



Perspektywy wykorzystania metod biotechnologicznych w walce z pasożytniczymi nicieniami glebowymi

Joanna Dąbrowska, Marcin Filipecki

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Perspectives of biotechnology in the management of plant-parasitic nematodes

Summary

Many laboratories worldwide are involved in the research on effective prevention and management of plant parasitic nematodes. Chemical control of these parasites is very costly and harmful to the environment, though the main strategy is to use resistance genes in breeding programs of crop plants. There is a limited number of naturally occurring resistance genes. Biotechnology can extend the usage of known resistance genes by transferring them to related and unrelated species *via* plant transformation. However, most promising is the development of new resistance strategies based on RNA interference or specific and inducible overexpression of nematocidal genes. Functional analysis of nematode and plant genes that are involved in induction and development of feeding structures can significantly help in engineering of new sources of resistance. Obviously, biotechnology is not the only prospective solution; however, it significantly enriches the breeders' toolbox. On the other hand, biotechnology-based pest management methods have been developed until recently, and often there are some shortcomings associated which require more research and optimization. Moreover, there is a permanent poor acceptance of genetically modified crops especially in Europe, which influences the decisions of policy makers. Nevertheless, recent genome scale experiments promise significant acceleration in the research and create a portfolio of numerous new possibilities.

Key words:

cyst nematodes, root-knot nematodes, pest management, resistance genes, defense response genes, biotechnology methods, RNA interference, plantibodies, promoters.

Adres do korespondencji

Joanna Dąbrowska,
Katedra Genetyki,
Hodowli i Biotechnologii
Roślin,
Wydział Ogrodnictwa
i Architektury Krajobrazu,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159,
02-776 Warszawa;
e-mail:
joanna_dabrowska@sggw.pl

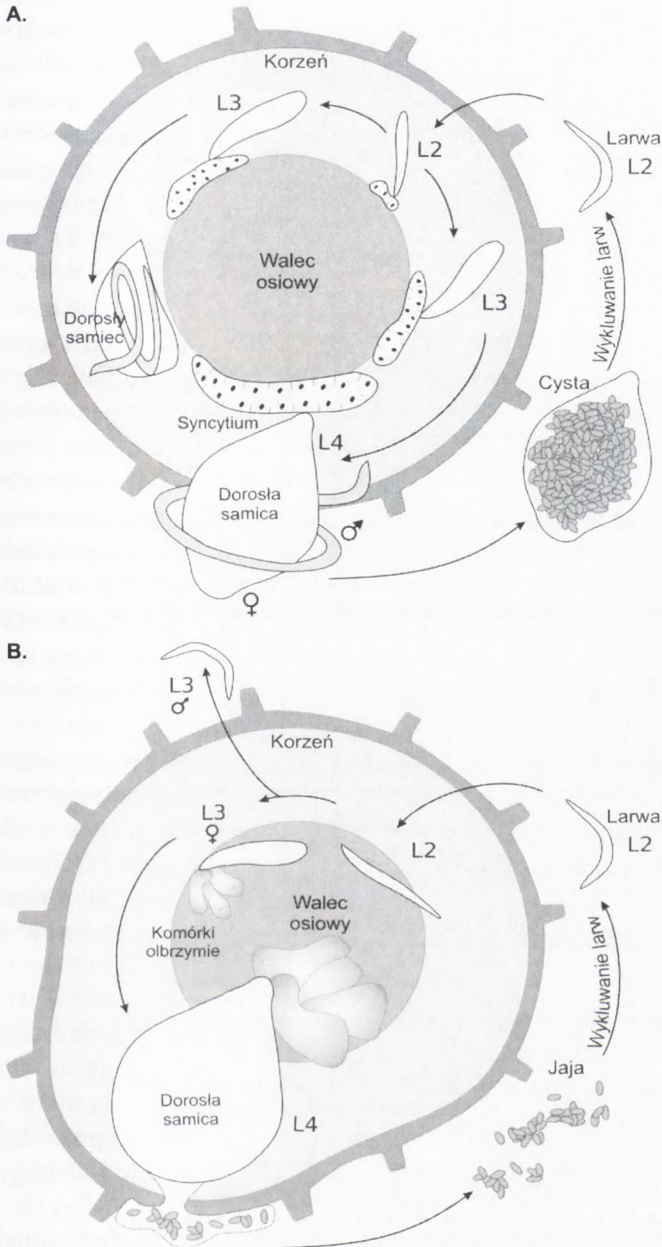
1. Wstęp

Nicenie pasożytnicze roślin, są groźnymi i rozpowszechnionymi we wszystkich strefach klimatycznych szkodnikami roślin uprawnych (1). Chociaż nie wywołują specyficznych objawów, powodują straty w rolnictwie rzędu 125 miliardów dolarów rocznie (2). Chemiczne zwalczanie tych szkodników jest kłopotliwe ze względu na to, że większość z nich żeruje na podziemnych organach roślin, a jaja mogą zalegać w glebie przez dziesiątki lat. Zarówno ograniczony wybór naturalnych źródeł odporności, jak i zróżnicowanie genetyczne szkodnika sprawiają, że duże nadzieje wiąże się z biotechnologicznymi metodami walki z nicieniami.

2. Biologia pasożytniczych nicieni glebowych

Nicenie (robaki obłe) stanowią bardzo liczną grupę gatunków w królestwie zwierząt (3). W badaniach dotyczących analizy porównawczej genomów oraz transkryptomów w obrębie tej gromady dowiedziono, że pomimo jednolitej budowy ciała, nicenie stanowią dalece zróżnicowaną genetycznie grupę organizmów. Dzięki tej różnorodności są to organizmy występujące na całej Ziemi, które doskonale przystosowały się do różnych warunków środowiska oraz trybów życia. Należą do nich organizmy wolno żyjące lądowe, wodne, odżywiające się bakteriami (mikrobionty), odżywiające się grzybami (micetofagi), nicenie drapieżne, pasożyty zwierząt, człowieka oraz roślin. Na podstawie filogenetyki molekularnej, wyróżniamy pięć klas nicieni: Dorylaimia (I), Enoplia (II), Chromadorea – Spirurina (III), Tylenchina (IV), Rhabditina (V) (4). Klasa I, II, III reprezentowana jest przez nicenie będące groźnymi pasożytami zwierząt i ludzi. Klasa IV reprezentowana jest przez nicenie pasożytnicze roślin. Głównymi przedstawicielami tej klasy są nicenie z rodzaju: *Meloidogyne* (guzaki), *Globodera*, *Heterodera* (nicenie cystowe; mątwiki), należące do grupy osiadłych endopasożytów oraz endopasożytnicze nicenie migrujące *Pratylenchus* i *Rhadopholus* (5).

Literatura dotycząca cyklu życiowego nicieni cystowych oraz guzaków jest bogata (6,7). Nicenie należące do tych rodzajów mają bardzo podobne cykle życiowe, w których wyróżniamy cztery stadia larwalne L1-L4 w przypadku nicieni cystowych, pięć stadiów L1-L5 w rozwoju guzaków oraz stadium dojrzałe zdolne do rozrodu. W zależności od warunków środowiska, głównie temperatury gleby, cykl trwa od jednego do trzech miesięcy. Przejście od stadium L1 do L2 zachodzi jeszcze w jajach osłoniętych cystami (mątwiki) lub workami żelatynowymi (guzaki), które znajdują się w glebie. Inwazyjne larwy stadium L2 wykluwają się z jaj w obecności wydzielin korzeniowych gospodarza i są larwami zdolnymi do porażenia korzenia rośliny (8,9). Larwy przedostają się do korzenia od strony strefy elongacji i wędrują wzdłuż walca osiowego, w celu lokalizacji odpowiedniej komórki, która pod wpływem wydzielin gruczołów okologardzielowych daje początek strukturze żywiciel-



Rys. Cykl życiowy pasożytniczych nicieni glebowych: (A) mątwik, (B) guzak (grafika – Magdalena Guzowska-Nowowiejska).

skiej – syncytium, w przypadku mątwików (10) oraz zespołu komórek olbrzymich (ang. *giant cells*), w przypadku guzaków (11). Syncytium to wielojądrowa struktura, która powstaje w wyniku tworzenia się otworów w ścianie komórkowej i zlewania się protoplastów sąsiadujących komórek, natomiast komórki olbrzymie są to zespoły bardzo silnie powiększonych pojedynczych komórek, zawierających liczne jądra komórkowe, które powstały w wyniku acytokinetycznych podziałów komórkowych (12). W czasie całego cyklu rozwojowego nicieni organy te stanowią jedyne źródło substancji pokarmowych, a larwy, które zaindukowały powstawanie struktur żywicielskich tracą zdolności lokomotoryczne i nie mogą zmienić swojego miejsca położenia. Kolonizacja korzenia możliwa jest dzięki enzymom degradującym ścianę komórkową, wydzielanym przez nicienia oraz przez uszkodzenia mechaniczne, larwy posiadają bowiem aparat gębowy zaopatrzone w sztylet, za pomocą którego podczas migracji niszczą komórki (13,14). Płeć nicieni zależna jest od warunków środowiska. W zależności od jakości i ilości pokarmu, inwazyjne larwy rozwijają się w samca bądź samicę (15). Samice mątwików w trakcie rozwoju powiększają swoje rozmiary, przyjmują kulisty kształt, a pod koniec cyklu życiowego ich ciało rozrywa warstwę korową korzenia, wydostając się na zewnątrz. Dojrzałe samice zapładniane są przez samce, które kończą pobieranie pokarmu z syncytium w stadium L3, a wraz z przejściem do stadium dorosłego odzyskują zdolności lokomotoryczne i opuszczają miejsce żerowania. Po zapłodnieniu, w jajach znajdujących się w ciele samicy, rozwijają się larwy L1, z oskórka martwej samicy osłaniającego jaja powstaje ochronna cysta (rys.). Samice guzaków w trakcie rozwoju również powiększają swoje rozmiary, przyjmują gruszkowaty kształt, jednak przez cały cykl życiowy pozostają w korzeniu. Dorosłe samce opuszczają korzeń rośliny, nie odgrywając żadnej roli w reprodukcji. Dojrzałe samice rozmnażają się na drodze partenogenezy, jaja z rozwijającymi się larwami pokolenia L1 deponowane są w workach żelowych, na powierzchni korzenia (16). Zarówno cysty, jak i worki żelowe chronią larwy przed szkodliwymi warunkami środowiska, również przed działaniem nematocydów. Na tym etapie rozwoju larwy są w stanie przetrwać w glebie nawet do 30. lat bez gospodarza (17).

3. Nicienie – szkodniki roślin, znaczenie w rolnictwie

Z ekonomicznego punktu widzenia największe szkody powodują nicienie należące do grupy osiadłych endopasożytów roślin z rodzaju: *Meloidogyne* spp. (guzaki), *Globodera* spp. i *Heterodera* spp. (nicienie cystowe; mątwiki) (2).

Zakres żywicieli guzaków korzeniowych jest szeroki, porażają one tysiące gatunków roślin spośród jedno- lub dwuliściennych, a niekiedy przedstawiciele obydwu tych klas. W Europie stwierdzono występowanie piętnastu gatunków guzaków korzeniowych (18). Wśród nich największe szkody w uprawie ziemniaka powodują: guzak amerykański (*Meloidogyne chitwoodi*) oraz guzak holenderski (*M. fallax*). Ponie-

waż gatunki te należą do trzeciej grupy troficznej, czyli porażają rośliny zarówno jedno-, jak i dwuliścienne, występują również w uprawach zbóż i kukurydzy. Spośród piętnastu gatunków guzaków występujących w Europie, obecność ośmiu z nich stwierdzono na terenie Polski. Wśród nich największe szkody w uprawach szklarniowych wyrządza guzak północny (*M. hapla*) (19). Roślinami żywicielskimi tego nicienia są prawie wszystkie uprawne i dziko rosnące rośliny dwuliścienne, w tym: pomidor, ziemniak, marchew, pietruszka. Trzy kolejne gatunki: guzak arachidowy (*M. arenaria*), guzak południowy (*M. incognita*) oraz guzak jawański (*M. javanica*), znane są jako szkodniki głównie upraw szklarniowych, przede wszystkim ogórka i pomidora.

Spośród nicieni pasożytujących na roślinach na szczególną uwagę zasługują nicienie cystowe. Pasożytują one przede wszystkim na korzeniach roślin, ale mogą porażać inne organy, takie jak bulwy w przypadku mątwika ziemniaczanego (*Globodera rostochiensis*). W przeciwieństwie do guzaków wszystkie gatunki nicieni cystowych mają bardzo wąski zakres żywicieli. Największe szkody w uprawach polowych powodują: pasożytujący na buraku cukrowym – mątwik burakowy (*Heterodera schachtii*), w uprawach ziemniaków – mątwik ziemniaczany i mątwik agresywny (*G. pallida*), porażający soję warzywną – mątwik sojowy (*H. glycines*) oraz pasożyt zbóż – mątwik zbożowy (*H. avenae*). Zakres strat w uprawach soi spowodowany przez mątwika sojowego w Stanach Zjednoczonych liczony jest w miliardach dolarów rocznie. W Wielkiej Brytanii mątwik ziemniaczany i mątwik agresywny powodują straty w uprawie ziemniaka rzędu 80 milionów dolarów rocznie. Straty w uprawie buraka cukrowego w Europie sięgają prawie 100 milionów dolarów rocznie (20,21).

W Polsce największe znaczenie pod względem wielkości powodowanych strat w uprawach ziemniaka ma mątwik ziemniaczany. W zależności od stopnia porażania wzorcowych odmian ziemniaka w obrębie gatunku *G. rostochiensis* wyróżniamy pięć patotypów (Ro1-Ro5) (22). Oprócz ziemniaka mątwik ten poraża inne rośliny z rodziny psiankowatych (Solanaceae), takie jak: oberżyna (*Solanum melongena* L.), pomidor uprawny (*Solanum lycopersicum* L. syn. *Lycopersicon esculentum* Mill. i *Lycopersicon lycopersicum* L.), oraz niektóre chwasty – psianka słodkogórz (*Solanum dulcamara* L.) i psianka czarna (*Solanum nigrum* L.). Wielkość strat w uprawie ziemniaka uzależniona jest od zagęszczenia populacji nicieni w glebie, określanego na podstawie liczby jaj i larw w jednostce objętościowej lub wagowej gleby (23). Szacuje się, że każde 20 jaj i larw na gram gleby może spowodować spadek plonu o dwie tony na hektar. Na glebach silnie skażonych, w których liczebność populacji jest wysoka z powodu częstej uprawy podatnych odmian ziemniaków, strata plonu może dochodzić do 80%.

Ze względu na trudność w zwalczaniu mątwiki: ziemniaczany, agresywny, sojowy oraz guzaki korzeniowe: amerykański i holenderski zostały wpisane na listę szkodników kwarantannowych EEPO A2. W krajach Unii Europejskiej (UE) zasady dotyczące szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzeniania się tych gatunków nicieni regulowała do tej pory Dyrektywa

Rady 69/465/EWG. Jednak postęp naukowy w poznaniu interakcji nicien-roślina oraz rozwijająca się hodowla odmian ziemniaka odpornych na europejskie patotypy mątwika ziemniaczanego i agresywnego, stały się podstawą do opracowania nowych ustaleń zawartych w Dyrektywie 2007/33/EC, przyjętej przez Radę UE 11 czerwca 2007 r., która obowiązuje od 1 lipca 2010 r.

4. Metody zwalczania

Zwalczanie nicieni glebowych atakujących korzenie roślin możliwe jest za pomocą bardzo toksycznych nematocydów, które doprowadzają do skażenia środowiska glebowego oraz wyniszczenia wielu organizmów glebowych. Związki te stanowią również zagrożenie dla zdrowia stosujących je rolników. Z tego powodu kraje Unii Europejskiej stopniowo zakazują stosowania nematocydów w walce z nicieniami pasożytniczymi.

W latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku przeprowadzono pierwsze próby zwalczania mątwika ziemniaczanego w glebie przez jej dezynsekcję, przy użyciu środków chemicznych, z których skutecznym okazał się związek należący do grupy karbaminianów – forbiat (24). W późniejszych latach do zwalczania nicieni stosowano jeden z najbardziej efektywnych nematocydów – 1,2-Dibromo-3-chloropropan (DBCP), niestety, jak się okazało, powodował on bezpłodność u stosujących go osób i został wycofany z produkcji pod koniec lat siedemdziesiątych (25). Od tego czasu brak jest na rynku substancji chemicznej specyficznie toksycznej dla nicieni. Stosowanie fumigantów (takich jak bromek metylu, obecnie wycofany), działa sterylizująco na glebę, niszcząc zasiedlające ją organizmy glebowe. Stwierdzono również, że środki te przyczyniają się do niszczenia warstwy ozonowej atmosfery. Z wymienionych powodów Komisja Wspólnot Europejskich wystosowała decyzję 2005/625/WE z 23 sierpnia 2005 r. określającą dozwolone ilości bromku metylu przeznaczone do zastosowań krytycznych w krajach Wspólnoty Europejskiej. Nematocydy nie będące fumigantami, takie jak inhibitory acetylocholinesterazy, są toksyczne dla wszystkich organizmów posiadających ten enzym, w tym także owadów i wolno żyjących nicieni niepasożytniczych. W warunkach polowych poza stosowaniem kwarantanny oraz środków chemicznych, do podstawowych metod integrowanego zwalczania nicieni należą:

- profilaktyczne i systematyczne badanie prób gleby,
- ugorowanie pola przez co najmniej 2 lata,
- stosowanie odpowiedniego zmianowania, czyli wieloletnich przerw w uprawach ziemniaka, bądź innych roślin żywicielskich na glebach zasiedlonych (przerwa nie powinna być krótsza niż siedem lat, a najbardziej odpowiednie rośliny do płodozmianu to lucerna, czosnek i cykoria),
- zastosowanie płodozmianu z roślin pułapkowych, np. aksamitek, nagetek, które przyciągają szkodniki (nicienie po wnikięciu do korzeni, nie znajdując warunków do dalszego rozwoju, giną),

- wykorzystanie wyciągów i wywarów z roślin, które, w porównaniu do związków chemicznych, nie są szkodliwe dla ludzi i środowiska (należy jednak uważać, gdyż stosowane preparaty oprócz szkodników zabijają również owady pożyteczne),
- zastosowanie naturalnych wrogów nicieni, tj. grzybów, bakterii,
- uprawa odpornych odmian ziemniaka.

Alternatywne metody walki, przyjazne dla środowiska, oparte na zastosowaniu naturalnych wrogów nicieni, tj. grzybów, czy bakterii znajdują się wciąż w stadium opracowania i stanowią potencjalną alternatywę dla chemicznych środków ochrony roślin. Ponieważ interakcje zachodzące pomiędzy rośliną, nicieniem i grzybem nicieniobójczym są bardzo złożone, powodzenie w zastosowaniu pasożytów grzybowych jaj nicieni zależne jest zarówno od gatunku nicienia, jak i liczebności populacji w glebie, uprawianej rośliny oraz cechy samego grzyba (wirulentność, produkcja zarodników, zasiedlanie ryzosfery korzenia) (26). Istotne znaczenie ma termin wprowadzania grzybów do gleby. Dużym zainteresowaniem cieszy się gatunek grzyba – *Pochonia chlamydosporia*, ze względu na wytwarzanie chlamydospor, zapewniających przetrwanie w niesprzyjających warunkach. Grzyb ten atakuje tylko jaja nicieni, nie poraża larw. Intensywne badania prowadzone są również nad grzybem *Paecilomyces lilacinus*. Stadiem infekcyjnym tego grzyba są konidia, które infekują zarówno jaja, jak i larwy nicieni. Jednakże zarówno szczepy należące do gatunku *P. chlamydosporia*, jak i *P. lilacinus*, charakteryzują się dużym zróżnicowaniem pod względem patogeniczności w stosunku do różnych gatunków nicieni. W badaniach prowadzonych nad tymi gatunkami grzybów wykazano skuteczność w redukcji jaj *M. arenaria* na korzeniach pomidora dla *P. lilacinus*, po wprowadzeniu do gleby przed rośliną i pojawieniem się szkodnika, natomiast dla *P. chlamydosporia*, po wprowadzeniu do gleby w czasie pikowania roślin, przed pojawieniem się szkodnika. W ryzosferze kapusty nie obserwowano zależności pomiędzy terminem wprowadzenia *P. lilacinus* do gleby a jego skutecznością. *P. chlamydosporia* był najskuteczniejszy po wprowadzeniu do gleby w czasie wegetacji kapusty i w momencie pojawienia się szkodnika (26).

Do tej pory na świecie zarejestrowanych jest kilka nicieniobójczych biopreparatów (27). Główne ograniczenie w stosowaniu tych preparatów stanowi temperatura i wilgotność, od których zależy rozwój grzyba. Ze względu na skomplikowany cykl życiowy nicieni pasożytniczych roślin oraz problem z uchwyceniem odpowiedniego momentu zastosowania środka biologicznego trudno również uzyskać wysoką skuteczność działania preparatu. Ponieważ dla większości tych organizmów optymalna temperatura rozwoju jest wyższa niż 25°C, środki te najczęściej używane są do zwalczania nicieni pasożytniczych roślin, w krajach z klimatem ciepłym. W Niemczech zarejestrowano biopreparat, do zwalczania guzaków korzeniowych oraz mątwików, oparty na grzybach *P. lilacinus*. Optymalna temperatura dla rozwoju tego grzyba wynosi 15°C, a skuteczność jego działania w tej temperaturze potwierdzono w warunkach polowych (26). W Polsce również prowadzi się badania nad wykorzystaniem grzybów nicieniobójczych *P. lilacinus* i *P. chlamydosporia*, np. do ograniczania populacji guzaków korzeniowych i mątwików. Skuteczność tych grzybów wyka-

zono zarówno w warunkach szklarniowych, jak i polowych w zwalczaniu mątwika burakowego oraz guzaka arachidowego (28,29). Do tej pory jednak nie zarejestrowano żadnego z tego typu biopreparatów.

Najprostszą metodą walki z nicieniami pasożytniczymi jest obecnie uprawa odmian posiadających naturalne geny odporności lub wykorzystanie ich jako podkładki tam, gdzie szczepienie jest ekonomicznie uzasadnione (30). Strategia ta jest także praktykowana w Polsce, wobec najgroźniejszego szkodnika upraw ziemniaka jakim jest mątwik ziemniaczany. Wszystkie zarejestrowane w Polsce odmiany zagraniczne posiadają odporność na mątwika ziemniaczanego. Odmiany krajowe, zarejestrowane po 2000 r., posiadają prawie 90% odporność na mątwika ziemniaczanego (31).

Do tej pory poznano molekularnie szereg genów odporności na nicienie cystowe i guzaki, u różnych gatunków roślin, które przedstawiono w tabeli. Geny te, podobnie jak większość poznanych genów R, kodują białka receptorowe należące do rodziny NBS-LRR. Ich mechanizm działania opisano w kolejnym rozdziale. Obok genów przedstawionych w tabeli, zidentyfikowano i zmapowano wiele innych genów niosących odporność na nicienie pasożytnicze. Ze względu jednak na położenie tych sekwencji w dużych skupiskach homologów, nawet znajomość sekwencji genu nie pozwala na szybkie i jednoznaczne wskazanie właściwego genu. U ziemniaka oprócz sklonowanych genów odporności: *H1*, *Gpa2*, zmapowano gen *Rmc1*, nadający odporność na guzaka amerykańskiego, holenderskiego i niektóre izolaty guzaka północnego (32). U pomidora sklonowano geny: *HeroA*, nadający odporność na mątwika ziemniaczanego i agresywnego oraz *Mi1.2*, niosący odporność na guzaka południowego, jawajskiego i arachidowego (zmapowano geny *Mi3* i *Mi9* wykazujące podobną specyfikę do *Mi1.2*) (33,34). Po wprowadzeniu genu *HeroA*, za pomocą transgenezy, do wrażliwej odmiany pomidora uzyskano odporność na porażenie mątwikami na poziomie 80-95%, natomiast nie uzyskano tego efektu u transgenicznego ziemniaka (35). Powyższe geny są wysoce specyficzne tylko wobec ściśle określonych gatunków nicieni, a czasami niosą odporność wobec konkretnego patotypu danego gatunku (tab.). Co więcej, odporność warunkowana przez te geny może być przełamywana, co prowadzi do powstawania nowego wirulentnego patotypu nicienia.

Inne źródła odporności w roślinie najczęściej mają naturę cech wielogenowych bądź warunkowane są genami recesywnymi. Analizy genetyczne wykazały, że u soi odporność na *H. glycines* patotyp 0 determinowana jest współdziałaniem dwóch niesprzężonych loci *Rhg1* i *Rhg4*. Pojedynczo, żadne z loci nie generuje odporności na żaden znany patotyp mątwika sojowego (36). U ryżu odporność na *H. sacchari* kontrolowana jest przez gen *Hsa-1⁰⁸* na drodze kodominacji, czyli współdziałania między allelem warunkującym odporność a allelem odpowiedzialnym za podatność ryżu na porażenie powyższym nicieniem cystowym (37).

Tabela

Charakterystyka poznanych molekularnie genów odporności na nicienie cystowe i guzaki

Roślina uprawna	Gatunek	Gen odporności	Gatunek nicienia/ patotyp	Lokalizacja na chromosomie	Rodzina kodowanego białka	Literatura
ziemniak	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	<i>H1</i>	<i>G. rostochiensis</i> Ro1, Ro4	chromosom 5	NBS-LRR	(38)
	<i>S. spengazzini</i>	<i>Gro1-4</i>	<i>G. rostochiensis</i> Ro1, Ro5	chromosom 7	NBS-LRR	(39)
	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	<i>Gpa2</i>	<i>G. pallida</i> Pa2	chromosom 12	LZ-NBS-LRR	(40)
	<i>S. vernei</i>	<i>GroVI</i>	<i>G. rostochiensis</i> Ro1	chromosom 5	NBS-LRR	(41)
pomidor	<i>L. pimpinellifolium</i>	<i>HeroA</i>	<i>G. rostochiensis</i> Ro1, Ro3, Ro5 <i>G. pallida</i> Pa2, Pa3	chromosom 4	NBS-LRR	(42)
	<i>L. peruvianum</i>	<i>Mil.2</i>	<i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i> <i>M. arenaria</i>	chromosom 6	LZ-NBS-LRR	(43)
burak cukrowy	<i>B. patellaris</i>	<i>Hs1^{pro-1}</i>	<i>H. schachtii</i>	chromosom 1	LRR-TM	(44)
pszenica	<i>T. aestivum</i>	<i>Cre1</i>	<i>H. avenae</i>	długie ramię chromosomu 2B	NBS-LRR	(45)
	<i>T. tauschii</i>	<i>Cre3</i>	<i>H. avenae</i>	długie ramię chromosomu 2D	NBS-LRR	(46)

NBS (ang. *Nucleotide Binding Site*) miejsce wiążące nukleotydy; **LRR** (ang. *Leucine-Rich Repeat*) powtórzenia bogate w leucynę; **TM** (ang. *Transmembrane Region*) sygnał lokalizacji błonowej; **LZ** (ang. *Leucine Zipper*) suwak leucynowy.

5. Mechanizm działania genów odporności

Synteza specyficznych białek odporności (R, ang. *Resistance Proteins*), które rozpoznają konkretne białka pasożyta, kodowane przez tzw. geny awirulencji (*Avr*), jest indukowana przez infekcje pasożytami, będącymi naturalnymi wrogami gospodarza. Specyficzna interakcja między produktami genów *R* rośliny a produktami genów *Avr* pasożyta jest podstawą modelu gen-na-gen opracowanego przez Flora (47), jednak molekularny mechanizm oddziaływań między powyższymi białkami nie jest do końca wyjaśniony. Bezpośrednia interakcja między białkami *R* i *Avr* została opisana dla białka odporności *Pi-ta* u ryżu, który ulega aktywacji w odpowiedzi na białko *AvrPITA Magnaporthe grisea* (48). Brak dowodów na temat bezpośrednich oddziaływań białek *R-Avr* w innych układach było podstawą do wyprowadzenia hipotezy strażnika (ang. *guard hypothesis*), według której interakcje między białkami odporności i awirulencji są koordynowane przez inne białka gospodarza. Potwierdzeniem tej hipotezy są analizy białka *RIN4* u *A. thaliana*, które jest białkiem receptorowym dla trzech białek *Avr* bakterii *Pseudomonas syringae* i pośredniczy w interakcji między

białkami odporności a białkami awirulencji (49). W 2007 r. Bhattarai i wsp. przedstawili model odpowiedzi obronnej, na białka Avr nicieni z rodzaju *Meloidogyne*, generowanej przez gen odporności *Mi1.2* u pomidora (50). Według tego modelu kompleks sygnałny aktywujący gen *Mi1.2* złożony jest z białek HSP90-1, SGT1 oraz RME1. Zmiany konformacyjne białka RME1, będące wynikiem interakcji tego białka z białkami Avr nicieni, powodują wiązanie się cząsteczek ATP do białka *Mi1.2*. Hydroliza ATP doprowadza do modyfikacji *Mi1.2* oraz aktywacji odpowiedzi obronnej.

Do tej pory geny *Avr* nicieni, kodujące białka rozpoznawane przez specyficzne białka R gospodarza, nie zostały opisane (51). Wyjątek stanowi gen kodujący białko *Avr-Cg1* u guzaka jawajskiego, sklonowany w 2008 r. przez zespół Gleason, które jest rozpoznawane przez białko odporności *Mi1.2* u pomidora (52). Problemy w analizie interakcji zachodzących między genami *Avr* nicienia i *R* gospodarza mogą świadczyć o tym, że klasyczna teoria gen-na-gen jest najczęściej niewystarczająca do wyjaśnienia mechanizmu odporności rośliny na nicienie. Przykładem mogą być analizy interakcji mączkowiec sojowy/soja, na podstawie których wykazano, że porażenie oraz rozwój tych nicieni, w zależności od badanego genotypu rośliny żywicielskiej, kontrolowany jest zarówno przez geny dominujące, jak i recesywne (53). Inny przykład stanowi odporność marchwi na guzaka północnego, która jest kontrolowana przez dwa recesywne geny (54).

Zdecydowana większość białek R, należy do rodziny białek NBS – LRR (tab.), co może świadczyć o tym, że rośliny posiadają wspólny szlak sygnałny generujący odporność na różne organizmy pasożytnicze (55). Elementami charakterystycznymi dla tej rodziny białek jest obecność w sekwencji aminokwasowej miejsca wiążącego nukleotydy (NBS, ang. *Nucleotide Binding Site*) oraz rejonu bogatego w tandemowe powtórzenia leucyn. Wykazano również obecność domen homologicznych do białek regulujących programowaną śmierć komórki. W wyniku dokładniejszych analiz miejsc NBS wykazano, że może mieć ono istotny wpływ na aktywację białek kinazowych kaskady przekazywania sygnału MAPKKK. Aktywacja reakcji obronnej z wykorzystaniem genów *R* jest szybka (56). Często odpowiedź rośliny na porażenie organizmem pasożytniczym kończy się aktywacją programowanej śmierci komórki w miejscach infekcji, zwaną również reakcją nadwrażliwości (HR, ang. *Hypersensitive Response*). Co więcej, lokalna odpowiedź na infekcje pasożytnicze indukuje nabytą systemową odporność (SAR, ang. *Systemic Acquired Resistance*), dzięki której cała roślina staje się odporna na porażenie. Z drugiej strony geny *R* są skierowane przeciwko konkretnym szczepom, bądź patotypom pasożyta, co nie daje odporności w szeroko pojętym znaczeniu tego terminu.

Do tej pory zostało opisanych około 25 roślinnych genów *R* skierowanych przeciwko białkom Avr nicieni, niosących odporność na osiadłe endopasożytnicze nicienie z rodzaju *Heterodera*, *Globodera* i *Meloidogyne* (57). Wyjątek stanowi gen *Mi 1.2* z pomidora, który daje szerszą odporność na trzy gatunki nicieni z rodzaju *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*) oraz na mszyce (*Macrosiphum euphorbie*) i mączlika ostroskrzydłego (*Bemisia tabaci*). Wszystkie białka kodowane

przez te geny należą do rodziny białek NBS – LRR. Ponadto geny odporności na nicienie są zgrupowane na chromosomie razem z pozostałymi genami *R* warunkującymi odporność na inne patogeny (58,59), np. gen *Mi1.2* znajduje się w odległości 1 centymorgana od genów *Cf2* i *Cf5*, warunkujących odporność na porażenie *Cladosporium fulvum*, u pomidora. Gen *Gpa2* i gen *Rx1*, niosący odporność na wirusa X ziemniaka, zlokalizowane są również w niewielkiej odległości na 12. chromosomie u ziemniaka.

6. Inne geny reakcji obronnej rośliny na atak nicieni

Geny, które ulegają indukcji w pierwszych godzinach po inokulacji nicieniami, związane są z odpowiedzią obronną rośliny na czynniki stresowe, wynikające ze zranienia oraz migracji nicienia wewnątrz tkanki korzeniowej (7). W odpowiedzi na przełamanie bariery, którą stanowi ściana komórkowa, roślina uaktywnia mechanizm produkcji reaktywnych form tlenu i azotu. Indukcji ulegają również geny kodujące peroksydazy, chitynazy, lipoksygenazy, inhibitory proteinaz oraz katalazy (60). Analizy transkryptomów korzeni, różnych gatunków roślin, porażonych nicieniami pasożytniczymi wyraźnie wskazują na silną aktywację genów: kodujących białka PR (ang. *Pathogenesis-Related Proteins*; np. PR4), aktywujących szlak syntezy kwasu salicylowego, np. PAD4 oraz uczestniczących w biosyntezie związków fenylopropenowych, np. PAL (amoniakolizaza fenyloalaniny) (61). Geny te ulegają aktywacji po porażeniu nicieniami zarówno u roślin odpornych, jak i podatnych, jednakże u roślin odpornych ekspresja tych genów zachodzi szybciej i na wyższym poziomie. Z odpowiedzią roślin na porażenie nicieniami związana jest synteza hormonów roślinnych, takich jak: kwas salicylowy, jasmonowy oraz etylen. Pasożyty biotroficzne są bardziej wrażliwe na odpowiedź obronną indukowaną kwasem salicylowym. Kwas jasmonowy oraz etylen są substancjami sygnałnymi włączającymi odpowiedź obronną na skutek zranienia, głównie po ataku gryzoni, bądź pasożytów powodujących nekrozy tkanek roślinnych (62). Nicienie pasożytnicze roślin powodują zranienia tkanki korzeniowej, ale są także biotrofami, co może stanowić pewien problem dla rośliny we włączeniu odpowiedniego szlaku odpowiedzi obronnej. W badaniach prowadzonych na mutantach *A. thaliana*, charakteryzujących się zaburzeniami w syntezie kwasu salicylowego, wykazano, że rośliny te są bardziej wrażliwe na porażenie mątwikiem burakowym, w porównaniu z roślinami kontrolnymi (63). Natomiast podczas analiz mutantów pomidora – *NahG*, charakteryzujących się również obniżonym poziomem kwasu salicylowego, nie wykazano zwiększonej wrażliwości na guzaki. W dalszych badaniach dowiedziono, że główną rolę w odpowiedzi na porażenie tymi nicieniami odgrywa kwas jasmonowy (64). Mniej skomplikowane zagadnienie stanowi rola etylenu w reakcjach obronnych rośliny na infekcje organizmami pasożytniczymi, który stymuluje porażenie zarówno nicieniami cystowymi, jak i guzakami. Rośliny traktowane etylenem, bądź mutanty charakteryzujące się zwiększonym poziomem tego hormonu, wykazują większą podatność na te nicie-

nie. Na roślinach obserwuje się wyższą liczbę samic oraz szybszy rozwój pasożytów. Samice uzyskują również większe rozmiary, w porównaniu do samic rozwiniętych na roślinach kontrolnych (65). W wyniku analiz profili ekspresji genów związanych z odpowiedzią na etylen, np. *EREBP* (ang. *Ethylene-Responsive-Element Binding Protein*), wykazały zwiększoną ekspresję badanych genów w korzeniach *A. thaliana*, po porażeniu mątwikiem burakowym, soi, po porażeniu mątwikiem sojowym oraz pomidora porażonego guzakiem jawańskim (66-68).

7. Biotechnologiczne metody zwalczania nicieni

Ograniczona liczebność dostępnych źródeł odporności oraz często występująca zbyt wąska specyfika skierowały zainteresowania badaczy na wykorzystanie metod biotechnologicznych w walce z nicieniami. Metody biotechnologiczne stosowane są obecnie na każdym etapie badań podstawowych, czy zaawansowanych prac hodowlanych zmierzających do otrzymania nowych odmian roślin uprawnych. Obejmują one techniki kultur komórkowych i tkankowych, transformację roślin, a także techniki molekularne mapowania, selekcję opartą na markerach molekularnych, sekwencjonowaniu genomów i izolacji genów. W szerszym znaczeniu można by nawet do nich zaliczyć opisane wcześniej wykorzystanie biopreparatów w ochronie przed nicieniami, jednak w rozdziale tym skoncentrujemy się wyłącznie na metodach opartych o transformację roślin.

Pierwszym i dosyć oczywistym wykorzystaniem inżynierii genetycznej w zwalczaniu nicieni jest przenoszenie opisanych wcześniej genów odporności (tab.) z odmian dziko rosnących do odmian uprawnych, porażanych przez tego samego nicienia. Opisane geny odporności, takie jak: *H1*, *Hero* czy *Mi1.2*, pozwalają w prosty i skuteczny sposób uzyskać rośliny uprawne, odporne na określone patotypy mątwików i guzaków. Jednak rozwój innych patotypów nicieni pasożytniczych wymusił hodowlę odmian odpornych, gdzie odporność nie jest już warunkowana pojedynczym genem, lecz całymi ich zespołami. Oprócz genów odporności można pokusić się o modyfikację wielu innych, zwykle mniej specyficznych, procesów związanych z patogenezą nicieni. Opisane strategie mają tę zaletę, że powinny pozwolić na uzyskanie roślin odpornych na całą grupę nicieni należących do konkretnego gatunku lub nawet rodzaju.

W testowanych metodach wykorzystuje się często zjawisko interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*), która doprowadza do wyciszenia ekspresji genu po wprowadzeniu do organizmu dwuniciowego fragmentu RNA (dsRNA), komplementarnego do sekwencji tego genu (69). Technika ta została pierwotnie wykorzystana do badania funkcji poszczególnych genów u wolno żyjącego nicienia – *C. elegans*, gdzie fragmenty dsRNA, skierowane przeciwko konkretnym genom nicienia, były przez niego pobierane z roztworu. Obecność specyficznych dsRNA, skierowanych przeciwko wybranemu genowi, w komórkach docelowych roślinnych lub zwierzę-

cyh aktywuje kompleks hydrolityczny DICER, który trawi dsRNA na 21-22 nukleotydowe fragmenty RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*). Następnie siRNA, w połączeniu z kompleksem wyciszającym RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*), doprowadza do degradacji komplementarnego mRNA genu docelowego. U roślin w dosyć prosty sposób możemy doprowadzić do ekspresji dsRNA nakierowanego na konkretny gen gospodarza, czy pasożytującego nicienia, poprzez stabilną transformację odpowiednią konstrukcją genową. Przykładem wprowadzenia zmian w ekspresji genów gospodarza, prowadzących do zaburzeń w indukcji i rozwoju struktur odżywiających nicienie, mogą być badania prowadzone na transgenicznym roślinach ziemniaka z wyciszonymi genami kodującymi endoglukanazy: *Sl-cel7*, *Sl-cel9C1*, biorące udział w przebudowie i rearanżacji ściany komórkowej niezbędnych do rozwoju struktur żywicielskich dla mątwika ziemniaczanego (70). Wyciszenie genów badanych endoglukanaz spowodowało spadek liczby samic o ponad 60% (rośliny z wyciszonym genem *Sl-cel7*) i 31% (rośliny z wyciszonym genem *Sl-cel9C1*). Ponadto u 89% (*Sl-cel7*) i 78% (*Sl-cel9C1*) w pełni dojrzałych samic, które rozwinęły się na roślinach z wyciszonymi genami, stwierdzono brak jaj w cystach.

Drugą z możliwości, jaką daje nam technika RNAi, jest dostarczenie wyprodukowanego w komórkach roślinnych dsRNA do nicienia pasożytniczego. Indukcja ekspresji specyficznych dsRNA w transgenicznym roślinach, skierowanych przeciwko genom nicieni, została po raz pierwszy opisana przez Yadav i wsp. w 2006 r. (71). Ekspresja dsRNA u tytoniu, skierowanych przeciwko czynnikowi składania mRNA (ang. *splicing factor*) guzaka północnego, zahamowała całkowicie rozwój komórek olbrzymich tych nicieni. W tym samym roku Hunag i wsp. (72) zbadali wpływ wyciszenia genu *16D10* u guzaka północnego, generowanego przez ekspresję specyficznego dsRNA u *A. thaliana*. Gen *16D10* koduje białko wysoce konserwowane u nicieni należących do rodzaju *Meloidogyne*, które odgrywa istotną rolę w pierwszych godzinach indukcji struktury odżywiającej. Na podstawie ekspresji dsRNA u *A. thaliana*, skierowanych przeciwko genowi *16D10*, wykazano redukcję liczby guzów na korzeniach o 69-93%, w porównaniu do roślin kontrolnych.

Prowadzone są także intensywne badania nad wpływem wyciszenia innych genów nicieni z rodzaju *Heterodera*, *Globodera* i *Meloidogyne* (73,74). Wyciszenie genu kodującego β -1,4-glukanazę u mątwika ziemniaczanego, ułatwiającego larwom inwazyjnym penetrację roślinnych ścian komórkowych i migrację wewnątrz korzeni, zmniejszyło liczbę larw zdolnych do porażania korzeni ziemniaka. Ponadto syncytia zaindukowane przez te larwy były zlokalizowane blisko powierzchni korzenia. Podobnie wyciszenie genu *Gr-ams-1*, u tego samego gatunku, kodującego białko wydzielane przez amfidy, które umożliwia larwom inwazyjnym lokalizację korzeni rośliny-gospodarza, spowodowało znaczny zanik zdolności tych larw do lokalizacji korzeni ziemniaka (75). Chociaż technika RNAi stała się metodą powszechnie wykorzystywaną w badaniach funkcji genów związanych z patogenezą nicieni, jej efektywność zależy od kilku czynników (76). W ostatnich badaniach dowodzi się, że efektywne pobieranie, wyprodukowanych w roślinie lub dostarczonych do roztworu,

dsRNA przez nicienia zależy głównie od jego wielkości. Wykazano, że guzak południowy pobiera w trakcie żerowania molekuły o większych rozmiarach niż mątwik burakowy i agresywny. Specyficzny dla gatunku limit wielkości pobieranych cząsteczek może zatem obniżać skuteczność zjawiska interferencji.

Inaktywacja czynników patogeniczności nicienia możliwa jest również za pomocą odpowiednich przeciwciał wytwarzanych przez rośliny transgeniczne (ang. *plantibodies*) w miejscu żerowania pasożyta (77). W tym celu wymagane jest opracowanie odpowiednich technik pozwalających na ekspresję specyficznych immunoglobulin przez komórki roślinne. Plantibodies zostały wykorzystane do wprowadzenia odporności na wirusa brązowej plamistości pomidora (TSWV, ang. *Tomato-Spotted Wilt Virus*) u tytoniu (78). Zostały również podjęte próby uzyskania w roślinach ekspresji monoklonalnych przeciwciał, zaburzających sekrecję białek z gruczołów wydzielniczych nicieni cystowych i guzaków (79). Jednak istotny wpływ zastosowanych przeciwciał, na proces indukcji i rozwoju struktur odżywiających nicienie pasożytnicze, nie został do tej pory opisany.

Można także uzyskać transgeniczne rośliny, u których wprowadzone konstrukcje genowe poprzez nadekspresję własnego bądź obcego genu będą tak modyfikować metabolizm rośliny, żeby zahamować migrację larw nicieni w korzeniu oraz nie dopuścić do rozwoju w pełni funkcjonalnego pasożyta. W tym celu, w 1997 r. Urwin i wsp. (80) prowadzili badania nad wykorzystaniem inhibitora proteiny cysteino-wej z ryżu. Proteinaza cysteinowa jest wydzielana przez nicienie we wczesnych etapach porażenia i umożliwia migrację larwom inwazyjnym w korzeniu. Wprowadzenie do genomu *A. thaliana* genu *Oc-1ΔD86* – kodującego białko inhibitora proteiny cysteino-wej, spowodowało zaburzenia w rozwoju samic, w stosunku do roślin kontrolnych, zarówno po porażeniu mątwikiem buraczanym, jak i guzakiem południowym. Wprowadzenie tego genu do genomu ziemniaka spowodowało spadek liczby samic mątwika agresywnego między 55-70%. Jednak samice, które rozwinęły się na korzeniach transgenicznego ziemniaka, były prawidłowego rozmiaru, a cysty zawierały prawidłową liczbę jaj. Przeprowadzono również badania nad wykorzystaniem genów *Cry*, kodujących endotoksyny u *Bacillus thuringensis*, w nadaniu roślinom odporności na nicienie pasożytnicze (81). Geny *Cry* są głównie wykorzystywane w celu uzyskania transgenicznych roślin kukurydzy i bawełny odpornych na larwy owadów z rzędu *Lepidoptera*. Wprowadzenie genu *Cry6A* do genomu pomidora doprowadziło do spadku liczby samic o 56-76% po inokulacji guzakiem południowym.

Wykorzystanie biotechnologicznych metod w zwalczaniu nicieni wymaga uzyskania odpowiednich transgenicznych roślin, w których główny transgen będzie pod kontrolą odpowiedniego promotora, najlepiej specyficznie aktywnego w strukturze odżywiającej. Dostępnych jest kilka promotorów tego typu np. *RPE* (82), *LEMM19* (83), *POLARIS* (84), *WRKY23* (85), ale żaden z nich nie gwarantuje uniknięcia ekspresji genu w miejscach innych niż szlaki migracyjne oraz struktury odżywiające nicieni. W celu znalezienia bardziej specyficznych promotorów wykonuje się konstrukcje delecyjne pozwalające na sprawdzanie specyficzności danego promotora po usunię-

ciu jego wybranych fragmentów. Przykładem udanej analizy delecyjnej jest promotor *TobRB7*, specyficznie ulegający ekspresji w korzeniu, którego fragment o długości 300 pz jest aktywowany w komórkach olbrzymich, indukowanych przez nicienie z rodzaju *Meloidogyne* (86). Poszukiwanie specyficznych promotorów, które ograniczają ekspresję transgenów tylko do struktury odżywiającej jest ważne również dlatego, że aktywność, powszechnie wykorzystywanego, promotora 35S z mozaiki wirusa kalafiora jest na niskim poziomie w miejscach żerowania nicieni pasożytniczych (87).

Katalog genów, które można by wyciszyć czy spowodować nadekspresję jest duży, ze względu na zaawansowane prace nad poznaniem dynamiki transkryptomów różnych gatunków gospodarzy nicieni pasożytniczych w czasie porażenia i żerowania (67,88,89). Wiedza ta wraz z lawinowym przyrostem danych sekwencyjnych o genomach nicieni i ich gospodarzy (www.nematode.net; www.plantgdb.org) dają realne szanse opisu najistotniejszych mechanizmów patogenezы nicieni i opracowania skutecznych oraz bezpiecznych metod ograniczania strat w uprawach roślin.

8. Podsumowanie

Aktualnie w wielu krajach prowadzi się intensywne badania nad optymalną profilaktyką i sposobami zmniejszania szkód powodowanych przez pasożytnicze nicienie glebowe. Ponieważ chemiczne zwalczanie roślinnych pasożytów glebowych jest bardzo trudne i obciążające środowisko, podstawowe jest wykorzystanie genów odporności w programach hodowlanych roślin. Istnieje też potrzeba wzbogacenia palety dostępnych źródeł odporności, co skłania naukowców do szerszego wykorzystania metod biotechnologicznych w walce z tymi szkodnikami. Analiza funkcjonalna zarówno genów roślinnych, jak i nicieniowych, które ulegają aktywacji podczas patogenezы może znacząco pomóc w tworzeniu takich nowych źródeł odporności. Nie należy jednak traktować biotechnologii jako cudownego lekarstwa, a jedynie jako poszerzenie możliwości hodowcy. Ponadto metody te są rozwijane dopiero od kilku lat i nie są pozbawione wad. Istnieje również trudność w powtórzeniu zachęcających wyników uzyskanych *in vitro* w laboratorium, w warunkach polowych. Najtrudniejszą jednak do przezwyciężenia, choć pozamerytoryczną, wadą opisanych metod jest słaba akceptacja społeczna roślin genetycznie zmodyfikowanych, która przekłada się na decyzje polityków. Niemniej jednak nauka nie stoi w miejscu i coraz bardziej powszechne, wielkoskalowe analizy genomowe, wraz z próbami holistycznej interpretacji obserwowanych interakcji rośliny ze środowiskiem, dają nadzieję na opracowanie skutecznych i zrównoważonych rozwiązań.

Literatura

1. Trudgill D. L., Block V. C., (2001), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39, 53-77.
2. Chitwood D. J., (2003), *Agricultural Research Service. Pest. Manag. Sci.*, 59, 748-753.
3. Dorris M., de Ley P., Blaxter M. L., (1999), *Parasitol. Today*, 15, 188-193.
4. Mitreva M., Blaxter M. L., Bird D. M., McCarter J. P., (2005), *Trends in Genetics*, 21(10), 571-581.
5. Jasmer D. P., Govere A., Smant G., (2003), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41, 245-270.
6. Sijmons P. C., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 23, 917-931.
7. Niebel A., Gheysen G., van Montagu M., (1994), *Parasitology Today*, 10(11), 424-430.
8. Wyss U., Grundler F. M. W., Munch A., (1992), *Nematologica*, 38, 98-111.
9. Schenk H., Driessen R. A. J., de Gelder R., Goubitz K., Nieboer H., Bruggemann-Rotgans I.E. M., Diepenhorst P., (1999), *Croatia Chem. Acta*, 72, 593-606.
10. Golinowski W., Grundler F. M. W., Sobczak M., (1996), *Protoplasma*, 194, 103-116.
11. Paulson R. E., Webster J. M., (1970), *Can. J. Bot.*, 48, 271-276.
12. Wiggers R. J., Starr J. L., Price H. J., (1990), *Phytopathology*, 80, 1391-1395.
13. Smant G., Stokkermans J. P. W. G., Yan Y., de Boer J. M., Baum T. J., Wang X., Hussey R. S., Gommers F. J., Henrissat B., Davis E. L., Helder J., Schots A., Baker J., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4905-4911.
14. Rosso M. N., Favery B., Piotte C., Arthaud L., de Boer J. M., Hussey R. S., Bakker J., Baum T. J., Abad P., (1999), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12, 585-591.
15. Grundler F. M. W., Betka M., Wyss U., (1991), *Phytopathol.*, 81, 70-74.
16. Castagone-Sereno P., (2006), *Heredity*, 96, 282-289.
17. Winslow R. D., Willis R. J., (1972), *Economic Nematology*, Ed. Webster J., 18-34, Academic Press. New York.
18. Karssen G., Brzeski M. W., (1998), *Nematodes of Tylenchina in Poland and Temperate Europe* (N. W. Brzeski, red.), Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, 242-263.
19. Brzeski M. W., Bojda Z., (1974), *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 154, 159-172.
20. Haydock P. P. J., Evans K., (1998), *Outlook Agr.*, 27, 253-260.
21. Wrather J. A., Stienstra W. C., Koenning S. R., (2001), *Can. J. Plant Pathol.*, 23, 122-131.
22. Kort J., (1974), *Bulletin OEPP/EPPO*, 4, 511-518.
23. Brown E. B., (1969), *Annals of Applied Biology*, 63, 493-502.
24. Wilski A., (1955), *Postępy Nauk Rolniczych*, 71(A-2), 337-341.
25. Slutsky M., Levin J. L., Levy B. S., (1999), *Int. J. Occup. Environ. Health*, 5, 116-122.
26. Sosnowska D., (2003), *Rozprawy Naukowe, Instytut Ochrony Roślin*, 9, 95.
27. Sosnowska D., (2005), *Postępy Nauk Rolniczych*, 5, 17-27.
28. Sosnowska D., Banaszak H., (2000), *J. Plant Protect. Res.*, 40, 73-79.
29. Sosnowska D., Kerry B. R., (2002), *Bull. Pol. Acad. Sci., Biological Sciences*, 50, 17-24.
30. Gheysen G., van der Eycken W., Barthels N., Karimi M., van Montagu M., (1996), *Pestic. Sci.*, 47, 95-101.
31. Kamas J., (2003), *COBORU, Słupia Wielka*.
32. Rouppe van der Voort, J. N. A. M., Janssen G. J. W., Overmars H., van Zandvoort P. M., van Norel A., Scholten O. E., Janssen R., Bakker J., (1999), *Euphytica*, 106, 187-195.
33. Ammiraju J. S. S., Veremis J. C., Huang X., Roberts P. A., Kaloshian I., (2003), *Theor. Appl. Genet.*, 106, 478-484.
34. Yaghoobi, J., Yates J. L., Williamson V. M., (2005), *Mol. Genet. Genomics*, 274, 60-69.
35. Sobczak M., Avrova A., Jupowicz J., Phillips M. S., Ernst K., Kumar A., (2005), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18(2), 158-168.
36. Meksem K., Pantazopoulos P., Njiti V. N., Hyten L. D., Arelli P. R., Lightfoot D. A., (2001), *Theor. Appl. Genet.*, 103, 710-717.
37. Lorieux M., Reversat G., Garcia Diaz S. X., Denance C., Jouvenet N., Orioux Y., Bourgr N., Pando-Bahuon A., Ghesquiere A., (2003), *Theor. Appl. Genet.*, 107, 691-696.
38. Bakker E., Achenbach U., Bakker J., van Vliet J., Peleman J., Segers B., van der Heijden L., van der Linde P., Graveland R., Hutten R., van Eck H., Coppoolse E., van der Vossen E., Bakker J., Govere A., (2004), *Theor. Appl. Genet.*, 109(1), 146-152.

39. Ballvora A., Hesselbach J., Niewohner J., Leister D., Salamini F., Gebhardt C., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 249, 82-90.
40. van der Voort J.R., Wolters P., Folkertsma R., Hulten R., van Zandvoort P., Vinke H., Kanyuka K., Bendahmane A., Jacobsen E., Janssen R., Bakker J., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 95, 874-880.
41. Jacobs J. M. E., van Eck H. J., Horsman K., Arens P. F. P., Verkerk-Bakker B., Jacobsen E., Pereira A., Stiekema W. J., (1996), *Mol. Breeding*, 2, 51-60.
42. Ernst K., Kumar A., Kriseleit D., Kloos D. U., Phillips M. S., Ganai M. W., (2002), *Plant J.*, 31(2), 127-136.
43. Ho J. Y., Weide R., Ma H., van Wordragen M. F., Lambert K. N., Koornneef M., Zabel P., Williamson V. M., (1992), *Plant J.*, 2, 971-982.
44. Cai D., Kleine M., Kifle S., Harloff H. J., Sandal N. N., Marcker K. A., Klein-Lankhorst R. M., Salentijn E. M., Lange W., Stiekema W. J., Wyss U., Grundler F. M., Jung C., (1997), *Science*, 275(5301), 832-834.
45. Williams K. J., Fisher J. M., Landrige P., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 927-930.
46. Eastwood R. F., Lagudah E. S., Appels R., (1994), *Genome*, 37, 311-319.
47. Flor H. H., (1971), *Ann. Rev. Phytopath.*, 9, 275-296.
48. Jia Y., McAdams S. A., Bryan G. T., Hershey H. P., Valent B., (2000), *EMBO J.*, 19, 4004-4014.
49. Jones J. D. G., Dangl J. L., (2006), *Nature*, 444, 323-329.
50. Bhattarai K. K., Li Q., Liu Y., Savithamma P., Kumar D., Kaloshian I., (2007), *Plant Physiol.*, 144(1), 312-323.
51. Williamson V. M., Kumar A., (2006), *Trends Genet.*, 22, 396-403.
52. Gleason C. A., Liu Q. L., Williamson V. M., (2008), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 21, 576-585.
53. Dong K., Opperman C. H., (1997), *Genetics*, 146, 1311-1318.
54. Wang M., Goldman I. L., (1996), *J. Hered.*, 87, 119-123.
55. McDowell J. M., Woffenden B. W., (2003), *Trends in Biotechnology*, 21, 178-183.
56. Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H. Y., Hunt M. D., (1996), *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
57. Milligan S. B., Bodeau J., Yaghoobi J., Kaloshian I., Zabel P., Williamson V. M., (1998), *Plant Cell*, 10, 1307-1319.
58. Dixon M. S., Jones D. A., Keddie J. S., Thomas C. M., Harrison K., Jones J. D. G., (1996), *Cell*, 84, 451-459.
59. van der Vossen E. A., van der Voort J. N., Kanyuka K., Bendahmane A., Sandbrink H., Baulcombe D. C., Bakker J., Stiekema W. J., Klein-Lankhorst R. M., (2000), *Plant J.*, 23(5), 567-576.
60. Niebel A., Heungens K., Barthels N., Inzé D., van Montagu M., Gheysen G., (1995), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8, 371-381.
61. Williamson V. M., Hussey R. S., (1996), *Plant Cell*, 8, 1735-1745.
62. Glazebrook J., (2005), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.
63. Wubben M. J. E., Jin J., Baum T. J., (2008), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 21, 424-432.
64. Bhattarai K. K., Xie Q. G., Mantelin S., Bishnoi U., Girke T., Navarre A. D., Kaloshian I., (2008), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 21(9), 1205-1214.
65. Wubben M. J. E., Su H., Rodermel S. R., Baum T. J., (2001), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14, 1206-1212.
66. Mazarei M., Puthoff D. P., Hart J. K., Rodermel S. R., Baum T. J., (2002), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 15, 577-586.
67. Puthoff D. P., Nettleton D., Rodermel S. R., Baum T. J., (2003), *Plant J.*, 33, 911-921.
68. Bar-Or C., Kapulnik Y., Koltai H., (2005), *Eur. J. Plant Pathol.*, 111, 181-192.
69. Wiśniewska A., Filipecki M., (2003), *Postępy Biologii Komórki*, 30, 339-358.
70. Karczmarek A., Fudali S., Lichocka M., Sobczak M., Kurek W., Janakowski S., Roosien J., Golinowski W., Bakker J., Goverse A., Helder J., (2008), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 21, 791-798.
71. Yadav B. C., Veluthambi K., Subramaniam K., (2006), *Mol. Biochem. Parasitol.*, 148, 219-222.
72. Huang G., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 14302-14306.
73. Urwin P. E., Lilley C. J., Atkinson H. J., (2002), *Molec. Plant Microbe Interacts*, 15, 747-752.

74. Bakhietia M., Charlton W. L., Urwin P. E., McPherson M. J., Atkinson H. J., (2005), *Trends Plant Sci.*, 10, 362-367.
75. Chen Q., Rehman S., Smant G., Jones J.T., (2005), *MPMI*, 18, 621-625.
76. Gheysen G., Vanholme B., (2007), *Trends in Biot.*, 25 (3).
77. Stiekema W. J., Bosch D., Wilmink A., Boer J. M., de Schouten A., Roosien J., Goverse A., Smant G., Stokkermans J. P. W. G., Gommers F. J., Schots A., Bakker J., (1997), *Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions*, Eds. Fenoll, C., Grundler F. M. W., Ohl S. A., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 262-272.
78. Prins M., Lohuis D., Schots A., Goldbach R., (2005), *J. Gen. Virology*, 86, 2107-2113.
79. Baum T. J., Hiatt A., Parrot W. A., Pratt H., Hussey R. S., (1996), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 9, 382-387.
80. Urwin P. E., Lilley C. J., McPherson M. J., Atkinson H. J., (1997), *Plant J.*, 12, 455-461.
81. Li X. Q., Wei J. Z., Tan A., Aroian R. V., (2007), *Plant Biotech. J.*, 5, 455-464.
82. Favery B., Lecomte P., Gil N., Bechtold N., Bouchez D., Dalmaso A., Abad P., (1998), *EMBO J.*, 17, 6799-6811.
83. Escobar C., de Meutter J., Aristizabal F. A., Sanz-Alferez S., Del Campo F. F., Bartels N., van der Eecken W., Seurinck J., van Montagu M., Gheysen G., Fenoll C., (1999), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12, 440-449.
84. Topping J. F., Lindsey K., (1997), *Plant Cell*, 9(10), 1713-1725.
85. Grunewald W., Karimi M., Wiczorek K., van de Cappelle E., Wischnitzki E., Grundler F., Inze D., Beeckman T., Gheysen G., (2008), *Plant Physiol.*, 148, 358-368.
86. Opperman C. H., Acedo G. N., Saravitz D. M., Skantar A. M., Song W., Taylor C. G., Conkling M. A., (1994), *In Advances in Molecular Plant Nematology*, Eds. Lamberti F., de Giorgi C., Bird D. M., (New York, Plenum Press), 221-232.
87. Goddijn O. J., Lindsey K., van der Lee F. M., Klap J. C., Sijmons P. C., (1993), *Plant J.*, 4, 863-873.
88. Jammes F., Lecomte P., de Almeida-Engler J., Bitton F., Martin-Magniette M. L., Renou J. P., Abad P., Favery B., (2005), *Plant J.*, 44(3), 447-458.
89. Świącicka M., Filipecki M., Lont D., van Viet J., Qin L., Goverse A., Bakker J., Helder J., (2009), *Mol. Plant Pathol.*, 10(4), 487-500.