboru pozytywnego na poszczególne pozycje aminokwasowe genów *Avr-vnt1* i *AvrSmira1*. Analiza neutralności potwierdziła, że badane geny efektorowe nie są neutralne pod względem doboru.

Doctoral thesis entitled
***Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Fusarium* spp.:**
diversity of pathogenicity on potato
(compilation of publications)

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the diversity of potato pathogen isolates, fungi of genus *Fusarium*, potato dry rot agents, and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, that causes late blight, and to estimate the impact of the observed diversity on the interaction with a potato host. Both diseases generate high losses in potato production.

The species identification of the *Fusarium* isolates collected from potato tubers with dry rot symptoms was performed by sequencing fragments of three genes. The potential ability to synthesize chosen mycotoxins was evaluated by PCR markers. Among 149 isolates, 12 species were identified, of which *F. oxysporum* was the most frequent. Isolates pathogenic in the laboratory tuber tests were found among four *Fusarium* species, regardless of their abilities for mycotoxin production. Yet not all isolates of the four pathogenic *Fusarium* species were able to evoke dry rot symptoms in the laboratory test.

In the *P. infestans* study, the late blight resistance of potato breeding lines resulting from crosses between donors of the *Rpi-phu1* and *Rpi-Smira1* resistance genes was tested in detached leaflet assays with four pathogen isolates. The *Rpi-phu1* transcript levels were analyzed using the qPCR method in chosen potato lines during the interactions with *P. infestans* isolates leading to infection or resistance. The same experimental setup was used to study the expression of three *P. infestans* effector genes, of which *Avr-vnt1* and *AvrSmira1* encode proteins recognized by the *Rpi-phu1* and *Rpi-Smira1* gene products, respectively. The *Avr-vnt1* and *AvrSmira1* effectors were investigated for their nucleotide sequence diversities.

Potato breeding lines with both *Rpi-phul* and *Rpi-Smiral* genes remained resistant despite using the *P. infestans* isolate virulent to plants with each gene separately. This could either result from *R* genes interaction or additional resistance gene(s) transferred from a parent plant. Depending on the outcome of the interaction with *P. infestans*, different expression patterns of the *Rpi-phul* gene were observed. The *Avr-vnt1* gene transcript level analyses revealed that the pathogen's strategy to avoid recognition by *Rpi-phul* plants is the temporary deactivation of the effector's expression. This ability could not be linked with the *Avr-vnt1* coding sequences of any of the tested *P. infestans* isolates. The M¹⁵⁶ and R¹⁷⁰ amino acid presence in the AvrSmiral effector could be associated with virulence, yet it cannot be the only mechanism of recognition avoidance. Sequence analyses of the *Avr-vnt1* and *AvrSmiral* genes indicated positive selection acting on these effectors. The neutrality tests confirmed that these effector genes are not neutral in terms of selection.

(-) mgr inż. Emil Stefańczyk