

MIROSLAW SOBCZAK, GRAŻYNA GRYMASZEWSKA,
WOJCIECH KUREK, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI

*Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa*

BIOTECHNOLOGICZNE METODY WPROWADZANIA ODPORNOŚCI U ROŚLIN NA NICIENIE

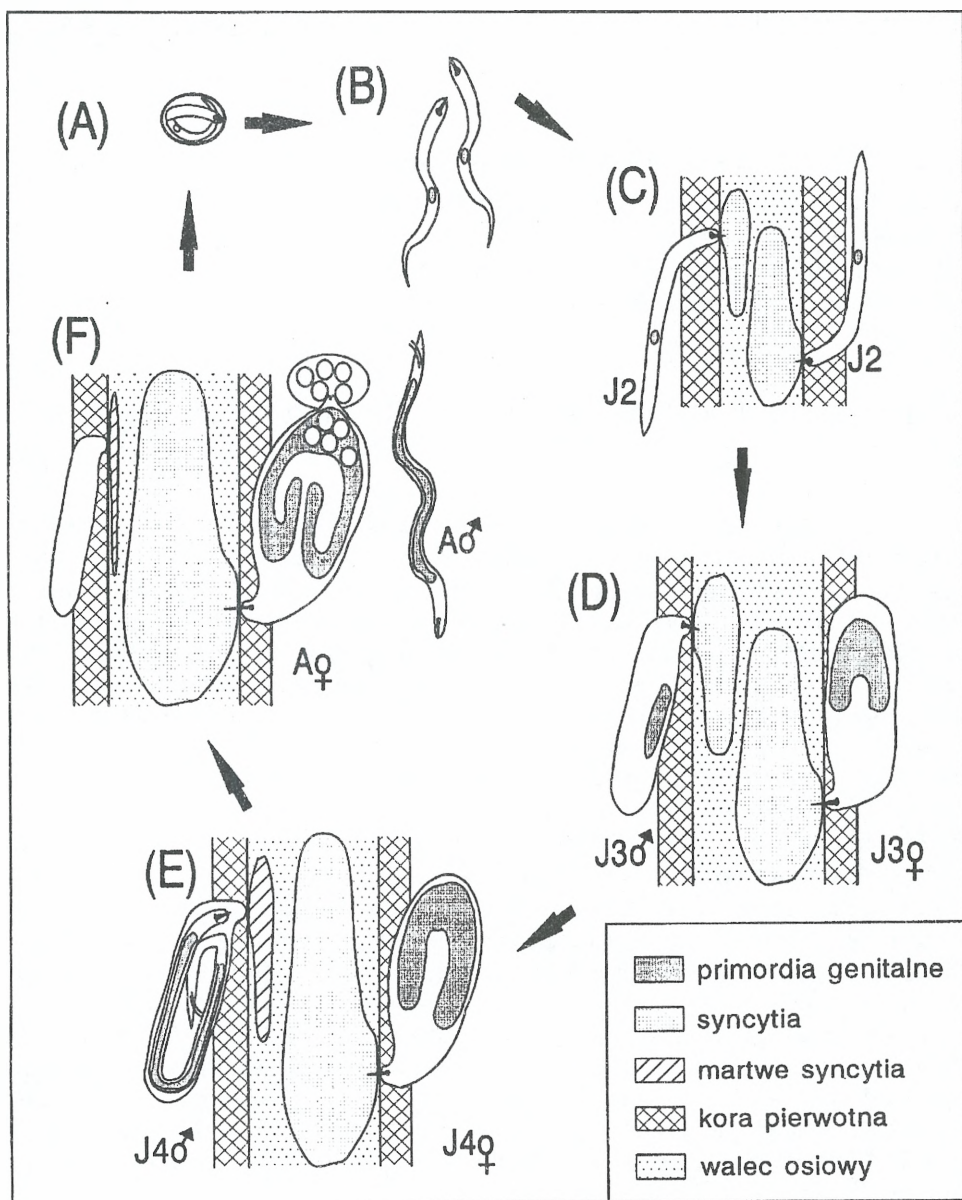
Pasożytnicze nicienie są szeroko rozpowszechnionymi szkodnikami powodującymi znaczące straty w uprawach roślin — zwłaszcza w krajach klimatu tropikalnego i subtropikalnego. Nieco mniejsze zagrożenie stanowią dla upraw roślin klimatu umiarkowanego. Biorąc pod uwagę dużą wartość strat w plonach (w skali świata szacowaną na około 100 mld dolarów rocznie) (SASSER i FRECKMAN 1987), intensywnie poszukuje się skutecznych metod zwalczania tych szkodników. Poza wprowadzeniem prawidłowego zmianowania, stosowaniem środków chemicznych (nematocydów) i metod biologicznych (grzybów z rodzaju *Verticillium* i *Nemathophthora*), najskuteczniejszą ochronę przed nicieniami zapewnia wprowadzanie do uprawy odpornych odmian roślin, co powoduje zmniejszenie już istniejącej populacji nicieni. Rośliny uprawne najczęściej nie posiadają jednak genów warunkujących odporność na nicienie. Trzeba je do nich wprowadzać z genomów dzikich krewnych lub z genomów obcych gatunków. Badania prowadzone w tym zakresie koncentrują się przede wszystkim na powodujących największe straty w rolnictwie nicieniach z rodzaju *Globodera* i *Heterodera* (małwiki) oraz *Meloidogyne* (guzaki).

W tej pracy przedstawiono najpierw to, co jest konieczne dla zrozumienia mechanizmów odporności roślin na nicienie, to jest cykl życiowy tych pasożytów oraz budowę i funkcjonowanie indukowanych przez nie w korzeniach organów (struktur) odżywiających: syncytiów i komórek olbrzymich (ang. giant cells). Na tym tle omówiono następnie dotychczasowe osiągnięcia biotechnologii w poszukiwaniu odporności na te nicienie.

CYKL ŻYCIOWY NICIENI

MĄTWIKI

W cyklu życiowym małwików występują cztery pokolenia larw i pokolenie osobników dojrzałych (ryc. 1). Larwy pierwszego stadium (J1) rozwijają się



Ryc. 1. Cykl rozwojowy mątwików (*Heterodera* spp.).

A) larwa drugiego stadium w osłonce jajowej. B) wędrujące larwy drugiego stadium. C) osiadłe, nie zróżnicowane płciowo larwy drugiego stadium po zaindukowaniu syncytium. D) zróżnicowane płciowo larwy trzeciego stadium. E) zróżnicowane płciowo larwy czwartego stadium (syncytium samca degeneruje). F) dojrzałe płciowo osobniki: samiec opuszcza kutykulę trzeciego stadium larwalnego i wędruje do samicy, która po zapłodnieniu zaczyna składać jaja.

w jajach zawartych we wnętrzu cyst i w nich przechodzą pierwszą wylinkę. Larwy drugiego stadium (J2) są larwami infekcyjnymi. Przebijają osłonkę jaja, wychodzą z cyst i rozpoczynają poszukiwanie rośliny gospodarza. W korzeniach roślin żywicielskich indukują rozwój syncytium i przechodzą na osiadły tryb życia. Larwy infekcyjne mątwików nie są zróżnicowane płciowo. Różnice w budowie primordiów genitalnych samic i samców stają się widoczne przed rozpoczęciem wylinki do stadium J3 (GRUNDLER 1989). Po zakończeniu fazy J3 larwy samców, bez przerw na pobieranie pokarmu, przechodzą dwie bezpośrednio po sobie następujące wylinki i po osiągnięciu dojrzałości płciowej opuszczają korzenie. W rozwoju samic kolejne wylinki są zawsze przedzielone krótszymi lub dłuższymi okresami pobierania pokarmu. Dojrzałe samice odżywiają się cały czas kosztem rośliny gospodarza. Po zapłodnieniu, w jajach będących jeszcze w ciele samic, rozwijają się larwy pierwszego stadium (J1), a z oskórka osłaniającego jaja powstaje ochronna cysta. Pomimo że większość gatunków mątwików jest obligatoryjnie amfimiktyczna (TRIANTAPHYLLOU i HIRSCHMANN 1980), wyniki doświadczeń z różnymi wariantami warunków rozwoju nicieni i porażonych przez nie roślin wskazują, że płć mątwików jest determinowana epigenetycznie (RASKI 1950, MUGNIERY i FAYET 1981, WYSS i GRUNDLER 1992).

GUZAKI

W rozwoju guzaków, podobnie jak w rozwoju mątwików, występują cztery stadia larwalne i pokolenie składające się z osobników dojrzałych. Infekcyjne larwy tych nicieni (J2) inicjują w korzeniach rozwój komórek olbrzymich, które są funkcjonalnymi odpowiednikami syncytiów. Po zainicjowaniu komórek olbrzymich, larwy przez około 14 dni pobierają z nich pokarm, po czym szybko przechodzą trzy wylinki. W obrębie oskórka larwy drugiego stadium przekształcają się w osobniki dojrzałe, które wznowiają pobieranie pokarmu i rozpoczynają składanie jaj. Większość guzaków to gatunki partenogenetyczne. Teoretycznie ich populacje powinny składać się wyłącznie z samic. Jednak w niekorzystnych warunkach nawet 60% populacji mogą stanowić samce lub formy interseksualne (TRIANTAPHYLLOU i HIRSCHMANN 1980). Potwierdza to teorię epigenetycznej regulacji płci nicieni.

STRATEGIA NICIENI W POCZĄTKOWYM STADIUM INFЕКCJI

MĄTWIKI

Infekcyjne larwy mątwików wchodzą do korzeni w strefie wierzchołkowej (strefa elongacyjna i włosnikowa). Początkowo poprzez tkanki kory pierwotnej przemieszczają się w kierunku walca osiowego, a następnie migrują wzdłuż osi korzenia. Ich aparat gębowy jest zaopatrzony w stosunkowo masywny sztyłęt. Posługując się nim niszczą one mechanicznie leżące na trasie ich wędrówki komórki głębszych warstw miększu korowego i endodermy. Czasem penetrują również wnętrze walca osiowego. Blisko brzegu walca osiowego nakłuwają delikatnie kilka komórek, próbując zainicjować w nich zmiany prowadzące do powstania syncytium. Po znalezieniu właściwie reagującej komórki przez około

7 godzin trwają nieruchomo ze sztyletem wbitym do wyselekcjonowanej komórki. W tym czasie tracą zdolność lokomocji i przechodzą na osiadły tryb życia, rozpoczynając pobieranie pokarmu (WYSS 1992), o czym świadczą pulsacyjne ruchy mięśni przetyku. Pobieranie pokarmu odbywa się w trzech kolejno po sobie następujących fazach. Faza pierwsza jest fazą właściwego pobierania pokarmu i trwa około 1,5 h. Po niej następuje faza druga, podczas której larwy wyciągają, a następnie ponownie wprowadzają sztylet do syncytium. W trzeciej fazie przez kanał sztyletu larwy wprowadzają do syncytium swoją wydzielinę. Z wydzieliny tej powstaje tak zwana rurka pokarmowa (ang. feeding tube), która umożliwia nicieniom pobieranie pokarmu z cytoplazmy syncytium. Po utworzeniu rurki pokarmowej cały proces rozpoczyna się od początku i trwa z przerwami (kolejne wylinki) przez cały okres życia nicieni (WYSS 1992).

GUZAKI

Larwy guzaków wchodzą do korzeni w strefie elongacji. Stąd, przeciskając się między komórkami miękiszu korowego, migrują ku wierzchołkowi korzenia, a następnie wykonują zwrot o 180° , wchodzą w obszar różnicującego się walca osiowego i zacierają ku nasadzie korzenia. W strefie różnicowania tkanek przechodzą na osiadły tryb życia i indukują rozwój komórek olbrzymich. Określoną trasę wędrówki larw zacierających do walca osiowego poprzez wierzchołek korzenia można wytłumaczyć istnieniem mechanicznej bariery, jaką stanowi dla nich położona na granicy kory pierwotnej i walca osiowego endoderma. Z kolei wybór międzykomórkowej drogi migracji przez larwy guzaków tłumaczy budowa sztyletu tych nicieni. Ma on mniejsze rozmiary niż sztylet mątwikow i z tego powodu nie nadaje się do wykonania dużych otworów w ścianach komórek. W związku z tym przemieszczające się w korzeniach larwy, wydzielanymi przez siebie enzymami rozpuszczają blaszki środkowe, a sztyletu używają do rozsuwania tarasujących im drogę komórek (WYSS i współaut. 1992).

MORFOGENEZA SYNCYTIÓW I KOMÓREK OLBRZYMICH

SYNCYTIA

Skład komórkowy i ultrastrukturę syncytiów formujących się pod wpływem mątwików badano u wielu gatunków roślin (JONES i NORTHCOTE 1972, WYSS i współaut. 1984, BLEVE-ZACHEO i ZACHEO 1987, GOLINOWSKI i MAGNUSSON 1991, MAGNUSSON i GOLINOWSKI 1991, GRZYMASZEWSKA i GOLINOWSKI 1991). W tej pracy przedstawiono wyniki obserwacji przeprowadzonych na porażonej mątwikiem burakowym modelowej roślinie, jaką w badaniach nematologicznych jest rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*), ryc. 2a, (SIJMONS i współaut. 1991). W korzeniach tej rośliny inicjalną komórką syncytiów powstających pod wpływem larw samic jest zazwyczaj komórka prokambialna przyległa do już zróżnicowanych naczyń proto- lub metaksylemu. Komórka ta pod wpływem nicienia intensywnie powiększa się. Wzrasta w niej ilość organelli, takich jak mitochondria, plastydy i diktiosomy. Następuje też proliferacja endoplazmatycznego retikulum (ER) i zwiększa się gęstość optyczna cytoplazmy. Centralna wakuola

rozpada się na liczne, mniejsze. Po kilku godzinach w ścianach komórki inicjalnej pojawiają się otwarcia łączące ją z sąsiednimi komórkami prokambialnymi, mającymi już podobnie zmieniony protoplast. Syncytium powiększa się stopniowo poprzez rozpuszczanie odcinków ścian i fuzję protoplastów kolejnych komórek walca osiowego. Rozprzestrzenia się w walcu osiowym wzdłuż wiązek przewodzących akro- i bazypetalnie (ryc. 2b). W tym czasie sąsiednie komórki prokambium i komórki perycyklu dzielą się na całej długości syncytium i tworzą układ tkanek podobny do budowy wtórnej korzenia. Komórki endodermi zamierają, a tkanki kory pierwotnej i epiblema są rozrywane przez rozrastający się walec osiowy. Poza rejonem głowy nicienia syncytium zostaje otoczone warstwami komórek perydermalnych. Przy syncytiach następuje zahamowanie różnicowania drewna pierwotnego. Wiązki floemowe są przesunięte ku brzegowi walca osiowego. Wzrasta w nich ilość elementów przewodzących. W zaawansowanym stadium rozwoju obecne w syncytiach ameboidalne jądra znacznie się powiększają, co w połączeniu z silną kondensacją nukleoplazmy świadczy o ich wysokiej aktywności metabolicznej. Retikulum endoplazmatyczne tworzy w syncytiach charakterystyczne koliste układy a w pewnych miejscach — zwarte obszary tubularnych cystern. W cytoplazmie pojawiają się liczne ciała lipidowe. Ściany syncytiów są zwykle grube i nie ma w nich czynnych plazmodesm. Przy naczyniach formują się na nich wyrostki transferowe, które powiększają powierzchnię pobierania wody i substancji pokarmowych.

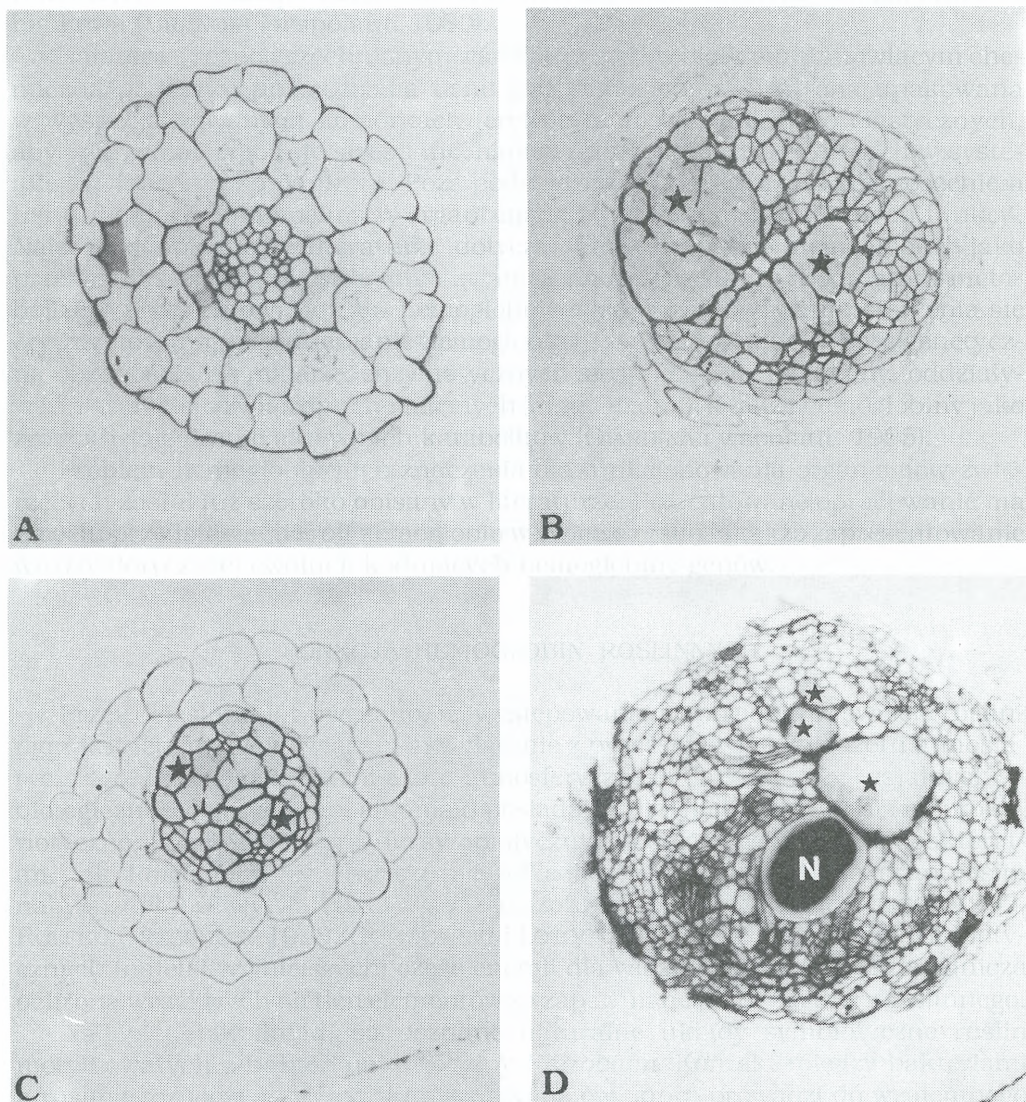
Syncytia, z których pobierają pokarm larwy samców, są usytuowane na brzegu walca osiowego i są inicjowane w perycyklu (ryc. 2c). Rozprzestrzeniają się w tej tkance i w prokambium. Ze względu na słabszy przyrost objętości komórek mają znacznie mniejsze rozmiary niż syncytia samic (GRUNDLER i współaut. 1994). Inne cechy, które różnią je od syncytiów samic, to prawie całkowity brak przerw w ciągłości ścian komórkowych w rejonach oddalonych od głowy nicienia i słabszy rozwój wyrostków transferowych, które wkrótce po powstaniu zlewają się ze sobą tworząc struktury przypominające raczej zgrubienia ściany komórkowej niż typowe wyrostki.

KOMÓRKI OLBRZYMIE

Larwy guzaków inicjują powstawanie zespołu komórek olbrzymich złożonego z 2 do 12 komórek w strefie różnicowania tkanek korzenia, w sąsiedztwie naczyń protoksylemu. Komórki poddane działaniu nicieni znacznie się powiększają (ryc. 2d). Zachodzą w nich synchronicznie liczne mitozy bez cytokinez. Wzrasta też ploidalność jąder — nawet do 64 n (JONES 1981). Tworzące zespół komórki łączą się ze sobą za pośrednictwem zmodyfikowanych plazmodesm. Następuje też proliferacja komórek w korze pierwotnej, co prowadzi do powstania wyrosły otaczającej zarówno nicienia, jak i komórki, z których pobiera pokarm (ENDO 1975).

Ciągłość tkanek przewodzących jest zachowana dzięki różnicowaniu się dodatkowych elementów drewna i łyka. W czasie rozwoju komórek olbrzymich wzrasta w nich proporcjonalny udział cytoplazmy w stosunku do wakuoli, a na ścianach sąsiadujących z naczyniami tworzą się rozbudowane systemy wyrostków ściany komórkowej. Cytoplazma ma strukturę podobną do cytoplazmy

komórek merystematycznych. Jądro komórkowe jest powiększone i ameboidalne, a ilość diktiosomów i mitochondriów wzrasta. Membrany ER są stosunkowo nieliczne, a rybosomy (wolne lub w polisomach) są rozproszone w całej cytoplazmie. Otwarcia w ścianie komórkowej nigdy się nie tworzą (JONES 1981).



Ryc. 2. Zmiany w tkankach korzenia rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) porażonych mątwikiem burakowym (*Heterodera schachtii*) i guzakiem północnym (*Meloidogyne incognita*).

A) przekrój poprzeczny przez korzeń rośliny nie zainfekowanej; B) syncytium (*) samicy mątwika w stadium J3; C) syncytium (*) samca mątwika w stadium J3; D) przekrój przez wyrost i komórki olbrzymie (*) zaindukowane przez guzaka; widoczne ciało nicienia (N). Powiększenie A, B, C — 500x, D — 250x.

ZMIANY AKTYWNOŚCI GENÓW W ORGANACH INDUKOWANYCH PRZEZ NICIENIE

Nie są znane do tej pory nawet podstawowe mechanizmy regulujące tworzenie i funkcjonowanie organów odżywiających nicianie. Zdolność jednego gatunku niciania do ich indukowania w setkach gatunków roślin (*Meloidogyne incognita* ma ponad dwa tysiące gatunków roślin gospodarzy) nie może być wytłumaczona tylko poprzez bezpośrednie oddziaływanie wydzielin niciania na kluczowe enzymy w metabolizmie roślin. Podobnie też wszystkich obserwowanych zmian nie da się wytłumaczyć jako prostego działania lokalnego układu dawca-biorca stworzonego przez nicianie. Aktywny udział genów gospodarza w tworzeniu i funkcjonowaniu organów odżywiających wydaje się być oczywisty. Niestety brak jest niepodważalnych, bezpośrednich dowodów na poparcie tej teorii (SIJMONS 1993). Powszechnie wiadomo jest jednak, że rozwijające się organy odżywiające mają silnie zagęszczoną cytoplazmę z dużą ilością organelli, szczególnie mitochondriów, rybosomów i endoplazmatycznego retikulum, dlatego za pewnik należy uznać, że przynajmniej te geny gospodarza, które biorą udział w regulowaniu aktywności i funkcji tych organelli, są w pewien sposób kontrolowane przez nicianie. Dodatkowo silnie powiększone, ameboidalne jądro komórkowe wskazuje na dużą aktywność genów roślinnych (BURROWS 1992). Pewne światło na mechanizm oddziaływania niciani na roślinę może rzucić fakt, że specyficzne dla wydzielin włośnia spiralnego (*Trichinella spiralis*) przeciwciała wykazują obecność jego wydzielin w jądrze komórek gospodarza (DESPOMMIER 1990, LEE i współaut. 1991). Co więcej, okazuje się, że w wydzielinie tego niciania jest substancja bardzo podobna do czynnika transkrypcji (POZIO i BRUSCHI 1994). Sugerowałoby to, że pasożyt oddziałuje bezpośrednio na specyficzną ekspresję genów komórek mięśnia. Włosień spiralny jest, co prawda, pasożytem zwierząt i człowieka, ale indukuje w ich komórkach mięśniowych także powstawanie syncytiów. Poprzez możliwe analogie można przyjąć założenie, że nicianie roślinne mogą bezpośrednio oddziaływać na genetyczne mechanizmy regulacji aktywności metabolicznej komórki.

Do tej pory podjęto tylko kilka prób zanalizowania składu białek w syncytiach i komórkach olbrzymich oraz porównania ich ze składem białek w roślinach nie porażonych przez nicianie. Nie wykazano jednak istnienia żadnych istotnych różnic. Co więcej, niespodziewanie, większe i istotniejsze różnice w ich składzie zaobserwowano w liściach porażonych roślin, gdzie pojawiło się nowe białko, niż w ich korzeniach (HAMMOND-KOSACK i współaut. 1990).

Poszukiwanie genów aktywowanych (prawie) specyficznie w komórkach roślinnych — organach odżywiających nicianie przebiega zasadniczo dwoma drogami. Pierwsza z nich to zastosowanie metody odczytu różnicującego (ang. differential display) bibliotek cDNA. Jednym ze zidentyfikowanych genów, aktywnym w organach pokarmowych niciani, jest gen *Nem2* kodujący katalazę. Pojawia się on w organach zaindukowanych przez *G. pallida* i *M. incognita* w korzeniach ziemniaka (NIEBEL i współaut. 1995). Katalaza steruje rozpadem nadtlenu wodoru do wody i tlenu. Nadtlenek wodoru jest uznawany za sub-

stancję sygnałową, stymulującą reakcje obronne w komórkach roślinnych. Zwiększona produkcja katalazy w zainfekowanych korzeniach może sugerować, że nicienie wytworzyły mechanizm wiodący do obejścia lub osłabienia systemu obronnego roślin poprzez zlikwidowanie lub ograniczenie ilości czynnika je indukującego, czyli nadtlenu wodoru (GHEYSEN i Van MONTAGU 1995).

Z kolei w korzeniach *Arabidopsis* porażonych przez *H. schachtii* zaobserwowano akumulację glikoproteidu (thioglikozydazy). Jest on jednak produkowany tylko w komórkach perydermalnych otaczających syncytium, a samo syncytium jest go całkowicie pozbawione (GRUNDLER i współaut. 1994, SCHMIDT 1995). Nieco bardziej specyficzną ekspresję dwóch ekstensyn (białek strukturalnych ściany komórkowej, pojawiających się pod koniec rozwoju ściany i stabilizujących połączenia pomiędzy jej składnikami) zaobserwowano w komórkach otaczających komórki olbrzymie zainicjowane przez *M. incognita* (Van der EYCKEN i współaut. 1992, 1994). Z drugiej strony, nie znaleziono istotnych ilości ekstensyny w ścianach komórek olbrzymich. Wysunięto więc hipotezę, że dla zachowania optymalnych możliwości pobierania pokarmu z systemu waskularnego do komórek olbrzymich niezbędne jest zachowanie ścian komórek olbrzymich w stanie jak najbardziej pierwotnym. Natomiast ściany komórek tworzących wyrośl stanowią w tym układzie mechaniczny system zabezpieczający komórki olbrzymie przed nadmierną ekspansją. W przypadku infekcji wątkowikami synteza ekstensyn miała miejsce tylko w komórkach zniszczonych przez nicienia w czasie jego migracji.

Rolę ochronną można też przypisywać produktowi genu *Lemmi9*, który wykazuje wysoką aktywność w komórkach olbrzymich zaindukowanych przez *M. incognita* w korzeniach pomidora. Gen ten wykazuje bardzo duże podobieństwo do genu *lea14A* (ang. late — embryogenesis abundant) z genomu bawełny. Jest on szczególnie aktywny w późnych stadiach embriogenezy, a jego produkt jest prawdopodobnie odpowiedzialny za ochronę zarodka przed wysychaniem w czasie dojrzewania nasion. Przypuszczalną rolę genu *Lemmi9* może więc być ochrona cytoplazmy komórek olbrzymich przed wysychaniem (Van der EYCKEN i współaut. 1994).

Drugą drogą badania zmian w ekspresji genów w syncytium lub komórkach olbrzymich jest analiza aktywności regionów regulatorowych genów, to jest promotorów. Są one często aktywne (tzn. umożliwiają syntezę danego białka) tylko na określonym etapie rozwoju rośliny lub w określonym organie. Bardzo efektywnym narzędziem monitorowania aktywności promotorów na poziomie komórkowym jest gen markerowy *GUS* (*uid A*) kodujący enzym β -glukuronidazę. Gen ten jest przyłączany do promotora, którego funkcja i sekwencja jest znana. Zestaw taki, na drodze transformacji, jest wprowadzany do genomu rośliny i po jej regeneracji obecność produktu genu *GUS* może być wykryta poprzez reakcję z odpowiednim substratem na poziomie komórkowym, wskazując na aktywność testowanego promotora (JEFFERSON i współaut. 1987).

Metodą tą znaleziono, jak dotąd, tylko parę promotorów wykazujących podwyższoną aktywność w strukturach odżywiających nicienie. Jednym z nich jest promotor genu *TobRB7*, kodującego membranowe białko kanałowe. Normalnie gen ten ulega krótkotrwałej ekspresji we wczesnych etapach rozwoju walca osiowego. W korzeniach porażonych przez nicienia promotor tego genu jest

aktywny w całym zespole komórek olbrzymich (OPPERMAN i współaut. 1994, TAYLOR i współaut. 1992). Poprzez stopniowe skracanie długości oryginalnego promotora (długości około 1,8 kb) uzyskano ostatecznie odcinek DNA o długości około 0,3 kb, który jest specyficznie i wyłącznie aktywny w komórkach olbrzymich organu odżywiającego zaindukowanego przez nicienia.

Drugim przykładem jest promotor genu kodującego kinazę *cdc2a*. Białko to jest znane jako jeden z kluczowych regulatorów cyklu komórkowego. W niezainfekowanych roślinach jest ono aktywne tylko w dzielących się komórkach tkanek merystematycznych. W organach odżywiających nicienie największa aktywność promotora *cdc2a* została zaobserwowana trzy dni po wnikięciu patogena do korzenia, a następnie stopniowo malała (NIEBEL i współaut. 1994). Rolę tego genu można stosunkowo prosto wyjaśnić w komórkach olbrzymich, gdyż powszechnie jest znany zachodzący w nich proces wielokrotnych mitoz nie zakończonych cytokinezą (JONES 1981). Znacznie trudniejsze jest wytłumaczenie aktywności tego genu w syncytiach, których jądra nie przechodzą mitozy. Jedną z ewentualnych możliwości jest indukowanie w nich początkowych faz mitozy, po których zostaje ona przerwana i zablokowana, co prowadzi jednak do ewentualnej endoreduplikacji materiału genetycznego (GHEYSEN i Van MONTAGU 1995).

Kolejnym przykładem promotora aktywnego w organach pokarmowych nicienia jest promotor genu kodującego reduktazę hydroksymetyloglutarylokoenzymu A (HMGR). Enzym ten pełni kluczową rolę w mechanizmach syntezy terpenoidów i steroli (CRAMER 1992). Promotor tego genu jest aktywowany wkrótce po wyselekcjonowaniu komórki inicjalnej i jest aktywny przez cały okres rozwoju zespołu komórek olbrzymich (WEISSENBORN i współaut. 1994). Jest to szczególnie interesujący promotor, gdyż nicienie są całkowicie zależne od swojego gospodarza pod względem dopływu i składu steroli, których nie są w stanie samodzielnie syntetyzować (CHITWOOD i LUSBY 1991).

Wydaje się, że dalsze badania wykażą, że geny gospodarza, aktywne w organach odżywiających nicienie, są także aktywne w innych tkankach lub specyficznych stadiach rozwojowych rośliny. Jednakże, pomimo że geny i mechanizmy gospodarza nie są uruchamiane specyficznym przez infekcję nicienia, to posiada on zdolność wywołania całościowych zmian korzystnych dla siebie (BURROWS 1992).

Z kolei inne badania prowadzone przy użyciu zestawu: promotor-gen *GUS* wykazały, że wiele powszechnie stosowanych w biologii molekularnej promotorów o wysokiej aktywności w korzeniach, jak *CaMV 35S*, *rol A-D*, *nos*, *[gamma]-TIP* czy *T-cyt* było całkowicie wyłączanych w wyniku infekcji nicieniowej (GODDIJN i współaut. 1993). Wydaje się, że w ten sposób pasożyt może zmuszać komórki gospodarza do wyłączenia pewnych szlaków metabolicznych i do przestawienia całej maszynery biosyntezy białka na potrzeby budowania organu odżywiającego i dostarczanie pożywienia nicieniowi.

Dysponowanie promotorem o (prawie) specyficznej ekspresji w organie odżywiającym nicienie jest bardzo ważne dla konstruowania metodami inżynierii genetycznej linii roślin odpornych na te patogeny. Dlatego niewielka liczba znanych promotorów, aktywnych w syncytiach i komórkach olbrzymich, spowodowała podjęcie poszukiwań nowych, aktywnych promotorów. Wykorzystano

w tym celu także gen *GUS*, tym razem jednak pozbawiony promotora. W wyniku transformacji i regeneracji gen ten włącza się losowo do genomu rośliny i w wielu przypadkach podłącza się do jakiegoś promotora, tworząc funkcjonalną całość. Taki hybrydowy gen (promotor z rośliny stransformowanej + gen *GUS*) przejawia swoją organowo- i/lub rozwojowo specyficzną ekspresję, która może być śledzona w laboratorium po podaniu substratu odpowiedniego dla *GUS* (KERTBUNDIT i współaut. 1991). Ta metoda znakowania i „wyławiania” promotorów jest stosowana od paru lat w kilku europejskich laboratoriach. Analiza ponad 1000 transgenicznych linii modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* wykazuje, że tylko około 5% „wyłowionych” w ten sposób promotorów wykazuje wzmoczoną aktywność w miejscu infekcji nicieniowej, przy czym nie jest to indukcja ściśle specyficzna. Zwykle ekspresję *GUS* obserwuje się też w innych miejscach w roślinie.

ZASTOSOWANIE BIOTECHNOLOGII WE WPROWADZANIU ODPORNOŚCI NA NICIENIE

Nematocydy są obecnie najbardziej toksycznymi pestycydami stosowanymi w rolnictwie, a co gorsza — jednocześnie najmniej skutecznymi i najtrudniejszymi w stosowaniu. Z tego powodu w wielu krajach rozwiniętych odchodzi się powoli od ich stosowania i szuka nowych, praktyczniejszych i bezpieczniejszych dla środowiska rozwiązań (ATKINSON i współaut. 1994).

Nadmiernego wzrostu populacji pasożytniczych nicieni można uniknąć poprzez stosowanie prawidłowego zmianowania i zachowanie odpowiednio długich przerw pomiędzy kolejnymi uprawami podatnymi na tego samego nicienia. Jest to jednak najczęściej warunek niemożliwy do spełnienia, gdyż większość nicieni ma bardzo szerokie spektrum gospodarzy, a niektóre ich gatunki potrafią przetrwać w stanie anabiozy nawet do ośmiu lat.

Inną możliwością jest zastosowanie w sposób masowy naturalnych wrogów nicieni, takich jak grzyby z gatunków *Nemathophthora gynophila* czy *Verticillium chlamydosporium*. W badaniach laboratoryjnych były one w stanie zniszczyć nawet 95% populacji nicieni, ale w praktyce okazało się, że działają bardzo wolno i są niezwykle trudne do zastosowania, chociaż zapewniają skuteczną i trwałą ochronę (BURROWS i współaut. 1994).

Ostatnią możliwością uniknięcia strat powodowanych przez nicienie jest wprowadzenie odporności do odmian uprawnych. Należy tu wyjaśnić, że w przypadku nicieni za roślinę odporną uznaje się taką, która uniemożliwia powiększanie się obecnej już populacji nicieni. Oznacza to, że za rośliny odporne uważa się takie, na których rozwijają się masowo tylko samce i sporadycznie pojedyncze samice (MÜLLER 1989). Problem polega jednak na tym, iż najczęściej gatunki uprawne nie posiadają odpowiednich genów odporności na nicienie i trzeba je przenosić z genomów ich dzikich krewnych, lub całkowicie obcych gatunków. Stosowane do tego tradycyjne metody hodowlane są bardzo czasochłonne i nie zawsze skuteczne.

Kilka znanych genów warunkujących odporność na nicienie jest obecnie już w części lub w całości sklonowana. Ich biochemiczna funkcja nie jest jednak

znana, podobnie zresztą jak większości innych genów odporności. Efekty ich działania są zazwyczaj podobne do nadwrażliwości i prowadzą do szybkiego obumierania protoplastu zaindukowanego organu odżywiającego nicienie.

Tak zwany gen *Mi* pochodzący z *Lycopersicon peruvianum* wprowadzono do genomu pomidora (*L. esculentum*). Jest to pojedynczy, dominujący gen o długości około 1,5 Mb i w najbliższej przyszłości powinien zostać całkowicie zsekwenconowany i sklonowany. Zapewnia on odporność na nicienie z rodzaju *Meloidogyne* (stąd nazwa) i jest, jak na razie, jedynym komercyjnie dostępnym genem odporności na te nicienie w uprawie pomidorów (ROBERTS 1992). Okazuje się jednak, że klasyczne lub nawet bardziej udoskonalone techniki hodowlane nie umożliwiają przeniesienia tego genu do innych roślin uprawnych niż pomidor.

Różne geny zapewniające odporność na *H. schachtii* występują w trzech dzikich gatunkach rodzaju burak (*Beta*), lecz do tej pory nie udało się wyhodować odmiany uprawnej odpornej na mątwika burakowego i posiadającej jednocześnie zdolność do produkcji cukru w stopniu umożliwiającym jego opłacalną produkcję. Obecnie podjęto kolejne próby osiągnięcia tego celu poprzez hodowlę linii translokacyjnych buraka cukrowego (trisomicznych krzyżówek buraka cukrowego z jego dzikim odpornym krewnym, które po *crossing-over* w mejozie mogą dać płodne diploidalne potomstwo posiadające już gen odporności w wymienionym odcinku genomowego DNA) noszących gen odporności przeniesiony z *B. procumbens*. Dla tych linii trwają już zaawansowane prace nad identyfikacją, mapowaniem i klonowaniem tego genu (JUNG i współaut. 1992).

Kilka dzikich podgatunków ziemniaka (*Solanum tuberosum*) posiada geny odporności na niektóre patotypy *Globodera rostochiensis* i *G. pallida*, podczas gdy inne patotypy nie wywołują reakcji obronnych rośliny. Skomplikowany skład genomu ziemniaka bardzo utrudnia mapowanie i klonowanie interesujących genów (PINEDA i współaut. 1993).

Trwają oczywiście poszukiwania innych genów warunkujących odporność na nicienie. Przykładem jest wyselekcjonowanie 12 różnych mutantów rzodkiewnika (*Arabidopsis*) oznaczonych jako *AMi* i posiadających częściową, lub całkowitą odporność na nicienie guzakowe lecz tylko częściową na mątwiki (NIEBEL i współaut. 1994). Z wyselekcjonowanych 12 mutantów większość wykazuje zaburzenia wzrostu i rozwoju, a co więcej, tylko jeden z nich okazał się być rzeczywiście odpornym w testach przeprowadzonych *in vitro*.

Żmudność metod klasycznych ilustruje fakt, że nad wprowadzeniem odporności na mątwika burakowego do buraka cukrowego pracuje się już od przeszło 80 lat i dopiero ostatnio osiągnięto to dzięki metodom biotechnologicznym. Wydaje się, że trudności związane z wprowadzeniem genów odporności do odmian uprawnych zostaną ostatecznie pokonane dopiero metodami inżynierii genetycznej w połączeniu z transformacją roślin. Aktualnie, przekazywanie obcego DNA za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* (por. przegląd GHEYSEN i współaut. 1992) jest techniką tak zaawansowaną, że tylko nieliczne rośliny nie dają się stransformować w ten sposób. Wtedy pozostają jeszcze do wykorzystania inne możliwości, jak na przykład mikrowstrzeliwanie DNA (porównaj artykuł *Genetyczna transformacja roślin* w tym zeszycie). Ponadto metody biotechnologiczne mogą być w przyszłości wykorzystane do modyfikowania i ulepszenia naturalnych genów odporności używając technik rekombinacji DNA.

Niezależnie od zastosowania genów odporności, rozwój pasożytniczego nicienia można przerwać w wielu miejscach jego cyklu rozwojowego, poczynając od uniemożliwienia mu opuszczenia osłonki jajowej, a na późnych, zaawansowanych stadiach rozwojowych kończąc. W dalszej części artykułu przedstawimy możliwe biotechnologiczne metody uzyskania odporności roślin, prowadzącej do przerwania rozwoju nicieni, w kolejności chronologicznej, w jakiej interferują one z ich cyklem życiowym.

OPUSZCZANIE OSŁONKI JAJOWEJ

Larwy niektórych gatunków mątwików wymagają przed opuszczeniem osłonki jajowej pobudzenia pewnymi substancjami, pochodzącymi z wydzielin korzeniowych. Poprzez wprowadzenie zmian w metabolizmie korzenia, prowadzących do zmniejszenia ilości tych związków można, teoretycznie, uzyskać rośliny nie stymulujące larw nicieni do opuszczania jaj. Strategia ta ma jednak parę słabych punktów. W ogólnej populacji jaj pewna ich część rozwija się zawsze do stadium wędrownych larw infekcyjnych, opuszczających osłonkę jajową bez uprzedniej stymulacji wydzielinami korzeniowymi. Prowadzi to do szybkiego wyselekcjonowania nowej wirulentnej populacji nicieni i obejścia uzyskanej tą drogą odporności. Dodatkowo okazało się, że niezwykle trudno jest wyizolować czynnik aktywny, a nawet po dokonaniu tego może okazać się, że metabolizmu korzenia nie da się zmienić w takim stopniu, aby związek stymulujący był produkowany w ilościach nie powodujących pobudzenia jaj (SIMONS i współaut. 1994b).

ROZPOZNANIE GOSPODARZA

Po opuszczeniu jaja wędrowna larwa drugiego stadium poszukuje potencjalnego gospodarza, kierując się do źródła substancji stymulujących (innych niż substancje indukujące opuszczenie jaja) czyli korzenia (CLEMENS 1994). Po dotarciu do niego larwa początkowo wędruje bardzo destrukcyjnie przez miękisz korowy aby, po dotarciu do walca osiowego, zmienić swoje zachowanie na znacznie bardziej subtelne. Świadczy to niewątpliwie o zdolności nicienia do rozpoznawania potrzebnych mu tkanek i komórek. Molekularny mechanizm tego procesu musi być podobny u wielu gatunków nicieni, gdyż potrafią one indukować organy odżywiające w korzeniach wielu gatunków roślin. Wprowadzenie zmian w metabolizmie korzenia może prowadzić do ograniczenia infekcji. Metoda ta posiada jednak takie same ograniczenia jak opisana poprzednio (SIMONS i współaut. 1994b).

BIĄŁKA TOKSYCZNE DLA NICIENI

Idea tej metody polega na wprowadzeniu do genomu rośliny genów kodujących białko toksyczne dla nicienia. Pobranie przez nicienia toksycznego białka produkowanego specyficznie tylko w organie odżywiającym, lub też konstytutywnie w całej roślinie, powinno prowadzić do jego śmierci lub przynajmniej zahamować i osłabić jego rozwój. Oczywiście białko to nie powinno być toksyczne dla rośliny. Kluczowym problemem było znalezienie substancji działającej wystarczająco silnie na nicienia. Pod uwagę brano egzotoksynę (substancję produ-

kowaną przez różne szczepy *Bacillus thuringiensis*), kolagenazę i inhibitor proteiny (SIJMONS i współaut. 1994a).

Do tej pory udało się już praktycznie stworzyć system funkcjonujący w oparciu o inhibitor trypsyny sklonowany z genomu wspegi chińskiej (*Vigna sinensis*) (CPTI) i soi (ATKINSON i współaut. 1994). Obecność CPTI nie ma znaczącego wpływu na natężenie infekcji i wczesne stadia rozwoju syncytium, jak też nie powoduje przerwania lub opóźnień rozwoju samców. Powoduje jednak zmniejszenie wielkości osobników obu płci i ponad dwukrotne zmniejszenie względnej liczby samic w stosunku do samców.

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE PRZECIW WYDZIELINOM NICIENI

Fragmenty DNA kodujące sekwencje łańcuchów immunoglobulin specyficznie aktywnych wobec wydzielin nicienia można wprowadzić do genomu rośliny i wywołać ich ekspresję. Wydzieliny larw nicienia wstrzyknięte do wyselekcjonowanych przez nie komórek zostaną zneutralizowane przez obecne w ich cytoplazmie przeciwciała. Przeciwciała wiążą się z reguły z centrami aktywnymi enzymów, przeciw którym zostały wyprodukowane. Enzymy czy też inne związki stymulujące, zawarte w wydzielinach nicienia, po połączeniu z przeciwciałami nie będą już w stanie aktywnie oddziaływać na metabolizm komórek gospodarza i nie będzie możliwe tym samym zaindukowanie przez nicienia organu odżywiającego (SCHOTS i współaut. 1992). To podejście znalazło już praktyczną realizację w fitopatologii: w ten sposób wprowadzono gen odporności do roślin tytoniu warunkujący ich odporność na porażenie wirusami (TAVLADORAKI i współaut. 1993).

BIĄŁKA TOKSYCZNE WOBEC STRUKTURY ODŻYWIĄCEJ NICIENIA

Po zaindukowaniu organu odżywiającego dalszy rozwój larw nicienia osiadłych odbywa się kosztem asymilatów gospodarza pobieranych za pośrednictwem tego wysoce wyspecjalizowanego organu. Larwy nie mogą już nigdy więcej zmienić swego położenia, a nawet nie są w stanie zaindukować ponownie powstania nowego organu odżywiającego, jeżeli stary zostanie uszkodzony. Co więcej, od efektywności tego organu zależy przyszła płeć nicienia. Wszelkie zaburzenia lub ograniczenia w dopływie związków pokarmowych powodują tworzenie się mniejszej liczby samic. Tę zależność można wykorzystać do konstruowania roślin transgenicznych odpornych na nicienie. Jeśli taka roślina będzie syntetyzować jakąkolwiek toksynę niszczącą syncytium, spowoduje to zatrzymanie dopływu pokarmu i tym samym śmierć nicienia. Ważną zaletą takiego podejścia jest fakt, że ma ono charakter ogólny, redukuje niebezpieczeństwo specyficzności gatunkowej i pojawienia się mutantów odpornych. Głównym problemem jest jednak stworzenie mechanizmu specyficznie uruchamiającego produkcję toksyny w organie odżywiającym. Cała gama toksycznych genów jest znana i może być łatwo wykorzystana. Pod uwagę mogą być brane substancje, takie jak nukleazy, proteinazy, glukanazy, lipazy, czynniki transkrypcji, przeciwciała i toksyny. Najważniejszym problemem jest jednak takie zmodyfikowanie genomu rośliny, aby gen kodujący toksynę był aktywny tylko i wyłącznie w zaindukowanej komórce lub też aby był aktywny we wszystkich komórkach, ale jego produkt

był neutralizowany w komórkach nie porażonych przez patogena. W oparciu o tę koncepcję zaproponowano model dwukomponentowego systemu składającego się z dwóch różnych promotorów i dwóch genów (SIJMONS 1993).

Praktyczną realizację tego systemu można oprzeć, na przykład, na parze związków: barnaza-barstar. Barnaza jest rybonukleazą toksyczną dla komórek. Enzym ten pochodzi z bakterii *Bacillus amyloliquefaciens* i posiada swój wewnętrzkomórkowy inhibitor zwany barstar. Oba związki są małymi jednołańcuchowymi białkami, które reagują ze sobą w proporcji 1:1, przez co barnaza ulega rozcięciu i dezaktywacji (HARTLEY 1988, 1989). Gen kodujący barnazę jest przyłączony do promotora o słabej ekspresji w normalnych tkankach rośliny, ale silnie aktywnego w organie odżywiającym nicienia. Natomiast gen kodujący sekwencję barstar jest pod kontrolą promotora konstytutywnie aktywnego w całej roślinie, ale blokowanego w organie odżywiającym nicienia (np. CaMV 35S). Po wprowadzeniu całego systemu do genomu rośliny w normalnych warunkach mamy więc następującą sytuację: barnaza jest produkowana w małych ilościach, gdyż jej promotor jest mało aktywny, i jest natychmiast blokowana przez barstar produkowany obficie, gdyż jego gen jest połączony z wysoce aktywnym promotorem. Sytuacja zmienia się, gdy dojdzie do zaindukowania przez nicienia organu odżywiającego. Jak wcześniej wspomniano, promotor białka barstar jest blokowany w organach odżywiających nicienie, dlatego też inhibitor ten nie jest dłużej produkowany w tych komórkach. Jako białko wewnętrzkomórkowe nie jest też wydzielany przez komórki sąsiednie i eksportowany do komórek wyselekcjonowanych przez nicienie. Natomiast barnaza, której gen jest połączony z promotorem nie ulegającym zablokowaniu przez nicienie, lub nawet przez nie aktywowanym, jest produkowana dalej. Po wyczerpaniu się zapasów inhibitora, w ciągu krótkiego czasu nagromadzają się duże ilości barnazy, co doprowadza do śmierci komórki inicjalnej organu odżywiającego. Dodatkową zaletą tego systemu jest brak konieczności użycia specyficznego promotora. Każdy przypadkowy wzrost ekspresji genu toksycznego poza strukturą odżywiającą będzie natychmiast neutralizowany przez barstar. Tylko tam, gdzie nastąpi zahamowanie aktywności genu neutralizującego, czyli w zaindukowanym organie odżywiającym nicienia, dojdzie do ujawnienia się efektu genu toksycznego (SIJMONS 1993).

FEROMONY

Samce poszukując i wędrując do samic są przywabiane feromonami płciowymi wytwarzanymi przez samice. Ich skład nie jest niestety do tej pory znany.

Istnieje kilka możliwości zakłócenia tego procesu. Można wprowadzić do genomu rośliny geny produkujące feromony nicieni w dużych ilościach i poprzez to swego rodzaju zagłuszanie uniemożliwić samcom określenie kierunku, z którego dochodzi sygnał chemiczny, lub też wprowadzić geny substancji szybko dezaktywizujących feromony nicieni. Inną metodą może być wprowadzenie zmian w metabolizmie roślin, uniemożliwiających im produkcję endogennych prekursorów ewentualnie potrzebnych nicieniowi do produkcji feromonów. Te metody są jednak całkowicie hipotetyczne i prawdopodobnie nigdy nie wyjdą poza stadium możliwości teoretycznych.

BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF INTRODUCING RESISTANCE TO NEMATODA IN PLANTS

Summary

The parasites nematoda cause large losses in plant crops, therefore search is continued for new, more efficient and less toxic for the environment methods of crop protection against those parasites. To understand the mechanism of resistance to nematoda it is indispensable to know their life cycle, as well as structure and function of the induced by nematoda in plant tissues, i.e. syncytia and giant cells. Their description is followed by discussion of changes in gene expression of the host plant, occurring in response to the pathogen attack. This forms the background for presentation of recent achievements of biotechnology in search for nematoda resistance.

LITERATURA

- ATKINSON H. J., BLUNDY K. S., CLARKE M. C., HANSEN E., HARPER G., KORITSAS V., MCPHERSON M., O'REILLY D., TURNBULL S. R., URWIN P. E., 1994. *Novel plant defences against nematodes*. [W:] *Advances in Molecular Plant Nematology* LAMBERTI F., De GIORGI C., McK. BIRD D. (red.). Plenum Press New York, 197-210.
- BLEVE-ZACHEO T., ZACHEO G., 1987. *Cytological studies of the susceptible reaction of sugarbeet roots to Heterodera schachtii*. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* 30, 13-25.
- BURROWS P. R., 1992. *Molecular analysis of the infection between cyst nematodes and their hosts*. *J. Nematol.* 24, 338-342.
- BURROWS P. R., KERRY B. R., PERRY R. N., 1994. *New approaches to plant-parasitic nematode control*. *J. Zool. Lond.* 232, 341-346.
- CHITWOOD D. J., LUSBY W. R., 1991. *Metabolism of plant sterols by nematodes*. *Lipids* 26, 619-627.
- CLEMENS C. -D., 1994. *Partielle Charakterisierung und Bedeutung von Wirtswurzelexudaten für das pinfektionelle Verhalten der L2-Larven des Rübenzystennematoden Heterodera schachtii* SCHMIDT. *Praca Doktorska*, University of Kiel, 131.
- CRAMER C. L., 1992. *Regulation of defence-related gene expression during plant-pathogen interaction*. *J. Nematol.* 24, 586-587.
- DESPOMMIER D. D., 1990. *Trichinella spiralis: a worm that would be virus*. *Parasitol. Today* 6, 193-196.
- ENDO B. Y., 1975. *Pathogenesis of nematode-infected plants*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13, 213-238.
- GHEYSEN G., ANGENON G., Van MONTAGU M., 1992. *Transgenic plants: Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and its use for crop improvement*. [W:] J. A. H. Murray (red.) John Wiley and Sons, Chichester, 187-232.
- GHEYSEN G., Van MONTAGU M., 1995. *Plant/nematode interactions, a molecular biologist's approach*. *Nematologica* 41, 366-384.
- GODDIN O. J. M., LINDSEY K., van der LEE F. M., Klap J. C., SIMMONS P. C., 1993. *Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-gusA fusion constructs*. *Plant J.* 4, 863-873.
- GOLINOWSKI W., MAGNUSSON C., 1991. *Tissue response induced by Heterodera schachtii (Nematoda) in susceptible and resistant white mustard cultivars*. *Can. J. Bot.* 69, 52-62.
- GRUNDLER F. M. W., 1989. *Untersuchungen zur Geschlechtsdetermination des Rübenzystennematoden Heterodera schachtii* SCHMIDT. *Praca Doktorska*, University of Kiel, 125.
- GRUNDLER F. M. W., BÖCKENHOFF A., SCHMIDT K.-P., SOBCZAK M., GOLINOWSKI W., WYSS U., 1994. *Arabidopsis thaliana and Heterodera schachtii, a versatile model to characterize the interaction between host plants and cyst nematodes*. [W:] *Advances in Molecular Plant Nematology* LAMBERTI F., De GIORGI C., McK. BIRD D. (red.). Plenum Press New York, 171-180.
- GRYMASZEWSKA G., GOLINOWSKI W., 1991. *Structure of syncytia induced by Heterodera avenae Woll. in roots of susceptible and resistant wheat (Triticum aestivum L.)*. *J. Phytopathol.* 133, 307-319.
- HAMMOND-KOSACK K. E., ATKINSON H. J., BOWLES D. J., 1990. *Changes in abundance of translatable mRNA species in potato roots and leaves following root invasion by cyst-nematode Globodera rostochiensis pathotypes*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37, 339-354.

- HARTLEY R. W., 1988. *Barnase and barstar. Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease*. J. Mol. Biol. 202, 913-915.
- HARTLEY R. W., 1989. *Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together*. TIBS 14, 450-454.
- JEFFERSON R.A., KAVANAGH T. A., BEVAN M.W., 1987. *GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO J. 6, 3901-3907.
- JONES M. G. K., 1981. *Host cell responses to endoparasitic nematode attack: Structure and function of giant cells and syncytia*. Ann. appl. Biol. 97, 353-372.
- JONES M. G. K., NORTHCOLE D. H., 1972. *Nematode-induced syncytium-a multinucleate transfer cell*. J. Cell Sci. 10, 789-809.
- JUNG C., KOCH R., FISCHER F., BRANDES A., WRICKE G., HERRMANN R.G 1992. *DNA markers closely linked to nematode resistance genes in sugar beet (Beta vulgaris L.) mapped using chromosome addition and translocations originating from wild beets of the Procumbentes section*. Mol. Gen. Genet. 232, 271-278.
- KERTBUNDIT S., DE GREVE H., DEBOECK F., VAN MONTAGU M., HERNALSTEENS J.-P., 1991. *In vivo random β -glucuronidase gene fusion in Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88; 5212-5216.
- LEE D. L., KO R. C., YI X. Y., YEUNG M. H. F., 1991. *Trichinella spiralis: antigenic epitopes for the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host*. Parasitology 102, 117-123.
- MAGNUSSON C., GOLINOWSKI W., 1991. *Ultrastructural relationship of the developing syncytium induced by Heterodera schachtii (Nematoda) in root tissue of rape*. Can. J. Bot. 69, 44-52.
- MUGNIERY D., FAYET G., 1981. *Determination du sexe chez Globodera pallida Stone*. Rev. Nematol. 4, 41-45.
- MÜLLER J., 1989. *Zur Definition von Resistenz und andere Fachbegriffe in der Nematologie*. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 41, 137-139.
- NIEBEL A., BARTHELIS N., DE ALMEIDA-ENGLER J., KARIMI M., VERCAUTEREN I., VAN MONTAGU M., GHEYSEN G., 1994. *Arabidopsis thaliana as a model host plant to study molecular interactions with root-knot and cyst nematodes*. [W:] *Advances in Molecular Plant Nematology*. LAMBERTI F., DE GIORGI C., McK. BIRD D. (red.). Plenum Press New York, 161-170.
- NIEBEL A., HEUNGENS K., BARTHELIS N., INZ D., VAN MONTAGU M., GHEYSEN G., 1995. *Characterization of the pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection*. Mol. Plant-Microbe Interact. (w druku).
- OPPERMAN C. H., TAYLOR C. G., CONKLING M. A., 1994. *Root knot nematode direct expression of plant root specific gene*. Science 263, 221-223.
- PINEDA O., BONIERBALE M., PLAISTED R., BRODIE R. L., BRODIE B., TANKSLEY S. T., 1993. *Identification of RFLP markers linked to the H1 gene conferring resistance to the potato cyst nematode Globodera rostochiensis*. Genome 36, 152-156.
- POZIO E., BRUSCHI F., 1994. *Updating on Trinellois*. Parasitology Today 18, 288-293.
- RASKI D. J., 1950. *The life history and morphology of the sugarbeet nematode Heterodera schachtii* SCHMIDT. Phytopathology 40, 135-150.
- ROBERTS P.A., 1992. *Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes*. J. Nematol. 24, 213-227.
- SASSER J. N., FRECKMAN D. W., 1987. *A world perspective on Nematology: the role of the Society*. [W:] *Vistas on Nematology* J. A. Veech, D. W. Dickson (red.). Society of Nematologists Hyattsville, 7-14.
- SCHMIDT K.-P., 1995. *Proteinanalytische Charakterisierung pathogenespezifischer Vorgänge im Wurzelgewebe von Arabidopsis thaliana nach Infektion mit dem Rübenzystennematoden Heterodera schachtii*. Praca doktorska, University of Kiel, 166.
- SCHOTS A., DE BOER J., SCHOUTEN A., ROOSIEN J., ZILVERENTANT J. F., POMP H., BOUWMAN-SMITS L., OVERMARS H., GOMMERS F. J., VISSER B., STIEKEMA W. J., BAKKER J., 1992. *"Plantibodies": a flexible approach to design resistance against pathogens*. Neth. J. Plant Pathol. 98, 183-191.
- SIJMONS P. C., 1993. *Plant nematode interactions*. Plant Mol. Biol. 23, 917-931.
- SIJMONS P. C., ATKINSON H. J., WYSS U., 1994a. *Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses*. Ann. Rev. Phytopathol. 32, 235-259.
- SIJMONS P. C., GRUNDLER F. M. W., VON MENDE N., BURROWS P. R., WYSS U., 1991. *Arabidopsis thaliana as a new model host for plant-parasitic nematodes*. Plant J. 1, 245-254.
- SIJMONS P. C., VON MENDE N., GRUNDLER F. M. W., 1994b. *Plant-parasitic nematodes*. [W:] *Arabidopsis* MEYEROWITZ E. M., SOMERVILLE C. R. (red.). Cold Spring Harbour Laboratory Press New York, 749-768.

- TAVLADORAKI P., BENVENUTO E., TRINCA S., De MARTINIS D., CATTANEO A., GALEFFI P., 1993. *Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack*. Nature 366, 469-472.
- TAYLOR C. G., SONG W., OPPERMAN C. H., CONKLING M. A., 1992. *Characterization of the nematode-responsive plant gene promoter*. J. Nematol. 24, 621.
- TRANTAPHYLLOU A. C., HIRSCHMANN H., 1980. *Cytogenetics and morphology in relation to evolution and speciation of plant-parasitic nematodes*. Ann. Rev. Phytopathol. 18, 333-359.
- Van der EYCKEN W., NIEBEL A., INZÈ D., Van MONTAGU M., GHEYSEN G., 1992. *Molecular analysis of the interaction between Meloidogyne incognita and tomato*. Nematologica 38, 441.
- Van der EYCKEN W., de ALMEIDA-ENGLER J., GHEYSEN G., Van MONTAGU M., 1994. *Molecular study of the compatible interaction: Meloidogyne incognita-tomato*. Nematologica 41, 350.
- WEISSENBORN D. L., ZHANG X., EISENBACK J. D., RADIN D. N., CRAMER C. L., 1994. *Induction of the tomato hmg2 gene in response to endoparasitic nematodes*. The 4th International Congress of Plant Molecular Biology, 19-24. 06., 1994, Amsterdam, Holandia, 1744, 1994.
- WYSS U., 1992. *Observations on the feeding behaviour of Heterodera schachtii throughout development, including events during moulting*. Fundam. appl. Nematol. 15, 75-89.
- WYSS U., GRUNDLER F. M. W., 1992. *Seminar: Heterodera schachtii and Arabidopsis thaliana, a model host-parasite interaction*. Nematologica 38, 488-493.
- WYSS U., GRUNDLER F. M. W., MÜNCH A., 1992. *The parasitic behaviour of second stage juveniles of Meloidogyne incognita in roots of Arabidopsis thaliana*. Nematologica 38, 98-111.
- WYSS U., STENDER C., LEHMANN H., 1984. *Ultrastructure of feeding sites of the cyst nematode Heterodera schachtii SCHMIDT in roots of susceptible and resistant Raphanus sativus L. var. oleiformis Pers. cultivars*. Physiol. Plant Pathol. 5, 21-37.