



Лекция 11 Тема: “Продукты генов устойчивости”.

Вопросы:

1. Свойства, природа, классификация элиситоров.

2. Эндогенные растительные элиситоры.

Специфические, абиогенные, неспецифические элиситоры. Активные элиситоры. Расоспецифические элиситоры

3. Гены авирулентности.

Элиситоры

Элиситоры - экзогенные или эндогенные для растения химические соединения в ответ на которые растения индуцируют защитные реакции. Элиситоры растений несвойственные для растения молекулы, часто связаны с вредителями, патогенами или синергетическими организмами. Элиситоры разделяют на биотические, абиотические и комплексные, они имеют определенную молекулярную структуру. Термин «элиситоры» был предложен в 1970-е годы (ранее называли «индукторы»)

Элиситоры распознаются растениями и запускают сигнальные системы, которые приводят к экспрессии генов, связанных с защитой, повышают устойчивость растений к биотическим и абиотическим факторам среды.

Классификация основных элиситоров:

- **специфические элиситоры;**
- **абиогенные элиситоры;**
- **неспецифические элиситоры;**
- **эндогенные растительные элиситоры.**

Элиситоры взаимодействуют со специальными белками-рецепторами, локализованными на мембране растительных клеток. Рецепторы способны узнавать структуру элиситоров и запускать внутриклеточную защитную реакцию при помощи сигнального каскада.

Защитная реакция приводит к усилению синтеза метаболитов, которые повышают устойчивость к фитопатогенам, вредителям и абиотическому стрессу.

Иммунный ответ растений, индуцируемый молекулярными структурами (паттернами), ассоциированными с фитопатогенами называют РТІ (**p**attern **t**riggered **i**mmunity).

Элиситоры стимулируют синтез защитных метаболитов растения, повышают иммунитет растения. Они усиливают синтез естественных соединений, при повышенной концентрации которых в тканях создаются условия, не приемлемые для развития возбудителя.

Элиситоры приводят к образованию веществ, инактивирующих токсины возбудителей.

Например, под действием производных фенилмочевины в плодах огурца и яблони повышается количество фенолов; из них в процессе метаболизма возникали полифенолы, оказывающие ингибирующее влияние на пектолитические ферменты возбудителей парши яблони и оливковой плесени огурца.

Так, применение препаратов меди для обработки растений, приводит к усилению синтеза в тканях растений фитоалексина - **пизатина**. Пизатин обычно образуется в растении при заражении фитопатогенными грибами, а профилактическая обработка приводит к его синтезу до инфицирования, препятствуя его наступлению.

Триадимефон, повышает в листьях растений концентрацию каротиноидов, ксантофилла и других факторов, в присутствии которых развитие фитопатогенов замедляется.

Специфические элиситоры

Специфические элиситоры вызывают защитные и восприимчивые реакции только **в устойчивых сортах растений**.

Специфические элиситоры и супрессоры выделяются на поверхность гиф грибов, гаусториев, отщепляются протеазами и доводятся до более мелких молекул, которые с помощью образования пор в мембране (некоторые токсины) или путем эндоцитоза проникают в цитоплазму растения-хозяина и действуют на сигнальные и метаболические процессы.

У некоторых бактериальных штаммов и грибных рас патогенов обнаружены **гены авирулентности**. Они синтезируют специальные молекулы - специфические элиситоры реакции сверхчувствительности (СВЧ).

Узнавание специфических элиситоров осуществляется с помощью специфических рецепторов растений, несущих гены устойчивости (R-гены). **Продукты R-генов являются рецепторами**, которые осуществляют передачу сигнала от рецептора в ядро.

Специфические элиситоры

В настоящее время группа R-генов клонирована и секвенирована у ряда растений.

В составе различных R-белков выделены сходные по строению и функциям домены: участки, характеризующиеся наличием лейцин богатых повторов (**LRR** – *leucin rich repeat*); нуклеотидсвязывающие сайты (**NBS** - *nucleotid binding site*), домены типа лейциновых молний (**LZ** - *leucin zipper*), протеинкиназные (**PK**- *protein kinase domen*), трансмембранные (**TM** - *transmembrane domen*) и гомологичные **TIR**-последовательностям домены (Toll Interleukin-1 Receptor). **LRR**- и **LZ**-домены могут участвовать в процессах димеризации белков, позволяя различным белкам с аналогичными доменами взаимодействовать.

R-белки активируют транскрипцию генов, имеют TIR-домен, высокоомологичный специфическим рецепторам животных.

Мембранная локализация R-белка в клетке обусловлена присутствием гидрофобного TM-домена, R-белки без TM-домена локализуются в цитоплазме. Домен NBS позволяет белку связывать тринуклеотидфосфаты (АТФ, ГТФ) и участвовать в передаче сигнала. Активация других белков может также осуществляться благодаря

Неспецифические элиситоры

Первый этап взаимодействия фитопатогенов с растениями - контакт клеточной стенки гриба или бактерии с цитоплазматической мембраной растительной клетки. Компоненты клеточной стенки грибов имеют элиситорные свойства, вызывают защитную ответную реакцию растения.

Основные составные части грибной клеточной стенки: β -1,3-глюкан и ацетилглюкозамин хитин. Олигосахариды этих молекул являются хорошо изученными элиситорами.

Например, обработка семядолей сои гептаглюкозидом *Phytophthora sojae* в концентрации 10 нМ индуцирует образование фитоалексина **глицеоллина**. Из плазмалеммы сои выделен белок-рецептор, связывание которого с глюкозидом приводит к изменению ионных каналов мембраны, потере K^+ и Cl^- или повышенному поступлению Ca^{2+} и H_2O_2 , генерации активных форм кислорода, активизации иммунной реакции клетки.



Активные элиситоры

Хитин, его деацетилированная форма **хитозан** и их фрагменты (олигомеры), гликопротеиды, входящие в состав клеточных стенок грибов относят к активным элиситорам.

Полисахариды клеточных стенок грибов - высокомолекулярные соединения, связаны друг с другом и другими соединениями, выполняют функции элиситоров только предварительно деградированными и переведенными в растворимую форму соответствующими ферментами.

Среди PR-белков растений обнаружены ферменты (β -глюканаза и хитиназа), которые расцепляют молекулы глюкана и хитина на отдельные низкомолекулярные фрагменты, проникающие в растение и играющие роль элиситоров.

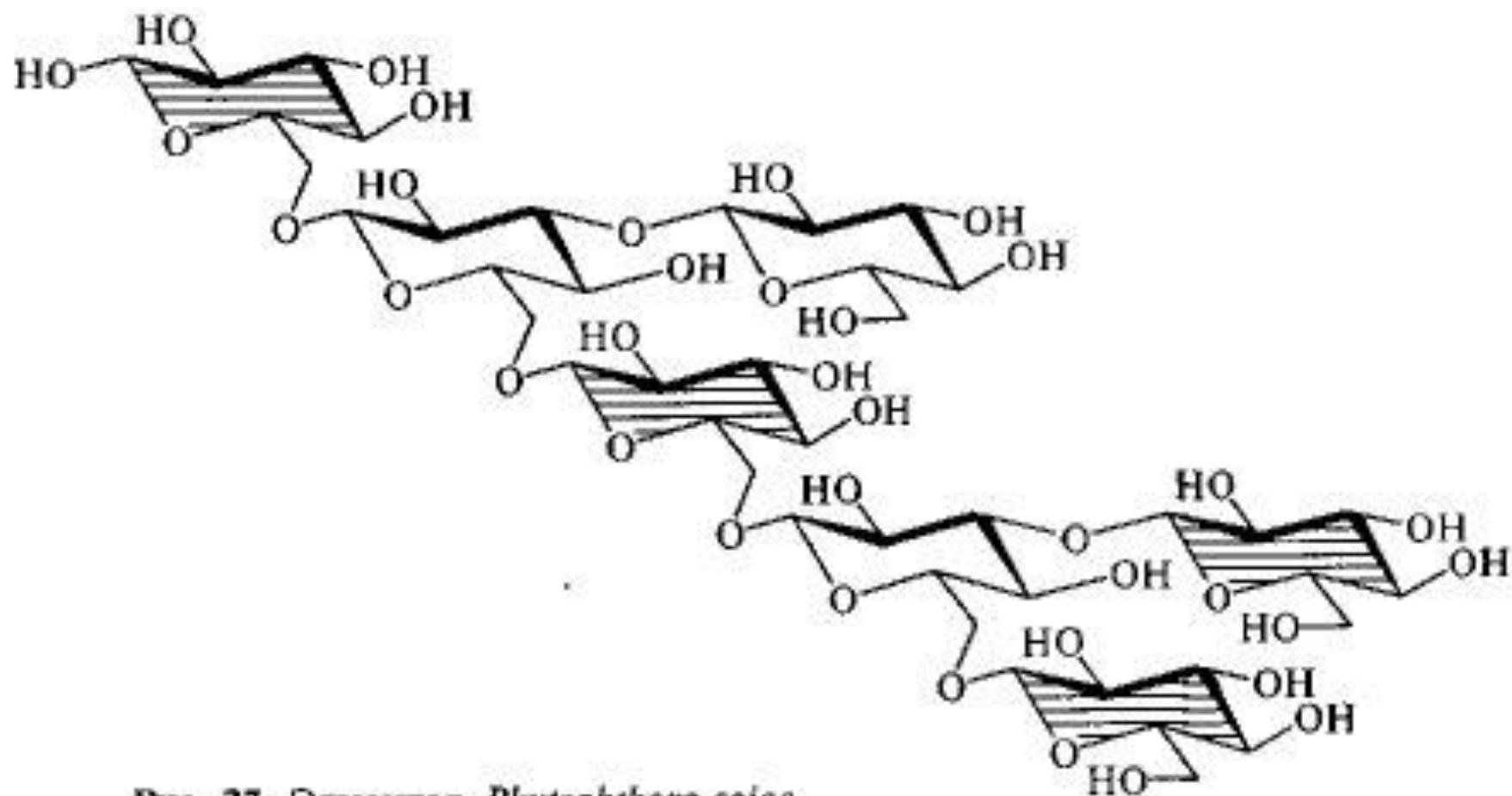


Рис. 27. Элиситор *Phytophthora sojae*

Элиситорную активность имеют также некоторые внутриклеточные соединения фитопатогенов. Например, в клетках *Phytophthora infestans* содержится полиненасыщенная жирная арахидоновая кислота. Она освобождается из проростков спор и вызывает протекание активных защитных реакций в зоне заражения, в частности накопление фитоалексинов.

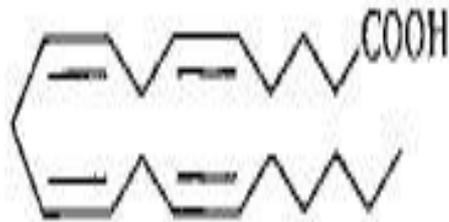


Рис. 28. Арахидоновая кислота



Расоспецифические элиситоры

Если комплементарные гены растения-хозяина и фитопатогена находятся в доминантном состоянии, то развивается устойчивое состояние (несовместимость). Если один из них или оба гена рецессивны, то растение восприимчиво, а фитопатоген вирулентен (состояние совместимости).

Эти данные интерпретированы следующим образом:

R-ген контролирует синтез специфического белка-рецептора, а ген авирулентности (Avr-ген) - специфического элиситора. Их взаимодействие приводит к индукции защитных реакций. Если у растения отсутствует рецептор или у паразита элиситор, то защитная реакция не развивается. Отсутствие рецепции вызывается делецией генов хозяина и паразита (рецептора или элиситора нет вообще) или мутациями этих генов (взаимодействие элиситор - рецептор ослаблено или потеряно).

Гены авирулентности патогена — Avr-гены

Для выявления специализированного ответа растений требуется идентификация не только растительных R-генов, но и **генов авирулентности** паразита, контролирующих синтез расоспецифического элиситора.



У большинства грибов элиситоры, как правило это пептиды, богатые цистеином. Это отмечено для продукта гена **NIPI** у *Rhynchosporium secalis* и продукта гена **Avr9** (*Cladosporium fulvum*), который состоит из 28 аминокислот и предположительно образует компактную структуру с тремя дисульфидными связями.

Продукт гена **Avr9** вызывает реакцию сверхчувствительности у растений томата (**ген Cf9**), причём ген **Avr9** контролирует синтез препротейна, который в случае взаимодействия с грибными и растительными протеазами разлагается до олигопептидов небольшого размера.

Элиситор, кодируемый геном **Avr4** *Cladosporium fulvum*, имеет 88 аминокислот. Предполагают, что цистеину принадлежит решающая роль в авирулентности грибов, т.к. при замене некоторых цистеинов на тирозин в гене **Avr4** гриб *C.fulvum* приобретает способность заражать растения томата, несущие ген **Cf4**

Для патогенных бактерий описано несколько типов Avr-генов. Например, у *P. syringae* p. v. *Tomato* - ген *avrD*, локализован в плазмиде, кодирует гликозилтрансферазу, которая участвует в синтезе элиситора сириngoлида, индуцирующего реакцию СВЧ у растений сои (*Glycine soja* L.), несущих ген *Rpg4*.

Для вирусов растений известно, что генами вирулентности могут быть гены, отвечающие за структуру и химический состав их оболочки. Они кодируют синтез репликазы, или гены, контролирующие синтез белка и перемещение вируса.



Абиогенные (синтезированные) элиситоры

Абиогенные элиситоры имеют широкий спектр воздействия на защитные системы растений. Это сингальные природные молекулы - салициловая кислота (СК) и жасмоновая кислота (ЖАК).

Абиогенные элиситоры имеют недостатки, не позволившие их коммерческое использование. СК токсична для растений, используемая экзогенно, быстро метаболизируется в β -глюкозиды, которые неспособны к флоремному транспорту.

Защитный эффект ЖАК и ее метилового эфира, определяется не индукцией защитных реакций растений, а токсичностью для грибных патогенов. Поэтому основное внимание сейчас обращено на синтетические препараты, индуцирующие SAR.

К абиогенным элиситорам относят вещества, не участвующие в процессах патогенеза, но вызывающие защитные ответы растений, как правило, в относительно невысоких концентрациях. К их числу относятся ионы тяжелых металлов, ингибиторы определенных звеньев метаболизма, металлосодержащих ферментов и тиоловых групп, ряд антибиотиков, фенольные соединения и хиноны, УФ-лучи, ряд фунгицидов (например, бордоская жидкость, хлорокись меди, цинеб, каптан и др.).

Ионы тяжелых металлов по их способности вызывать образование у картофеля располагаются в следующем порядке:



Одна из возможных причин абиотической индукции защитных реакций состоит в том, что абиотические элиситоры в той или иной мере активизируют эндогенные гидролазы растительных тканей - нуклеазы, пептидазы, глюканазы и другие ферменты, ответственные за деградацию биополимеров, которые осуществляют функции хранения, передачи и реализации информации. А это, в конечном итоге, индуцирует защитные эффекты растительной ткани.



Эндогенные растительные элиситоры

Элиситоры — это главным образом продукты патогенных микроорганизмов, которые выявляются растением как чужие и контакт которых с растительными структурами вызывает иммунный ответ. Поскольку иммунный ответ вызывают не только метаболиты паразитов, но и некоторые химические и физические воздействия (соли тяжелых металлов, УФ-лучи), а также некоторые метаболиты самого зараженного растения.

Элиситоры также делятся на абиогенные и биогенные.

Биогенные — на экзогенные и эндогенные;

Некоторые элиситоры патогенов индуцируют иммунный ответ только при взаимодействии с определенными генотипами растений, а другие вызывают его у представителей разных видов и родов растений, поэтому их стали подразделять на **специфические и неспецифические**.

Эндогенные биотические элиситоры являются производными веществ самого растения, возникающими при патологическом процессе (например, олигомеры пектина клеточных стенок растений, образующиеся в результате их деструкции патогеном).

В середине 70-х гг. XX в. американскими биохимиками Альберсхеймом и Валент был обнаружен новый класс регуляторных молекул, представляющий собой **олигосахариды клеточных стенок растений и грибов**.

Эти соединения **способны контролировать защитные функции растений, а также процессы их роста и дифференцировки**.

Олигосахариды, обладающие регуляторной активностью, получили название олигосахаринов (ОС).

ОС из клеточных стенок грибов (β -1,3-глюканы, хитин и хитозан), являются экзогенными по отношению к растению (микробными). ОС из клеточных стенок растений носят название эндогенных, конституционных или вторичных. Хотя ОС богаты сахарными остатками, они могут содержать и неуглеводные компоненты: фенолы, пептиды, ацильные группы.

Гены восприимчивости

1. Контролируют синтез рецепторов, специфически связывающихся с токсинами фитопатогенов, и это приводит к деструкции иммунных свойств клетки.
2. Подавляют защитные реакции в зараженных клетках.
3. Улучшают условия питания паразита.

Системная приобретенная устойчивость

Системная приобретенная устойчивость (*systemic acquired resistance - SAR*). Локальная приобретенная устойчивость (*localized acquired resistance - LAR*).

Системная приобретенная устойчивость - это вторичный иммунный ответ на заражение, возникающий вследствие наличия локальной устойчивости.

Термин введен немецким ученым Россом в 1961 г. на основании исследования растений табака, инфицированного ВТМ. *Системная приобретенная устойчивость* развивалась в тканях инфицированного растения, **свободных от заражения**, тогда как *локальная* - непосредственно в месте инфицирования. Т.о., системная приобретенная устойчивость — вторичный иммунный ответ на заражение, возникает вследствие наличия локальной устойчивости. Системная устойчивость появляется через 48-72 часа после заражения, этот период совпадал с появлением симптомов на листе-индукторе. Установлено, что **SAR** транспортируется по растению снизу вверх. Так, прививка дыни или арбуза на подвой огурца, содержащего лист-индуктор, индуцирует устойчивость в привое. Термическая обработка флоэмы черешка листа-индуктора блокировала сигнальный транспорт устойчивости. Устойчивость передается растениям-регенерантам через культуру тканей.

Понимание биохимических механизмов, связанных с SAR, мало прогрессировало до открытия PR-белков, коррелирующих с распространением SAR. Их обнаружение помогло найти маркеры SAR, которые предшествовали бы биохимическим ответам. Например, при изолировании кДНК, которые образуются в свободных от инфекции тканях зараженных растений. Используя систему табак — ВТМ, были обнаружены мРНК по крайней мере 9 семейств генов, которые постоянно индуцируются в незараженных листьях зараженных растений. Они получили название *семейства SAR-генов*. Начало экспрессии SAR-генов составляет примерно 6 часов после заражения и соответствует периоду, когда устойчивость может быть определена фенотипически. Абиотические агенты, которые индуцируют устойчивость (салициловая или 2,6-дихлоризоникотиновая кислоты), вызывают экспрессию того же спектра SAR-генов и примерно с той же интенсивностью. Считается, что экспрессия SAR-генов коррелирует с состоянием устойчивости.

Некоторые SAR-гены, вероятно, играют активную роль в устойчивости. Ряд кодируемых кДНК белков или имеют непосредственную антимикробную активность, либо обладали ферментативными свойствами, приводящими к созданию антимикробных белков. К их числу относятся классы SAR-генов, кодирующие β -1,3-глюканазы и хитиназы.

Другой класс SAR-генов кодирует богатую цистеином группу белков - *тауматины*. Тауматин-подобные белки известны как антигрибные продукты, активность которых определяется их способностью нарушать мембранную целостность, что является основанием для названия этого класса *перматины*.

Одна из групп SAR-генов — **PR-1 белки**, функция которых пока неясна, широко распространены у покрытосемянных растений. PR-1 белки из табака и томатов подавляют *in vitro* рост *Phytophthora infestans*.

Подтверждено участие SAR-генов в устойчивости трансгенных растений. Например, табак и капуста, несущие ген хитиназы из бобов, оказались защищенными от *Rhizoctonia solani*. Высокий уровень экспрессии PR-1 в трансгенных растениях табака приводил к снижению заболеваемости *Peronospora tabacina* и *Phytophthora nicotiana*. Некоторые SAR-гены кодируют белки, обладающие антимикробной активностью, и экспрессия этих генов в растениях обеспечивает возрастание SAR.

Данные по экспрессии генов SAR стали быстро накапливаться при исследовании *Arabidopsis*, у которого SAR-гены относятся к тому же семейству, как и у табака. Например, в огурцах, SAR-гены отличаются от генов табака. Возможно, что разные таксономические группы растений могут иметь собственную сеть SAR-генов, которые возникают в ответ на эволюционный прессинг специфических патогенов.

Как индуцируется устойчивость в тканях растений, находящихся на расстоянии от места инфекции?

Предполагают, что в растениях существуют **мобильные молекулы**, которые **активируют механизм устойчивости в клетках, удаленных от места инфекции**. Предложено несколько критериев, которым должны удовлетворять соединения, претендующие на роль межклеточных системных сигнальных молекул:

- сигнальные молекулы должны синтезироваться в растении;
- передвигаться по нему и количественно возрастать после повреждения растительной ткани;
- индуцировать защитные механизмы.

В ряде опытов показано, что сигнал индукции SAR передается по флоеме. При нарушении флоемного транспорта у окольцованных растений, нарушается и индукция SAR.

Существуют два параллельные пути передачи межклеточных сигналов:

1-й путь связан с молекулами, сигнализирующими о поранении растительной ткани, независимо от того, является ли это поранение механическим или вызвано некротрофными патогенами и вредителями. Сигнальной молекулой этого типа является **жасмоновая кислота (ЖАК)**.

Второй тип сигнальных молекул специфичен только для патогенной инфекции: бактериальной, грибной или вирусной. Сигнальной молекулой второго типа является *салициловая кислота* (СК).

Эти два пути относительно независимы (доказано опытами с мутантами арабидопсиса).

У арабидопсиса сигнал от жасмоновой кислоты передается на управляющий белок *Coir*, который индуцирует экспрессию жасмонат-зависимых генов (ген ингибитора протеиназы *PIN* и др.). Мутация *coir*, блокирующая чувствительность гена *PIN* к ЖАК, подавляет устойчивость к некротрофным паразитам *Botrytis cinerea* и *Alternaria brassicola*, но не влияет на устойчивость к биотрофу *Peronospora parasitica*.

С другой стороны, мутация гена *NPR1*, белок которого - активный передатчик сигнала с СК на SAR-гены (*PR1* и др.), значительно снижает базовую устойчивость к *P. parasitica*, но не влияет на устойчивость к *B. cinerea* и *A. brassicola*.

Между этими двумя сигнальными путями существует интерференция. Например, некротрофная бактерия *Erwinia carotovora* индуцирует синтез некоторых PR-белков (не SAR) у табака, но ингибирует экспрессию SAR-генов, а индукция SAR подавляет ответ на заражения *Erwinia*. СК оказывает регуляторное действие на биосинтез ЖАК - усиливает накопление важнейшего фермента биосинтеза алленоксидсинтетазы, но ингибирует финальные этапы биосинтеза (фермент алленоксидциклазу) и тем самым подавляет ответ на поранение.

Кроме СК и ее производных, жасмоновой кислоты и ее метилового эфира (Ме-ЖАК) кандидатами на роль системных сигналов служат *системин* и *этилен*, а также возможно, некоторые *олигосахарины* и *абсцизовая кислота*.