



Лекция 12 Тема: “Гены вирулентности и их продукты”.

Вопросы:

1. Гены вирулентности. Импедины (супрессоры). Типы супрессоров.
2. Патотоксины и их биологическая роль.
3. Ферменты, деградирующие антимикробные соединения.

Гены вирулентности

Гены вирулентности (*virulence genes*): это гены, которые обеспечивают выживание и выполнение патогенных функций паразитам внутри организма-хозяина. они обнаружены у большинства патогенов.

На скорость возникновения вирулентных генов влияют следующие факторы:

- частота мутирования генов вирулентности;
- плотность популяции растений;
- наличие процессов комбинации генов (рекомбинации);
- возможность миграции из других популяций.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АВИРУЛЕНТНОСТИ ФИТОПАТОГЕНОВ

Химические продукты, которые выделяют фитопатогены

в зараженное растение для установления взаимоотношений с ним, называют

иммуномодуляторами.

Иммуномодуляторы могут быть двух типов:

- **супрессоры**, или **импедины**, которые подавляют защитный эффект хозяина;
- **элиситоры**, или индукторы, которые, наоборот, вызывают протекание защитных реакций.

Классификация иммуносупрессоров

Иммуносупрессоры

Неспецифические

Специфические

Высокомолекулярные **Низкомолекулярные**

Высокомолекулярные

Низкомолекулярные

Ферменты
деполимеразы

Вивотоксины

Ферменты
деградации
антибиотических
соединений

Импедины,
(нетоксичные)

Патотоксины
(токсичные)

ИММУНОМОДУЛЯТОРАМИ.

Супрессоры или импедины, которые подавляют защитный эффект хозяина

Элиситоры или индукторы, которые, наоборот, вызывают протекание защитных реакций.

Неспецифические супрессоры не участвуют в системе взаимоотношений типа «ген-на-ген». Они являются общими факторами патогенности, без которых паразит не смог бы преодолевать факторы полевой и истинной устойчивости живых растений.

Высокомолекулярные неспецифические супрессоры. Это ферменты, разрушающие клеточные покровы растений. За исключением вирусов, большинство которых «въезжает» в растительную клетку с помощью стилета насекомых, паразиты (грибы и бактерии) должны преодолеть полисахаридный барьер клеточной стенки.

Низкомолекулярные неспецифические супрессоры. К ним относят вивотоксины низкомолекулярные метаболиты грибов и бактерий, выделяемые в зараженное растение (*in vivo*), а не только в искусственную питательную среду, в которой выращивают данный микроорганизм, и вызывающие типичные симптомы болезни (некрозы, увядание).

Элиситоры

Для установления взаимоотношений с растением-хозяином фитопатогены выделяют многочисленные метаболиты. В процессе коэволюции у растений возникли механизмы рецепции некоторых метаболитов паразитов и передачи сигнала о появлении чужого организма для инициации защитных реакций.

Вещества паразита, индуцирующие протекание защитных реакций у растений, называют **элиситорами**. Элиситоры бывают **неспецифическими** и **специфическими**.

Неспецифические элиситоры вызывают защитные реакции как в устойчивых, так и в восприимчивых видах и сортах растений.

Специфические элиситоры вызывают защитные реакции только в устойчивых сортах растений.

Ферменты, деградирующие фитоантиципины и фитоалексины

У многих паразитов обнаружены ферменты, изменяющие структуру фитоалексинов и фитоантиципинов и снижающие их токсичность. Известно несколько групп таких ферментов. **Гликозидазы.** Эти ферменты отщепляют глюкозу и другие сахара от гликозида, переводя его в нерастворимую форму агликона. Например, штаммы возбудителя корневой гнили злаков *Geotrichum graminis*, способные заражать корни овса, отличаются от авирулентных штаммов наличием фермента **авенациназы**, отщепляющей остатки сахаров от сапониона авенацина и переводящей его в нерастворимую менее активную форму.

Томатиназа (Р-гликозидаза) паразита томата *Septoria lycopersici*, отщепляя глюкозу от стероидного гликоалкалоида α-томатина, переводит его в более токсичный Р2-томатин. Последний, в свою очередь, подавляет индукцию защитной ответной реакции, поскольку интерферирует с фундаментальными путями передачи сигнала, ведущими к возникновению устойчивости.

Гидролиазы. Изменяют молекулу присоединением к ней воды. Например, патогены сорго *Gloeosporium sorghi*, *Stemphylium loti* с помощью фермента цианидгидролиазы осуществляют конверсию цианида (синильной кислоты) в менее токсичный формамид.

Деметилазы. Отщепление от некоторых соединений метильных групп сильно снижает их патогенность. Например, штаммы гриба *Nectria haematococca* (анаморфа *Fusarium solani*), способные заражать горох, имеют фермент пизатиндеметилазу, отщепляющую метальную группу от молекулы пизатина.

Ферменты, деградирующие фитоантиципины и фитоалексины

Гидролиазы. Изменяют молекулу присоединением к ней воды. Например, патогены сорго *Gloeosporium sorghi* и лядвенца *Stemphylium loti* с помощью фермента цианидгидролиазы осуществляют конверсию цианида (синильной кислоты) в менее токсичный формамид.

Деметилазы. Отщепление от некоторых соединений метальных групп сильно снижает их патогенность. Например, штаммы гриба *Nectria haematococca* (анаморфа *Fusarium solani*), способные заражать горох, имеют фермент пизатиндеметилазу, отщепляющую метильную группу от молекулы пизатина.

У вирусов роль элиситоров выполняют вирусные белки, они синтезируются внутри зараженных клеток растений. Например, структурный белок вируса табачной мозаики (ВТМ) узнается продуктом гена N' устойчивого табака *Nicotiana sylvestris*, фермент РНК-полимераза - продукт гена.

Транспортный белок - продукт гена T2 устойчивых сортов томата.

У бактерий обнаружены семейства гомологичных **Avr-белков**. Белок Avr Bs2 *Xanthomonas vesicatoria* и *X. campestris pv.*

alfalfae имеют свойства фермента, они участвуют в синтезе и гидролизе фосфодиэфирных связей между углеводами или фосфолипидами.

Аналогичные белки индуцируют реакции устойчивости, но их инактивация в результате мутаций приводит к значительному снижению.

AvrBs3-белки необходимы для размножения фитопатогенных бактерий в растении и развития симптомов болезней.

Ингибиторы ферментов растений

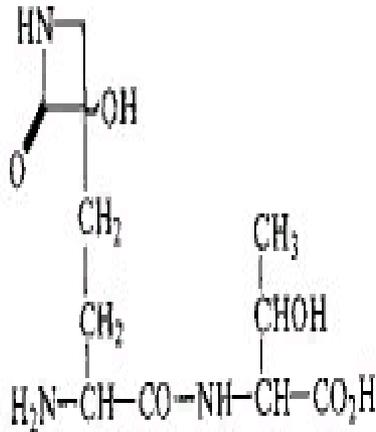


Рис. 21. Табтоксин

Ингибиторы ферментов растений - **табтоксин** фитопатогенной бактерии *Pseudomonas syringae*, **фазеолотоксин** *P. syringae*, **тентоксин** гриба *Alternaria alternata*.

Например, **табтоксин** - дипептид, соединенный с β -лактамовым кольцом. В зараженном растении растительные протеазы отщепляют активную часть токсина табтоксинин- β -лактам - ингибитор фермента глутаматсинтетазы. Вследствие снижения активности этого фермента накапливается его предшественник аммоний, вызывающий разобщение фосфорилирования, ингибирование фотосинтеза и дыхания. Эти нарушения обмена проявляются как системный хлороз и задержка роста.

Мембраноактивные вещества

Многие вивотоксины фитопатогенных грибов из родов *Fusarium* (фузариевая кислота), *Rhizosporium*, *Phoma*, *Cephalosporium*, *Fusicoccus* и бактерий из родов *Clavibacter*, *Pseudomonas* (коронатин, сирингомицины) обладают сильным мембранотропным действием.

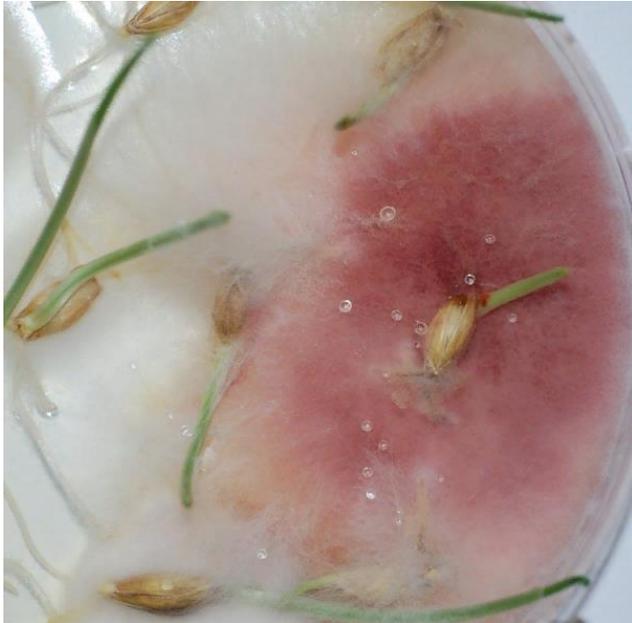


Рис. 22. Фузариевая кислота

Мембраноактивные вещества индуцируют потерю метаболитов и некрозы клеток, влияют на трансмембранный перенос ионов и ритм работы устьиц, вызывая увядание растений.

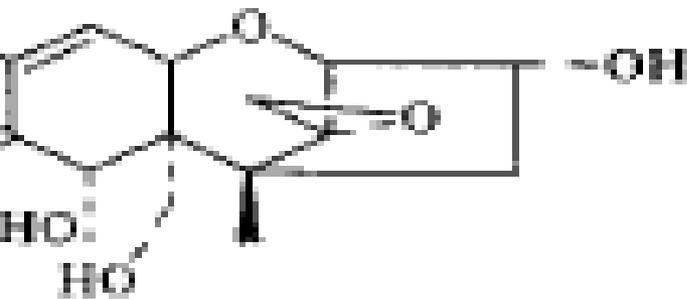
Генераторы активных форм кислорода

Ряд фитопатогенных грибов из родов *Cercospora*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Elsinoe*, *Hypocrella* образуют циклические соединения - **пренилированные хиноны**, для проявления токсичности которых в отношении растений-хозяев требуется свет, то есть они относятся к группе фотосенсибилизаторов.

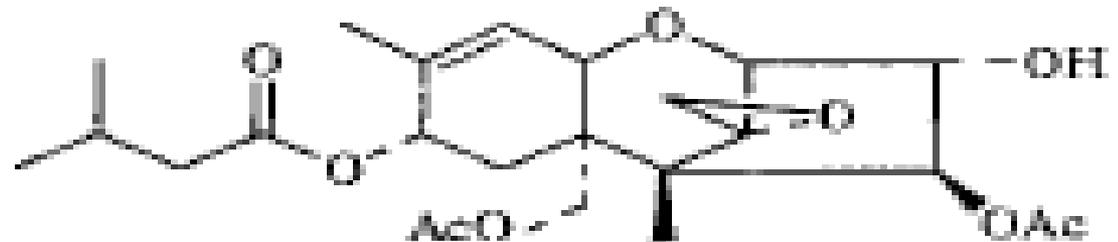
В результате абсорбции энергии света фотосенсибилизаторы конвертируются в энергетически активное состояние и приобретают способность при взаимодействии с молекулярным кислородом генерировать его активные формы (АФК): супер-оксид-радикал (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксил-радикал (OH^-) и синглетный кислород (O_2 - общее название для двух метастабильных состояний молекулярного кислорода O_2 с более высокой энергией, чем в основном, триплетном состоянии). Все они обладают высокой токсичностью и вызывают повреждения в клетках растений.

Ингибиторы синтеза белка

Трихотеценовые токсины фузариевых грибов ингибируют синтез белка у эукариот. Эти токсины вызывают у экономически важных растений болезни (пшеницы, ячменя, кукурузы). Содержащие токсины растительные продукты токсичны для людей и сельскохозяйственных животных (вызывают потерю аппетита, дерматиты, анемию, геморрагический сепсис, иммуносупрессию и др).



Дезоксинивалинол (ДОН)



T2-токсин

Рис. 24. Трихотеценовые токсины *Fusarium graminearum*

Устойчивость к каждому фитопатогену находится под собственным генетическим контролем. Это подтверждает наличие генов, непосредственно связанных с устойчивостью к разным болезням.

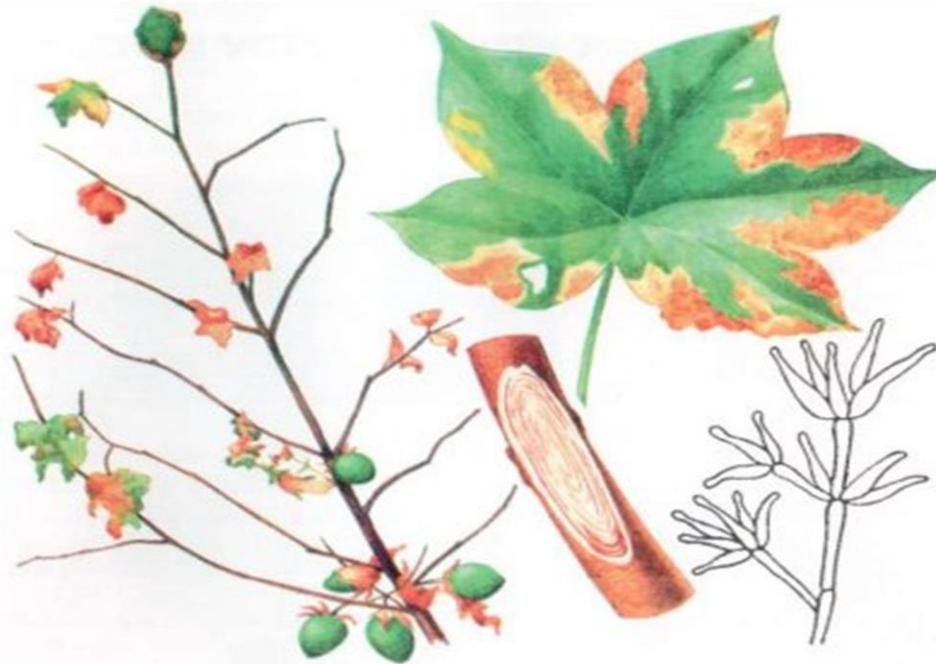
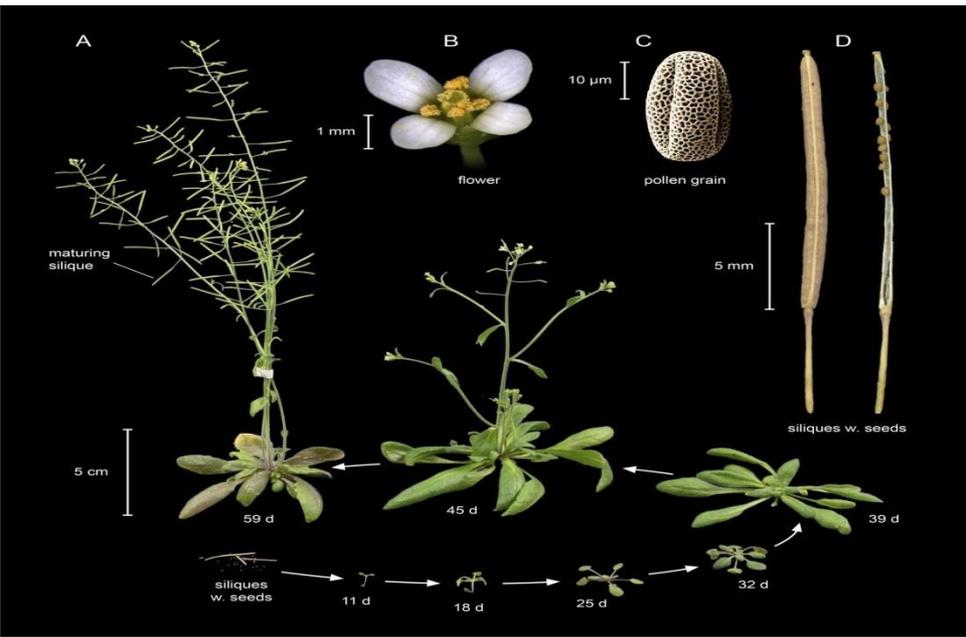


Рис. 2. Вертициллез хлопчатника (по Юдину, 1991)

- У растения *Arabidopsis thaliana* семейства крестоцветных, геном которого полностью секвенирован, обнаружено более 100 генов устойчивости.



Однако, устойчивость многих сортов культурных растений со временем теряется вследствие накопления вирулентных для них рас паразитов.



Истинная устойчивость: вертикальная или горизонтальная

**Фенотипическое
проявление
вертикальной
устойчивости**



Быстрая гибель зараженных тканей,
органов или клеток, называемая
реакцией сверхчувствительности
(СВЧ)

Реакция сверхчувствительности

Верхушечный некроз
Самоотторжение
Дырчатая пятнистость
Локальный некроз



При этой форме СВЧ гиперчувствительностью обладает только меристема. Некоторые сорта картофеля (например, Кинг Эдуард) системно заражаются вирусом X

Самоотторжение

Листья некоторых сортов перца, зараженные штаммами *VTM*, и фасоли, зараженные штаммами *Pseudomonas syringae*, обеспечивают распространение инфекции по листу до того места, где он сочленяется с черешком (листовая пяточка).



Дырчатая пятнистость

В листьях некоторых косточковых пород (вишни, сливы, абрикоса) грибная и бактериальная инфекция индуцирует образование слоя раневой перидермы, кольцом окружающей зараженное место. Зараженная ткань выпадает, и образуется дырка.



Локальный некроз

Локальный некроз - распространенная форма СВЧ. Он выражается в почернении (некрозе) или, реже, посветлении (хлорозе) зараженного участка. Некроз может быть крупным, достигающим в диаметре нескольких миллиметров, если сигнал от патогена поступает не сразу, а после оккупации им нескольких слоев клеток



Генетика взаимоотношений с паразитами

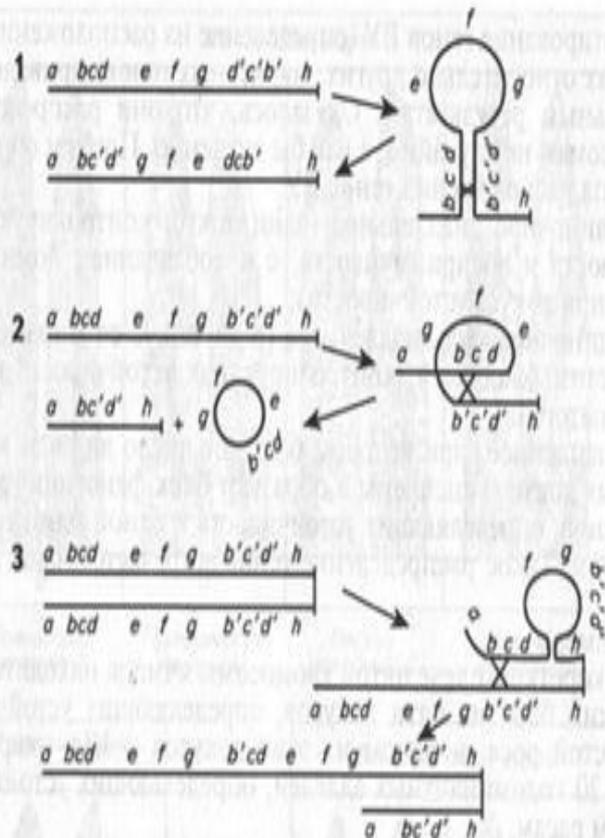


Рис. 19. Схема эктопической рекомбинации:

1 — внутримолекулярная рекомбинация между обращенными повторами bcd и $d'c'b'$ в участке между b и c (апострофы указывают на одинаковые участки двух повторов) сопровождается поворотом на 180° (инверсией) участка efg , заключенного между повторами; 2 — внутримолекулярная рекомбинация по прямым повторам bcd и $b'c'd'$ с вырезанием сегмента хромосомы между участками кроссинговера и состыковкой сегментов, расположенных снаружи от участков кроссинговера; 3 — рекомбинация по прямым повторам bcd и $b'c'd'$ между сестринскими хроматидами (неравный кроссинговер) с утратой (делецией) сегмента efg и одной копии повтора bcd в одной хроматиде и их добавление (дупликация) к другой

Из определения ВУ следует, что гены устойчивости могут обеспечивать непоражаемость растения одними расами и поражаемость другими. Параллельное изучение генетики устойчивости льна и генетики вирулентности его паразита *Melampsora lini* привели американского фитопатолога Г. Флора к постулированию концепции «ген на ген»

Гены вирулентности рецессивны, а гены устойчивости доминантны

2. Схема наследования устойчивости и вирулентности в системе лен—ржавчина (Флор, 1962)

Раса паразита	Сорт хозяина		F_1 R1r1 R2r2	F_2				Отноше- ние R : S
	Оттава R1-r2r2	Бомбей r1r1-R2-		110 (9)	32 (3)	43 (3)	9 (1)	
22(alalA2-)	R(A)	S(a)	R	R	R	S	S	3 : 1
24 (A1-a2a2)	S(a)	R(a)	R	R	S	R	S	
F_1 (A1a1A2a2)	A	A	A	A	A	A	a	15 : 1
F_2 (A1-A2-)	A	A 78(9)	A	A	A	A	a	15 : 1
(alalA2-)	a	A 23(3)	A	A	a	A	a	3 : 1
(A1-a2a2)	A	a27(3)	A	A	A	a	a	3 : 1
(alala2a2)	a	a5(1)	a	a	a	a	a	

Примечание. R — устойчивость; S — восприимчивость; A — авирулентность; a — вирулентность.

Гетерозиготы хозяина и паразита соответственно устойчивы к обеим расам и авирулентны к обоим сортам; **устойчивость и авирулентность определяется доминантными генами хозяина и паразита.**

Устойчивое состояние возникает лишь в том случае, если взаимодействующие аллели растения и патогена доминантны; если же один взаимодействующий аллель или они оба находятся в гомозиготном рецессивном состоянии, растение восприимчиво.

Таким образом, у хозяина и паразита имеются «комплементарные» гены, взаимодействие продуктов которых определяет установление состояния устойчивости.

Фенотипическое проявление вертикальной устойчивости. Наиболее частое внешнее проявление вертикальной устойчивости (ВУ) - быстрая гибель зараженных тканей, органов или клеток, называемая реакцией сверхчувствительности (СВЧ).

Горизонтальная устойчивость (ГУ) отличается от вертикальной тем, что она раснеспецифична и отношения паразита и хозяина типа «ген-на-ген» при ней отсутствуют или не отчетливы. Различия между этими формами проявляются также в генетическом контроле. При скрещивании сортов, обладающих ВУ, с восприимчивым потомством F1 дает единообразную реакцию на заражение (чаще оно устойчиво, так как гены ВУ доминантны), в F2 наблюдается обычно расщепление на два класса, четко различающихся по фенотипу, — устойчивых и восприимчивых. Соотношение численности этих классов дает возможность определить число генов устойчивости у устойчивого родителя.

ПРИЗНАКИ ВЕРТИКАЛЬНОЙ И ГОРИЗОНТАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Признаки	ВУ	ГУ
Генетический контроль	Олигогенный	Полигенный
Фенотипическое проявление	Качественное (альтернативное)	Количественное (не альтернативное)
Модификация внешними условиями	Слабая	Сильная
Взаимоотношения с паразитом	Расоспецифические	Неспецифические
Влияние на эпифитотии	Подавляет X_0	Снижает r
Механизмы устойчивости	Активные защитные реакции	Разные механизмы

СТРУКТУРА R-БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ

Химическая структура продуктов генов ВУ - R-белков была расшифрована в конце XX века. R-белки содержат несколько участков (доменов). Являясь полимерами аминокислот, они имеют с одной стороны карбоксильную группу (С-концевой участок), а с другой — аминогруппу (N-концевой). Крупный домен локализован на С-конце белка, содержит большое число (несколько десятков) повторяющихся последовательностей аминокислот, среди которых чаще других встречается аминокислота лейцин (повторы, богатые лейцином - ПБЛ).

Каждый ПБЛ состоит из 23...24 аминокислот. Эта структура обеспечивает взаимодействие с другими белками, служит рецептором для лигандов (элиситоров паразита). Наличие частых повторов в структуре кодирующей ДНК R-гена является условием генетических перестроек вследствие неаллельной (эктопической) рекомбинации.

Ферменты, деградирующие антимикробные соединения

Появление в окружающей среде неизвестных ранее органических соединений индуцировало у микроорганизмов способность к их разрушению. Причины и механизм этого явления пока точно не установлены, но известно, что устойчивые соединения, как ДДТ, подвержены постепенному распаду.

Микроорганизмы осуществляют деструкцию неприродных соединений в различных процессах конструктивного и энергетического обмена: используя углерод, азот, серу, фосфор в качестве источников питания, окисляя соединения с получением энергии, используя только часть молекулы субстрата и т. д.

Кометаболизм - способность микроорганизмов трансформировать органические соединения, не используя их. Кометаболизм, наблюдается на богатых питательных средах.

Соокисление: микроорганизмы, не способные расти на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода определенное органическое соединение, могут окислять его вместе с другими веществами. Многие трудноокисляемые соединения подвергаются деструкции в процессах **кометаболизма** и **соокисления**. Так, нитрохлорорганические соединения используются только при наличии в среде питательных веществ, пригодных для активного роста микроорганизмов. В результате кометаболизма подвергаются деструкции многие аналоги ДДТ.

Дегградация антимикробных соединений

Кометаболизм, соокисление или аналогичность химических связей новых соединений не объясняют факт того, что многие совершенно новые соединения со временем становятся доступными для микроорганизмов.

При деструкции трудноокисляемых и токсичных соединений большую роль играют процессы изменчивости микроорганизмов - как мутагенные (закрепляющиеся в строении ДНК клетки), так и адаптационные, утрачивающиеся при пересеве на среды, не содержащие агента, вызвавшего адаптацию.