



Czynniki chorobotwórcze w biologicznym zwalczaniu nicieni – szkodników roślin

Aleksandra Obrepalska-Stęplowska, Danuta Sosnowska
Instytut Ochrony Roślin, Poznań

Microorganisms in biological control of plant-parasitic nematodes

Summary

Nematodes are unsegmented roundworms that numerous and successfully adapted to all regions and environments on earth. The last ones were usually classified into feeding types: free-living, predaceous, and parasitic – including plant-parasitic. They are of great significance in terms of damage they cause. Plant-parasitic nematodes have been reported to be responsible for the losses amounting to over \$100 billion throughout the world. Because of the big difficulties in their eradication some of them are considered as quarantine species. The plant-parasitic nematodes are controlled using chemical methods – mainly chemical nematicides. However, because of many drawbacks including health and environmental concerns, other control methods are considered. One of them is biological control and application of antagonistic microorganisms to decrease densities of nematodes populations. Microbial antagonists parasitizing various developmental stages of their hosts may affect nematodes by secretion of antibiotics, toxins and other secondary metabolites. The most important virulence factors are extracellular enzymes that participate in destroying the nematodes' cuticle or the egg-shell or in further phases of infection.

This publication presents the examples of microorganisms investigated in terms of biological control, those that are already available commercially as well as some mechanisms involved in nematode-microbes interactions.

Key words:

plant-parasitic nematodes, microorganisms, antagonistic interactions.

Adres do korespondencji

Aleksandra
Obrepalska-Stęplowska,
Międzyzakładowa
Pracownia Biologii
Molekularnej,
Instytut Ochrony Roślin,
ul. Władysława Węgorka 20,
60-318 Poznań;
e-mail:
ao.steplovska@ior.poznan.pl

1. Wstęp

Nicień (Nematoda) z gromady obleńców stanowią jedną z najliczniejszych grup zwierząt wielokomórkowych żyjących w glebie. Są zdolne do aktywnej migracji w ryzosferze, niektóre również na naziemnych częściach i wewnątrz rośliny. Jednakże największe znaczenie gospodarcze mają nicienie pasożytujące na korzeniach. Nicień pasożytujące na roślinach powodują bardzo duże szkody w uprawach sięgające nawet do 125 miliardów dolarów rocznie na całym świecie (1), przez co znajdują się na drugim miejscu pod względem wielkości strat po grzybach, a przed bakteriami i wirusami. Szczególnie szkodliwe są guzaki korzeniowe (*Meloidogyne* spp.) mogące żerować na ponad 3000 gatunków roślin i powodować straty plonu dochodzące do 21% (2). Większość z tych gatunków powoduje mechaniczne uszkodzenia korzeni i galasy prowadzące często do ogólnego niedorozwoju rośliny. Bardzo szkodliwe dla roślin są wydzielane przez nicienie enzymy hydrolityczne, którymi trawią częściowo pokarm i rozpuszczają ściany komórek roślinnych, co ułatwia im przemieszczanie się w tkance. Zniszczeniu ulegają komórki roślin i przez to obumierają całe tkanki, a nawet organy roślin. Pośrednia szkodliwość nicieni wynika z tego, że są wektorami fitopatogennych wirusów, grzybów i bakterii. Wektorami wirusów roślin są nicienie długacze (*Longideridae*), czyli ektopasożyty wędrowne atakujące korzenie wyłącznie zewnątrz. Aż 16 gatunków należących do tej rodziny nicieni przenosi wirusy roślinne, np. *L. attenuatus* jest wektorem wirusa czarnej plamistości pomidora (TBRV) (2). Jednak głównie te gatunki są wektorami wirusów w sadach i na plantacjach truskawek. Gatunek nicienia *Xipinema index* był w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku cytowany jako pierwszy gatunek nicienia będący wektorem nepowirusa na winoroślach (ang. *grapevine fanleaf nepovirus*) (2). Bardzo duże starty w plonach roślin uprawnych powodują mątwiki, wśród nich mątwik burakowy (*Heterodera schachtii*) oraz znajdujące się na liście organizmów kwarantannowych – mątwiki ziemniaczane (*Globodera* spp.). Ograniczanie populacji nicieni jest bardzo trudne ze względu na środowisko glebowe, w którym żyją, a które chroni je przed różnymi zabiegami.

Do ich ograniczania stosuje się chemiczne środki ochrony roślin – nematocydy. Jednak ich częste stosowanie zanieczyszcza środowisko glebowe. Dlatego znaczenia nabierają metody alternatywne, jak płodozmian, uprawa roślin obojętnych lub wrogich, wczesny wysiew i uprawa roślin odpornych. Od wielu lat poszukuje się chorobotwórczych dla nicieni mikroorganizmów, które mogą uzupełnić wymienione metody. Wiadomo, że w warunkach naturalnych ogromną rolę w ograniczaniu populacji nicieni – szkodników roślin odgrywają grzyby i bakterie nicieniobójcze (3-5). Spośród dużej liczby gatunków chorobotwórczych dla nicieni w praktyce zastosowanie w formie biopreparatów znalazło tylko kilka. Są to głównie grzyby pasożytujące względem jaj i samicy nicieni, a także wytwarzane przez nie toksyny oraz bakterie. Przyczyn takiej sytuacji jest wiele. Między innymi ich różna skuteczność, uzależnienie od warunków środowiska i różnorodność wśród szczepów jednego gatunku grzyba.

Publikacja ta pozwoli przybliżyć znaczenie metody biologicznej w ograniczaniu populacji fitofagicznych nicieni oraz wyjaśnić procesy zachodzące pomiędzy patogenami, nicieniami i roślinami, a także mechanizmy ich działania. Poznanie podstaw biochemicznych i multitroficznych interakcji antagonistycznych nicieni-mikroorganizm, będzie miało w przyszłości duże znaczenie dla produkcji biopreparatów nicieniobójczych.

2. Biologiczne zwalczanie i mechanizmy działania gatunków antagonistycznych

Metoda biologiczna polega na wykorzystaniu naturalnych zjawisk zachodzących w środowisku pomiędzy organizmami żywymi, głównie pasożytnictwa i drapieżnictwa, do ograniczenia liczebności danego szkodnika lub zmniejszenia jego szkodliwości. W metodzie tej wykorzystuje się również zjawisko antagonizmu występujące pomiędzy organizmami oraz współzawodnictwo.

Interakcja antagonistów i nicieni może mieć charakter bezpośredni lub pośredni. Mechanizm bezpośredni dotyczy wspomnianego hamowania rozwoju nicieni poprzez ich wykluczenie na drodze współzawodnictwa, produkcję substancji toksycznych lub ograniczających ich występowanie czy przez bezpośrednie ograniczenie nicieni na drodze pasożytnictwa. Z oddziaływaniem pośrednim mamy do czynienia, gdy obecność mikroorganizmów antagonistycznych powoduje wzrost odporności rośliny, na której pasożytuje dany gatunek nicienia lub zmiany w mikrośrodowisku nicienia – w taki sposób, że zawartość składników mineralnych, jak również innych – nieantagonistycznych mikroorganizmów się zmienia, powodując zmniejszenie liczebności tego nicienia. W naturze wiele spośród wymienionych mechanizmów jest często wykorzystywanych przez ten sam antagonistyczny gatunek (6).

3. Mikroorganizmy antagonistyczne w stosunku do nicieni

Do antagonistów nicieni należą grzyby endofityczne, grzyby nicieniobójcze (w tym grzyby drapieżne, endopasożyty, pasożyty jaj i cyst oraz grzyby produkujące toksyny), i bakterie (*Actinomycetes*, bakterie ryzosferowe, bakterie endofityczne, ryzobia, bakterie z rodzaju *Pasteuria*).

3.1. Grzyby endofityczne

Grzyby te występują wewnątrz tkanek roślinnych. Do tej pory poznano niewiele gatunków należących do tej grupy. Należą do nich m.in. *Fusarium oxysporum*, *Melanconium betulinum*, *Phomopsis phaseoli* (7,8). Obecność tych organizmów wpływa

stymulująco na wzrost roślin i hamuje choroby (9). Ich obecność zwiększa odporność roślin poprzez wzrost ich tolerancji, pobierania i przyswajania składników mineralnych i hamowanie inwazji nicieni (10,11).

3.2. Grzyby nicieniobójcze

Grzyby te mają zdolność do pasożytowania lub paraliżowania nicieni (12,13). W zależności od sposobu infekowania, grzyby nicieniobójcze podzielono na następujące grupy:

– grzyby drapieżne, posiadają one struktury chwytne lub stanowiące pułapki, takie jak adhezyjne (przyczepne) guzki, sieci, odgałęzienia lub pierścienie zaciskające (14,15). Ich oddziaływanie z gospodarzem nie są gatunkowo specyficzne. Grzyby te mogą również produkować toksyny paraliżujące ofiary (12). Mogą również żyć saprofitycznie w glebie. Do tej grupy należą m.in. grzyby z rodzaju *Arthrobotrys* (15);

– endopasożyty, czyli organizmy żyjące wewnątrz ciała ofiary – infekują nicienie za pomocą spor. Wiele z nich jest pasożytami bezwzględnie żyjącymi wewnątrz nicienia i produkującymi spory na zewnątrz jego ciała. Mają większą specyficzność w stosunku do gospodarza niż poprzednia grupa (16). Endopasożyty w zależności od stadium rozwojowego nicienia, na którym pasożytują, dzielą się na cztery podgrupy:

a) Pasożyty stadiów larwalnych nicieni np. *Hirsutella rhossiliensis*. Ich spory są zwykle adhezyjne i przyczepiają się do kutikuli, a następnie kiełkują do wnętrza ciała nicienia asymilując jego zawartość przed zarodnikowaniem (16).

b) Pasożyty osiadłych samic: mogą być pasożytami obligatoryjnymi, np. grzyb *Nematophthora gynophilia* patogen *Heterodera avenae* lub fakultatywnymi, np. grzyb *Pochonia chlamydosporia* również pasożytujący na *Heterodera* (4,5). Są również fakultatywnymi saprofitami glebowymi.

c) Pasożyty jaj, np. *P. chlamydosporia* i *Paecilomyces lilacinus*. Stadium infekcyjnym *P. chlamydosporia* jest chlamydospora, która w odpowiednich warunkach, po dostaniu się na powierzchnię jaja nicienia, zaczyna wytwarzać enzymy rozpuszczające osłonkę jajową i za pomocą specjalnej strzępki infekcyjnej zwanej appressorium (przycistka, zgrubiałego fragmentu grzybni, którym grzyb przytwierdza się do podłoża w początkowej fazie infekcji) wnika do jego wnętrza. Zawartość jaja jest wchłaniana i po pewnym czasie zamiast larwy wypełnia je grzybnia (17). Grzyb atakuje tylko niedojrzałe jaja nicieni. Podobny sposób pasożytowania posiada *P. lilacinus*, z tym że jego stadium infekcyjnym są konidia elipsoidalnego kształtu. U większości tych grzybów stwierdzono aktywność chitynolityczną. Chityna stanowi większą część osłonki jaja, natomiast nie wchodzi w skład kutikuli larwalnej (rys. 1) (18). Gatunki tych grzybów są pasożytami jaj nicieni i porażają zarówno mątwiki jak i guzaki. Szczególnie skutecznie infekują jaja guzaków, które dorosłe samice składają do galaretowatych woreczków złożonych przez samicę do gleby lub do wnętrza tkanki

korzenia lub też na zewnątrz. To wilgotne galaretowate podłoże złóż jajowych nicienia może być pożywką dla grzybów pasożytniczych, a ogromna liczba jaj w złożu jajowym (do 400) jest dostępna i dogodna dla rozprzestrzeniania się grzybni. W przypadku nicieni tworzących cysty droga infekcji przez te grzyby jest inna. Jaja nicienia znajdują się wewnątrz cysty w glebie i patogen musi najpierw przedostać się przez jej naturalne otwory, aby je zainfekować. Grzyby te mogą również rozwiąć się na powierzchni cysty jako saprofity.

d) Pasożyty jaj, samic i larw. Wiele gatunków grzybów, które głównie pasożytuje na danym stadium rozwojowym (tylko jaja lub tylko samice) może okazjonalnie atakować inne stadia u tego nicienia (np. samice). Nie są one jednak w równym stopniu efektywne w pasożytowaniu na wszystkich stadiach w warunkach naturalnych.

3.3. Bakterie

– *Actinomycetes*, szczególne znaczenie w aspekcie biologicznego zwalczania mają przedstawiciele rodzaju *Streptomyces*, np. *Streptomyces avermitilis* produkuje makrocykliczne laktony (awermektyny), które posiadają aktywność nicieniobójczą i są używane w preparatach do zwalczania nicieni (19).

– Bakterie ryzosfery, występują obficie w ryzosferze i mogą ją istotnie modyfikować, wpływając w ten sposób na oddziaływanie nicieni z ich gospodarzami roślinnymi (20). Niektóre z nich, np. *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus* spp., czy *Pseudomonas* spp. są antagonistami bakterii i grzybów wywołujących choroby roślin i są określane jako tzw. bakterie ryzosfery stymulujące wzrost roślin (PGPR, ang. *plant growth promoting rhizobacteria*) (21,22). Hamują one też rozwój guzaków korzeniowych (*Meloidogyne* spp.) poprzez ograniczenie ich rozmnażania, jak i rozwoju ich larw (20,22-24).

– Bakterie endofityczne, występują w różnych tkankach wielu roślin wyższych. Należą do nich m.in. *Kocaria varians* i *Microbacterium esteroromaticum*, będące antagonistami nicieni z rodzaju *Pratylenchus*, hamującymi ich rozmnażanie (25).

– Rizobia, bakterie glebowe wchodzące w symbiotyczne interakcje z roślinami motylkowatymi. Mają duże znaczenie dla środowiska, gdyż są odpowiedzialne za wiązanie azotu atmosferycznego. Chronią uprawy przed wieloma patogenami grzybowymi, a także przed guzakami korzeniowymi, zmniejszając przeżywalność ich larw w glebie (26).

– Bakterie z rodzaju *Pasteuria*, należą do najczęściej stosowanych w praktyce do ograniczania populacji nicieni-szkodników roślin (zwłaszcza gatunek *Pasteuria penetrans*) (27). Te Gram-dodatnie bakterie tworzące endospory są obligatoryjnymi pasożytami nicieni, rozwijającymi się preferencyjnie na ich organach rozrodczych, powodując hamowanie rozmnażania nicieni (28). Natura interakcji *Pasteuria*-nicieni jest wysoko specyficzna gatunkowo, a nawet populacyjnie. Zależy również od stadium rozwojowego żywiciela (29). *Pasteuria* pasożytuje wyłącznie na stadium młodocianym J2 (30). Dotychczas opisano trzy gatunki pasożytujące na nicieniach:

Pasteuria penetrans na *Meloidogyne* spp., *P. thornei* na *Pratylenchus* spp., i *P. nishizawae* na nicieniach tworzących cysty należących do rodzajów *Heterodera* i *Globodera* spp. (31).

4. Podstawy biochemiczne antagonizmu nicieni – mikroorganizm

Mikroorganizmy antagonistyczne w stosunku do nicieni pasożytujących na roślinach wykorzystują mechanizmy biochemiczne negatywnie wpływające na fizjologię ich gospodarzy. Należą do nich: produkcja toksycznych metabolitów, produkcja metabolitów stymulujących wykluwanie, zmieniających fizjologię nicienia czy zmniejszających pasożytnicze właściwości gospodarza w infekowaniu roślin (19). Metabolity te można podzielić na dwie grupy: inhibitory i stymulatory.

– Inhibitory, należą do nich toksyny, antybiotyki i metabolity wtórne produkowane przez antagonistów. Toksyczne związki są syntetyzowane przez większość bakterii: np. *Clostridium butyricum* produkuje mieszaninę kwasów: mrówkowego, octowego, propionowego i masłowego, które są toksyczne dla nicienia *Tylenchorhynchus martini* (32). Z kolei *Desulfovibrio desulfuricans* może uwalniać siarkowodór, co jest wykorzystywane w zalewanych polach ryżowych do biologicznego zwalczania nicieni (33). *Streptomyces avermitilis* (*Actinomycetes*) produkuje makrocykliczne laktony (awermektyny) o szerokim zakresie działania nicieniobójczego (34).

Wiele grzybów również produkuje antybiotyki lub substancje o działaniu nicieniobójczym. Metabolity te mogą zmieniać strukturę osłonki jaja, hamować rozwój embrionalny i powodować zaburzenia fizjologiczne (35). Niektóre z inhibitorów produkowanych przez grzyby zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1

Enzymy i metabolity wtórne produkowane przez grzyby nicieniobójcze

Grzyby	Substancja czynna	Działanie i gospodarz
<i>Omphalotus olearius</i>	omfalotyna A	nicieniobójcze, guzaki korzeniowe
endofity kostrzewy trzcinowatej <i>Festuca arundinacea</i>	alkaloidy lolinowe, piropolirazina, kwasy organiczne	redukcją żywotność nicieni roślinnych, <i>Pratylenchus</i> sp.
<i>Fusarium oxysporum</i>	metabolity wtórne	redukcją żywotność <i>M. incognita</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	kwas <i>trans</i> -2-dekenodikarboksyłowy	nicieniobójcze, <i>Panagrellus</i> sp., <i>M. arenaria</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	kwas octowy	nicieniobójcze, guzaki korzeniowe
<i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>A. chlamydosporia</i>	kwas linolowy	nicieniobójcze, <i>Bursaphelenchus</i> sp., <i>Panagrellus</i> sp.
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	proteazy	osłonka jajowa; <i>M. incognita</i>

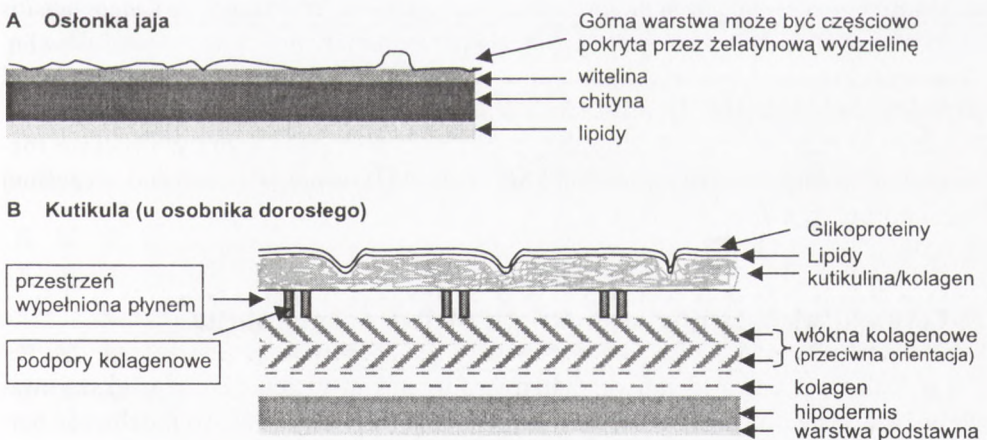
Tabela opracowana na podstawie informacji zawartych w (35).

– Stymulatory, substancje, które mogą indukować przedwczesne wyklucie się larw z jaj, co upośledza aktywność nicienia w procesie infekcji gospodarzy. Mogą one również mieć wpływ na przepuszczalność osłonki jajowej, indukować ruch larw w jajach, powodować sekrecję enzymów, które mogą rozpuszczać osłonkę jajową przez zemulsyfikowanie jej warstwy lipidowej (18).

5. Interakcje nicieni – antagonista

Proces infekcji nicieni przez antagonistyczne mikroorganizmy jest słabo poznany. Uważa się, że większość mechanizmów wykorzystywanych w tym procesie przez bakterie i grzyby jest podobna. Stwierdzono nawet, że żaden z poznanych mechanizmów infekcji nie jest wykorzystywany wyłącznie przez bakterie lub wyłącznie przez grzyby (6). Jednakże istnieją dość znaczne różnice na etapie rozpoznania i interakcji z gospodarzem. W dużej mierze zależą one od struktury, którą posługuje się dany mikroorganizm w celu zainfekowania nicienia: mogą to być adhezyjne spory, które kiełkując na powierzchni ciała nicienia wnikają do jego wnętrza za pomocą specjalnego wyrostka zwanego appressorium (przycistka, zgrubiałego fragmentu grzybni) (36).

Bardzo duże znaczenie ma również stadium rozwojowe nicienia, które ulega infekcji, gdyż od niego zależy jaką pierwszą barierę będzie miał do pokonania mikroorganizm – osłonkę jajową czy kutikulę. Od składu chemicznego tej bariery zależy, w jaki sposób i za pomocą jakich enzymów będzie ona pokonana. W przypadku jaj, ich osłonka w dużej mierze zbudowana jest z chityny. Tak np., grzyb *P. chlamydozporia* dzięki odpowiednim enzymom chitynolitycznym może rozpuścić warstwę chityno-



Rys. 1. Struktura i warstwy A) osłonki jajowej oraz B) przykładowej kutikuli osobnika dorosłego – wg www.wormatlas.org, zmodyfikowane.

wą jaja i wnikać do jego wnętrza (37). Z kolei wszystkie pozostałe stadia jej nie posiadają, a w to miejsce pojawiają się włókna kolagenowe (38). Struktura kolagenu, jak również jej skład zależy także od stadium rozwojowego. Większość kolagenów u stadiów larwalnych (J) jest glikozylowana, w przeciwieństwie do stadiów dorosłych (39). Struktura kutikuli jest również różna u różnych gatunków nicieni. Przykładowy schemat przedstawiający warstwy w osłonce jaja oraz w kutikuli przedstawiono na rysunku 1. Najlepiej poznanym przykładem pierwszego etapu interakcji antagonistycznych nicieni-mikroorganizm jest proces rozpoznania w infekcji nicieni z rodzaju *Meloidogyne* przez bakterię *Pasteuria*, ale również on nie jest dobrze wyjaśniony.

Powierzchnia spor bakteryjnych pokryta jest adhezynami, których natura nie jest poznana (40). Biorą one udział w interakcjach z receptorem na powierzchni nicieni. Powierzchnia spory jest bardzo heterogenna. W wyniku przeprowadzonych badań z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych wskazuje się na udział w procesie interakcji szeregu epitopów, których dystrybucja na powierzchni spory różni się nawet pomiędzy populacjami *Pasteuria* (41). Adhezyny różnią się zarówno konformacją, jak i specyficznością gatunkową (41). Na podstawie badań fizjochemicznych wskazuje się, że w wiązaniu spory do kutikuli nicienia odgrywają rolę oddziaływania hydrofobowe (42). W jednej z hipotez mówi się o udziale fibronektyny w rozpoznaniu spora bakteryjna – kutikula nicienia (43). Fibronektyna jest zewnątrzkomórkową glikoproteiną obecną w formie rozpuszczalnej (osocze) lub nierozpuszczalnej (macierze zewnątrzkomórkowe) u wielu zwierząt (44). Odgrywa ważną rolę w patogeniezie wielu bakterii (45). Fibronektyna posiada w strukturze trzy moduły: Fn1, Fn2 i Fn3, które razem tworzą domeny zawierające miejsca wiązania różnych części, w tym domenę wiązania żelatyny (zdenaturowany kolagen) (GBD, ang. *gelatin binding domain*) czy heparyny (HBD, ang. *heparine binding domain*) (46). Potraktowanie endospor *Pasteuria* fragmentami białka zawierającymi HBD lub GBD redukowało liczbę spor związanych do kutikuli *Meloidogyne* (43). Wykazano, że *Ceanorhabditis elegans* oraz *Meloidogyne incognita* posiadają heterodimery podobne do modułów Fn. Znalezione również wiele polipeptydów w zewnątrzkomórkowej macierzy nicieni rozpoznawanych przez przeciwciała poliklonalne dla ludzkiej fibronektyny (47). Prawdopodobny jest też udział glikoprotein na powierzchni spory w procesie rozpoznania. Wydaje się, że są to O-glikoproteiny (41), a nie jak uważano wcześniej N-glikoproteiny (40).

6. Czynniki wirulencji w interakcjach nicieni – antagonisty

W badaniach nad oddziaływaniami mikroorganizmy-nicień coraz większą uwagę poświęca się podstawom biochemicznym tych interakcji. Daje to możliwość bardziej dogłębnego zrozumienia zachodzących procesów, a poznanie natury wirulencji u omawianych mikroorganizmów jest podstawą do opracowywania nowych tech-

nologii ochrony roślin przy wykorzystaniu nicieniobójczych substancji produkowanych przez bakterie i grzyby.

Za główne czynniki wirulencji w procesie infekcji uważane są enzymy zewnątrzkomórkowe, w tym proteazy, chitynazy i kolagenazy – odpowiadające chemicznym składnikom kutikuli i osłonki jaja nicieni. Enzymy te są zaangażowane w proces infekcji i prawdopodobnie biorą udział w wielu jego etapach, takich jak penetracja (połączenie uszkodzenia mechanicznego i aktywności hydrolitycznej enzymów), trawienie wewnętrznych tkanek gospodarza, proces uwalniania toksyn (48). Enzymy wielu mikroorganizmów zaangażowane w infekcję nicieni pasożytujących na roślinach były izolowane, kodujące je geny sekwencjonowane, porównywane i charakteryzowane (41,49-51).

6.1. Proteazy

Proteazy należą do najszerzej analizowanych czynników wirulencji w procesie infekcji nicieni przez mikroorganizmy. Wyizolowane z wielu grzybów i bakterii są głównie proteazami serynowymi (37). Mają wysoki stopień podobieństwa do proteazy K należącej do rodziny proteaz serynowych subtylizynopodobnych izolowanych z grzybów i bakterii Gram-ujemnych. Proteazy te mają konserwatywną triadę aminokwasową: kwas asparaginowy-histydyna-seryna oraz konserwatywne domeny wiążące substrat posiadające serynę. Masa cząsteczkowa takich proteaz izolowanych z grzybów pasożytujących na jajach oraz endopasożytów wynosi 32-33 kDa, natomiast u grzybów drapieżnych 35-39 kDa (52,53). Proteazy te wpływają również na liczbę organów pułpkowych (u odpowiedniej grupy grzybów), mogą stymulować ich tworzenie, a także trawić tkanki nicieni zapewniając pożywkę dla rozwoju struktur infekcyjnych grzyba (54).

Poznane proteazy mają relatywnie dużą specyficzność substratową oraz wysoki poziom homologii na N-końcu sekwencji, zwłaszcza u grzybów nicieniobójczych (rys. 2). Do najlepiej scharakteryzowanych należą:

S	V	T	D	Q	Q	G	A	D	W	G	L	A	R	I	S	H	R	E	HnspI
A	I	V	E	Q	Q	G	A	P	W	G	L	G	R	I	S	N	R	Q	VCP1
	A	T	Q	S	N	A	P	W	G	L								Pr1C	
T	Y	A	E	Q	T	D	S	T	W	G	L	D	R	I	S	H	E	D	PII/Aoz1
I	N	A	E	Q	L	D	S	T	W	G	L	D	R	I	S	H	E	N	MIx

Rys. 2. Porównanie N-końca sekwencji aminokwasowej wybranych proteaz serynowych (wg 48, zmodyfikowane).

– Proteaza PII, wyizolowana z grzyba *Arthrobotrys oligospora*, ma masę cząsteczkową ok. 35 kDa i optimum aktywności pomiędzy pH 7 a 9. Podobnie jak proteaza Aoz1 (również z *A. oligospora*), Mlx z *Monacrosporium microscaphoides* oraz Pr1C z *Clonostacys rosea* unieruchamia wolno żyjące nicienie i hydrolizuje białka ich kutikuli (52). Wykazuje wysoką aktywność hydrolityczną w stosunku do takich substratów jak: albuminy surowicy, żelatyna, zdenaturowana kazeina i kolagen, a nawet całe preparaty kutikuli nicieni. W stosunku do natywnego kolagenu wykazuje natomiast ograniczoną aktywność (55). W doświadczeniach prowadzonych przez Ahman i wsp. (54) przygotowano kilka mutantów PII, w tym mutanty z delecją genu PII oraz z jego nadekspresją. W badaniach wykazano, że delecja genu PII miała tylko nieznaczny wpływ na patogeniczność grzyba, natomiast nadekspresja znacząco zwiększała zdolność zmutowanych grzybów do zabijania nicieni (54).

– Proteaza VCP1, wyizolowana z grzyba *Pochonia chlamydosporia* jest alkaliczną proteazą serynową funkcjonalnie i serologicznie podobną do proteazy PR1 z *Metarhizium anisopliae* (najczęściej stosowany grzyb owadobójczy, który syntetyzuje tę proteazę, a jego transformanty z wieloma kopiami PR1 mają znacznie podwyższoną wirulencję (56). Proteaza ta usuwa zewnętrzną witelinową warstwę z jaj nicieni eksponując warstwę chitynową. Proteaza VCP1 występuje w dwóch izoformach wyizolowanych z dwóch grup nicieni: tworzących cysty oraz guzaków korzeniowych (49). Izoformy te różnią się pomiędzy sobą dwoma aminokwasami w pozycjach 65 (Glu lub Gln) oraz 99 (Gly lub Ala) (54). Różnice te mogą być odpowiedzialne za odmienne właściwości enzymu, przyczyniając się do różnych preferencji w infekowaniu gospodarza. Substytucja Glu-Gln może zmienić ładunek enzymu zachowując jego strukturę, natomiast polimorfizm Gly/Ala występuje w rejonie wiążącym substrat. Różnica w wielkości reszty aminokwasowej może w tym przypadku znacząco wpłynąć na aktywność enzymu. VCP1 w przeciwieństwie do proteaz uzyskanych z *M. anisopliae* oraz *A. oligospora* nie posiada potencjalnych miejsc N-glikozytacji (49).

– Proteaza Hnspl, jest neutralną zewnątrzkomórkową proteazą serynową, o masie cząsteczkowej ok. 32 kDa. Została wyizolowana z izolatu OWT1 grzyba *Hirsutella rhossiliensis*, pasożyta mątwika sojowego. Wykazuje stabilną aktywność w przedziale pH pomiędzy 6 a 8. Należy do chymotrypsynowych/subtylizynowych proteaz serynowych (50).

– Proteazy BLG4 i NPE-4, są jednymi z nielicznych proteaz bakteryjnych scharakteryzowanych do tej pory. Zostały wyizolowane z *Brevibacillus laterosporus* (48,51). Za większość aktywności nicieniobójczych tej bakterii odpowiada zewnątrzkomórkowa alkaliczna proteaza BLG4, niszcząca kutikulę gospodarzy *B. laterosporus*, którymi mogą być: *H. glycines*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Bursaphelenchus xylophilus* i saprofityczny nicieniec *Panagrellus redivivus*. Szczepy pozbawione tej proteazy wykazywały tylko 43% swoich zdolności nicieniobójczych (57). Za pozostałą aktywność odpowiada proteaza NPE-4. Jednakże sama oczyszczona proteaza NPE-4 wykazywała małą aktywność nicieniobójczą *in vitro* i nie była w stanie indukować degradacji nie naruszonej kutikuli gospodarza. Natomiast znacząco zwiększała patogeniczność

dzikiego szczepu *B. laterosporus* posiadającego proteazę BLG4. Nasunęło to wniosek, że te dwie bakteryjne proteazy zewnątrzkomórkowe mogą odgrywać inną rolę na różnych etapach infekcji lub wspólną rolę w penetracji kutikuli nicienia przez *B. laterosporus* (51).

6.2. Chitynazy

Chitynazy hydrolizują chitynę i uczestniczą w procesie penetracji nicieni. Są enzymami indukowanymi i pełnią ważną rolę stymulującą w procesie wzrostu strzępek grzyba (58). Prawdopodobnie uczestniczą też w degradacji osłonek jaj nicieni (59). Odnotowano, że proporcja zainfekowanych jaj nicieni wzrastała wraz ze zwiększeniem aktywności chitynazowej (59). Jednakże ta grupa enzymów istotnych dla biologicznego zwalczania nicieni, jest również bardzo słabo poznana. Jedynym przykładem są chitynazy CHI43, o masie cząsteczkowej 43 kDa, oczyszczone i scharakteryzowane w 2002 r. (60). CHI43 wyizolowane z *P. chlamydosporia* i *P. suchlasporia* wykazują podobne optimum aktywności w stosunku do koloidalnego roztworu chityny w pH 5,2-5,7. Na podstawie analizy wpływu CHI43 na osłonki jaj nicieni *G. pallida* razem z protezą P32, wykazano, że jej degradacja następowała jedynie, wówczas gdy zostały użyte oba enzymy (60).

6.3. Kolagenazy

Kolagenazy są najslabiej zbadaną grupą enzymów uczestniczących w trawieniu powłok ciała nicieni (61). Są definiowane jako enzymy katalizujące hydrolizę włókien kolagenu i żelatyny. Potwierdzono udział bakteryjnych i grzybowych kolagenaz w badaniach nad infekcją *C. elegans* bakteriami i grzybami. Stwierdzono, że oczyszczona kolagenaza z *Arthrobotrys amerospora* może degradować białka kutikuli nicieni, pełniąc istotną rolę na etapie jej penetracji (62).

7. Biopreparaty i cechy mikroorganizmów wykorzystywanych do biologicznego zwalczania nicieni

Ograniczanie populacji nicieni – szkodników roślin odbywa się głównie przez zastosowanie chemicznych środków ochrony roślin. W świecie jednak stosuje się środki biologiczne oparte na różnych gatunkach grzybów pasożytniczych, drapieżnych i ich metabolitach (63). Mechanizm działania organizmów wykorzystywanych w formie biopreparatów został opisany w tej publikacji.

W Polsce nie zarejestrowano do tej pory żadnego z wymienionych w tabeli 2 środków, co jest uzależnione od ich producenta. Przed przygotowaniem bioprepa-

ratów do zwalczania nicieni, należy wcześniej przeprowadzić szereg testów na wybranych mikroorganizmach, które mogą być kandydatami do wykorzystania w praktyce. Wymaganymi cechami antagonistów rozpatrywanych do tego celu są: specyficzność gatunkowa – tak, aby tylko docelowy gatunek ulegał infekcji; synchronizacja ich rozwoju z gospodarzem; zdolność przeżycia okresów, gdy potencjalny gospodarz występuje w małych ilościach; zdolność znalezienia potencjalnego gospodarza infekcji w glebie i szybkie tempo namnażania, warunkujące skuteczność działania.

Tabela 2

Środki nicieniobójcze przygotowane na bazie mikroorganizmów antagonistycznych, produkowanych komercyjnie

Nazwa handlowa środka	Gatunek wchodzący w skład biopreparatu	Gospodarz
Abamectin	<i>Streptomyces avermitilis</i> (Actinomycetes)	<i>Meloidogyne incognita</i>
Biocon	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Meloidogyne</i> sp.
Bionem	<i>Bacillus firmus</i>	<i>Meloidogyne</i> sp. i inne nicienie, w tym <i>Heterodera avenae</i>
Deny	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>M. incognita</i>
DiTera	<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Globodera rostochiensis</i> , <i>G. pallida</i> , <i>H. glycines</i> , <i>H. schachtii</i> , <i>M. incognita</i> , <i>Radophalus</i> sp.
Miexianning	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Meloidogyne</i> sp. pasożytujące na tytoniu
Nemont	nieokreślony grzyb drapieżny	<i>M. javanica</i>
Royal 350	<i>Arthrobotrys robusta</i>	niszczyc pieczarkowiec (<i>Ditylenchus myceliophagous</i>)
Paecil	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Meloidogyne</i> sp.
Xianchongbike	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	<i>Meloidogyne</i> sp.
Klami C	<i>P. chlamydosporia</i>	<i>Meloidogyne</i> sp. na warzywach

Opracowano wg 10, zmodyfikowane.

Asortyment tych środków jest jednak niewielki w porównaniu ze środkami stosowanymi do ograniczania populacji innych agrofagów (owady, choroby, chwasty). Najprawdopodobniej jest to związane z samym szkodnikiem jakim jest nicienie, którego cykl rozwojowy jest tak skomplikowany, że odpowiednie zastosowanie środka biologicznego jest bardzo trudne, żeby uzyskać pożądany efekt. Wiele z grzybów pasożytniczych jest wysoce wyspecjalizowana i infekuje tylko jaja nicieni (np. *P. chlamydosporia*). Stadium infekcyjnym nicieni są larwy. W praktyce trudno jest trafić na moment masowego składania jaj przez samice nicieni i tym samym trudno jest ograniczyć właśnie to stadium rozwojowe szkodnika. Dlatego po zastosowaniu biopreparatu zawierającego np. chlamydosporę grzyba *P. chlamydosporia* trudno uzyskać wysoką skuteczność i to najczęściej zniechęca rolników do ich stosowania. Grzyby są bardzo uzależnione od warunków abiotycznych, jak temperatura i wilgot-

ność. Dla większości optymalna temperatura dla ich rozwoju przekracza 25°C (64) i dlatego w krajach z klimatem ciepłym (RPA, Tajlandia, Kuba) są one najczęściej rekomendowane do ograniczania nicieni (64).

W Niemczech zarejestrowano biopreparat zawierający zarodniki grzyba *P. lilacinus* do zwalczania guzaków korzeniowych (*Meloidogyne* spp.) oraz mątwików *Globodera* spp. Grzyb ten może rozwijać się w temperaturze 15°C, dlatego jest rekomendowany do zastosowania w warunkach polowych (64). W Anglii wieloletnie badania zakończono opracowaniem technologii masowej produkcji biopreparatu zawierającego chlamydospory grzyba *P. chlamydosporia*, jednak jest on zarejestrowany do stosowania na Kubie w ograniczaniu guzaków korzeniowych (65).

W Polsce badano krajowe szczepy grzybów nicieniobójczych: *P. lilacinus* i *P. chlamydosporia*. Stosowano je w szklarniach do ograniczania populacji guzaka arachidowego (*Meloidogyne arenaria*) oraz określono warunki ich praktycznego stosowania (66,67). W warunkach polowych w uprawie buraka cukrowego wykazano znaczenie grzybów pasożytniczych w ograniczaniu populacji mątwika burakowego (*Heterodera schachtii*). Ich skuteczność była większa na polach nawożonych organicznie (słoma i gorczyca) (68). Jednak do tej pory w Polsce nie zarejestrowano biopreparatu do zwalczania nicieni – pasożytów roślin.

8. Uwagi końcowe

Badacze koncentrują się na poszukiwaniach najskuteczniejszych szczepów wybranych gatunków mikroorganizmów do wykorzystania w biologicznym zwalczaniu nicieni. Szczepy te różnią się znacznie wirulencją, produkcją zarodników i ilością potencjalnych gospodarzy, specyficznością gatunkową, charakterem infekcji, a także efektami ubocznymi. Ważne jest, aby znaleźć takie szczepy, które będą miały jak największą ilość gospodarzy, a jednocześnie nie byłyby niebezpieczne dla innych „niedocelowych” organizmów, w tym również dla ludzi, a także organizmów pożytecznych takich jak rośliny uprawne, pszczoły, jedwabniki i inne. Istotny jest też aspekt ekonomiczny – czyli koszty produkcji, badań oraz zastosowania w stosunku do strat powodowanych przez nicienie – szkodniki roślin.

Zastosowanie mikroorganizmów poza szeregiem zalet ma również pewne wady. Należą do nich m. in. niewystarczająca wiedza o nich samych, jak i wszystkich organizmach, które mogłyby infekować. Istnieje też ryzyko ich niekontrolowanego rozprzestrzenienia w środowisku oraz skutki pośrednie wywoływane przez te organizmy, które są trudne zarówno do przewidzenia, jak i do wykrycia.

Istotną przeszkodą w wykorzystaniu mikroorganizmów jako potencjalnych biologicznych nematocydów są problemy związane z ich rejestracją. Preparaty takie muszą przejść przez długotrwałe i drogie testy toksyczności i skuteczności.

Do wspomnianych ograniczeń dochodzą również mechanizm działania nematocydów biologicznych w porównaniu z chemicznymi (jest on powolny, a nie natych-

miastowy), ich nierówne i czasem nieprzewidywalne działanie w warunkach polowych, różna skuteczność oraz problemy z formulacją (zwłaszcza w przypadku pasożytów/patogenów obligatoryjnych, których cykl życiowy jest ściśle związany z żywym gospodarzem, np. *Pasteuria*).

Przyszłość ochrony roślin jest związana z produkcją „zdrowej” żywności w ramach rolnictwa integrowanego i ekologicznego. Przejście na ochronę biologiczną będzie możliwe tylko, wtedy gdy proponowane nowe sposoby ochrony upraw zapewnią wysokie plony i wysoką skuteczność zwalczania nicieniowych szkodników roślin. Znajomość wpływu mikroorganizmów na populację szkodnika jest pierwszym etapem poszukiwania takich szczepów, których wysoka wirulentność zapewni znaczną redukcję liczebności szkodnika i doprowadzi do produkcji biopreparatu.

Właśnie takich nowych możliwości ochrony upraw polowych i szklarniowych trzeba już dzisiaj szukać, tym bardziej, że celem zasadniczym jest zmniejszenie skażenia środowiska glebowego.

Literatura

1. Chitwood D. J., (2003), *Pest. Manag. Sci.*, 59, 748-753.
2. Shurtleff M. C., Averre C. W., (2000), *Diagnosing plant diseases caused by nematodes*, APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
3. Crump D. H., (1989), *Aspects Appl. Biol.*, 22, 135-140.
4. Kerry B. R., (1981), *Plant Dis.*, 65, 390-393.
5. Sosnowska D., Banaszak H., (1998), *Progr. in Plant Protect/Postępy w Ochronie Roślin*, 38, 455-458.
6. Hajek A. E., (2004), *Natural Enemies*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 105-126.
7. Hallman J., Sikora R. A., (1996), *Eur. J. Plant Pathol.*, 102, 155-162.
8. Schwartz M., Kopcke B., Weber R. W. S., Sterner O., Anke H., (2004), 65, 239-2245.
9. Hyakamachi M., Kubota M., (2004), *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*, Eds. Atora D. K., Bridge P. D., Bhatnagar D., 104-110, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
10. Dong L. Q., Zhang K. Q., (2006), *Plant Soil.*, 288, 31-45.
11. Waceke J. W., Waudo S. W., Sikora R., (2001), *Int. J. Pest. Manag.*, 47, 135-140.
12. Tunlid A., Jansson S., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2868-2872.
13. Sorbo G., Marziano F., D'Errico F. P., (2003), *J. Plant Pathol.*, 85, 219-221.
14. Jarowaja N., (1964), *Gazeta Cukrownicza*, 72, 288-292.
15. Jarowaja N., (1970), *Acta Mycologica*, 2, 337-406.
16. Jansson H. B., Lopez-Llorca L. V., (2001), *Trichomycetes and Other Fungal Groups*, Eds. Misra J. K., Horn B. W., 144-173, Science Publishers Inc., Enfield, NH, USA.
17. Barron G. L. (1977), *The nematode-destroying fungi*, Canadian Biological Publications, Ontario, Canada, 140.
18. Jatala P., (1986), *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24, 454-489.
19. Samac D. A., Kindel L. L., (2001), *Plant Soil.*, 235, 35-44.
20. Neipp P. W., Becker J. O., (1999), *J. Nematol.*, 31, 54-61.
21. Jonathan E. I., Barker K. R., Abdel-Alim F. F., Vrain T. C., Dickson D. W., (2000), *Nematropica*, 30, 231-240.
22. Chen J., Abawi G. S., Zuckerman B. M., (2000), *J. Nematol.*, 32, 70-77.
23. Jagdale G. B., Grewal P. S., (2002), *Pest. Manag. Sci.*, 58, 451-458.
24. Talavera M., Itou K., Mizukubo T., (2002), *Appl. Entomol. Zool.*, 37, 61-67.
25. Sturz A. V., Kimpinski J., (2004), *Plant Soil.*, 262, 241-249.

26. Siddiqui I. A., Shaikat S. S., (2002), *Biol. Fertil. Soils.*, 36, 260-268.
27. Stirling G. R., (1991), *Biological Control of Plant-Parasitic Nematods: Progress, Problems and Prospects*, CAB International, Wallingford.
28. Sturhan D., Winkelheide R., Sayre R. M., Wergin W. P., (1994), *Fund. Appl. Nematol.*, 17, 29-42.
29. Sayre, R. M. (1993), *Pasteuria, Metchnikoff 1888*, in: *Bacillus subtilis and Other Gram Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*, Eds. Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R., 101–111, American Society for Microbiology Washington, DC, USA.
30. Bird D. M., Opperman C. H., Davies K. G., (2003), *Int. J. Parasitol.*, 33, 1269-1276.
31. Chen Z. X., Dickson D. W., (1998), *J. Nematol.*, 30, 313-340.
32. Browning M., Dawson C., Alm S. R., Gorres J. H., Amador J. A., (2004), *Applied. Soil. Ecol.*, 27, 47-54.
33. Santegoeds C. M., Ferdelman T. G., Muyzer G., de Beer D., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3731-3739.
34. Burg R. W., Miller B. M., Baker E. E., Birnbaum J., Currie S. A., Hartman R., Kong Y.-L., Monaghan R. L., Olson G., Putter I., Tunac J. B., Wallick H., Stapley E. O., Oiwa R., Omura S., (1979), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15, 361-367.
35. Meyer S. L. F., Huettel R. N., Liu X. Z., Humber R. A., Juba J., Nitao J. K., (2004), *Nematology*, 6, 23-32.
36. Barron G. L., (1977), *The nematode-destroying fungi*, Canadian Biological Publications, Ontario, Canada, 140.
37. Bird A. F., (1968), *J. Parasitol.*, 54, 475-489.
38. Godoy G., Rodriguez-Kabana R., Morgan-Jones G., (1982), *J. Nematol.*, 14, 441-442.
39. Reddigari S. R., Jansma P. L., Premachandran D., Hussey R. S., (1986), *J. Nemat.*, 18, 294-302.
40. Persidis A., Lay J. G., Manousis T., Bishop A. H., Ellar D. J., (1991), *J. Cell Sci.*, 100, 613-622.
41. Davies K. G., Redden M., (1997), *J. Appl. Microbiol.*, 83, 227-235.
42. Afolabi P., Davies K. G., O'Shea P. S., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 244-249.
43. Mohan S., Fould S., Davies K. G., (2001), *Parasitology*, 123, 271-276.
44. Akiyama S. K., Yamada K. M., (1995), *Fibronectin and fibronectin fragments*, in: *Extracellular Matrix: a Practical Approach*, Eds. Haralson M. A., Hassel J. R., 175-185, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
45. Patti J. M., Allen B. L., McGavin M. J., Hook M., (1994), *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 585-617.
46. Potts J. R., Campbell I. D., (1996), *Current Opinion Cell Biol.*, 6, 313-320.
47. Davies K. G., Afolabi P., O'Shea P. S., (1996), *Parasitology*, 112, 553-559.
48. Huang X., Zhao N., Zhang K., (2004), *Res. Microbiol.*, 155, 811-816.
49. Morton C. O., Hirsch P. R., Peberdy J. P., Kerry B. R., (2003), *Mycol. Res.*, 107, 38-46.
50. Wang B., Wu W., Liu X., (2007), *Mycopathologia*, 163, 169-176.
51. Tian B. Y., Yan J., Lian L. H., Chunyan W., Li N., Zhang K. Q., (2007), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 372-380.
52. Zhao M. L., Mo M. H., Zhang K. Q., (2004), *Mycologia*, 96, 16-22.
53. Zhao M. L., Huang J. S., Mo M. H., Zhang K. Q., (2005), *Fungal Divers* 2005, 19, 217-234.
54. Ahman J., Johansson T., Olsson M., Punt P. J., van den Hondel C. A., Tunlid A., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3408-3415.
55. Ahman J., Ek B., Rask L., Tunlid A., (1996), *Microbiology*, 142, 1605-1616.
56. St Leger R. J., Joshi L., Bidochka M. J., Roberts D. W., (1996), *PNAS, USA*, 93, 6349-6354.
57. Tian B. Y., Li N., Lian L. H., Liu J. W., Yang J. K., Zhang K. Q., (2006), *Arch. Microbiol.*, 186, 297-305.
58. Takaya N., Yamazaki N., Horiuchi H., Ohta A., Takagi M., (1998), *Microbiology*, 144, 2647-2654.
59. Dackman C., Chet I., Nordbringhertz B., (1989), *FEMBS Microbiol. Ecol.*, 62, 201-208.
60. Tikhonov V. E., Lopez-Llorca L. V., Salinas J., Hansson H.-B., (2002), *Fungal. Gen. Biol.*, 35, 67-78.
61. McLennan J. D., Mandl I., Howes L., (1953), *J. Clin. Invest.*, 32, 1317-1322.
62. Galper S., Cohn E., Spiegel Y., Chet I., (1991), *J. Nematol.*, 23, 269-274.
63. Sosnowska D., (2005), *Postępy Nauk Rolniczych* 5, 17-27.
64. Sosnowska D., (2003), *Możliwości zastosowania Pochonia chlamydosporia (Goddard) Zare et Gams oraz Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson w biologicznym zwalczaniu mątwika burakowego (Heterodera schachtii Schmidt) i guzaków korzeniowych (Meloidogyne spp.)*. Rozprawy Naukowe, Instytut Ochrony Roślin, 9, 95.

65. Bourne J. M., Kerry B. R., (2000), *Int. J. Nematol.*, 10, 9-18.
66. Sosnowska D., Mauchline T. H., Bourne J. M., Kerry B. R., (2001), *J. Plant Protect. Res.*, 41, 77-84.
67. Sosnowska D., Kerry B. R., (2002), *Bull. Pol. Acad. Sci., Biological Sciences*, 50, 17-24.
68. Sosnowska D., Banaszak H., (2000), *J. Plant Protect. Res.*, 40, 71-77.