

NOWE WYDANIE

Fizjologia roślin

pod redakcją
Jana Kopcewicza
i Stanisława Lewaka

WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN

8B. ODPOWIEDZI ROŚLIN NA CZYNNIKI BIOTYCZNE

Magdalena Krzymowska

8.12. Molekularne podstawy odpowiedzi na czynniki chorobotwórcze	710
8.12.1. Różne typy odporności 711 • 8.12.2. Model zygzaka 713 • 8.12.3. Białka odporności R 713 • 8.12.4. Czynniki wirulencji 714 • 8.12.5. Zestaw czynników wirulencji określa zakres gospodarza 716 • 8.12.6. Modele percepcji efektorów 717 • 8.12.7. Reakcje obronne 718 • 8.12.8. Odporność indukowana 719 • 8.12.9. Wyciszanie RNA jako sposób obrony przed infekcjami wirusowymi 720	
8.13. Odpowiedź roślin na szkodniki	722
8.13.1. Odpowiedź na atak owadów roślinożernych 722 • 8.13.2. Odpowiedź bezpośrednia 722 • 8.13.3. Metabolity wtórne i białka obronne 724 • 8.13.4. Zmiany w fizjologii owadów i roślin wywołane wzajemnym kontaktem 724 • 8.13.5. Odpowiedź roślin na inwazję nicieni 725	
8.14. Interferencja szlaków przekazywania sygnałów aktywowanych podczas obrony	726
8.15. Rośliny pasożytnicze	726
Literatura uzupełniająca	728

Wzrost i rozwój roślin zależy także od interakcji zżywionymi elementami środowiska – innymi roślinami, mikroorganizmami, zwierzętami. Relacje te mogą mieć różny charakter, niektóre są pozytywne inne zaś niekorzystne dla przebiegu procesów życiowych roślin. W tej części podręcznika skoncentrujemy się na odpowiedzi roślin na wybrane stresogenne bodźce biotyczne: patogeny, szkodniki oraz rośliny pasożytnicze.

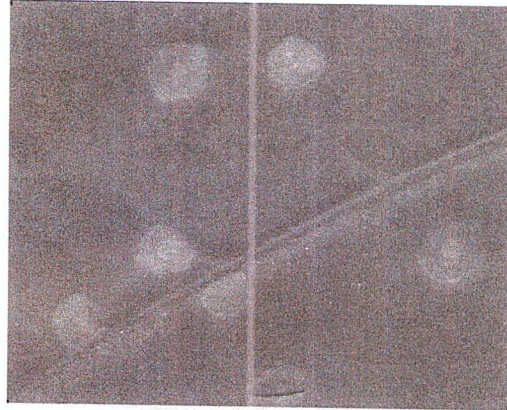
Oddziaływanie z czynnikami biotycznymi ma charakter bardzo dynamiczny: na jego wynik wpływa stan fizjologiczny roślin, funkcjonowanie gotowych i indukowanych mechanizmów obronnych oraz uruchamianie systemów przeciwobronnych przez atakujące organizmy.

Jak dotąd, najlepiej scharakteryzowano oddziaływanie roślin z czynnikami chorobotwórczymi (patogenami). Dlatego też pojęcia, koncepcje i hipotezy sformułowane na potrzeby tej dziedziny stały się pierwowzorem opisu oddziaływań z innymi organizmami.

Mimo że w środowisku żyje wiele potencjalnych patogenów, ich kontakt z roślinami rzadko prowadzi do rozwoju choroby. Dzieje się tak, ponieważ większość roślin jest odporna na większość roślinnych patogenów. Najstarszą, a zarazem najpowszechniejszą formą odporności jest **niegościnnosc** (*ang.* nonhost). Termin ten opisuje przypadki, gdy mikroorganizm nie jest w stanie skolonizować żadnej z roślin w obrębie danego gatunku. Odporność ta może być warunkowana zarówno istnieniem specyficznych barier (typ budowy organów roślinnych, zawartość szkodliwych lub odstraszających związków chemicznych), jak i działaniem indukowanych mechanizmów obronnych. Podobną odpowiedź obserwuje się podczas ataku szkodników – nicieni i owadów, a także podczas inwazji przez pasożytnicze rośliny, i choć natura tych procesów może się różnić, wszystkie opisywane są wspólnym pojęciem – niegościnnosc. Niektóre organizmy patogenne wykształciły w drodze ewolucji mechanizmy pozwa-

lające przełamać u niektórych roślin ten typ odporności. Mówimy o nich, że są przystosowane lub zaadaptowane do danej rośliny, która nazywana jest wtedy **gospodarzem**. Często zasiedlenie gospodarza przez intruza związane jest z wytwarzaniem specyficznych czynników zwanych **efektorami**. Dlatego też niektóre rośliny wykształciły inny typ odporności, skierowany swoiście przeciw konkretnym rasom, odmianom, izolatom lub biotypom intruzów, a oparty na rozpoznaniu efektorów, stąd nazywany **odpornością indukowaną przez efekторы, ETI** (*ang.* effector triggered immunity).

Jedną z bardziej skutecznych **strategii obronnych** uruchamianych w różnych typach odpowiedzi i skierowaną przeciw różnym organizmom jest **reakcja nadwrażliwości (HR – *ang.* hypersensitive response)**. Polega ona na obumieraniu komórek lokal-



Rys. 8.27. Reakcja nadwrażliwości. Inokulacja wirusem mozaiki tytoniu (TMV) liści odpornej odmiany tytoniu (mającej gen odporności *N*) prowadzi do lokalnego obumierania komórek. Proces ten zapobiega rozprzestrzenianiu się wirusa.

nie w miejscu inwazji, co prowadzi do zablokowania ataku (rys. 8.27).

8.12. MOLEKULARNE PODSTAWY ODPOWIEDZI NA CZYNNIKI CHOROBOTWÓRCZE

Rośliny mogą stać się celem dla patogenów należących do różnych grup taksonomicznych. Wśród czynników chorobotwórczych są wirusy i wiroidy, bakterie i grzyby. Liczne roślinne patogeny, także te o dużym znaczeniu ekonomicznym, są lęgniowcami (*Oomycetes*). Przez wiele lat uważano, że grupa ta jest częścią królestwa grzybów, lecz okazało się, że lęgniowce są bliżej spokrewnione ewolucyjnie z brunatnicami.

Patogeny można podzielić również ze względu na przyjmowane strategie życiowe. **Nekrotrofy** na początku inwazji zabijają komórki roślinne i żywią się martwą tkanką. W tym celu wydzielają toksyny oraz enzymy degradujące ścianę komórkową roślin. Taki sposób działania umożliwia na ogół bytowanie na wielu gatunkach roślin. Na

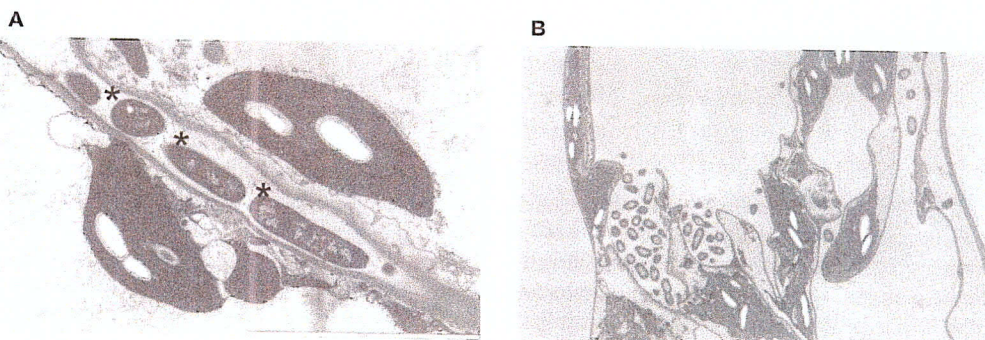
przykład grzyb *Botrytis cinerea*, wywołujący szarą pleśń, atakuje około tysiąca gatunków. Inną taktykę obierają **biotrofy**. Ich rozwój często zależy od konkretnego gospodarza, a dopełnienie cyklu życiowego patogenu wymaga obecności żywych komórek. Najlepiej ilustrują tę strategię wirusy, które do namnażania bezwzględnie potrzebują sprawnej maszyneryi komórkowej gospodarza. Przykładem jest też grzyb z gatunku *Blumeria graminis*, którego dwie formy specjalne (**f.sp.**) *tritici* i *hordei* wywołują objawy mączniaka prawdziwego wyłącznie na roślinach odpowiednio pszenicy albo jęczmienia. Są i takie drobnoustroje, nazywane **hemibiotrofami**, które w pierwszej fazie infekcji zachowują się jak biotrofy, później zaś unicestwiają komórki gospodarza i za-

siedlają martwe tkanki. W ten sposób przebiegają na przykład choroby wywołane bakteriami z gatunku *Pseudomonas syringae*. Bakterie te najpierw bytują w apoplacie, wykorzystując otaczające komórki gospodarza. W późniejszym stadium choroby, kiedy dochodzi do obumierania tkanek, bakterie żywią się substancjami pochodzącymi ze szczątków martwych komórek (rys. 8.28).

8.12.1. Różne typy odporności

Przeszkodą w kolonizacji roślin może być dla patogenów struktura roślinnej ściany komórkowej, obecność grubej kutykuli, zawartość szkodliwych substancji, a także niewrażliwość komórek roślinnych na toksyny lub enzymy wydzielane przez patogeny. W uzupełnieniu do tych konstytutywnie funkcjonujących mechanizmów, pojawienie się drobnoustrojów wyzwała także aktywną odpowiedź roślin. Dzięki specyficznym receptorom z rodziny **PRR (receptory rozpoznające wzorce, ang. pattern recognition receptors)** rośliny rozpoznają na powierzchni komórki komponenty swoiste dla mikroorganizmów, określane jako **wzorce molekularne powiązane z patogenami (PAMP – ang. pathogen associated mole-**

cular patterns). PRR wyspecjalizowane są na ogół w detekcji czynników unikatowych dla większej grupy drobnoustrojów i niezbędnych do ich przeżywalności, stąd wysoce konserwowanych ewolucyjnie. Przykładem czynników PAMP są pochodzące z bakterii lipopolisacharydy, peptydoglikan, czynnik elongacyjny EF-Tu, charakterystyczny wzór metylacji DNA, flagelina oraz składniki ścian komórkowych grzybów, takie jak glukany lub chityna. Istotą odporności typu niegościnność, nazywaną też **odpornością wywoływaną przez PAMP (PTI – ang. PAMP triggered immunity)**, w pełni ilustruje mechanizm percepcji transglutaminazy wytwarzanej przez łęgniowce z rodzaju *Phytophthora*. Niektóre rośliny rozpoznają trzynastoaminokwasowy peptyd (Pep13) występujący na powierzchni cząsteczki transglutaminazy. Motyw ten jest konserwowany, a jakiegokolwiek podstawienia w jego obrębie zaburzają aktywność enzymatyczną. Ponieważ transglutaminaza jest niezbędna do prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych, wykształcenie receptora wiążącego jej krytyczny element stało się fundamentem skutecznej strategii obronnej aktywowanej przez pewne gatunki roślin w odpowiedzi na *Phytophthora* spp.

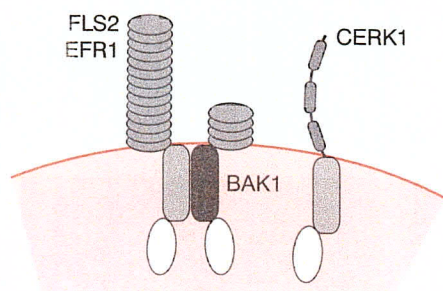


Rys. 8.28. Pałeczki bakterii *Pseudomonas syringae* (*) są hemibiotrofami. Początkowo zasiedlają przestrzemy międzykomórkowe (A), w późniejszych stadiach infekcji zabijają komórki roślinne i żywią się ich resztkami (B). (Fot. dr Mirosław Sobczak)

Dotychczas scharakteryzowane PRR to transbłonowe białka o planie budowy typowym dla receptorów (rys. 8.29). W rozpoznaniu PAMP uczestniczy ich zewnątrzkomórkowa domena.

W przypadku receptorów FLS2 i EFR, stymulowanych odpowiednio przez flagelinę – białko budujące wić bakteryjną oraz przez prokariotyczny czynnik elongacyjny EF-Tu, domena ta zawiera krótkie powtórzenia aminokwasowe bogate w leucynę (**LRR** – *ang.* leucine rich repeats). W przekazywaniu sygnału bierze natomiast udział domena kinazy białkowej położona od wewnętrznej strony plazmolemy. Funkcjonalność opisanych receptorów zależy od współdziałania wielu innych białek wchodzących w skład kompleksu, w tym wcześniej zidentyfikowanego białka **BAK1** – pozytywnego regulatora receptora brasinosteroidów BRI1 (patrz rozdz. 2.5.6). Drugą grupę receptorów PRR stanowią białka zawierające w zewnątrzkomórkowej domenie trzy motywy LysM. Motyw LysM odpowiada za wiązanie peptydoglikanów, chityny lub innych sacharydów o zbliżonej strukturze. Przykładem tej kategorii jest receptor CERK1 biorący udział w percepcji chityny, która tworzy ścianę komórkową grzybów i łęgniowców.

Przystosowane drobnoustroje dysponują arsenalem efektorów, zwanych też **czynnikami wirulencji**, które blokują lub osłabiają



Rys. 8.29. Receptory roślinne PRR rozpoznają swoiste komponenty drobnoustrojów (PAMP). W wiązaniu ligandów bierze udział wewnątrzkomórkowa domena, którą w przypadku receptorów FLS2 i EFR1 tworzą motywy LRR, natomiast w przypadku receptora CERK1 trzy motywy LysM. Aktywność FLS2 i EFR1 wymaga współdziałania koreceptora BAK1, jak również innych białek pomocniczych

białą odpowiedź roślin typu PTI. Dzięki ich aktywności patogeny są w stanie skolonizować konkretny gatunek roślin. Tak więc nabycie przez mikroorganizmy chorobotwórcze w toku ewolucji specyficznych efektorów umożliwiło przekształcenie danego gatunku roślin w gospodarza. Zjawisko to nosi nazwę **podatności wywołanej przez efektor** (**ETS** – *ang.* effector triggered susceptibility).

W odpowiedzi na te działania drobnoustrojów rośliny wykształciły inny typ odporności, opisaną wcześniej **odporność indukowaną przez efektor**, **ETI**. Jej naukowe podstawy stworzył jeszcze w latach czterdziestych ubiegłego stulecia Harold Flor. Odkrył on, że odporność roślin jest warunkowana obecnością dziedzicznego **czynnika R**, zaś **niezdolność patogenu do wywołania choroby (awirulencja)** również jest dziedziczna i zależy od **czynnika Avr**. Sformułowana przez Florę hipoteza, zwana obecnie **hipotezą gen-do-genu**, zakłada, że na każdy roślinny gen odporności (*R*) przypada specyficzny gen patogenu warunkujący awirulencję (*Avr*). Innymi słowy do rozpoznania mikroorganizmu i uruchomienia procesów obronnych dochodzi tylko wtedy, gdy roślinę mającą gen *R* zaatakuje mikroorganizm z czynnikiem *Avr*. W każdym innym z możliwych czterech wariantów interakcja patogenu z rośliną kończy się chorobą rośliny.

Przez wiele lat wydawało się, że hipoteza Florę zawiera pewien paradoks. Czynniki awirulencji sygnalizują roślinie obecność drobnoustroju, co powoduje, że przestaje on być patogeny wobec rośliny z genem *R*. Zagadką było więc, dlaczego presja selekcyjna nie eliminuje tych genów *Avr* z genomów mikroorganizmów chorobotwórczych dla roślin? Rozwiązanie było dość nieoczekiwane. Okazało się, że czynniki *Avr* pierwotnie odgrywają rolę w wirulencji. Dopiero jeśli roślina ma odpowiedni mechanizm obronny, przekształca je w czynniki awirulencji. Ciągłe jednak te same czynniki wspomagają wzrost patogenów na roś-

linach wrażliwych, to jest nie mających kompatybilnego receptora R.

8.12.2. Model zygzaka

Rozpatrując oddziaływanie chorobotwórczych mikroorganizmów z roślinami w skali ewolucyjnej, można przyjąć, że niegościnnosc jest najbardziej pierwotnym typem odporności, który przez niektóre patogeny został przełamany dzięki wykształceniu specyficznych efektorów. W reakcji na ten proces rośliny stworzyły mechanizm ETI oparty na białkach R, co pociągnęło za sobą nabycie przez drobnoustroje kolejnych efektorów, które modyfikują odpowiedź ETI gospodarza, a mogą być z kolei rozpoznawane przez inne białka R. Przystosowanie do kolonizacji danego gatunku roślin może też być związane z usunięciem genów awirulencji z konkretnych odmian czy ras patogenów.

Taka gra między rośliną a patogenem toczy się nieustająco. Podobny przebieg ma także każda infekcja – pierwsza linia obrony to odpowiedź typu niegościnnosc, która może być stłumiona, jeśli patogen ma odpowiedni efektor. Następnie zależnie od tego, czy roślina ma kompatybilne białko R rozpoznające dany efektor, rozwój choroby może zostać zahamowany lub nie. Model, który opisuje tę dynamiczną sytuację – balansowanie między odpornością a podatnością roślin, nosi nazwę **modelu zygzaka** (*ang.* zig-zag model).

8.12.3. Białka odporności R

Zjawisko dziedziczenia odporności wykorzystywali hodowcy już na początku XX w. do selekcji odpornych odmian zbóż, w tym do konstruowania mieszańców międzygatunkowych zbóż ze spokrewnionymi gatunkami roślin występującymi w stanie dzikim.

Jednak dopiero w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia udało się wyodrębnić pierwsze geny *R* warunkujące odporność roślin. Do tej pory poznano sekwencję wielu takich genów, wyizolowanych z różnych roślin i determinujących odporność na chorobotwórcze wirusy, bakterie, grzyby, lęgniowce, a także pasożytnicze rośliny, owady oraz nicienie. W samym genomie *Arabidopsis thaliana* jest zakodowane ok. 150 potencjalnych białek odporności. Interesujące, że choć zidentyfikowane geny pochodzą z niespokrewnionych gatunków roślin i warunkują odporność na choroby o różnej etiologii, kodują one białka wykazujące charakterystyczne cechy budowy. Większość z nich zawiera konserwowaną ewolucyjnie sekwencję wiążącą nukleotydy (**NB** – *ang.* nucleotide binding) oraz domenę LRR, stąd nazywane są **białkami typu NB-LRR**. Dodatkowo na aminowym końcu łańcucha peptydowego znajduje się na ogół domena odpowiadająca za oddziaływanie białko-białko.

Ze względu na rodzaj tej domeny, białka *R* dzieli się na dwie podstawowe klasy. Pierwsza z nich obejmuje białka z **domeną zwiniętego kłębka** (**CC** – *ang.* coiled coil). Do grupy tej należą na przykład białka RPS2 i RPM1 z *Arabidopsis thaliana*, zapewniające odporność na różne szczepy *Pseudomonas syringae*. Receptory drugiej podklasy mają domenę homologiczną do cytoplazmatycznej części białka Toll, związanego z programem rozwojowym i reakcją obronną muszki owocowej *Drosophila melanogaster* oraz do receptora interleukiny 1 systemu immunologicznego ssaków, stąd nazwa domeny – **TIR**. Reprezentatywnym przedstawicielem tej klasy jest białko N tytoniu warunkujące odporność na wirus mozaiki tytoniu TMV. Przynależność do jednej z klas NB-LRR determinuje powiązanie z innymi komponentami łańcucha

przekazywania sygnału. Większość białek typu CC-NB-LRR aktywuje ścieżkę zawierającą białko NDR1, natomiast przekazywanie sygnału od receptorów TIR-NB-LRR przebiega przez białko EDS1.

Działanie kompleksu receptorowego R można podzielić na dwa etapy: odbiór sygnału zachodzący w cytoplazmie oraz aktywację procesów obronnych w jądrze komórkowym, gdzie, jak się przypuszcza, białka R miałyby bezpośrednio oddziaływać z czynnikami transkrypcyjnymi. Nad prawidłowym przebiegiem tych procesów czuwają białka opiekuńcze, takie jak: HSP90, Hsc70, SGT1 i RAR1, które zapewniają przybranie właściwej konformacji przez białka R, regulują ich poziom oraz utrzymują w konformacji nieaktywnej, lecz umożliwiającej odbiór sygnału. Usuwają też źle złożone receptory. Ponadto osłabiają (przerwywają) łańcuch przekazywania sygnału przez eliminację tych cząsteczek receptorów, które były już zaangażowane w odbiór bodźca. Być może uczestniczą także w przemieszczaniu kompleksu receptorowego do jądra. Precyzyjna kontrola kompleksu receptorowego jest krytyczna, zważywszy, że aktywacja białek R może prowadzić do uruchomienia programowanej śmierci komórek (reakcja HR).

8.12.4. Czynniki wirulencji

Jak opisano wcześniej, przystosowanie do kolonizacji konkretnego gospodarza wiązało się z wykształceniem przez drobnoustroje specyficznych czynników, które interferują z odpornością roślin typu niegościnnosc. Patogenne bakterie gramujemne wprowadzają kilkadziesiąt białek efektorowych bezpośrednio do wnętrza komórki roślinnej. Transport zachodzi przez strukturę pełniącą rolę molekularnej strzykawki, nazywaną

systemem sekrecji typu trzeciego (TTSS – ang. type three secretion system). Zarówno sam system, jak i część wydzielanych przez czynników wirulencji, są konserwowane w wielu gramujemnych bakteriach chorobotwórczych dla roślin, a także w patogenach zwierząt. Przyczynia się do tego wymiana materiału genetycznego w drodze horyzontalnego transferu genów, która zachodzi między różnymi gatunkami bakterii. Do tej pory poznano rolę tylko nielicznych efektorów. Analiza sekwencji nie dostarcza na ogół przesłanek co do pełnionej przez nie funkcji. Ponadto efekторы TTSS nierzadko wykazują aktywności niespotykane u innych *Prokaryota*. Przykładem jest efektor AvrPtoB z *Pseudomonas syringae*, który wykazuje aktywność ligazy ubikwitynowej i naznacza do degradacji m.in. niektóre receptory i koreceptory PRR, np. FLS2, CERK1, EFR1, BAK1. Podczas ewolucji powstały rozmaite efekторы różniące się sposobem działania, często nakierowane na te same wewnątrzkomórkowe cele. Tak więc dezaktywację kinaz MAP mogą przeprowadzać fosfatazy i acetylazy blokujące fosforylację kinaz lub efekторы wykazujące unikatową aktywność liazy fosfotreoninowej, która eliminuje treoninę w pętli aktywującej. W końcu kinazy MAP mogą być modyfikowane przez ubikwitynację lub sumoilację. Nierzadko jeden szczep bakterii syntetyzuje kilka białek o różnych aktywnościach wymierzonych w ten sam cel komórkowy. Taktyka powielania funkcji efektorów stosowana jest powszechnie, zarówno przez bakterie chorobotwórcze dla zwierząt, jak i roślin. Umożliwia ona skuteczne wyłączenie całej ścieżki sygnałowej uruchamianej przez gospodarza w odpowiedzi na infekcję. Jednak wykształcony przez rośliny mechanizm odporności, opisany dalej jako hipoteza strażników, polegający na monitorowaniu stanu krytycznych komponentów

odpowiedzi obronnej, np. kinaz MAP, jest bardzo wyrafinowanym, a zarazem skutecznym sposobem na wszystkie efekторы atakujące dany cel w komórce.

Efektory TTSS biorą także udział w dostosowaniu warunków otoczenia do zasiedlenia przez bakterie. Szczególnie ciekawą grupą są białka o charakterze aktywatorów transkrypcji (**TAL** – *ang.* transcription activator like). Wiążą się one bardzo precyzyjnie z sekwencjami promotorowymi odpowiednich genów gospodarza i regulują ich ekspresję.

Podczas infekcji ryżu efektor PthXo1 z *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* aktywuje promotor genu *OsSWEET11*, którego produkt uczestniczy w transporcie glukozy z cytoplazmy do apoplastu. Natomiast AvrBs3 z *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* łączy się z elementami UPA (*ang.* up-regulated by AvrBs3) obecnymi w promotorach niektórych genów, indukując przerost (hipertrofię) komórek mezofilowych. Rośliny papryki wykształciły w odpowiedzi niezwykle skuteczny sposób regulacji genu Bs3, kodującego monoooksygenazę flawinową – nietypowe białko odporności biorące udział w rozpoznaniu AvrBs3. Mianowicie w promotorze tego genu znajdują się sekwencje UPA. Tym samym przemieszczanie bakteryjnego efektora AvrBs3 do jądra komórkowego odpornej odmiany papryki aktywuje nie tylko geny sprzyjające rozwojowi choroby, lecz także ekspresję genu odporności Bs3.

Najbardziej znanym patogenem z grupy *Oomycetes* jest *Phytophthora infestans*, wywołująca zarazę ziemniaczaną. We wczesnych fazach infekcji łęgniowce te wydzielają różne efekторы do apoplastu rośliny. Są wśród nich inhibitory enzymów roślinnych, białka RGD oraz toksyny. Na przykład czynniki EPIC1 i EPIC2B z *P. infestans* wiążą się do białka Rcr3 z pomidora, blokując jego aktywność proteazy cysteinowej. Inną klasę czynników tworzą białka RGD (zawierające motyw arginina, glicyna, asparaginian) naruszające przyleganie do ściany

* pv. – odmiana chorobotwórcza.

plazmolemy komórek gospodarzy, co prawdopodobnie zaburza procesy obronne zachodzące w ścianie komórkowej oraz zakłóca przepływ informacji o zakażeniu. Organizmy biotroficzne i hemibiotroficzne wykształcają ssawki (haustoria), które penetrują ścianę komórkową gospodarza i wpuklają błonę komórkową, tworząc miejsca pobierania składników odżywczych oraz sekrecji efektora. Znane są dwie klasy efektora transportowanych przez łęgniowce do wnętrza komórki gospodarza. Pierwsza to **efektory RXLR**, mające specyficzny peptyd sygnałowy na końcu aminowym oraz domenę efektorową na końcu C. Analiza bioinformatyczna wskazuje, że *P. infestans* może syntetyzować blisko sześćset białek o takich właściwościach. Ze względu na podobieństwo sekwencji na aminowym końcu efektora RXLR do sygnału translokacji PEXEL u zarodźca małarii, przypuszcza się, że mechanizm transportu białek RXLR do wnętrza komórek gospodarza jest analogiczny, jak u tych pierwotniaków. Drugą klasę efektora dostarczanych do komórek roślinnych stanowią **białka Crinklers**, zawierające specyficzną domenę na końcu N poprzedzającą domenę efektorową. Przypuszczalnie *P. infestans* produkuje około dwustu białek o takiej budowie. Choć wiadomo, że wiele efektora z obu wymienionych klas hamuje różne procesy obronne roślin, takie jak reakcję nadwrażliwości czy odkładanie kalozy, molekularne podstawy tych zjawisk nie są znane. Wyjątkiem jest AVR3a, czynnik typu RXLR z *P. infestans*, który stabilizuje CMPG1, tj. ligazę ubikwitynową gospodarza. Dodatkowo nekrotrofy lub hemibiotrofy należące do łęgniowców wytwarzają dwie rodziny toksyn zabijających komórki roślinne, tym samym inicjując nekrotroficzną fazę wzrostu. Efektory łęgniowców prawdopodobnie służą również do przesta-

wienia metabolizmu gospodarza. Choć w zarażonych roślinach dochodzi do zahamowania fotosyntezy, w miejscu infekcji uruchamiany jest import asymilatów, co zwiększa pulę składników odżywczych dostępnych dla drobnoustrojów. Porażenie systemowe (porażenie całej rośliny) przez lęgniowce może powodować też deformacje roślin, co jak się uważa, służy wydajnemu rozsiewaniu zarodników przez wiatr i deszcz. W wyniku infekcji *Sclerospora graminicola* niektóre zboża i trawy zamiast organów kwiatowych wytwarzają rozgałęzione pędy, zwane czarcimi miotłami. Natomiast *Sclerophthora makrospora* indukuje formowanie „szalonych wiech” u wielu gatunków roślin, w tym zbóż i kukurydzy. Te struktury przypominające pióropusze powstają na skutek hipertrofii oraz skręcania liści, pędów lub wiech.

8.12.5. Zestaw czynników wirulencji wyznacza zakres gospodarza

Powszechnie uważa się, że repertuar czynników wirulencji definiuje zakres gospodarza dla danego drobnoustroju, czyli zestaw gatunków roślin infekowanych przez ten drobnoustrój. Hipotezę tę dobrze ilustruje efektor HopQ1 z *Pseudomonas syringae*, który wspomaga rozwój bakteriozy obwódkowej fasoli, i którego obecność zwiększa przeżywalność bakterii na tych roślinach. Natomiast rośliny tytoniu rozpoznają właśnie ten czynnik i uruchamiają mechanizmy obronne. Wyniki badań wskazują, że szczepy *P. syringae* atakujące tytoń usunęły z zestawu efektorów HopQ1. Przyjmuje się, że właśnie eliminacja efektora, a nie zmiana przez mutację, jest najlepszym sposobem uniknięcia rozpoznania przez system obrony roślin. Analiza kombinatoryczna wskazuje, że wystarczy zestaw zaledwie sześciu

czynników TTSS, by zapewnić badanemu szczepowi bakterii *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 niemal pełną wirulencję wobec roślin konkretnego gatunku (*Nicotiana benthamiana*). Można przyjąć, że pozostałe efekторы wydzielane przez dany szczep tworzą zestawy wyspecjalizowane wobec innych gospodarzy lub też stanowią rezerwuuar czynników, które mogą być przydatne bakteriom w przyszłości. Ponadto okazało się, że efekторы tworzą pewien hierarchiczny układ. Prym wiedzie efektor wyłączający odpowiedź typu niegościnnosć (w tym przypadku AvrPtoB), który pozwala działać pozostałym efektorom zwiększającym zjadliwość bakterii.

Możliwe są dwie strategie współistnienia patogenów i gospodarzy. W pierwszej obaj partnerzy interakcji koewoluują, uczestnicząc w swoistym wyścigu zbrojeń. Jedna strona wykształca wciąż nowe efekторы, druga dopasowane białka odporności. Przykładem są wspomniane już formy specjalne grzyba *tritici* i *hordei* *Blumeria graminis* powodujące mączniaka prawdziwego odpowiednio pszenicy i jęczmienia. Grzyby te są w stanie rozmnażać się jedynie na roślinach gospodarza. Rozdział tych dwóch form grzyba nastąpił prawdopodobnie około dziesięciu milionów lat temu. Wydaje się jednak, że w wielu przypadkach zakres gospodarza dla danego patogenu nie jest stały, lecz podlega dynamicznym zmianom. Zakres gospodarza może się rozszerzać, gdy patogen nabywa zdolność kolonizacji spokrewnionych gatunków. Przykładem jest grzyb *Magnaporthe grisea*, atakujący rośliny ryżu, który w ostatnich latach zaczął infekować także pszenicę. Można przyjąć, że mechanizm tego zjawiska polega na nieznacznej modyfikacji zestawu efektorów syntetyzowanych przez drobnoustrój. Tak więc prawdopodobnie utrata przez *Magnaporthe oryzae* efektora Avr1-Co39, rozpo-

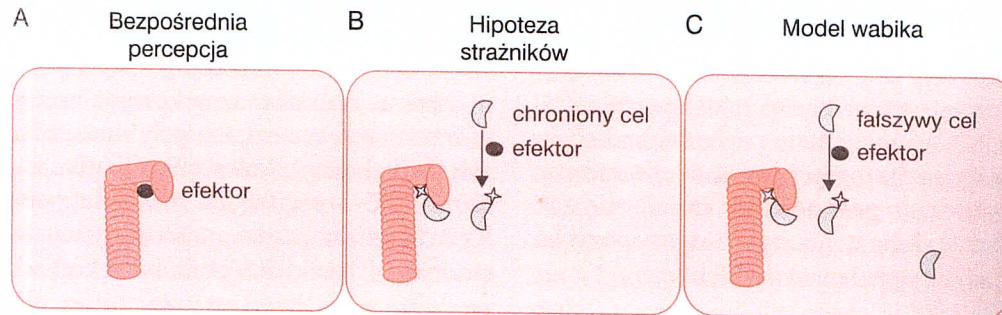
znawanego przez gen odporności ryżu, przyczyniła się do zasiedlenia ryżu. Jak wskazują wyniki badań nad legniowcami, niespodziewanie często może dochodzić do **przeskoku patogenu na nowego** niespokrewnionego **gospodarza**. Dzieje się tak prawdopodobnie, kiedy patogen pozyska przynajmniej jeden nowy efektor.

8.12.6. Modele percepcji efektorów

W większości znanych przypadków efektor nie wiąże się bezpośrednio z białkiem R (rys. 8.30A i B). Jak dochodzi wtedy do rozpoznania efektora, wyjaśnia **hipoteza strażników** (*ang.* guard hypothesis). Zgodnie z nią białka R monitorują stan newralgicznych elementów łańcucha przekazywania sygnału wewnątrz komórki. Jeżeli wskutek aktywności efektora ochraniający element ulegnie modyfikacji lub naruszona zostanie jego integralność, białka R inicjują mechanizmy obronne. Dobrym przykładem ilustrującym tę koncepcję jest ochrona białka RIN4 z *Arabidopsis thaliana*. Białko to uczestniczy w regulacji zamykania aparatów szparkowych, jednej z wczesnych reakcji obronnych. W wyniku adaptacji *Pseudomonas syringae*, RIN4 stało się celem ataku dla kilku niespokrewnionych efektorów wydzielanych przez te bakterie. Bakteryjne białko AvrRpt2 jest proteazą, która degraduje RIN4. Proteolizę RIN4 przez AvrRpt2 wykrywa roślinne białko typu R, RPS2. Z kolei receptor RPM1 rozpoznaje fosforylację RIN4, która zachodzi w obecności efektorów AvrRPM1 i AvrB. Detekcja zmian w strukturze białka RIN4 uruchamia odpowiedź roślin. Tak więc bodźcem stymulującym receptory RPS2 i RPM1 nie są same cząsteczki bakteryjnych efektorów, lecz wprowadzone przez nie modyfikacje białek gospodarza.

Celem ataku różnych mikroorganizmów mogą być te same składniki komórkowe. Otwieranie aparatów szparkowych następuje też na skutek działania grzybowej toksyny (fuzikokcyny), która wiąże białka z rodziny 14-3-3 regulujące działanie pompy ATP. Mechanizm percepcji oparty na stałej obserwacji ważkich składników komórkowych ma więc charakter uniwersalny, gdyż potencjalnie warunkuje odporność na niespokrewnione patogeny. Ponadto liczba receptorów konieczna do skutecznej ochrony może być stosunkowo niewielka, gdyż jeden receptor może wykrywać zmiany tego samego komponentu wywołwane przez różne efekторы. Zupełnie inna sytuacja zachodzi, gdy efekторы są ligandami dla receptorów. Szybsze tempo ewolucji mikroorganizmów niż roślin powoduje, że receptory specyficzne względem efektorów mogą łatwo stać się bezużyteczne.

Z hipotezy strażników wynika, że krytyczne elementy łańcucha przekazywania sygnału poddane są sprzecznym presjom selekcyjnym. Gdy brak odpowiedniego białka R, dobór naturalny faworyzuje rośliny, w których wiązanie efektora do substratu jest osłabione. Natomiast obecność receptora sprzyja wzmocnieniu tego wiązania. Toteż, jak zakłada **model wabika** (*ang.* decoy model), rośliny wykształciły czynniki, które udają cele dla efektorów (rys. 8.30C). Przykładem jest kinaza serynowo-treoninowa Pto z pomidora, pierwotnie zidentyfikowana jako białko odporności na *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Według współczesnej interpretacji kinaza ta, dzięki podobieństwu do domeny występującej w receptorach typu PRR, poddaje się działaniu efektorów skierowanych przeciw tym receptorom. Modyfikacja Pto przez AvrPto lub AvrPtoB – czynniki z *P. syringae* wymierzone w receptor FLS2 – stymuluje receptor Prf i prowadzi do odporności na bak-



Rys. 8.30. Modele percepcji patogenów. **A.** Roślinny receptor R wiąże się z efektem, co uruchamia odpowiedź obronną. **B.** Receptor R rozpoznaje zmiany komponentu łańcucha przekazywania sygnału wprowadzone przez efektor w komórce gospodarza. **C.** Roślina syntetyzuje czynnik, który przypomina właściwy cel efektoru. Modyfikacja tego czynnika, zwanego wabikiem, jest rozpoznawana przez receptor R

terie wytwarzające efekторы AvrPto lub AvrPtoB. Poza tą rolę białko Pto nie pełni innej funkcji w odpowiedzi odpornościowej. Działanie presji selekcyjnej ogranicza się więc tylko do lepszego dopasowania Pto do efektorów. W ogólnym zarysie strategia wabika przypomina użycie przez armię nadmuchiwanego czołgu, aby zdezorientować przeciwnika i skierować ofensywę na fałszywe cele.

8.12.7. Reakcje obronne

Podczas odpowiedzi typu PTI oraz ETI aktywowane są podobne łańcuchy przekazywania sygnału oraz mechanizmy obronne. Wczesne reakcje obejmują zmiany w przepuszczalności błony komórkowej prowadzące do wycieku jonów potasowych i chlorkowych na zewnątrz komórki oraz wnikania jonów wodorowych i wapniowych do wnętrza komórki. Aktywowana jest kaskada kinaz MAP. Następuje też wzmożona synteza anionorodnika nadmanganowego przez oksydazę NADPH, a tym samym – zmiana stanu redoks komórki (patrz rozdz. 2.2.4 i 5.4). Nadtlenek wodoru powstający z anionorodnika bierze udział w procesach reakcji obronnej: w bezpośred-

nie niszczeniu patogena, w uszczelnianiu ściany komórkowej przez jej lignifikację oraz poprzeczne usieciowanie białek w niej występujących, a także w uruchamianiu programowanej genetycznie śmierci komórki podczas reakcji HR. Aktywowane są również te szlaki metaboliczne, które umożliwiają syntezę niskocząsteczkowych lipofilowych związków o właściwościach bakterio- i grzybobójczych, czyli **fitoaleksyn**. Dochodzi też do całkowitej zmiany profilu transkrypcji, tj. do represji genów związanych z fotosyntezą i ogólnym metabolizmem oraz indukcji genów związanych z odpowiedzią obronną, w tym kodujących **białka PR** (związane z patogenezą, *ang.* pathogenesis related). Proces ten jest zależny od koaktywatora transkrypcji, białka NPR1. W roślinach zdrowych białko NPR1 znajduje się w cytoplazmie w formie oligomeru tworzonego przez mostki dwusiarczkowe. Na skutek infekcji wzrasta poziom kwasu salicylowego i zmienia się stan redoks komórki. Dochodzi zatem do redukcji mostków dwusiarczkowych i zmiany konformacji NPR1 z oligomeru w monomer. Następnie NPR1 w formie monomeru przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie tworzy kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny TGA.

Rozpoznanie mikroorganizmów chorobotwórczych przez roślinę prowadzi bardzo często do uruchomienia reakcji nadwrażliwości. Polega ona na wytworzeniu nekrozu w miejscu wniknięcia patogenu, co zapobiega jego dalszemu rozprzestrzenianiu się. Proces ten ma znamiona programowanej śmierci komórki, ale może przebiegać różnymi szlakami. Zależnie od badanego układu patogen-roślina wskazywano na udział apoptozy, programowanej onkozy, nielizosomalowej śmierci oraz autofagii. Jak pokazują wyniki badań genetycznych, bezsprzecznie niektóre drobnoustroje aktywują mechanizmy autofagii. Na jakiej drodze komórki roślinne obumierają w innych patosystemach – pozostaje do wyjaśnienia.

Nie wiadomo dotychczas, co jest bezpośrednią przyczyną lokalizacji infekcji. Można przyjąć, że obumarła tkanka stanowi fizyczną barierę dla dalszej inwazji. Możliwe jednak, że reakcja ta ma pozbawić patogen składników odżywczych lub unicestwić go enzymami hydrolitycznymi uwalnianymi przez umierające komórki.

8.12.8. Odporność indukowana

Pierwotna infekcja może prowadzić do wytworzenia w całej roślinie długotrwałej **nabytej odporności systemowej (SAR – ang. systemic acquired resistance)** na kolejne infekcje spowodowane przez ten sam lub wiele innych, często niespokrewnionych, czynników chorobotwórczych, w tym wirusy, bakterie, łęgniowce i grzyby. Mechanizm ten nie zapewnia jednak ochrony przed wszystkimi patogenami. SAR może rozwijać się zarówno u rośliny odpornej w następstwie odpowiedzi HR, jak i na skutek przebytej choroby u rośliny wrażliwej. Czas konieczny do powstania odporności typu SAR oraz okres, przez który się ona utrzymuje,

zależy od danego układu patogen-roślina. Niewiele wiadomo o ciągu zdarzeń prowadzącym do uzyskania SAR. Można założyć, że zjawisko to obejmuje dwa etapy. W pierwszym – dochodzi do rozpoznania patogenu i wysłania sygnału o zakażeniu do innych, oddalonych części rośliny. W drugim – komórki docelowe odbierają sygnał i uruchamiają mechanizmy prowadzące do aktywacji genów *SAR* (wiele z nich należy do rodziny genów *PR*) i powstania zwiększonej odporności. Liczne dane eksperymentalne wskazują na ważką rolę **kwasu salicylowego** w wytwarzaniu nabytej odporności. Najbardziej przekonujących dowodów na kluczowe znaczenie kwasu salicylowego dla całego procesu patogenezy roślin przyniosły badania z wykorzystaniem transgenicznych roślin tytoniu zawierających bakteryjny gen *nahG* z *Pseudomonas putida*. Produkt genu *nahG* – hydrolaza kwasu salicylowego katalizuje reakcję przekształcenia tego kwasu do katechołu. Podczas infekcji aktywnym genem *NahG* rośliny były zdolne do gromadzenia tylko niewielkich ilości kwasu salicylowego, a zatem wykazywały ostrzejsze symptomy chorobowe w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Nie mogły również wytworzyć odporności nabytej typu SAR.

Dane te potwierdzają udział kwasu salicylowego zarówno w powstaniu odpowiedzi typu HR, jak i SAR. Jednak wbrew pierwotnym przypuszczeniom kwas salicylowy nie jest mobilną cząsteczką sygnałową, przenoszącą informację o infekcji do oddalonych części rośliny, choć jest tam niezbędny do wytworzenia SAR. Przypuszcza się, że rolę mobilnego sygnału mogą pełnić substancje o bardzo różnej naturze: pochodna kwasu salicylowego (salicylan metylu); 3-fosforan glicerolu współdziałający z białkiem DIR1 (białkiem apoplastu transportującym lipidy); kwas azelainowy oraz AZI1 – inne białko przenoszące lipidy, którego ekspresja aktywowana jest właśnie przez kwas azelainowy; małe RNA, a także sygnały elektrochemiczne. Być może skoordynowane

działanie tych wszystkich czynników pozwala zaindukować odpowiedź SAR o parametrach dobranych do danego mikroorganizmu.

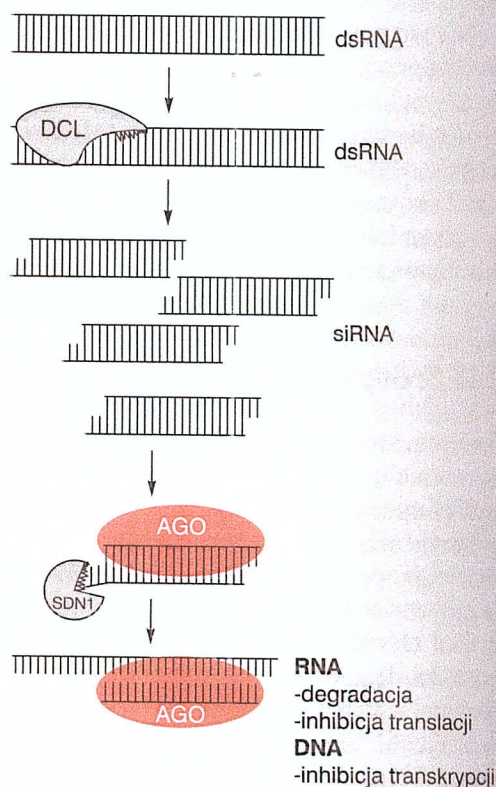
Odporność roślin może być indukowana także przez niepatogenne bakterie zasiedlające przykorzeniową warstwę gleby (ryzosferę). Ten typ odporności nazywa się **indukowaną odpornością systemową (ISR – ang. induced systemic resistance)**. Jego mechanizm jest niezależny od kwasu salicylowego, a uczestniczy w nim kwas jasmonowy oraz etylen. Zjawisku temu towarzyszy aktywacja wielu specyficznych genów, różnych jednak od genów *PR*.

8.12.9. Wyciszanie RNA jako sposób obrony przed infekcjami wirusowymi

Wirusy i wiroidy są najczęstszymi czynnikami wywołującymi choroby roślin. Ich rozwój jest całkowicie zależny od maszyny komórkowej gospodarza, dlatego też zalicza się je do obligatoryjnych biotrofów. Wiroidy to małe koliste cząsteczki jednociowego RNA. Wirusy roślinne natomiast składają się z kwasu nukleinowego okrytego płaszczem białkowym, a w bardzo rzadkich przypadkach także otoczką lipidową. Dzieli się je na 49 rodzin, ze względu na kształt i wielkość cząsteczki, budowę genomu, sposób replikacji i syntezy białek. Wirusy roślinne zawierają RNA lub DNA, w postaci jedno- lub dwuniciowej. Genom większości z nich (ok. 70%) tworzy jednociowy RNA o dodatniej polarności, jednak wszystkie wirusy roślinne w swoim cyklu życiowym produkują RNA.

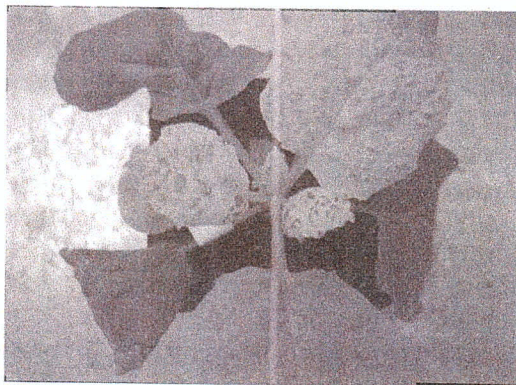
Oprócz opisanych wcześniej reakcji obronnych stosowanych wobec mikroorganizmów chorobotwórczych, rośliny wykształciły specyficzne metody eliminacji obcych cząsteczek RNA. Mechanizm ten, nazywany **wyciszaniem RNA**, uruchamia-

ny jest na skutek pojawienia się w komórce dwuniciowego RNA (rys. 8.31). Dwuniciowe RNA mogą powstawać w procesie replikacji wirusów, mogą stanowić fragment cząsteczki jednociowego RNA (np. struktura spinki) bądź formować się podczas transkrypcji w dwóch kierunkach. Dwuniciowy RNA rozpoznawany jest przez kompleks enzymatyczny zawierający białko typu Dicer (DCL, *ang. Dicer like*) i jest specyficznie cięty na dwuniciowe fragmenty długości 21–24 nukleotydów, nazywane wirusowymi **małymi interferującymi RNA (siRNA, ang. small interfering RNA)**. Wirusowe siRNA włączane są do kompleksów



Rys. 8.31. Schemat obrony roślin przed cząsteczkami wirusowych kwasów nukleinowych. AGO – białko Argonaute, DCL – *ang. Dicer like*, SDN1 – *ang. small RNA degrading nuclease 1*

zawierających białka Argonaute. Jedną z nici siRNA – pilotująca (*ang.* guide strand) odpowiada za rozpoznanie substratu, druga, zwana pasażerską (*ang.* passenger strand), zostaje zdegradowana przez nukleazę SDN1 (*ang.* small RNA degrading nuclease 1, nukleaza degradująca małe RNA). Oddziaływanie kompleksu, zawierającego Argonaute z sekwencją RNA komplementarną do nici pilotującej, prowadzi na ogół do degradacji tego RNA bądź do blokady jego translacji, a jeśli sekwencją docelową jest DNA, to transkrypcja na jego matrycy zostaje zahamowana przez modyfikację kwasu nukleinowego lub histonów. Dodatkowo polimerazy RNA zależne od RNA, syntetyzują na matrycy jednoniciowego RNA kolejną pulę dwuniciowych RNA, które po obróbce przez DCL tworzą drugorzędowe wirusowe siRNA. Ciekawym aspektem procesu wyciszania RNA jest jego systemowy charakter, co oznacza, że zjawisko to zachodzi również w tkankach od-



Rys. 8.32. Wyciszenie ekspresji genu desaturazy fitoenu (PDS) *Nicotiana benthamiana* metodą VIGS. Wektory skonstruowane na podstawie wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (TRV) zawierające fragmenty genu PDS wprowadzono do dolnych liści roślin. Ponieważ PDS uczestniczy w biosyntezie karotenoidów, zmniejszenie ekspresji PDS widoczne jest jako wybielenie górnych liści rośliny. (Fot. dr Sabina Zuzga)

dalonych od pierwotnego miejsca infekcji. Obecność dwuniciowego RNA generuje sygnał, który przenoszony jest lokalnie z komórki do komórki oraz wiązkami przewodzącymi na większe odległości. Oprócz transportu symplastycznego, który, jak się wydaje, odgrywa dominującą rolę, istnieją też sytuacje (np. w pyłku), kiedy transport odbywa się przez apoplast. Wprawdzie wiadomo, że sygnał ma naturę RNA, jednak nie do końca udało się wyjaśnić, czy są to cząsteczki siRNA, czy ich prekursorzy.

Skuteczność wyciszania jako strategii obronnej wobec szybko namnażających się cząstek wirusowych zasadza się na trzech podstawowych cechach: 1) duża specyficzność warunkowana jest przez komplementarność sekwencji, 2) dzięki powielaniu siRNA proces ulega wzmocnieniu, 3) powstaje mobilny sygnał.

W odpowiedzi na ten mechanizm wirusy roślinne wykształciły supresory białkowe działające na różnych etapach wyciszania. Ich celem jest bądź całkowite zablokowanie tego procesu, bądź spowodowanie, że wirus go nie uaktywnia. Wydaje się też prawdopodobne, że wirusy za pomocą siRNA mogą regulować ekspresję genów gospodarza. W zgodzie z tą tezą rekombinowane wirusy wyciszają ekspresję homologicznych genów roślinnych. Technika ta jest szeroko stosowana w laboratoriach do poznania funkcji badanych genów (rys. 8.32).

8.13. ODPOWIEDŹ ROŚLIN NA SZKODNIKI

W tej części zostaną opisane mechanizmy odporności na dwie podstawowe grupy szkodników: owady roślinożerne (rozdz. 8.13.1–4) oraz nicienie (rozdz. 8.13.5).

8.13.1. Odpowiedź na atak owadów roślinożernych

Rośliny wykształciły różne mechanizmy pozwalające odpierać ataki roślinożerców, a dające się podzielić ze względu na sposób regulacji (obrona bierna i indukowana) lub wytyczone cele defensywy (obrona bezpośrednia i pośrednia).

Obrona bierna polega na tworzeniu **barier fizycznych**, które utrudniają penetrację tkanek gospodarza, np. gruba warstwa kutykuli, sztywna blaszka liściowa, gęsto ułożone włoski, obecność kolców lub cierni, oraz **konstrykcyjnych barier chemicznych**, czyli zawartości w tkankach roślinnych toksyn, repelentów lub substancji spowalniających metabolizm szkodników.

W miejscu zaatakowanym przez roślinożerców, jak również systemowo w całej roślinie dochodzi do uruchomienia **indukowanych** procesów obronnych. Taki tryb odpowiedzi jest znacznie korzystniejszy dla rośliny. Pozwala on dostosować reakcję do konkretnego przeciwnika. Ponadto zużywa się mniej substancji odżywczych, a poniesione nakłady energetyczne są mniejsze w porównaniu z obroną bierną.

Z kolei **obrona bezpośrednia** obejmuje działania wymierzone przez rośliny w roślinożerców, podczas gdy w **odpowiedzi pośredniej** rośliny przywabiają na pomoc drapieżniki, które regulują wielkość populacji szkodników. Aby przyciągnąć naturalnych wrogów roślinożerców, zaatakowane rośliny

emitują substancje lotne lub wydzielają nektar z miodników pozakwiatowych. Równocześnie inhibitory enzymów trawiennych, syntetyzowane przez rośliny, ograniczają wzrost szkodników, ułatwiając im późniejszą eliminację przez drapieżniki. Ciekawe, w innych warunkach substancje te działają na niekorzyść roślin, gdyż zwiększają zapotrzebowanie owadów na pokarm.

8.13.2. Odpowiedź bezpośrednia

Odpowiedź na atak owadów roślinożernych jest aktywowana przez dwie grupy bodźców. Pierwsza z nich obejmuje substancje chemiczne wydzielane przez owady podczas żerowania bądź składania jaj oraz związki uwalniane ze zniszczonych tkanek. W kategorii tej najpowszechniejsze są niedyferkowane formy kwasów tłuszczowych – koniugaty z aminokwasami (FAC – *fatty acid-amino acid conjugate*) oraz kwasy tłuszczowe zawierające siarkę (kelferyny). Przykładem są tu również owadzie enzymy takie jak np. oksydaza glukozowa i β -glukozydaza. Także komponenty roślinne, np. receptyny – produkty degradacji podjednostki γ chloroplastowej syntazy ATP oraz lipidy błon ścian komórkowych indukują reakcje odpornościowe. Do drugiej grupy bodźców aktywujących mechanizmy obrony roślin można zaliczyć zjawiska wynikające ze specyficznego sposobu uszkodzenia tkanek roślinnych przez owady, to jest czynniki bodźców mechanicznych, wzór zamiatania schemat przemieszczania się roślinożercy po roślinie itp.

Percepcja tych czynników przez rośliny uruchamia złożoną kaskadę procesów obronnych, obejmującą zmiany w przepływie

członności błony komórkowej, aktywację kaskady kinaz MAP, syntezę wolnych rodników, w końcu zmianę w profilu ekspresji genu. Wydaje się, że podobnie jak podczas infekcji, sygnały te są odbierane przez dwie klasy receptorów. Charakterystycznym przykładem jest receptora wiązania wolicytyny (*N*-koniugat kwasu 17-hydroksylololenolowego i L-Gln) w aparatach błon komórkowych wyizolowanych z roślin kukurydzy sugeruje istnienie specyficznego transbłonowego receptora wolicytyny. Pochodne kwasów tłuszczowych odgrywają rolę w asymilacji azotu i tym samym konieczne do prawidłowego wzrostu i rozwoju larw. Z drugiej strony istnienie w wydzielinach owadów aktywnych mechanizmy obronne roślin. Przez analogię do PTI (odporności indukowanej przez patogeny), czynniki swoiste dla roślinożerców konieczne do ich rozwoju i rozpoznawania przez rośliny nazywa się **HAMP** (*herbivore-associated molecular patterns*). Nie udało się dotąd wyizolować specyficznych ligandów roślinnych receptorów biorących udział w tym procesie. Natomiast sklonowano kilkanaście genów warunkujących odporność roślin na owady roślinożerne. Co ciekawe, geny te kodują białka zawierające domeny NB-ARR, a więc o strukturze typowej dla receptora R. Gen *Mi-2* nadaje odporność dla pomidora na niektóre rasy mszycy żółtej (*Macrosiphum euphorbiae*), dwa geny mączlika, trzy gatunki nicieni należące do guzaków oraz koliszki, natomiast gen *Mi-1* – na mączlika ostroskrzydłego (*Bemisia tabaci*), a także na niektóre rasy mszycy żółtej (lecz nie na mszycę brzoskwińską – *Myzus persicae*) oraz na guzaki. Gen *Vat* pochodzący z roślin melona zapewnia odporność na mszycę ogórkową (*Aphis gossypii*), a *Bph14* na skoczka (*Nilaparvata lugens*) z rodziny szydlakowatych. Zidentyfikowano też całe rodziny genów warunkujących odporność na kon-

LIN NA SZKODNIKI

emitują substancje lotne lub wydzielają faktory z miodników pozakwiatowych. Równocześnie inhibitory enzymów trawienia, syntetyzowane przez rośliny, ograniczają wzrost szkodników, ułatwiając ich łatwiejszą eliminację przez drapieżniki. Co kawe, w innych warunkach substancje, które zaburzają procesy trawienne, mogą być niekorzystne dla roślin, gdyż zwiększają zapotrzebowanie owadów na pokarm.

3.2. Odpowiedź bezpośrednia

Odpowiedź na atak owadów roślinożernych jest wywołana przez dwie grupy bodźców.

Pierwsza z nich obejmuje substancje fizyczne wydzielane przez owady podczas żerowania bądź składania jaj oraz uszkodzenia tkanek. W tej kategorii najpowszechniejsze są zmożone formy kwasów tłuszczowych: glicerydy z aminokwasami (FAC – ang. fatty acid conjugate) oraz kwasy tłuszczowe zawierające siarkę (keliferyny). Wśród nich są również owadzie enzymy, np. oksydaza glukozy i β -glukozylaza. Także komponenty roślinne, np. inozytyl – produkty degradacji podjednostki α syntazy ATP oraz fragmenty błon komórkowych indukują reakcje obronne. Do drugiej grupy czynników należą mechanizmy obronne wywołane przez uszkodzenia mechaniczne, np. zranienia, przemieszczanie się roślinożerców i ich larw.

Odpowiedź na atak tych czynników przez roślinę jest wywołana złożoną kaskadą procesów biochemicznych, obejmującą zmiany w przepuszczości błony komórkowej, aktywację kinazy MAP, syntezę wolnych rodników, w końcu zmianę w profilu ekspresji genów. Wydaje się, że podobnie jak podczas infekcji, sygnały te są odbierane przez dwie klasy receptorów. Charakterystycznym przykładem jest wiązanie wolicytyny (*N*-koniugat kwasu 11-hydroksylinolenolowego i L-Gln) do aparatów błon komórkowych wyizolowanych z roślin kukurydzy sugeruje istnienie specyficznego transbłonowego receptora wolicytyny. Pochodne kwasów tłuszczowych odgrywają rolę w asymilacji azotu i są nieodzowne do prawidłowego wzrostu i rozwoju larw. Z drugiej strony ich obecność w wydzielinach owadów aktywuje mechanizmy obronne roślin. Przez analogię do PTI (odporności indukowanej przez AMP), czynniki swoiste dla roślinożerców niezbędne do ich rozwoju i rozpoznawane przez rośliny nazywa się **HAMP** (ang. herbivore-associated molecular patterns). Nie udało się dotąd wyizolować specyficznych roślinnych receptorów biorących udział w tym procesie. Natomiast sklonowano kilkanaście genów warunkujących odporność roślin na owady roślinożerne. Co ciekawe, geny te kodują białka zawierające domeny NB-ARR, a więc o strukturze typowej dla białek R. Gen *Mi-2* nadaje odporność roślinie pomidora na niektóre rasy mszycy mączkowej (*Macrosiphum euphorbiae*), dwa geny mączlika, trzy gatunki nicieni należące do guzaków oraz koliszki, natomiast gen *Mi-1* – na mączlika ostroskrzydłego (*Bemisia tabaci*), a także na niektóre rasy mszycy mączkowej (lecz nie na mszycę brzoskwińską – *Myzus persicae*) oraz na guzaki. Kolejny gen *Vai* pochodzący z roślin melona zapewnia odporność na mszycę ogórkową (*Aphis gossypii*), a *Bph14* na skoczka (*Nilaparvata lugens*) z rodziny sztylakowatych. Identyfikowano też całe rodziny genów białek R warunkujących odporność na kon-

kretnie gatunki owadów. Jedną z rodzin obejmuje geny *H* niesące odporność na przyszczarkę heskiego (*Mayetiola destructor*). Ponieważ wykazano, że funkcjonalność białka odporności *Mi-1* wymaga obecności białek opiekuńczych HSP90 i SGT1, można założyć, że w odpowiedzi na atak owadów uczestniczy podobny kompleks receptorowy, jak formowany podczas infekcji przez drobnoustroje. Godne uwagi jest to, że geny awirulencji *M. destructor* lokują się na chromosomie w rejonie kodującym wiele hipotetycznych białek wydzielanych ze śliną. Istnieją doniesienia, że niektóre z białek wydzielanych przez owady służą bądź unieczynnieniu obrony gospodarza, bądź poprawiają kondycję szkodników. Opierając się na nomenklaturze stworzonej dla oddziaływań roślin z mikroorganizmami chorobotwórczymi, przyjęto nazywać te czynniki efektorami. Wszystkie te dane sugerują, że relacje między rośliną a owadem można opisać za pomocą mechanizmów analogicznych do funkcjonujących podczas patogenezы. W pierwszej linii percepcja konserwowanych czynników HAMP aktywuje odpowiedź roślin, później zaś efekторы wydzielane przez owady indukują odpowiedź swoistą dla danej rasy czy biotypu szkodnika, zależną od roślinnych białek R. Centralną rolę w przekazywaniu sygnału o ataku roślinożerców pełnią jasmoniany. Uszkodzenie tkanki, np. spowodowane żerowaniem owadów, powoduje gwałtowną akumulację amidu JA z izoleucyną. Zatem następuje zależna od ubikwityny degradacja białek Jaz, które są represorami transkrypcji, a tym samym aktywacja wczesnych genów odpowiedzi. Wiele z tych genów indukowane jest przez owady prowadzące różny tryb życia. Ale oprócz tej wspólnej grupy genów, profile ekspresji różnią się znacząco, zależnie czy ataku dokonuje wyspe-

nie dzięki obecności w ślinie białek łączyących wapń, przeciwdziałają koagulacji białek wewnątrz rurek sitowych, a tym samym blokują proces zatykania rurek, co powoduje kontrakcję roślin na atak szkodników. Imago zawisaka tytoniowego (*Manduca sexta*) jest nocnym motylem zapyłym *Nicotiana attenuata*. Choć zjawisko samo w sobie jest korzystne dla rośliny, w przypadku zapylania zawisak tytoniowy kładła na liściach jaja, z których wykluły się żarłoczne gąsienice. Tolerują one wysokie dawki nikotyny, alkaloidu którego zawartość w liściach stanowi podstawowy mechanizm obronny *N. attenuata*. Dla człowieka dawka śmiertelna dla człowieka dawka nikotyny (LD_{50}) wynosi 2 mg/kg masy ciała, *M. sexta* zaś aż 1500 mg/kg. Z kolei gąsienice polifaga słonecznicy amerykańskiej (*Helicoverpa zea*) wydzielają oksydazę tyrozynową, która hamuje syntezę nikotyliczną, jednak kiedy roślina wyczuwa obecność złożonych jaj owadów na swoich liściach, dochodzi do zmian w zachowaniu dobowym kwiatów. Kwiaty otwierane wówczas nie jak zwykle w nocy, kiedy służyłyby przyciągnięciu kolejnych samic, lecz w ciągu dnia, aby przywabić do zapylania samic.

Gąsienice potrafią też dla własnych celów wykorzystywać skierowane pierwotnie przeciwko nim działania. Chrzążki z podrzędu strąkowcowatych używają toksycznych aminokwasów niebiałkowych jako źródła azotu do syntezy własnych aminokwasów. Natomiast larwy motyli *Utetheisa ornatrix* z rodziny niedźwiedziówkowatych wykorzystują toksyczne alkaloidy pirolizydynowe. Następnie jako dorosłe osobniki przetwarzają te substancje do składanych jaj, co chroni jaja przed drapieżnikami. Inne owady odpowiadają na roślinne inhibitory produkując enzymy niewrażliwe na działanie inhibitorów lub je dezaktywujące.

W wyniku ataku roślinożerców, kiedy dochodzi do dużych ubytków w listowiu, roślina reorganizuje przepływ asymilatów, powoduje zwiększoną akumulację cukrów w korzeniach, a zatem opóźnione stanienie się roślin oraz wydłużoną fazę kwitnienia. Proces ten jest precyzyjnie kontrolowany przez kinazy z rodziny SnRK. Jak się okazuje, taka taktyka jest próbą przesunięcia momentu wytwarzania nasion na korzystniejsze warunki, np. na czas kiedy gąsienice przestają żerować i ulegają przecierzeniu. Można powiedzieć, że takie zachowanie roślin ma charakter altruistyczny, gdyż nie służy przetrwaniu konkretnego osobnika, lecz zachowaniu gatunku.

8.13.5. Odpowiedź roślin na inwazję nicieni

Roślinożerne nicienie to kolejna grupa organizmów, która przysparza dużych strat w rolnictwie. Za szkody odpowiadają głównie osiadłe endopasożyty: nicienie cystowe z rodzajów *Globodera* i *Heterodera* oraz guzaki należące do rodzaju *Meloidogyne*. Nicienie cystowe są na ogół wąsko wyspecjalizowane, guzaki zaś cechując bardzo szeroki zakres gospodarzy. Cztery najczęściej występujące gatunki guzaków: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* i *M. hapla* atakują łącznie ponad 1700 różnych gatunków roślin.

Podobnie jak na inne czynniki biotyczne, odporność na nicienie warunkowana jest przez mechanizmy bierne i indukowane. Skuteczną barierę chroniącą przed inwazją stanowią substancje o charakterze nicieniobójczym (nematocydy) lub odstraszaającym (repelenty) zawarte w tkankach roślinnych. Na przykład obecność pirokatecholu w korzeniach miłki zakrzywionej (*Eragrostis curvula*) chroni roślinę przed in-

wazją guzaków. Wydaje się, że naturalna odporność na nicienie ogranicza się do niewielu gatunków roślin uprawnych. Zidentyfikowano jednak szereg białek typu NB-LRR, należących do obu podklas białek R, które zapewniają odporność na nicienie. Co ciekawe, wiele z nich warunkuje równocześnie odporność na zupełnie niespokrewnione organizmy. Gen *Gpa2* (*CC-NB-LRR*), wyizolowany z roślin ziemniaka, oprócz odporności na mątwika agresywnego (*Globodera pallida*) nadaje także odporność na wirus ziemniaka X (PVX), a wspomniany wcześniej gen *Mi-1* poza odpornością na trzy gatunki guzaków – także na niektóre owady.

Efektory wydzielane przez nicienie ułatwiają pasożytom wnikanie do korzeni roślin oraz przemieszczanie się w ich wnętrzu, blokują też odpowiedź obronną gospodarza oraz uczestniczą w wytwarzaniu struktur odżywiających (syncytiów i komórek olbrzymich, indukowanych odpowiednio przez nicienie cystowe i guzaki). Większość efektorów produkowana jest i wydzielana przez gruczoły gardzielowe nicieni (przybrzuszne lub grzbietowe) i dostarczana za pomocą sztyletu bezpośrednio do komórek roślinnych. Gruczoły przybrzuszne syntetyzują głównie enzymy degradujące ścianę komórkową: enzymy hydrolityczne, białka wspomagające trawienie, takie jak ekspansyny, oraz białka wiążące celulozę. Natomiast gruczoły grzbietowe wytwarzają czynniki związane z tłumieniem reakcji obronnych oraz modyfikujące program rozwojowy roślin. Powstawanie struktur odżywiających obejmuje aktywację cyklu komórkowego, depolimeryzację aktyny, zmianę w gospodarce hormonalnej i profilu ekspresji licznych genów oraz wiele innych procesów. Uczestniczy w tym wiele białek wytwarzanych przez nicienie, często nasładowujących białka gospodarza. Nicienie wy-

działają ekspansyny, aneksyny, mutazę choryzmianową.

Najbardziej spektakularnym przykładem manipulowania rozwojem roślin jest produkcja peptydu Hg-SYV46 przez mątwika sojowego (*Heterodera glycines*). Peptyd ten jest homologiem czynnika CLAVATA3 (CLV3) z rzodkiewnika pospolitego (*A. thaliana*). CLV3 aktywuje receptor CLV1/CLV2 i negatywnie reguluje ekspresję *WUSCHEL*. Toteż

uważa się, że czynnik Hg-SYV46 tworzy warunki do różnicowania komórek, a nie ich proliferacji, wpływając na formowanie syncytium. Z kolei peptyd Hg-SYV46 wydzielany przez guzaki, tworzy kompleks z innymi czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny *Sca* i tym samym wzmacnia wzrost korzeni. Przypisano też funkcję peptydowi Hsc19C07 syntetyzowanemu przez mątwika burakowego (*Heterodera schachtii*), wiąże się on do transportera auksyny, zwiększając jego aktywność.

8.14. INTERFERENCJA SZLAKÓW PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW AKTYWOWANYCH PODCZAS OBRONY

Rośliny w odpowiedzi na mikroorganizmy o naturze biotrofów aktywują najczęściej szlaki przekazywania sygnałów zależne od kwasu salicylowego, natomiast atak nekrotrofów lub roślinożerców indukuje sygnał transmitowany przez jasmoniany i etylen. W naturze często dochodzi jednak do infekcji mieszanych lub też ataki następują po sobie w krótkim czasie. Dostosowanie do warunków środowiska wymaga więc funkcjonowania mechanizmów precyzyjnie kontrolujących ten proces. Podstawowe znaczenie ma tu integracja różnych ścieżek sygnałowych, które współdziałają ze sobą bądź wzajemnie się wykluczają. Taki typ regulacji umożliwia precyzyjne dopasowanie od-

powiedzi do atakującego. Co również istotne, pozwala zminimalizować koszty energetyczne ponoszone podczas obrony. Jednak również te właściwości odpowiedzi roślin mogą być niegodziwie wykorzystywane przez przeciwników. Patogenne mikroorganizmy syntetyzują fitohormony (np. auksyny) lub związki naśladujące ich funkcję (np. koronatynę), aby wyłączyć mechanizmy obronne oparte na działaniu kwasu salicylowego. Z kolei wiele owadów celowo uruchamia ścieżkę sygnałową zależną od kwasu salicylowego, aby hamować mechanizmy zależne od JA, pierwotnie skierowane przeciw tej grupie organizmów.

8.15. ROŚLINY PASOŻYTNICZE

Rośliny pasożytnicze (parazytofity) wielokrotnie pojawiały się w toku ewolucji okrytonasiennych. Stąd grupa ta jest dość różnorodna, zarówno pod względem form, jak i stosowanych strategii. Obejmuje około czterech tysięcy gatunków. Niektóre z nich, zwane **półpasożytami**, zawierają chlorofil

i są zdolne do fotosyntezy, a z roślin gospodarza czerpią substancje mineralne i wodę. Przykładem jest powszechnie występujący w Polsce jemiola pospolita (*Viscum album*). Natomiast **holoparazytofity** (całkowicie pasożyty) z organizmu żywiciela pobierają również organiczne związki węgla i azotu.

W naszej strefie klimatycznej parazyty (jak zaraza – *Orobanche*) nie stanowią poważnego problemu ekonomicznego. Są one natomiast, że do 60% ziem uprawnych afrykańskiej sawanny skażone jest i jest ono półpasożytniczymi z rodzaju *Striga*. Obejmuje on około 50 gatunków, z których większość obligatoryjnie pasożytuje na 10 różnych odmianach zbóż i warzyw. Powoduje to straty sięgające rocznie 1–7 mld dolarów oraz problemy z wyżywieniem milionów ludzi. Toteż prestiżowe czasopismo naukowe *Science* w 2010 r. zaliczyło je do największych światowych zagrożeń dla bezpieczeństwa żywności.

Dlatego trwają intensywne badania w celu wyjaśnienia mechanizmów kontroli cyklu życiowego *Striga*. Obejmuje on trzy podstawowe etapy: kiełkowanie nasion, wytworzenie specjalnej ssawki (haustorium), przytwierdzenie się za jej pomocą do korzenia gospodarza, wniknięcie do struktury korzenia i wytworzenie dodatkowych połączeń z wiązkami przewodzącymi. Pojedynczy osobnik z rodzaju *Striga* wytwarza 50–500 tysięcy niewielkich nasion, które mają niezwykle właściwości. Zachowują zdolność kiełkowania nawet w warunkach ekstremalnych przez kilkadziesiąt lat. Sygnałem, który indukuje kiełkowanie nasion *Striga*, są wydzielane przez gospodarza strigolaktyny. Ponieważ te są bardzo niestabilne, ich obecność przez parazytofitę gwarantuje, że gospodarz znajduje się w kilkucentymetrowej bliskości. Bliskość taka jest krytyczna dla rozwoju siewki, ponieważ nasi parazyty mają bardzo mało składników z pokarmu. Następnie korzenie siewki rosną w kierunku powierzchni korzeni gospodarza. Tam wierzchołki korzeni *Striga* zamieniają się w wyspecjalizowane struktury służące zarówno do umocowania się do żywiciela, jak i do pobierania składników.

tezę kwasu salicylowego, aktywację czynników transkrypcyjnych z rodziny WRKY oraz produkcję białek PR.

Odporność roślin może objawiać się na różnych etapach cyklu życiowego półpasożytów z rodzaju *Striga*: przed przytwierdzeniem się do gospodarza, podczas wnikania w jego korzenie oraz już po wytworzeniu połączenia z tkankami przewodzącymi gospodarza. Ponieważ dwa etapy w rozwoju *Striga* zależą od substancji roślinnych, mutacje prowadzące do ich zmniejszonej syntezy bądź słabszego wydzielania do gleby potencjalnie redukują sukces pasożytów. Jednak okazało się, że strigolaktony to nieznaną dotąd klasa roślinnych regulatorów wzrostu, które syntetyzowane są w korzeniach, aktywne zaś są w częściach nadziemnych rośliny, gdzie blokują proces rozgałęziania się pędów. Stąd **zmniejszenie syntezy strigolaktonów** zmienia pokrój roślin, co często nie jest korzystną cechą hodowlaną. Do zahamowania rozwoju pasożytów może dochodzić także podczas penetracji korzeni. Również odporność warunkowana przez *RSG-301* zatrzymuje rozwój *Striga* na tym etapie, uruchamiając w miejscu przyczepu **reakcję nadwrażliwości**. Zablockowaniu wzrostu haustorium w korze pierwotnej często towarzyszy odkładanie kalozy, suberyny, związków fenolowych oraz usie-

ciowanie białek ściany komórkowej. Endoderma stanowi kolejną barierę trudną do sforsowania przez ssawki pasożytów. Wydaje się, że jest to często związane z akumulacją niezidentyfikowanych dotąd substancji, bądź przeciwnie – z niedoborem stymulatorów wzrostu. W końcu nawet wytworzenie przez haustoria połączenia z elementami tkanek przewodzących żywiciela nie gwarantuje pomyślnego zakończenia cyklu życiowego pasożyta. Może to być spowodowane obecnością w wiązkach toksyn lub śluzowatych substancji, utrudniających pobieranie składników odżywczych.

Literatura uzupełniająca

- Spael S., Dong X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12: 89–100.
- Kielkiewicz M., Godzina M., Czapl A. 2010. Aktywacja mechanizmów obronnych roślin przez szkodniki. *Postępy w Ochronie Roślin*, 50(2): 885–896.
- Święcicka M., Dąbrowska J., Filipiński M. 2011. Rozgrywka molekularna pasożytniczych nicieni cystowych z komórkami korzeni roślin. *Postępy Biologii Komórki*, 38 (2): 267–281.
- Dzierżyńska A. 2007. Wykorzystanie komunikacji chemicznej między roślinami do zwalczania chwastów pasożytniczych. *Postępy Nauk Rolniczych*, 2: 33–46

F

FIZJOLOGICZNE PODSTAWY PR

9.1. FIZJOLOGICZNE POI

- 9.1.1. Powiązanie fizjologii roślin z
- 9.1.1.1. Fizjologia roślin a nauki rolnicze 730 • 9.1.1.3. Niekonwencjonalne metody uprawy 730
- 9.1.2. Fotosynteza i dystrybucja białek
- 9.1.2.1. Produkcja fotosyntetycznych związków 730
- 9.1.2.2. Produkcja fotosyntetycznych związków 730
- 9.1.2.3. Produkcja fotosyntetycznych związków 730
- 9.1.3. Produktywność zespołów roślinnych
- 9.1.3.1. Produktywność biomasy z 730
- 9.1.3.2. Metody oceny produktywności 730
- 9.1.3.3. Produktywność 730
- 9.1.4. Produktywność roślin a plon i jakość
- 9.1.4.1. Co to jest plon rolniczy 730
- 9.1.4.2. Plon i jakość 730
- 9.1.4.3. Nawożenie roślin w rolnictwie 730
- 9.1.5. Wpływ warunków klimatycznych na produktywność
- 9.1.5.1. Roślina a klimat 747 • 9.1.5.2. Wpływ warunków klimatycznych 747 • 9.1.5.3. Adaptacje anatomiczne 748 • 9.1.5.4. Przyczyny zmian 748 • 9.1.5.5. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.6. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.7. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.8. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.9. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.10. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.11. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.12. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.13. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.14. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.15. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.16. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.17. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.18. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.19. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.20. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.21. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.22. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.23. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.24. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.25. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.26. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.27. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.28. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.29. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.30. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.31. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.32. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.33. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.34. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.35. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.36. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.37. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.38. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.39. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.40. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.41. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.42. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.43. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.44. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.45. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.46. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.47. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.48. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.49. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.50. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.51. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.52. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.53. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.54. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.55. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.56. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.57. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.58. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.59. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.60. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.61. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.62. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.63. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.64. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.65. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.66. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.67. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.68. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.69. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.70. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.71. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.72. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.73. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.74. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.75. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.76. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.77. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.78. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.79. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.80. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.81. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.82. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.83. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.84. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.85. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.86. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.87. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.88. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.89. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.90. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.91. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.92. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.93. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.94. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.95. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.96. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.97. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.98. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.99. Wpływ zmian 748 • 9.1.5.100. Wpływ zmian 748
- 9.1.6. Ingerencja rolnika w procesy fizjologiczne
- 9.1.6.1. Plon – wynik strategii nie tylny i ich toksyczność dla roślin i ludzi 754 • 9.1.6.2. Wpływ zmian 754 • 9.1.6.3. Wpływ zmian 754 • 9.1.6.4. Wpływ zmian 754 • 9.1.6.5. Wpływ zmian 754 • 9.1.6.6. Biostymulatory 756
- 9.1.7. Wpływ zanieczyszczeń środowiska na produktywność
- 9.1.7.1. Problemy uprawy roślin 760
- 9.1.7.2. Główne źródła zanieczyszczenia do wykorzystania dla roślin przemysłowych w ochronie roślin uprawnych 760
- Literatura uzupełniająca