



## **Лекция 9. Тема: “Гены устойчивости и их продукты”**

Вопросы:

1. Молекулярно-генетические основы устойчивости растений и вирулентности патогенов. Иммунный ответ растений.
2. Гены устойчивости у растений – R-гены.
3. PR-белки, антивирусные белки, ингибиторы протеиназ, лигнин, гликопротеины и др. Системная приобретенная устойчивость. Гены устойчивости злаковых культур

# Иммунитет растений

Иммунитет растений - это невосприимчивость, определяемая иммунной системой растений, которая поддерживает постоянство клеточного состава организма и отражает инфицирование фитопатогенов: бактерий, вирусов, грибов и других болезнетворных организмов. В данном случае иммунитет рассматривается, как способность организма отличать чужеродный материал от своего.

**Иммунный ответ растений** состоит из двух видов реакций:

1. Распознании молекул, типичных для микроорганизмов.
2. Ответ на патогенные факторы грибов, вирусов, бактерий.

# Гены устойчивости растений

Гены, кодирующие детерминанты индуцируемого иммунитета называют генами устойчивости.

Специализированные эффекторы патогена, которые распознаются продуктами генов устойчивости, называют также **белками авирулентности**. Соответственно, гены кодирующие эти белки называют **генами авирулентности**.



## Гены устойчивости растений – R-гены

**Гены устойчивости у растений – R-гены.** В настоящее время известны последовательности более, чем 40 R-генов.

R-гены определяют устойчивость к различным патогенам: вирусам, бактериям, грибам, нематодам и др. Сходство R-генов свидетельствует об одинаковой природе образования сигнальных событий при формировании защитной реакции растений.

**Все R-гены сгруппированы в 5 классов.** Разнообразие R-генов прямо связано с организацией их генома. **Различные R-локусы могут находиться в одном из четырёх состояний.** Часто это один ген со множеством аллелей.

В отдельных районах генома растений, R-гены для грибных, бактериальных и вирусных патогенов локализованы на хромосоме на очень близком расстоянии друг от друга (1-2 сМ). Так, у арабидопсиса выявлено пять R-ген-богатых районов. **Такие ассоциации R-генов называются главными комплексами устойчивости (MRCs - major resistance complexes).**

# Гены устойчивости растений

**Гены устойчивости являются полифункциональными, они придают устойчивость к нескольким патогенам.**

Например, у растения рожь, гены устойчивости к разным видам ржавчины локализованы на коротком сегменте хромосомы IR. Возможно, это один ген.

**Гены устойчивости мутируют с высокой частотой.**

Например, после облучения  $\gamma$ -лучами обнаружено 2,3 % устойчивых к мучнистой росе мутантов растений ячменя (контроль — 0,7 %); 2,7 % устойчивых к ржавчине мутантов льна; 0,1 % устойчивых к пирикуляриозу мутантов риса.

Предполагают, что продукты генов устойчивости имеют по крайней мере, **две функции**:

- **рецепторов** (узнают элиситоры патогена);
- **медиаторов** (передают сигнал от рецептора на геном).

Используя методы мутагенеза эти функции иногда удается разделить. Например, получены серии мутантов кукурузы и *Arabidopsis thaliana*, в незараженных тканях которых формируются некрозы и протекают внутриклеточные процессы, как и при несовместимых инфекциях.

Мутации, в сайте узнавания могут снижать специфичность рецепции; мутации в сайте активации вызывают активацию иммунного ответа.

## Картирование генов устойчивости

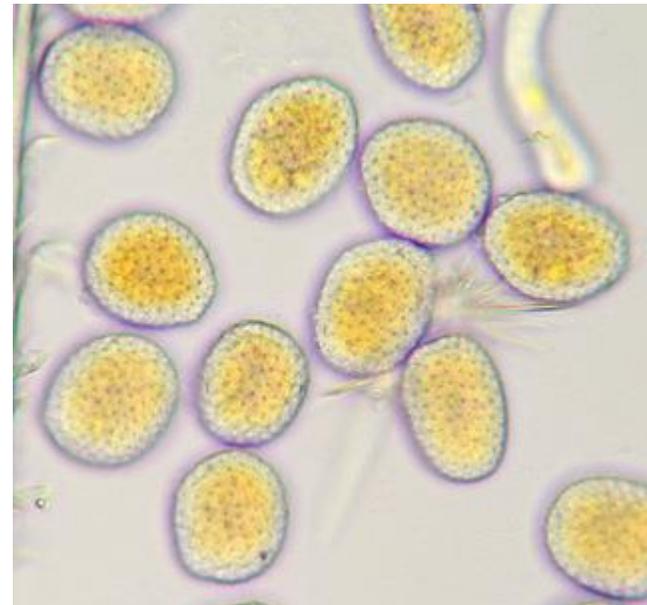
Картирование генов устойчивости растений к патогенам показало **три типа** локализации генов устойчивости:

- **одионое мультиаллельное**: один локус имеет много кодоминантных аллелей, которые контролируют устойчивость к разным расам патогена;
- **одионое диаллельное**: два аллеля одного локуса контролируют устойчивость и восприимчивость, при этом устойчивость доминантна;
- **сцепленное**: число ди- и мультиаллельных локусов сцеплены, они образуют блок фенотипически сходных генов, которые определяют устойчивость к одной или нескольким болезням.

Взаимодействие белков устойчивости и белков авирулентности на генетическом уровне представляет собой взаимодействие, называемое взаимодействием «ген-на-ген» впервые обнаружено фитопатологом Г. Флором в 1940-х при изучении взаимодействия растений льна с возбудителем ржавчины грибом *Melampsora lini*.



При заражении разных сортов льна различными биотипами *Melampsora lini*, Г. Флор обнаружил, что полученные данные хорошо объясняют предположение, что каждому гену устойчивости растения, имеющему доминантный аллель устойчивости, соответствует комплементарный ген гриба, имеющий доминантный аллель авирулентности.



## Гены устойчивости

При взаимодействии ген-на-ген устойчивость растений является специфической и индуцируется в случае, если продукты генов устойчивости растения распознают продукты генов, определяющих авирулентность фитопатогена.

Позднее гипотеза Г.Флора подтверждена для многих других патосистем, включающих различные растения и различные патогены: вирусы, бактерии, грибы, нематоды, насекомые и хищные цветковые растения.

У льна обнаружено около 30 кодоминантных генов устойчивости к расам ржавчины *M. lini*, они расположены в пяти локусах:

в локусе L картировано 13 аллельных генов;

в сложном локусе M - 7 тесно сцепленных генов; в локусе P - 5; в локусе N - 3; в локусе K - один ген.

У пшеницы обнаружены гены H, M, T и R, контролирующие устойчивость растений к головне. Гены устойчивости образуют одну группу сцепления и рекомбинируют с частотой от 15 до 37 %.

У ячменя в V хромосоме обнаружен блок из пяти локусов, определяющих устойчивость к мучнистой росе; в одном из локусов — M1a — картировано более 30 кодоминантных аллелей.

Например, у клевера устойчивость к расам 1, 3, 7, 8 и 10 возбудителя мучнистой росы контролируют аллельные или тесно сцепленные гены.

Гены *R* кодируют сравнительно небольшое число типов белков с общими консервативными аминокислотными последовательностями.

В число таких общих структурных тем входят сайт связывания нуклеотидов, обогащенный лейцином, область с гомологией цитоплазматического домена рецепторного белка Toll у *Drosophila* и рецептора интерлейкина-1 млекопитающих, суперспиральная структура, трансмембранный домен и домен серин/треонин-специфической протеинкиназы .

Основное количество генов устойчивости растений кодируют внутриклеточные белки, имеющие домены **NBS** и **LRR**.

Сайты связывания нуклеотидов (NBS) присутствуют в многочисленных АТФ и ГТФ-связывающих белках и найдены у представителей многих белковых семейств.

Домены NBS белков-продуктов генов устойчивости растений характеризуются несколькими высоко консервативными аминокислотными участками, включая связывающую фосфат петлю (Р-петлю) и киназные сайты.

Белки, кодируемые генами устойчивости, являются рецепторами, которые непосредственно либо опосредованно распознают присутствие эффекторных белков патогенов в растительной клетке или в апопласте.

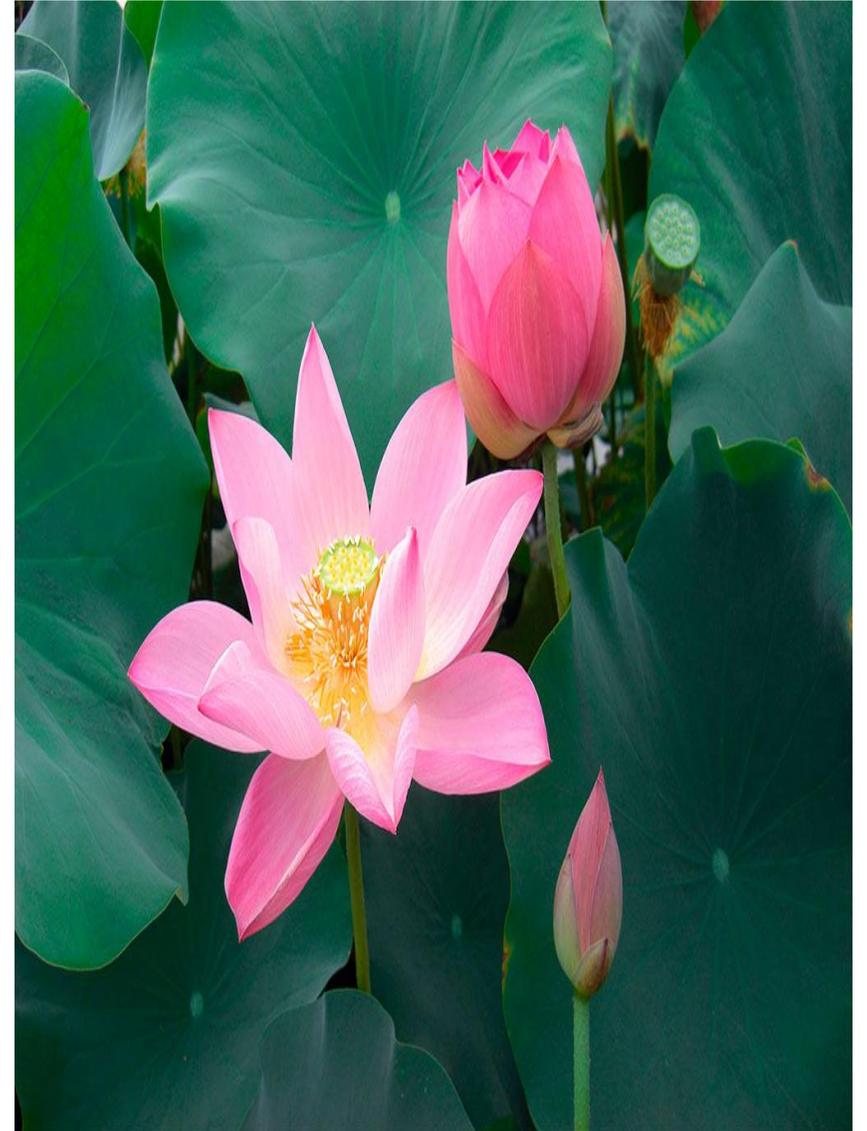
Эффектор патогена, который распознается белками устойчивости, называют **белком авирулентности**. Далее запускаются реакции иммунитета, индуцируемого эффекторами патогенов.

Эта форма иммунитета является быстрой и более сильной версией иммунитета, индуцируемого ассоциированными с молекулярными структурами фитопатогена.

Однако качественных различий между этими формами иммунитета нет; рассмотренные выше реакции устойчивости растений наблюдаются и в одном, и в другом случаях.

Предполагают прямое взаимодействие белков устойчивости и авирулентности в цитоплазме растительной клетки, поскольку имеются экспериментальные доказательства.

В этих случаях взаимодействие проходит по типу рецептор-лиганд, где рецептором служит белок устойчивости, а лигандом – белок авирулентности.



## PR-белки (pathogenesis-related proteins)

PR-белки (pathogenesis-related proteins) или белки, связанные с патогенезом, были впервые обнаружены вирусологами в листьях сорта табака, который реагировал реакцией СВЧ на заражение ВТМ.

Различные PR-белки были обнаружены у многих видов растений. Термин «белки, связанные с патогенезом», означает группу белков, которые индуцируются в растении в ответ на грибные, бактериальные, вирусные, вириодные болезни, а также некоторые химикаты.

PR-белки обладают определенными общими свойствами: они растворимы только в кислых условиях (рН 3), присутствуют в экстрацеллюлярной жидкости и высоко устойчивы к деградации протеолитическими ферментами. Экстрацеллюлярная жидкость вокруг некротической зоны имеет низкое значение рН и высокую протеолитическую активность, поэтому обладающие соответствующими свойствами белки должны быть хорошо адаптированы к этим условиям. Некоторые PR-белки (например, томата и картофеля) являются основными, их могут разрушить протеолитическими ферменты.

# PR-белки

Обнаружено, что у растений табака все PR-белки разделяются на несколько групп. Каждый кислый экстрацеллюлярный белок имеет цифру, обозначающую группу, а также различными буквами: «а», «b», «с» и т. д. Нумерация основывается на относительной мобильности при электрофорезе в неденатурирующей гелевой системе.

Различные белки, обозначенные одним и тем же номером (например, PR-1а, PR-1b, PR-1с), серологически родственны, имеют близкую молекулярную массу и обладают частичным сходством в аминокислотной последовательности.

Гены, кодирующие PR-белки, экспрессируются разными сигнальными путями: PR-1, PR-5 индуцируются салициловой кислотой (СК).

Ген PR-4 индуцируется СК, жасмоновой кислотой (ЖАК) и этиленом,

Ген PR-12 (*Arabidopsis defensine gene*) индуцируется этиленом и ЖАК, но не СК.

Накопление PR-белков при инфицировании патогенами, вызывающими некроз и приобретение растениями устойчивости к последующему заражению, позволили предположить, что **PR-белки из группы 1 участвуют в системной приобретенной устойчивости.**

# PR-белки

## PR-1

## тип

## белков

Среди белков, накапливающихся в листьях табака в ответ на инфицирование ВТМ, найдены кислые формы PR-1a, PR-1b и PR-1c, которые имеют сходную молекулярную массу и аминокислотную последовательность. Эти белки были обнаружены в инфицированных горохе, картофеле, кукурузе, ячмене и томате. Широкое распространение белков типа PR-1, как у однодольных, так и у двудольных растений, подтверждает их важную роль в ответах растений на стресс.

Другую подгруппу составляют **основные PR-подобные белки**. По аминокислотной последовательности они на 65 % похожи на кислые белки табака. По аналогии с кислыми PR-белками основные белки содержат гидрофобный N-терминальный участок, состоящий из 30 аминокислот, который, возможно, функционирует как сигнальный пептид, необходимый для прохождения через мембрану. Геном табака может содержать свыше 6 генов, соответствующим основным PR-белкам. Белки группы PR-1 из листьев томата ингибируют прорастание зооспор и патогенность *Phytophthora infestans*.

Накопление PR-белков при инфицировании патогенами, вызывающими некроз и приобретение растениями устойчивости к последующему заражению, позволили предположить, что PR-белки из группы 1 участвуют в **системной приобретенной устойчивости**.

# PR-белки

**PR-2 тип белков:  $\beta$ -1,3-глюканазы**

**PR-3 тип белков: хитиназы**

**PR-4 тип белков**

PR-4 белки разделяют на 2 подкласса. Подкласс I представляет собой хитин-связывающие белки с мм 13-14,5 кДа. Они имеют сходство с хитин-связывающим лектином - хевеином. Белки из обоих классов имеют широкий спектр антигрибной активности. Серологически сходные белки накапливаются в апопластной жидкости томатов, зараженных

*Cladosporium fulvum*.

**PR-5 тип белков: тауматиноподобные белки.**

# Антивирусные белки

Белки - ингибиторы вирусов представляют собой особую группу растительных антибиотических веществ.

Все известные антивирусные белки делят на **эндогенные** (синтезируемые конститутивно) растительные антивирусные белки - **EAVP** (endogenous antiviral proteins) и **белки-ингибиторы**, синтез которых индуцируется в ответ на инфекцию - **IAVP** (induced antiviral proteins).

Оба типа белков-ингибиторов имеют много сходных физико-химических и биологических характеристик:

- устойчивость к изменениям рН и термостабильность;
- способность осаждаться высокими концентрациями сульфата аммония;
- активность при очень низких концентрациях;
- широкий спектр антивирусного действия;
- влияние содержания аминокрупп на биологическую активность.

**Эндогенные противовирусные белки (EAVP)** - это постоянно продуцируемые растением, а не индуцируемые в нем стрессом ингибиторные белки, которые, будучи экстрагированными из ткани растений-хозяев, могут блокировать развитие вирусной инфекции в обработанных ими растениях. Некоторые растения могут содержать более одного EAVP. Так, экстракты из листьев перца, герани и дурмана содержат высокомолекулярные и низкомолекулярные компоненты, обладающие антивирусной активностью.

# Антивирусные белки

Ряд растений содержат более одного ЕАVP. Так, экстракты из листьев перца, герани и дурмана содержат высокомолекулярные и низкомолекулярные компоненты, обладающие антивирусной активностью.

Известно, по крайней мере, 4 различных, механизма защитного действия ЕАVP:

1. Агрегация ингибитора с вирионом;
2. Ингибирование стационарной фазы вирусной инфекции;
3. Индукция системной устойчивости к вирусу;
4. Ингибирование репликации путем блокирования белкового синтеза.

Некоторые ЕАVP полифункциональны, т. е. обладают более чем одним типом биологической активности, что, в некоторых случаях осложняет изучение механизмов их антивирусного действия.

# Конституционные антивирусные белки

Процесс инфицирования растения вирусом делят на две фазы: **стационарная фаза** и **фаза репликации**.

***Стационарная фаза включает:***

- первоначальное механическое повреждение поверхности листа в месте внедрения;
- проникновение вируса в клетку;
- отделение оболочки вириона от вирусной нуклеиновой кислоты (депротеинизация).

***Фаза репликации:***

- синтез вирусных нуклеиновых кислот и белков;
- сборка вириона;
- транспорт вновь синтезированных вирусных частиц в другие клетки, в другие части растения.

Понятия «ингибитор стационарной фазы в жизненном цикле вируса» и «ингибитор репликации вируса» не имеют четко обозначенных различий, поскольку депротенизация инокулюма перекрывается во времени с началом синтеза вирусного белка и нуклеиновых кислот.

Вещество является ингибитором репликации, если оно блокирует инфекцию при обработке растений спустя 5-8 часов после заражения вирусом.

При анализе антивирусной активности ингибитора его смешивают с вирусной суспензией, инокулируют такой смесью листья сверхчувствительного растения-хозяина и, подсчитывают количество возникших инфекционных пятен.

Уменьшение количества инфекционных пятен означает, что имеет место блокирование стационарной фазы развития вирусной инфекции. Однако, количество инфекционных пятен может также снижаться, если репликация вируса ингибируется до такой степени, что видимые пятна не образуются, поэтому данный тест не позволяет достаточно точно отделить воздействие ингибитора на стационарную фазу вирусной инфекции от его воздействия на фазу репликации.

Репрезентативными тестами, дающими возможность судить о воздействии ингибитора на репликацию вируса являются следующие:

- определение средних размеров инфекционных пятен;
- тестирование действия ингибиторов на протопластах;
- анализ накопления вирусов в системно-инфицируемых тканях;
- обработка растений ингибитором спустя несколько часов после инокуляции вирусом.

# Индуцируемые антивирусные белки

Кроме конституционных метаболитов растений - эндогенных антивирусных белков (EAVP), в инфицированных растениях обнаруживаются антивирусные белки, синтез которых индуцируется в ответ на инфекцию, и которые отсутствуют в тканях здоровых растений до заражения. Это индуцированные антивирусные белки (IAVP). В отличие от EAVP, которые оказывают влияние на ранние фазы жизненного цикла вируса, и с которыми индуцированные белки-ингибиторы имеют много общего.

IAVP являются ингибиторами поздних стадий вирусной инфекции. Показано, что обработка растений IAVP вызывает значительное снижение вирусного титра в растении. Кроме того, эффективность IAVP сохраняется при их применении через несколько часов после инокуляции вирусом.

Поскольку IAVP в растениях присутствуют в тканях, обладающих системной устойчивостью, они рассматриваются многими исследователями как возможные кандидаты на роль сигнальных молекул при развитии системной приобретенной устойчивости растений к вирусам.

Однако низкий уровень экспрессии генов, кодирующих эти белки, значительно затрудняет выделение последних из растительных тканей в виде очищенных препаратов с целью дальнейшего изучения.