

WYBRANE MECHANIZMY NABYWANIA ODPORNOŚCI ORGANIZMÓW NA ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN

CHOSEN MECHANISMS OF ACQUIRING ORGANISMS' RESISTANCE
TOWARDS PESTICIDES

Katarzyna NOWACZYK, Aleksandra OBREPALSKA-STEPLOWSKA

Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Ochrony Roślin
w Poznaniu

Streszczenie: Wystąpienie odporności jest naturalną konsekwencją zachodzących nieprzerwanie procesów ewolucyjnych wywołanych presją selekcyjną. W przypadku stosowania środków ochrony roślin presją tą są pestycydy, wykorzystywane w celu zapobiegania stratom w uprawach, spowodowanym przez patogeny, szkodniki itp. Wykształcanie przez agrofagi odporności na te preparaty jest zjawiskiem stosunkowo częstym, pojawiającym się nawet po krótkim czasie kontaktu z substancją czynną. Nabycie odporności jest najczęściej skutkiem mutacji punktowych, wpływających na zmianę struktury białek docelowych dla działania pestycydów, czy powodujących zmianę funkcjonalną innych białek (np. enzymatycznych), lub też zwiększonej ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za detoksykację substancji czynnej. Zarówno mechanizmy działania biocydów, jak i nabywania na nie odporności stanowią bardzo szerokie zagadnienie, w związku z czym w niniejszej pracy omówione zostały wybrane mechanizmy molekularne, wpływające na pojawienie się odporności na środki ochrony roślin. Podane przykłady dotyczą najczęściej występujących szkodników i patogenów roślinnych – owadów, grzybów i patogenicznych bakterii, a także chwastów.

Słowa kluczowe: odporność, biocydy, patogeny roślin, szkodniki.

Summary: Pests and plant pathogens are important reason of crops' quality and productivity limitation. Chemical drugs and pesticides belong to the most common among the strategies used to restrict losses in agricultural production. However, agrophags frequently acquire the resistance towards these substances, even after short time of contact with them. The occurring resistance is a natural consequence of the continuous evolutionary processes influenced by the selective pression of pesticides. The resistance results from point mutations and, in consequence, the changes of target protein's structure for pesticides or the functional changes of other proteins, for example enzymes. The matter of the mechanisms of pesticides' action and the formation of resistance is very extensive, therefore in this paper only chosen molecular mechanisms, that influence the occurrence of resistance towards pesticides are discussed. Given examples had been restricted to the most common pests and plant pathogens – insects, fungi, pathogenic bacteria, as well as herbs.

Key words: resistance, biocides, plant pathogens, pests.

WSTĘP

Ciągły i szybki wzrost populacji ludzkiej wymaga nieustannego zwiększania produkcji żywności, a zwłaszcza jej wydajności. Jednym ze sposobów jest ograniczenie rozprzestrzeniania się szkodników roślin, powodujących wraz z chorobami ok. 60% strat w produkcji roślinnej. Stosowane w ostatnich latach strategie ochrony roślin polegały głównie na krótkoterminowych interwencjach wykorzystujących pojedynczo dostępne na rynku technologie, szczególnie chemiczne pestycydy. Nie prowadzono badań nad możliwym współdziałaniem różnych technologii i ich kompatybilnością. Doświadczenia ostatnich lat pokazują, że im większą kontrolę udaje się uzyskać nad patogenami roślin w wyniku działań krótkoterminowych, tym większe prawdopodobieństwo poważnego załamania równowagi w poddanych im ekosystemach. Szkodniki zawsze wpływały na spadek wydajności produkcji, jednak wiele z zaistniałych obecnie problemów wynika z działań podjętych w celu ochrony roślin [39]. Jednym z takich problemów jest pojawienie się odporności u patogenów i szkodników roślinnych na stosowane przeciw nim środki.

Biocydy (ksenobiotyki) to substancje lub mieszaniny substancji przeznaczone do zwalczania chwastów, szkodników i patogenów roślin. Są to zwykle związki organiczne lub mineralne, toksyczne w określonych stężeniach dla każdej żywej komórki [28]. Do ich najważniejszych cech należą: wysoka aktywność i duża selektywność, decydująca o szybkości działania związku i liczbie koniecznych aplikacji. Istotny jest także czas rozkładu substancji w środowisku i jego ewentualny toksyczny wpływ na człowieka i zwierzęta. W tabeli 1 przedstawiono podział pestycydów ze względu na grupy organizmów, na które działają.

Najliczniejsze i najczęściej stosowane są organiczne biocydy, czyli chemiczne środki ochrony roślin, żywności i człowieka, uniemożliwiające lub ograniczające rozwój mikroorganizmów odpowiedzialnych za biologiczny rozkład roślin, środków spożywczych, przemysłowych i tworzyw. Należą do nich m.in. aminy, amidy, fenole i ich pochodne, sulfidy, karbaminiany, izotiazole, tioftalimidy, pochodne triazynowe i inne [30].

PRZYKŁADOWE MECHANIZMY DZIAŁANIA PESTYCYDÓW

Omówienie mechanizmów nabywania odporności na środki ochrony roślin wymaga uprzedniego zapoznania się ze sposobem działania najczęściej stosowanych substancji. Nabywanie odporności jest zwykle związane z modyfikacją struktur lub cząsteczek docelowych dla biocydów lub też ze zmianami w transporcie substancji czynnej wewnątrz organizmu patogena. W celu pełniejszego obrazowania efektów zmian w genomie patogenów roślinnych, w niniejszej pracy przedstawiono przykłady działania związków stosowanych w ochronie roślin. Do najczęściej spotykanych patogenów i szkodników roślinnych należą bakterie, grzyby, owady oraz chwasty. Z tego względu liczbę przykładów ograniczono do związków skierowanych przeciwko tym organizmom.

TABELA 1. Podział biocydów w zależności od typu związku, jego właściwości lub organizmu docelowego (wg [30], zmodyfikowano)

Podział biocydów w zależności od organizmów docelowych	
Bakteriocydy – zwalczające bakterie	
Zoocydy – zwalczające organizmy zwierzęce: Insektycydy – środki owadobójcze Rodentycydy – środki gryzoniobójcze Moluskocydy – środki mięczakobójcze Nematocydy – środki nicieniobójcze Larwicydy – środki larwobójcze Aficydy – środki mszycobójcze Akarycydy – środki roztoczobójcze Owicydy – środki niszczące jaja i roztocza	
Fungicydy – zwalczające grzyby	
Herbicydy – zwalczające chwasty	
Podział biocydów w zależności od typu związku chemicznego – przykłady	
Nieorganiczne	związki rtęci, cynku, miedzi, arsenu, fluoru, siarka, boraks, chloran sodu
Metaloorganiczne	alkilowe pochodne cyny (estry i etery tributylcyny), miedzi, cynku, manganu i rtęci
Organiczne	aminy, amidy, chlorowane i niechlorowane pochodne fenolowe, bifenole, sulfidy, karbaminiany (ditiokarbaminian, aminokarb, propoxur, karbaryl), izotiazole, tioftalimidy, pochodne triazynowe (symazyna, atrazyna, propazyna)
Podział biocydów w zależności od właściwości związku chemicznego – przykłady	
Utleniające	brom, bromochlorohydantoina, chlor, dwutlenek chloru, jod, estry kwasu izocyjanurowego
Nieutleniające	bromonitropropandiol, bromonitrostyren, karbaminian, aldehyd glutarowy, izotiazol

Bakteriocydy

Stosowane w rolnictwie środki bakteriobójcze stanowią dużą grupę, w skład której wchodzi głównie antybiotyki, sulfonamidy, pochodne 8-hydroksychinoliny i in. Antybiotyki, stanowią bardzo liczną grupę związków i nie będą szczegółowo omawiane w niniejszej pracy.

Podstawowe mechanizmy działania bakteriocydów polegają na rozbijaniu struktury lub zmianie przepuszczalności ściany komórkowej, hamowaniu procesów energetycznych oraz biosyntezy. Przykłady związków działających bakteriobójczo przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2. Przykłady bakteriocydów (wg [18], zmodyfikowano)

Elementy/mechanizmy komórki docelowe dla bakteriocydu	Przykłady związków
Ściana komórkowa	bacytracyna, cefalosporyny, penicyliny
Błony komórkowe	jonofory, polimyksyny
Synteza białek	aminoglikozydy, chloramfenikol, tetracyklina
Synteza RNA	rifamycyna
Synteza DNA	chinolony
Synteza kwasu foliowego	sulfonamidy

Jednym ze związków stosowanych jako składnik preparatów bakteriobójczych jest inhibitor syntetazy glutaminy, fosfinotricyna (PPT). Związek ten jest analogiem kwasu glutaminowego toksycznym dla bakterii i roślin. Formą stosowaną w ochronie roślin jest tripeptyd L-alanino-L-alanino-fosfinotricyna, z którego komórkowe peptydazy odcinają dwa aminokwasy, a powstała fosfinotricyna działa jako kompetycyjny inhibitor syntetazy glutaminy. Blokada enzymu przyczynia się do raptownego zwiększenia wewnątrzkomórkowego poziomu amoniaku, co skutkuje rozbiciem struktur błonowych, a u roślin dodatkowo zahamowaniem fotosyntezy. Konsekwencją jest śmierć organizmu [21].

Sulfonamidy są kompetycyjnymi inhibitorami syntazy dihydropterianu, analogami kwasu p-aminobenzoowego. Działanie antybiotyku zaburza wewnątrzkomórkowy metabolizm bakterii blokując syntezę kwasu dihydrofoliowego, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania biosyntezy puryn i pirymidyn oraz nukleotydowych kofaktorów, takich jak NAD [17,29].

Czwartorzędowe związki amoniaku (np. chlorek benzalkoniowy) wpływają na przepuszczalność błon bakteryjnych i powodują koagulację cytoplazmy. Stosowane są głównie przeciw bakteriom Gram⁺, ale też niektórym Gram⁻, wirusom, grzybom i pierwotniakom [40].

Insektycydy

Spośród preparatów insektycydowych najliczniej reprezentowaną grupą są neurotoksyny, działające na receptory synaptyczne, acetylocholinesterazę lub aksony komórek nerwowych owada. Działanie insektycydów należących do grupy tzw. insektycydów o niekonwencjonalnym mechanizmie działania polega na zaburzeniu rozwoju biologicznego owadów, ich żerowania i komunikacji osobniczej. Tego typu preparaty blokują m.in. syntezę chityny czy receptory błon komórek nabłonka jelita środkowego.

Hamowanie aktywności acetylocholinesterazy (AChE), enzymu hydrolizującego acetylocholinę w synapsach nerwowych, zachodzi na zasadzie inhibicji kompetycyjnej. Związki fosforoorganiczne będące składnikami preparatów insektycydowych są hydrolizowane przez AChE, czego skutkiem jest fosforylacja seryny w miejscu aktywnym enzymu i kilkudniowa blokada jego aktywności, prowadząca do śmierci owada [35].

Jako tzw. bioinsektycydy stosuje się pochodne toksyn bakteryjnych – grupy bioinsektycydowych białek krystalicznych (Cry) produkowanych przez *Bacillus thuringiensis**. Do tej pory zsekwencjonowano ponad 100 genów kodujących białka Cry. Są to sekwencje o wysokim stopniu zmienności, często kodowane przez plazmidy jako fragmenty większych struktur, zawierających ruchome elementy genetyczne. Toksyczne działanie tych białek zostało stwierdzone dla wielu gatunków owadów, jak również dla niektórych nicieni i pierwotniaków. Kryształy białkowe po spożyciu ulegają solubilizacji, a uwolnione protoksyny podlegają obróbce proteolitycznej w jelicie owadów. Powstałe toksyny wiążą się z receptorami powierzchniowymi komórek nabłonka jelita środkowego, wnikają w błony i formują nieselektywne kanały jonowe lub pory. W wyniku niekontrolowanego napływu wody i jonów komórki pęcznieją i następuje ich liza. Geny kodujące krystaliczne białko *B. thuringiensis* wykorzystuje się również do transformacji roślin w celu uzyskania odmian odpornych na owady. Toksyczność białek Cry jest wysoce specyficzna i ogranicza się do niektórych grup owadów i bezkręgowców. Z tego względu *B. thuringiensis* jest obecnie najszerzej stosowanym pestycydem pochodzenia biologicznego [33].

Potencjalnym bioinsektycydem jest również neurotoksyna z jadu pająka – atracotoksyna. Blokują one bramkowane napięciem kanały wapniowe w błonie komórkowej neuronów [42].

Działanie owadobójcze będące wynikiem specyficznego blokowania kanałów jonowych wykazują też syntetyczne insektycydy organiczne (pyretroidy, cyklodieny). Blokują one kanały sodowe w osłonce neuronów, doprowadzając do hiperpolaryzacji błony, blokady przewodzenia impulsów i paraliżu układu nerwowego [8,34,46].

Fungicydy

Większość fungicydów wpływa hamująco na procesy związane z biosyntezą oraz podziałem jądra komórkowego, funkcjonowaniem błony cytoplazmatycznej i mitochondriów, a także na przemiany energetyczne. Natomiast tzw. fungicydy trzeciej generacji wzbudzają reakcje odpornościowe rośliny, działając jak abiotyczne induktory (elicitory).

Za najbardziej aktywne grzybobójczo uważa się pestycydy blokujące podział jądra komórkowego i biosyntezę ergosterolu. Podziały mitotyczne są hamowane przez związki benzimidazolowe (karbendazym, tiabendazol, benomyl, tiofanat metylu). Działanie tych związków polega na blokowaniu kurczliwości mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego, po związaniu się herbicydu z podjednostką β białek tubulinowych. Do fungicydów blokujących syntezę ergosterolu (IBE, inhibitory biosyntezy ergosterolu) należą związki triazolowe, imidazolowe i strobilurynowe [2].

*Owadzi patogen *B. thuringiensis* należy do bakterii Gram (+) produkujących przetrwalniki. Podczas stacjonarnej fazy wzrostu produkuje krystaliczne białko (Cry) o właściwościach owadobójczych. Toksyczne białka kodowane są przez licznie występujące w genomie bakterii plazmidy. Zaobserwowano interakcje (synergistyczne, jak i antagonistyczne) pomiędzy toksynami pochodzącymi z różnych szczepów *B. thuringiensis*. *B. thuringiensis* oficjalnie jest gatunkiem odrębnym od *B. cereus*, lecz metody biochemiczne i morfologiczne, a nawet niektóre z metod molekularnych nie pozwalają na jednoznaczne rozróżnienie obu gatunków. Część badaczy postuluje więc traktowanie ich jako członków tego samego gatunku (*B. cereus*).

Związki metali, siarki oraz większość fungicydów aromatycznych to niespecyficzne inhibitory enzymów uczestniczących w przemianach energetycznych. Zaburzenia przemian energetycznych mogą też wynikać z uszkodzeń błony lub zaburzenia transportu elektronów przez błonę mitochondrialną. Zahamowanie biosyntezy białek polega najczęściej na zakłóceniu reakcji włączenia aminokwasów do kompleksu polipeptydowego. Taki sposób działania charakteryzuje organiczne związki fosforu. Uszkodzenie białek błony komórkowej zakłóca jej przepuszczalność [2], a stymulacja wzrostu stężenia akumulowanego glicerolu wywołuje w komórkach stres hiperosmotyczny [45]. Sposoby działania fungicydów oraz przykłady substancji czynnych przedstawiono w tabeli 3.

TABELA 3. Przykładowe fungicydy oraz sposób ich działania

Sposób działania fungicydu	Przykłady związków	Literatura
Blokada podziału mitotycznego *	związki benzimidazolowe (karbendazym, tiabendazol, benomyl, tiofanat metylu)	[2]
Blokada biosyntezy ergosterolu	związki triazolowe, imidazolowe, strobilurynowe (IBE)	[2]
Zahamowanie biosyntezy białek	organiczne związki fosforu (pirazofos), niektóre fungicydy dichlorofenylamidowe procymidon, iprodion, winklozolina)	[2]
Zahamowanie biosyntezy RNA	związki fenylamidowe (metalaksyl)	[2]
Zaburzenia przemian energetycznych: – uszkodzenia błon mitochondrialnych – wakuolizacja wewnętrznej błony mitochondrialnej	związki difenylamidowe, dinokap terrazol	[22] [22]
Zaburzenia przemian energetycznych – zahamowanie transportu elektronów przez błonę mitochondrialną	związki strobilurynowe	[22]
Zaburzenia przemian energetycznych – niespecyficzna inhibicja enzymów	związki metali (miedzi, cyny, rtęci), związki siarki tiokarbaminiany, fungicydy aromatyczne	[22]
Zakłócenie przepuszczalności błony komórkowej	dodyna (monoocetan guanidyny, kationowy surfaktant), tridemorf	[2]
Stres hiperosmotyczny	fungicydy fenylpirolowe	[45]
Wzbudzenie reakcji odpornościowej rośliny	fosetyl glinu	[43]

*) Działanie tych związków polega na blokowaniu kurczliwości mikrotubul wrzeczona kariokinetycznego, po związaniu się fungicydu z podjednostką β białek tubulinowych

Herbicydy

Działanie herbicydów polega głównie na blokowaniu syntezy aminokwasów, karotenoidów lub lipidów, a także na zaburzeniu cyklu wzrostowego rośliny. Wiele związków działa też poprzez hamowanie transportu elektronów w chloroplastach.

Przykładem związków uszkadzających elementy fotosystemu mogą być DCMU (dichlorofenyldimetylomocznik) i Parakwat (dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-dipirydylu). DCMU blokuje przepływ elektronów pomiędzy fotoukładami PS II i PS I przy przenośniku elektronów – cząsteczce ubichinonu Q_A , która jest połączona z drugą cząsteczką ubichinonu Q_B . Struktura Q_B decyduje o powstaniu połączenia z Q_A . W przypadku zablokowania transferu elektronów między cząsteczkami ubichinonu (na skutek działania herbicydu lub np. mutacji w genie kodującym Q_A) możliwe jest powstanie mutacji, zmieniającej strukturę Q_B , co decyduje o powstaniu alternatywnego połączenia między białkami, a zatem o odporności na DCMU.

Parakwat przechwytuje elektrony przekazywane pomiędzy PS I i $NADP^+$, działając jako egzogeny akceptor elektronów i przekazując je następnie na tlen. Skutkiem nieprawidłowego transportu elektronów jest powstawanie w chloroplastach rodników ponadtlenkowych O_2^- i uszkodzenie składników chloroplastu, w szczególności lipidów i białek [28].

2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) należy do pochodnych fenoksykwasów i działa jak regulator wzrostu roślin podobny do auksyn. W większych stężeniach niszczy rośliny dwuliścienne, zmuszając je do nadmiernie szybkiego wzrostu, w wyniku czego roślina ginie. Rośliny jednoliścienne mają szybki sposób detoksykacji 2,4-D, dlatego herbicyd ten stosuje się do zwalczania dwuliściennych chwastów w uprawach jedno-liściennych [28].

Glyfosat to herbicyd o szerokim spektrum działania. Blokuje on aktywność syntazy kwasu 5-enolopirogrono-3-fosfoszikiimowego (EPSPS), która uczestniczy w biosyntezie aminokwasów aromatycznych. Herbicyd jest nieszkodliwy dla zwierząt, niedokonujących syntezy tych aminokwasów [28].

Do inhibitorów syntazy acetylomleczanowej (ang. *acetolactate synthase*, ALS) należą herbicydy sulfonynolmocznikowe oraz imidazole. Inhibitory ALS wpływają na zahamowanie szlaku metabolicznego leucyny, izoleucyny i waliny poprzez zablokowanie jednego z dwóch (lub obu) miejsc w cząsteczce enzymu. Herbicydy mogą hamować wzrost komórek poprzez inhibicję syntazy celulozowej, prawdopodobnie blokując miejsce wiązania pewnych regulatorów lub fragment białka odpowiedzialny za formowanie poru, którym łańcuchy celulozowe przechodzą przez błonę komórkową. Przykładem tego typu herbicydów są tiazolidinony i izoksaben [32].

Do najczęściej stosowanych należą herbicydy triazynowe, mocznikowe, karbaminianowe, tiokarbaminianowe, amidowe i fenoksyalkanokarboksyłowe. Wprowadza się też herbicydy nowego typu – fotodynamiczne. Są to herbicydy o strukturze dwupierścieniowej typu difenyl-eter (np. acifluorfen, oksyfluorfen), działające na zasadzie inhibicji kompetycyjnej w miejscu przyłączenia naturalnego substratu dla oksydazy protoporfirynogenu IX. Jest to ostatni enzym szlaku biosyntezy tetrapirołu, a jego zablokowanie prowadzi do akumulacji protoporfirynogenu IX. Wynikiem jest absorpcja energii świetlnej przez protoporfirynogen IX, fotooksydacja i uwolnienie toksycznych dla komórki reaktywnych form tlenu [19].

Herbicydy działają selektywnie w zależności od rozmieszczenia systemu korzeniowego chwastów i roślin uprawnych w glebie. Substancje te działają na systemy enzymatyczne, funkcjonujące w określonych, wyspecjalizowanych tkankach, dlatego docelowe miejsce działania herbicydów w roślinie odgrywa również dużą rolę. Odporność na herbicyd może być wynikiem słabego przemieszczania się tego związku do tkanki docelowej, na przykład wierzchołków wzrostu.

Selektywność działania herbicydu w stosunku do określonych gatunków roślin wynika głównie ze zdolności pewnych roślin (np. uprawnych) do jego detoksykacji. Odporność na 2,4-D polega na jego szybkim metabolizowaniu. Może się to odbywać drogą hydroksylacji pierścienia aromatycznego, przyłączenia glukozy lub kwasu asparaginowego przy grupie karboksylowej, jak też poprzez reakcję utlenienia łańcucha bocznego, którego usunięcie powoduje zanik aktywności hormonalnej. Zbyt wolne przeprowadzanie tej ostatniej reakcji jest przyczyną wrażliwości chwastów dwuliściennych na ten herbicyd [15]. Każdy herbicyd w stężeniu większym niż stężenie niszczące określoną grupę chwastów może uszkodzić lub zniszczyć także roślinę uprawną.

DZIAŁANIE PESTYCYDÓW NA ORGANIZMY INNE NIŻ DOCELOWE

Wpływ biocydów na rośliny uprawne może mieć dwojaki charakter. Zazwyczaj działania pozytywne przeważają nad szkodliwymi skutkami ubocznymi ich stosowania. Część pestycydów, jak fungicyd kaptan, może korzystnie wpływać na wzrost liści i pędów, intensywność fotosyntezy oraz zabarwienie owoców poprzez stymulację gromadzenia antocyjanów w skórce owoców, np. jabłek [2]. Stosowanie fungicydów chroni rośliny przed akumulacją mykotoksyn w tkankach, a herbicydów – przed nadmierną konkurencją o wodę i energię świetlną [28]. W wielu przypadkach trudno jest jednak wyeliminować negatywny wpływ pestycydów na rośliny uprawne. Stosowane substancje są często toksyczne dla roślin, wywołując powstawanie nekroz na liściach, kwiatach i owocach. Związki miedzi i siarki mogą przyczyniać się do silnego uszkodzenia liści i owoców, a nieorganiczne związki siarki powodują ponadto zahamowanie fotosyntezy. Substancje te zwiększają również transpirację kutykularną kosztem zatrzymania transpiracji szparkowej. Z kolei zaprawy do nasion często obniżają zdolność i energię ich kiełkowania.

Większość chemicznych pestycydów ma bardzo szerokie spektrum działania i niszczy, oprócz szkodników, także organizmy pożyteczne, wywołując niekorzystne zmiany w składzie i strukturze fauny glebowej [30]. Powszechne stosowanie środków ochrony roślin, a także nieorganicznych nawozów wpływa redukująco na produktywność i jakość gleby, która w pewnym stopniu zależy od procesów fizjologicznych żyjących w glebie mikroorganizmów. Pestycydy mogą wpływać na gęstość występowania glebowych bakterii i grzybów, ich aktywność i wzrost, przyczyniając się do niekorzystnych zmian w liczebności i strukturze populacji tych mikroorganizmów. Zmiany te prowadzą do spadku różnorodności i zaniku funkcji mikroorganizmów glebowych i zachwiania równowagi dynamicznej środowiska glebowego [13].

Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin nie pozostaje również bez wpływu na człowieka. Pestycydy wywierają duży wpływ na system immunologiczny osób pracujących przy ich produkcji, stosujących je rolników, a także mieszkańców terenów rolniczych oraz konsumentów wyprodukowanej przy ich użyciu żywności. Wpływ ten jest najczęściej immunosupresywny, czasem jednak immunostymulujący, w zależności od rodzaju stosowanego środka oraz dawki. Immunosupresja zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów. Immunostymulacja przyczynia się do pojawiania się chorób autoimmunologicznych i alergii [41].

Dyrektywy Unii Europejskiej ściśle określają rodzaj i ilość związków stosowanych jako biocydy, wprowadzanych na rynki krajów UE. Wyklucza się użycie związków działających niekorzystnie na organizm, np. wydzielających formaldehyd, tworzących rakotwórcze nitrozoaminy. Także produkty przemian chemicznych i mikrobiologicznych używanych pestycydów nie mogą wykazywać działania toksycznego, rakotwórczego, uczulającego itp. [30]. Pestycydy organiczne mają określony czas trwałości, determinujący czas karencji (najkrótszego okresu, jaki musi upłynąć od ostatniego kontaktu roślin z preparatem do terminu ich zbioru i spożycia) [28].

MECHANIZMY NABYWANIA ODPORNOŚCI NA ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN

Rozwój odporności na pestycydy jest procesem ewolucyjnym, w którym dany pestycyd działa jako presja selekcyjna na populację zróżnicowaną genetycznie pod względem odporności na niego. Tempo tego procesu zależy od zróżnicowania genetycznego tej populacji oraz od intensywności selekcji [23]. Określenie charakteru odporności i zidentyfikowanie odpowiedzialnych za ten mechanizm mutacji powinno w przyszłości pozwolić, w powiązaniu z badaniami z dziedziny genetyki populacyjnej i ekologii, na stworzenie zintegrowanych technik ochrony roślin (ang. *Integrated Pest Management*, IPM) [39].

Wrażliwość organizmu na dany związek zależy od trzech cech: istnienia w komórce elementu docelowego dla pestycydu, posiadania mechanizmu transportu substancji do wnętrza komórki oraz braku enzymów inaktywujących lub modyfikujących te związki. Zmiana którejkolwiek z tych cech prowadzi do nabycia odporności przez organizm [18]. W każdej populacji, obok dominujących form wrażliwych, mogą w wyniku mutacji, krzyżowania i heterokariozy (u grzybów) pojawić się osobniki odporne. Formy te, początkowo nieliczne, wskutek selekcyjnego działania pestycydu, stopniowo zaczynają dominować w populacji. Prawdopodobieństwo nabycia odporności w dużym stopniu, obok zmienności gatunkowej organizmu, zależy od mechanizmu działania związku. Pestycydy działające na kilka układów enzymatycznych jednocześnie (np. zakłócające funkcje energetyczne) stwarzają mniejsze niebezpieczeństwo uodpornienia się osobnika niż związki selektywne, działające na ściśle określone funkcje. Odporność na pestycydy wchodzące w specyficzne reakcje z elementami komórki (np. inhibitory syntezy ergosterolu – związki benzimidazolowe) wykształca się często w bardzo krótkim czasie na skutek pojedynczych mutacji punktowych. Przykłady mutacji punktowych nadających odporność przedstawiono w tabeli 4.

TABELA 4. Przykłady mutacji punktowych nadających odporność na biocydy

Organizm	Biocyd	Gen i jego rola	Zmiana aminokwasu	Uwagi	Lit.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	tetracyklina	<i>rpsJ1</i> – koduje rybosomalne białko S10	Val 57 → Met/Leu/Gln	zmiana struktury RNA w pobliżu miejsca przyłączenia antybiotyku	[16]
<i>Escherichia coli</i>	microcin B17*	<i>gyrB</i> – koduje podjednostkę β bakteryjnej gyrazy	Trp751 → Arg	podwójna tranzycja AT w GC	[6]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	fluorochinolony np. ciprofloksacyna	<i>parC</i> – koduje bakteryjną topoizomerazę IV	Asp 86 → Asn Ser 87 → Ile Ser 88 → Pro Glu 91 → Gly		[7]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ciprofloksacyna ofloksacyna norfloksanyna	<i>gyrA</i> – koduje podjednostkę α bakteryjnej gyrazy <i>parC</i> – koduje bakteryjną topoizomerazę IV	Thr 83 → Ile Asp 87 → Gly/Asn Ser 80 → Leu Glu 84 → Lys		25] 25]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Synechococcus</i> sp.	atrazynan DCMU metribuzin	<i>psbA1</i> – gen kodujący białko Q _B	np. Ser 264 → Gly/Glu/Ala Pro/Thr/Cys Phe 255 → Leu/Tyr Leu 271 → Val/Met/Ala	u roślin wyższych mutacja Ser264Gly powoduje zmniejszoną produktywność efektywność fotosyntezy kumulacja mutacji wpływa na stopień odporności	[31]
<i>Synechocystis</i>	metribuzin atrazyna ioxynil	<i>psbA1</i> – gen kodujący białko Q _B	Ala 251 → Val Ile 248 → Thr Asn 266 → Thr Ser 264 → Ala	zwiększona wrażliwość na stres świetlny kumulacja mutacji wpływa na stopień odporności	[27]
<i>Glycine max</i>	atrazyna	<i>psbA</i> – gen kodujący białko Q _B	Ser 268 → Pro	zwiększona wrażliwość na stres świetlny	[1]

TABELA 4. cd.

Organizm	Biocyd	Gen i jego rola	Zmiana aminokwasu	Uwagi	Lit.
<i>Solanum tuberosum</i>	atrazyna	<i>psbA</i> – gen kodujący białko Q _B	Ser 264 → Thr	brak spadku efektywności fotosyntezy, prawdopodobnie dzięki zachowaniu grupy -OH łańcucha bocznego aminokwasu i utrzymaniu wiązań chemicznych w cząsteczce	[37]
<i>Lucilia cuprina</i> , <i>Musca domestica</i>	insektocydy fosforoorganiczne, np. diazinon	<i>LcaE7</i> – gen kodujący karboksylesterazę	Gly 137 → Asp Ala 267 → Val Met 283 → Leu Thr 335 → His Ile 358 → Phe	zmiana karboksylesterazy w hydrolazę insektocydu, – zmiana konformacji miejsca aktywnego pozwalająca na ustawienie cząsteczki wody w pozycji dogodnej do przeprowadzenia reakcji hydrolizy i regeneracji ufosforylowanego enzymu; często dodatkowo występuje podwyższona ekspresja GST, cyt. p450, esteraz	[26]
<i>Drosophila melanogaster</i>	insektocydy fosforoorganiczne, np. malation	<i>ace</i> – gen acetylocholinesterazy, AChE	Phe 268 → Tyr Gly 256 → Val** Ile 161 → Val Phe 330 → Tyr Gly 368 → Ala	następuje zmiana właściwości katalitycznych enzymu; poziom odporności koreluje z liczbą kopii genu <i>ace</i> mutacje dotyczą miejsca aktywnego lub jego sąsiedztwa; wpływa to negatywnie na stabilność enzymu; kumulacja mutacji wpływa na szerszy zakres odporności, jednocześnie zmniejszając stabilność enzymu; tylko jedna z mutacji kompensuje to podwyższoną aktywnością AChE	[10] [35]

*) działanie polega na inhibicji podj. β bakteryjnej gyrazy. Bakteriocyd prawdopodobnie blokuje miejsce, przez które przeplatana jest nieprzecięta nić DNA

***) mutacja powoduje wzrost aktywności enzymu

Możliwe jest również wystąpienie zjawiska odporności krzyżowej, polegającego na wykształceniu odporności na kilka substancji, należących do grupy związków o podobnym mechanizmie działania. Zablokowanie mechanizmu działania substancji czynnej pozwala na uodpornienie się na kilka związków w wyniku kontaktu tylko z jednym z nich.

Przykładem może być powiązanie odporności bakterii na streptomycynę z odpornością na inne antybiotyki z grupy aminoglikozydów (odporność krzyżowa między metycyliną, streptomycyną i tetracykliną) [9]. U grzybów często występuje zjawisko nabywania odporności krzyżowej, którego przyczyną jest nadużywanie fungicydów benzimidazolowych, dikarboksyimidowych i fenyloamidowych [2]. Zależności między nabywaniem odporności na najczęściej stosowane insektycydy przedstawiono na rycinie 1.

Działanie presji selekcyjnej w kierunku zwiększania puli genów odporności w populacji przejawia się już w najwcześniejszych stadiach rozwoju organizmów. Przyczyną bardzo szybkiego uodpornienia się chwastów na herbicydy – inhibitory ALS jest wystąpienie mutacji punktowych w genie enzymu syntazy acetylomleczanowej. Uważa się, że na słupku kielkują jedynie zmutowane ziarna pyłku, co zwiększa prawdopodobieństwo utrzymania się i rozprzestrzenienia mutacji w populacji [12].

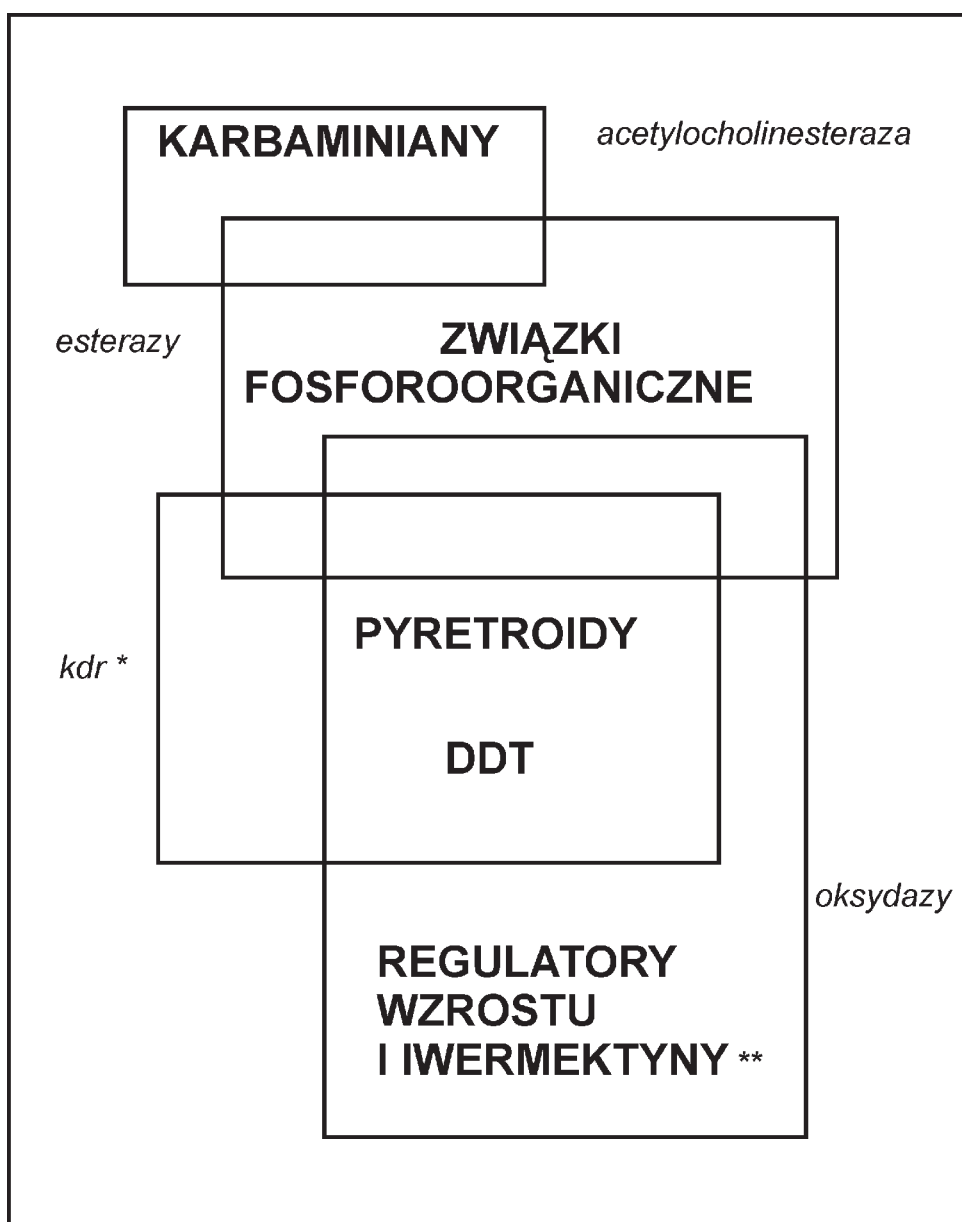
Ewolucyjny proces nabywania odporności na środki ochrony roślin może służyć jako dobry model adaptacji organizmów. Adaptacja ta może odbywać się różnymi drogami, które zazwyczaj determinują szybkość wykształcenia odporności oraz jej mechanizm. Przykłady niektórych mechanizmów nabywania odporności zaprezentowano w tabeli 5.

Mutacje punktowe powodujące zmianę właściwości i/lub struktury białka docelowego

Mutacje punktowe mogą zmieniać konformację miejsca wiązania pestycydu do białka, przez co wiązanie z pestycydem jest nietrwałe lub wręcz niemożliwe. Przykładem może być mutacja w genie kanału sodowego owadów, powodująca niewrażliwość tego kanału na pyretroid [46]. Za zmianę w interakcji enzymu z inhibitorem (tzw. herbicydami typu fop i dim – haloxyfop, sethoxydim) odpowiada też mutacja punktowa w genie plastydowej karboksylazy acetylo-CoA, dzięki czemu herbicydy te nie inaktywują docelowego enzymu [44]. Ocenia się, że minimum 5 różnych mutacji punktowych w miejscu wiązania insektycydu przez AChE odpowiada, pojedynczo lub wspólnie, za zróżnicowany stopień odporności na związki fosforoorganiczne i insektycydy karbamylowe [3,35].

Dwie mutacje punktowe powodują powstanie izoforny syntazy celulozowej niewrażliwej na herbicydy izoksabenowe i tiazolidowe [32]. Z kolei, wywołane mutacjami punktowymi zmniejszone powinowactwo enzymu sterolo-14 α -demetylasy do fungicydów imidazolowych i triazolowych odpowiada za znaczne zmniejszenie skutków działania prochlorazu i innych fungicydów należących do tych grup [8].

Zmutowane odporne białko może być jednak mniej stabilne, przy czym stabilność jest skorelowana z liczbą mutacji punktowych w pierwotnym genie. Zależność taką udokumentowano w przypadku zmutowanego genu dla AChE u *Drosophila melano-gaster* [35].



RYCINA 1. Zależności w występowaniu odporności krzyżowej na najczęściej używane grupy insektycydów. W ramkach podano grupy związków będących składnikami preparatów insektycydowych. Kursywą wypisane zostały nazwy enzymów detoksykujących odpowiadających za odporność na dane grupy insektycydów (wg [3], zmieniono): *kdr** (ang. *knockdown resistance*) – odporność na szok, odporność układu nerwowego owadów na paraliż wywołany insektycydami blokującymi kanały jonowe; ** – iwermektyny należą do syntetyzowanych przez bakterie z rodzaju *Streptomyces* związków z grupy laktonów makrocyclicznych stosowanych jako nematocydy i insektycydy, blokują bramkowane kwasem glutaminowym kanały sodowe bezkręgowców, co prowadzi do paraliżu mięśni

TABELA 5. Przykłady molekularnych mechanizmów odporności patogenów i szkodników roślin na pestycydy

Mechanizm nabycia odporności	Przykład - mechanizm odporności	Typ pestycydu, rodzaj związku	Litera-tura
Mutacja punktowa	<ul style="list-style-type: none"> – mutacja w genie kanału sodowego w miejscu wiązania pyretroidu – zmiana aminokwasu w receptorze GABA (kwasu γ-aminomasłowego) – zmiana 1 aminokwasu, zmiana specyficzności esterazy w hydrolazę insektycydu – mutacja w silnie konserwatywnym regionie genu syntazy celulozowej 	<p>Insektycydy (pyretroid)</p> <p>Insektycydy organofosforowe (malation) i karbamylowe (propoxur)</p> <p>Insektycydy organofosforowe (malation) i karbamylowe (propoxur)</p> <p>Herbicydy (tiazolidinony, izoksaben)</p>	<p>[46]</p> <p>[3]</p> <p>[3]</p> <p>[32]</p>
Amplifikacja kopii genu	<ul style="list-style-type: none"> – nadekspresja monoooksygenazy cytochromu p450 – wzrost liczby kopii esterazy – nadekspresja transferaz glutationowych 	<p>Insektycydy (pyretroid), Herbicydy (fenylomocznik).</p> <p>Insektycydy organofosforowe (malation) i karbamylowe (propoxur)</p> <p>Herbicydy chloracetanilidow e(acetochlor, metolachlor)</p>	<p>[46][36]</p> <p>[3]</p> <p>[14]</p>
Zmiana stabilności mRNA	<ul style="list-style-type: none"> – zwiększenie stabilności transkryptu genu monoooksygenazy cytochromu p450 wskutek mutacji 	<p>Insektycydy (pyretroid)</p>	<p>[46]</p>
Nadekspresja lub zmiana powinowactwa do białka docelowego	<ul style="list-style-type: none"> – zmiana powinowactwa sterolo-14α-demetylazy – wiele zmian w miejscach przyłączenia białka Cry do receptorów komórkowych w jelicie owadów – mechanizm nieznan – zmiany w miejscu przyłączenia herbicydu typu difenyleter do oksydazy protoporfirynogenu IX. Połączenie inhibitora nietrwale 	<p>Fungicydy imidazolowe (prochloraz) i triazolowe</p> <p>Bioinsektycydy (Cry)</p> <p>Herbicydy (acifluorfen, oxyfluorfen)</p>	<p>[8]</p> <p>[33]</p> <p>[19]</p>
Minimalizacja skutków działania pestycydu	<ul style="list-style-type: none"> – hiperaktywacja MAP kinaz szlaku transdukcji sygnałów w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny – usuwanie pestycydu przez pompy błonowe, transport aktywny – zmiana składu kwasów tłuszczowych błony komórkowej 	<p>Fungicydy fenylopirolowe (fludioxonil), herbicydy dikarboksyimidowe</p> <p>Fungicydy imidazolowe (prochloraz) i triazolowe</p> <p>Bakteriocyd (chlorek benzalkoniowy)</p>	<p>[45]</p> <p>[8]</p> <p>[40]</p>

Amplifikacja kopii genu

Strategia ta ma na celu osiągnięcie wyższego poziomu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za detoksykację ksenobiotyków. Najczęstszym przykładem jest zwiększenie kopii genu esterazy do ponad 250 u owadów, m.in. komarów, zwiększające odporność na związki fosforoorganiczne i karbaminiany, dzięki szybszej detoksykacji tych insektycydów [24].

Mutacje punktowe powodujące zmianę właściwości i/lub struktury białka innego niż docelowe

Istnieje również mechanizm odporności polegający na modyfikacji niektórych enzymów detoksykujących, niespecyficznym w stosunku do danego pestycydu i nie będących celem działania tych związków. W wyniku mutacji specyficzność takiego enzymu może zostać zmieniona w kierunku większego powinowactwa do konkretnego związku, co pozwala organizmom na skuteczną detoksykację lub inhibicję pestycydu. Przykładem mogą być esterazy, tworzące rodzinę złożoną z sześciu grup białek enzymatycznych. U *Diptera* występują one jako zgrupowanie genów na tym samym chromosomie. Poza mechanizmem odporności polegającym na amplifikacji kopii wielogenowych, mogą wystąpić również mutacje punktowe modyfikujące pojedyncze geny danej grupy. Na przykład zmiana niespecyficznej esterazy w specyficzną dla danego insektycydu hydrolazę może zajść w wyniku zmiany jednego aminokwasu w sekwencji białka [3,26].

Zwiększenie poziomu transkrypcji genów enzymów detoksykujących

Najczęściej występującym mechanizmem odporności owadów na insektycydy jest wzmocniona transkrypcja genów enzymów detoksykujących: esteraż, oksydaz, transferaz glutationowych [3,10]. Na przykład w odpowiedzi na presję selekcyjną wywieraną przez insektycydy chloracetanilidowe (atrazyna) u muchy domowej występuje zwiększenie poziomu transkrypcji transferaz glutationowych i esteraż biorących udział w detoksykacji tych związków [11]. Przykładem podobnego mechanizmu u roślin może być nadekspresja syntetazy γ -glutamylcysteiny (γ ECS), enzymu regulatorowego w procesie biosyntezy glutationu. Podwyższenie ekspresji γ ECS oraz transferaz glutationowych jest źródłem odporności na herbicydy chloracetanilidowe u topoli [14].

Nadekspresja białka docelowego dla pestycydu

W wyniku stosowania insektycydów karbamylowych i związków fosforoorganicznych może wykształcić się mechanizm odporności polegający na biosyntezie większej ilości kopii acetylocholinesterazy. Część cząsteczek enzymu pozostaje wówczas zdefosforylowana i aktywna, a poziom aktywnej AChE ściśle koreluje ze stopniem odporności [10]. Zazwyczaj jednak mechanizm ten wiąże się z występowaniem mutacji punktowych w genie AChE. Ze względu na to, że mutacje punktowe w genie enzymu powodują jego zmniejszoną aktywność i stabilność, nadekspresja kompensuje te niekorzystne zmiany poprzez zwiększenie ilości kopii białka [35].

Stabilizacja mRNA

Poziom enzymów może zostać zwiększony dzięki zapewnieniu większej stabilności transkryptu. Prawdopodobnie mutacja w jednym z genów monoooksygenazy cytochromu p450 wpływa na zwiększoną stabilność transkryptu tego genu i w ten sposób zwiększa wewnątrzkomórkowy poziom enzymu, co wpływa na odporność owadów na pyretroid [46].

Metabolizm i detoksykacja pestycydu

Częstym źródłem odporności jest zwiększenie poziomu i/lub aktywności związków wiążących ksenobiotyki (np. glutation, fitochelatyny) lub specyficznych enzymów biorących udział w inaktywacji pestycydu [8,10]. Przykładem mogą być bakterie odporne na analog kwasu glutaminowego – fosfinotricynę. Syntetyzują one enzym specyficznie go inaktywujący – acetylotransferazę fosfinotricyny [21].

Odporność może wynikać również z braku aktywnej formy enzymu, np. owady odporne na toksyczne białko *Cry B. thuringiensis* nie mają w jelicie proteaz zwykle trawiących protoksynę, w związku z czym niepoddany obróbce proteolitycznej bioinsektycyd pozostaje w formie nieaktywnej [33].

Minimalizacja skutków działania pestycydu

Tego typu strategii odpornościowe skutkują zwiększoną odpornością na toksyczne dotychczas związki poprzez: zmniejszenie stopnia wchłaniania pestycydu do komórki (zmiany w składzie ściany komórkowej, jej uszczelnienie, zmiany w budowie kanałów błonowych, którymi toksyczne substancje przedostają się przez błonę, zwiększenie ilości i aktywności pomp błonowych usuwających toksyny na zewnątrz komórki). Zwykle za osłabienie skutków działania pestycydów odpowiada zwiększenie naturalnej zdolności detoksykacji reaktywnych form tlenu powstałych w wyniku działania pestycydu na drodze szlaku antyoksydacyjnego. Często tego typu odporność, związana ze zwiększoną aktywnością lub ilością kopii enzymów szlaku antyoksydacyjnego, występuje u roślin odpornych na herbicydy uszkodzające fotosystem II. W odpowiedzi na herbicydy dikarboksymidowe i fungicydy fenylpirolowe, zwiększające poziom akumulacji glicerolu w komórkach, u odpornych roślin i grzybów następuje hiperaktywacja MAP kinaz szlaku transdukcji sygnałów związanego ze stresem osmotycznym i przywrócenie prawidłowego ciśnienia osmotycznego w komórce [45]. Możliwe jest też aktywne usuwanie ksenobiotyku poza komórkę w drodze transportu aktywnego, jak to ma miejsce u niektórych grzybów odpornych na prochloraz [8]. U bakterii częstym mechanizmem odporności jest zmiana składu kwasów tłuszczowych błony, jej struktury oraz zwiększona synteza kwasów tejchojowych, co radykalnie zmniejsza przepuszczalność błony dla wielu antybiotyków [40].

Najczęstszą drogą przekazywania genów odporności u bakterii jest koniugacja. W genomie bakteryjnym odporność może być kodowana zarówno na chromosomie bakteryjnym, jak i przez plazmidy. Jeżeli plazmid występujący w komórce należy do koniugacyjnych, odporność może być przekazywana nawet między różnymi gatunkami bakterii, w dodatku proces ten nie zależy od obecności lub braku antybiotyków w

środowisku. Na przykład gen odporności na metycylinę u *Staphylococcus aureus* (Gram+) powstał z genu β -laktamazy *S. aureus* i fragmentu genu pochodzącego z innej bakterii, prawdopodobnie z *E. coli* (Gram-), kodującego białko wiążące penicylinę [18].

Mechanizm działania biocydów wpływa na czas wykształcenia się odporności na dany związek. Odporność na substancje niespecyficycznie blokujące różne układy enzymatyczne wykształca się wolniej niż w przypadku związków wysoce selektywnych w stosunku do substratu.

EWOLUCJA ODPORNOŚCI

Genetyczne podstawy odporności na pestycydy grają decydującą rolę dla ryzyka dalszego rozprzestrzenienia się odporności. Nagły spadek efektywności pestycydu jest bardziej prawdopodobny, gdy odporność jest skutkiem mutacji w jednym genie (np. gwałtowny rozwój oporności na benzimidazole w populacji grzybowych patogenów roślin). Jeżeli odporność pojawia się dopiero w efekcie synergistycznego działania dwóch zmienionych genów, dopiero mutacja w obu loci powoduje jej wystąpienie. Stopniowe zmiany w kierunku zmniejszonej wrażliwości na środki ochrony roślin mają miejsce, gdy odporność jest w danej populacji pod kontrolą poligenową. Selekcja jest w tym przypadku raczej kierunkowa niż różnicująca [8]. Wykorzystywane jest wówczas zjawisko naturalnego zróżnicowania wrażliwości na pestycydy u organizmów w populacji [19]. Mechanizmy odporności są bardzo złożone, gdyż na efekt działania pestycydu wpływ ma, poza genotypem patogena, również jego stan fizjologiczny i czynniki środowiskowe, w tym obecność i aktywność naturalnych wrogów.

Skutki nabycia odporności również bywają zróżnicowane. Substytucja w jednym locus z allelu wrażliwości w allel odporności może mieć wpływ na zmianę biochemicznych i fizjologicznych właściwości rozwojowych organizmu. Nabycie odporności na pestycydy może mieć negatywny wpływ na żywotność patogena w warunkach braku kontaktu z pestycydem, jak również na jego ogólną kondycję i płodność. Teoretycznie, wobec tego, że mutacje w allel odporności wpływają negatywnie na żywotność organizmów, allele te są z powodu selekcji naturalnej rzadkie w populacjach atakujących rośliny niechronione pestycydami. Nabyta cecha odporności mogłaby więc, w warunkach zaprzestania stosowania pestycydu, ulec rewersji pod wpływem selekcji naturalnej. Tak się jednak nie dzieje, badania empiryczne wskazują bowiem, że negatywne koszty nabycia odporności są w warunkach polowych w znacznym stopniu ograniczane [23]. Zamiast rewersji, częściej występuje ewolucja kompensacyjna. Istotnie, po nabyciu odporności przez pierwotnie wrażliwego patogena, jego żywotność i tempo metabolizmu mogą się zmniejszyć. Jednak w warunkach braku pestycydu w środowisku, w genomie patogena zachodzą mutacje kompensujące, zwiększające poziom metabolizmu i ogólną kondycję organizmu. W warunkach ponownego zastosowania pestycydu, patogeny pozostają odporne, a ich żywotność utrzymuje się na wysokim poziomie. Ewolucja i adaptacja są bowiem procesami postępowymi i nieodwracalnymi [20].

WPROWADZANIE ODPORNOŚCI JAKO STRATEGIA OCHRONY ROŚLIN

Przykłady omówione powyżej koncentrowały się na zgadnieniu odporności naturalnej. W celu podwyższenia produktywności upraw można również zastosować biotechnologiczne wprowadzanie odporności do genomów organizmów. Coraz popularniejsze staje się wykorzystanie biotechnologicznych metod konstruowania roślin uprawnych odpornych na substancje stosowane dla ich ochrony. Alternatywą dla bezpiecznego dla jednoliściennych stosowania 2,4-D coraz częściej staje się wprowadzanie do genomu roślin uprawnych genu odporności na stosowany herbicyd. Dzięki odporności roślin uprawnych można zwiększyć dawkę stosowanego środka chwastobójczego bez obaw o wysokość plonu. Niebezpieczeństwem przeniesienia się tych genów do genomu chwastów w wyniku zapylenia zapobiega się poprzez klonowanie genów odporności do genomu plastydowego lub przez podzielenie konstruktów i umieszczenie go w dwóch różnych genomach rośliny: plastydowym i jądrowym [5,38]. Zwykle wprowadzana jest odporność na herbicydy o szerokim spektrum działania. Przykładem może być wprowadzenie dodatkowej kopii genu enzymu EPSPS do genomu roślin uprawnych, co w znacznym stopniu zwiększyło ich odporność na glyfosat [28].

Odporność na szkodniki można uzyskać poprzez produkcję roślin produkujących toksyny (m.in. bawełna z wklonowanym i ulegającym ekspresji genem białka Cry pochodzącym z genomu *B. thuringiensis*). Podejście takie jest bardzo korzystne, można bowiem ograniczyć ekspresję toksyn jedynie do tkanek zagrożonych inwazją szkodników. Ponadto odporność na patogeny staje się dziedziczna, co ogranicza koszty ochrony uprawy [33].

Niebezpieczeństwem nabycia przez szkodniki odporności występuje również w przypadku wykorzystywania toksyn syntetyzowanych przez rośliny. Dlatego metoda syntezy bioinsektycydów w organizmach roślinnych (tak jak i podczas konwencjonalnego stosowania pestycydów) wymaga osiągnięcia na tyle wysokiej ekspresji białka (stężenia pestycydu), by wyeliminować osobniki heterozygotyczne pod względem odporności. Wówczas odporne homozygoty będą krzyżować się z osobnikami wrażliwymi, co wpłynie na opóźnienie wykształcania się fenotypu odporności w populacji.

STRATEGIE ZAPOBIEGANIA NABYWANIU ODPORNOŚCI NA ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN

Wobec szybkiego nabycia odporności przez patogeny i szkodniki roślin, szczególnie najszybciej i najskuteczniej na działające selektywnie pestycydy organiczne, straty w uprawach są bardzo wysokie. Poszukuje się zatem strategii zapewniających ochronę przed wykształcaniem przez szkodniki odporności na środki ochrony roślin.

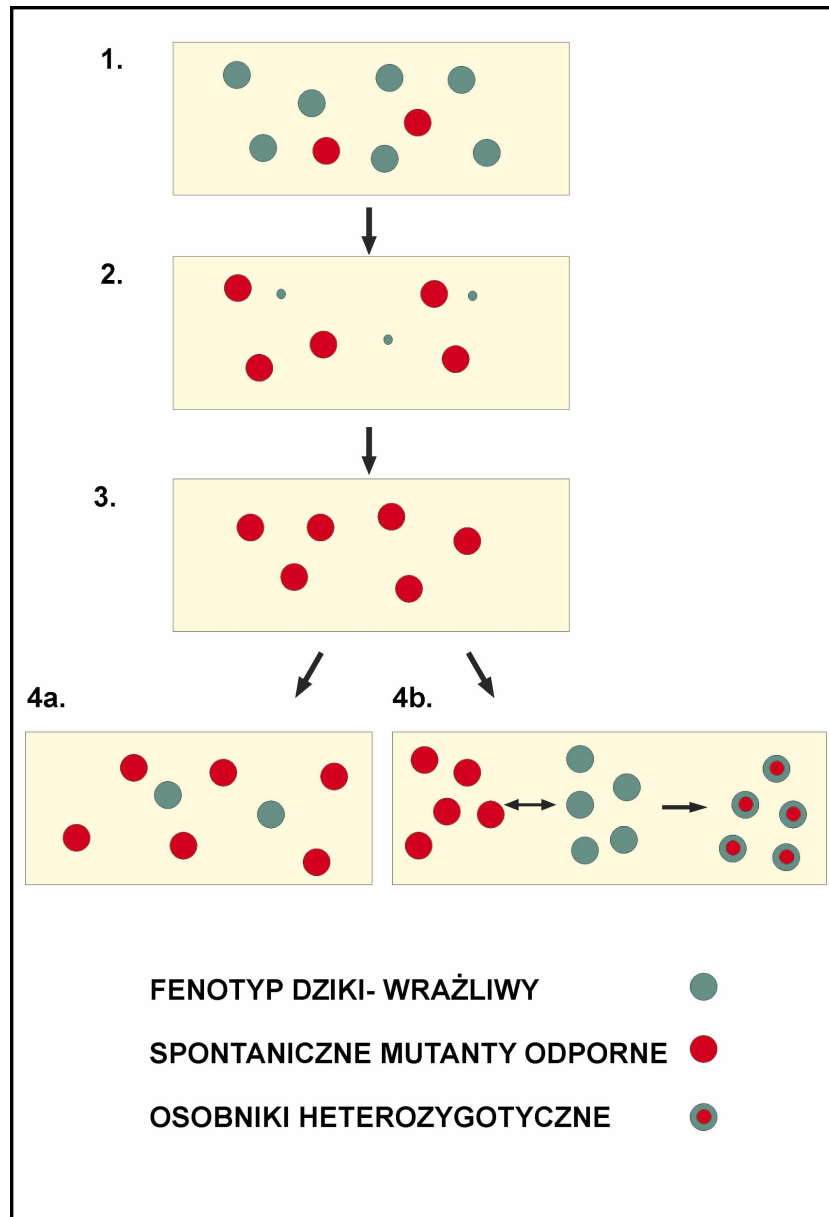
Zaleca się przede wszystkim stosowanie, zamiennie lub jednocześnie, kilku różnych metod zwalczania szkodników upraw, łączenie chemicznych i niechemicznych metod ochrony roślin, wykorzystanie naturalnych antagonistów patogena (biokontrola) oraz rotację upraw na danym obszarze. Odporności krzyżowej zapobiega stosowanie

mieszanek lub zamienne stosowanie pestycydów o różnym mechanizmie działania [12]. Zalecane jest też pozostawianie obszarów, na których nie stosuje się pestycydu, aby mogła przetrwać część populacji patogena niosąca geny wrażliwości na dany pestycyd. Zwiększa to prawdopodobieństwo krzyżowania się homozygotycznych form odpornych z homozygotami wrażliwymi, co zapobiega dryfowi genetycznemu prowadzącemu do wykształcenia form homozygotycznych, odpornych na stosowany środek [4]. Na rycinie 2. przedstawiono schemat zmian w populacji poddanej takiej presji selekcyjnej. Występowanie naturalnych wrogów szkodników upraw może w dużym stopniu wpływać na powodzenie strategii ochrony roślin. Nawet jedynie częściowo skuteczna biokontrola w połączeniu z metodami chemicznymi daje korzystny efekt synergistyczny, wpływając znacząco na obniżenie liczebności szkodników [39].

Wydaje się, że w przyszłości najbardziej efektywne i najszerzej stosowane będą tzw. zintegrowane techniki ochrony roślin, łączące technologie biokontroli ze stosowaniem biopestycydów, pestycydów chemicznych i odmian roślin uprawnych odpornych na pestycydy. Jest to podejście ekologiczne, uwzględniające liczne interakcje zachodzące między organizmami, wpływ elementów środowiska oraz mechanizmy adaptacyjne i ewolucyjne w populacjach szkodników. Poza znacznym ograniczeniem kosztów ochrony roślin techniki te pozwolą ograniczyć stopień dewastacji środowiska naturalnego [39].

LITERATURA

- [1] ALFONSO M, PUEYO JJ, GADDOUR K, ETIENNE A-L, KIRILOVSKY D, PICOREI R. Induced new mutation of D1 Serine-268 in soybean photosynthetic cell cultures produced atrazine resistance, increased stability of $S_2Q_B^-$, and $S_3Q_B^-$ states and increased sensitivity to light stress. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1499–1508.
- [2] BORECKI Z. Nauka o chorobach roślin. Państwowe Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa 2001.
- [3] BROGDON WG, McALLISTER JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 605–613.
- [4] CARRIERE Y, TABASHNIK BE. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proc R Soc Lond B* 2001; **268**: 1475–1480.
- [5] CHIN HG, KIM GD, MARIN I, MERSHA F, EVANS TC Jr., CHEN L, XU MQ, SRIHARSA P. Protein trans-splicing in transgenic plant chloroplast: Reconstruction of herbicide resistance from split genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4510–4515.
- [6] DEL CASTILLO FJ, DEL CASTILLO I, MORENO F. Construction and Characterization of Mutations at Codon 751 of the *Escherichia coli gyrB* Gene That Confer Resistance to the Antimicrobial Peptide Microcin B17 and Alter the Activity of DNA Gyrase. *J Bacter* 2001; **183**: 2137–2140.
- [7] DEGUCHI T, YASUDA M, NAKANO M, KANEMATSU E, OZEKI S, NISHINO Y, EZAKI T, MAEDA S-I, SAITO I, KAWADA Y. Rapid screening of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae parC* gene associated with resistance to quinolones. *J Clin Microb* 1997; **35**: 948–950.
- [8] DYER PS, HANSEN J, DELANEY A, LUCAS JA. Genetic control of resistance to the sterol 14 α -demethylase inhibitor fungicide prochloraz in the cereal eyespot pathogen *Tapesia yallundae*. *Appl Envir Microb* 2000; **66**: 4599–4604.
- [9] FALKINER FR. The consequences of antibiotic use in horticulture. *J Antimicrob Chemoth* 1998; **41**: 429–431.
- [10] FOURNIER D, BRIDE JM, HOFFMANN F, KARCH F. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14270–14274.
- [11] FOURNIER D, BRIDE JM, POIRIE M, BERGE JB, PLAPP FW Jr. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J Biol Chem* 1992; **3**: 1840–1845.



RYCINA 2. Presja selekcyjna wywierana na populację przez zastosowanie pestycydu i możliwość wpływania na rozwój odporności (wg [18], zmieniono): 1. Populacja w warunkach braku kontaktu z pestycydem; w populacji pierwotnej większość osobników jest wrażliwa. 2. Zastosowanie pestycydu – przeżywiają i rozmnażają się tylko osobniki odporne. 3. Zaprzestanie stosowania środka – możliwe są min. 2 drogi rozwoju populacji. 4a. Dłuższy czas bez kontaktu z pestycydem – pojawiają się spontaniczne mutanty wrażliwe, w populacji obecnych jest dużo homozygot odpornych. Nastąpiła zmiana pierwotnej struktury populacji w kierunku fenotypu odporności. 4b. Rozwój sytuacji przy pozostawieniu obszarów, na których nie stosowano pestycydu – możliwe jest krzyżowanie się homozygot odpornych z wrażliwymi homozygotami z terenów, na których nie stosowano środków ochrony roślin. Powstaje struktura populacji sprzyjająca odrodzeniu się fenotypu wrażliwości

- [12] GAWROŃSKI SW. Chwasty odporne: mechanizm odporności, rozprzestrzenianie i zapobieganie wystąpieniu. XLV Sesja Naukowa IOR 2005.
- [13] GIRVAN MS, BULLIMORE J, BALL AS, PRETTY JN, OSBORN MA. Responses of active bacterial and fungal communities in soil under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl Environ Microb* 2004; **70**: 2692–2701.
- [14] GULLNER G, KÖMIVES T, RENNENBERG H. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase towards chloracetanilide herbicides. *J Exp Bot* 2001; **52**: 971–979.
- [15] HARBORNE JB. Ekologia biochemiczna. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1997.
- [16] HU M, NANADI S, DAVIES C, NICHOLAS RA. High level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rps-J* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. *Antimicrob Agents Ch* 2005; **49**: 4327–4334.
- [17] KANG TJ, SEO JE, LOC NH, YANG MS. Herbicide resistance of tobacco chloroplasts expressing the *bar* gene. *Molec Cells* 2003; **16**: 60–66.
- [18] KHACHATOURIANS GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canad Med Assoc J* 1998; **159**: 1129–1136.
- [19] LERMONTOVA I, GRIMM B. Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen. *Plant Physiol* 2000; **122**: 75–83.
- [20] LEVIN BR, PERROT V, WALKER N. Compensatory mutations and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 2000; **154**: 985–997.
- [21] LUTZ KA, KNAPP JE, MALIGA P. Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1585–1590.
- [22] LYR H, LAUSSMANN B, CASPERSON G. Mechanism of action of terrazol. *Z Allg Mikrobiol* 1975; **15**: 345–355.
- [23] MIYO T, OGUMA Y, CHARLESWORTH B. The comparison of intrinsic rates of increase among chromosome-substituted lines resistant and susceptible to organophosphate insecticides in *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet Syst* 2000; **78**: 373–382.
- [24] MOUCHES C, PASTEUR N, BERGE JB, HYRIEN O, RAYMOND M, de SAINT VINCENT BR, de SILVESTRI M, GEORGHIU GP. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex mosquito*. *Science* 1996; **233**: 778–780.
- [25] NAKANO M, DEGUCHI T, KAWAMURA T, YASUDA M, KIMURA M, OKANO Y, KAWADA Y. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch* 1997; **41**: 2289–2291.
- [26] NEWCOMB RD, CAMPBELL PM, OLLIS DL, CHEAH E, RUSSELL RJ, OAKESHOTT JG. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7464–7468.
- [27] PEREWOSKA I, ETIENNE A-L, MIRANDA T, KIRILOVSKY D. S₁ destabilization and higher sensitivity to light in metribuzin-resistant mutants. *Plant Physiol* 1994; **104**: 235–245.
- [28] PULLIN AS. Biologiczne podstawy ochrony przyrody. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2004.
- [29] QUINLIVAN EP, McPARTLIN J, WEIR DG, SCOTT J. Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. *FASEB J* 2000; **14**: 2519–2524.
- [30] RUPIŃSKI S. Substancje z licencją na zabijanie. *Chem Rev* 2004; **4**: 25–32.
- [31] SAJJAPHAN K, SHAPIR N, JUDD AK, WACKETT LP, SADOWSKY MJ. Novel *psbA1* gene from a naturally occurring atrazine-resistant cyanobacterial isolate. *Appl Environ Microb* 2002; **68**: 1358–1366.
- [32] SCHEIBLE WR, ESHED R, RICHMOND T, DELMER D, SOMERVILLE C. Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis Ixr1* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10079–10084.
- [33] SCHNEPF E, CRICKMORE N, van RIE J, LERECLUS D, BAUM J, FEITELSON J, ZEIGLER DR, DEAN DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microb Mol Biol Rev* 1998; **62**: 775–806.
- [34] SHAFER TJ, MEYER DA, CROFTON KM. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* 2005; **113**: 123–136.
- [35] SHI MA, LOUGARRE A, ALIES C, FRÉMAUX I, TANG ZH, STOJAN J, FOURNIER D. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol Biol* 2004; **4**: 5.

- [36] SIMINSZKY B, CORBIN FT, WARD ER, FLEISCHMANN TJ, DEWEY RE. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1750–1755.
- [37] SMEDA RJ, HASEGAWA PM, GOLDSBROUGH PB, SINGH NK, WELLER SC. A serine-to-threonine substitution in the triazine herbicide-binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity. *Plant Physiol* 1993; **103**: 911–917.
- [38] SUN L, GHOSH I, PAULUS H, XU MING-QUN. Protein *trans*-splicing to produce herbicide-resistant acetolactate synthase. *Appl Envir Microb* 2001; **67**: 1025–1029.
- [39] THOMAS MB. Ecological approaches and the development of „truly integrated” pest management. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5944–5951.
- [40] TO MS, FAVRIN S, ROMANOVA N, GRIFFITHS MW. Postadapational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Envir Microb* 2002; **68**: 5258–5264.
- [41] TOKARSKA-RODAK M, TOŚ-LUTY S, HARATYM-MAJ AN. Selected parameters of immunological response in hop growers during the period of intensive application of pesticides. *Ann Agric Environ Med* 2004; **11**: 227–231.
- [42] WANG XIU-HONG, SMITH ROSS, FLETCHER JAMIE I, WILSON HARRY, WOOD CHRIS J, HOWDEN MERLIN E H, KING GLENN F. Structure-function studies of ω -atracotoxin, a potent antagonist of insect voltage-gated calcium channels. *Eur J Biochem* 1999; **264**: 488–494.
- [43] www.bayercs.pl
- [44] ZAGNITKO O, JELENSKA J, TEVZADZE G, HASELKORN R, GORNOCKI P. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6617–6622.
- [45] ZHANG Y, LAMM R, PILLONEL C, LAM S, XU JIN-RONG. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a *HOG1* mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl Envir Microb* 2002; **68**: 532–538.
- [46] ZHU YC, SNODGRASS GL. Cytochrome P450 CYP6X1 cDNAs and mRNA expression levels in three strains of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (*Heteroptera: Miridae*) having different susceptibilities to pyrethroid insecticide. *Insect Mol Biol* 2003; **12**: 39–49.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 15.09.2005 r.

Przyjęto: 25.01.2006 r.

ul. Mieczurina 20 60-318 Poznań

e-mail: AO.Steplowska@ior.poznan.pl