

AUTOREFERAT

1. **Imię i nazwisko:** Jadwiga Śliwka

2. **Posiadane dyplomy/stopnie naukowe:**

- 18.06.2001 Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
tytuł magistra biologii –z wyróżnieniem
praca magisterska pod kierunkiem prof. dr. hab. S. Więckowskiego, pt.: „Izoformy oksydoreduktazy ferredoksyna: NADP⁺”
- 14.12.2005 Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików
stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii – z wyróżnieniem
praca doktorska pod kierunkiem dr. hab. W. Marczewskiego, pt.: „Charakterystyka odporności na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary liści i bulw ziemniaka w wybranych populacjach diploidalnych mieszańców *Solanum tuberosum* L.”

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

- Od 1 lipca 2001 – do chwili obecnej jestem zatrudniona w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin -PIB, Oddział Młochów, na stanowiskach kolejno: stażysty, pracownika inżyniersko-technicznego, asystenta i adiunkta.
- 15.01.08-15.11.08 staż podoktorski w laboratorium prof. J. Jonesa, The Sainsbury Laboratory, Norwich, Wielka Brytania
- Od 1 czerwca 2009 - do chwili obecnej w IHAR-PIB Młochów pełnię funkcję kierownika Pracowni Badania Odporności Ziemniaka na Grzyby i Bakterie

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) Tytuł osiągnięcia:

Identyfikacja i charakterystyka ekspresji genów odporności na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary oraz ich wykorzystanie w hodowli ziemniaka uprawnego *Solanum tuberosum* L.

b) osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl następujących publikacji:

H1 van Poppel P.M.J.A., Jiang R.H.Y, **Śliwka J.**, Govers F. 2009. Recognition of *Phytophthora infestans* Avr4 by potato R4 is triggered by C-terminal domains comprising W motifs. Mol. Plant Pathol. 10: 611-620. (IF=3,455; MNiSW=40)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu eksperymentów, klonowaniu domen Avr4, ocenie reakcji roślin na uzyskane konstrukty, analizie danych i interpretacji wyników, udziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

H2 **Śliwka J.**, Jakuczun H., Kamiński P., Zimnoch-Guzowska E. 2010. Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying *Rpi-phu1*, a major gene for

resistance to *Phytophthora infestans*. J. Appl. Genet. 51(2): 133–140. (IF=1,482; MNiSW=20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, wykonaniu testów PCR, ocenie odporności na P. infestans, analizie danych i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

H3 Śliwka J., Jakuczun H., Chmielarz M., Hara-Skrzypiec A., Tomczyńska I., Kilian A., Zimnoch-Guzowska E. 2012. A new resistance gene against potato late blight originating from *Solanum x michoacanum* maps to potato chromosome VII. Theor. Appl. Genet. 124:397–406. (IF=3,298¹; MNiSW=40)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, wykonaniu testów PCR, ocenie odporności na P. infestans, analizie danych, konstrukcji mapy genetycznej i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

H4 Śliwka J., Jakuczun H., Chmielarz M., Hara-Skrzypiec A., Tomczyńska I., Kilian A., Zimnoch-Guzowska E. 2012. Late blight resistance gene from *Solanum ruiz-ceballosii* is located on potato chromosome X and linked to violet flower colour. BMC Genet. 13 (1): 11 (IF=2,475¹; MNiSW=20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, wykonaniu testów PCR, ocenie odporności na P. infestans, analizie danych, konstrukcji mapy genetycznej i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H5 Śliwka J., Świątek M., Tomczyńska I., Stefańczyk E., Chmielarz M., Zimnoch-Guzowska E. 2012. Influence of genetic background and plant's age on expression of potato late blight resistance gene *Rpi-phu1* during incompatible interaction with pathogen. Plant Pathology, DOI: 10.1111/ppa.12018 (w druku) (IF=2,125¹; MNiSW=40)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, analizie danych i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

¹podano IF z roku 2011, gdyż dane za rok 2012 nie były jeszcze dostępne.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) jest po ryżu, pszenicy i kukurydzy czwartą najważniejszą rośliną uprawną na świecie. Jego znaczenie wzrasta zwłaszcza w krajach takich jak Chiny i Indie, które są obecnie dwoma największymi jego producentami na świecie. Polska natomiast z plonem ziemniaka przekraczającym 8 mln t rocznie zajmuje drugie miejsce pod względem wielkości produkcji w Europie (Zgórska 2012). Statystyczny Polak zjadł w 2011 roku 112 kg ziemniaków (Kamiński 2012) i to wysokie spożycie sprawia, że ważne jest, by spożywane ziemniaki były zdrowe, nie tylko wolne od chorób, ale i od pozostałości pestycydów stosowanych do ich zwalczania.

Pod względem ekonomicznym, najważniejszą chorobą ziemniaka jest zaraza ziemniaka powodowana przez organizm z grupy *Chromista*, gromady *Oomycetes* – *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Patogen ten rozprzestrzenił się z Ameryki Południowej w ślad za ziemniakiem, wszędzie tam, gdzie ziemniaki są uprawiane. W latach 1840. pierwsza epidemia zarazy ziemniaka w Europie przyniosła klęskę znaną jako Wielki Głód. W Irlandii milion osób zmarło z głodu, a 1,5 miliona było zmuszone do emigracji (Ristaino et al. 2001). Obecnie, łączny koszt ochrony chemicznej przed zarazą ziemniaka oraz strat przez nią powodowanych jest szacowany w Europie na ponad 1 mld euro rocznie (Haverkort et al. 2008). W chłodnym i wilgotnym sezonie wegetacyjnym skuteczna ochrona chemiczna przeciw zarazie ziemniaka może wymagać zastosowania nawet kilkunastu zabiegów, co nie pozostaje obojętne dla środowiska. Alternatywą dla ochrony chemicznej, jest uprawa odpornych na *P. infestans* odmian ziemniaka, która przyczynia się do zwalczania zarazy ziemniaka w sposób przyjazny dla środowiska. Korzyści odnieśliby także konsumenci, którzy coraz częściej poszukują produktów spożywczych uzyskanych w ekologicznym systemie uprawy, bez użycia pestycydów.

Uzyskanie ziemniaków odpornych na *P. infestans* stało się jednym z głównych celów hodowli, zwłaszcza przed wynalezieniem chemicznych środków ochrony. Na początku XX wieku odkryto w dzikim gatunku *S. demissum* 11 genów głównych odporności (*R*) na *P. infestans*, nazwanych *R1* do *R11*, które wkrótce zaczęły być wprowadzane do odmian ziemniaka. Powstały m.in. szkockie odmiany Pentland Dell (z genami *R1*, *R2*, *R3*) i Maris Peer (*R1*, *R2*) oraz polska odmiana Epoka (*R3*, *R4*), które początkowo były odporne, jednak wskutek rozprzestrzenienia się izolatów *P. infestans* posiadających odpowiednie czynniki wirulencji przestały być odporne (Malcolmson, 1969; Rudkiewicz, 1985). Fakt, że odporność warunkowana genami *R* okazała się nie być trwałą, skłonił hodowców do zainteresowania się odpornością ilościową, warunkowaną poligenicznie. Ten rodzaj odporności na *P. infestans* jest jednak trudniejszy we wprowadzaniu do linii hodowlanych, a także związany z niepożądanym, długim okresem wegetacji ziemniaków. W konsekwencji, nadal brakuje odmian ziemniaka odpornych na *P. infestans*, które odnosiłyby sukces komercyjny.

Ten brak osiągnięć hodowli opartej o odporność polową w kontekście produkcji towarowej spowodował ponowny wzrost zainteresowania genami *R*. Produkty genów *R*, oddziałując pośrednio lub bezpośrednio z białkami patogena zwanymi czynnikami awirulencji lub efektorami, inicjują specyficzne reakcje odpornościowe prowadzące do tzw. reakcji nadwrażliwości, czyli śmierci zainfekowanych komórek i tym samym

uniemożliwiając rozprzestrzenianie się patogenów bio- lub hemibiotroficznych, w tym *P. infestans* (Dangl i Jones 2001). Dominuje pogląd, że geny *R* warunkują trwalszą odporność roślin, kiedy są aktywowane przez konserwatywne, kluczowe dla patogena efekторы, które ulegają tylko niewielkim ewolucyjnym modyfikacjom. Uważa się także, że wykorzystanie wielu genów odporności jednocześnie w jednej roślinie (piramidyzacja) lub w mieszaninie linii wyposażonych w różne geny, może poprawić ich skuteczność i trwałość, sprawiając, że trudniej będzie populacji organizmu patogenicznego "przełamać" odporność warunkowaną przez łączne działanie szeregu genów (Pink i Puddephat, 1999). Teorie te były inspiracją do poszukiwań nowych genów *R*, warunkujących odporność na zarazę ziemniaka i zaowocowały w ostatnich latach identyfikacją ok. 50 genów *R* (Śliwka i Zimnoch-Guzowska 2013).

Publikacje wchodzące w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego dotyczą genów odporności na *P. infestans* na różnych etapach ich wprowadzania do hodowli ziemniaka i obejmują: identyfikację nowych genów *R*: *Rpi-mch1* i *Rpi-rzc1* (**H3** i **H4**, punkt 4 autoreferatu), selekcję zaawansowanych linii hodowlanych wyposażonych w gen *Rpi-phu1* przy wykorzystaniu markerów molekularnych (**H2**), charakterystykę ekspresji genu *Rpi-phu1* w różnych liniach ziemniaka o zróżnicowanym tle genetycznym i stadium rozwoju roślin (**H5**) oraz charakterystykę funkcjonalną efektora, który powoduje aktywację produktu genu odporności *R4* na *P. infestans* (**H1**).

Identyfikacja genów *Rpi-mch1* i *Rpi-rzc1* odporności na *P. infestans* oraz poznanie ich położenia na mapie genetycznej ziemniaka są przedmiotem dwóch publikacji, w których jestem pierwszym wykonawcą i autorem korespondującym (**H3** i **H4**; Śliwka et al. 2012a i b). Źródłem obydwu genów były odporne klony dzikich gatunków z rodzaju *Solanum*, spokrewnione z ziemniakiem uprawnym. Klony te zostały wyselekcjonowane w IHAR-PIB Młochów spośród roślin pochodzących z unikatowej kolekcji Wawiłowa WIR w Sankt Petersburgu. Geny *Rpi-mch1* i *Rpi-rzc1* zlokalizowano na mapie genetycznej ziemniaka diploidalnego, przy wykorzystaniu technologii Diversity Array Technology (DArT). **To pierwsze mapy genetyczne *Solanum* sp. skonstruowane z użyciem markerów DArT opublikowane w czasopiśmie naukowym.** Uzyskane dane o lokalizacji genomowej markerów typu DArT są bardzo przydatne w badaniach genetycznych prowadzonych w ramach innych projektów badawczych.

Gen *Rpi-mch1* został zidentyfikowany w *Solanum* × *michoacanum* (Śliwka et al. 2012a; **H3**), diploidalnym gatunku spokrewnionym z ziemniakiem, lecz nie krzyżującym

się z nim z powodu niekompatybilnej ploidalności bielma. *S. michoacanum* pochodzi ze stanu Michoacán w Meksyku i jest uważany za naturalnego mieszańca międzygatunkowego *S. bulbocastanum* × *S. pinnatisectum* (Hawkes 1990). Obydwa gatunki rodzicielskie *S. michoacanum* były opisywane jako źródła odporności na *P. infestans* (Kuhl et al. 2001; Naess et al. 2001). Populację mapującą stanowiły 164 osobniki pokolenia F₁ uzyskane ze skrzyżowania odpornego i podatnego na *P. infestans* klonu *S. michoacanum*. Odporność form rodzicielskich, osobników populacji mapującej i odmian wzorcowych była testowana przy użyciu dwóch różnych izolatów *P. infestans* w badaniach laboratoryjnych na odciętych liściach, w dwóch kolejnych latach (2009 i 2010). Mapa genetyczna form rodzicielskich została skonstruowana na podstawie analizy sprzężeń 798 markerów DArT i 48 markerów o znanej lokalizacji na chromosomach ziemniaka. Gen *Rpi-mch1* został zlokalizowany na chromosomie VII genomu ziemniaka. Marker C2_At1g53670 jest położony w odległości 6,3 cM od genu *Rpi-mch1* i można mu przypisać ponad 80% zmienności obserwowanej w wynikach testów odporności. Gen *Rpi-mch1* nie może zostać przeniesiony bezpośrednio do puli genetycznej ziemniaka przez krzyżowanie, jednak może stać się przydatny dla hodowli innymi drogami. Jestem współautorem badań, które dotyczą introgresji tej odporności do puli hodowlanej ziemniaka przez hybrydyzację somatyczną (Smyda et al. online), a także izolacji genu *Rpi-mch1* z użyciem sekwencjonowania nowej generacji. Badania związane z izolacją genu są wykonywane ramach mojej współpracy z The Sainsbury Laboratory w Wielkiej Brytanii. To podejście może dać szansę na wprowadzenie genu *Rpi-mch1* do ziemniaka uprawnego metodą cisgenezy. Znajomość położenia genu *Rpi-mch1* i sprzężonych z nim markerów molekularnych stanowią ważne narzędzie jego introgresji metodami konwencjonalną i molekularną. Gen *Rpi-mch1* może być cenny dla hodowli, a zwłaszcza w uzyskiwaniu piramid genów odporności, gdyż jest położony w *locus*, w którym zidentyfikowano do tej pory jedynie gen *Rpi1* odporności na *P. infestans* pochodzący z *S. pinnatisectum* (Kuhl et al. 2001). Gen ten nie był dotychczas wykorzystywany w hodowli. Gen *Rpi-mch1* z powodu swojego położenia może być odmienny i odpowiadać na inne efekторы niż pozostałe znane geny odporności na zarazę ziemniaka, a w konsekwencji zapewniać trwalszą odporność ziemniaka na tę chorobę.

Gen *Rpi-rzc1* pochodzący z *S. ruiz-ceballosii* to drugi gen odporności na *P. infestans* zmapowany przy użyciu markerów DArT (Śliwka et al. 2012b, **H4**). Gen ten został zidentyfikowany w gatunku pochodzącym z terenów Peru i Boliwii, znanym także pod nazwą *S. sparsipilum* i krzyżującym się z ziemniakiem uprawnym. W związku z tym, do

mapowania genu użyto w charakterze populacji mapującej 114 diploidalnych osobników F_1 z międzygatunkowego krzyżowania odpornego klonu *S. ruiz-ceballosii* z dihaploidem odmiany ziemniaka Balbina. Osobniki populacji mapującej były oceniane pod względem odporności na *P. infestans* w laboratoryjnych testach listkowych i plasterów bulw w trzech sezonach wegetacyjnych. Mapa genetyczna form rodzicielskich o łącznej długości 1204 cM została skonstruowana z 1603 markerów DArT i 48 markerów specyficznych dla sekwencji z poszczególnych chromosomów ziemniaka. Gen *Rpi-rzc1* został zmapowany na chromosomie X genomu ziemniaka, zaś najbliższy położony marker molekularny T1521 był oddalony od genu o 6,1 cM. W *locus* tym zostały wcześniej zmapowane dwa geny odporności na *P. infestans* pochodzące z *S. berthaultii* (Ewing et al. 2000; Rauscher et al. 2006, Park et al. 2009) oraz odporność ilościowa z *S. sparsipilum* (Danan et al. 2009).

Populację mapującą dH Balbina \times *S. ruiz-ceballosii* wykorzystaliśmy do identyfikacji czynników genetycznych warunkujących barwę kwiatów. Rodzic odporny populacji, *S. ruiz-ceballosii*, posiadał kwiaty jasnofioletowe, podczas gdy dH Balbina – kwiaty białe. Wśród potomstwa odnotowano osobniki o kwiatach białych, jasnofioletowych, fioletowych i ciemnofioletowych, przy czym osobniki o kwiatach białych były podatne na *P. infestans*. Sprzężenie barwy kwiatów z odpornością wynika z położenia genu *Rpi-rzc1* w odległości 3,4 cM od *locus F* odpowiadającego za tę cechę (van Eck et al. 1993; van Eck et al. 1994). Dzięki temu barwa kwiatów może służyć jako użyteczny marker fenotypowy odporności, któremu w populacji mapującej można było przypisać 87 lub 85% zmienności obserwowanej w wynikach testów odporności na zarazę ziemniaka, odpowiednio listkowych i plasterowych. Gen *Rpi-rzc1* zapewnia wysoką odporność zarówno liści, jak i bulw, został już wprowadzony do puli genetycznej ziemniaka uprawnego na poziomie diploidalnym i może być stosowany w hodowli z wykorzystaniem do selekcji markerów molekularnych, a w pewnych kombinacjach rodzicielskich –fenotypowego markera, czyli barwy kwiatów.

Efektom prac nad wykorzystaniem w hodowli ziemniaka genu *Rpi-phu1* odporności na *P. infestans* są kolejne dwie publikacje, w których jestem pierwszym wykonawcą i autorem korespondującym (**H2**, Śliwka et al. 2010 i **H5**, Śliwka et al. 2013). Gen ten, warunkujący wysoką odporność na zarazę ziemniaka naci i bulw został wprowadzony do ziemniaka uprawnego z gatunku *S. phureja* przez krzyżowanie na poziomie diploidalnym. Następnie został zmapowany na chromosomie IX ziemniaka, wykazano też, że nie jest on związany z niepożądanym, długim okresem wegetacji (Śliwka et al. 2006). W wyniku mojej współpracy z The Sainsbury Laboratory poznano sekwencję nukleotydową *Rpi-*

phu1, która okazała się być identyczna z sekwencją genu *Rpi-vnt1* pochodzącego z *S. venturii* i typową dla genów *R* (Foster et al. 2009). Gen *Rpi-phu1* został przeniesiony na poziom tetraploidalny i w wyselekcjonowanych liniach przekazany do spółki hodowlanej Zamarte Hodowla Ziemniaka Sp. z o.o. do wykorzystania w programach hodowlanych, przy użyciu markera GP94 jako narzędzia selekcyjnego. Przydatność markera GP94 do selekcji osobników z genem *Rpi-phu1* wykazano w dwóch segregujących populacjach diploidalnych oraz populacji tetraploidalnej (łącznie 379 osobników), w których oceniono odporność na *P. infestans* w testach listkowych i genotyp pod względem obecności markera (**H2**). Sprzężenie markera z genem *Rpi-phu1* potwierdzono także w 126 diploidalnych i 20 tetraploidalnych liniach ziemniaka o zróżnicowanym tle genetycznym. Wykazano, że charakterystyczny dla obecności genu odporności allel markera GP94 jest stosunkowo rzadki w puli genetycznej ziemniaka uprawnego, gdyż został wykryty w jedynie w trzech spośród 43 testowanych różnorodnych odmian ziemniaka. Wśród mieszańców międzygatunkowych z udziałem *S. kurtzianum* i *S. ruiz-ceballosii* allel ten był wykrywany pod nieobecność genu *Rpi-phu1*, co może świadczyć o obecności homologów genu w tych formach. Marker GP94 był także użyty w selekcji w dwóch potomstwach uzyskanych w celach komercyjnych w Zamarte Hodowla Ziemniaka Sp. z o.o. (**H2**).

Odporność na *P. infestans* różnorodnych, wyselekcjonowanych linii hodowlanych ziemniaka posiadających gen *Rpi-phu1* była testowana także w testach polowych, przy silnej naturalnej presji infekcyjnej. Rośliny takie pozostawały bardzo odporne i nie wykazywały żadnych objawów choroby. W roku 2009 pod koniec sezonu wegetacyjnego odnotowano po raz pierwszy objawy zarazy ziemniaka na roślinach z genem *Rpi-phu1* (**H5**). Z porażonych liści uzyskano izolaty *P. infestans*, m. in. izolat MP1162. Izolat ten użyto w laboratoryjnych testach na listkach odciętych z roślin z genem *Rpi-phu1*, gdzie nie uzyskano porażenia. Wynik ten dał początek hipotezie, że objawy obserwowane w polu, nie były spowodowane przez zmutowany, wirulentny izolat *P. infestans*, ale że być może w starzejących się roślinach, kiedy bulwy już dojrzewają, następuje zanik bądź obniżenie ekspresji genu odporności. Rośliny przestają inwestować energię w obronę części nadziemnych, które stają się podatne. By przetestować tę hipotezę wykorzystano dostępną od niedawna sekwencję genu *Rpi-phu1/Rpi-vnt1.1* (Foster et al. 2009) i przeprowadzono analizy qRT-PCR ekspresji względnej genu *Rpi-phu1* przed i 1, 3, 5 dni po kontakcie rośliny z patogenem, w roślinach wybranej linii hodowlanej o różnym wieku oraz w roślinach o różnym tle genetycznym, di- i tetraploidalnych (**H5**). Zastosowano izolat *P. infestans* MP324, który nie poraża roślin z genem *Rpi-phu1*. Wszystkie badane rośliny

były odporne, bez względu na genotyp i wiek. Nie wykryto istotnych zmian w poziomie transkryptu *Rpi-phu1* w roślinach tetraploidalnych po inokulacji *P. infestans*. Jednak w roślinach diploidalnych poziom transkryptu genu *Rpi-phu1* wzrastał istotnie po kontakcie z patogenem. Większy udział genomu dzikiego donora genu odporności w roślinach diploidalnych być może leży u podłoża tych różnic, ponieważ wraz ze wzrostem udziału dzikiego genomu wzrasta prawdopodobieństwo wystąpienia alleli genów regulatorowych, które wyewoluowały wraz z genem *Rpi-phu1* i wpływają na zmiany poziomu jego ekspresji. Wśród roślin badanych w różnych fazach rozwojowych, wyróżniały się rośliny 3-tygodniowe, które miały statystycznie istotnie niższy poziom ekspresji genu *Rpi-phu1* przed inokulacją niż rośliny 6-, 9- i 12-tygodniowe. Pierwszego dnia po inokulacji różnica ta była jednak rekompensowana przez istotny wzrost ekspresji genu odporności u roślin 3-tygodniowych. Opisane badania nie wyjaśniły zjawiska skutecznej infekcji roślin z genem *Rpi-phu1* przez awirulentny izolat w warunkach polowych u schyłku sezonu. Być może ważne są tu czynniki takie jak stała obecność zarodników *P. infestans* w warunkach naturalnych, obecność innych patogenów lub stresy abiotyczne, na które narażone są rośliny w polu. Obecnie, zespół, którym kieruję kontynuuje badania, w celu oszacowania wpływu długości dnia na profil ekspresji genu *Rpi-phu1*.

Dla wyniku interakcji rośliny z patogenem, równie ważne jak obecność i ekspresja genów *R*, są efekторы produkowane przez organizm chorobotwórczy, ich zmienność i zdolność do bezpośredniej lub pośredniej aktywacji białek *R*. W ramach projektu badawczego UE BioExploit miałam okazję wziąć udział w pracach nad efektozem *P. infestans* prowadzonych w laboratorium prof. Francine Govers na Uniwersytecie w Wageningen w Holandii. Efektor Avr4 *P. infestans* powoduje reakcję nadwrażliwości u roślin ziemniaka z genem *R4* z *S. demissum* i należy do klasycznej rodziny efektorów RXLR-dEER (van Poppel et al. 2008). Poza domeną zawierającą motywy RXLR i dEER, które są odpowiedzialne za dostarczenie efektoru do komórki gospodarza, w białku PiAvr4 zidentyfikowano trzy motywy tryptofanowe (W1-W3) i jeden tyrozynowy (Y) na końcu C (van Poppel et al. 2009, **H1**). By zbadać funkcje poszczególnych motywów białka PiAvr4, utworzono serię binarnych konstruktów DNA opartych o sekwencję nukleotydową wirusa X ziemniaka (PVX) i zawierających poszczególne motywy pojedynczo i w kilku kombinacjach. Konstrukty te wprowadzono do wektora pGR106, a następnie za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*, do roślin posiadających gen *R4* oraz podatnych roślin kontrolnych odmiany ziemniaka Bintje. W ten sposób wykazano, że do wywołania nekrotycznej reakcji u roślin z genem *R4* niezbędny jest motyw W2 PiAvr4 w

połączeniu z motywem W1 lub W3. Ponadto, analiza sekwencji *PiAvr4* wykazała obecność sześciu homologów tego genu w *P. infestans*, jednego w *Phytophthora ramorum* i siedmiu w *Phytophthora sojae*. Bardzo zbliżony homolog wykryto także w *Phytophthora mirabilis*. Ten ostatni, w testach takich jak opisane powyżej, wywoływał specyficzną reakcję nekrotyczną u roślin z genem *R4*, podobnie jak *PiAvr4*. Praca ta przyczyniła się do lepszego poznania mechanizmu aktywacji białka R przez efektor, zidentyfikowano kluczowe elementy efektora, których mutacje mogą prowadzić do nabywania przez *P. infestans* zdolności do infekcji roślin z danym genem odporności (**H1**).

Podsumowanie

Pięć publikacji stanowiących moją rozprawę habilitacyjną obejmuje wyniki badań nad odpornością ziemniaka na *P. infestans* warunkowaną przez cztery geny *R*. Efektem badań są:

- identyfikacja i zmapowanie dwóch nowych genów odporności (*Rpi-mch1* i *Rpi-rzc1*)
- konstrukcja pierwszych map genetycznych gatunków *Solanum* z użyciem markerów DArT
- wprowadzanie do hodowli ziemniaka uprawnego genu *Rpi-phu1*
- opracowanie markera GP94 i określenie jego przydatności do selekcji form odpornych na *P. infestans* z genem *Rpi-phu1*
- charakterystyka ekspresji genu *Rpi-phu1*
- poznanie molekularnego podłoża działania genu *R4*, odporności na *P. infestans*.

Rezultaty badań genetycznych i molekularnych przedstawione w tej pracy mają znaczenie poznawcze i praktyczne. Opracowane mapy DArT ziemniaka mogą być przydatne nie tylko do badań genetycznych ziemniaka, ale także gatunków pokrewnych, np. pomidora. Badane geny są (*Rpi-phu1*) lub mogą być (*Rpi-mch1* i *Rpi-rzc1*) wykorzystane w hodowli ziemniaka odpornego na *P. infestans*. Wiedza o czynnikach molekularnych wpływających na ekspresję genów *R* oraz o funkcji poszczególnych motywów białka efektora przyczynia się do lepszego zrozumienia interakcji roślina - patogen.

Literatura

- Danan S., Chauvin J.-E., Caromel B., Moal J.-D., Pellé R., Lefebvre V. 2009. Major-effect QTLs for stem and foliage resistance to late blight in the wild potato relatives *Solanum sparsipilum* and *S. spegazzinii* are mapped to chromosome X. Theor. Appl. Genet. 119: 705-719

- Dangl J.L., Jones J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833
- Ewing E.E., Šimko I., Smart C.D., Bonierbale M.W., Mizubuti E.S.G., May G.D., Fry W.E. 2000. Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Mol. Breeding* 6: 25-36
- Foster S.J., Park T.-H., Pel M., Brigneti G., Śliwka J., Jagger L., van der Vossen E., Jones J.D. 2009. *Rpi-vnt1.1*, a *Tm-2(2)* homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 589-600
- 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 cost of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res.* 51: 47-57
- Hawkes J.G. 1990. The potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, London, UK
- Kamiński P. 2012. Jak powstrzymać spadkową tendencję powierzchni uprawy ziemniaka w Polsce? *Wieś Jutra* 162/163: 18-20
- Kuhl J.C., Hanneman R.E. Jr., Havey M.J. 2001. Characterization and mapping of *Rpi1*, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol Genet Genomics* 265: 977-985
- Malcolmson J.F. 1969. Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain. *Transactions of the British Mycological Society* 53: 417-423
- Naess S.K., Bradeen J.M., Wielgus S.M., Haberlach G.T., McGrath J.M., Helgeson J.P. 2001. Analysis of the introgression of *Solanum bulbocastanum* DNA into potato breeding lines. *Mol Gen Genom* 265: 694-704
- Park T.-H., Foster S., Brigneti G., Jones J.D.G. 2009. Two distinct potato late blight resistance genes from *Solanum berthaultii* are located on chromosome 10. *Euphytica* 165: 269-278
- Pink D., Puddephat I. 1999. Deployment of disease resistance genes by plant transformation – a ‘mix and match’ approach. *Trends Plant Sci.* 4: 71-75
- Rauscher G.M., Smart C.D., Šimko I., Bonierbale M., Mayton H., Greenland A., Fry W.E. 2006. Characterization and mapping of *R_{Pi-ber}*, a novel potato late blight resistance gene from *Solanum berthaultii*. *Theor. Appl. Genet.* 112: 674-687
- Ristaino J.B., Groves C.T., Parra G.R. 2001. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimen. *Nature* 411: 695-697.
- Rudkiewicz F. 1985. Zaraza ziemniaka (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary). W: Gabriel, W. (red.) *Biologia ziemniaka*. Państwowe Wydawnictwa Naukowe, Warszawa.
- Smyda P., Jakuczun H., Dębski K., Śliwka J., Thieme R., Nachtigall M., Wasilewicz-Flis I., Zimnoch - Guzowska E. 2013. Development of somatic hybrids *Solanum x michoacanum* Bitter. (Rydb.) (+) *S. tuberosum* L. and autofused 4x *S. michoacanum* plants as potential sources of late blight resistance for potato breeding. *Plant Cell Reports*, DOI 10.1007/s00299-013-1422-5
- Śliwka J., Jakuczun H., Lebecka R., Marczewski W., Gebhardt C., Zimnoch-Guzowska E. 2006. The novel, major locus *Rpi-phu1* for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period. *Theor. Appl. Gen.* 113: 685-695
- Śliwka J., Zimnoch-Guzowska E. 2013. Resistance to late blight in potato. In: Tuberosa R, Varshney RK (ed) *Genomics Applications in Plant Breeding*. USA, Wiley-Blackwell Publishers, w druku

- Van Eck H.J., Jacobs J.M.E., van den Berg P.M.M.M., Stiekema W.J., Jacobsen E. 1994. The inheritance of anthocyanin pigmentation in potato (*Solanum tuberosum* L.) and mapping of tuber skin colour loci using RFLPs. *Heredity* 73: 410-421
- Van Eck H.J., Jacobs J.M.E., van Dijk J., Stiekema W.J., Jacobsen E. 1993. Identification and mapping of three flower colour loci of potato (*S. tuberosum* L.) by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 86: 295-300
- van Poppel P.M., Guo J., van de Vondervoort P.J., Jung M.W., Birch P.R., Whisson S.C., Govers F. 2008. *The Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 1460-1470
- Zgórska K. 2012. Wartość odżywcza i cechy jakości ziemniaka konsumpcyjnego. *Więś Jutra* 162/163:24-27

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pierwszą pracę badawczą wykonałam w IV Liceum Ogólnokształcącym w Katowicach, biorąc udział w Olimpiadzie Biologicznej. Praca dotyczyła allelopatycznego działania czosnku na wzrost innych roślin, zaś mój udział w konkursie zakończyłam jako laureatka XXIV (1995) i finalistka XXV Centralnej Olimpiady Biologicznej (1996).

Ukończyłam z wyróżnieniem Uniwersytet Jagielloński w Krakowie na kierunku biologia, broniąc 18 czerwca 2001 pracę magisterską przygotowaną pod kierunkiem prof. dr. hab. S. Więckowskiego, pt.: „Izoformy oksydoreduktazy ferredoksyna: NADP⁺” z wynikiem bardzo dobrym. W czasie studiów wzięłam udział w programie wymiany studentów Socrates i spędziłam sześć miesięcy na Uniwersytecie Walijskim w Bangor, w Wielkiej Brytanii. Oprócz uczestniczenia w zajęciach, wzięłam tam również udział w projekcie badawczym kierowanym przez dr. Davida S. Shawa i poświęconym *Phytophthora infestans*. Badałam m.in. zróżnicowanie genetyczne walijskich izolatów *P. infestans* oraz interakcje tego organizmu z korzeniami roślin ziemniaka i pomidora. Było to moje pierwsze zetknięcie ze sprawcą zarazy ziemniaka, organizmem o fascynującej historii i biologii. Po powrocie do Polski, odszukałam ośrodek naukowy zajmujący się *P. infestans*, czyli IHAR-PIB Młochów i tam aplikowałam o pracę, którą podjęłam 1 lipca 2001.

Pierwszym zagadnieniem, którym zajmowałam się w IHAR-PIB Młochów, była analiza wewnątrzgatunkowego zróżnicowania izolatów *P. infestans* pochodzących z Polski (**Śliwka 2002, Śliwka et al. 2006a, Lebecka et al. 2007, Chmielarz et al. 2010, Sobkowiak et al. 2011 w wykazie literatury**). Zróżnicowanie to było oceniane przy użyciu markerów fenotypowych, takich jak typ kojarzeniowy, odporność na metalaksyl (substancję czynną niektórych środków ochrony chemicznej przeciw zarazie ziemniaka), agresywność i wirulencja, czyli zdolność do porażania określonych genotypów ziemniaka wyposażonych w geny odporności. Wykorzystywaliśmy także markery molekularne: Simple Sequence Repeat

(SSR) i markery haplotypu mitochondrialnego. Badania te są kontynuowane do dziś, obecnie w ramach dwóch zadań Programu Wieloletniego IHAR-PIB finansowanego przez MRiRW. Pełnię funkcję kierownika zadania poświęconego gromadzeniu, przechowywaniu i charakteryzowaniu różnorodnych kolekcji patogenów ziemniaka w oddziałach IHAR-PIB: Młochów, Radzików i Bonin, które zawierają zbiory wirusów, bakterii, grzybów oraz nicieni atakujących ziemniaka, a przede wszystkim kolekcję 1112 izolatów *P. infestans*, które są pod opieką mojej pracowni.

W roku 2005 obroniłam z wyróżnieniem pracę doktorską przygotowaną pod kierunkiem prof. dr hab. W. Marczewskiego pt. „Charakterystyka odporności na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary liści i bulw ziemniaka w wybranych populacjach diploidalnych mieszańców *Solanum tuberosum* L.” Praca ta była poświęcona mapowaniu genu *Rpi-phu1* z *Solanum phureja* warunkującego odporność na *P. infestans* (Śliwka et al. 2006b) oraz *loci* ilościowych wpływających na tę samą cechę pochodzących z *S. verrucosum* i *S. microdontum* (Śliwka et al. 2007). W obu populacjach mapujących oceniano odporność na *P. infestans* liści i bulw ziemniaka, a także długość okresu wegetacji, badając związek odporności ze wczesnością ziemniaka. Część doświadczeń wykonałam w Max Planck Institute for Plant Breeding Research w Kolonii, w Niemczech, pod kierunkiem prof. Christiane Gebhardt, w której laboratorium spędziłam łącznie rok. W roku 2006 pracę tę wyróżnił nagrodą Prezes Rady Ministrów RP.

Skonstruowanie map genetycznych z użyciem populacji mapujących wykorzystanych w doktoracie zaowocowało rozwinięciem kolejnego wątku badawczego. Osobniki tych populacji były oceniane dodatkowo pod względem długości okresu spoczynku bulw, kształtu bulw, regularności zarysu, głębokości oczek i barwy miąższu. Wykonano analizę *loci* leżących u podłoża tych cech ilościowych (Śliwka et al. 2008), co pozwoliło lepiej ocenić efekty wprowadzenia alleli z dzikich gatunków *Solanum* do ziemniaka uprawnego *S. tuberosum*, nie tylko tych pożądaných, jak odporność na zarazę ziemniaka, ale także tych niekorzystnych.

Następnie odbyłam czteromiesięczny staż w laboratorium prof. Francine Govers, w Wageningen, w Holandii, w ramach stypendium projektu badawczego UE BioExploit Training Fellowship. Zajmowałam się tam efektem *P. infestans* Avr4, co jest opisane powyżej jako osiągnięcie habilitacyjne (H1).

Zlokalizowanie w ramach doktoratu genu *Rpi-phu1* na chromosomie IX ziemniaka stało się przyczyną nawiązania współpracy z prof. Jonathanem Jonesem z The Sainsbury Laboratory (TSL) w Norwich, w Wielkiej Brytanii. W jego laboratorium

zidentyfikowano i zmapowano w tym samym regionie, co gen *Rpi-phul*, inny gen odporności na *P. infestans*, pochodzący z *S. venturii* *Rpi-vnt1.1*. W roku 2008 w TSL trwały zaawansowane prace nad poznaniem sekwencji genu *Rpi-vnt1.1*. Postawiliśmy hipotezę, że gen *Rpi-phul* może być homologiczny do genu *Rpi-vnt1.1*, uprawnioną ze względu na fakt, że wiele genów odporności z różnych gatunków *Solanum*, położonych w tych samych miejscach genomów, jest do siebie bardzo podobnych. Dołączyłam do zespołu prof. Jonesa na dziesięć miesięcy, by wykazać, że sekwencja nukleotydowa genu *Rpi-phul* jest tożsama z sekwencją genu *Rpi-vnt1.1* (Foster et al. 2009). W TSL rozpoczęłam także prace nad mapowaniem odporności na zarazę ziemniaka odmiany Sarpo Mira, które kontynuuję do chwili obecnej w IHAR-PIB Młochów.

W roku 2009 po powrocie do IHAR-PIB Młochów, podjęłam prace będące przedmiotem osiągnięcia habilitacyjnego opisanego powyżej: nad selekcją w oparciu o markery osobników z genem *Rpi-phul* (H2), badaniami regulacji ekspresji tego genu (H5) oraz identyfikacją i mapowaniem genów *Rpi-mch1* i *Rpi-rzcl* (H3, H4). Od czerwca 2009 podjęłam także obowiązki kierownika Pracowni Badania Odporności na Grzyby i Baterie.

Ważnym etapem przebiegu mojej pracy naukowej było uzyskanie finansowania projektu LIDER (LIDER/06/82/L-1/09/NCBiR/2010), w ramach którego do niedawna zajmowałam się wraz z zespołem Pracowni mapowaniem odporności na zarazę ziemniaka odmiany Sarpo Mira, łączeniem tej odporności z odpornością warunkowaną genem *Rpi-phul*, w celu osiągnięcia zwiększonej trwałości tej cechy, badaniami ekspresji genu *Rpi-phul* i poszukiwaniem homologów genu *Rpi-phul* w dzikich gatunkach ziemniaka.

Spektrum twórcze moich naukowych zainteresowań obejmuje nie tylko badania związane z odpornością ziemniaka na *P. infestans*. Jestem głównym wykonawcą w projekcie NCN (UMO-2011/01/B/NZ2/00181) dotyczącym identyfikacji czynników genetycznych warunkujących poziom skrobi w ziemniaku. 22 marca 2013 roku decyzją Rady Naukowej IHAR-PIB zostałam promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr A. Hary-Skrzypiec przygotowującej pracę na temat genetycznego podłoża ciemnej plamistości bulw w ziemniaku diploidalnym.

Jadwiga Skrzypiec