

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
- Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Emil Stefańczyk

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Zróżnicowanie zdolności chorobotwórczych patogenów ziemniaka:
Phytophthora infestans (Mont.) de Bary i *Fusarium* spp.**

Promotor:

prof. dr hab. Jadwiga Śliwka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Młochowie
Zakład Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka

Recenzenci:

dr hab. Magdalena Arasimowicz-Jelonek, prof. nadzw. UAM

Zakład Ekofizjologii Roślin, Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

dr hab. Łukasz Stępień, prof. IGR PAN

Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Radzików, 2019

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

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
IF₂₀₁₆ (impact factor): 1,478
5-letni IF: 1,657
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
IF₂₀₁₇ (impact factor): 3,036
5-letni IF: 3,200
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
IF₂₀₁₇ (impact factor): 2,303
5-letni IF: 2,423

WPROWADZENIE

Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.), jest narażony na wiele chorób zarówno w trakcie rozwoju rośliny, jak i po zbiorze bulw, m. in. zarazę ziemniaka, powodowaną przez grzybopodobny organizm *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary z królestwa Stramenopiles, oraz suchą zgniliznę bulw ziemniaka, której przyczyną są grzyby z rodzaju *Fusarium*. Poziom wiedzy nt. każdego z patogenów jest różny. Badania dotyczące *P. infestans* skupiają się na mechanizmach oddziaływań z gospodarzem na ich molekularnym poziomie, podczas gdy badania grzybów z rodzaju *Fusarium* w interakcji z ziemniakiem obejmują głównie ocenę ich zdolności do wywoływania suchej zgnilizny bulw i najkorzystniejszych warunków dla rozwoju choroby, a także ocenę zdolności izolatów *Fusarium* do syntezy mykotoksyn.

Choroby wywoływane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* nie tylko obniżają plon, ale pogarszają także jego jakość. Wynika to ze zdolności *Fusarium* spp. do syntezy mykotoksyn, wtórnych metabolitów o działaniu toksycznym dla roślin, zwierząt i ludzi. Cullen i in. (2005) do sprawców suchej zgnilizny zaliczają 13 gatunków *Fusarium*, wskazując *F. sambucinum* i *F. solani* var. *coeruleum* jako najbardziej powszechne. Gatunki należące do kompleksu *F. solani* zalicza się obecnie do rodzaju *Neocosmospora* (Sandoval-Denis i Crous, 2018). Przynależność gatunkową grzybów z rodzaju *Fusarium* można określić na podstawie morfologii oraz z użyciem metody analizy sekwencji nukleotydowych konserwatywnych genów lub ich fragmentów. Zastosowanie metody PCR pozwala ocenić potencjalną zdolność do syntezy mykotoksyn przez *Fusarium* spp. Genetyczne i fizjologiczne podłoże odporności bulw ziemniaka na suchą zgniliznę nie jest dobrze poznane. Na intensywność objawów choroby ma wpływ między- i wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie izolatów *Fusarium* spp. pod względem agresywności.

W przeciwieństwie do odporności na suchą zgniliznę bulw, opisano zarówno linie ziemniaka odporne polowo (odporność horyzontalna), jak i wyposażone w geny główne odporności na zarazę ziemniaka (odporność wertykalna). Źródłem genów głównych odporności (genów *R*) warunkujących odporność wertykalną na zarazę ziemniaka są spokrewnione z ziemniakiem gatunki z rodzaju *Solanum*. Produkt genu *R* gospodarza rozpoznaje, pośrednio lub bezpośrednio, produkt genu efektorowego patogenu. Efektory są wydzielanymi przez patogeny białkami, które wpływają na funkcję i strukturę komórek gospodarza, umożliwiając przeprowadzenie infekcji. W wyniku rozpoznania efektorów dochodzi do indukcji reakcji

nadwrażliwości (*Hypersensitive Response*, HR), której konsekwencją jest kontrolowana śmierć komórek w miejscu infekcji i zahamowanie rozwoju patogenu (Kamoun, 2006). Przykładem jest rozpoznanie produktów genów *Avr-vnt1* i *AvrSmira1* przez, odpowiednio, białka Rpi-phu1 i Rpi-Smira1 ziemniaka.

Geny kodujące efekторы są zlokalizowane w regionach genomu *P. infestans*, które charakteryzują się wysoką częstością mutacji i rekombinacji niehomologicznych. Te z kolei mogą prowadzić do powstania nowych form efektorów (Croll i McDonald, 2012). Wybrane warianty efektorów mogą unikać rozpoznania przez białka R na skutek modyfikacji ich sekwencji kodujących, delecji czy braku ekspresji.

CEL BADAŃ

Celem badań była ocena zróżnicowania izolatów patogenów ziemniaka, grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz grzybopodobnego organizmu *P. infestans*, wraz z określeniem wpływu ich zmienności na interakcje z gospodarzem.

Cele szczegółowe:

1. Identyfikacja gatunkowa oraz ocena zróżnicowania izolatów *Fusarium* spp., pochodzących z bulw ziemniaka z objawami suchej zgnilizny bulw, pod względem patogeniczności i potencjalnej zdolności do syntezy mykotoksyn.
2. Określenie poziomu ekspresji efektorów *Avr-vnt1*, *AvrSmira1* i *Avr8* *P. infestans* oraz genu odporności *Rpi-phu1* ziemniaka w trakcie interakcji wybranych roślin ziemniaka ze zróżnicowanymi izolatami patogenu prowadzących do infekcji lub odporności.
3. Analiza izolatów *P. infestans* z Polski i Norwegii, krajów o zróżnicowanym klimacie i strukturze upraw ziemniaka, pod względem sekwencji nukleotydowych efektorów *Avr-vnt1* oraz *AvrSmira1*.

Hipotezy naukowe:

1. Przynależność gatunkowa grzybów z rodzaju *Fusarium* i ich zdolność do wytwarzania mykotoksyn są czynnikami kluczowymi dla ich patogeniczności wobec bulw ziemniaka.
2. Zróżnicowanie sekwencji DNA i poziom ekspresji genów kodujących efekторы mają decydujące znaczenie dla rozwoju infekcji powodowanych przez *P. infestans* na roślinach ziemniaka z genami odporności, których produkty rozpoznają efekторы.

WYNIKI BADAŃ

W publikacji Stefańczyka i in. (2016) przeprowadzono identyfikację gatunkową 124 izolatów grzybów wyizolowanych z bulw ziemniaka z objawami suchej zgnilizny bulw pochodzących z sześciu miejscowości w Polsce oraz 25 izolatów z kolekcji IHAR-PIB w Młochowie.

W oparciu o sekwencjonowanie fragmentów genów kodujących czynnik elongacji translacji 1- α , β -tubulinę oraz dwóch wewnętrznych sekwencji transkrybowanych zlokalizowanych pomiędzy genami kodującymi podjednostki rRNA (*Internal Transcribed Spacer*, ITS), zidentyfikowano 12 gatunków *Fusarium*. Najliczniej reprezentowane były izolaty *F. oxysporum* (45% wszystkich izolatów), *F. avenaceum* (12,1%) oraz *F. solani* (10,7%) (Tab. 1). Dla trzech izolatów (M87A, M115 i M93) nie znaleziono w bazach danych podobnych sekwencji nukleotydowych pochodzących ze zidentyfikowanych uprzednio organizmów. Zastosowanie analizy filogenetycznej z użyciem sekwencji multilocus pozwoliło zaklasyfikować izolaty M87A oraz M115 jako należące do kompleksu gatunków *F. solani* (obecnie rodzaj *Neocosmospora*). Dla izolatu M93 wykonano sekwencjonowanie fragmentów dodatkowych genów stosowanych w identyfikacji grzybów: podjednostek A i B polimerazy RNA II (*RNA polymerase II subunit RPB1* i *RPB2*) oraz dużej podjednostki rRNA (*Large Subunit rRNA*, LSU), które jednak również nie doprowadziły do identyfikacji izolatu. Ocena przynależności gatunkowej izolatu M93 przeprowadzana jest obecnie metodami klasycznymi we współpracy z Instytutem Botaniki im. W. Szafera – PAN w Krakowie.

Test patogeniczności 119 izolatów *Fusarium* spp. przeprowadzono na czterech odmianach ziemniaka. Pięć bulw każdej odmiany w dwóch powtórzeniach raniono w części apikalnej z użyciem metalowego cylindra, inokulowano zawiesiną izolatów i inkubowano w 16°C przez cztery tygodnie. Wielkość plamy chorobowej obliczano jako średnią długości i szerokości plamy mierzonej w przekroju podłużnym bulwy. Do gatunków patogenicznych, tj. powodujących objawy suchej zgnilizny bulw ziemniaka przekraczające obszar mechanicznego zranienia, zaliczono izolaty *F. sambucinum* o najwyższych zdolnościach chorobotwórczych oraz *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*. Ponieważ wśród izolatów tych gatunków obserwowano wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie patogeniczności, odrzucono hipotezę o możliwości określenia zdolności chorobotwórczych wyłącznie poprzez identyfikację gatunkową grzybów z rodzaju *Fusarium*. Również hipoteza o zdolności do wytwarzania

testowanych mykotoksyn, jako czynnika kluczowego dla patogeniczności grzybów z rodzaju *Fusarium* wobec ziemniaka nie została potwierdzona. Z użyciem markerów PCR, wśród gatunków patogenicznych stwierdzono potencjalnych producentów trichotecenów i zearalenonu (*F. culmorum* i *F. graminearum*), trichotecenów (*F. sambucinum*) oraz izolaty niezdolne do syntezy mykotoksyn obydwu grup (*F. avenaceum*).

Tab. 1. Lista zidentyfikowanych gatunków *Fusarium* pogrupowanych wg miejsca pochodzenia izolatów. Kolumna „Inne” zawiera izolaty pochodzące z Naroczyc, Świebodzina, Zazdrości oraz trzy pochodzące z bulw zakupionych w sklepie. Jeśli dotyczy, w nawiasach podano obowiązujące nazwy rodzajów dla przeklasyfikowanych gatunków *Fusarium*.

| Gatunek | Pochodzenie | | | | Suma | % wszystkich |
|---|-------------|------------|---------|------|---|-----------------|
| | Młochów | Chwałowice | Zamarte | Inne | | |
| <i>F. avenaceum</i> | 4 | | 11 | 3 | 18 | 12,1 |
| <i>F. cerealis</i> | 2 | | 1 | 4 | 7 | 4,7 |
| <i>F. culmorum</i> | 8 | | | | 8 | 5,4 |
| <i>F. equiseti</i> | | | 1 | | 1 | 0,7 |
| <i>F. graminearum</i> | 3 | | 1 | 1 | 5 | 3,4 |
| <i>F. merismoides</i> | | | | 1 | 1 | 0,7 |
| <i>F. oxysporum</i> | 47 | 15 | 4 | 1 | 67 | 45 |
| <i>F. redolens</i> | 2 | 2 | 1 | | 5 | 3,4 |
| <i>F. sambucinum</i> | 9 | | | 2 | 11 | 7,4 |
| <i>F. solani</i> (<i>Neocosmospora</i>) ^a | 7 | 3 | 5 | 1 | 16 | 10,7 |
| <i>F. tabacinum</i> (<i>Plectosporium</i>) ^b | | | 4 | | 4 | 2,7 |
| <i>F. venenatum</i> | | 1 | 2 | | 3 | 2 |
| Niezidentyfikowane <i>Fusarium</i> | 3 | | | | 3 | 2 |
| Suma | 85 | 21 | 30 | 13 | 146 izolatów 12 gatunków <i>Fusarium</i> + 3 niezidentyfikowane | |

^a – zmiana rodzaju wg Sandoval-Denis i Crous (2018)

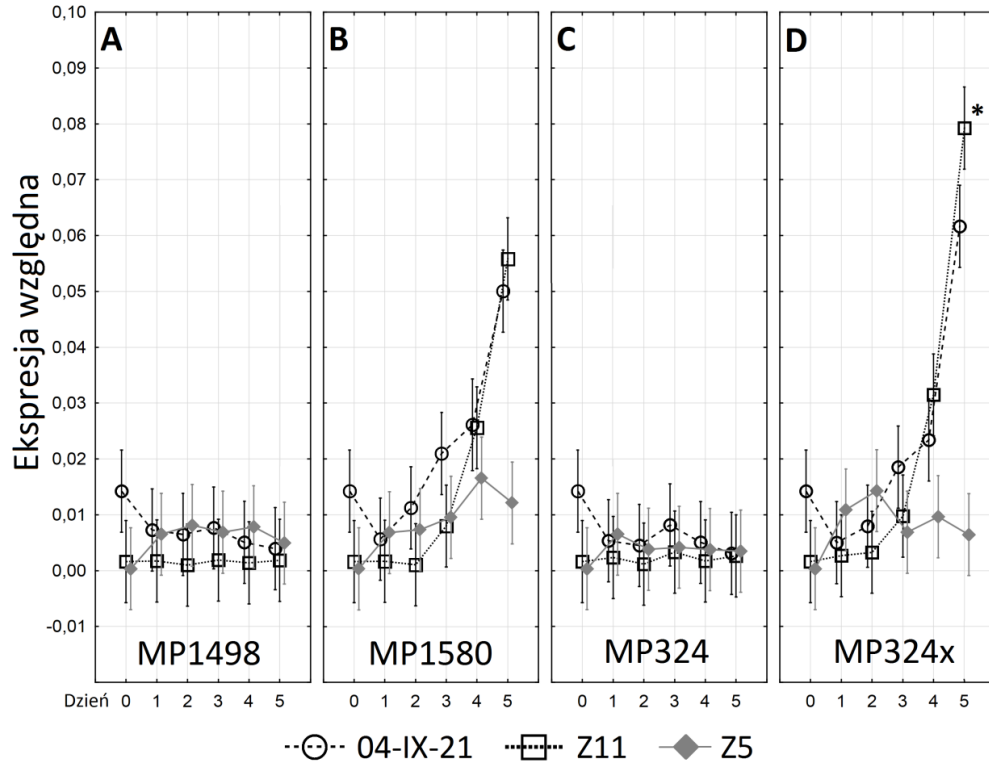
^b – zmiana rodzaju wg Palm i in. (1995)

Prace Stefańczyka i współautorów z lat 2017 i 2018 dotyczą interakcji pomiędzy ziemniakiem a *P. infestans*. W pierwszej części prac, wykorzystano linie hodowlane ziemniaka ($n = 83$) pochodzące z krzyżowania odmiany ziemniaka Sárpo Mira z dwoma donorami genu odporności *Rpi-phu1*. Spośród linii hodowlanych, przy użyciu markerów PCR sprzężonych z genami odporności *Rpi-Smiral* oraz *Rpi-phu1*, wyodrębniono cztery grupy genotypów: z pojedynczymi genami *Rpi-Smiral* lub *Rpi-phu1*, z dwoma genami oraz bez żadnego z tych

genów. Odporność linii ziemniaka testowano w teście listkowym z użyciem czterech izolatów *P. infestans* o różnorodnej wirulencji. Izolat *P. infestans* MP1580, choć zdolny do przełamania odporności warunkowanej przez każdy z tych genów osobno, nie infekował linii ziemniaka z dwoma genami. Obserwacja ta mogła wynikać z interakcji pomiędzy dwoma genami, bądź przeniesienia innych genów odporności z odmiany Sárpo Mira do tych linii. Na odporność tych linii nie wpływał gen *R8*, którego obecność stwierdzono wyłącznie w dwóch z siedmiu linii ziemniaka odpornych na wszystkie zastosowane izolaty *P. infestans*, jak również w 10 z 24 linii porażanych przez każdy z izolatów *P. infestans* (dane nieopublikowane).

Pomiar poziomu ekspresji względnej genu *Rpi-phu1* metodą qPCR przeprowadzono przed inokulacją i każdego z pięciu dni po inokulacji całych roślin lub odciętych listków linii ziemniaka 04-IX-21. Ponieważ nie wykazano istotnych różnic w poziomie transkryptu genu *R* między dwoma sposobami przygotowywania prób do eksperymentu, w dalszych badaniach zastosowano test listkowy.

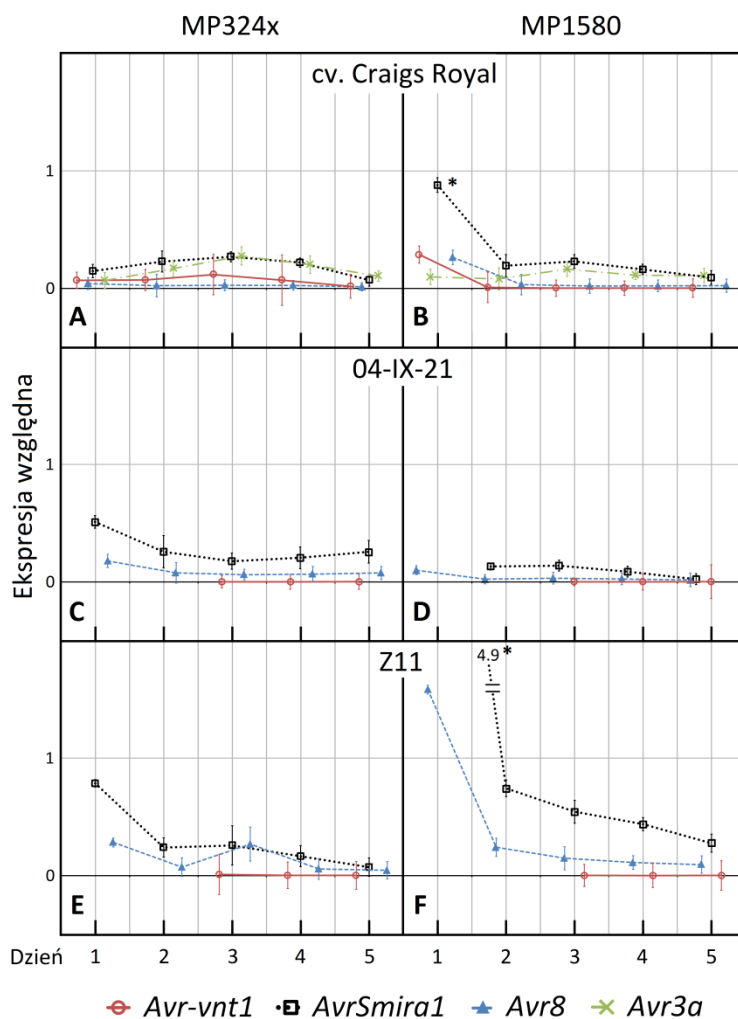
Do badań ekspresji genu odporności *Rpi-phu1* użyto linii ziemniaka 04-IX-21 i Z11 (z genem *Rpi-phu1*) oraz Z5 (*Rpi-phu1* + *Rpi-Smira1*). Jako kontrolę zastosowano podatną na *P. infestans* odmianę ziemniaka Craigs Royal. Przed inokulacją, zebrano po trzy listki testowanych roślin, kolejne 15 listków inokulowano czterema izolatami *P. infestans* w dwóch terminach. Każdego z pięciu dni po inokulacji, z trzech listków każdej z testowanych roślin izolowano RNA, który po przepisaniu na cDNA, posłużył w analizach z wykorzystaniem qPCR. W przypadku izolatów *P. infestans* niezdolnych do przełamania odporności genu *Rpi-phu1* (MP324 i MP1498), obserwowano niski i stabilny poziom ekspresji *Rpi-phu1* we wszystkich testowanych genotypach (Rys. 1A i 1C). Inokulacja izolatami MP324x i MP1580 doprowadziła do infekcji genotypów 04-IX-21 i Z11 a także wzrostu poziomu transkrypcji genu *Rpi-phu1* począwszy od drugiego do piątego dnia po inokulacji (Rys. 1B i 1D). Niezainfekowany genotyp Z5 z dwoma genami odporności wykazywał stały poziom transkryptu *Rpi-phu1* (Rys. 1).



Rys. 1. Ekspresja względna genu odporności *Rpi-phu1* w liniach ziemniaka z genem *Rpi-phu1* (linie 04-IX-21 i Z11) oraz z genami *Rpi-phu1* i *Rpi-Smiral* (linia Z5) inokulowanych wirulentnymi (MP1580 i MP324x) i awirulentnymi (MP1498 i MP324) izolatami *P. infestans*. Poziom ekspresji względnej mierzono jako stosunek cykli kwantyfikacyjnych (Cq) genu *Rpi-phu1* i referencyjnego genu α -*tubuliny* metodą $\Delta\Delta Cq$ przed inokulacją i w każdym z pięciu dni po inokulacji. Symbolem „*” oznaczono różnice statystycznie istotne według testu Duncana ($\alpha = 0,05$) przeprowadzonego dla każdego z izolatów *P. infestans* osobno.

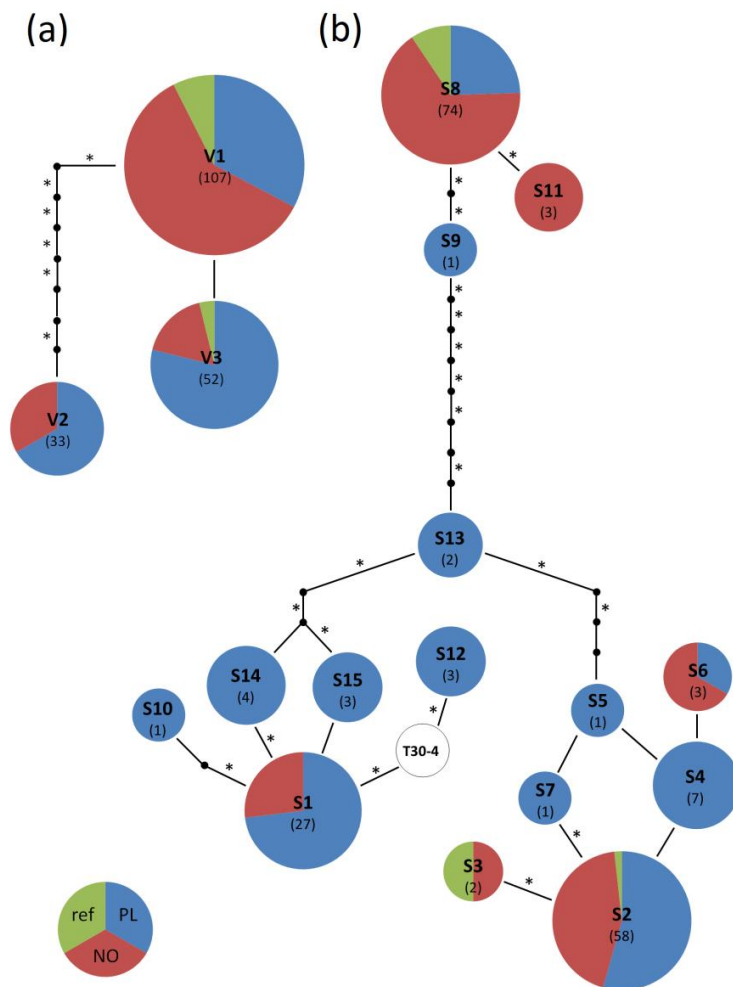
W tym samym układzie eksperymentalnym przeprowadzono pomiar ekspresji trzech efektorów *P. infestans*: *Avr-vnt1*, *AvrSmiral* oraz *Avr8* rozpoznawanych odpowiednio przez produkty genów odporności *Rpi-phu1*, *Rpi-Smiral* oraz *R8* (homolog genu *Rpi-Smira2*). W kombinacjach, w których nie doszło do infekcji (linia Z5 inokulowana każdym z czterech izolatów *P. infestans* oraz linie 04-IX-21 i Z11 inokulowane MP324 i MP1498) analiza ekspresji efektorów nie powiodła się. Najprawdopodobniej wynikało to z braku żywego patogenu w próbach, na co wskazywał brak ekspresji genu metabolizmu podstawowego *P. infestans* użytego jako gen referencyjny. W każdym z pozostałych układów, poziom transkrypcji *AvrSmiral* był najwyższy spośród testowanych efektorów (Rys. 2). Efektor *Avr8* posiadał wzór ekspresji przypominający wzór *AvrSmiral*, lecz ulegał niższej ekspresji. Transkrybowany na niskim poziomie efektor *Avr-vnt1* był niewykrywalny w pierwszych dwóch dniach testu

w przypadku interakcji z genotypami ziemniaka posiadającymi gen *Rpi-phu1* (Rys. 2). Jako wewnętrzną kontrolę eksperymentu, zastosowano pomiar ekspresji efektoru *Avr3a* w izolatach MP324x i MP1580 użytych do inokulacji odmiany Craigs Royal. Maksimum jego ekspresji obserwowano w dniu trzecim po inokulacji, zgodnie ze wcześniejszymi doniesieniami (Armstrong i in., 2005).



Rys. 2. Ekspresja względna efektorów *Avr-vnt1*, *AvrSmira1* i *Avr8* mierzona w izolatach MP324x (A, C i E) oraz MP1580 *P. infestans* (B, D i F) użytych do inokulacji podatnej odmiany ziemniaka Craigs Royal (A i B) oraz dwóch linii z genem *Rpi-phu1*, 04-IX-21 (C i D) i Z11 (E i F). Poziomą ekspresję względną mierzono jako stosunek cykli kwantyfikacyjnych (Cq) genów efektorowych i referencyjnego genu *czynnika elongacji 2- α* metodą $\Delta\Delta Cq$ w każdym z pięciu dni po inokulacji. Symbolem „*” oznaczono różnice statystycznie istotne według testu Tukeya dla różnych N ($\alpha = 0,05$) przeprowadzonego dla każdego z układów osobno.

W pracy Stefańczyka i in. (2018) badano zróżnicowanie sekwencji genów efektorowych *Avr-vnt1* i *AvrSmira1* rozpoznawanych przez produkty genów odporności *Rpi-phu1* i *Rpi-Smira1*. Materiał stanowiły izolaty *P. infestans* pochodzące z Polski (49 izolatów), Norwegii (42) oraz referencyjne (5). Sekwencjonowanie genów obydwu efektorów wykazało 20 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (w tym 13 niesynonimicznych) tworzących 15 alleli efektoru *AvrSmira1* oraz dziewięć polimorfizmów w trzech allelach efektoru *Avr-vnt1* (Rys. 3).



Rys. 3. Sieć powiązań alleli efektorów *Avr-vnt1* (a, oznaczone V1-V3) i *AvrSmira1* (b, oznaczone S1-S15). Wielkość okręgów jest proporcjonalna do częstości alleli, a różnymi kolorami oznaczono ich pochodzenie (PL - Polska, NO - Norwegia, ref - izolaty referencyjne). W nawiasach podano liczbę sekwencji danego allelu. Czarne punkty symbolizują hipotetyczne, brakujące allele. Mutacje synonimiczne i niesynonimiczne oznaczone są, odpowiednio, liniami i liniami z gwiazdką. Sekwencja *AvrSmira1* z izolatu referencyjnego T30-4 *P. infestans* oznaczono „T30-4”.

Zróznicowanie sekwencji obu efektorów było wyższe wśród polskich izolatów *P. infestans* w porównaniu z izolatami norweskimi. Najsilniej zróżnicowana była część C-końcowa efektorów, biorąca udział w oddziaływaniu z gospodarzem, w której 14 i sześć pozycji aminokwasowych efektorów AvrSmira1 i Avr-vnt1 podlegało działaniu doboru wg przeprowadzonych testów na selekcję. Nie stwierdzono powiązania pomiędzy allelami efektora Avr-vnt1, a wirulencją posiadających je izolatów *P. infestans* na roślinach z genem *Rpi-phu1*. Jak postulowali Rietman i in. (2012), za unikanie rozpoznania efektora AvrSmira1 przez białko Rpi-Smira1 może być odpowiedzialny polimorfizm w pozycjach 156 i 170, gdyż białko AvrSmira1 z aminokwasami M¹⁵⁶ i R¹⁷⁰ było obecne wyłącznie w trzech wirulentnych izolatach. Wykryto jednak 26 izolatów *P. infestans* wirulentnych wobec odmiany Sárpo Mira, które posiadały inną kombinację aminokwasów w pozycjach 156 i 170. Obserwacja ta wskazuje na istnienie większej liczby sposobów unikania rozpoznania przez Rpi-Smira1.

Na podstawie uzyskanych wyników, potwierdzono hipotezę o tym że, zróżnicowanie sekwencji DNA efektora AvrSmira1 oraz poziom ekspresji genu Avr-vnt1 mają decydujące znaczenie dla rozwoju infekcji powodowanych przez *P. infestans* na roślinach ziemniaka z genami odporności, których produkty rozpoznają efekторы.

WNIOSKI

1. Wyizolowane z bulw ziemniaka z objawami suchej zgnilizny bulw izolaty *Fusarium* należały do 12 gatunków *Fusarium*. Przynależność gatunkowa grzybów tego rodzaju nie jest wystarczająca do określenia ich patogeniczności względem bulw ziemniaka, ponieważ w czterech patogenicznych gatunkach zaobserwowano również izolaty niepatogeniczne.
2. Nie stwierdzono, aby potencjalna zdolność do syntezy wybranych mykotoksyn była związana ze zdolnością izolatów *Fusarium* do wywoływania suchej zgnilizny bulw ziemniaka, ponieważ wśród czterech najbardziej patogenicznych gatunków zidentyfikowano zarówno potencjalnych producentów trichotecenów i/lub zearalenonu, jak i gatunki niezdolne do syntezy żadnej z tych toksyn.
3. Wykazano zróżnicowanie ekspresji genu *Rpi-phu1* w zależności od wyniku interakcji patogen-gospodarz. W porównaniu do roślin odpornych, w roślinach zainfekowanych poziom transkryptu genu *R* wzrastał w kolejnych dniach po inokulacji.

Obserwacja ta może być przejawem obrony gospodarza przed patogenem i, w warunkach polowych o niższej presji infekcyjnej niż w teście laboratoryjnym, może mieć istotne znaczenie dla odporności roślin.

4. Badania ekspresji genów efektorowych *P. infestans* w trakcie interakcji patogen-gospodarz wykazały, że mechanizm unikania rozpoznania w przypadku efektora *Avr-vnt1* powiązany jest z brakiem jego transkrypcji w biotroficznej fazie infekcji. Zdolności tej nie udało się powiązać z sekwencją kodującą efektor *Avr-vnt1* w żadnym z czterech izolatów *P. infestans* użytych w testach listkowych, jak również w grupie poszerzonej o 49 polskich, 42 norweskie i pięć referencyjnych izolatów.
5. Obecność aminokwasów M¹⁵⁶ i R¹⁷⁰ w białku *AvrSmira1* może być związana z wirulencją (występuje wyłącznie u izolatów wirulentnych na roślinach z genem *Rpi-Smira1*), ale nie stanowi jedyne mechanizmu unikania rozpoznania, gdyż zidentyfikowano wirulentne izolaty z innymi aminokwasami w pozycjach 156 i 170.
6. Test czy badane sekwencje efektorowe podlegają doborowi naturalnemu przeprowadzono z użyciem programu omegaMap, który wykazał działanie doboru pozytywnego na, odpowiednio, 14 i sześć pozycji aminokwasowych efektorów *AvrSmira1* i *Avr-vnt1*. Analiza neutralności potwierdziła, że badane geny efektorowe nie są neutralne pod względem doboru.

SPIS LITERATURE

- Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JIB, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Böhme U, Brooks K, Cherevach I, Hamlin N, White B, Fraser A, Lord A, Quail MA, Churcher A, Hall N, Berriman M, Huang S, Kamoun S, Beynon JL, Birch PRJ (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci* 102: 7766–71
- Croll D, McDonald BA (2012) The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. *PLoS Pathog* 8: e1002608
- Cullen DW, Toth IK, Pitkin Y, Boonham N, Walsh K, Barker I, Lees AK (2005) Use of quantitative molecular diagnostic assays to investigate *Fusarium* dry rot in potato stocks and soil. *Phytopathology* 95: 1462–71
- Kamoun S (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic Oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* 44: 41–60
- Palm ME, Gams W, Nirenberg HI (1995) *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. *Mycologia* 87: 397–406
- Rietman H, Bijsterbosch G, Cano LM, Lee HR, Vossen JH, Jacobsen E, Visser RG, Kamoun S, Vleeshouwers VG (2012) Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sárpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 910–9
- Sandoval-Denis M, Crous PW (2018) Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora*. *Persoonia* 41: 109–29