

WŁADYSŁAW GOLINOWSKI, GRAŻYNA GRYMASZEWSKA, SŁAWOMIR JANAKOWSKI,
WOJCIECH KUREK i MIROSŁAW SOBCZAK

Katedra Botaniki

Wydział Rolniczy SGGW

Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

e-mail: golinowski@delta.sggw.waw.pl

STRATEGIE KONSTRUOWANIA ROŚLIN TRANSGENICZNYCH ODPORNYCH NA NICIENIE

WSTĘP

Pasożytnicze nicienie atakujące korzenie roślin są bardzo uciążliwą grupą organizmów chorobotwórczych, a ich zwalczanie jest ekonomicznie opłacalne jedynie przy pomocy bardzo toksycznych i biologicznie trwałych nematocydów. Prowadzi to do skażenia środowiska glebowego. Z tego powodu ich stosowanie napotyka na zrozumiały i stale rosnący opór opinii publicznej. Kraje Unii Europejskiej stopniowo zakazują stosowania tych pestycydów. Tymczasem straty w uprawie kilku ważnych dla naszego rolnictwa upraw (np. ziemniaka i buraków cukrowych) powodowane przez nicienie mogą sięgać nawet 20-30% plonów. Alternatywne i przyjazne dla środowiska metody, które powinny zastąpić ochronę chemiczną w praktyce rolniczej znajdują się wciąż w stadium opracowywania. Istniejące metody alter-

natywne są ekonomicznie nieopłacalne, trudne do zastosowania i zawodne. Najprostszą metodą ograniczenia występowania nicieni jest wprowadzenie do uprawy odmian posiadających naturalne geny odporności na nicienie. Jednak geny te są najczęściej wysoce specyficzne i skuteczne jedynie wobec bardzo określonych gatunków nicieni, a czasem nawet tylko wobec pewnych patotypów danego gatunku. Co więcej, bardzo często odporność przez nie warunkowana jest w warunkach polowych przełamywana, co prowadzi do selekcji nowego wirulentnego patotypu nicienia. Dlatego pomimo ogromnych nakładów na hodowlę odmian odpornych czas praktycznego wykorzystania rolniczego wyhodowanej odmiany jest niewiele dłuższy od czasu potrzebnego do jej wytworzenia.

ZARYS STRATEGII WALKI Z NICIENIAMI

Spośród pasożytujących na roślinach nicieni szczególnie ważne są mątwiki (nicienie cystowe) i guzaki. Tak jak u innych nicieni wyróżniamy w ich cyklu życiowym 4 stadia larwalne (J1 - J4) i stadium dojrzałe, zdolne do rozrodu. Są to organizmy osiadłe, których sukces reprodukcyjny zależy w dużej mierze od rośliny-gospodarza, którą zainfekują. Infekując korzenie roślin postaci inwazyjne pasożyta (larwy sta-

dium J2) zmieniają program morfogenetyczny komórek korzenia, prowadząc do powstania w nim organu odżywiającego nicienia. W czasie całego cyklu rozwojowego nicieni ten organ jest dla nich jedynym źródłem substancji pokarmowych.

Mątwiki indukują w korzeniach roślin wielokomórkowe struktury odżywiające zwane syncytiami. Tworzą się one poprzez początko-

we silne rozrośnięcie się pojedynczych komórek, a następnie zlanie się ich protoplastów w wyniku rozpuszczenia fragmentów ścian komórkowych. Natomiast guzaki indukują powstawanie tak zwanych komórek olbrzymich (ang. giant cells). Są to zespoły bardzo silnie powiększonych pojedynczych komórek, z których nicienń sukcesywnie pobiera pokarm. W obrazie cytologicznym obu typów organów odżywiających występują: hipertrofia komórek, zanik centralnej wakuoli oraz proliferacja retikulum endoplazmatycznego i rybosomów. Celowe byłoby więc uzyskanie takich roślin, które w reakcji na inwazję patogena w ogóle nie wytworzą organów odżywiających lub wytworzą organy bardzo mało efektywne w dostarczaniu pokarmu nicieniom. Dodatkowym czynnikiem podnoszącym skuteczność tej strategii odporności roślin jest fakt, że larwy nicieni, które zaindukowały rozwój organu odżywiającego w korzeniach, tracą zdolności lokomotoryczne. Larwy te nie mogą już opuścić korzenia, ani też zmienić swojego miejsca w korzeniu. Ma to podstawowe znaczenie dla tego mechanizmu odporności na nicienie, gdyż w przypadku nekrozy organu odżywiającego larwa nie jest w stanie ponownie zaindukować nowego organu i ginie. U guzaków i mątwików występuje także specyficzny epigenetyczny mechanizm regulacji płci poprzez ilość i skład substancji odżywczych produkowanych i pobieranych z organu odżywiającego. Dlatego bardzo często odporność roślin na nicienie objawia się zwiększoną proporcją samców w stosunku do samic, które dodatkowo produkują mniejsze ilości jaj. Prowadzi to w efekcie końcowym do zmniejszenia zagęszczenia nicieni w glebie. Z punktu widzenia długofalowej ochrony roślin mechanizm taki jest wystarczający dla redukcji strat powodowanych przez nicienie.

Pierwszym etapem skutecznej walki z nicieniami powinno więc być poznanie reakcji ro-

śliny, które prowadzą do wytworzenia w pełni funkcjonalnego organu odżywiającego pasożyta. Następnie należy podjąć próby takiego modyfikowania metabolizmu roślin, aby reakcje te nie mogły zostać uruchomione przez larwy nicieni. W ten sposób można będzie uzyskać odporność roślin na nicienie. Takie podejście ma przewagę nad stosowaniem naturalnych genów odporności, gdyż zmodyfikowane rośliny powinny być odporne na całą grupę gatunków nicieni tworzących struktury odżywiające o podobnym planie budowy.

Strategia ta została zastosowana w finansowanym przez Unię Europejską w ramach 5 Programu Ramowego projekcie „Wytwarzanie roślin odpornych na nicienie pasożytnicze: ograniczanie infekcji-głodzenie nicienia” – „Making plants resistant to plant parasitic nematodes: no access – no feeding” (akronim: NONEMA). Autorzy tego projektu zdają sobie sprawę, że uzyskanie odporności przeciwko organizmowi takim jak nicienie przy użyciu pojedynczego czynnika odporności jest trudne. W wielu przypadkach interakcja jest bardzo złożona i patogen znajduje nieoczekiwane drogi przełamania odporności. Dlatego o wiele skuteczniejsze wydaje się takie zmodyfikowanie genomu rośliny, by stworzyć możliwość blokowania kilku etapów cyklu życiowego nicienia. Etapami, na których koncentrują się badania w ramach projektu NONEMA są: migracja patogena wewnątrz korzenia, reaktywacja cyklu komórkowego w komórkach korzenia, tworzenie połączeń między komórkami należącymi do syncytium. Odporne rośliny, będące potencjalnym rezultatem projektu, to organizmy transgeniczne. Dlatego wśród podjętych badań znalazł się specjalny pakiet roboczy, którego celem jest zapewnienie, że obce dla rośliny uprawnej geny (transgeny) będą wytwarzać swe produkty (wykazywać ekspresję) tylko w określonych organach rośliny.

HAMOWANIE MIGRACJI LARW W KORZENIU

Larwy inwazyjne zarówno mątwików jak i guzaków muszą wejść do korzenia i wewnątrz niego migrować do miejsca, gdzie zainicjują powstanie struktury odżywiającej. Migrację ułatwiają im wydzielane do korzenia substancje zwane ogólnie czynnikami patogenicznymi. Larwy te są wyposażone w wysuwany sztylet – sztywny organ podobny do igły do iniek-

cji, którym mogą przebijać się przez ściany komórkowe. Oprócz tego wydzielają enzymy degradujące ścianę, takie jak celulazy (β -1,4-endoglukanazy). Celulazy takie znaleziono zarówno u mątwików (SMANT i współaut. 1998), jak i u guzaków (ROSSO i współaut. 1999). W trakcie migracji nicienie mogą też wydelać enzymy degradujące pektyny, takie jak liaza pektynia-

nowa, co ułatwia przemieszczenie się między komórkami gospodarza, które ściśle przylegają do siebie właśnie dzięki warstwom pektyny. Enzymy degradujące ścianę komórkową są zwykle kodowane przez niewielkie rodziny genów. Po przebiciu się przez skórę korzenia larwy guzaków migrują międzykomórkowo, a larwy mątwików – wewnątrzkomórkowo w kierunku walca osiowego. Na tym etapie roślina uruchamia mechanizm obronny w postaci produkowania reaktywnych form tlenu (RFT) w celu zabicia patogena. W odpowiedzi nicieni wydzielają ochronne enzymy (peroksydazy, dysmutazę nadtlenkową), by inaktywować RFT gospodarza. Migracja larw kończy się w momencie znalezienia odpowiedniej komórki, która stanie się początkiem struktury odżywiającej nicienia. Taką komórką inicjalną dla guzaków (rodzaj *Meloidogyne*) jest zwykle komórka miękiszu drzewnego (WYSS i współaut. 1992), a dla mątwików (rodzaje *Heterodera* i *Globodera*) – komórka prokambium lub perycyklu (GOLINOWSKI i MAGNUSON 1991) lub nawet kory pierwotnej (GOVERSE i współaut. 2000b), zależnie od kombinacji roślina/nicień.

Pierwszym krokiem w kierunku hamowania migracji nicieni w korzeniu jest więc tu dokładne zidentyfikowanie wydzielanych przez larwy białek (np. enzymów degradujących ścianę i peroksydaz) i ich genów niezbędnych dla sukcesu patogena na tym etapie. W tym celu zastosowane zostały różne techniki biologii molekularnej.

Pierwszą z nich jest sporządzenie subtrakcyjnej biblioteki cDNA. W tym celu wyizolowane zostały wszystkie mRNA z larw J2 przed stadium pasożytniczym z jednej strony oraz z larw J3 i J4 z drugiej strony. mRNA z pierwszej puli (J2) zostały przepisane za pomocą odwrotnej transkryptazy na jednoniciowe cząsteczki cDNA (ang. complementary DNA – DNA o sekwencji komplementarnej do danego mRNA). Takie cDNA użyto do hybrydyzacji (łączenia się) z tymi cząsteczkami mRNA z larw J3+J4, które są wspólne dla obu puli. Cząsteczki mRNA nie tworzące hybryd z cDNA wyizolowano, przepisano na cDNA i stanowią one bibliotekę subtrakcyjną cDNA, zawierającą sekwencje specyficzne dla larw stadiów pasożytniczych. Wśród tych sekwencji poszukiwane są geny (białka) pasożyta, których ekspresja (aktywność) pozwala patogenowi migrować wewnątrz korzenia i indukować strukturę odżywiającą.

Drugą metodą jest porównawcze cDNA-AFLP. AFLP (ang. amplified fragment length polymorphism) to polimorfizm długości fragmentów DNA namnożonych w reakcji PCR. W tym przypadku mRNA larw J2 przepisano na cDNA, które z kolei pocięto enzymami restrykcyjnymi. Otrzymane w ten sposób fragmenty powielono reakcją PCR i rozdzielono elektroforetycznie na żelu, uzyskując charakterystyczny układ prążków. Procedurę tę przeprowadzono osobno dla mRNA z przedniej i tylnej połowy ciała nicienia. Można przypuszczać, że te prążki, które wystąpią tylko w żelu z przedniej połowy ciała, będą reprezentować poszukiwane czynniki patogeniczne (gruczoły wydzielnicze zlokalizowane są w tej części ciała). Specyficzność uzyskanych w ten sposób sekwencji jest dalej weryfikowana przy użyciu metody hybrydyzacji *in situ*, gdzie odpowiednio przygotowana sonda (fragment DNA lub RNA) łączy się z odpowiednim fragmentem mRNA utrwalonego, np. w skrawku przekroju podłużnego przez larwę J2. Zlokalizowanie badanego mRNA na terenie gruczołów wydzielniczych robaka świadczy o zachodzącej transkrypcji danego genu (o jego ekspresji) i potwierdza hipotezę, że jest to czynnik patogeniczny.

Trzecią metodą jest sztuczne indukowanie procesu wydzielania u larw J2 za pomocą odpowiednich substancji chemicznych. Wśród zebranych w ten sposób wydzielin (białek) są z pewnością liczne czynniki patogeniczne. Białka te są następnie rozdzielane elektroforetycznie i sekwencjonowane.

Wykryte powyższymi trzema metodami geny (białka) to kandydaci na najważniejsze czynniki patogeniczne na etapie migracji. Znaczenie każdego takiego czynnika dla sukcesu nicienia jako patogena powinno być najpierw dokładniej zbadane, np. poprzez inaktywowanie (wyciszenie) odpowiedniego genu w organizmie robaka i obserwowanie czy taki zmodyfikowany organizm jest w stanie pomyślnie przejść przez etap migracji. Niestety, laboratoria nematologiczne nie dysponują aktualnie mutantami nicieni. Również transformacja nicieni pasożytniczych roślin z użyciem tzw. konstrukcji antysensownych jest skomplikowana. Można jednak wykorzystać zjawisko zwane interferencją RNA (ang. RNA interference, RNAi), polegające na inaktywacji wybranego genu poprzez wprowadzenie do organizmu cząsteczek dwuniciowego RNA (dsRNA). Nie-

dawno opracowano technikę, która pozwala zahamować funkcję danego genu u modelowego gatunku wolno żyjącego nicienia *Caenorhabditis elegans* na drodze mikroiniekcji cząsteczek dsRNA komplementarnego do mRNA genu, który ma być wyciszony. Wystarczy wstrzyknąć tylko kilka kopii dsRNA, by inaktywować nawet bardzo duże ilości docelowego mRNA. Co więcej, dsRNA łatwo przenika z komórki do komórki i mikroiniekcja nie musi być bardzo precyzyjna (MONTGOMERY i współaut. 1998). Technika ta wykazała już swoją przydatność w przypadku nicienia – pasożyta zwierząt *Trypanosoma brucei* (NGO i współaut. 1998), ale wymaga zaadoptowania do układu roślina/nicień. Oprócz mikroiniekcji planowane jest też w ramach NONEMA mikrowstrzeliwanie dsRNA do jaj lub larw J2 w sposób analogiczny do jednej z technik otrzymywania roślin transgeniczných. Następny etap to infekowanie korzeni wrażliwych odmian roślin osobnikami mątwików (lub guzaków) otrzymanych w wyniku transformacji fragmentami dsRNA skierowanymi przeciw różnym genom. Larwy, o najbardziej zahamowanym rozwoju wewnątrz korzenia, wskazują na te geny nicienia, których aktywność jest najważniejsza dla sukcesu patogena na etapie migracji i indukowania struktury odżywiającej.

Po ustaleniu, które z wydzielanych przez nicienia czynników patogenicznych są najistotniejsze dla sukcesu patogena na etapie migracji, wybrane białka nicienia można inaktywować za pomocą odpowiednich przeciwciał (immunoglobulin) wytwarzanych przez roślinę transgeniczną specyficzną w miejscu infekcji patogena. Mimo że rośliny nie mają systemu

immunologicznego takiego jak kręgowce, opracowano już techniki pozwalające na ekspresję immunoglobulin przez komórki roślinne (STIEKEMA i współaut. 1997). W tym celu należy przetłumaczyć informację zawartą w sekwencjach aminokwasów łańcucha ciężkiego i lekkiego danej immunoglobuliny na sekwencje nukleotydów i skonstruować w ten sposób dwa geny. Genami tymi (pod kontrolą odpowiednich promotorów) transformuje się roślinę. W komórkach, w których znajdują się produkty obu genów, dojdzie do połączenia się polipeptydów w funkcjonalną immunoglobulinę. Tak uzyskane przeciwciała otrzymały angielską nazwę plantibodies (od ang. plant antibodies).

Ich skuteczność została już wykazana w układzie pasożytniczym roślina/wirus (TAVLADORAKI i współaut. 1993). W przypadku nicienia, syntetyzowane w odpowiednich komórkach korzenia przeciwciała będą w stanie inaktywować czynniki patogeniczne nicienia i zahamować inwazję już na etapie migracji. Jak już wspomniano, czynnikami tymi są m.in. wydzielane przez nicienia enzymy degradujące ścianę komórkową. Białka te łączą się z odpowiednimi ligandami w roślinie. Aby przeciwciało (plantibody) było efektywnym inhibitorem, powinno ono łączyć się właśnie z aktywnym miejscem enzymu. Zlokalizowanie tego miejsca możliwe jest dzięki trójwymiarowemu modelowaniu białek. Technika ta w ramach NONEMA pozwoli ustalić wspólne dla danej rodziny genów (i białek) domeny celulaz nicieniowych kluczowe dla ich enzymatycznej aktywności. Przeciwciało skierowane przeciw takiej domenie wykaże największą skuteczność.

UNIEMOŻLIWIENIE REAKTYWACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO W KOMÓRKACH KORZENIA

Następny po migracji etap inwazji patogena to zaindukowanie wybranej komórki inicjalnej do rozwoju w funkcjonalną strukturę odżywiającą nicienia. Okazuje się, że integralną częścią tego procesu jest reaktywacja cyklu życiowego tej właśnie wyselekcjonowanej komórki (DE ALMEIDA ENGLER i współaut. 1999). Guzaki powodują ostatecznie wytworzenie od 2 do 12 wielojądrowych komórek olbrzymich, z których każda zawiera od 30 do 60 jąder. Jest to wynik reaktywacji cyklu komórkowego, której wynikiem są liczne mitozy bez cytokinez. Syncytium tworzone w wyniku interakcji z mątwikami jest tworem wielojądrowym, ale nie w wyni-

ku indukowanych mitoz, lecz jako rezultat połączenia protoplastów sąsiednich komórek za pomocą wielkich otworów powstałych w wyniku rozpuszczenia ścian komórkowych. Jednak i w tym przypadku jądra są powiększone, o ameboidalnym kształcie, co jest wynikiem powielenia ilości DNA wewnątrz otoczki jądrowej (endoreduplikacji). Tak więc i tu nicien powoduje wznowienie cyklu komórkowego. Zjawisko to było badane również metodami biologii molekularnej i stwierdzono podczas indukcji struktury odżywiającej nicienia podwyższenie ekspresji niektórych genów kodujących białka charakterystyczne dla poszczególnych

etapów cyklu komórkowego, m. in. cyklin oraz zależnych od nich kinaz (GHEYSEN i współaut. 1997). Niezbędność aktywacji cyklu komórkowego komórek korzenia dla sukcesu patogena wykazano też dla obu grup nicieni w doświadczeniach z użyciem inhibitorów cyklu komórkowego: oryzaliny i hydroksymocznika (DE ALMEIDA ENGLER i współaut. 1999). Zachodzi więc potrzeba szczegółowego poznania, które białka (geny) związane z aktywacją cyklu komórkowego ulegają podwyższonej ekspresji. Z jednej strony można badać wzór ekspresji wybranych genów za pomocą hybrydyzacji *in situ*, umożliwiającej ustalenie, w których komórkach zachodzi transkrypcja (a więc i ekspresja na poziomie mRNA) danego genu. Jest to technika wykonywana na utrwalonym już materiale. Możliwe jest też jednak monitorowanie tej ekspresji *in vivo* przy użyciu transgenicznych roślin zawierających konstrukt: promotor badanego genu + gen reporterowy. W tym układzie ekspresja genu reporterowego (np. w postaci świecenia) wystąpi tylko w takiej komórce, w której promotor badanego genu ulega aktywacji, a badany gen (np. gen cykliny) wykazuje pełną ekspresję w postaci wytworzonego białka. W roli genu reporterowego można wykorzystać bądź gen zielonego fluoryzującego białka (ang. green fluorescent protein GFP), bądź gen lucyferazy (LUC). Pierwsze z tych białek zostało wyizolowane z meduzy *Aequorea victoria*. Jego obecność można monitorować w roślinie za pomocą bezpośredniej obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym bez podawania egzogennych substratów czy kofaktorów. Stwierdzono eksperymentalnie, że GFP nie interferuje z rozwojem struktury odżywiającej nicienia ani z samym nicieniem (GOVERSE i współaut. 1998). Alternatywą jest gen enzymu lucyferazy ze świetlika *Photinus pyralis*. Obecność aktywnego genu w danej komórce ujawniana jest po podaniu substratu: lucyferyny. Enzymatycznemu przekształceniu lucyferyny towarzyszy emisja fotonów, która może być rejestrowana przez odpowiednią kamerę. Również w tym przypadku stwierdzono doświadczalnie, że podanie substratu nie zaburza rozwoju nicieni w korzeniach gospodarza (GOVERSE i współaut. 2000a).

Po ustaleniu, które geny (białka) odpowiedzialne za reaktywację cyklu komórkowego są szczególnie intensywnie wykorzystywane przez nicienia (ich ekspresja znacznie wzrasta), można podjąć próbę zahamowania ich ekspresji w miejscu, gdzie nicien indukuje strukturę odżywiającą. W tym celu należy stransformować roślinę tak, by uzyskać dominujące negatywne mutacje wybranych genów, ujawniające się tylko po zadziałaniu czynnika patogenicznego wydzielanego przez nicienia. Do tego konieczne jest zastosowanie w użytym konstrukcie promotora, który jest aktywowany specyficznie przez te wydzieliny.

Można też wykorzystać technikę antysens. Polega ona na stransformowaniu rośliny konstruktem zawierającym fragment DNA o odwrotnej kolejności nukleotydów niż fragment genu, którego ekspresję chcemy wyłączyć (np. cykliny). Specyficzna ekspresja takiego konstruktu na terenie komórki zaindukowanej przez nicienia spowoduje wytworzenie fragmentów mRNA, które będą łączyły się (hybrydowały) z mRNA genu docelowego (np. cykliny). W ten sposób zostanie zablokowana translacja: nie dojdzie do wytworzenia odpowiedniego białka, co uniemożliwi bądź osłabi reaktywację cyklu komórkowego.

Wiadomo też, że aktywacja cyklu komórkowego może być stymulowana przez auksyny (DOERNER i współaut. 1996). Zaburzenie działania auksyn w roślinie (w korzeniu) może więc interferować z rozwojem nicienia. I rzeczywiście, eksperymenty z użyciem zmutowanej odmiany pomidora „diageotropica”, która w znacznym stopniu jest niewrażliwa na podawanie auksyny, wykazały, że rośliny te są praktycznie odporne zarówno na mątwiki, jak i na guzaki. Znane są już niektóre geny, które są odpowiedzialne za metabolizm auksyn i ich percepcję przez komórki rośliny (np. geny *axr* czy *abp*). Wykorzystanie ich jako narzędzi przy manipulowaniu cyklem komórkowym w celu podniesienia odporności roślin na nicienie jest również jedną z metod wykorzystywanych w ramach projektu NONEMA.

ZAHAMOWANIE ROZROSTU SYNCYTIIUM

W przypadku mątwików, których strukturą odżywiającą jest syncytium, nicienie aktywują enzymy roślinne, które katalizują lokalny

rozkład ścian komórkowych. Dzięki temu powstają otwory – połączenia między sąsiednimi komórkami, co znacznie zwiększa efektyw-

ność tego organu w odżywianiu pasożyta. Badania anatomiczno-cytologiczne wykazały, że bardziej efektywne syncytia, te które odżywiają samice nicienia, mają liczniejsze i znacznie większe otwory w ścianach niż syncytia odżywiające samce (GOLINOWSKI i współaut. 1996, SOBCZAK i współaut. 1997). GRUNDLER i współaut. (1998) wykazali, że w proces ten zaangażowane są celulazy roślinne, ale prawdopodobnie funkcjonuje tu cały zestaw enzymów, których aktywność daje w efekcie fuzję protoplastów komórek składowych syncytium. Przebudowa i/lub degradacja ściany komórkowej są często spotykanymi zjawiskami w rozwoju roślin, np. w czasie wzrostu komórek i całych organów, dojrzewania owoców, odcinania organów, rozwoju elementów floemu i ksylemu. Za procesy te odpowiedzialne są dwie grupy białek: enzymy degradujące ścianę komórkową [β -1,4-endoglukanazy (celulazy), endotransglikozylazy ksyloglukanowe, poligalakturnazy, metylesterazy pektynianowe] i ekspansyny (białka umożliwiające rozluźnianie, rozciąganie się ścian komórkowych). Dotychczas zidentyfikowano wiele izoform wszystkich tych białek i wiadomo, że każdy indywidualny proces rozkładu ściany komórkowej wymaga swoistej i specyficznej mieszanki różnych izoform enzymów degradujących ścianę komórkową i ekspansyn. Można tu wykorzystać w dużym stopniu dobrze poznany i opisany w literaturze naukowej proces dojrzewania owoców pomidora. Prace w tym zakresie skierowane były na wytworzenie owoców pomidora, które stają się czerwone, ale nie miękną. Dzięki takim badaniom w pomidorze znanych już jest około 20 izoform ekspansyn i kilka izoform celulaz. W celu uzyskania pomidorów, które nie stają się zbyt miękkie nawet w stanie dojrzałym, próbowano inaktywować mRNA odpowiednich białek z zastosowaniem techniki antysens (LASHBROOK i współaut. 1998, BRUMMEL i współaut. 1999, ROSE i BENNETT 1999).

Podobnie w przypadku interakcji rośliny/nicień należy najpierw zidentyfikować te białka roślinne i te ich izoformy, które są specyficznie aktywowane dla rozpuszczania ścian komórkowych w obrębie tworzącego się syncytium. Jedną z metod identyfikacji używanych w NONEMA jest łańcuchowa reakcja polimeryzacji z użyciem odwrotnej transkryptazy (ang. reverse transcriptase-polymerase chain reaction RT-PCR). Technika ta pozwala ustalić czy DNA danego genu ulega transkrypcji. Wymaga-

na jest do tego znajomość sekwencji nukleotydów przynajmniej fragmentów badanego genu. Dla większości celulaz i ekspansyn te sekwencje są dostępne w bazach danych. W oparciu o nie projektuje się specyficzne dla danego genu oligonukleotydy, tzw. primery, które przy użyciu odwrotnej transkryptazy pozwalają zsyntetyzować odpowiadający danemu fragmentowi mRNA fragment DNA (czyli cDNA). Jest on następnie powielany z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimeryzacji. Wynik pozytywny, tj. zsyntetyzowanie DNA, uzyskuje się tylko wtedy, gdy w danej próbce był komplementarny mRNA, a więc gdy badany gen (na przykład gen ekspansyny 3 z pomidora) ulegał ekspresji. Co więcej, technika ta jest półilościowa i pozwala wstępnie oszacować, jak silna jest ta ekspresja. W przypadku interakcji rośliny/nicień badaną próbką jest mRNA wyizolowany z samych syncytiów lub z fragmentów korzeni zawierających syncytia. Należy przy tym szczególnie uważać, by materiał pobierany do izolowania mRNA nie zawierał innych tkanek z aktywnymi np. celulazami, takich jak różniące się elementy trachealne.

Technika RT-PCR nie dostarcza informacji o bardziej szczegółowej lokalizacji ekspresji badanych genów. Do tego celu w projekcie wykorzystywana jest hybrydyzacja *in situ*, której wynik obserwowany jest w mikroskopie optycznym. Metoda ta pokazuje na przekrojach przez korzeń uzyskanych z utrwalonego materiału, w których komórkach występuje ekspresja badanego genu na poziomie mRNA. Ekspresja genów lokalizowana jest też na poziomie białka za pomocą technik immunocytochemicznych. W tym celu używane są przeciwciała (mono- lub poliklonalne) przeciw tym izoformom białek biorących udział w degradacji ściany komórkowej, na które wskazują wyniki eksperymentów z RT-PCR. Korzenie zawierające syncytia utrwalone i zatopione w syntetycznej żywicy są cięte na skrawki półciennie (do mikroskopu optycznego) lub ultracienkie (do mikroskopu elektronowego). Na skrawkach tych prowadzona jest lokalizacja z użyciem przeciwciał, której ostatecznym efektem jest wyznaczenie badanych białek za pomocą np. fluorochromów w przypadku mikroskopu optycznego lub ziaren złota koloidalnego w przypadku mikroskopu elektronowego.

Po ustaleniu powyższymi metodami, które białka, w których komórkach i na którym etapie rozwoju syncytium są szczególnie aktywne w tworzeniu otworów w ścianach komórko-

wych, wybierane są geny (i białka), których wyłączenie (inaktywacja) pozwoli nie dopuścić do powiększania się syncytium. Następnym etapem jest wytworzenie roślin transge-

nicznych, posiadających antysensowne konstrukty genowe lub geny przeciwciał przeciw wybranym białkom, funkcjonujące pod kontrolą specyficznych promotorów.

LOKALIZACJA EKSPRESJI GENÓW WPROWADZANYCH DO ROŚLINY

Opinia publiczna zwraca coraz większą uwagę na potencjalne niebezpieczeństwa związane z produkcją żywności w oparciu o organizmy zmodyfikowane genetycznie (ang. genetically modified organisms GMO). Dlatego zaproponowane w projekcie NONEMA rozwiązania problemu nicieni w europejskim rolnictwie przy użyciu roślin transgenicznych będą zaakceptowane przez konsumentów tylko wtedy gdy:

- zaoferowany produkt będzie miał istotną przewagę nad dotychczasowymi rozwiązaniami,

- odporność będzie wysoce specyficzna dla organizmu docelowego,

- ekspresja transgenów nie wystąpi w jadalnych częściach rośliny i będzie ograniczona do wybranych miejsc w roślinie,

- wprowadzone geny nie przedostaną się do innych gatunków roślin.

W związku z tym szczególne znaczenie ma redukcja do minimum ekspresji transgenów poza miejscami, gdzie mają one hamować inwazję nicienia. Jest to przede wszystkim kwestia użycia odpowiednich promotorów, które ulegają aktywacji tylko na szlaku migracji nicienia lub wewnątrz struktury odżywiającej. Kilka specyficznych promotorów tego typu jest już dostępnych, np. *Att0728* (BARTELS i współaut. 1997), *rpe* (FAVERY i współaut. 1998), *LEMMI9* (ESCOBAR i współaut. 1999) i *POLARIS* (TOPPING i LINDSEY 1997), ale żaden z nich użyty pojedynczo nie zapewni w 100% uniknięcia ekspresji w miejscach niepożądanych. W ramach projektu NONEMA poszukiwane są więc promotory jeszcze bardziej specyficzne. W tym celu podjęto próby doskonalenia specyficzności znanych promotorów za pomocą analizy delecyjnej, tj. kolejnego wycinania za pomocą enzymów restrykcyjnych wybranych fragmentów promotora i testowania ich specyficzności po zainfekowaniu korzeni nicieniami. Aktywność promotora może być tu monitorowana za pomocą dołączonego za nim genu reporterowego, np. genu *uid A* kodującego enzym glukuronidazę, który po podaniu odpowiedniego substratu daje reakcję

barwną – niebieski strą. Reakcja ta pozwala zlokalizować miejsce ekspresji genu, a więc – i aktywności promotora. Przykładem udanej analizy delecyjnej jest tu promotor genu *TobRB7* (OPPERMAN i współaut. 1994). Promotor ten jest specyficznie aktywowany w korzeniu, ale okazało się, że jego fragment o długości 300 par zasad (ok. 25% długości oryginalnego promotora) jest specyficznie aktywny w komórkach olbrzymich indukowanych przez *Meloidogyne*. W ramach NONEMA poszukiwane są też całkiem nowe sekwencje regulacyjne przy wykorzystaniu kolekcji promotorów stworzonej z użyciem tzw. pułapki promotorowej. Technika ta polega na transformowaniu roślin konstruktem zawierającym gen *uid A* pozbawiony promotora. W efekcie w roślinach transgenicznych niebieskie zabarwienie występuje tylko wtedy i w tych komórkach, gdzie sekwencje kodujące genu reporterowego znalazły się pod kontrolą endogennego promotora, wykazującego aktywność transkrypcyjną. Jeśli ekspresja genu *uid A* badana jest w roślinach uprzednio inokulowanych nicieniami, możliwe jest znalezienie takich osobników, w których gen reporterowy wyznakował promotor aktywny specyficznie w strukturze odżywiającej nicienia. Innym sposobem jest wyszukiwanie tych mRNA, które są syntetyzowane w komórkach pomidora poddanych działaniu wydzielin nicienia, natomiast brak ich w komórkach nie traktowanych wydzielinami. Wykazanie następnie, że tych mRNA brak jest również w łodygach, liściach, kwiatach, siewkach i nie infekowanych korzeniach jest potwierdzeniem, że chodzi tu o geny specyficznie ekspresjonowane w odpowiedzi na atak nicienia. Po przepisaniu tych sekwencji na cDNA i sklonowaniu pełnowymiarowych cDNA ich promotory są izolowane bądź na drodze przeszukiwania komercyjnych bibliotek genomowych, bądź przy zastosowaniu odwrotnej reakcji PCR ze strawionym genomowym DNA jako substratem.

W przypadku użycia pojedynczego promotora, nawet uważanego za specyficzny, niewielkie „przeciekanie” jego aktywności (to jest eks-

presja w innych tkankach rośliny) jest nie do uniknięcia. Nie będzie to jednak miało znaczenia tak długo jak długo transgeniczne białko (mające np. hamować reaktywację cyklu komórkowego) lub antysensowne mRNA nie spotka odpowiednio: swego białka docelowego lub komplementarnego fragmentu mRNA. I tak, w przypadku hamowania cyklu komórkowego z zastosowaniem negatywnych dominujących mutacji niewielka ekspresja zmutowanego genu w zróżnicowanych już komórkach kory pierwotnej nie będzie miała ujemnego wpływu na roślinę, gdyż komórki te w swoim programie morfogenetycznym nie mają mitozy i nie wytwarzają białek takich jak cykliny czy zależne od cyklina kinazy.

Z drugiej strony, zastosowanie przeciwciał (plantibodies) zwiększa możliwość precyzyjnej ekspresji. Dla ekspresowania genów danego przeciwciała zastosowana zostanie para promotorów, które mogą wykazywać aktywność w różnych częściach korzenia, ale pokrywanie się ich aktywności wystąpi tylko na szlaku migracji patogena i/lub na terenie struktury odżywiającej nicienia. W ten sposób możliwa będzie specyficzna co do miejsca ekspresja kompletnego, funkcjonalnego przeciwciała. Przeciwciało składa się bowiem z dwóch iden-

tycznych łańcuchów ciężkich i dwóch identycznych łańcuchów lekkich i będzie funkcjonować tylko w tej komórce, w której wszystkie te łańcuchy są syntetyzowane. Parę takich promotorów przydatną do hamowania migracji larw w korzeniu za pośrednictwem przeciwciał stanowią na przykład: promotor genu *pyk10* (PUZIO i współaut. 2000) – specyficznie aktywny w ryzodermie i korze pierwotnej (którędy pasożyt migruje) i promotor indukowany przez zranienie, np. genu *wun* (HANSEN i współaut. 1996).

Ostatecznym celem różnych strategii zastosowanych w ramach projektu NONEMA jest uzyskanie odpornych roślin transgenicznych. Do weryfikacji ich efektywności w hamowaniu rozwoju syncytiów posłużą zarówno metody anatomiczno-cytologiczne (obserwacja morfogenezy korzenia zainfekowanego nicieniami) jak i czysto nematologiczne (porównanie liczby samic rozwijających się na korzeniach roślin transgenicznych w porównaniu z roślinami kontrolnymi). Ewentualny sukces, po zaakceptowaniu przez społeczność Unii Europejskiej, może być ważnym krokiem w kierunku upowszechnienia nieklasycznych metod otrzymywania roślin uprawnych odpornych na pasożyty.

STRATEGIES FOR CONSTRUCTION OF NEMATODE RESISTANT PLANTS

S u m m a r y

Plant-parasitic nematodes are very important pests of many crops causing up to 20-30% losses of agricultural yield. Their traditional control relies on extremely toxic nematicides and breeding resistant cultivars. As both methods have major disadvantages (environmental pollution, long time-course of breeding a new cultivar with resistance which is often broken by the pathogen after several years), an approach based on genetic engineering seems to be a promising alternative. Reproductive success of the nematodes depends on induction and development of a feeding site composed of modified plant cells. In a compatible plant/pathogen interaction, nematode secretions (pathogenicity factors) released consecutively into the root change the morphogenetic programme of plant cells via modification of expression of selected plant genes which enables nematode's migration, induction of the feeding site and its proper development into an effective feeding structure. Different strategies to stop or to impair pathogen development may be applied which interfere with nematode's development at different points of its life cycle. This approach has been adopted by an international research project „NONEMA” carried out within 5th Framework Programme of the European Community for Research, Technological Development and Demonstration.

First, pathogenicity factors are sought, recognised and evaluated employing such methods as subtractive hybridisation using cDNA libraries, comparative cDNA-AFLP, microsequencing of nematode secretions, dsRNA-mediated mRNA inactivation of candidate genes in nematodes. The factors thought to be involved in: modification/dissolving of plant cell walls during migration, protection against active oxygen species produced upon infection by the host and induction of feeding cells are search for. The selected proteins – pathogenicity factors will be afterwards inactivated by „plantibodies” – specific immunoglobulins synthesised in transgenic plants. This should minimise pathogen's success during early stages of infection. Second, plant proteins up-regulated upon infection are being identified using RT-PCR, *in situ* hybridisation and immunolocalisation. These genes/proteins involved in reactivation of cell cycle (necessary for induction of feeding site development) or in modification of plant cell walls (including local dissolutions of the walls) in developing feeding sites of cyst nematodes will be inactivated using „plantibodies” or inhibited at mRNA level using antisense constructs in transgenic plants. To maximise the chances of public acceptance for genetically engineered plants special attention is paid to use promoters with minimised expres-

sion outside the area (plant tissues) of their action. Some feeding site-specific promoters are already available but they are being improved by employing pro-

moter deletion techniques and also new ones are sought.

LITERATURA

- BARTELS N., VAN DER LEE F. M., Klap J., GODDIJN O. J., KARIMI M., PUZIO P., GRUNDLER F. M., OHL S. A., LINDSEY K., ROBERTSON L., ROBERTSON W. M., VAN MONTAGU M., GHEYSEN G., SIJMONS P. C., 1997. *Regulatory sequences of Arabidopsis drive reporter gene expression in nematode feeding structures*. Plant Cell 9, 2119–2134.
- BRUMMELL D. A., HALL B. D., BENNETT A. B., 1999. *Anti-sense suppression of tomato endo-1,4- β -glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening*. Plant Mol. Biol. 40, 615–622.
- DE ALMEIDA ENGLER J., DE VLEESCHUWER V., BURSENS S., CELENZA J. L. Jr., INZE D., VAN MONTAGU M., ENGLER G., GHEYSEN G., 1999. *Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia*. Plant Cell 11, 793–808.
- DOERNER P., J.-E., YOU R., STEPPUHN J., LAMB C., 1996. *Control of root growth and development by cyclin expression*. Nature 380, 520–523.
- ESCOBAR C., DE MEUTTER J., ARISTIZABAL F. A., SANZ-ALFerez S., DEL Campo F. F., BARTELS N., VAN DER EYCKEN W., SEURINCK J., VAN MONTAGU M., GHEYSEN G., FENOLL C., 1999. *Isolation of the LEMMI9 gene and promoter analysis during a compatible plant-nematode interaction*. Mol. Plant Microbe Interact. 12, 440–449.
- FAVERY B., LECOMTE P., GIL N., BECHTOLD N., BOUCHEZ D., DALMASSO A., ABAD P., 1998. *RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells*. EMBO J. 17, 6799–6811.
- GHEYSEN G., DE ALMEIDA ENGLER J., VAN MONTAGU M., 1997. *Cell cycle regulation in nematode feeding sites*. [W:] *Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions*. FENOLL C., GRUNDLER F. M. W., OHL S. A. (red.). Kluwer, Dordrecht, 120–132.
- GOLINOWSKI W., GRUNDLER F. M. W., SOBCZAK M., 1996. *Changes in the structure of Arabidopsis thaliana during female development of the plant-parasitic nematode Heterodera schachtii*. Protoplasma 194, 103–116.
- GOLINOWSKI W., MAGNUSSON C., 1991. *Tissue response induced by Heterodera schachtii (Nematoda) in susceptible and resistant white mustard cultivars*. Can. J. Bot. 69, 53–62.
- GOVERSE A., BIESHEUVEL J., WIJERS G.-J., GOMMERS F. J., BAKKER J., SCHOTS A., HELDER J., 1998. *In planta monitoring of the activity of two constitutive promoters, CaMV 35S and TR2', in developing feeding cells induced by Globodera rostochiensis using green fluorescent protein in combination with confocal laser scanning microscopy*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 52, 275–284.
- GOVERSE A., DE ENGLER J. A., VERHEES J., VAN DER KROL S., HELDER J. H., GHEYSEN G., 2000a. *Cell cycle activation by plant parasitic nematodes*. Plant Mol. Biol. 43, 747–761.
- GOVERSE A., OVERMARS H., ENGELBERTINK J., SCHOTS A., BAKKER J., HELDER J., 2000b. *Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin*. Mol. Plant Microbe Interact. 13, 1121–1129.
- GRUNDLER F. M. W., SOBCZAK M., GOLINOWSKI W., 1998. *Formation of wall openings in root cells of Arabidopsis thaliana following infection by the plant-parasitic nematode Heterodera schachtii*. Eur. J. Plant Pathol. 104, 545–551.
- HANSEN E., HARPER G., MCPHERSON M. J., ATKINSON H. J., 1996. *Differential expression patterns of the wound-inducible transgene wun-1-uidA in potato roots following infection with either cyst or root-knot nematodes*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 48, 161–170.
- LASHBROOK C. C., GIOVANNONI J. J., HALL B. D., FISCHER R. L., BENNETT A. B., 1998. *Transgenic analysis of tomato endo- β -1,4-glucanase gene function. Role of cell 1 in floral abscission*. Plant J. 13, 303–310.
- MONTGOMERY M. K., XU S., FIRE A., 1998. *RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502–15507.
- NGO H., TSCHUDI C., GULL K., ULLU E., 1998. *Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14687–14692.
- OPPERMAN C. H., TAYLOR C. G., CONKLING M. A., 1994. *Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene*. Science 263, 221–223.
- PUZIO P. S., LAUSEN J., HEINEN P., GRUNDLER F. M., 2000. *Promoter analysis of pyk20, a gene from Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. 157, 245–255.
- ROSE J. K., BENNETT A. B., 1999. *Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening*. Trends Plant Sci. 4, 176–183.
- ROSSO M. N., FAVERY B., PIOTTE C., ARTHAUD L., DE BOER J. M., HUSSEY R. S., BAKKER J., BAUM T. J., ABAD P., 1999. *Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode Meloidogyne incognita and expression analysis during plant parasitism*. Mol. Plant Microbe Interact. 12, 585–591.
- SMANT G., STOKKERMANS J. P., 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., BAKKER J., 1998. *Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4906–4911.

- SOBCZAK M., GOLINOWSKI W., GRUNDLER F. M. W., 1997. *Changes in the structure of Arabidopsis thaliana roots induced during development of males of the plant parasitic nematode Heterodera schachtii*. Europ. J. Plant Pathol. 103, 113–124.
- STIEKEMA W. J., BOSCH D., WILMINK A., DE BOER J. M., SCHOUTEN A., ROOSIEN J., GOVERSE A., SMANT G., STOKKERMANS J., GOMMERS F. J., SCHOTS A., BAKKER J., 1997. *Towards plantibody-mediated resistance against nematodes*. [W:] *Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions*. FENOLL C., GRUNDLER F. M. W. OHL S. A. (red.). Kluwer, Dordrecht, 262–271.
- 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, 469–72.
- TOPPING J. F., LINDSEY K., 1997. *Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in Arabidopsis*. Plant Cell 9, 1713–1725.
- WYSS U., GRUNDLER F. M. W., MÜNCH A., 1992. *The parasitic behaviour of 2-nd stage juveniles of Meloidogyne incognita in roots of Arabidopsis thaliana*. Nematologica 38, 98–111.