

뿌리혹선충 유전자의 RNA 간섭 억제에 의한 선충저항성 식물 개발 및 선충방제의 최근 연구 동향

한 범 수*
국립농업과학원

Recent Studies on Development of Transgenic Plants Induced Root-Knot Nematode Resistance by RNA Interference Suppression of Nematode Genes and Nematode Prevention

Bum-Soo Hahn*

National Academy of Agricultural Science, Suwon, Korea
(Received on October 19, 2009)

Root-knot nematodes cause billions of dollars in crop losses annually have a broad range of host over 2,000 species of plants. These nematodes are known as obligate, sedentary endo-parasites in a plant host to feed upon to complete their life cycle. To prevent the plant parasitic nematode, methyl bromide was widely applied as a soil fumigant. Other strategies to prevent or control nematodes involve RNAi-mediated suppression, R gene transformation, natural products or chemical treatments, the expression of peptide or proteins in susceptible plants, and others. Over the last decade, the entry in GenBank for *Meloidogyne* reveals 73,340 ESTs and recently two complete *Meloidogyne* spp. genomes sequences have simultaneously been presented by two groups. Recent works have demonstrated the effect of RNAi suppression to nematode target genes. These results will provide novel members of genes as a foundation for studies focused on understanding the function of *M. incognita* nematode genes as well as for the development of novel target genes for parasite control. Thus the successful development of biotechnology-derived plants with nematode resistance will result in large yield benefits for producers as well as environmental benefits and will accelerate the research related to pathogen-resistant crops.

Keywords : *Meloidogyne*, Prevention, RNAi, Root-knot nematode, Transgenic plant

선충감염으로 인한 대표적인 40개 작물의 생산량 손실액은 전 세계적으로 1,180억 달러(2001년)로 추산되며, 이는 전체 생산량의 약 10%에 해당한다(McCarter, 2009). 선충 피해가 가장 큰 작물은 벼와 옥수수 두 작물이 입는 손실은 중국에서만 총 벼생산량의 28%가 피해를 입고 있으며, 옥수수는 미국에서만 피해액이 약 100억 달러에 달하는 것으로 알려져 있다(Fig. 1). 또한 전 세계적으로 작물에 가장 큰 피해를 주는 식물기생 선충류는 뿌리혹선충(root-knot nematode)과 시스트 선충(cyst nematode)이다.

매년 작물에 수십억 달러의 피해를 야기하는 뿌리혹선

충류(*Meloidogyne* spp.)는 대략 2,000여종의 식물에 감염이 가능하며, 선충감염으로 인한 작물 피해의 절반을 야기하는 것으로 알려져 있다(Sasser, 1980). 이러한 뿌리혹선충은 식물 뿌리조직 내에 침입해 들어가 정착생활을 하며, 뿌리의 세포들로부터 직접 양분을 흡수하는 정주성 내부기생선충으로 토양 내 선충 수가 급격히 증가함에 따라 식물이 입는 피해 또한 급증하는 것으로 알려져 있다(Fig. 2). 대표적으로 문제가 되고 있는 뿌리혹선충은 약 4종이며, 그 중 *M. incognita*(고구마뿌리혹선충)와 *M. arenaria*(땅콩뿌리혹선충)와 같이 기주숙주식물에 대한 병원성 변이가 있는 종들은 다양한 race로 분화되어 있으며, 분화된 뿌리혹선충의 race들은 토마토를 포함한 6가지 특정 품종의 작물을 대상으로 구분할 수 있는 방법이 알려져 있다(Hartman과 Sasser, 1985)(Table 1).

*Corresponding author
Phone) +82-31-299-1693, Fax) +82-31-299-1672
Email) bshahn@rda.go.kr

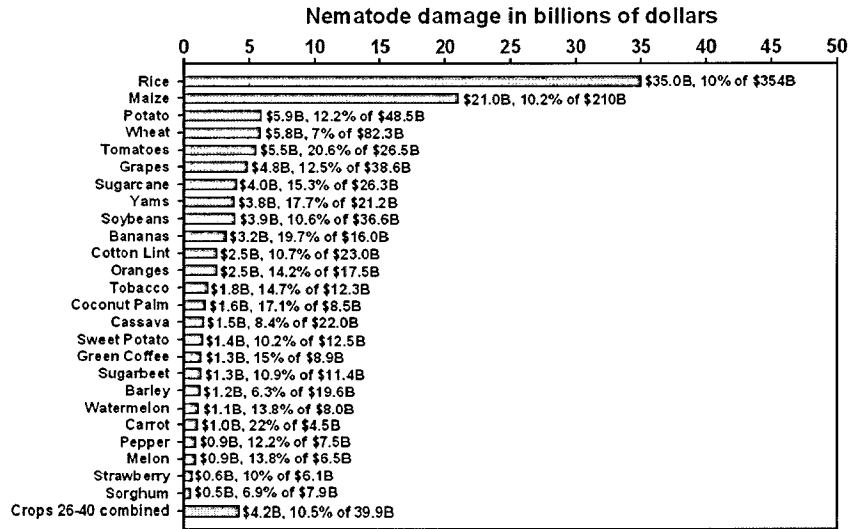


Fig. 1. An estimate of potential 2001 global nematode damage to the 40 crops. Crops ranked 26-40 are millet, cow peas, lemons/limes, chick peas, pineapple, broad beans, cocoa bean, tea leaves, eggplant, papaya, oats, pigeon pea, grapefruit, broad beans and rye. Figure adapted from McCarter, 2009.

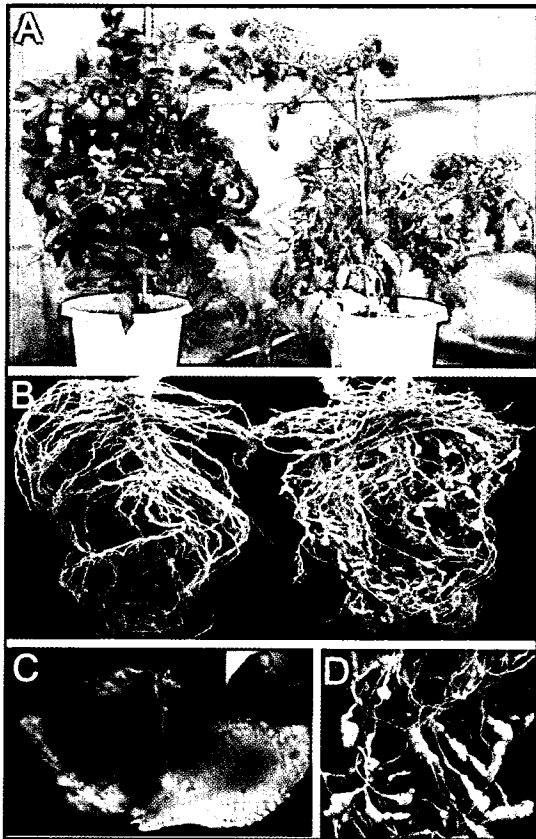


Fig. 2. Propagation of *Meloidogyne incognita* on susceptible tomato plant. A. symptoms caused by the root-knot nematode on tomato. Non-infected tomato plant (left). Infected tomato plant (right). B. Non-infected tomato root (left). Infected tomato root (right). C. Egg mass was stained with acid fuchsin. Inset shows adult female (left) and J2 (right). D. Root-knots (photo was taken by a magnification power of five).

뿌리혹선충의 생활사는 1번의 알 단계, 4번의 유충기 및 4번의 탈피, 그리고 1번의 성충기로 이루어져 있다. 침입기로 알려진 제2기 유충기(juvenile 2) 선충은 토양에서 식물 뿌리끝으로 침입 후 뿌리 끝으로 이동을 한다. 일단 뿌리 내 분열조직에 도달하면 방향을 바꾸어 도관 조직 쪽으로 향하고 분화를 시작하는 원생목부에 도달할 때까지 이동한다. 제2기의 유충은 성장에 필요한 영양분을 식물체로부터 공급받기 위하여 5-7개의 유조직 세포들이 융합된 형태의 영양저장고(metabolic sinks)를 형성하여 이용한다(Jones과 Northcote, 1972). 이들 영양저장고는 거대세포(giant cells)로 불리우며, 완전히 분화된 거대세포는 정상세포보다 더 크며, 감수분열 없이 염색체가 증대되는 endoreduplication으로 대략 100 개의 핵을 갖고 있다(Wiggers 등, 1990). 뿌리혹선충은 자웅이형의 특성이 있어, 뿌리에 감염 후 대략 3-6주 후가 되면 암컷 선충은 서양배를 닮은 모양으로 둥글게 부풀어 오르고, 성숙한 암컷은 체외로 알집(egg mass)를 형성하여 그속에 약 200-300개의 알을 낳는다. 토양속에서 각각의 알은 부화 후 제 2기 유충상태에서 다시 뿌리에 감염 하여 생활사를 반복하게된다. 이러한 뿌리혹선충의 기초 생활사를 바탕으로 토마토를 기주로 온실조건에서 선충을 증식하여 활용할 수 있으며(Fig. 2), 또한 분리한 선충은 토마토 뿌리 또는 모상근(hairy root)에 접종하여 plate상에서 무균 배양도 가능한 것으로 확인되었다(Fig. 3).

한편, 선충 감염에 따른 작물의 피해를 줄이거나 방지하기 위해서는 대표적인 토양훈증제인 methyl bromide를 이용하고 있으나, 이는 인체 및 환경 유해도가 높아 단계

Table 1. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test

<i>Meloidogyne</i> sp	Cotton	Tobacco	Pepper	Watermelon	Peanut	Tomato
<i>M. incognita</i>						
Race 1	-	-	+	+	-	+
Race 2	-	+	+	+	-	+
Race 3	+	-	+	+	-	+
Race 4	+	+	+	+	-	+
<i>M. arenaria</i>						
Race 1	-	+	+	+	+	+
Race 2	-	+	-	+	-	+
<i>M. javanica</i>	+	+	-	+	-	+
<i>M. hapla</i>	-	+	+	-	+	+

NOTE: (-) indicates a resistant host; (+) indicates a susceptible host

Cotton - Deltapine 61; Tobacco - NC 95; Pepper - Early California Wonder; Watermelon - Charleston Gray; Peanut - Florunner; Tomato - Rutgers. Table adapted from Hartman and Sasser, 1985.

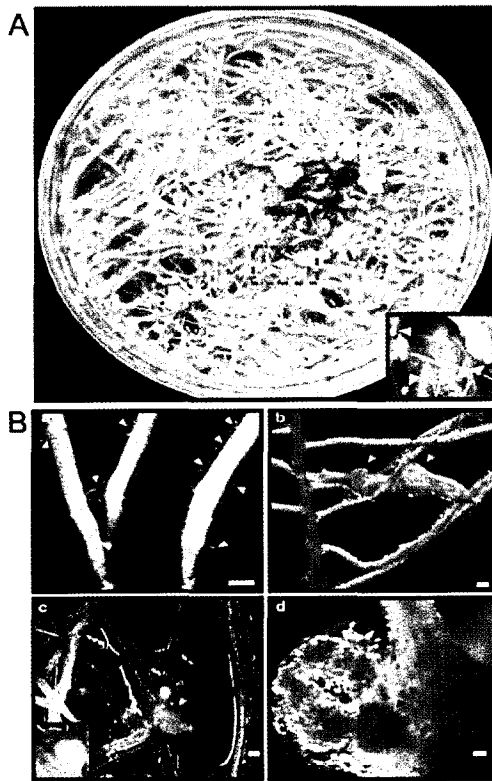


Fig. 3. *In vitro* micropropagation of root-knot nematode. **A.** Propagation of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on the roots of the tomato. Egg mass (yellow arrowheads). Inset shows the egg masses (photo was taken by a magnification power of five). **B.** Propagation of the root-knot nematode, *M. incognita*, on the hairy roots of the Oriental melon. The J2 (white arrowheads) gathering near the root tips 2 days after inoculation with surface-sterilized eggs (a). Bar=1 mm. Formation of root-knot (yellow arrowheads) in hairy roots 9 days after inoculation (b). Bar=1 mm. Egg mass (red arrow) and root-knot (yellow arrowhead) on hairy roots 4-5 weeks after inoculation (c). Bar=1 mm. Inset shows the egg mass (photo was taken by a magnification power of three). The root knot and egg mass (red arrow) was stained using acid fuchsin (d). Bar=50 μ m. Female in the root-knot shown by the black arrowhead. Figure adapted from Pak *et al.*, 2009.

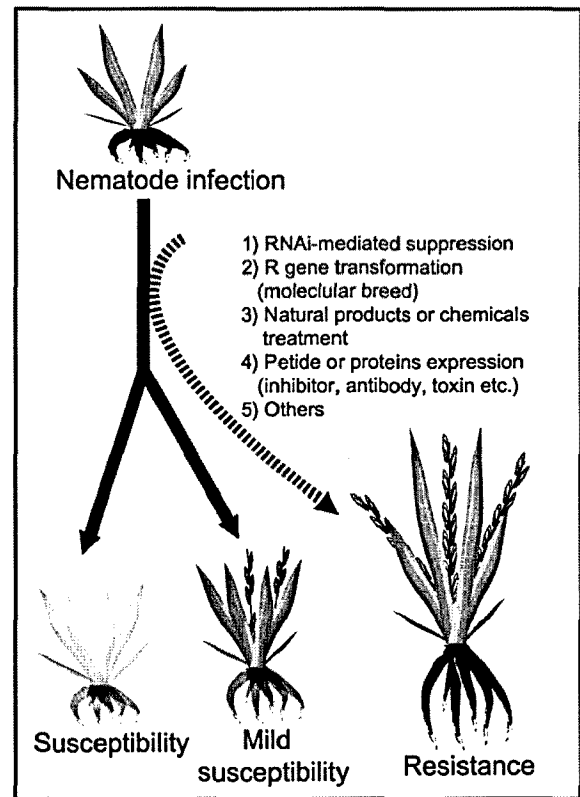


Fig. 4. Root-knot nematode infection and prevention/control strategies. Approaches to prevention/control can be classified as (1) RNAi-mediated suppression, (2) R gene transformation including molecular breeding, (3) Natural products or chemicals treatments, (4) the expression of peptide or proteins in susceptible plants, and (5) others (managing soil biology, crop rotations and pre-cultivation of cover crops, botanical nematicides treatment, the use of biocontrols, pre-cultivation of resistant plant, red plastic mulch, solarization and flooding).

적으로 줄여 사용이 금지될 약종이다. 따라서 이에 대한 효과적인 방제 대체제 마련을 위한 여러 연구들이 진행 중이다(Fig. 4). 이러한 연구들로는 크게 다음과 같다: 1)

선충의 유전정보 및 단백질 정보를 이용하여 RNA interference 억제 기작으로 선충 방제 연구 2) 식물 유래 저항성 유전자를 이용한 선충 방제 연구 3) 선충에 독성을 나타내는 단백질 및 펩타이드를 이용한 연구 4) 천연물이나 식물대사산물을 이용한 선충 방제 연구 5) 선충 기피 물질 및 식물을 이용한 연구 6) 친환경적 방제방법 등.

본 논문에서는 주로 생명공학 기술을 이용한 뿌리혹선충의 방제 및 예방에 대한 최신 연구동향을 문헌고찰을 통해 기술하고자 한다.

본 론

뿌리혹선충 유전정보 분석. 지난 수십 년 동안 여러 연구그룹에 의해서 뿌리혹선충(*Meloidogyne*)의 73,340개의 EST(expressed sequence tag)들이 GenBank에 등록되었으며, 뿌리혹선충의 EST를 대량 분석한 첫 연구는 McCarter 등(2003)이 *M. incognita*(고구마뿌리혹선충)로부터 1,625 EST cluster(*M. incognita*의 6-10% 유전자에 해당)를 예쁜꼬마선충의 유전체와 비교하여 뿌리혹선충의 유전자기능을 규명하였다. 또한 뿌리혹선충의 기주숙주 내 기생에 필요한 37개의 유전자(parasitism gene)들이 *M. incognita*의 esophageal gland에서 클로닝된 신호서열을 갖는 185

개의 EST서열을 이용하여 *in situ* hybridization법으로 증명되었다(Huang 등, 2003). 선충 감염시 초기 발현양이 증대되는 유전정보에 관한 연구는 Dubreuil 등(2007)이 *M. incognita*의 제 2기 침입기 유충과 세포내에 정착기인 제 3기 유충의 suppression subtractive library를 만들어 감염 초기에 증대되는 유전정보를 얻은 결과와 *M. javanica*(자바뿌리혹선충)를 토마토에 접종하여 4일과 7일 후에 생성된 초기단계의 거대세포 내에 있는 RNA를 미세절제법으로 추출하여 만든 library로부터 발현양이 증대된 유전정보를 분석한 결과가 있다(Fosu-Nyarko, 2009).

최근에 *M. incognita*와 *M. hapla*(당근뿌리혹선충)에 대한 전체 게놈의 염기서열이 두 연구그룹에 의해서 발표되었다(Abad 등, 2008; Opperman 등, 2008). Abad 등(2008)은 *M. incognita*의 게놈 크기는 47-51 Mb이며 19,212개의 단백질을 암호화한다고 보고하였다. 또한 이들의 연구결과로 예쁜꼬마선충의 게놈 크기와 비교하여 절반밖에 안 되는 게놈 크기로 예쁜꼬마선충과 비슷한 유전자수(20,072개)를 담기 위해서는 operon 수의 증대와 유전자상호 지역(intergenic region)의 평균 크기가 작게 구성되어 있다는 사실을 알게 되었으며, 하부식도부(subventral과 dorsal glands)에서 발현되는 뿌리혹선충의 기생에 관여하는 유전자의 체계적인 연구가 가능하게 되었다(Fig. 5).

Property	<i>M. incognita</i>		<i>C. elegans</i>
Life cycle (days)	Egg-J1-J2-J3-J4-adult (30-60)		Egg-J1-J2 (dauer)-J3-J4-adult (3)
Sex	Male, female		Male, hemaphrodite
Hatching stage	J2		J1
Egg layering (average number of eggs)	Egg mass (500-1000)		Egg (250-1000)
Gland	Two subventral and one dorsal glands		No
Stylet	Yes		No
Feeding habit	5-7 Giant cells, feeding tube		coli
Genome size (putative number of genes)	47-51 (19,212)		100 (29,972)
RNAi mechanism	Yes		Yes

Nematodes in figure are female and hemaphrodite.

Fig. 5. Properties comparison of *Meloidogyne incognita* and *Coenorhabditis elegans*.

*M. incognita*의 유전정보는 http://www.inra.fr/meloidogyne_incognita 웹 주소에 공개되어 있어 쉽게 필요한 유전정보를 찾아 볼 수 있다. 또한 Opperman 등(2008)은 뿌리혹선충의 다른 종인 *M. hapla*의 완전한 게놈서열 및 유전학적 지도의 초안을 완성하였다. 이들의 연구결과로 *M. hapla*의 게놈 크기는 54 Mb이며 14,420개의 단백질을 암호화하고 있음이 알려졌다. *M. hapla*에 대한 유전정보는 www.halpa.org 또는 www.rootknot.org 웹주소에서 정보를 얻을 수 있다. 이러한 2종의 뿌리혹선충의 유전정보는 식물기생 선충들의 비교 유전체학 등의 다양한 연구에 활용될 것으로 기대된다.

Wylie 등(2008)은 식물기생 선충을 포함한 36종류의 선충 유전정보를 이용하여 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 데이터베이스에 기초한 선충 유전자들의 대사경로 내에서의 기능과 예쁜꼬마선충의 RNAi 표현형과의 연관성을 쉽게 만들었다. 또한 Nagaraj 등(2008)은 식물 기생 선충을 포함한 39종류의 선충의 유전정보를 이용하여 excretory-secretory 및 secretome에 관여하는 유전자를 대량 분석하여 동물, 인체 및 식물 기생 선충의 단백질에 대한 정보를 제공하여 항선충 약물 및 백신개발에 이용 가능성을 제시하였다.

뿌리혹선충 단백질 분석. 숙주기생에 필요한 뿌리혹선충의 단백질 정보를 찾고자 하는 연구들이 또한 진행되었다. Jaubert 등(2002)은 *M. incognita*에서 분비되는 단백질들을 2D 전기영동을 실시하여 7개의 주요한 단백질들의 서열을 결정하였으며, calterculin이 subventral esophageal gland에 발현됨을 증명하였다. 최근에 대량의 단백질체 (proteome) 분석연구가 Bellafiore 등(2008)에 의해서 *M. incognita*를 0.4% resorcinol과 토마토 추출물로 gland를 자극하여 얻은 시료로부터 486개의 단백질 절편들의 펩타이드 정보를 분석하여 분비되는 단백질정보들이 구축되었고 대부분의 단백질이 subventral gland에 존재하고 있음이 증명되었다.

RNAi 작용 기작. RNAi(RNA interference)에 의한 post-transcriptional silencing은 dsDNA(double-stranded DNA)가 세포 내에서 siRNA(short interference RNA)로 변환된 후 특히 mRNA의 제거를 통해 발현을 억제하거나 또는 chromatin remodeling 과정을 통해 일어나는 것으로 예쁜꼬마선충을 포함하여, 초파리, 생쥐, 인체, 식물 등에서 작용기작이 잘 알려져 있다(Sijen 등, 2001)(Fig. 6). RNAi 작용 기작을 간략하면 다음과 같다. 세포밖에 있는 dsRNA는 transmembrane 영역을 가지고 있는 SID-1와 SID-2의 두 단백질에 의해서 세포 내에 들어오게 된다. 그 후 dsRNA는 argonaute 단백질의 한 종류인 RDE-4와 RNaseIII 활

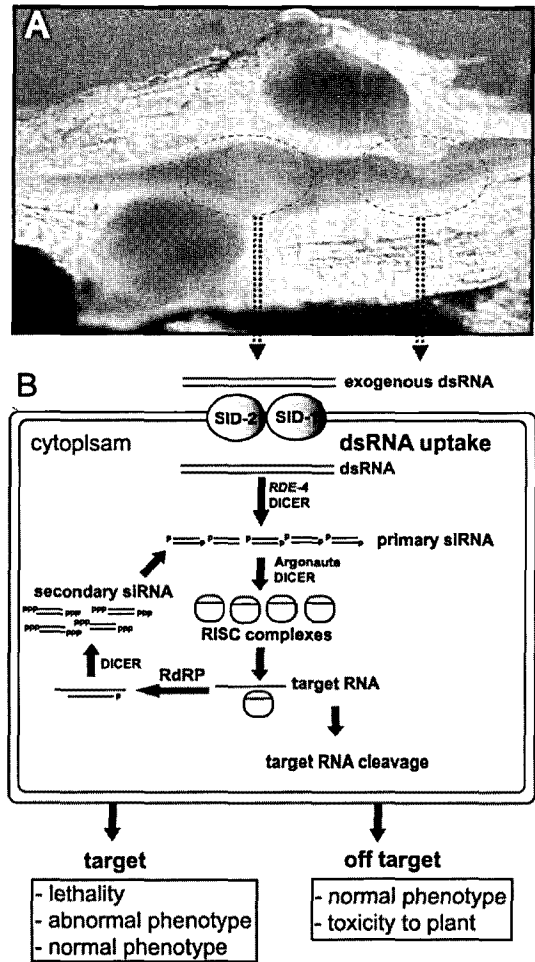


Fig. 6. A putative model for RNAi interference in *Meloidogyne incognita* based on the RNAi pathway of *Coenorhabditis elegans*. A. Female nematodes in the tomato root. B. A putative RNAi pathway of *M. incognita* in plant root. SID-1 and 2; systemic RNA interference defective (transmembrane proteins), RDE-4; RNAi defective-4 (dsRNA binding protein), Dicer; RNase III family of nucleases, RISC; RNA-induced silencing complex, RdRP; RNA-dependent RNA polymerase; siRNA; small interfering RNA. Figure modified and adapted from Rosso *et al.*, 2009.

성을 갖는 Dicer에 의해서 primary siRNA로 분해가 일어나게 되며, 이러한 primary siRNA는 RISC(RNA induced silencing complex)와 결합을 통하여 표적 RNA에 상보적으로 결합한 후 RdRP(RNA-dependent RNA polymerase)에 의해서 새로운 dsRNA 합성된 후 Dicer의 작용으로 secondary-type의 siRNA를 합성하여 세포내 RNAi 기작을 증폭하게 된다. 또한 이러한 일련의 RNAi 기작은 세포 내에서 유래하는 dsRNA에 의해서도 유사하게 일어나고 있고 관련 단백질에 대한 연구내용은 다음과 같은 참고 문헌에 잘 기술되어 있어 본 논문에서는 생략하기로 한

Table 2. Genes of plant parasitic nematodes silenced by transgenic plants and soaking method

<i>Meloidiogyne</i> species	Target gene	Target tissue or developmental stage	Phenotype or characterization	Si RNA source (plant-mediated or soaked with dsRNA)	Reference
<i>artiellia</i>	Chitin synthase	Egg	Delayed hatching	Soaked with dsRNA for 24-72 hr	Fanelli <i>et al.</i> , 2005
<i>incognita</i>	Calreticulin (<i>Mi-crt</i>) and polygalacturonase (<i>Mi-pg-1</i>) genes	Subventral esophageal glands	92% depletion of <i>Mi-crt</i> transcripts	Soaked with dsRNA for 4 hr	Rosso <i>et al.</i> , 2005
<i>incognita</i>	Dual oxidases (peroxidase and NADPH oxidase)	Extracellular matrix	Slightly increase of number of fusiform and saccate Reduction in egg numbers (up to 70%) at 35 days	Soaked with dsRNA (Adzuki bean)	Bakhetia <i>et al.</i> , 2005
<i>incognita</i>	Splicing factor and integrase	Unknown	Reduction of number of Egg mass and knots; reduction of number of Egg hatching; transparent nematode	Soaked with dsRNA for 28 hr Tobacco (45days)	Yadav <i>et al.</i> , 2006
<i>incognita javanija arenaria hapla</i>	Parasitism gene (<i>16D10</i>)	Subventral esophageal glands	Reduction of number of galls and gall size and eggs	Soaked with dsRNA (<i>Arabidopsis</i>)	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>javanica</i>	Putative transcription factor (<i>MjTis11</i>)	Egg and mature female	None Transcription level down	Tobacco	Fairbairn <i>et al.</i> , 2007
<i>incognita</i>	Glutathione-S-transferase (<i>Mi-gst</i>)	Esophageal glands	Reduction of number of egg mass	Soaked with dsRNA for 28 hr (tomato)	Dubreuil <i>et al.</i> , 2007
<i>incognita</i>	Cathepsin L cysteine proteinase (<i>Mi-cpl-1</i>)	Intestine of young and mature female	Reduction of number of established females producing eggs; female altered morphology (more roundness than wild type)	Soaked with dsRNA and infection in plant (tomato) at 21 dpi	Shingles <i>et al.</i> , 2007
<i>javanica</i>	Avirulence gene (<i>Cg-1</i>)	Unknown	Virulent on <i>Mi-1</i> tomato	Soaked with dsRNA for 48 hr	Gleason <i>et al.</i> , 2008

다(Kawaji와 Hayashizaki, 2008; Rosso 등, 2009).

RNAi 작용 기작 이용 뿌리혹선충의 유전자 발현 억제. RNAi 기작에 의해서 예쁜꼬마선충 유전자의 발현이 억제되는 것이 확인(Timmons과 Fire, 1998; Hannon, 2002) 된 이후로, 이러한 기작을 이용한 기술이 다른 종의 선충에서도 유전자의 기능규명 및 선충 방제연구에 적용되고 있다. 최근에 뿌리혹선충의 표적 유전자에 대한 RNAi 억제 효과를 증명하기 위하여 특이적인 dsRNA가 함유된 용액이나 dsRNA를 발현하는 식물체를 이용한 여러 연구가 진행되었다(Table 2). 침지법으로 dsRNA가 투여된 뿌리혹선충에서 RNAi 기작이 작용한다는 첫 연구결과는 Fanelli 등(2005)이 *M. artiellia*의 chitin synthase에 대한 RNAi 억제로 선충 알의 부화가 지연되는 것을 확인하였다. Bakhetia 등(2005)은 *M. incognita*의 dual oxidase (peroxidase와 NADPH oxidase) 효소의 일부분인 peroxidase dsRNA를 투여한 후 RNAi 억제에 의한 암컷의 형태학적

비율의 변화와 선충 한마리가 생산하는 알 수(fecundity)의 감소 효과를 증명하였다. 또한 RNAi 억제 효과가 유전자에 따라 투여 후 시간 별로 차이가 있음을 증명한 연구결과는 Rosso 등(2005)이 *M. incognita*의 두 개의 유전자(*Mi-pg-1*과 *Mi-crt*)의 투여 후 시간에 따른 전사영향 정도를 측정한 실험에서 *Mi-pg-1*의 경우 44시간에 전사영향에 최대 효과가 나타났고 *Mi-crt*는 68시간에는 RNAi 억제효과가 상실됨을 확인하였다. *M. incognita*의 초기 감염에 중요한 유전자를 찾고자 하는 시도들로는 Huang 등(2006)이 *M. incognita*의 *16D10*의 dsRNA를 rescorcinol과 투여한 선충에서 *16D10*의 전사량이 93-97%가 감소함을 확인하였고 애기장대에서 혹(gall)수가 74-81%가 감소함을 확인하였다. Dubreuil 등(2007)은 qRT-PCR(quantitative RT-PCR)을 범을 이용하여 J3의 subventral gland에서 발현양이 높게 존재하는 glutathione-S-transferase를 발굴하여 RNAi 억제효과로 토마토에서 egg mass 수가 감소됨

을 확인하였다. 한편으론 형질전환된 식물에서 dsRNA를 생성 후 선충에 전달하여 RNAi 억제효과를 확인하는 연구들이 진행되었다. Yadav 등(2006)은 *M. incognita*의 splicing factor와 integrase의 dsRNA를 생성하는 형질전환 담배를 이용하여 혹 수와 egg mass수의 감소, 알의 부화율 감소 및 선충 체색이 투명해지는 표현형을 관찰하였다. Fairbairn 등(2007)은 *M. javanica*의 잠정적인 전사인자, *MjTis11*의 dsRNA가 생성되는 담배 형질전환체에서 qRT-PCR법으로 *MjTis11*의 발현양이 감소됨을 확인하였다. 또한 Shingles 등(2007)은 *M. incognita*의 장내에 존재하는 cathepsin L cysteine proteinase, *Mi-cpl-1*의 전사억제 후 생식 기능을 갖는 암컷 수가 감소하고 암컷의 모습이 타원형의 방추모양 형태로 변형됨을 확인하였다. RNAi 억제기작을 저항성 유전자와 관련한 새로운 연구시도는 Gleason 등(2008)이 토마토의 R유전자(*Mi-1*)에 대응하는 *M. javanica*의 avirulence 유전자, *Cg-1*의 dsRNA를 침지법으로 *Cg-1*이 병 유발에 관여하고 있음을 증명하였다.

식물유래 저항성 유전자를 이용한 방제 및 한계점. 선충에 대한 저항성을 나타내는 6개의 저항성 유전자들이 토마토, 사탕무, 감자 등에서 현재 클로닝 되었으며, 10개의 저항성 유전자들이 mapping되었다. *Mi-1.2*는 토마토 야생 근연종인 *Solanum peruvianum*에서 클로닝된 유전자로 단백질 구조는 coiled coil, nucleotide-binding(NB), leucine-rich repeat(LRR) homology domain로 구성되어 있으며, *Mi-1.2* 유전자는 *Meloidogyne(M. incognita)*와 *M. javanica*와 진드기에 저항성을 갖는다고 알려져 있다(Milligan 등, 1998; Rossi 등, 1998; Vos 등, 1998). 이러한 저항성 유전자는 삽입수에 따라 dosage 효과로 homozygous 계통에서 선충 저항성을 더 강하게 나타낸다는 보고와 반대의 연구결과가 서로 상충되고 있다(Jacquet 등, 2005; Chen 등, 2006). 또한 저항성 유전자의 단점으로는 저항성이 모든 선충에 대해서 모두 높게 나타나지 않으며 저항성 유전자를 적용할 수 있는 작목범위가 넓지 않다는 것이다. 저항성 유전자의 적용한계를 나타내는 예로는 저항성 유전자인 *Hero A*를 뿌리혹선충에 저항성이 없는 토마토에 집어 넣으면 저항성을 나타내나 감자에 집어 넣으면 저항성을 나타내지 않는다는 보고가 있으며(Sobczak 등, 2005), 또한 *Mi-1.2* 유전자를 담배에 넣으면 효과가 없고, 가지에 넣으면 효과가 있다는 보고가 있다. 이러한 이유로는 저항성 유전자의 하위에 존재하는 유전자들과의 연결고리가 생성되지 않는 것으로 추측된다. 또한 저항성 유전자(*Mi-1.2*)를 포함하는 형질전환체를 세대 전진하면 저항성 감소가 나타난다는 연구 결과가 있으며(Goggin 등, 2004), *Mi* 유전자의 온도에 대한 민감성

으로 지역적 한계를 나타낼 수 있다는 문제도 제기되었다(Dropkin, 1969). 또 다른 부정적인 면을 시사하는 연구결과들은 저항성 유전자 도입결과로 수광성이 낮아진다는 것이 RoundupReady 대두에서 보고가 되었고, *Mi* 유전자가 도입된 *S. peruvianum*에서도 유사한 결과의 보고가 있다(Messenguer 등, 1991). 또한 저항성 유전자를 이용한 방제 방법은 선충의 변이로 인하여 선충 저항성 작물의 저항성 상실이 야기될 수 있다는 한계를 극복해야 하는 숙제를 안고 있다.

독성 단백질 및 펩타이드를 이용한 방제. 뿌리혹선충의 방제 또는 예방을 위하여 선충에 치사 또는 독성을 나타내는 단백질들과 펩타이드들을 발현하는 형질전환체 개발연구와 대사작용에 관여하는 단백질 분해효소의 억제제를 이용한 연구들이 진행되었다. 예로는 선충 장속에 있는 시스테인 프로테아제의 억제제(cysteine protease inhibitor)의 한 종류인 Oc-1(cystatin)의 변이체 Oc-ID86를 발현하는 벼에서 *M. incognita*의 감염이 55%로 감소했다는 보고(Vain 등, 1998)와 감수성 감자에 cystatin을 발현하게하면 선충 저항성 효과가 있다고 알려져 있다(Urwin 등, 2001). 또한 선충에 대하여 부분적으로 저항성을 갖는 저항성 유전자와 cystatin을 조합하면 저항성이 더 증가된다는 연구보고가 있다(Urwin 등, 2003). 대사관련 효소의 억제제를 이용한 연구로는 Vishnudasan 등(2005)이 세린프로테아제 및 alpha-amylase의 억제제를 이용하여 선충 방제 효과를 확인하였으며, cowpea trypsin inhibitor (CpTI)를 발현하는 감자에서 *M. incognita* 암컷의 생식력이 영향을 받는다고 알려져 있다(Urwin 등, 1998).

*Bacillus thuringiensis*는 선충 및 곤충에 독성 효과가 있는 Crystal(Cry) 단백질들을 발현하며 이중 Cry5B, Cry6A, Cry14A, Cry21A가 선충에 독성 효과가 있다고 알려져 있다(Wei 등, 2003). Cry5B와 Cry6A의 선충 치사 효과가 예쁜 꼬마 선충에서 선충 번식력과 생존력에 영향을 주는 것이 확인(Marroquin 등, 2000)된 이후로, 합성 유전자 Bt Cry6A를 발현하는 토마토 모상근에 *M. incognita*를 감염하면 혹 생성에는 영향을 주지 않았으나 알 생성율이 56-76%로 감소하여 대략 4배의 선충의 후손 감소 효과를 나타내었다(Li 등, 2007). 또한 선충 방제를 위하여 다양한 단백질들(collagenases, chitinases, ribosome inactivating proteins, patatin, 비특이성 lipid acyl hydrolase)을 이용한 연구가 진행되어 선충에 대한 저항성 효과가 있다고 보고되었다(Burrows와 De Waele, 1997; Jung 등, 1998).

선충방제를 위하여 단백질을 이용한 또 다른 연구로는 식물에서 유래하는 당단백질인 lectin의 한 종류인

concanavalin A를 토마토 뿌리에 처리 후에 *M. incognita*의 흡이 대조군에 비하여 75% 감소하였다는 보고(Marban-Mendoza 등, 1987)와 snowdrop lectin(GNA)를 사용하여 oilseed rape, 감자 및 애기장대에서 항선충 활성의 효과가 보고 되었다(Burrows 등, 1997, 1998; Ripoll 등, 2003).

또 다른 시도로는 선충 단백질에 특이적으로 결합하는 plantibodies를 이용한 연구들이 진행 되었다. 예를 들면, salivary secretions에 대한 항체 6D₄를 사용하여 항선충 효과를 기대하였으나 크게 효과가 없었지만(Baum 등, 1996), cuticle과 amphid sensory organs에 대한 항체는 *Meloidogyne*와 *Globodera* 종들에 대해 침투와 이동에 대한 효과가 있다고 보고 되었다(Fioretti 등, 2002; Sharon 등, 2002).

선충 방제에 이용되는 대사산물. 살선충제의 세계 시장규모는 7-10억 달러로 알려져 있으며, 선충방제에 효과가 높은 화학적 물질이 주로 사용되어왔다. 그러나 이들 화합물들은 여러 부정적인 면이 대두되면서 현재는 사용이 금지되거나 억제되고 있는 추세다. 예를 들면, 선충방제에 사용되었던 organophosphate와 carbamate는 신경에 비특이적인 독성을 나타내는 특성을 가지고 있어 인체에 해로운 영향이 있으며, 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP)는 인체에 불임을 초래한다는 보고가 있다. 또한 methyl bromide는 오존 파괴를 일으키는 물질로 현재 사용이 줄고 있는 실정이나 1970년 이후로 효과적인 새로운 선충치사 화합물은 상용화되지 않고 있다. 이러한 필요성에 의해 식물에서 살선충 물질을 찾고자 하는 여러 시도들이 있었다. 식물에서 발견되는 선충치사 물질은 주로 polythienyl, alkaloid, lipid, isoflavonoid와 diterpenoid 등으로 알려져 있다(Chitwood, 2002; Kaplan과 Keen, 1980; Valette 등, 1998). 이러한 식물유래 물질을 이용한 선충에 대한 저항성관련 연구로는 Veech와 McClure(1977)가 목화에서 terpenoid aldehyde 축적은 *Meloidogyne*에 저항성을 나타낸다는 것을 발견하였고, 다른 연구그룹은 phytoalexin(coumestrol, psoralidin, phytoecdysteroid 20-hydroxyecdysone(20E), flavones C-glycoside, *O*-methylapigenin-*C*-deoxyhexoside-*O*-hexoside)들이 선충에 저항성을 나타낸다고 보고하였다(Rich 등, 1977; Soriano 등, 2004a, b). 또한 곰팡이로부터 반합성된 기생억제 물질(macrocyclic lactone)들이 알려져 있다(Yoon 등, 2004).

선충의 기피 물질. 식물에서 유래한 선충을 유인할 수 있는 물질과 기피물질관련 연구 또한 선충에 대한 예방을 위하여 진행되었다. 상처가 난 식물에서 방출되는 (E)-beta-caryophyllene는 선충 유인물질로 알려져 있다(Rasmann 등, 2005). 반면, 아스파라거스 뿌리에서 분비되는 glycoside는 선충(*Paratrichodorus minor*)에 기피물질로 작용하고

오이에서 분비되는 curcubitacin triterpenoids는 *M. incognita*의 기피물질로 작용한다고 알려져 있다(Kaplan과 Keen, 1980).

결론과 전망

뿌리혹선충의 작물에 대한 피해를 방지하거나 최소화하기 위하여 식물 유래 저항성 유전자를 이용한 분자유종 연구, 선충 장내에 존재하는 프로테아제 억제제를 이용한 저항성 식물 개발연구, 천연물을 이용한 선충치사물질 또는 기피물질 등의 관련 연구, 환경과 인체에 문제점을 야기하는 화학적 방제 대체 물질개발 및 친환경적인 방제방법 등의 다양한 연구가 진행 중이며 가시적인 결과를 나타내고 있다. 그러나 저항성 유전자 이용 연구와 선충치사 단백질을 이용한 연구에서 대두된 선충의 변이에 따른 저항성 작물의 항선충 효과 저하 및 적용 작목의 한계 등의 문제점으로 새로운 접근 방법이 필요하게 되었다. 최근에 선충 유전정보를 이용한 RNAi 억제 기작을 활용한 선충 방제 연구는 새로운 대안방법으로 주목을 받고 있으며, 현재는 주로 선충 기생에 필수적인 유전자(peptide 16D10, chorismate mutase, calreticulin, ubiquitin extension protein, 세포벽 분해 효소[β-1,4-endoglucanases (cellulases), pectate lyase, expansin과 endo-1,4-β-xylanase]를 발굴하여 발현억제 시 방제 효과가 있음을 증명하는 쪽으로 많은 연구가 진행 중이다. 이러한 RNAi 억제 기작 연구는 최근에 2종의 뿌리혹선충의 완전한 게놈 서열의 결정으로 보다 풍부해진 유전정보 자료를 바탕으로 숙주에 기생하기 위해 필요한 선충 유전자들의 폭넓은 기능규명 연구 및 선충의 발생단계에 필요한 유전자들의 기능규명 연구에 응용될 것으로 전망된다. 또한 다양한 선충의 게놈서열 분석 및 대량의 EST 분석으로 유전정보의 다양성을 가질 것으로 예측되며, 단백질체(proteome)와 전사체(transcriptome) 연구를 통한 유전자의 발현 기초연구를 바탕으로 표적 단백질의 발굴을 통한 억제 또는 방제 물질 개발 연구가 진행될 것으로 전망한다. 한편으로는 이러한 생명공학을 이용한 선충 방제 또는 예방하고자 하는 기술 이외에 친환경적인 방법들(토양개선, 식물성 정유를 이용한 살선충효과, 이모작 활용, 붉은색 비닐로 뿌리덮개 사용, 태양열이용 살균 및 담수 등)의 연구가 활발히 추진되고 있다. 이러한 친환경적인 방제 방법과 생명공학을 이용한 저항성 작물의 적절한 혼용을 통하여 작물을 재배하는 농업인에게 큰 이로움과 소득증대를 주는 분야로 뿌리혹선충의 방제분야가 자리매김할 것으로 기대된다.

감사의 글

논문 작성에 조언과 수정의 도움을 주신 한혜림(국립산림과학원)박사께 깊이 감사를 드립니다. 논문에 인용된 연구 결과는 바이오 그린21 연구비(20080401034031)와 농촌진흥청 국립농업과학원 연구비(200901FHT-010407539)에 의해서 지원되었습니다.

참고문헌

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., *et al.* 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat. Biotechnol.* 26: 909-915.
- Bakhetia, M., Charlton, W., Atkinson, H. J. and McPherson, M. J. 2005. RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 1099-1106.
- Baum, T. J., Hiatt, A., Parrott, W. A., Pratt, L. H. and Hussey, R. S. 1996. Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the root-knot nematode. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9: 382-387.
- Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M. N., Abad, P., Shih, P. and Briggs, S. P. 2008. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS. Pathog.* 4: e1000192.
- Chen, R. G., Zhang, L. Y., Zhang, J. H., Zhang, W., Wang, X., Ouyang, B., Li, H. X. and Ye, Z. B. 2006. Functional characterization of *Mi*, a root-knot nematode resistance gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *J. Int. Plant Biol.* 48: 1458-1465.
- Chitwood, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 221-249.
- Dropkin, V. H. 1969. Cellular responses of plants to nematode infections. *Annu. Rev. Phytopathol.* 7: 101-122.
- Dubreuil, G., Magliano, M., Deleury, E., Abad, P. and Rosso, M. N. 2007. Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytol.* 176: 426-436.
- Fairbairn, D. J., Cavallaro, A. S., Bernard, M., Mahalinga-Iyer, J., Graham, M. W. and Botella, J. R. 2007. Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta.* 226: 1525-1533.
- Fanelli, E., Di Vito, M., Jones, J. T. and De Giorgi, C. 2005. Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. *Gene.* 349: 87-95.
- Fioretti, L., Porter, A., Haydock, P. J. and Curtis, R. 2002. Monoclonal antibodies reactive with secreted-excreted products from the amphids and the cuticle surface of *Globodera pallida* affect nematode movement and delay invasion of potato roots. *Int. J. Parasitol.* 32: 1709-1718.
- Fosu-Nyarko, J., Jones, M. G. and Wang, Z. 2009. Functional characterization of transcripts expressed in early-stage *Meloidogyne javanica*-induced giant cells isolated by laser microdissection. *Mol. Plant Pathol.* 10: 237-248.
- Gleason, C. A., Liu, Q. L. and Williamson, V. M. 2008. Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene *Mi-1* leads to acquisition of virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 576-585.
- Goddijn, O. J., Lindsey, K., van der Lee, F. M., Klap, J. C. and Sijmons, P. C. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-*gusA* fusion constructs. *Plant J.* 4: 863-873.
- Goggin, F. L., Shah, G., Williamson, V. M. and Ullman, D. E. 2004. Instability of *Mi*-mediated nematode resistance in transgenic tomato plants. *Mol. Breeding* 13: 357-364.
- Hannon, G. J. 2002. RNA interference. *Nature* 418: 244-251.
- Hartman, K. M. and Sasser, J. N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: Barker, K. R., Carter, C. C. and Sasser, N. (Eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. II. Methodology*. Raleigh, USA, North Carolina State University: 69-77.
- Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J. and Hussey, R. S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 14302-14306.
- Huang, G., Gao, B., Maier, T., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J. and Hussey, R. S. 2003. A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 376-381.
- Jacquet, M., Bongiovanni, M., Martinez, M., Verschave, P., Wajnberg, E. and Castagnone-Sereno, P. 2005. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathol.* 54: 93-99.
- Jaubert, S., Ledger, T. N., Laffaire, J. B., Piotte, C., Abad, P. and Rosso, M. N. 2002. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121: 205-211.
- Jones, M. G. and Northcote, D. H. 1972. Nematode-induced syncytium-a multinucleate transfer cell. *J. Cell Sci.* 10: 789-809.
- Jung, C., Cai, D. and Kleine, M. 1998. Engineering nematode resistance in crop species. *Trends Plant Sci.* 3: 266-271.
- Kaplan, D. T. and Keen, N. T. 1980. Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. *Revue Nématol.* 3: 123-134.
- Kawaji, H. and Hayashizaki, Y. 2008. Exploration of small

- RNAs. *PLoS. Genet.* 4: e22.
- Li, X. Q., Wei, J. Z., Tan, A. and Aroian, R. V. 2007. Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematicidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *Plant Biotechnol. J.* 5: 455-464.
- Marban-Mendoza, N., Jeyaprakash, A., Jansson, H. B., Damon, R. A. and Zuckerman, B. M. 1987. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. *J. Nematol.* 19: 331-335.
- Marroquin, L. D., Elyassnia, D., Griffiths, J. S., Feitelson, J. S. and Aroian, R. V. 2000. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155: 1693-1699.
- McCarter, J. P. 2009. "Molecular Approaches Toward Resistance to Plant-Parasitic Nematodes", Chapter in Cell Biology of Plant Nematode Parasitism, Berg, R. H. and C. G. Taylor eds., Series: Plant Cell Monographs, Vol. 15, Springer-Verlag Press, Berlin.
- McCarter, J. P., Mitreva, M. D., Martin, J., Dante, M., Wylie, T., Rao, U., Pape, D., Bowers, Y., Theising, B., Murphy, C. V., Kloek, A. P., Chiapelli, B. J., Clifton, S.W., Bird, D. M. and Waterston, R. H. 2003. Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. *Genome Biol.* 4: R26.
- Messeguer, R., Ganal, M., Devicente, M. C., Young, N. D., Bolkan, H. and Tanksley, S. D. 1991. High-resolution RFLP map around the root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 82: 529-536.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. and Williamson, V. M. 1998. The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10: 1307-1319.
- Nagaraj, S. H., Gasser, R. B. and Ranganathan, S. 2008. Needles in the EST Haystack: Large-Scale Identification and Analysis of Excretory-Secretory (ES) Proteins in Parasitic Nematodes Using Expressed Sequence Tags (ESTs). *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2: e301.
- Opperman, C. H., Bird, D. M., Williamson, V. M., Rokhsar, D. S., Burke, M., Cohn, J., Cromer, J., Diener, S., Gajan, J., Graham, S., Houfek, T. D., Liu, Q., Mitros, T., Schaff, J., Schaffer, R., Scholl, E., Sosinski, B. R., Thomas, V. P. and Windham, E. 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 14802-14807.
- Pak, H. K., Sim, J. S., Rhee, Y., Ko, H. R., Ha, S. H., Yoon, M. S., Kang, C. H., Lee, S., Kim, Y. H. and Hahn, B. S. 2009. Hairy root induction in Oriental melon (*Cucumis melo*) by *Agrobacterium rhizogenes* and reproduction of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 98: 219-228.
- Rasmann, S., Kollner, T., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J. and Turlings, T. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434: 732-737.
- Rich, J. R., Keen, N. T. and Thomason, I. J. 1977. Association of coumestans with the hypersensitivity of lima bean roots to *Pratylenchus scribneri*. *Physio. Plant Path.* 10: 105-116.
- Ripoll, C., Favery, B., Lecomte, P., Van Damme, E., Peumans, W., Abad, P. and Jouanin, L. 2003. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Sci.* 164: 517-523.
- Rossi, M., Goggin, F.L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E. and Williamson, V. M. 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9750-9754.
- Rosso, M. N., Dubrana, M. P., Cimbolini, N., Jaubert, S. and Abad, P. 2005. Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 18: 615-620.
- Rosso, M. N., Jones, J. T. and Abad, P. 2009. RNAi and Functional Genomics in Plant Parasitic Nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 207-232.
- Sasser, J. N. 1980. Root-knot nematodes: A global menace to crop production. *Plant Dis.* 64: 36-41.
- Sharon, E., Spiegel, Y., Salomon, R. and Curtis, R. H. C. 2002. Characterization of *Meloidogyne javanica* surface coat with antibodies and their effect on nematode behaviour. *Parasitology* 125: 177-185.
- Shingles, J., Lilley, C. J., Atkinson, H. J. and Urwin, P. E. 2007. *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. *Exp. Parasitol.* 115: 114-120.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. and Fire, A. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476.
- Subczak, M., Avrova, A., Jupowicz, J., Phillips, M. S., Ernst, K. and Kumar, A. 2005. Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance *Hero* gene. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 18: 158-168.
- Soriano, I. R., Asenstorfer, R. E., Schmidt, O. and Riley, I. T. 2004a. Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. *Phytopathol.* 94: 1207-1214.
- Soriano, I. R., Riley, I. T., Potter, M. J. and Bowers, W. S. 2004b. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. *J. Chem. Ecol.* 30: 1885-1899.
- Timmons, L. and Fire, A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854.
- Urwin, P. E., Green, J. and Atkinson, H. J. 2003. Expression of a plant cystatin confers partial resistance to *Globodera*, full

- resistance is achieved by pyramiding a cystatin with natural resistance. *Mol. Breeding* 12: 263-269.
- Urwin, P. E., McPherson, M. J. and Atkinson, H. J. 1998. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta* 204: 472-479.
- Urwin, P. E., Troth, K. M., Zubko, E. I. and Atkinson, H. J. 2001. Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Mol. Breeding* 8: 95-101.
- Urwin, P. E., Lilley, C. J., McPherson, M. J. and Atkinson, H. J. 1997. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J.* 12: 455-461.
- Vain, P., Worland, B., Clarke, M. C., Richard, G., Beavis, M., Liu, H., Kohli, A., Leech, M., Snape, J. W., Atkinson, H. and Christou, P. 1998. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (OC-IAD86) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 96: 266-271.
- Valette, C., Andary, C., Geiger, J. P., Sarah, J. L. and Nicole, M. 1998. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Phytopathol.* 88: 1141-1148.
- Veech, J. A. and McClure, M. A. 1977. Terpenoid aldehydes in cotton roots susceptible and resistant to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* 9: 225-229.
- Vishnudasan, D., Tripathi, M. N., Rao, U. and Khurana, P. 2005. Assessment of nematode resistance in wheat transgenic plants expressing potato proteinase inhibitor (*PIN2*) gene. *Transgenic Res.* 14: 665-675.
- Vos, P., Simons, G., Jesse, T., Wijbrandi, J., Heinen, L., Hogers, R., Frijters, A., Groenendijk, J., Diergaarde, P., Reijans, M., Fierens-Onstenk, J., de Both, M., Peleman, J., Liharska, T., Hontelez, J. and Zabeau, M. 1998. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nat. Biotechnol.* 16: 1365-1369.
- Wei, J. -Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.-C. and Aroian, R. V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2760 - 2765.
- Wider, T. L. and Abawi, G. S. 2000. Mechanism of suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage by a green manure of Sudan grass. *Plant Dis.* 84: 562-568.
- Wiggers, R. J., Starr, J. L. and Price, H. J. 1990. DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 80: 1391-1395.
- Wylie, T., Martin, J., Abubucker, S., Yin, Y., Messina, D., Wang, Z., McCarter, J. P. and Mitreva, M. 2008. NemaPath: online exploration of KEGG-based metabolic pathways for nematodes. *BMC Genomics.* 9: 525.
- Yadav, B. C., Veluthambi, K. and Subramaniam, K. 2006. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Mol. Biochem. Parasitol.* 148: 219-222.
- Yoon, Y., Kim, E., Hwang, Y. and Choi, C. 2004. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 626-634.