

# Trwała odporność na nicienie kwarantannowe *Meloidogyne chitwoodi* i *M. fallax*<sup>1</sup>

Władysław Golinowski, Grażyna Grymaszewska, Justyna Jupowicz,  
Wojciech Kurek, Mirosław Sobczak  
Katedra Botaniki, Wydział Rolnictwa i Biologii,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,  
Nowoursynowska 159, Budynek 37, 02-776 Warszawa,  
tel./fax.: 022/ 5932650, e-mail: Golinowski@delta.sggw.waw.pl

**Słowa kluczowe:** biotechnologia, geny odporności, nicienie pasożytnicze, odporność, podatność

## Wstęp

Osiadłe nicienie pasożytnicze atakujące korzenie roślin są ciągle stosunkowo mało docenianą w rolnictwie grupą organizmów chorobotwórczych, chociaż stanowią większość szkodników glebowych i powodują wiele chorób kwarantannowych. Problem ten został jednak w ostatnich latach poważnie potraktowany przez Unię Europejską, która w ramach 5 Programu Ramowego Badań, Rozwoju Technologicznego i Prezentacji finansuje realizację 3 projektów badawczych poświęconych wypracowaniu metod i sposobów walki z tymi pasożytami. „Breeding Tools for Durable Resistance to Nematodes (*Meloidogyne* ssp.) of Coffee Varieties” dotyczy odporności kawy na nicienie z rodzaju *Meloidogyne* [10]. „Making Plants Resistant to Plant Parasitic Nematodes: No Access—No Feeding” („NONEMA”, <http://www.nonema.uni-kiel.de>) dotyczy odporności ziemniaka i pomidora na porażenie mątwikiem ziemniaczanym (*Globodera rostochiensis*) i guzakiem południowym (*M. incognita*) [7]. Natomiast program „Durable Resistance against *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*” („DREAM”, <http://www.eu-dream.nl>) ukierunkowany na guzaki zostanie przedstawiony bardziej szczegółowo w tym artykule.

<sup>1</sup> Praca wykonana w ramach projektu badawczego 5 Programu Ramowego Unii Europejskiej (QLRT5-1999-1462).

Już kilkanaście lat temu Sasser i Freckman [13] szacowali globalne straty ekonomiczne powodowane przez pasożytnicze nicienie w uprawach rolniczych na około 87 mld dolarów. Należy zaznaczyć, że wysokość strat ekonomicznych zależy od gatunku uprawianej rośliny, gatunku porażającego ją nicienia oraz rodzaju plonu rolniczego. W uprawach warzyw korzeniowych oraz roślin bulwiastych i cebulowych straty ekonomiczne mogą wynosić nawet 100%. Powodujące znaczną część tych strat nicienie osiadłe przechodzą cały cykl rozwojowy w korzeniach roślin i powodują powstawanie zgrubień, wyrośli, przebarwień i nekrotycznych plam. Przy słabym porażeniu nicieniami infekcja zazwyczaj przebiega bez objawów widocznych na nadziemnych częściach roślin. Dopiero przy silnym porażeniu rośliny słabo rosną, są chlorotyczne i więdną, nawet w warunkach dużego uwilgotnienia gleby. W praktyce rolniczej stosuje się wiele zabiegów agrotechnicznych, które w pewnym zakresie umożliwiają także ograniczenie liczebności pasożytniczych nicieni. Podstawową metodą jest stosowanie odpowiednich płodozmianów. W praktyce oznacza to jak najrzadsze uprawianie na tym samym polu roślin podatnych na dany gatunek nicienia. Osiągnięcie zadowalających wyników tą metodą jest trudne z powodu rosnącej specjalizacji nowoczesnego rolnictwa. Z drugiej strony nicienie pasożytnicze mają wielu żywicieli i jeden gatunek może infekować nawet kilkaset gatunków roślin. Poza tym larwy wielu gatunków nicieni mogą przetrwać w stanie anabiozy nawet kilkanaście lat zachowując pełną zdolność do infekcji. Kolejną metodą ograniczenia populacji nicieni jest uprawa odmian odpornych. Rośliny odporne są zazwyczaj infekowane, ale rozwój nicieni zostaje zatrzymany w stadium larwalnym lub dojrzałość osiągają prawie wyłącznie samce pasożyta, co prowadzi do zmniejszenia liczebności populacji nicieni [9]. Niestety, nicienie często przełamują odporność roślin i dochodzi wtedy do selekcji nowego wirulentnego patotypu. Na zmniejszenie liczebności nicieni pasożytniczych w glebie bardzo dobrze wpływa utrzymywanie gleby w czarnym ugorze po zbiorze plonu. Modyfikacją tej metody jest uprawa roślin „pułapkowych”. Są to rośliny podatne na nicienie, np. rzodkiew lub gorczyca. Uprawiane w poplonie przywabiają larwy mątwika burakowego, ale przed zakończeniem jego cyklu rozwojowego są przyorywane na zielony nawóz. Kolejną metodą jest termiczna sterylizacja gleby, która jest jednak kosztowna i wymaga specjalistycznego sprzętu. Jej stosowanie jest opłacalne tylko w szklarniach lub na ograniczonych obszarach, gdzie prowadzona jest uprawa szczególnie cennego materiału hodowlanego. Prowadzi ona do całkowitej sterylizacji gleby i dlatego budzi zastrzeżenia ekologów. Ostatnio wiele uwagi poświęcono biologicznym metodom zwalczania nicieni przy pomocy drapieżnych lub pasożytniczych grzybów z takich gatunków jak *Cladosporium herbarum*, *Paecilomyces lilacinus* czy *Verticillium chlamydosporium* oraz bakterii *Bacillus thuringensis* i *Pasteuria penetrans*. W praktyce rolniczej metody biologiczne nie zawsze się sprawdzają ze względu na duże zróżnicowanie warunków środowiskowych, ale dostępne są komercyjne preparaty biologiczne przeznaczone do stosowania w uprawach ekologicznych.

Najskuteczniejszą metodą kontroli pasożytniczych nicieni korzeniowych jest, jak dotychczas, ochrona chemiczna przy pomocy bardzo toksycznych, nieselektywnych i biologicznie trwałych nematocydów. Ich stosowanie prowadzi jednak do wyjąłowienia i skażenia środowiska glebowego. W porównaniu z innymi pestycydami są one niezwykle kosztowne, a ich dogłębowa aplikacja wymaga specjalistycznego sprzętu. Każda z wyżej wymienionych metod zwalczania nicieni może być stosowana oddzielnie, ale w nowoczesnym rolnictwie stosuje się zintegrowany system ochrony roślin oparty na kombinacjach różnych, mniej lub bardziej skutecznych metod. Główny nacisk jest ostatnio położony na stosowanie odpowiednich metod agrotechnicznych, płodozmianów i uprawę jak największej liczby odmian odpornych.

## Ogólne założenia projektu

---

Podstawowym celem projektu „DREAM” jest opracowanie nowych strategii ochrony roślin przed pasożytniczymi nicieniami korzeniowymi, niewymagających stosowania nematocydów w specjalistycznych i wysoko produkcyjnych gospodarstwach rolnych. Strategie te muszą być możliwe do bezpośredniego zastosowania w praktyce, tanie lub przynajmniej niezwiększające kosztów produkcji powyżej kosztów wynikających ze stosowania nematocydów, a także możliwe do zastosowania w różnych uprawach rolniczych. Do osiągnięcia tego celu niezbędne jest kompleksowe opracowanie naukowych podstaw warunkujących skuteczność i trwałość tych metod i strategii. Dlatego „DREAM” testuje wiele metod potencjalnie użytecznych w praktyce rolniczej. Poza zabiegami agrotechnicznymi, najczęściej stosowaną niechemiczną metodą walki z nicieniami jest uprawa odmian mających naturalne geny odporności na nicienie. Jednak geny te są najczęściej wysoce specyficzne i skuteczne jedynie wobec określonych gatunków nicieni, a czasem nawet tylko wobec pewnych patotypów [3]. Odporność warunkowana przez te geny w warunkach polowych bywa często bardzo trwała, jak w przypadku genu *H1* przeniesionego do ziemniaka przed ponad 50 laty i warunkującego odporność na dwa patotypy mątwika ziemniaczanego (*G. rostochiensis*) [1]. Może być jednak przełamana w warunkach polowych w ciągu kilku lub kilkunastu sezonów wegetacyjnych, co wykazano dla genów *Hs1* warunkujących odporność na mątwika burakowego (*H. schachtii*) [12]. Pomimo tych ograniczeń, naturalne geny odporności są, poza nematocydami, najskuteczniejszym narzędziem w walce z nicieniami pasożytniczymi. Zwiększoną trwałość odporności planuje się uzyskać poprzez wprowadzenie do płodozmianów szeregu odmian odpornych różnych gatunków noszących różne geny odporności o zróżnicowanym mechanizmie działania i spektrum specyficzności. Dodatkowym zabezpieczeniem jest wypracowanie zestawu zaleceń agrotechnicznych i płodozmianowych, które na dłuższy czas uniemożliwią przełamanie przez patogena wprowadzonych genów odporności. Taka strategia jest nieszkodliwa dla środowiska i jednocześnie umożliwia specjaliza-



cję produkcji rolniczej. W ramach projektu opracowuje się ją w pierwszej kolejności dla produkcji ziemniaka. W przyszłości może ona stanowić model do tworzenia podobnych strategii dla innych ważnych gospodarczo roślin. Badania koncentrują się na ziemniaku, gdyż jest on jedną z najważniejszych roślin uprawnych i jednocześnie jedną z roślin najsilniej i najczęściej porażanych przez nicienie. W ramach projektu, źródła genów odporności są poszukiwane także wśród różnych odmian i genotypów rzodkwi (*Raphanus sativus*), życicy (*Lolium multiflorum*) i papryki (*Capsicum annuum*). *M. chitwoodi* i *M. fallax* zostały wybrane do badań jako modelowe patogeny, gdyż obydwie gatunki są objęte regulacjami kwarantannowymi we wszystkich krajach Europy. Zostały one opisane stosunkowo niedawno i niewiele jak dotychczas wiadomo o ich biologii. Będąc głównie pasożytami ziemniaka infekują także większość roślin uprawianych w tradycyjnych płodozmianach ziemniaczanych i dlatego mogą co-roczenie się rozmnażać. W bulwach ziemniaka samice *M. chitwoodi* i *M. fallax* penetrują na tyle głęboko, że żelatynowy worek z jajami pozostaje ukryty pod perydermą i patogen rozprzestrzenia się wraz z bulwami. Porażenie tymi nicieniami jest więc szczególnie niebezpieczne dla materiału hodowlanego i rozmnożeniowego.

Reakcje obronne roślin są procesami złożonymi i wymagają badania ich różnych aspektów zarówno od strony rośliny jak i patogena. W badania realizowane w ramach projektu „DREAM” są zaangażowane następujące ośrodki: Plant Research International (NL), Applied Research for Arable Farming (NL), Uniwersytet Wageningen (NL), Institut National de la Recherche Agronomique (F), Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego (PL), Scottish Crop Research Institute (GB), Barenbrug Holding B.V. (NL) i P.H. Petersen Saatzucht (D). Dzięki temu w programie pracują specjaliści z zakresu: nematologii, hodowli roślin, botaniki, agronomii, genetyki i cytogenetyki oraz biologii molekularnej. Projekt składa się z kilku pakietów roboczych koncentrujących się na badaniu biologii patogena, uprawie i biologii roślin gospodarzy, a także na badaniu interakcji pomiędzy patogenem, a gospodarzem.

## Charakterystyka nicieni

---

Nicienie z rodzaju *Meloidogyne* (gr. *melon* = jabłko, *eidos* = kształt, *gyne* = kobieta) opisano już w drugiej połowie XIX wieku. Najnowsza systematyka dla tego rodzaju wyszczególnia 68 gatunków [2]. Od jej opracowania opisano co najmniej 4 nowe gatunki guzaków. Guzak kalifornijski (*M. chitwoodi*) został po raz pierwszy zidentyfikowany w 1980 r. w Stanach Zjednoczonych [6]. Znaleziono go także w Argentynie (1985), Republice Południowej Afryki (1988), Meksyku (1990), Holandii (1991), Francji i Niemczech (1996), Belgii (1997) i Portugalii (1998). Natomiast guzak holenderski (*M. fallax*) został opisany po raz pierwszy w 1996 w Holandii, a potem we Francji (1996), Belgii (1997) i Niemczech (1998). Brak jest dotychczas informacji o występowaniu tych gatunków w Polsce. Biorąc jednak pod uwagę ich przystosowanie do



klimatu umiarkowanego i szeroką gamę ich gospodarzy potencjalne zagrożenie w Polsce jest duże.

W strefie klimatu umiarkowanego najczęściej występującym guzakiem jest *M. hapla*, który występuje w warunkach polowych w Polsce na ziemniaku i roślinach korzeniowych, np. marchwi. Guzaki *M. chitwoodi* i *M. fallax* wyodrębniono z populacji *M. hapla* na podstawie różnic morfologicznych, cytologicznych, sposobu rozmnażania oraz spektrum roślin gospodarzy. Obydwa nowe gatunki mają stałą liczbę chromosomów  $n = 16$  lub  $18$  i rozmnażają się na drodze fakultatywnej mejotycznej partenogenezy. Podobnie jak *M. hapla* są one bardzo zróżnicowane genetycznie i posiadają wyspecjalizowane patotypy. Mają stosunkowo szerokie spektrum gospodarzy, głównie roślin dwuliściennych, np. ziemniak, pomidor, burak, rzepa, rzodkiew, fasola, lucerna i marchew. W przeciwieństwie do *M. hapla* mogą także infekować i rozmnażać się na zbożach i innych trawach, których uprawa jest często stosowana w praktyce rolniczej do ograniczenia liczebności populacji *M. hapla*. Brak jest dokładnych danych na temat wielkości i wartości strat powodowanych przez *M. chitwoodi* i *M. fallax* w uprawach rolniczych, ale o potencjalnym zagrożeniu może świadczyć fakt, że już przy zagęszczeniu 1 larwa na  $10\text{ cm}^3$  gleby dochodzi do zainfekowania zawiązujących się bulw ziemniaka. Zwiększenie zagęszczenia do 100 larw na  $10\text{ cm}^3$  gleby powoduje już straty plonu handlowego gdyż porażone bulwy są silnie zdeformowane wyrosłami [11].

W przypadku osiadłych nicieni pasożytniczych stadium infekcyjnym są robakowate larwy drugiego stadium. Wnikają one do korzeni roślin gospodarzy zazwyczaj powyżej stożka wzrostu. W korzeniu wędrują pomiędzy komórkami kory pierwotnej do walca osiowego, gdzie przechodzą na osiadły tryb życia indukując rozrost kilku komórek w okolicach swojej głowy prowadzący do powstania specyficznego organu odżywiającego zwanego komórkami olbrzymimi. Pokarm jest pobierany tylko z komórek olbrzymich [4, 9]. Po kilkunastu dniach odżywiania larwy przechodzą trzy kolejne, bezpośrednio po sobie następujące wylinki. Samce, o ile występują, przyjmują ponownie robakowaty kształt i wychodzą z oskórka i korzenia. Dojrzałe samice pozostają w korzeniach i wznawiają pobieranie pokarmu z komórek olbrzymich. Długość dojrzałej samicy może przekraczać 1 mm, a grubość dochodzić do 0,7 mm [2]. Po zapłodnieniu (lub bez, u guzaków rozmnażających się partenogenetycznie) samice zaczynają produkować jaja do żelatynowego worka znajdującego się na zewnątrz ciała.

W ramach projektu stworzono kolekcję próbek populacji *M. chitwoodi* i *M. fallax* pochodzących z różnych roślin uprawnych zebranych w różnych krajach i rejonach geograficznych. Kolekcja składa się obecnie z ponad 70 próbek *M. chitwoodi* i 10 *M. fallax*. W jej skład wchodzi także 20 izolatów wyselekcjonowanych jako potomstwo pojedynczych samic, które przełamały odporność warunkowaną przez różne geny dzikich gatunków ziemniaka. Kolekcja jest wykorzystywana do poszukiwania genów lub markerów genów (a)wirulencji nicieni. Wybrane genotypy są charakteryzowane pod względem molekularnym i genetycznym w celu stworzenia mapy markerów AFLP (ang.: *amplified fragment length polymorphism*) dla ich genomów. Otrzy-

mane dotychczas w ramach projektu wzory markerów AFLP dla 21 próbek *M. chitwoodi* i 9 *M. fallax* są bardzo zróżnicowane, dlatego wydaje się, że większość z nich jest w dalszym ciągu mieszanką różnych genotypów. Udało się jednak znaleźć markery różnicujące obydwie gatunki guzaków. Na podstawie otrzymanych map markerów AFLP pojedyncze próbki są łączone w grupy, populacje i patotypy reprezentatywne dla poszczególnych rejonów i upraw. Około 20% próbek jest badanych pod względem morfologicznym i cytologicznym w celu lepszego poznania biologii tych nicieni. Dotyczy to głównie procesu rozmnażania oraz spektrum gospodarzy.

Przeprowadzone w ramach projektu wielokrotne testy infekcji na wyselekcjonowanych odpornych genotypach ziemniaka, papryki, rzodkwi i zycicy służą do wyselekcjonowania dodatkowych wirulentnych izolatów *M. chitwoodi* i *M. fallax*, a statystyczna analiza częstości ich występowania daje ocenę stabilności odporności badanych genotypów roślin i jej wpływu na reprodukcję nicieni w warunkach polowych. Jednocześnie wyselekcjonowano już szereg blisko spokrewnionych kombinacji: linia roślinna/próbka nicieni znacząco różniących się stopniem odporności. Pozwala to ustalić, które próbki nicieni mają gen(y) wirulencji niezbędne do przełamania odporności warunkowanej przez dany gen roślinny, a które dysponują genem awirulencji uniemożliwiającym przełamanie odporności. Taki sam schemat tworzony jest dla różnych linii roślin mających różne geny odporności w warunkach infekcji jedną próbka nicienia. Wybrane genotypy wirulentne są krzyżowane z awirulentnymi w celu stworzenia mapy markerów genetycznych blisko związanych z potencjalnymi genami (a)wirulencji. Potomstwo tych genotypów nicieni jest następnie testowane na roślinach odpornych pod kątem zachowania wirulencji, a także pod względem cytologicznym i molekularnym dla ustalenia sposobu dziedziczenia tych genów i ich markerów. Pozwala to ocenić przydatność markerów do ewentualnego klonowania genów oraz uzupełnia mapę genetyczną *M. chitwoodi* i *M. fallax*. Wpływ genów (a)wirulencji na nicienie jest sprawdzany poprzez ich wyciszenie metodą interferencji dwuniciowego RNA. W praktyce rolniczej uzyskane wyniki są wskazówką przy doborze płodozmianu odpowiednio do patotypów nicieni obecnych w glebie tak, aby efektywnie obniżyć ich liczebność. Podstawowy nacisk w projekcie jest położony na trwałość odporności w warunkach polowych, dlatego płodozmian musi być zaplanowany w taki sposób, aby zminimalizować niebezpieczeństwo wyselekcjonowania nowego patotypu nicienia lub silnego namnożenia takiego patotypu, którego liczebność w stosowanym płodozmianie nie będzie redukowana przez odpowiedni gen odporności roślin.

## Charakterystyka roślin

---

W ramach projektu powstaje także kolekcja różnych genotypów ziemniaka, papryki, rzodkwi i zycicy oraz ich dzikich krewnych. Rośliny te są testowane pod względem odporności na porażenie różnymi populacjami *M. chitwoodi* i *M. fallax*. Obecnie kolekcja składa się z około 50 odpornych genotypów różnych gatunków *Solanum*, 10 *Capsicum*, 18 *Raphanus* i 4 *Lolium*. Najbardziej obiecujące genotypy odporne są

testowane także na poletkach doświadczalnych naturalnie porażonych czystymi populacjami *M. chitwoodi* lub *M. fallax*, co pozwala oszacować wpływ tych roślin na zagęszczenie larw infekcyjnych tych nicieni w glebie. Testowany jest także wieloletni wpływ odpornej rzodkwi i życicy uprawianych jako poplon na wysokość i jakość plonu wrażliwych odmian ziemniaka. Bada się przy tym efekt supresyjny tych odmian na liczebność populacji *M. chitwoodi* i *M. fallax* w glebie.

Odporne genotypy ziemniaka oraz pozostałych badanych roślin są krzyżowane z podatnymi genotypami i produkowane są populacje mieszańców. Analiza genetyczna mieszańców w połączeniu z testami infekcji *M. chitwoodi* i *M. fallax* umożliwi ustalenie charakteru odporności: wielogenowa czy jednogenowa, jakościowa czy ilościowa oraz mechanizmu jej dziedziczenia. Wyselekcjonowane genotypy roślin są analizowane na poziomie genetycznym i molekularnym w celu znalezienia genów lub markerów genów odporności na nicienie. Wyniki te są wykorzystywane do uzupełnienia i rozbudowy map genetycznych markerów AFLP, a na ich podstawie także map markerów PCR (ang. *polymerase chain reaction*) tych roślin, co umożliwi szybsze przeniesienie genów odporności do roślin uprawnych także na drodze klasycznej hodowli. Techniki te umożliwiły znalezienie markerów AFLP dla 4 genów odporności papryki oraz markerów PCR genu odporności dzikiego ziemniaka na *M. chitwoodi*. Jednym z planowanych zadań projektu jest sklonowanie genu(ów) odporności z co najmniej jednej badanej rośliny uprawnej poprzez stworzenie, a następnie selekcję klonów z banku YAC (ang. *yeast artificial chromosome*) opartą na wyselekcjonowanych markerach AFLP lub PCR. Wyselekcjonowane klony będą sekwencjonowane w celu znalezienia funkcjonalnej ramki odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) homologicznej do znanych genów odporności. Znaleziony gen zostanie wprowadzony do roślin uprawnych metodami inżynierii genetycznej.

Tworzone są także biblioteki genomowego DNA roślin odpornych, a wyselekcjonowane klony, u których wcześniej zlokalizowano markery genów odporności, są klonowane. Z nich zostaną wyizolowane geny odporności. Ponieważ geny odporności są bardzo zachowawcze i mają bardzo duży procent homologii [5], możliwe jest w przypadku blisko spokrewnionego ziemniaka i papryki bezpośrednio wykorzystanie markerów genów odporności do tworzenia map genetycznych obu gatunków. Technika ta zwana RGA (ang. *resistance gene analogue*), oparta na lokalizowaniu analogicznych genów odporności przy wykorzystaniu starterów DNA specyficznych dla zachowawczych sekwencji genów odporności, jest wykorzystywana także przy tworzeniu mapy genetycznej rzodkwi i życicy.

## **Badania nad reakcją roślin na porażenie guzakami**

---

*M. chitwoodi* i *M. fallax* są obligatoryjnymi biotrofami, których rozwój i sukces reprodukcyjny zależy od efektywności zaindukowanych przez nie w korzeniach roślin komórek olbrzymich, z których pobierają pokarm. W roślinach odpornych reakcja obronna oparta jest zazwyczaj na reakcji nadwrażliwości, wyrażającej się nekroty-



zacja tkanek otaczających nicienia i uniemożliwiającej mu zaindukowanie rozwoju komórek olbrzymich. Często obserwowane jest też wczesne zamieranie komórek olbrzymich lub takie modyfikowanie ich metabolizmu, że rozwijają się tylko samce pasożyta, co prowadzi do spadku liczebności populacji nicienia w glebie [9]. Dotychczas brak jest praktycznie informacji bibliograficznych dotyczących indukcji, rozwoju i budowy komórek olbrzymich zaindukowanych przez *M. chitwoodi* i *M. fallax* w komórkach podatnych i odpornych roślin ziemniaka [4], życicy, rzodkwi i papryki. Takie badania są realizowane w Katedrze Botaniki SGGW. Współpraca z innymi uczestnikami projektu daje możliwość prowadzenia cytologicznych i histologicznych badań porównawczych nad infekcją roślin przez dwa izogeniczne genotypy nicienia, z których jeden jest wirulentny, a drugi awirulentny. W toku badań opracowano czasowy schemat przebiegu reakcji podatnej i obronnej roślin na infekcję nicieni oraz wskazano mechanizmy cytologiczne warunkujące odporność roślin. Wykazano, że reakcja obronna wielu genotypów ziemniaka i życicy warunkowana jest nadwrażliwością roślin. Jednak inne genotypy ziemniaka, czasem blisko spokrewnione z reagującymi nadwrażliwością, a także odporne genotypy rzodkwi pozwalają na zaindukowanie komórek olbrzymich przez nicienia i dopiero po upływie kilku dni dochodzi do nekrozy komórek olbrzymich i komórek je otaczających. Analizowano także genotypy ziemniaka, w których w ogóle nie dochodziło do penetracji korzenia, a także takie, w których penetrujące larwy nie wywoływały żadnych zmian cytologicznych lub histologicznych. Badania te przyczyniają się do wskazania mechanizmów warunkujących odporność i ułatwiają selekcję genów odporności na nicienie.

Interakcja pomiędzy wirulentnymi lub awirulentnymi genotypami *M. chitwoodi* lub *M. fallax*, a roślinami odpornymi jest badana także na poziomie molekularnym. Badania te mają na celu wyizolowanie genów (a)wirulencji nicieni oraz ustalenie mechanizmów ich dziedziczenia. Potencjalna wartość tych genów w hodowli roślin odpornych na nicienie jest bardzo duża, gdyż produkty genów (a)wirulencji są wytwarzane w gruczołach larw inwazyjnych i wydzielane przez sztylet do komórek roślinnych [8]. Poszukiwania tych genów prowadzone w bibliotekach cDNA uzyskanych metodą supresyjnej hybrydyzacji odejmującej (SSH, ang. *suppressive subtractive hybridisation*) i metodą sekwencji ulegających ekspresji (EST, ang. *expressed sequence tags*) doprowadziły do wyselekcjonowania 9 potencjalnych genów awirulencji i 3 genów wirulencji. Za pomocą dwuwymiarowej elektroforezy porównywany jest także skład białek produkowanych w gruczołach wirulentnych i awirulentnych larw inwazyjnych. Uzyskano kilka białek różnicujących linie wirulentne i awirulentne. Białka te są obecnie sekwencjonowane i poddawane komputerowej analizie funkcjonalnej. Prowadzona jest także analiza ich wzoru ekspresji w czasie patogenezy za pomocą metod hybrydyzacji *in situ*. Dla zbadania różnic we wzorze ekspresji potencjalnych genów tworzone są biblioteki cDNA oddzielnie dla każdej wirulentnej i awirulentnej linii w różnych fazach rozwoju larw. O ile ekspresja zsekwencjonowanych fragmentów ma miejsce w gruczołach larw i mają one sekwencję sygnałową wskazującą, że są wydzielane przez nicienia, wtedy są klonowane do genomu wirusa X ziemniaka, któ-

rym infekowane są rośliny odporne na nicienie. Jeżeli rekombinowane cząstki wirusa X będą zawierały sekwencje rzeczywistych nicieniowych genów awirulencji to ich ekspresja w roślinach podatnych na wirus X będzie prowadzić do zaindukowania w roślinie reakcji obronnej i nekrozy komórek, do których wnika wirus. Wykryte w ten sposób elementy genetyczne nicienia związane z wirulencją mogą być wykorzystane w przyszłości do konstruowania roślin transgenicznych, które w odpowiedzi na infekcję nicieniową uruchomią wystarczająco silną reakcję obronną. Z kolei poszukiwane elementy odporności w genomie roślin stanowią podstawę alternatywnego sposobu uzyskania roślin odpornych.

Wielostronność zastosowanej tu strategii, obejmującej obok działań hodowlanych wspomaganymi metodami biologii molekularnej również zagadnienia modyfikacji płodozmianów, a także modelowy charakter badanych patogenów dają nadzieję, że uzyskane w projekcie wyniki znacznie zwiększą szanse europejskiego rolnictwa na skuteczną walkę z nicieniami również po wycofaniu nematocydów z arsenału środków ochrony roślin. Techniki i strategie wypracowywane w ramach projektu „DREAM” mogą otworzyć w hodowli roślin perspektywy szybkiego uzyskiwania znacznej liczby odmian roślin uprawnych odpornych na nicienie. Dysponowanie większą liczbą odmian odpornych w obrębie danego gatunku pozwoli z kolei na szybkie i elastyczne reagowanie w przypadku pojawienia się nowego patotypu patogena, który przełamał wprowadzone wcześniej mechanizmy odpornościowe.

## Literatura

- [1] Brodie B.B., Evans K., Franco J. 1998. Nematode parasites of potato. W: „Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture”. Evans K., Trudgill D.L., Webster J.M. (red.), CABI Publishing, Wallingford: 87–132.
- [2] Eisenback J.D., Hirschmann-Triantaphyllou H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. W: „Manual of Agricultural Nematology”. Nickle W.R. (red.) M. Dekker Inc., Nowy Jork: 191–274.
- [3] Ernst K., Kumar A., Kriseleit D., Kloos D.-U., Phillips M.S., Ganai M.W. 2002. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *Plant J.* 31: 127–136.
- [4] Finley A.M. 1981. Histopathology of *Meloidogyne chitwoodi* (GOLDEN ET AL.) on Russet Burbank potato. *J. Nematol.* 13: 486–491.
- [5] Fluhr R. 2001. Sentinels of disease. Plant resistance genes. *Plant Physiol.* 127: 1367–1374.
- [6] Golden A.M., O’Bannon J.H., Santo G.S., Finley A.M. 1980. Description and SEM observations of *Meloidogyne chitwoodi* n.sp. (*Meloidogynidae*), a root-knot nematode on potato in the Pacific Northwest. *J. Nematol.* 12: 23–45.
- [7] Golinowski W., Grymaszewska G., Janakowski S., Kurek W., Sobczak M. 2003. Strategie konstruowania roślin transgenicznych odpornych na nicienie. *Kosmos* 52: 331–340.

- [8] Hussey R.S. 1989. Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 123–141.
- [9] Jung C., Wyss U. 1999. New approaches to control plant parasitic nematodes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 439–446.
- [10] Lashermes P. 2002. Breeding tools for durable resistance to nematodes (*Meloidogyne* spp.) of coffee varieties. *Plant Protect. Sci.* 38: 717–720.
- [11] Molendijk P.G., Mulder A. 1996. The Netherlands, nematodes and potatoes; old problems are here again. *Potato Res.* 39: 471–477.
- [12] Müller J. 1998. New pathotypes of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) differentiated on alien genes for resistance in beet (*Beta vulgaris*). *Fundam. Appl. Nematol.* 21: 519–526.
- [13] Sasser J.N., Freckman D.W. 1987. A world perspective on nematology: the role of the Society. W: „Vistas on Nematology”. Veech J.A., Dickson D.W. (red.), Society of Nematologists, Hyattsville: 7–14.

## Durable resistance against *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*<sup>1</sup>

**Keywords:** biotechnology, parasitic nematodes, susceptibility, resistance, resistance genes

### Summary

Plant parasitic nematodes *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* are one of the greatest newly emerged threats to European agriculture. General objective of the project is to develop a scientific base leading to executable strategies for persistent resistance management of these pests in order to build up the control regimes for them. As these nematodes are able to multiply on many crop plants a complex strategy is necessary that could be applied in an integrated way by implementing new techniques and approaches to develop permanent plant resistance to both species. In order to create such a strategy the collection of samples of both nematode species are examined for the presence of (a)virulence genes, their genetics and host specificity. Resistance genes and/or their genetic markers are searched among the wild and cultivated genotypes of *Solanum*, *Capsicum*, *Raphanus* and *Lolium* species. Finally, the interactions between plants and nematodes are examined on cytological and genetic levels.

---

<sup>1</sup> Research Project of the 5th Framework Programme of the European Union (QLRT5-1999-1462).