

Mirosława Górecka, Wojciech Kurek, Władysław Golinowski
SGGW w Warszawie, Wydział Rolniczy, Katedra Botaniki

Immunocytochemiczna lokalizacja celulazy w korzeniach rzepaku porażonych mątwikiem burakowym (*Heterodera schachtii*)

Immunolocalisation of a cellulase in syncytia induced in roots
of oilseed rape by sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*

Słowa kluczowe: celulaza, β -1,4-endoglukanaza, syncytium, ściana komórkowa, otwory w ścianie komórkowej

Key words: cellulase, β -1,4-endoglucanase, syncytium, cell wall, cell wall openings

Powstawanie i rozwój syncytiów — struktur odżywiających larwy nicieni cystowych — są związane z przebudową apoplastów komórek do nich włączanych. Pogrubieniu ulega zewnętrzna ściana syncytium, a plazmodesmy ulegają zamknięciu. Równocześnie powstają otwory w ścianach komórkowych pomiędzy komórkami włączonymi do syncytium, a ich protoplasty łączą się ze sobą tworząc jeden duży protoplast o wysokim stopniu aktywności fizjologicznej. W celu sprawdzenia hipotezy o udziale endogennych celulaz rośliny w przebudowie apoplastu syncytium zastosowano metodę immunocytochemicznej lokalizacji celulazy z użyciem poliklonalnych przeciwciał I i II-rzędowych piętnowanych złotem koloidalnym. W badanych przez nas syncytiach zaindukowanych w korzeniach dwu odmian rzepaku przez mątwika burakowego *Heterodera schachtii* stwierdzono występowanie endogennej celulazy. Białko to było obecne w protoplaście w pobliżu nowo powstających oraz w pełni wykształconych otworów w ścianach komórkowych, jak też — wewnątrz struktur pęcherzykowatych w syncytium. Celulazę zlokalizowano również w komórkach zawiązków korzeni bocznych. Wykazanie obecności tego białka w rozwijających się strukturach odżywiających pasożyta pozwala lepiej zrozumieć mechanizmy interakcji roślina

Plant-parasitic cyst nematodes induce in roots of their host specialised feeding structures called syncytia. Cells incorporated consecutively into the syncytia undergo extensive apoplast rearrangement, including cell wall thickening, closure of plasmodesmata and localised cell wall dissolutions resulting in large cell wall opening between neighbouring cells. As a result a large symplastic unit arises with high metabolic activity. To verify a hypothesis that endogenous plant cellulases are involved in apoplast rearrangement during syncytium development immunocytochemical localisation of a cellulase was performed using polyclonal antibodies and immunogold technique. We have localised molecules of cellulase in syncytia induced in two varieties of oilseed rape by sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. The protein was present in a protoplast close to emerging as well as fully developed cell wall openings and also within vesicular structures in syncytium. The enzyme was also localised to primordia of lateral roots. Finding cellulase in expanding syncytia allows for better understanding of mechanisms underlying plant-nematode interaction. In the future it may also contribute to engineering crop plants resistant to nematodes.

– nicień, co w przyszłości może przyczynić się do wytworzenia metodami inżynierii genetycznej nowych odmian odpornych na nicienie.

Wstęp

Pasożytnicze nicienie z rodzaju *Heterodera* są obligatoryjnymi biotrofami i główną część swego cyklu życiowego przechodzą wewnątrz korzenia rośliny — gospodarza. Larwy tych pasożytów zmieniają program morfogenetyczny komórek korzenia, prowadząc do powstania w nim organu odżywiającego nicienia — wielokomórkowej struktury zwanej syncytium (Golinowski i Magnusson 1991, Magnusson i Golinowski 1991, Golinowski i in. 1996, Sobczak i in. 1997). Bardzo istotnym elementem ontogenezy syncytium jest przebudowa apoplastów komórek do nich włączanych. W przypadku rzepaku pogrubieniu ulega zewnętrzna ściana syncytium, a plazmodesmy ulegają zamknięciu (Górecka 2002). Równocześnie powstają otwory w ścianach komórkowych pomiędzy komórkami włączanymi do syncytium, a ich protoplasty łączą się ze sobą tworząc jedną dużą symplastyczną całość o wysokim stopniu aktywności fizjologicznej (Golinowski i in. 1996, Sobczak i in. 1997). Geneza tych otworów nie została do końca wyjaśniona. Z jednej strony odkryto niedawno, że mątwiki dysponują enzymami celulolitycznymi, wydzielanymi do organizmu rośliny w trakcie migracji (Smant i in. 1997). Z drugiej strony wykazano jednak, że wydzielanie tych enzymów ustaje w momencie zaindukowania w jednej z komórek korzenia zmian programu genetycznego prowadzących do wytworzenia syncytium (Goellner i in. 2001). Praca Grundlera i in. (1998) wskazuje z kolei na zwiększoną produkcję endogennych celulaz roślinnych w miejscu tworzenia się otworów między sąsiednimi komórkami syncytium. Sugeruje to istotną rolę w tym procesie endogennych związków roślinnych związanych z przebudową i demontażem ściany komórkowej. Taka przebudowa lub rozpuszczanie ściany są istotą kilku procesów zachodzących w ontogenezie rośliny, takich jak wzrost wydłużeniowy (np. koleoptyli czy hypokotyli), wzrost objętościowy (zwiększanie objętości owoców), dojrzewanie owoców, tworzenie strefy odcinania w ogonkach liściowych i szypułkach owoców oraz wytwarzanie perforacji między sąsiednimi członami naczynia. W procesach tych uczestniczą w sposób skoordynowany substancje należące do kilku grup białek: endoglukanazy (celulazy), ekspansyny, egzoglukanazy, pektynazy, endotransglikozylazy ksyloglukanu, egzoglukanazy. Każdy z tych procesów ma swój charakterystyczny zestaw izoform związków z poszczególnych grup. Ekspresja wielu spośród tych substancji jest regulowana za pośrednictwem fitohormonów (Catala i in. 1997, Saab i Sachs 1996, Xu i in. 1995).

Celulazy czyli β -1,4-endoglukanazy to białka enzymatyczne, które przecinają łańcuch główny polisacharydów zbudowanych z reszt glukozy. Przypuszcza się, że

in vivo substratami tych enzymów są: hemiceluloza (ksyloglukan) i celuloza niekryształiczna opłaszczająca mikrofibryle celulozowe stanowiące szkielet ściany komórkowej. Zgodnie z przyjmowanymi aktualnie modelami budowy pierwotnej ściany komórkowej roślin dwuliściennych (Cosgrove 2001) łańcuchy hemicelulozy łączą pośrednio (lub bezpośrednio) mikrofibryle celulozowe. Stąd ksyloglukan uważany jest za główną strukturę przenoszącą naprężenia w ścianie. Endoglukanazy mające zdolność przecinania hemiceluloz są więc bardzo ważnym składnikiem kompleksu białek zaangażowanych w rozluźnianie i demontaż ściany. Badania nad celulazami są szczególnie zaawansowane w związku z ich udziałem w procesach wzrostu objętościowego, dojrzewania i mięknięcia owoców (Rose i Bennett 1999). U poszczególnych gatunków odkrywano coraz to nowe izoformy celulaz. Na przykład u pomidora znaleziono ich już osiem, a u modelowego rzodkiewnika — kilkanaście.

Celulazy są też z pewnością zaangażowane w inicjowanie i powiększanie otworów łączących sąsiednie komórki syncytium indukowanego przez nicienia. Ważne byłoby poznanie, które izoformy endoglukanaz biorą udział w tym procesie. W niniejszej pracy podjęto takie badania w układzie pasożytniczym: rzepak/mątwik burakowy. Ponieważ celulazy rzepaku są jak dotąd słabo poznane i brak dla nich specyficznych przeciwciał, w pracy wykorzystano przeciwciało przeciw celulazie 1 pomidora, w celu sprawdzenia udziału tej endoglukanazy w powstawaniu otworów w ścianach pomiędzy komórkami budującymi syncytium. Jak dotąd wykazano, że celulaza 1 pomidora gromadzi się w zwiększonych ilościach w strefie odcinania kwiatów i w czasie dojrzewania owoców pomidora (Lashbrook i in. 1994, Del Campillo i Bennett 1996, Gonzales-Bosch i in. 1996). Ponieważ dojrzewaniu i mięknięciu owoców towarzyszy degradacja ścian komórkowych, celulaza 1 pomidora wydaje się być dobrym kandydatem do specyficznego zestawu białek odpowiedzialnych za tworzenie otworów w syncytium.

Material i metody

Nasiona rzepaku ozimego *Brassica napus* var. *oleifera* odmian Bor i Kana sterylizowano w 70% etanolu i w 5% podchlorynie wapnia i podkiełkowano przez 72 godziny w ciemności na 0,5% sterylnym agarze. Siewki przeniesiono na sterylne podłoże zawierające zmodyfikowaną pożywkę mineralną 0,2 KNOP o pH 6,4, zestaloną 0,7% agarem, wzbogaconą 0,1% roztworem witamin Gamborg B5 i 2% sacharozą. Rośliny rosły w temperaturze 20–22°C i 16-godzinnym fotoperiodzie przy świetle o natężeniu 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Dziesięciodniowe rośliny inokulowano larwami inwazyjnymi (stadium rozwojowe J2) mątwika burakowego *Heterodera schachtii* i hodowano w takich samych warunkach. Pobierano fragmenty korzeni głównych i bocznych z syncytiami i żerującymi na nich larwami drugiego (J2) i trzeciego (J3) stadium.

Materiał utrwalano w mieszaninie 2% paraformaldehydu i 2,5% glutaraldehydu w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,9 przez 2,5 godziny w 4°C, przepłukiwano 4 × 15 minut 0,1 M buforem fosforanowym o pH 6,9, odwadniano w etanolu i zatapiano w żywicy akrylowej LR White. Polimeryzację przeprowadzano w temperaturze 36°C przez 72 godziny.

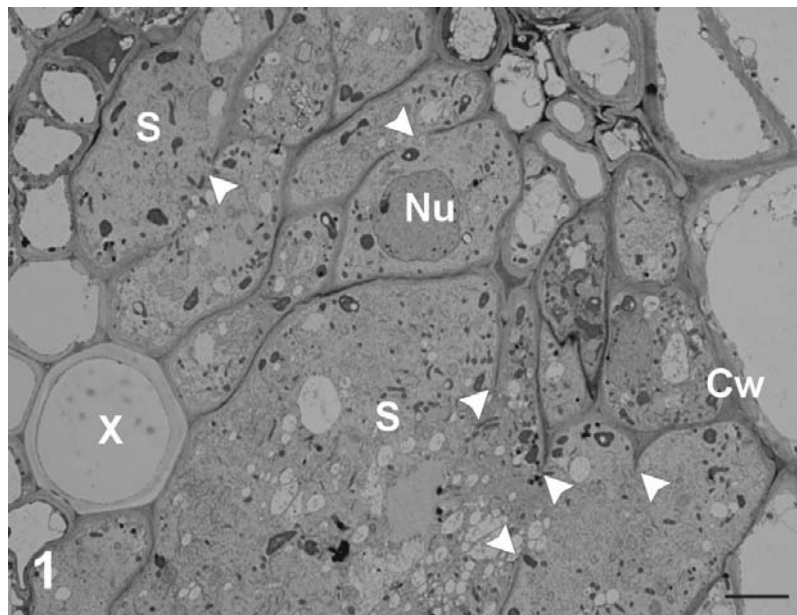
Wykonano ultracienkie skrawki, które zbierano na siatki nikłowe.

Celulazę lokalizowano immunocytochemicznie, stosując dwustopniowe znakowanie na siatkach („on grid”), zgodnie z procedurą opisaną przez Baluška (1999). W badaniach użyto poliklonalnych przeciwciał przeciwko celulazie 1 z pomidora (uzyskanych dzięki uprzejmości dr Ann Powell z University of California, Davis, USA). Wszystkie używane odczynniki dozowano w 50 µl kroplach na siatkę w temperaturze pokojowej. Blokowanie niespecyficznego epitopów (30 min.) przeprowadzono w buforze TBS (bufor Tris + 0,9% NaCl, pH 7,5) z dodatkiem 2% albuminy wołu (BSA bovine serum albumin) i 0,8% surowicy koziej (NGS normal goat serum). Następnie inkubowano materiał z I-rzędowym specyficznym przeciwciałem (1 godzina) i płukano w buforze TBS pH 7,5 z 2% BSA (4 × 15 minut). Do wizualizacji przeciwciał zastosowano II-rzędowe przeciwciała sprzężone ze złotem koloidalnym 20 nm, rozpuszczone w buforze TBS (pH 8,2) z 0,8% NGS i 2% BSA. Materiał płukano następnie w buforze TBS (pH 8,2) z NGS i BSA (4 × 15 minut), kontrastowano w 2% wodnym roztworze octanu uranylu (10 minut) i płukano w wodzie destylowanej (5 × 2 minuty). Analizę materiału przeprowadzono przy użyciu mikroskopu elektronowego JEM 100.

Wyniki i dyskusja

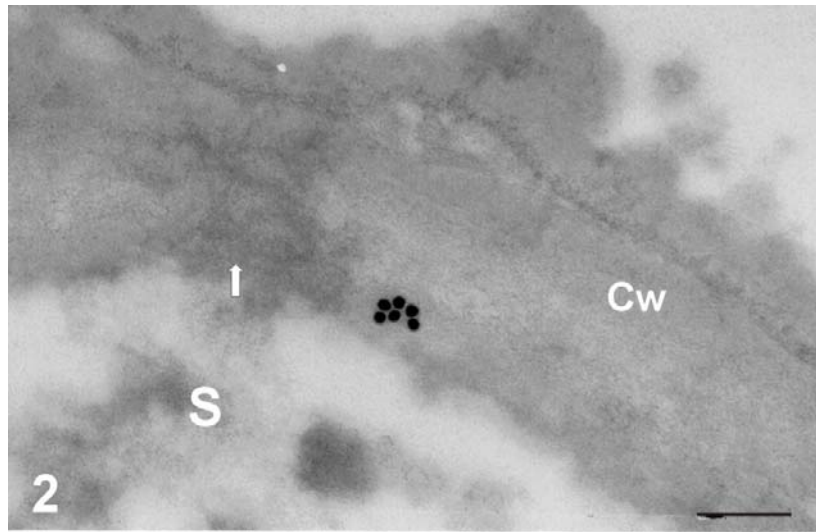
Syncytia odżywiający larwy w stadium J3 zajmują centralną część walca osiowego. Komórki do nich włączone ulegają hipertrofii, a ściany pomiędzy nimi ulegają rozpuczeniu (fot. 1). U rzepaku pierwsze takie otwory powstają w miejscu występowania plazmodesm. Po rozszerzeniu plazmodesmy następuje rozluźnienie struktury ściany komórkowej od strony komórki inicjalnej, a następnie jej rozpuszczenie. Kolejne otwory powstają już bez udziału plazmodesm. W sąsiedztwie rozpadającej się ściany komórkowej gromadzi się endoplazmatyczne retikulum i następuje rozluźnianie, a następnie rozpuszczanie ściany komórkowej z dwóch stron (Górecka 2002). Wykonane w niniejszej pracy eksperymenty pozwalają powiązać tę degradację ściany komórkowej z aktywnością celulaz. Zastosowane przeciwciała przeciw celulazie 1 z pomidora zlokalizowały celulazę w syncytiach obu badanych odmian rzepaku. Wiarygodność metody immunolokalizacji potwierdzono wykonując kontrolę negatywną. W tym celu w zastosowanej procedurze dokonano jednej zmiany: podano 1% roztwór BSA w miejsce I-rzędowego przeciwciała. Na tak potraktowanych skrawkach korzeni nie obserwowano żadnego

znakowania, co dowodzi, że przy zastosowaniu standardowego protokołu wykrywane są epitopy celulozy. W syncytiach odżywiających larwy stadium J3 białko to było obecne w pobliżu nowo powstających otworów w ścianach komórkowych (fot. 2 i 3). Również w miejscach, gdzie otwory te były starsze i znacznie powiększone, celuloza znajdowała się w pobliżu fragmentów ścian na obrzeżu otworu (fot. 4). Sugeruje to udział tej endoglukanazy w procesach hydrolizy ściany. Znakowanie przy użyciu złota koloidalnego wykazało też obecność celulozy w endoplazmatycznym retikulum i cytoplazmie syncytium (fot. 5), w tym — wewnątrz znajdujących się tam struktur pęcherzykowatych (fot. 6). Zgodne byłoby to z postulowanym miejscem syntezy celulaz — retikulum endoplazmatycznym i późniejszą drogą transportu — za pośrednictwem pęcherzyków w kierunku ściany komórkowej. Wykrycie celulozy w syncytiach indukowanych w korzeniach rzepaku przez mątwika burakowego jest zgodne z wynikami Goellner i in. (2001), którzy stosując metodę hybrydyzacji *in situ* stwierdzili podwyższony poziom transkryptów pięciu izoform endogennej endoglukanazy w syncytiach rozwijających się w korzeniach tytoniu inokulowanego mątwikiem *Globodera tabacum*.

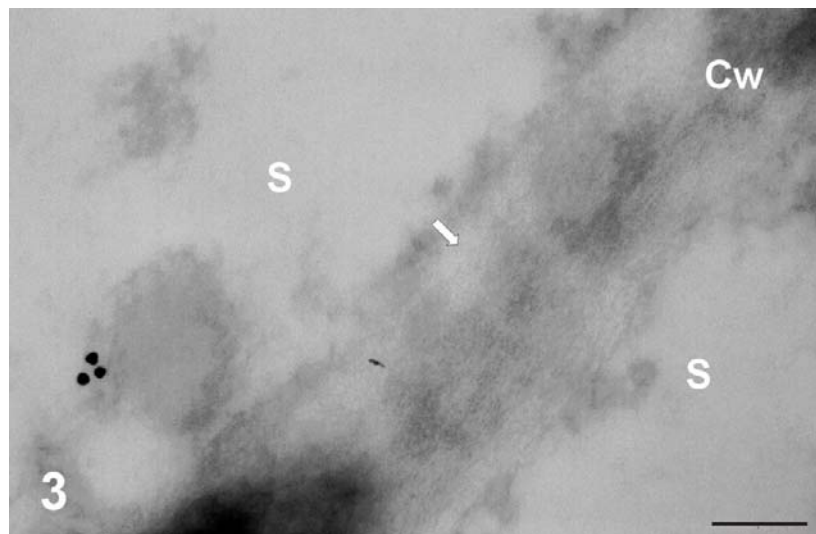


Groty strzałek — otwory w ścianach komórkowych, X — naczynie, S — syncytium, Nu — jądro komórkowe, Cw — ściana komórkowa — Arrow heads — cell wall openings, X — xylem, S — syncytium, Nu — nucleus, Cw — cell wall

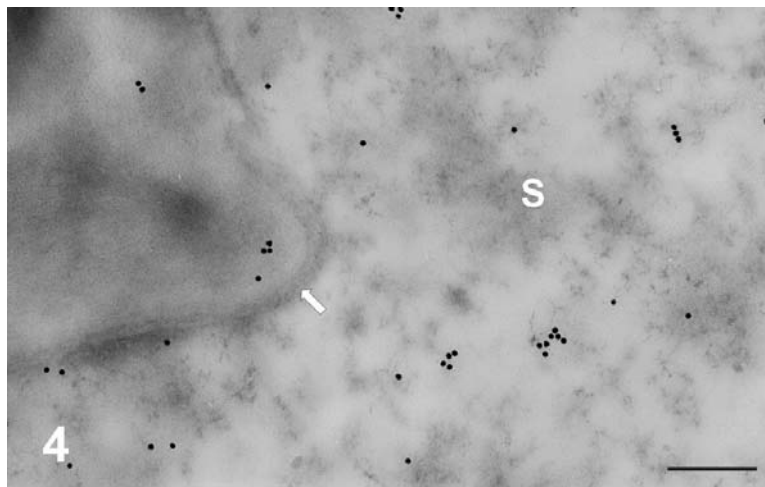
Fot. 1. Fragment syncytium zaindukowanego w pericyklu korzenia odmiany Bor z larwą w stadium J3 *Fragment of syncytium induced by juvenile (stage J3) of Heterodera schachtii in a pericycle in a root of oilseed rape cv. Bor. Bar — 4 μm*



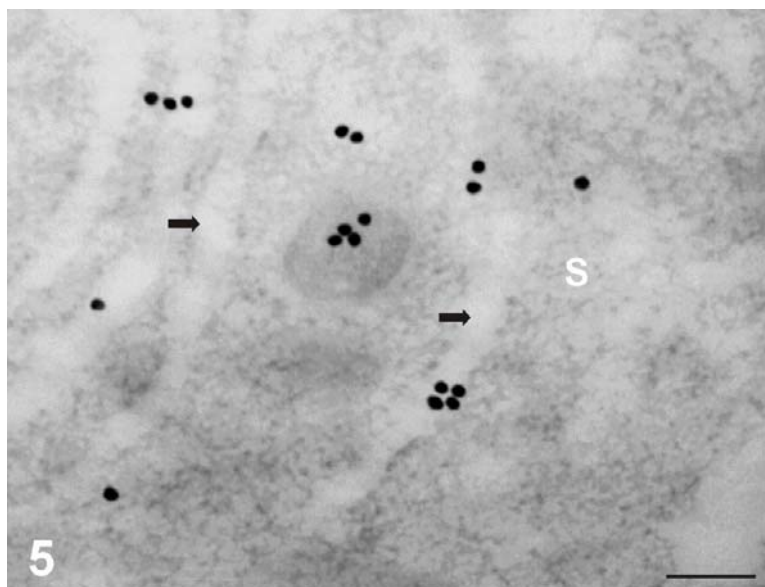
Fot. 2. Ziarna złota koloidalnego w pobliżu otworu (strzałka) powstającego w ścianie komórkowej (Cw). S — syncytium. Odmiana Kana — *Immunogold labeling of celulase 1 in a syncytium of a juvenile (stage J3) of H. schachtii in a root of oilseed rape cv. Kana. Particles of colloidal gold localise the protein of an emerging cell wall opening (arrow). Cw — cell wall, S — syncytium. Bar — 0,25 μm*



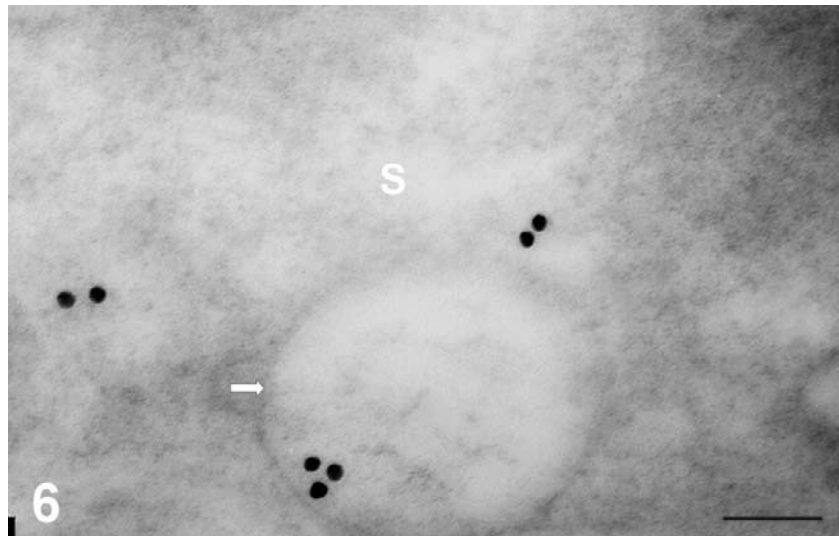
Fot. 3. Ziarna złota koloidalnego w pobliżu otworu (strzałka) powstającego w ścianie komórkowej (Cw). S — syncytium. Odmiana Bor — *Immunogold labeling of celulase 1 in a syncytium of a juvenile (stage J3) of H. schachtii in a root of oilseed rape cv. Bor. Particles of colloidal gold localise the protein of an emerging cell wall opening (arrow). Cw — cell wall, S — syncytium. Bar — 0,25 μm*



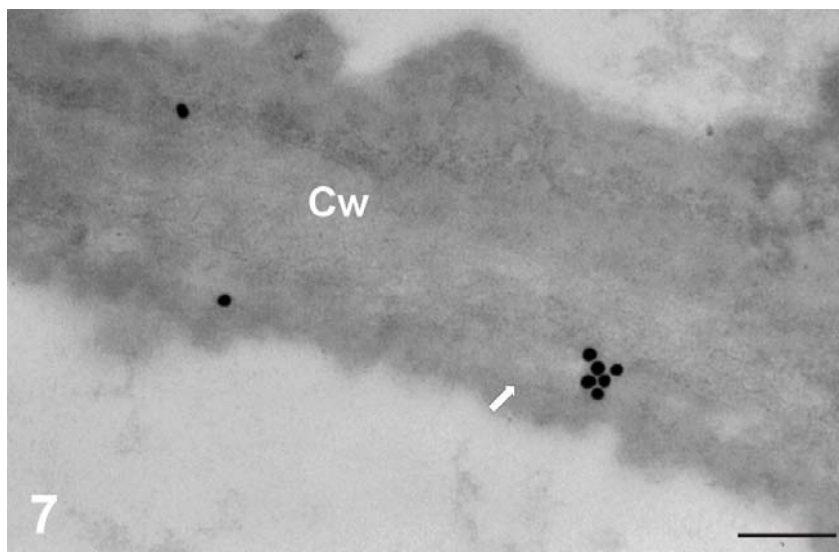
Fot. 4. Ziarna złota koloidalnego widoczne w cytoplazmie syncytium oraz obok fragmentu pozostałego po rozpuszczonej ścianie komórkowej (strzałka). S — syncytium. Odmiana Bor — *Immunogold labeling of celulase 1 in a syncytium of a juvenile (stage J3) of H. schachtii in a root of oilseed rape cv. Bor*. Particles of colloidal gold localise the protein to cytoplasm of the syncytium (S) and to vicinity of a cell wall fragment bordering a cell wall opening (arrow). Bar — 0,5 μm



Fot. 5. Ziarna złota koloidalnego widoczne w ER (strzałki) i cytoplazmie syncytium (S). Odmiana Kana — *Immunogold labeling of celulase 1 in a syncytium of a juvenile (stage J3) of H. schachtii in a root of oilseed rape cv. Kana*. Particles of colloidal gold localise the protein in cytoplasm and ER (arrows) of the syncytium (S). Bar — 0,25 μm



Fot. 6. Ziarna złota koloidalnego widoczne w cytoplazmie syncytium (S) i w pęcherzykach (strzałka). Odmiana Kana — *Immunogold labeling of celulase 1 in a syncytium of a juvenile (stage J3) of H. schachtii in a root of oilseed rape cv. Kana. Particles of colloidal gold localise the protein to cytoplasm of the syncytium (S) and to vesicles in it (arrow). Bar — 0,25 μ m.*



Fot. 7. Fragment komórki w powstającym korzeniu bocznym. Znakowanie widoczne w przyściennych warstwach cytoplazmy (strzałka). Cw — ściana komórkowa. Odmiana Bor — *Immunogold labeling of celulase 1 in cells of an emerging lateral root. Particles of colloidal gold localise the protein to paramural cytoplasm (arrow). Cw — cell wall. Bar — 0,25 μ m*

W sąsiedztwie rozwijających się w korzeniach rzepaku syncytiów często tworzą się liczne korzenie boczne. Zastosowana tu metoda immunocytochemiczna wskazuje na obecność celulazy również w przyściennej warstwie cytoplazmy komórek w strefie zawiązka takiego korzenia bocznego (fot. 7). Podobnie Goellner i in. (2001) obserwowali zwiększoną ilość mRNA endogennych celulaz tytoniu w zawiązkach korzeniach bocznych. Jak wiadomo, korzenie boczne powstają z perycyklu endogenicznie. W związku z tym rosnący zawiązek korzenia musi przebić się przez warstwę kory pierwotnej. Być może również w tym procesie występuje zlokalizowana przebudowa ścian komórkowych, co zmniejsza ich sztywność i ułatwia korzeniowi bocznemu przerośnięcie na zewnątrz.

W niniejszej pracy prowadzonej na materiale pochodzącym z rzepaku użyto poliklonalnych przeciwciał przeciw celulazie 1 pochodzącej z pomidora. Mimo to uzyskano znakowanie pozwalające zlokalizować endogluksanazę rzepaku. Może to wynikać z faktu, że w strukturze cząsteczek celulaz są regiony konserwatywne o wysokiej homologii sekwencji aminokwasów. Ta wysoka homologia może występować nie tylko w obrębie celulaz danego gatunku rośliny, ale również między endogluksanazami pochodzącymi z różnych roślin. Analizy sekwencji aminokwasowych pokazują, że w niektórych przypadkach ogólne podobieństwo między celulazami z dwóch różnych gatunków jest większe niż między celulazami z tej samej rośliny (Catala i in. 1997).

Przedstawione tu wyniki immunolokalizacji potwierdzają hipotezę, że celulaza jest zaangażowana w przebudowę apoplastu komórek włączanych do syncytium mątwika, a w szczególności — w powstawanie otworów w ścianach. Jest to proces bardzo istotny dla rozwoju mątwików, u których występuje epigenetyczna determinacja płci (Mugniery i Fayet 1981). Prace prowadzone na modelowym układzie *Arabidopsis thaliana* / *Heterodera schachtii* wykazały, że wielkość tych otworów decyduje o ilości pokarmu dostępnego dla larw i jest jednym z czynników determinujących płeć rozwijającego się pasożyta (Sobczak i in. 1996). Syncytia odżywiające samice charakteryzują się dużymi otworami, natomiast w syncytiach samców połączenia między protoplastami sąsiednich komórek są o wiele mniejsze. Z drugiej strony wiadomo, że rozwój samic na korzeniu rośliny-gospodarza powoduje znacznie większe straty plonu niż rozwój samców. Dlatego nematolodzy określają jako odporne te odmiany roślin, na których korzeniach rozwój samic jest znacznie ograniczony. Ponadto zmniejszenie liczby samic powoduje zmniejszenie populacji pasożyta w następnych pokoleniach i ograniczeniem strat w następnych sezonach wegetacyjnych. Wskazuje to na potencjalne drogi wytwarzania roślin odpornych na nicienie z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej. Można myśleć o skonstruowaniu roślin transgenicznych, które wykazywałyby specyficznie na terenie zaindukowanego syncytium obniżoną aktywność celulaz i/lub innych białek zaangażowanych w degradację ścian komórkowej. Wynikający z tego słaby rozwój otworów w ścianach syncytium zmniejszyłyby liczbę rozwijających się

samic. Można by do tego wykorzystać technikę antysens inaktywującą mRNA wybranych genów. Taką technikę zastosowano już w próbach wytworzenia transgenicznego pomidora o niemięknących dojrzałych owocach (Lashbrook i in. 1998, Brummel i in. 1999, Rose i Bennett 1999).

Trzeba jednak pamiętać, że modyfikacja apoplastu syncytium to wynik działania całego zestawu białek. Jednym z nich są celulazy, ale należą tu też inne czynniki z ekspansynami na czele. Dalsze badania w tym zakresie powinny więc z jednej strony dać bliższą charakterystykę zlokalizowanej w korzeniach rzepaku celulazy, a z drugiej — prowadzić do wykrycia innych izoform rzepakowej endoglukanazy oraz innych białek biorących udział w przebudowie apoplastu syncytium.

Podziękowanie

Pragniemy złożyć podziękowania dr Ann Powell z University of California, Davis, USA za dostarczenie przeciwciała przeciwko celulazie 1 pomidora.

Wnioski

- Przeciwciała przeciw celulazie 1 pomidora wykrywają celulazę rzepaku.
- Metodami immunocytochemicznymi wykazano obecność celulazy w syncytiach larw stadium J3 mątwika burakowego zaindukowanych w korzeniach rzepaku odmian Kana i Bor.
- Wyniki badań potwierdzają hipotezę, że celulaza jest zaangażowana w przebudowę apoplastu rozwijającego się syncytium.

Conclusions

- Antibodies against tomato cellulase 1 recognise molecules of cellulase in oilseed rape.
- Cellulase was immunolocalised in syncytia of juveniles (stage J3) of *H. schachtii* in roots of oilseed rape cv. Kana and Bor.
- The results prove the hypothesis that cellulase is involved in rearranging of apoplast in developing syncytia.

Literatura

- Baluška F., Šamaj J., Napier R., Volkmann D. 1999. Maize calreticulin localizes referentially to plasmodesmata in root apex. *The Plant Journal* 19: 481-488.
- Brummell D.A., Hall B.D., Bennett A.B. 1999. Antisense suppression of tomato endo-1,4- β -glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Molecular Biology* 40: 615-622.
- Catala C., Rose J.K.C., Bennett A.B. 1997. Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4- β -D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *The Plant Journal* 12: 417-426.
- Cosgrove D.J. 2001. Wall Structure and Wall Loosening. A Look Backwards and Forwards. *Plant Physiol.* 125: 131-134.
- Del Campillo E., Bennett A.B., 1996. Pedicel break strength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiol.* 111: 813-820.
- Goellner M., Wang X., Davis E. L. 2001. Endo- β -1,4-Glucanase Expression in Compatible Plant-Nematode Interactions. *Plant Cell* 13: 2241-2255.
- Golinowski W., Magnusson C. 1991 Tissue response induced by *Heterodera schachtii* (Nematoda) in susceptible and resistant white mustard cultivars. *Can. J. Bot.* 69: 53-62.
- Golinowski W., Grundler F.M.W., Sobczak M. 1996 Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* 194: 103-116.
- Gonzales-Bosch C., Brummell D.A., Bennett A.B. 1996. Differential expression of two endo- β -1,4-glucanase genes in pericarp and locules of wild-type and mutant tomato fruit. *Plant Physiol.* 111: 1313-1319.
- Górecka M. 2002. Histogeneza korzenia rzepaku *Brassica napus* w warunkach infekcji mątwikiem burakowym *Heterodera schachtii*. Rozprawa doktorska, SGGW, Warszawa.
- Grundler F.M.W., Sobczak M., Golinowski W. 1998. Formation of wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Europ. J. Plant Pathol.* 104: 545-551.
- Lashbrook C.C., Gonzales-Bosch C., Bennett A.B. 1994. Two divergent endo-1,4- β -glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell* 6: 1485-1493.
- Lashbrook C.C., Giovannoni J.J., Hall B.D., Fischer R.L., Bennett A.B. 1998. Transgenic analysis of tomato endo- β -1,4-glucanase gene function. Role of cell in floral abscission. *Plant Journal* 13: 303-310.
- Magnusson C., Golinowski W. 1991. Ultrastructural relationships of the developing syncytium induced by *Heterodera schachtii* (Nematoda) in root tissue of rape. *Can. J. Bot.* 69: 44-52.
- Mugniery D., Fayet G. 1981. Determination du sexe chez *Globodera pallida* Stone. *Rev. Nemat.* 4: 41-45.
- Rose J.K.C., Bennett A.B. 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* 4: 176-183.
- Saab I., Sachs M. 1996. A flooding-induced xyloglucan endotransglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. *Plant Physiol.* 112: 385-391.
- Smant G., Stokkermans J.P.W.G., Yan Y., De Boer J.M., Baum T.J., Wang X., Hussey R.S., Gommers F.J., Henrissat B., Davis E.L., Helder J., Schot A., Bakker J. 1998. Endogenous

- cellulases in animals: Isolation of β -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4906-4911.
- Sobczak M., Grundler F.M.W., Golinowski W. 1996. The structure of syncytia in *Arabidopsis thaliana* induced by *Heterodera schachtii* and its relevance to the sex of the nematode. Nematropica 26: 313.
- Sobczak M., Golinowski W., Grundler F.M.W. 1997. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* roots induced during development of males of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. Europ. J. Plant Pathol. 103: 113-124.
- Xu W., Purugganan M.M., Polisensky D.H., Antosiewicz D.M., Fry S.C., Braam J. 1995. Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. Plant Cell 7: 1555-1567.