

ROZGRYWKA MOLEKULARNA PASOŻYTNICZYCH NICIENI CYSTOWYCH Z KOMÓRKAMI KORZENI ROŚLIN*

MOLECULAR STRIFE OF PARASITIC CYST NEMATODES
WITH PLANT CELLS

Magdalena ŚWIĘCICKA, Joanna DĄBROWSKA, Marcin FILIPECKI

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

Streszczenie: Endopasożytnicze nicienie osiadłe, atakujące korzenie roślin stanowią poważny problem nowoczesnego rolnictwa. W interakcji kompatybilnej nicienie cystowe do mechanicznej penetracji korzenia wykorzystują specyficzny organ aparatu gębowego – sztylet. Wspecjalizowane gruczoły wydzielnicze umożliwiają im syntezę i sekrecję związków, które ułatwiają migrację przez tkanki korzenia oraz zmieniają program morfogenetyczny komórek gospodarza. W wybranej komórce inicjalnej zachodzi reaktywacja cyklu komórkowego, przebudowa ściany komórkowej oraz intensyfikacja metabolizmu podstawowego i wtórnego. Prowadzi to do powstania wielojądrowego syncytium, z którego nicienie pobierają pokarm. Atak nicieni uruchamia odpowiedź obronną rośliny, ale obserwuje się również jej hamowanie. Gruntowna wiedza dotycząca procesów komórkowych, zachodzących podczas rozwoju syncytium, jest bardzo istotna przy opracowywaniu nowych metod ochrony roślin przed tymi trudnymi do zwalczania szkodnikami.

Słowa kluczowe: nicienie cystowe, syncytium, ściana komórkowa, cykl komórkowy, auksyny, reakcja obronna rośliny.

Summary: Endoparasitic sedentary nematodes infecting plant roots are an important problem of modern agriculture. In a compatible interaction with their hosts, cyst nematodes use stylet for mechanical root penetration. The specialized nematode oesophageal glands produce and secrete proteins that facilitate the migration within the root and change morphogenetic program of plant cells. The changes in selected initial cell involve cell cycle reactivation, cell wall modification and boosting of plant primary and secondary metabolism. These leads to the multinuclear syncytium formation, which is the nematode feeding site. Cyst nematode infection activate different plant defense responses, but their active suppression was also observed. The deep understanding of cellular mechanisms involved in syncytium development is essential for the development of new strategies for plant protection against these difficult to control pests.

Key words: cyst nematodes, syncytium, cell wall, cell cycle, auxin, plant defence.

*Publikację dofinansowano z projektu MNiSW N N302593938.

WSTĘP

Nicienie (*Nematoda*) są najliczniejszą grupą zwierząt wielokomórkowych występującą w większości ekosystemów [41]. Głównie są to organizmy wolno żyjące, a pasożytnicze nicienie glebowe stanowią tylko 15% wszystkich dotychczas poznanych i opisanych gatunków tych zwierząt [19]. Jednak ze względu na mało specyficzne objawy porażenia oraz niedobór skutecznych metod ochrony roślin, nicienie glebowe są bardzo uciążliwymi szkodnikami wielu ważnych ekonomicznie roślin uprawnych. Większość strat w plonie przypisuje się działalności endopasożytów osiadłych, do których należą nicienie cystowe (mątwiki; *Globodera* spp. i *Heterodera* spp.) i guzaki (*Meloidogyne* spp.). Szkody spowodowane ich pasożytnictwem w światowym rolnictwie szacuje się na około 157 miliardów dolarów rocznie [1]. Nicienie cystowe, w przeciwieństwie do guzaków, mają bardzo wąski zakres żywicieli. Najważniejsze gatunki nicieni cystowych to: mątwik ziemniaczany (*Globodera rostochiensis*) i mątwik agresywny (*Globodera pallida*), które atakują ziemniaki, mątwik sojowy (*Heterodera glycines*) porażający soję, mątwik burakowy (*Heterodera schachtii*) pasożytujący na burakach cukrowych i roślinach z rodzaju kapustnych. Wielu problemów przysparzają również mątwiki zbożowe (*Heterodera avenae*), pasożytujące głównie na pszenicy, jęczmieniu i owsie. Ich obecność wykryto na 50% największych europejskich i kanadyjskich obszarów uprawy zbóż [39].

Po wnikięciu do korzenia rośliny gospodarza, nicienie cystowe indukują powstawanie wielojądrowego syncytium. Stanowi ono jedyne źródło substancji pokarmowych dla rozwijającego się nicienia i decyduje o jego dalszym rozwoju i rozrodzie. Indukcja i rozwój prawidłowo funkcjonującego syncytium jest sterowana przez wydzieliny nicieni, które bezpośrednio lub pośrednio zmieniają profil ekspresji genów roślinnych i modyfikują program morfogenetyczny komórek korzenia [9]. Badania nad patogenezą nicieni koncentrują się zarówno na identyfikacji i opisie funkcji białek przez nie wydzielanych, jak również genów roślinnych, których ekspresja ulega modyfikacji. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat precyzyjnej wymiany informacji pomiędzy nicieniem pasożytniczym a rośliną żywicielską, która w układzie kompatybilnym ujawnia niezwykle skalę molekularnego dopasowania tych odległych ewolucyjnie organizmów.

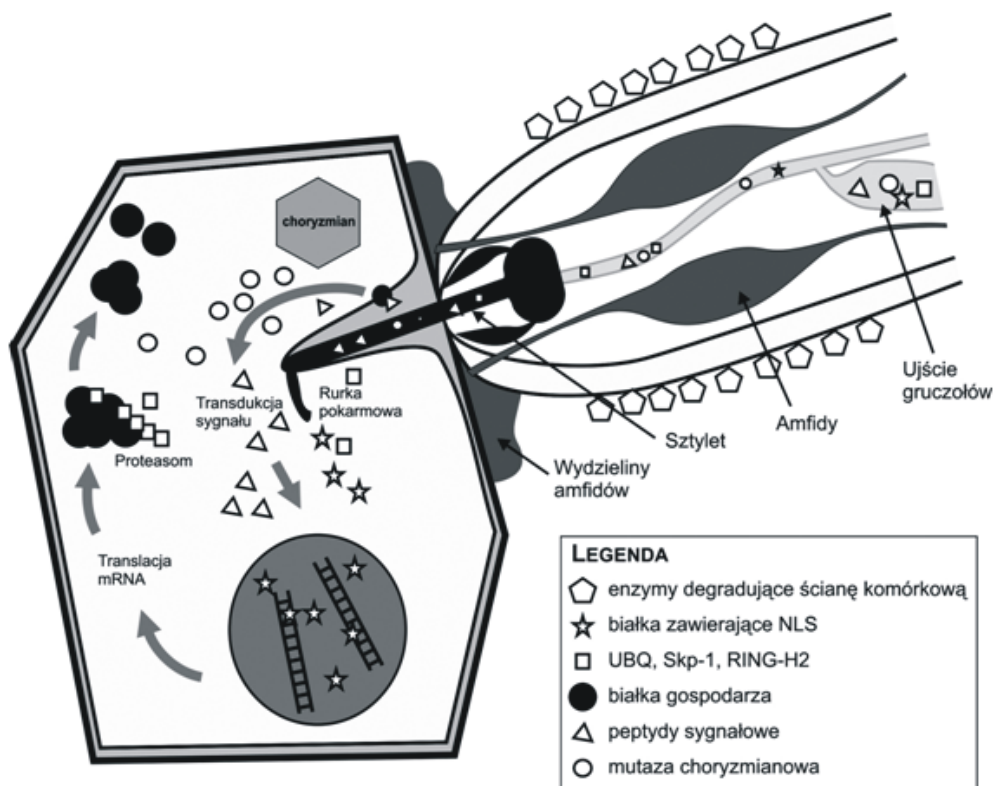
ROZWÓJ NICIENI CYSTOWYCH

W cyklu życiowym nicieni cystowych wyróżniamy cztery stadia larwalne (L1–L4) i zdolne do rozrodu stadium dojrzałe. Pierwsze stadium L1 rozwija się wewnątrz jaj. Następnie, część osobników młodocianych (L2) opuszcza cysty i rozpoczyna wędrówkę w kierunku korzeni gospodarza. Wykluwanie się larw L2 jest stymulowane przez wydzieliny korzeniowe roślin żywicielskich, dzięki czemu cykl rozwojowy nicieni jest w pełni skorelowany ze wzrostem i rozwojem roślin [39]. Wnikanie nicieni cystowych do wnętrza korzeni oraz ich wewnątrztkankowa migracja odbywa

się poprzez mechaniczne uszkodzenia ścian komórkowych oraz ich hydrolizę. Po dotarciu do wewnętrznej części kory pierwotnej nicienie wybierają pojedynczą komórkę inicjalną – ISC (ang. *initial syncytial cell*) zdolną do zainicjowania syncytium [22]. Następnie, na skutek atrofii mięśni wra skórno-mięśniowego nicienie tracą zdolność lokomocji i stają się formami osiadłymi. Po wytworzeniu syncytium, pasożyty przechodzą jeszcze dwie wylinki, aż do osiągnięcia formy dorosłej zdeterminowanej płciowo. Dojrzałe samce odzyskują zdolność lokomocji i opuszczają korzeń w poszukiwaniu samic, które powiększając swoje rozmiary przebijają epidermę korzenia. Po kopulacji, u samic rozpoczyna się intensywny proces rozwoju jaj. Po pewnym czasie samice obumierają, a ich oskórek twardnieje i brunatnieje, przekształcając się w ochronny worek, cystę, wypełniony zwykle ponad 500 jajami [39]. Cysty na ogół odpadają od korzeni i pozostają w glebie w stanie uśpienia.

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE ZACHODZĄCE W POWSTAJĄCYM SYNCYTIUM

Syncytium powstaje w wyniku częściowej hydrolizy ścian komórkowych i zlewania się protoplastów komórek sąsiadujących. Zaobserwowano, że już w 18 godzin po inokulacji nicieniami, w ścianach komórki inicjalnej tworzą się pierwsze duże otwory międzykomórkowe [22]. W tym czasie powstające syncytium jest już w nieznanym stopniu powiększone. W początkowej fazie syncytium rozwija się centrypetalnie w kierunku walca osiowego, a następnie w miarę obejmowania nowych komórek rozrasta się również w kierunku akropetalnym i bazypetalnym. W pełni wykształcone syncytium może składać się z ponad 200 komórek. W miarę rozwoju, w powstającym syncytium, zachodzi wiele zmian ultrastrukturalnych prowadzących do zagęszczenia cytoplazmy, wzrostu liczby rybosomów, ciałek tłuszczowych, mitochondriów i plastydów. Centralna wakuola zostaje zastąpiona dużą liczbą małych wakuoli. Natomiast jądro komórki powiększa się i przybiera nieregularne kształty. Ściana komórkowa ulega pogrubieniu, a w sąsiedztwie elementów trachealnych ksylemu tworzą się, zbudowane z celulozy i innych polisacharydów, wrosty transferowe [22]. Dzięki nim wzrasta powierzchnia błony komórkowej, co jednocześnie zwiększa powierzchnię wymiany substancji pokarmowych i transportu wody. W miejscu wbicia sztyletu, w ścianie komórkowej syncytium powstaje zatyczka pokarmowa (ang. *feeding plug*; ryc. 1), która najprawdopodobniej zbudowana jest z wydzielin nicienia oraz komponentów ściany komórkowej [39]. Chociaż funkcja zatyczek pokarmowych nie została jak dotąd sprecyzowana, wydaje się, że uszczelniają one perforacje w ścianie komórkowej, które powstały po jej mechanicznym uszkodzeniu przez nicienie. Na szczycie sztyletu gromadzą się wydzieliny nicieni uwalniane do wnętrza cytoplazmy syncytium, które tworzą cylindryczne struktury, tzw. rurki pokarmowe (ang. *feeding tubes*; ryc. 1) [9]. Ich funkcja związana jest z ułatwieniem nicieniowi pobierania pokarmu z bardziej odległych miejsc cytoplazmy. Pełnią również rolę sit molekularnych, które selekcionują pobierany pokarm, nie dopuszczając do zatkania



RYCINA 1. Model oddziaływań wydzielin nicienia na ekspresję genów i metabolizm komórek gospodarza (wg [9] zmodyfikowany)

FIGURE 1. A model of interactions of nematode secretions with gene expression and metabolism of host plant cells (acc. to [9] modified)

otworu sztyletu, np. mątwiki burakowe pobierają białka o wielkości 20–40 kDa [55]. Po zakończeniu cyklu życiowego nicieni syncytia degenerują.

ROLA BIAŁEK WYDZIELANYCH PRZEZ NICIENIE

Osiadłe, endopasożytnicze nicienie są grupą zwierząt, która idealnie przystosowała się ewolucyjnie do prowadzenia pasożytniczego trybu życia. Wspecjalizowane gruczoły wydzielnicze oraz sztylet umożliwiają im syntezę i sekrecję różnych związków, dzięki którym komórki korzenia zostają przekształcone w syncytium. Białka wydzielane przez nicienie wpływają również na ekspresję genów gospodarza, co prowadzi do rozległych zmian morfologicznych, fizjologicznych oraz molekularnych w komórkach korzenia [8]. Liczne badania przyczyniły się do sklonowania i sklasyfikowania wielu genów nicieni oraz do stworzenia modelu oddziaływań wydzielin na ekspresję genów i metabolizm komórek gospodarza [9] (ryc. 1).

W procesie pasożytnictwa nicieni wyróżniamy dwa główne etapy: migrację wewnątrztkankową przez korzeń gospodarza oraz utworzenie prawidłowo funkcjonującego syncytium. W obydwu tych etapach udział biorą białka, które są produkowane w gruczołach gardzielowych nicieni, ulokowanych po ich brzusznej i grzbietowej stronie. W trakcie migracji istotną rolę pełnią gruczoły brzuszne produkujące białka modyfikujące ścianę komórkową, jak np. endoglukanazy, enzymy degradujące pektyny, ksylanazy czy ekspansyny [10]. Natomiast białka wydzielane przez grzbietową komórkę wydzielniczą nicieni pełnią zasadniczą funkcję przy indukcji i prawidłowym funkcjonowaniu syncytium. Jednym z najlepiej poznanych białek wydzielanych przez nicienie jest mutaza choryzmianowa – CM (EC 5.4.99.5). Jest to kluczowy enzym szlaku syntezy kwasu szikimowego, który bierze udział w syntezie aminokwasów aromatycznych (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan), prekursorów metabolitów wtórnych (np. fitohormony) oraz związków biorących udział w odpowiedzi obronnej rośliny (fitoaleksyny). Wydzielanie mutazy choryzmianowej do cytozolu komórek gospodarza może wpływać na zmianę składu pochodnych kwasu szikimowego, a tym samym modyfikować program morfogenetyczny komórek korzenia oraz hamować reakcje obronne rośliny [50].

Białka CLE (ang. *CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION*) zidentyfikowane dotychczas tylko u roślin, regulują wiele procesów fizjologicznych związanych ze wzrostem i rozwojem rośliny, np. różnicowanie się tkanki merystematycznej pędu i korzenia, jak również rozwój tkanki przewodzącej. Zbadano, że zwiążanie się białka CLV3 (*CLAVATA3*) z zewnątrzkomórkową domeną kinazy receptorowej CLV1 (*CLAVATA1*) powoduje różnicowanie się komórek merystemu pędu u *Arabidopsis thaliana* [40]. Współczesne badania dostarczyły dowody wydzielania przez mątwika sojowego białka SYV 46, wykazującego podobieństwo do roślinnych białek sygnałnych CLE [52]. Udowodniono również, że roślinne białka CLE hamują różnicowanie się komórek i zarazem stymulują auksyno-zależną proliferację komórek u rzodkiewnika [53], co może mieć ogromne znaczenie w rozwoju syncytium. Kolejnymi białkami zidentyfikowanymi w wydzielinach nicieni są białka wykazujące podobieństwo do roślinnych białek biorących udział w selektywnej degradacji białek w proteosomach na drodze ubiquitynacji [10]. W roślinie jest to podstawowy mechanizm regulacji procesów komórkowych. Poprzez wydzielanie białek wykazujących podobieństwo do Skp-1 (ang. *S-phase kinase associated protein 1*), RING-H2 oraz ubiquityny nicienie mogą oddziaływać na białka związane z przekazywaniem sygnału, cyklem komórkowym, reakcją obronną oraz brać udział w transferze ubiquityny do białek przeznaczonych do degradacji [10]. W wydzielinach mątwika ziemniaczanego zidentyfikowano zwiększoną ekspresję genów kodujących białka podobne do roślinnych białek z rodziny RanBPMs zlokalizowanych w centrosomach (ang. *Ran-binding protein in the microtubule-organizing centre*) [44]. Ich funkcja związana jest prawdopodobnie z zaburzeniami prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego w syncytium. Co ciekawe, aż 25% białek wydzielanych przez mątwika sojowego zawiera sygnał lokalizacji jądrowej – motyw NLS (ang. *nuclear localization signal*), co może świadczyć o przekierowaniu tych białek do jąder komórek roślinnych, gdzie możliwa jest

bezpośrednia interakcja z sekwencjami promotorowymi genów wpływająca na ich ekspresję [11].

GENY ROŚLINNE INDUKOWANE PRZEZ NICIENIE

Przeprogramowanie ekspresji genów rośliny gospodarza jest niezbędnym warunkiem do powstania prawidłowo wykształconego i funkcjonującego syncytium. Przy użyciu różnorodnych metod biologii molekularnej udało się zidentyfikować całą gamę różnych genów, które prawdopodobnie są zaangażowane w proces pasożytnictwa nicieni [m. in. 26, 29, 42, 45, 54]. Prace eksperymentalne wykorzystują zarówno strategie masowej identyfikacji genów (na skalę genomów) i ich produktów, a także analityczne podejścia obejmujące szczegółowe badania ekspresji i regulacji pojedynczych genów w połączeniu z analizami organizmów z zaburzonym ich funkcjonowaniem poprzez mutacje, nadekspresję czy wyciszenie. Dotychczas poznane geny roślinne, których profile ekspresji ulegają zmianie zarówno lokalnie w obrębie zainicjowanego syncytium, jak również systemicznie w porażonej roślinie, związane są m.in.: z reakcjami obronnymi i odpowiedzią rośliny na zranienie, cyklem komórkowym, modyfikacjami ściany komórkowej, regulacją ciśnienia osmotycznego, metabolizmem podstawowym i wtórnym, czynnikami transkrypcyjnymi oraz geny, których ekspresja jest ściśle związana z hormonami roślinnymi (np. auksyną, etylenem) [20].

Geny reakcji obronnych

Rośliny w drodze ewolucji wykształciły odpowiednie mechanizmy obronne chroniące je przed atakami szkodników. Pierwszą linię obrony stanowią liczne modyfikacje morfologiczne w budowie roślin oraz synteza i wydzielanie związków toksycznych [38]. Po przełamaniu pierwszej linii obrony przez szkodnika dochodzi do uruchomienia molekularnego mechanizmu obrony opartego na szybkim zlokalizowaniu, rozpoznaniu oraz odpowiedzi na czynnik patogenności.

Geny, które ulegają indukcji w pierwszych godzinach po ataku nicieni, są związane z odpowiedzią obronną rośliny na czynniki stresowe, wynikające ze zranienia oraz migracji nicienia wewnątrz tkanki korzeniowej. W odpowiedzi na uszkodzenie ściany komórkowej, roślina produkuje reaktywne formy tlenu i azotu. Indukcji ulegają geny kodujące peroksydazy, chitynazy, lipoksygenazy, inhibitory proteinaz oraz katalazy. W trakcie patogenez, aktywacji ulegają również szlaki metaboliczne związane z biosyntezą fitoaleksyn, odkładaniem kalozy i lignin, które stanowią fizyczną barierę dla pasożyta [20]. Analizy transkryptomu korzeni różnych gatunków roślin porażonych nicieniami pasożytniczymi wykazały zależną od kwasu salicylowego aktywację ekspresji genów kodujących białka PR (ang. *pathogenesis-related proteins*) [3] oraz uczestniczących w biosyntezie związków fenylopropenowych [37].

Kwas salicylowy, jasmonowy oraz etylen pełnią rolę mediatora odpowiedzi obronnej roślin na infekcje wywołane takimi pasożytami, jak: wirusy, grzyby, bakterie oraz nicienie. Pasożyty biotroficzne wykazują większą wrażliwość na odpowiedź

obronną indukowaną kwasem salicylowym. Natomiast kwas jasmonowy i etylen są elementami sygnałnymi odpowiedzi obronnej związanej ze zranieniem po ataku gryzoni lub pasożytów powodujących nekrozy tkanek roślinnych [21]. Nicienie pasożytnicze roślin powodują zranienie tkanki korzeniowej, ale są również organizmami biotroficznymi, co może stanowić problem dla rośliny przy włączaniu odpowiedniego szlaku odpowiedzi obronnej. Analizy mutantów *Arabidopsis thaliana*, charakteryzujących się zaburzeniami w syntezie kwasu salicylowego, wykazały wrażliwość roślin na porażenie mątwikiem burakowym, w przeciwieństwie do mutantów pomidora, które pomimo obniżonego poziomu kwasu salicylowego nie wykazywały wrażliwości na guzaki [3]. Kolejne badania dowiodły, że główną rolę w odpowiedzi na porażenie przez nicienie tego rodzaju odgrywa kwas jasmonowy [6].

Roślina zaatakowana przez szkodnika będącego jej naturalnym wrogiem, najczęściej generuje odpowiedź obronną związaną z syntezą specyficznych białek odporności R (ang. *resistance proteins*), które rozpoznają konkretne białka pasożyta syntetyzowane przez geny wirulencji (*Avr*). Założenie o istnieniu specyficznej interakcji między produktami genów *R* rośliny a produktami genów *Avr* pasożyta jest podstawą modelu gen-na-gen [4]. W wielu układach eksperymentalnych nie udało się jednak potwierdzić istnienia bezpośrednich oddziaływań R-Avr, co doprowadziło do sformułowania hipotezy strażnika (ang. *guard hypothesis*), według której inne białka gospodarza pośredniczą i koordynują oddziaływania białek R i Avr [31]. Do tej pory brak jest opracowań potwierdzających istnienie tego mechanizmu w patogenezie nicieni cystowych, jednak spokrewniony guzak południowy aktywuje u pomidora uprawnego białko odporności Mi1.2 poprzez kompleks sygnałny złożony z białek HSP90-1, SGT1 oraz RME1, które przypuszczalnie wchodzi w interakcję z nicieniowym białkiem Avr [5]. Aktywacja reakcji obronnej z wykorzystaniem genów *R* często prowadzi do uruchomienia w miejscach infekcji programowanej śmierci komórki powodując tak zwaną reakcję nadwrażliwości – HR (ang. *hypersensitive response*). Co więcej, lokalna odpowiedź na porażenie pasożytem może indukować nabytą systemową odporność – SAR (ang. *systemic acquired resistance*), dzięki której cała roślina staje się odporna na infekcje [16]. Do tej pory zostało opisanych około 25 roślinnych genów *R* skierowanych przeciwko białkom Avr nicieni, niosących odporność na osiadłe endopasożyty z rodzaju *Heterodera*, *Globodera* i *Meloidogyne* [49]. Spośród nich osiem poznano molekularnie i podobnie jak zdecydowana większość genów odporności na patogeny, kodowane przez nie białka należą do rodziny NBS-LRR. W swojej sekwencji białka te zawierają charakterystyczne miejsce wiążące nukleotydy – NBS (ang. *nucleotide binding site*) oraz rejon bogaty w tandemowe powtórzenia leucyn – LRR (ang. *leucine rich repeat*). Analiza sekwencji tych białek wskazuje także na możliwe interakcje ze szlakami sygnałnymi programowanej śmierci komórki oraz kaskadami kinaz MAPK [12].

Geny zaangażowane w reorganizację ściany komórkowej

Modyfikacje ściany komórkowej, obejmujące procesy degradacji i syntezy nowych komponentów, są podstawowymi procesami zachodzącymi podczas powstawania i

rozwoju syncytium. W pierwszych dniach żerowania nicieni cystowych ściana komórek sąsiadujących z komórką inicjalną podlega częściowej hydrolizie. Powstają w ten sposób otwory, przez które dochodzi (w bardziej bezpośredni sposób niż przez plazmodesmy) do połączenia protoplastów. Elementy strukturalne syncytium ulegają silnej hipertrofii, w związku z czym otaczająca je ściana komórkowa musi być elastyczna i rozluźniona. Jednocześnie, w odpowiedzi na wysokie ciśnienie osmotyczne panujące wewnątrz syncytium, ściana komórkowa ulega pogrubieniu, a w miejscach, gdzie syncytium graniczy z ksylemem, powstają palczaste wrosty charakterystyczne dla komórek transferowych [22]. Początkowo sugerowano, że za rozkład ścian komórkowych podczas indukcji i rozwoju syncytium odpowiedzialne są enzymy hydrolityczne produkowane i wydzielane przez nicienie. Jednak dokładne analizy ekspresji genów gospodarza udowodniły głównie ich udział w procesach rearanżacji ściany komórkowej powstającego syncytium [46]. Podczas rozwoju roślin, w procesach przebudowy i degradacji ściany komórkowej bierze udział swoista i specyficzna mieszanka różnych izoform enzymów hydrolizujących i rozluźniających ścianę komórkową. Nie dziwi zatem fakt zaangażowania zestawu enzymów w proces tworzenia syncytium. Wykazano zwiększoną aktywność endoglukanaz, liaz pektynianowych, poligalakturonaz, endotransglikozylaz ksyloglukanu, jak również ekspansyn [46]. Badania na roślinach ziemniaka z wyciszonymi genami *Cel7* i *Cel9C1*, które kodują celulazy degradujące odpowiednio celulozę amorficzną i krystaliczną, wykazały zwiększoną odporność tych roślin na porażenie mątwikiem ziemniaczanym [34]. Rozwój nicieni na tych roślinach był zahamowany w stadium L2, a co za tym idzie, obserwowano mniejszą liczbę rozwijających się samic (o 60% dla *Cel7* i 31% dla *Cel9C1*) w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Ponadto u 89% samic rozwiniętych na roślinach ziemniaka z wyciszonym genem *Cel7* i 78% samic rozwiniętych na roślinach z wyciszonym genem *Cel9C1* zaobserwowano brak jaj w cystach [34]. Ostatnie badania zidentyfikowały kolejną grupę białek roślinnych – ekspansyn, zaangażowanych w modyfikację ściany komórkowej zachodzące podczas procesu tworzenia syncytium. Białka te biorą udział w procesach komórkowych, w których dochodzi do modyfikacji kształtu ściany komórkowej, a co za tym idzie całych komórek. Poprzez kontrolę rozciągliwości białka te są odpowiedzialne za właściwości mechaniczne ścian komórkowych. Analizy transkryptomu korzeni rzodkiewnika porażonych guzakiem południowym wykazały wzrost ekspresji siedmiu genów α -ekspansyn oraz dwóch β -ekspansyn w komórkach olbrzymich [54]. Ekspansyny ulegają podwyższonej ekspresji również w roślinach rzodkiewnika i pomidora po porażeniu nicieniami cystowymi [54, 18]. Analiza funkcjonalna genów ekspansyn jest utrudniona ze względu na wysokie podobieństwo sekwencji i specyfiki działania licznych izoform całej rodziny genowej, co stwarza konieczność analizy wielokrotnych mutantów czy wyciszania przynajmniej kilku genów jednocześnie.

Regulacja gospodarki wodnej

W ciągu doby nicienie pobierają pokarm przewyższający czterokrotnie objętość syncytium. Tak intensywne odżywianie wymaga kontroli oraz intensyfikacji przepływu

wody z ksylemu do syncytium. Proces ten może być usprawniony dzięki obecności kanałów wodnych lub przenośników w błonie komórkowej syncytium. Analizy transkryptomu korzeni *Arabidopsis thaliana*, które zostały porażone wątkiem burakowym, wykazały, że w syncytiach zwiększonej ekspresji ulegają przenośniki błonowe – *AtAAP6* (permeaza aminokwasowa) i *AtPIP2-5* [43]. Wykazano również zwiększoną aktywność genów kodujących akwaporyny u rzodkiewnika – *AtPIP2a* [33] oraz u soi – *GmPIP2-2* [36].

Metabolizm pierwotny i wtórny

Wysoka aktywność metaboliczna syncytium przejawia się nie tylko w obrazie cytologicznym, ale również w podwyższonej ekspresji genów związanych z metabolizmem podstawowym i wtórnym. Odnotowano wysoką aktywność genów związanych z syntezą białek, metabolizmem węglowodanów, a także metabolizmem i transportem cukrów [2]. W korzeniach rzodkiewnika porażonych wątkiem burakowym wzrasta poziom ekspresji genów kodujących lizofosfolipazę (*LPPL*), fosfatyzę polifosforanu inozytolu (*IPPP*) i dehydrogenazę izocytrynianu (*ISDGh*) [27]. Na szczególną uwagę zasługują geny kodujące enzymy biorące udział w szlakach biosyntezy metabolitów wtórnych, takich jak: flawonoidy, antocyjany, fenylopropanoidy oraz składniki wtórnej ściany komórkowej – ligniny i suberyny, a których zwiększoną ekspresję wykazano w korzeniach soi porażonych wątkiem sojowym [28]. Flawonoidy stanowią jedną z największych grup metabolitów wtórnych i biorą udział m.in. w odpowiedzi obronnej rośliny na porażenie organizmami pasożytniczymi, a także są inhibitorami transportu auksyny w roślinie. Funkcja flawonoidów w interakcji roślin z nicieniami cystowymi nie została do końca wyjaśniona. Ich indukcja może być przede wszystkim związana z odpowiedzią rośliny na zranienie. Jednakże flawonoidy mogą również pełnić istotną rolę w procesie tworzenia syncytium. Wzrost poziomu flawonoidów w rozwijającym się syncytm zaburza polarny transport auksyn, hamując wypływ tego hormonu z komórki i powodując tym samym jego akumulację [32]. Przypuszczalnie, jest to proces niezbędny do powstania prawidłowo funkcjonującego syncytium. Dodatkowo, funkcja zwiększonej produkcji flawonoidów może być związana z odkładaniem nowych pokładów lignin w celu pogrubienia ścian komórkowych syncytium, aby zrównoważyć wysokie ciśnienie osmotyczne panujące wewnątrz [20].

Reorganizacja i depolimeryzacja struktury cytoszkieletu

W trakcie rozwoju syncytium modyfikacjom podlega struktura cytoszkieletu, stabilizująca i nadająca kształt komórce. W odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, np. atak nicienia pasożytniczego, elementy cytoszkieletu ulegają reorganizacji. Wysoka aktywność genów kodujących białka aktyny (*ACT2* i *ACT7*) oraz α -, β - i γ -tubulin jest obserwowana zarówno wewnątrz proliferujących syncytiów, jak również w komórkach sąsiadujących w korzeniach rzodkiewnika porażonych wątkiem burakowym [13]. Zwiększoną ekspresję genów kodujących α - i β -tubulinę (*GmTubA1* i *GmTubB4*) wykazano również w syncytiach indukowanych w korzeniach soi po porażeniu wątkiem sojowym [36]. Podczas rozwoju syncytium nie zaobserwowano

prawidłowych struktur szkieletu aktynowego, a raczej pojedyncze włókna rozproszone w komórkach żywicielskich, co może świadczyć o jego depolaryzacji. We wczesnych fazach rozwoju syncytium zachodzi również przestrzenna dezorganizacja mikrotubul. Komórki sąsiadujące mają prawidłową organizację mikrotubul, co wskazuje na odrębność strukturalną syncytium. Sygnał o zmianach w układzie mikrotubul nie przechodzi do komórek sąsiadujących do czasu, gdy ulegną fuzji z syncytium [13].

Geny białek cyklu komórkowego

Integralną częścią procesu indukcji i rozwoju syncytium jest reaktywacja cyklu komórkowego w komórkach gospodarza. Syncytium jest tworem wielojądrowym powstającym poprzez połączenie protoplastów sąsiadujących komórek, których ściany uległy częściowej degradacji. Jądra komórkowe są znacznie powiększone i przyjmują ameboidalny kształt, co jest wynikiem powielenia ilości DNA wewnątrz otoczki jądrowej na drodze endoreduplikacji. Analizy molekularne wykazały, że w trakcie indukcji i rozwoju syncytium zwiększonej ekspresji ulegają geny związane z cyklem komórkowym [20]. U rzodkiewnika przeanalizowano profil ekspresji genów kodujących białka związane z cyklem komórkowym – cykliny (*cycB1;1* i *cycA2;1*) i kinazy zależne od cyklin (*cdc2a* i *cdc2b*) podczas porażenia nicieniami cystowymi [23]. Wykazano, że wszystkie cztery geny ulegają indukcji już we wczesnych godzinach pasożytnictwa nicieni, co sugeruje szybką reaktywację cyklu komórkowego przez nicienie. Lokalizacja transkryptów genów kinaz zależnych od cyklin oraz cykliny *cycA2;1*, w komórkach sąsiadujących z syncytium sugeruje ich gotowość do podziałów komórkowych oraz przyłączenia do szybko rozwijającej się struktury. Wysoka ekspresja cykliny *cycB1;1* w syncytium oraz brak podziałów jądra komórkowego świadczy o przebiegu cyklu komórkowego obejmującego fazy G_1 -S- G_2 z pominięciem mitozy [23].

Dodatkowo, badania z użyciem inhibitorów cyklu komórkowego – oryzaliny i hydroksymocznika udowodniły, że tylko zablokowanie cyklu komórkowego między fazą G_1 /S oraz G_2 /M w początkowych dniach porażenia hamuje indukcję i rozwój syncytium [48]. Replikacja DNA jest zatem podstawą wytworzenia prawidłowo funkcjonującego syncytium, a co za tym idzie sukcesu reprodukcyjnego nicieni. Komórki ulegające inkorporacji do syncytium wykazują wysoką aktywność mitotyczną. Zablokowanie cyklu komórkowego w fazie M w komórkach sąsiadujących doprowadza do zahamowania radialnego wzrostu syncytium. Ekspresja oraz aktywacja genów kodujących cykliny i zależnych od nich kinaz regulowana jest również przez fitohormony: auksynę i cytokininy, które uważane są za istotne związki kontrolujące przebieg cyklu komórkowego oraz odgrywają kluczową rolę w indukcji i rozwoju syncytium. Gen cykliny *cycB1;1* ulega szybkiej indukcji po potraktowaniu korzeni *Arabidopsis thaliana* egzogenną auksyną. Co więcej, prowadzenie kultury zawieszinowej komórek *Arabidopsis thaliana* w płynnej pożywce pozbawionej auksyn prowadzi do obniżenia poziomu transkryptów dla genów cyklin *cycA2;1*, *cycA2;2*, *cycB1;1*, *cycB2;2* [17].

Udział fitohormonów w procesie powstawania i rozwoju syncytium

Hormony roślinne biorą udział w regulacji procesów wzrostowych, rozwojowych, a także w odpowiedzi rośliny na czynniki abiotyczne i biotyczne. Kontrolują istotne dla komórek procesy, dlatego też ich bezpośredni udział w rozwoju i prawidłowym funkcjonowaniu syncytium jest bardzo prawdopodobny. Znacząca rola fitohormonów, głównie auksyny, w interakcji rośliny z nicieniem była postulowana już w latach sześćdziesiątych dwudziestego wieku. Na przestrzeni lat wielu badaczy dostarczyło dodatkowych dowodów znaczenia auksyny w procesie pasożytnictwa nicieni. Wykazano m.in., że mutant pomidora *dgt* (*diageotropica*), niewrażliwy na auksyny, jest *de facto* odporny na porażenie nicieniami cystowymi [24]. Liczba cyst przypadająca na roślinę była o 71% niższa w porównaniu z roślinami kontrolnymi, a rozwijające się cysty były mniejsze i charakteryzowały się obniżoną ilością jaj. Kolejne badania wpływu auksyny na proces tworzenia i rozwoju syncytium przeprowadzono z użyciem syntetycznego promotora DR5 [35], który aktywuje ekspresję genów w obecności śladowych ilości auksyny. Ekspresja genu reporterowego obserwowana była już w 18 godzin po inokulacji korzeni rzodkiewnika mątwikiem burakowym w komórkach sąsiadujących, co świadczy o udziale auksyn w przygotowaniu tych komórek do ich integracji z syncytium. Wzrost poziomu auksyny w tworzącym się syncytium może być wynikiem jej bezpośredniego wydzielania przez nicienie [15] lub lokalnej akumulacji. Auksyny transportowane są w roślinie bazypetalnie, z części pędowych w kierunku korzenia. Ich polarny transport odbywa się dzięki obecności w błonie cytoplazmatycznej wyspecjalizowanych nośników transportujących auksynę do komórki (AUX) oraz kierujących wypływem IAA z komórki (PIN). Zidentyfikowano i scharakteryzowano rodziny genów kodujących powyższe nośniki. Odkryto również, że nośniki transportujące auksynę poza komórkę (PIN) mogą zmieniać swoje położenie w błonie komórkowej, co może prowadzić do zmiany kierunku transportu tego związku [51]. Przy użyciu mutantów rzodkiewnika (*axr2/iaa7*, *pin* i *pin2*) z zaburzonym transportem auksyn, wykazano zahamowany rozwój mątwika burakowego na korzeniach tych roślin [24]. Podobne wyniki obserwowano w roślinach pomidora porażonych mątwikiem ziemniaczanym, których nasiona zostały zanurzone w kwasie naftyloftalamowym (NPA), będącym inhibitorem polarnego transportu auksyn [24]. Po przebadaniu nośników transportujących auksynę PIN, Grunewald i współpracownicy [25], przedstawili przypuszczalny model manipulacji transportem auksyny w trakcie tworzenia i rozwoju syncytium. Według tego schematu, w początkowych etapach powstawania syncytium nicienie hamują ekspresję genu *pin1*, dzięki czemu zostaje zahamowany wypływ auksyny z komórki inicjalnej. W trakcie rozwoju syncytium w czasie, gdy przyłączane zostają nowe komórki sąsiadujące, nicienie manipulują ekspresją genów *pin3* i *pin4*, a auksyna jest transportowana do komórek sąsiadujących [25].

Ekspresja wielu genów, która jest zwiększona w porażonych korzeniach roślin, jest regulowana przez auksyny. Regulują one również aktywność genu syntazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (*ACC*), który bierze udział w syntezie etylenu, kolejnego hormonu roślinnego zaangażowanego w proces rozwoju i

prawidłowego funkcjonowania syncytium. Etylen wpływa na ekspresję genów związanych z degradacją ścian komórkowych w trakcie rozwoju syncytium, kieruje również polarnym transportem auksyn w roślinie, doprowadzając do akumulacji tego fitohormonu w komórkach sąsiadujących ze strukturą odżywiającą. Doświadczenia na mutantach *Arabidopsis thaliana*, z nadekspresją genów biorących udział w odpowiedzi na etylen – *eto1*, *eto2*, *eto3*, wykazały, że rośliny te charakteryzowały się dużą wrażliwością na porażenie mątwikiem burakowym [7]. Także eksperymenty przeprowadzone w naszym laboratorium, na korzeniach pomidora po porażeniu mątwikiem ziemniaczanym, pokazują znaczny wzrost ekspresji genów niektórych izoform enzymów ACS i ACO uczestniczących w syntezie etylenu (Święcicka, badania niepublikowane). Z przebadanych 21 genów aż 17 ulegało zwiększonej ekspresji w korzeniach soi po ich porażeniu mątwikiem sojowym [47].

Badania prowadzone nad aktywnością promotora genu *ARR5* (ang. *Arabidopsis response regulator*), związanego z syntezą auksyny i etylenu, wykazały również istotny udział cytokinin w rozwoju syncytium. Cytokiny uczestniczą w regulacji podziałów komórkowych (cytokineza), pobudzają wzrost objętościowy komórek, indukują rozwój i rozgałęzianie się pędów, a także opóźniają procesy starzenia się. Cytokiny prawdopodobnie wydzielane są przez nicienie. W wydzielinach guzaka południowego (*Meloidogyne incognita*) i mątwika burakowego zidentyfikowano następujące związki: rybozyd zeatyny, benzyloadeninę i izopentyloadenozynę [15].

PODSUMOWANIE

Na przestrzeni lat przeprowadzono wiele badań charakteryzujących interakcję roślin z nicieniami cystowymi. Analizy wielkoskalowe, jak np. sekwencjonowanie fragmentów cDNA, wykorzystanie genomowych mikromacierzy czy metod proteomiki i metabolomiki pozwoliły na jednoczesne analizowanie tysięcy genów i zależności między nimi. Niektórym nowo odkrytym genom przypisano istotną funkcję w procesie pasożytnictwa nicieni cystowych. Jednakże dla większości z nich rola w tym procesie nadal nie została dokładnie określona, a niekiedy ze względu na brak ich podobieństwa do znanych sekwencji uniemożliwiona jest nawet spekulacja funkcji. Analiza funkcjonalna ogromnej liczby zidentyfikowanych genów, których ekspresja zmienia się podczas porażenia nicieniami cystowymi nadal pozostaje w fazie doświadczalnej. Obejmuje ona wykorzystanie bogatych bibliotek mutantów insercyjnych rzodkiewnika i technik RNAi wraz z precyzyjnymi analizami fenotypowymi. Identyfikacja genów roślinnych oraz nicieniowych zaangażowanych w kluczowe procesy pasożytnictwa przyczynią się do opracowania nowych strategii odporności na porażenie nicieniami cystowymi [12]. Mogą one wykorzystywać dostarczenie molekuł siRNA z syncytium do odżywiającego się nicienia i w ten sposób możliwe będzie zaburzenie funkcjonowania najistotniejszych genów nicieniowych. Innym sposobem może być produkcja siRNA poprzez promotor genu indukowanego pod wpływem obecności nicienia i wyłączenie w ten sposób genu roślinnego,

którego wzmożona ekspresja jest niezbędna podczas tworzenia syncytium. Sekwencje promotorowe specyficznie reagujące na obecność nicienia można zastosować do produkcji innych substancji, np. białek o aktywności przeciwnicieniowej. Wykorzystanie nowych narzędzi i metod (często z pogranicza różnych dziedzin nauki) pozwalają na systemowe, dynamiczne spojrzenie na pasożyta i jego gospodarza. Nie bez znaczenia staje się również badanie konkretnej interakcji w kontekście współwystępujących oddziaływań ze środowiskiem. W szczególności należy zwrócić uwagę na oddziaływania nicieni z innymi organizmami czy drobnoustrojami, w zdecydowanej większości niepatogennymi czy wręcz dobroczynnymi.

Szeroko pojęta genomika i bioinformatyka zbliżają język patologa, ekologu i biologa roślin, co daje nadzieję nie tylko na opracowanie nowych metod ochrony roślin przed tymi szkodnikami, ale również dopracuje zasady zrównoważonego funkcjonowania człowieka w środowisku.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABAD P, GOUZY J, AURY JM, CASTAGNONE-SERENO P, DANCHIN EG, DELEURY E, PERFUS-BARBEOCH L i inni. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 909–915.
- [2] ALKHAROUF NW, KLINK VP, CHOUIKHA IB, BEARD HS, MACDOLAND MH, MEYER S, KNAP HP, KHAN R, MATTHEWS BF. Timecourse microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible *Glycine max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Planta* 2006; **224**: 838–852.
- [3] BALHADERE P, EVANS AAF. Histopathogenesis of susceptible and resistant responses of wheat, barley and will grasses to *Meloidogyne naasi*. *Fundam Appl Nematol* 1995; **18**: 531–538.
- [4] BENT AF, MACKEY D. Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 2007; **45**: 399–436.
- [5] BHATTARAI KK, LI Q, LIU Y, SAVITHRAMMA P, KUMAR D, KALOSHIAN I. The *Mi-1*-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiol* 2007; **144**: 312–323.
- [6] BHATTARAI KK, XIE QG, MANTELIN S, BISHNOI U, GIRKE T, NAVARRE DA, KALOSHIAN I. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Mol Plant Microbe Interact* 2008; **21**: 1205–1214.
- [7] CURTIS RHC. Do phytohormones influence nematode invasion and feeding site establishment? *Nematology* 2007; **9**: 155–160.
- [8] DAVIS EL, HUSSEY RS, BAUM TJ, BAKKER J, SCHOOTA, ROSSO MN, ABAD P. Nematode parasitism genes. *Annu Rev Phytopathol* 2000; **38**: 365–396.
- [9] DAVIS EL, HUSSEY RS, BAUM TJ. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends Parasitol* 2004; **20**: 134–141.
- [10] DAVIS EL, HUSSEY RS, MITCHUM MG, BAUM TJ. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* 2008; **11**: 1–7.
- [11] DAVIS EL, MITCHUM MG. Nematodes. Sophisticated parasites of legumes. *Plant Physiol* 2005; **137**: 1182–1188.
- [12] DĄBROWSKA J, FILIPECKI M. Perspektywy wykorzystania metod biotechnologicznych w walce z pasożytniczymi nicieniami glebowymi. *Biotechnologia* 2010; **3**: 173–190.
- [13] DE ALMEIDA-ENGLER M, VAN POUCKE K, DE GROODT R, GHEYSEN G, ENGLER G, GHEYSEN G. Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant J* 2004; **38**: 12–26.
- [14] DE MEUTTER J, TYTGAT T, PRINSEN E, GHEYSEN G, VAN ONCKELEN H, GHEYSEN G. Production of auxin and related compounds by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Commun Agric Appl Biol Sci* 2005; **70**: 51–60.

- [15] DE MEUTTER J, TYTGAT T, WITTERS E, GHEYSEN G, VAN ONCKELEN H, GHEYSEN G. Identification of cytokinins produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Mol Plant Pathol* 2003; **4**: 271–277.
- [16] DURRANT WE, DONG X. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 2004; **42**: 185–209.
- [17] FERREIRA PC, HEMERLY AS, ENGLER JD, VAN MONTAGU M, ENGLER G, INZÉ D. Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell* 1994; **6**: 1763–1774.
- [18] FUDALI S, JANAKOWSKI S, SOBCZAK M, GRIESSER M, GRUNDLER FMW, GOLINOWSKI W. Two tomato a-expansins show distinct spatial and temporal expression patterns during development of nematode-induced syncytia. *Physiol Plant* 2008; **132**: 370–383.
- [19] FULLER VL, LILLEY CJ, URWIN PE. Nematode resistance. *New Phytol* 2008; **180**: 27–44.
- [20] GHEYSEN G, FENOLL C. Gene expression in nematode feeding sites. *Annu Rev Phytopathol* 2002; **40**: 191–219.
- [21] GLAZEBOOK J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 2005; **43**: 205–227.
- [22] GOLINOWSKI W, SOBCZAK M, KUREK W, GRYMASZEWSKA G. The structure of syncytia. W: Fenoll C, Grundler FMW, Ohl SA [red.] Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. London, Kluwer Academic Publishers 1997: 89–97.
- [23] GOVERSE A, DE ALMEIDA ENGLER J, VERHEES J, VAN DER KROL S, HELDER J, GHEYSEN G. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 747–761.
- [24] GOVERSE A, OVERMARSH, ENGELBERTINK J, SCHOTSA, BAKKER J, HELDER J. Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. *Mol Plant Microbe Interact* 2000; **13**: 1121–1129.
- [25] GRUNEWALD W, CANNOOT B, GHEYSEN G. Parasitic nematodes modulate PIN-mediated auxin transport to facilitate infection. *PLoS Pathog* 2009; **5**: 1–7.
- [26] GRUNEWALD W, KARIMI M, WIECZOREK K, VAN DE CAPPELLE E, WISCHNITZKI E, GRUNDLER FMW, INZÉ D, BEECKMAN T, GHEYSEN G. A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes. *Plant Physiol* 2008; **148**: 358–368.
- [27] HERMSMEIER D, HART JK, BYZOVA M, RODERMEL SR, BAUM TJ. Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infected roots of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 2000; **13**: 309–315.
- [28] ITHAL N, RECKNOR J, NETTLETON D, HEARNE L, MAIER T, BAUM TJ, MITCHUM MG. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 2007; **20**: 293–305.
- [29] ITHAL N, RECKNOR J, NETTLETON D, MAIER T, BAUM TJ, MITCHUM MG. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Mol Plant Microbe Interact* 2007; **20**: 510–525.
- [30] JAMMES F, LECOMTE P, DE ALMEIDA-ENGLER J, BITTON F, MARTIN-MAGNIETTE ML, RENOU JP, ABAD P, FAVERY B. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005; **44**: 447–458.
- [31] JONES JDG, DANGL JL. The plant immune system. *Nature* 2006; **444**: 323–329.
- [32] JONES JT, FURLANETTO C, PHILLIPS MS. The role of flavonoids produced in response to cyst nematode infection of *Arabidopsis thaliana*. *Nematology* 2007; **9**: 671–677.
- [33] JÜRGENSEN K. Untersuchungen zum Assimilat- und Wassertransfer in der Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Heterodera schachtii*. Praca doktorska, Uniwersytet w Kilonii, Niemcy. 2001.
- [34] KARCZMAREK A, FUDALI S, LICHOCKAM, SOBCZAK M, KUREK W, JANAKOWSKI S, ROOSIEN J, GOLINOWSKI W, BAKKER J, GOVERSE A, HELDER J. Expression of two functionally distinct plant endo-b-1,4-glucanases is essential for the compatible interaction between potato cyst nematode and its host. *Mol Plant Microbe Interact* 2008; **21**: 791–798.
- [35] KARCZMAREK A, OVERMARS H, HELDER J, GOVERSE A. Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. *Mol Plant Pathol* 2004; **5**: 343–346.
- [36] KLINK VP, ALKHAROUF N, MACDONALD M, MATTHEWS B. Laser capture microdissection (LCM) and expression analyses of *Glycine max* (soybean) syncytium containing root regions formed by the plant pathogen *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Plant Mol Biol* 2005; **59**: 965–979.
- [37] KLINK VP, HOSSEINI P, MATSYE P, ALKHAROUF NW, MATTHEWS BF. A gene expression analysis of syncytia laser microdissected from the roots of the *Glycine max* (soybean) genotype PI 548402 (Peking) undergoing a resistant reaction after infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Plant Mol Biol* 2009; **71**: 525–567.

- [38] KNOGG W. Fungal infection of plants. *Plant Cell* 1996; **8**: 1711–1722.
- [39] LILLEY CJ, ATKINSON HJ, URWIN PE. Molecular aspects of cyst nematodes. *Mol Plant Pathol* 2005; **6**: 577–588.
- [40] MITCHUM MG, WANG X, DAVIS EL. Diverse and conserved roles of CLE peptides. *Curr Opin Plant Biol* 2008; **11**: 75–81.
- [41] OKULEWICZ A, PEREC A, HILDEBRAND J. Biodiversity of nematode fauna. *Wiad Parazytol* 2005; **51**: 209–212.
- [42] PUTHOFF DP, EHRENFRIED ML, VINYARD BT, TUCKER ML. GeneChip profiling of transcriptional responses to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, colonization of soybean roots. *J Exp Bot* 2007; **58**: 3407–3418.
- [43] PUTHOFF DP, NETTLETON D, RODERMEL SR, BAUM TJ. *Arabidopsis* gene expression changes during nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant J* 2003; **33**: 911–921.
- [44] QIN L, PRINS P, JONES JT, POPEIJUS H, SMANT G, BAKKER J, HELDER J. GenEST, a powerful bidirectional link between cDNA sequence data and gene expression profiles generated by cDNA-AFLP. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 1616–1622.
- [45] SWIECICKA M, FILIPECKI M, LONT D, VAN VLIET J, QIN L, GOVERSE A, BAKKER J, HELDER J. Dynamics in the tomato root transcriptome on infection with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant Pathol* 2009; **10**: 487–500.
- [46] TUCKER ML, BURKE A, MURPHY CHA, THAI VK, EHRENFRIED ML. Gene expression profiles for cell wall-modifying proteins associated with soybean cyst nematode infection, petiole abscission, root tips, flowers, apical buds, and leaves. *J Exp Bot* 2007; **58**: 3395–3406.
- [47] TUCKER ML, XUE P, YANG R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) concentration and ACC synthase expression in soybean roots, root tips, and soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) – infected roots. *J Exp Bot* 2010; **61**: 463–472.
- [48] VAN DE CAPPELLE E, PLOVIE E, KYNDT T, GRUNEWALD W, CANNOOT B, GHEYSEN G. AtCDKA1 silencing in *Arabidopsis thaliana* reduces reproduction of sedentary plant-parasitic nematodes. *Plant Biotechnol J* 2008; **6**: 749–757.
- [49] VAN DER VOSSSEN EA, VAN DER VOORT JN, KANYUKA K, BENDAHMANE A, SANDBRINK H, BAULCOMBE DC, BAKKER J, STJEKEMA WJ, KLEIN-LANKHORST RM. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J* 2000; **23**: 567–576.
- [50] VANHOLME B, KAST P, HAEGEMAN A, JACOB J, GRUNEWALD W, GHEYSEN G. Structural and functional investigation of a secreted chorismate mutase from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii* in the context of related enzymes from diverse origins. *Mol Plant Pathol* 2009; **10**: 189–200.
- [51] VIETEN A, SAUER M, BREWER PB, FRIML J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci* 2007; **12**: 160–168.
- [52] WANG X, ALLEN R, DING X, GOELLNER M, MAJER T, DE BOER JM, BAUM TJ, HUSSEY RS, DAVIS EL. Signal peptide-selection of cDNA cloned directly from the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; **14**: 536–544.
- [53] WHITFORD R, FERNANDEZ A, DE GROODT R, ORTEGA E, HILSON P. Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 18625–18630.
- [54] WIECZOREK K, GOLECKI B, GERDES L, HEINEN P, SZAKASITS D, DURACHKO DM, COSGROVE DJ, KREIL DP, PUZIO PS, BOHLMANN H, GRUNDLER FMW. Expansins are involved in the formation of nematode-induced syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2006; **48**: 98–112.
- [55] WYSS U. Root parasitic nematodes: an overview. W: Fenoll C, Grundler FMW, Ohl SA (red.) Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. London, Kluwer Academic Publishers 1997: 5–22.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.01. 2011 r.

Przyjęto: 09.03. 2011 r.

Marcin Filipecki, Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii SGGW

02-797 Warszawa, ul. Nowoursynowska 156A/14,

e-maile: marcin_filipecki@sggw.pl