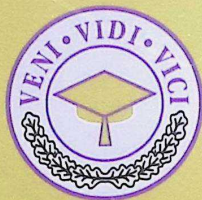


МАГИСТРАТУРА

Ю.Т. Дьяков

ФИТОИММУНИТЕТ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ



ВЫСШЕЕ ОБРАЗОВАНИЕ – МАГИСТРАТУРА
серия основана в 1996 г.



Ю.Т. ДЬЯКОВ

ФИТОИММУНИТЕТ

УЧЕБНИК

*Рекомендовано в качестве учебника
для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по направлениям подготовки 06.04.01 «Биология»,
35.04.04 «Агрономия», 35.04.05 «Садоводство»
(квалификация (степень) «магистр»)*

znanium.com

электронно-библиотечный портал

Москва
ИНФРА-М
2024

УДК 632.938(075.8)

ББК 28.57я73

Д93

Автор:

Дьяков Юрий Таричанович — доктор биологических наук, профессор, заслуженный профессор Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Рецензенты:

Левитин М.М. — доктор биологических наук, академик РАН, главный научный сотрудник Всероссийского института защиты растений (ВИЗР, г. Санкт-Петербург);

Смирнов А.И. — доктор биологических наук, профессор кафедры защиты растений Российского государственного аграрного университета — МСХА им. К.А. Тимирязева

Дьяков Ю.Т.

Д93

Фитоиммунитет : учебник / Ю.Т. Дьяков. — Москва : ИНФРА-М, 2024. — 178 с. — (Высшее образование: Магистратура). — DOI 10.12737/21429.

ISBN 978-5-16-012183-3 (print)

ISBN 978-5-16-105021-7 (online)

С учетом последних достижений науки дана характеристика иммунитета растений. Рассмотрен естественный врожденный и приобретенный, или адаптивный, иммунитет. Уделено внимание использованию полученных научных данных о механизмах иммунитета растений для защиты их от возбудителей болезней и вредителей (методы искусственного повышения фитоиммунитета).

Соответствует требованиям Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования последнего поколения.

Учебник предназначен для магистров классических университетов по направлению подготовки «Биология» и сельскохозяйственных вузов по направлениям подготовки «Агрономия» и «Садоводство».

УДК 632.938(075.8)

ББК 28.57я73

ISBN 978-5-16-012183-3 (print)

ISBN 978-5-16-105021-7 (online)

© Дьяков Ю.Т., 2016

Список сокращений

- АК — арахидоновая кислота
АТФ — аденозинмонофосфат
АФК — активные формы кислорода
ВТМ — вирус табачной мозаики
ВУ — вертикальная устойчивость
ГП — гликопротеиды
ГУ — горизонтальная устойчивость
ДОН — дезоксиниваленон
ЖАК — жасмоновая кислота
ИЛ — интерлейкин
ЛОГ — липооксигеназа
МеЖАК — метилжасмонат
ПК — протеинкиназы
СБО — структурный белок оболочки вирусов
СВЧ — реакция сверхчувствительности
СК — салициловая кислота
СОД — супероксиддисмутаза
ФА — фитоалексины
ФАЛ — фенилаланинаммонийлиаза
ЭПК — эйкозопентаеновая кислота
АНЛ — ацетилгомосерин
Avr — авирулентности (гены, белки)
СС — суперскрученная область белка
СДРК — кальцийзависимые протеинкиназы
DAMPs — набор молекул, ассоциированный с повреждениями (эндогенные элиситоры)
EGR — рецептор фактора элонгации
FLS2 — участок молекулы флагеллина, узнающий рецептором
INA — изоникотиновая кислота
ISR — индуцированная системная устойчивость
LAR — локальная приобретенная устойчивость
LecRK — лектиноподобная рецепторная киназа
LRR — область, богатая лейциновыми повторами
LZ — лейциновая «застежка»
MAMPs — молекулярные структуры, ассоциированные с микроорганизмами
MAPK — митоген-активная протеинкиназа
NBS — сайт, связывающийся с нуклеотидами
NIP — протеины, индуцирующие некрозы

NLP — протеин, индуцирующий некрозы и этилен
PAMPs — молекулярные структуры, ассоциированные с патогенами
PCD — запрограммированная клеточная смерть
PR-белки — белки, связанные с патогенезом
QS (quorum sensing) — пленкообразование
R-гены (белки) — гены (белки) устойчивости
RIP — белки, ингибирующие РНК
RLK — рецепторные протеинкиназы
SAR — системная приобретенная устойчивость
SIPK — киназа, индуцирующая салициловую кислоту
ХВК — X-вирус картофеля

Вступление

Иммунитетом (от лат. *immunitas* — освобождение) в широком смысле в биологии называют освобождение организма от инфекции. В узком смысле механизмом иммунитета было принято считать производство антител, узнающих чужеродные молекулы и клетки и способствующих их уничтожению. Поэтому термин «иммунитет» длительное время использовали только в отношении позвоночных животных, способных к образованию антител. В отношении растений в англоязычной литературе преобладал термин *resistance* — устойчивость. Напротив, в русскоязычной литературе фитопатологи и ботаники традиционно для описания механизмов самозащиты растений от болезней пользовались термином «иммунитет» (М.В. Горленко «Краткий курс иммунитета растений к инфекционным болезням», 1957, 1973). Эта традиция возникла после публикации книг и статей Н.И. Вавилова «Очерк современного состояния учения об иммунитете хлебных злаков к грибным заболеваниям» (1913), «Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям» (1918) и «Учение об иммунитете растений к инфекционным заболеваниям» (1935). Исследования медицинской иммунологии последних десятилетий заставили обратить пристальное внимание не только на антитела, но и на другие механизмы устойчивости животных и человека; подобно фитопатоологам, в медицине стали говорить о «врожденном» и «приобретенном» иммунитете. А затем сходные механизмы естественного врожденного иммунитета обнаружили и у растений. Так что сейчас термин «фитоиммунитет» не вызовет идиосинкразии даже у самого педантичного фитопатолога.

Настоящее учебное пособие написано для магистров классических университетов по специальности «Биология» и сельскохозяйственных вузов по специальностям «Защита растений от болезней и вредителей», «Селекция и семеноводство» и «Сельскохозяйственная биотехнология». Поскольку в последние годы произошло разделение высшего образования на две ступени, то необходимо прежде всего очертить круг обязанностей и должностей, которые могут занимать выпускники этих ступеней в соответствии с полученными ими знаниями. Бакалавр способен быть фермером, грамотным настолько, чтобы вести собственное сельское хозяйство на уровне современной сельскохозяйственной науки, ориентирясь в новой научной и производственной литературе и принимая адекватные решения в нестандартных ситуациях, постоянно возникающих в сель-

скохозийственном производстве. Кроме того, диплом бакалавра позволяет работать в отделах районных и областных административных органов, занимающихся вопросами экологии и сельского хозяйства, и в качестве лаборантов на сельскохозяйственных опытных станциях и в научно-исследовательских институтах медицинского, сельскохозяйственного и биологического профиля.

Выпускники магистратур — основные кадры для биологической и сельскохозяйственной наук, всемерная поддержка которых — главное условие продовольственной безопасности. Кризис, вызванный падением цен на нефть и экономическими санкциями, наглядно показал абсолютную необходимость развивать в нашей стране науку вообще и науку, связанную с продовольственной безопасностью, в особенности. Причем, как это ни парадоксально, необходимо развивать прежде всего наиболее передовые разделы науки, требующие самых высоких финансовых вливаний, — молекулярную биологию, биофизику, биохимию, микробиологию — для того, чтобы, во-первых, автоматизировать и, по возможности, заменить людской труд при различного рода учетах и оценках и, во-вторых, создавать сорта, пестициды, агротехнологии нового поколения, способные конкурировать с зарубежными.

В учебнике Ю.Т. Дьякова и С.Н. Еланского «Общая фитопатология», написанном для бакалавров, приведены основы иммунитета растений и селекции устойчивых сортов, созданных главным образом с использованием традиционных методов и подходов. В данном учебнике в связи с его целевым назначением основное внимание уделено молекулярным исследованиям фитоиммунитета и использованию результатов этих исследований в практических целях.

Предисловие

Фитопатология была создана трудами великих ботаников XIX в. А. де Бари и Кюна в Германии, М.С. Воронина в России, Э. Смита в США и др. Однако на иммунитет растений фитопатологи обратили свое внимание гораздо позже, когда уже были сделаны великие открытия врачей и медицинских микробиологов Л. Пастера, И.И. Мечникова, П. Эрлиха, Р. Коха. В своей книге «Невосприимчивость к инфекционным болезням» (1903) И.И. Мечников писал по этому поводу: «Когда еще бродили впотьмах относительно причины болезни человека и высших животных, патология растений была уже подробно изучена и этиология множества их болезней прочно установлена. Но в ботанике, несмотря на это, вопрос о невосприимчивости оставался на заднем плане, так что мы не имеем о нем никаких работ». Поэтому не удивительно, что большинство исследований первой четверти XX в. в области иммунитета растений было проведено под влиянием великих открытий медицинских иммунологов и посвящено возможностям использовать приобретенный иммунитет. Растения заражали различными ослабленными микроорганизмами, чтобы вызывать у них образование антител, как это происходит в организмах позвоночных животных. Результаты этих работ отражены в двух книгах, изданных, в том числе, на русском языке: А. Карбоне, К. Ариауди «Иммунитет у растений» (пер. с итал., 1937) и Н.И. Вавилов «Учение об иммунитете растений к инфекционным заболеваниям» (1935). Однако антитела у растений не были найдены, а эффект от «вакцинаций» оказался, во-первых, слишком слабым и, во-вторых, нестабильным. Поэтому интерес к практическому использованию приобретенного иммунитета стал постепенно падать. И это не удивительно, поскольку существуют принципиальные различия между растением и животным в их строении и метаболизме, а также между растением, даже полезным, и человеком как объектами исследований и практических подходов в сельском хозяйстве и медицине в целом.

Первое различие заключается в методологических подходах. Это различие отметил еще американский фитопатолог К. Честер, писавший: «Основная цель медицинских наук о человеке — как сохранить индивидуум; цель фитопатологии иная, меньше всего помышление об индивидууме, а главным образом о популяции — множестве. Медик преимущественно занят терапией, фитопатолог — профилактикой» [Cester, 1933]. В самом деле, поскольку выражение «челове-

ческая жизнь бесценна» стало аксиомой медицины, ее задачей является борьба всеми возможными средствами за каждую жизнь. В сельском хозяйстве существует такое понятие, как экономический порог вредности, т.е. перед принятием решения о проведении тех или иных мероприятий по борьбе с возбудителями болезней растений необходимо подсчитать, окупятся ли эти мероприятия стоимостью спасенного урожая и насколько. Если в городе с миллионным населением от инфекционного заболевания погибнет сто человек, то это вызовет панику среди жителей и острую реакцию властей, вплоть до президента. Для фермера, на поле которого растет миллион колосьев пшеницы, гибель даже тысячи колосьев составит столь незначительную долю общего урожая (0,1%), которую он не заметит. Более того, гибель отдельных растений улучшает условия жизни их соседей (например, увеличивается площадь питания корневой системы) и может даже привести к некоторому увеличению общего урожая.

Второе различие заключается в особенностях строения и обмена веществ растений и высших животных. В отличие от растений для позвоночных животных характерна высокая интеграция всех частей организма в единую, тонко регулируемую структуру. Нервная система передает болевой сигнал о месте повреждения в мозг, а кровеносная система направляет туда (в место повреждения) иммунные клетки, обладающие различными защитными функциями. Между этими клетками осуществляется постоянная связь с помощью разнообразных белковых молекул — цитокинов, которые рецептируются специфическими рецепторами и регулируют экспрессию генов, необходимых для прохождения защитных реакций. В специальных клетках происходит синтез белков — антител, система трансляции которых (наличие блоков вариабельных и константных генов) позволяет создавать бесчисленное множество комбинаций, а массовое накопление только тех клонов В-лимфоцитов, которые синтезируют необходимые для защиты от инфекции антитела, дает возможность связывать вредные микроорганизмы и делать их доступными для атаки иммунными молекулами и клетками [Хантов, 1999].

В отличие от позвоночных животных организм растения гораздо менее интегрирован; это выражается хотя бы в том факте, что удаление значительных участков тела растения не приводит к столь трагическим последствиям, как это имеет место у животных. У растений:

- нет гуморальной системы транспорта иммунных клеток к зоне заражения, поэтому нет самих иммунных тканей и клеток: каждая вегетативная клетка несет иммунные функции. А поскольку вегетативная клетка не может выдержать высоких энергетических

нагрузок по созданию огромного разнообразия белковых антител, их у растений нет и быть не может;

- клетки растений в отличие от животных клеток покрыты полисахаридной стенкой, препятствующей контактам между мембраной и белковыми мессенжерами — цитокинами, поэтому нет цитокинов.

В связи с этим механизм возникновения приобретенного иммунитета у растений, если и есть (а он есть), то не может быть столь эффективным, как у животных, и основан на совершенно иных факторах.

Наконец, третье различие заключается в морально-этических подходах использования разных механизмов устойчивости растения и человека. У всех организмов известны внутри- и межпопуляционные генетические различия в предрасположенности к инфекционным болезням. Например, в заливе Мальпек в 1915 г. возникла эпизоотия устриц. В 1920—1927 гг. почти все устрицы исчезли из этого места, но затем численность стала расти и в 1940 г. было собрано 6300 т. Позже такая же эпизоотия возникла в заливе Энмор-Ривер, где к 1933 г. погибли почти все устрицы. Для восстановления популяции завезли устрицы из Мальпек. Интродуценты оказались устойчивыми к болезни и дали рост новым колониям. Европейский речной рак страдает от оомицета *Aphanomyces astaci*, а американский — устойчив. Гетерогенность популяций по устойчивости к болезням известна и у людей. Даже по отношению к такой страшной болезни, как бубонная чума, которая в Средние века косила население целых городов, всегда оставались отдельные индивидуумы, которые, ухаживая за больными, не заболели или болели в слабой форме. Многие подобные примеры приведены в книгах Ф. Харта (1963), В.П. Эфроимсона (1971) и др.

Однако наличие того или иного свойства еще не означает возможности его практического использования. Хотя элементы позитивной евгеники (убийство больных и слабых младенцев и подбор пар для скрещиваний) использовались в древней Спарте и фашистской Германии, они осуждены большинством религий, общественной моралью и запрещены государственными законами. В отличие от медицинских и ветеринарных специалистов только фитопатологу позволено путем искусственного заражения отобрать устойчивые к болезни экземпляры растений, скрестить их с восприимчивыми, но высокопродуктивными, жестко заразить потомство возбудителем болезни, отбраковать и уничтожить все заразившиеся экземпляры и т.д. Поэтому в отличие от медицины в фитопатологии основным способом повышения устойчивости к болезням стала селекция бо-

лезнеустойчивых сортов. Наш выдающийся соотечественник Н.И. Вавилов значительную часть своей жизни провел в экспедициях по разным странам, а также посылал в экспедиции сотрудников руководимого им института растениеводства (ВИР). Он создал теорию о генетических центрах формирования разных групп растений и закономерностях распределения генов устойчивости в генцентрах и на их периферии. В итоге многочисленных экспедиций была создана уникальная коллекция культурных растений и их сородичей. На организованных в разных эколого-климатических зонах страны опытных станциях ВИР проводились испытания привезенных растений и гибридов с ними. В результате этой работы в СССР были созданы первые в мире гибридные сорта картофеля, устойчивые к фитофторозу, сорта табака, устойчивые к вирусу мозаики, подсолнечника, устойчивые к заразику, яблони, устойчивые к парше и др.

Как видно, исследования и практическое использование иммунитета животных и растений развивались в различных направлениях, не оплодотворяя друг друга идеями и методами. Положение изменилось после того, как произошло внедрение в эти направления идей и методов молекулярной биологии. Оказалось, что между механизмами устойчивости к болезням у растений и у животных много общего. Это показалось интересным как медицинским иммунологам, так и фитоиммунологам. Возникли совместные конференции, совместные сборники статей и др. Этот общебиологический подход и лег в основу изложения материалов фитоиммунитета в настоящем учебнике.

В учебниках медицинской иммунологии явления иммунитета сгруппированы по трем разделам: иммунитет на уровне целого организма, врожденный неспецифический клеточный иммунитет и приобретенный иммунитет. Такая же группировка использована и в настоящей книге (рис. 0.1).

Выбранный автором подход к изложению материала отличает настоящий учебник от аналогичных учебников и учебных пособий, изданных в разные годы русскоязычными авторами [Вердеревский, 1959; Горленко, 1973; Дьяков и др., 1976; 2001; Метлицкий, Озерскова, 1968; Попкова, 1979; Рубин, Аршиховская, Аксенова, 1975; Сухоруков, 1952; Шапиро и др., 1986; Шкалик и др., 2005].

Вместе с тем, требования к объему магистерских учебников заставили автора отсеять не только все материалы, лежащие в стороне от избранной генеральной линии, но и изложение методов, с помощью которых исследователи пришли к описываемым в учебнике результатам исследований. Поэтому для усвоения представленных материалов необходимо знание не только фитопатологии, но также таких

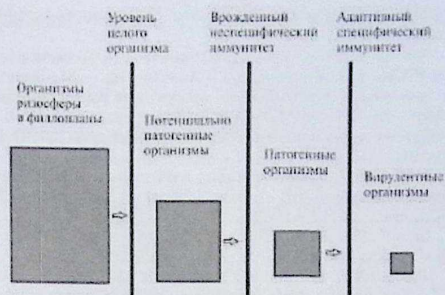


Рис. 0.1. Три линии обороны растений и их роль в снижении численности потенциально патогенных организмов

фундаментальных биологических наук, как биохимия, генетика и молекулярная биология. Методам молекулярных исследований в фитопатологии и фитоиммунитете уделено большое внимание в книге «Фундаментальная фитопатология» (2012).

Цитированная литература

Вавилов Н.И. Учение об иммунитете растений к инфекционным заболеваниям [Текст] / Н.И. Вавилов // Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям. — М.: Наука, 1986.

Вердеревский Д.Д. Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям [Текст] / Д.Д. Вердеревский. — М.: Сельхозиздат, 1959.

Галактионов В.Г. Иммунология [Текст] / В.Г. Галактионов. — М.: Академия, 2004.

Горленко М.В. Краткий курс иммунитета растений к инфекционным болезням [Текст] / М.В. Горленко. — М.: Высшая школа, 1973.

Дьяков Ю.Т. Общая и молекулярная фитопатология [Текст]: учеб. пособие / Ю.Т. Дьяков, О.Л. Озерецковская, В.Г. Джавахия, С.Ф. Багирова. — М.: Общество фитопатологов, 2001.

Дьяков Ю.Т. Общая фитопатология с основами иммунитета [Текст] / Ю.Т. Дьяков, Г.Д. Успенская, И.Г. Семенова. — 2-е изд., перераб. — М.: Колос, 1976.

Дьяков Ю.Т. Общая фитопатология [Текст] / Ю.Т. Дьяков, С.Н. Еланский. — М.: Юрайт, 2015.

Карбоне А. Иммунитет у растений [Текст] / А. Карбоне, К. Арнауди. — М., 1937.

Метлицкий Л.В. Фитоиммунитет [Текст] / Л.В. Метлицкий, О.Л. Озерецковская. — М.: Наука, 1968.

Мечников И.И. Невосприимчивость к инфекционным болезням [Текст] / И.И. Мечников. — СПб., 2003.

Попкова К.В. Учение об иммунитете растений [Текст] / К.В. Попкова. — М.: Колос, 1979.

Рубин Б.А. Биохимия и физиология иммунитета растений [Текст] / Б.А. Рубин, Е.В. Аршиховская, В.А. Аксенова. — М.: Высшая школа, 1975.

Сухоруков К.Т. Физиология иммунитета растений [Текст] / К.Т. Сухоруков. — М.: Изд-во АН СССР, 1952.

Фундаментальная фитопатология [Текст] / под ред. Ю.Т. Дьякова. — М.: Красанд, 2012.

Хаитов Р.М. Взаимодействия клеток иммунной системы: физиологические и медицинские аспекты [Текст] / Р.М. Хаитов // Аллергия, Астма и Клиническая Иммунология. — 1999. — № 1. — С. 6–20.

Харт Ф. Наследственная устойчивость домашних животных к заболеваниям [Текст] / Ф. Харт. — М.: Сельхозгиздат, 1963.

Шапиро И.Д. Иммунитет растений к вредителям и болезням [Текст] / И.Д. Шапиро, Н.А. Вилкова, Э.И. Слепян. — Л.: Агропромиздат, 1986.

Шкаликов В.А. Иммунитет растений [Текст]: учебник / В.А. Шкаликов [и др.]. — М.: Колос, 2005.

Эфроимсон В.П. Иммуногенетика [Текст] / В.П. Эфроимсон. — М.: Медицина, 1971.

Chester K.S. The problem of acquired physiological immunity in plants [Text] // Quarterly Review of Biology, 1933.

Глава 1

ИММУНИТЕТ НА УРОВНЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА

Факторы, определяющие устойчивость целого организма, или, как их назвал выдающийся швейцарский миколог и фитопатолог Э. Гойман (1954), — *факторы аксени*, выработались в процессе эволюции с целью не допустить патогенные организмы к чувствительным органам, тканям и клеткам. Растениям и животным присущи одинаковые группы защитных факторов в виде физических, химических и микробиологических барьеров (табл. 1.1), но конкретные факторы, слагающие эти группы, различны. Рассмотрим эти группы факторов растений подробнее, причем изложение материалов будет подано в виде «гонки вооружений», т.е. «фактор устойчивости растения — способ его преодоления патогеном — способ защиты от такого патогена... и т.д.».

Таблица 1.1

Факторы иммунитета на уровне целого организма у животных и растений

Факторы	Животные	Растения
Физические барьеры	Плотное соеднение эпителиальных клеток	Кутикулярный покров, полисахаридные стенки
Химические барьеры	Жирные кислоты (кожа), лизоцим (слюна, слезы), пенсин (кишечник), дефензин (кишечник)	Летучие антимикробные вещества (фитонциды), фенолы, терпены, депонированные в листовых волосках и мертвых клетках покровных тканей
Микробиологические барьеры	Конкурентная микрофлора эпителия, антибиотические вещества	Микроорганизмы фило- и ризопланы, и ризопланы, их антибиотики, хитинолитические ферменты и др.

1.1. ФИЗИЧЕСКИЕ БАРЬЕРЫ РАСТЕНИЙ

1.1.1. Кутикулярный покров

Кутин — нерастворимый полимер $C_{16}-C_{18}$ жирных кислот, соединенных эфирными связями со спиртами, который погружен в воск, состоящий из неполярных $C_{20}-C_{32}$ алифатических углеводородов, жирных кислот, спиртов и их эфиров. В связи с таким строением кутикула чрезвычайно важна для жизни растений, ибо:

- она создает на поверхности растения прочную пленку, непреодолимую не только для большинства потенциально патогенных микроорганизмов, но также для их метаболитов и вредных для растения ксенобиотиков (продуктов человеческой деятельности);
 - эта пленка обладает гидрофобными свойствами (не смачивается водой), поэтому капли воды не расплываются по ее поверхности, а скатываются в виде шариков. А поскольку споры многих грибов и клетки бактерий попадают на поверхность листьев и способны к прорастанию только в каплях воды, они скатываются вместе с инфицированными каплями. В зависимости от угла наклона листа к несущему его стеблю, скатывание может приводить к освобождению растения от инфекционного агента или к накоплению его в основании листа — листовом влагалыше. Предложен даже такой показатель устойчивости пшеницы к бурой ржавчине, как «водоудерживающая поверхность листа» [Юдкина и др., 1979];
 - кутикулярная пленка ослабляет воздухо- и водообмен между растительной тканью и окружающей средой и, следовательно, уменьшает интенсивность испарения. Поэтому поверхность ксерофитов (засухоустойчивых растений) покрыта мощным восковым налетом;
 - мономеры кутина индуцируют прорастание апрессориев у возбудителей пирикулярноза риса *Magnaporthe grisea* и мучнистой росы злаков *Blumeria graminis* [Serrano et al., 2014].
- В процессе коэволюции многие паразиты приобрели способность преодолевать защитный кутикулярный слой различными путями.

1. *Проликование через брешу в кутикулярном слое — ранки.* Вследствие погрызов насекомыми, повреждения частицами грунта, имеющими острые края, рабочими органами сельскохозяйственных машин, в процессе ухода за растениями и других причин на листьях и особенно на корнях постоянно возникают разрывы кутикулярного слоя, служащие воротами для инфицирования многими грибами и бактериями, которые называют *раневыми паразитами*. Важный фактор устойчивости к ним — скорость зарубцовывания ран. Например, процент успешных заражений листьев кукурузы возбудителем антракноза *Colletotrichum graminicola* в момент нанесения ранки составил 70%, через 1 ч — 22%, а через 6 ч — менее 5% [Muimba et al., 1990]. Раневые паразиты особенно опасны в процессе хранения сочной продукции (картофеля, плодов, корнеплодов), ибо очаг гниения может захватить всю хранящуюся партию. Поэтому в картофелехранилищах применяют «активное вентилирование» — пропускают через хранящуюся партию подогретый воздух: создание ра-

невой перидермы — энергоемкий процесс, требующий снабжения клеток кислородом, поэтому активное вентилирование способствует быстрому затягиванию ранок на клубнях.

2. *Активное прободение кутикулы.* У многих фитопатогенных грибов в апрессории развивается огромное внутриклеточное тургорное давление, с помощью которого растворенные в воде органические вещества всасываются в клетки. А поскольку в стенке апрессория у многих грибов откладывается меланин, выполняющий роль молекулярной ловушки, потери поглощенных веществ не происходит, что еще более увеличивает внутриклеточное давление. Паразит риса *Pyricularia oryzae* генерирует внутри апрессория давление $80 \cdot 10^5$ Па (80 атм). Ростковые трубки возбудителя серой гнили *Botrytis cinerea* пробивают золотую фольгу. Такое давление позволяет растущей вниз инфекционной гифе пробивать кутикулярную пленку. Защитой от подобных паразитов может быть только увеличение толщины кутикулярного слоя, как это показано для видов барбариса, имеющих различную степень устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* [Гойман, 1954]. Толщина кутикулы — важный фактор устойчивости крыжовника к мучнистой росе (возбудитель *Sphaerotheca mors uvae*): в устойчивых к мучнистой росе сортах она составляет 1,05–1,26 мкм, а в восприимчивых — 0,51–0,64 мкм.

К механическому давлению следует добавить образование многими грибами фермента кутиназы — специфической эстеразы, деградирующей кутин. Кутиназа присуща таким важным возбудителям болезней растений, как *Cochliobolus heterostrophus*, *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis*, *Nectria haematococca*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemutianum*. Как видно, все они относятся к некротрофам или гемибiotрофам. Ее синтез индуцируется фракцией кутин (6-оксигирными кислотами) длиной 16 углеродных единиц [Serrano et al., 2014].

3. *Внедрение через естественные отверстия в кутикуле — устьица, гидратоды и др.* Многие грибы и бактерии проникают через естественные отверстия в кутикуле. Поиск устьиц осуществляется ростом по градиенту концентрации химических веществ, выделяемых через устьица, или ориентацией в соответствие со структурой кристаллов воска на поверхности листа. Например, проростки урединиоспор злаковых ржавчин растут строго поперек длинной оси листа, что повышает вероятность нахождения устьиц (рис. 1.1). Режим работы устьиц контролируется факторами окружающей среды — степенью освещения, влажности воздуха, концентрацией CO_2 . Нанесение на лист *Arabidopsis* бактериальных клеток также приводило к закрытию устьиц, как одно из направлений иммунного ответа (см. гл. 2).

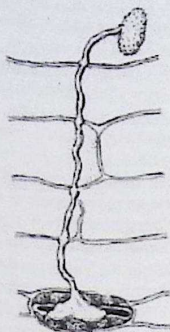


Рис. 1.1. Внедрение ростковой трубки гриба *Puccinia striiformis* в устьице (показано стрелкой) на листе пшеницы [Андреев, Плотникова, 1989]

4. Внедрение с помощью переносчиков. Многие грибы, бактерии и большинство фитопатогенных вирусов распространяются на теле членистоногих животных и нематод и вносятся в растительные клетки с помощью ротовых органов, которыми колюще-сосущие насекомые и фитонематоды прокалывают как кутикулу, так и клеточную стенку (см. ниже) и вносят в клетки патогенные микроорганизмы.

1.1.2. Клеточная стенка

Клетки растений покрыты клеточными стенками, которые, подобно жесткому каркасу, поддерживают протопласт, защищая его от механических и осмотических повреждений. Основной компонент клеточной стенки растений — полисахариды, которые подразделяют на три группы:

- целлюлоза, представляющая собой микрофибриллы из β -1,3-глюканов (линейных полимеров глюкозы), соединенные друг с другом по всей длине водородными связями;
- пектин — линейный полимер метилированной полигалактуроновой кислоты (α -1,4-полигалактуронан), нерегулярно связанный с молекулами рамнозы (метил-рамногалактуронан);
- гемицеллюлоза: под этим названием объединяют разнообразные полимеры галактана (разветвленного α -1,4, β -1,6 полимера галактозы), арабинана (разветвленного α -1,5, 1,3 полимера арабинозы), ксилоглюкана (α -1,4 полимера глюкозы с разветвлениями

из ксилозы, галактозы и фукозы), ксилана (α -1,4 полимера глюкозана с разветвлениями из арабинозы и глюкуроновой кислоты).

Эти полимеры соединены друг с другом ковалентными и водородными связями, образуя сложную цепь (рис. 1.2), из которой построена *первичная клеточная стенка*. Целлюлозные балки, как арматура в стене дома, обеспечивают стенке необходимую прочность, а соединение их с гибкими молекулами гемицеллюлозы позволяет стенке растягиваться, вследствие чего молодая клетка увеличивается. После достижения клеткой необходимого размера в ее стенке откладывается полимер ароматических альдегидов и кислот — лигнин (рис. 1.3), придающий стенке жесткость, ригидность и не позволяющий дальнейшему ее растягиванию (*вторичная клеточная стенка*). Между стенками соседних клеток откладывается *срединная пластинка*, тоже состоящая из полисахаридов с преобладанием пектина, — межклеточный цемент, склеивающий клетки и объединяющий их в ткань.

Клеточная стенка — полифункциональная структура. Она поддерживает протопласт, защищая его от разрушения вследствие внутренних осмотических явлений, она защищает клетку от проникновения в нее потенциально патогенных микроорганизмов и их метаболитов, наконец, находящиеся в клеточной стенке и пронизывающие ее ферментные и рецепторные белки осуществляют разнообразные функции, связанные с взаимоотношением клетки с окружающей средой. Поэтому целостность клеточной стенки

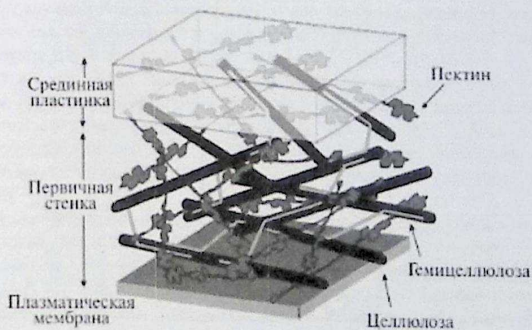


Рис. 1.2. Схема строения клеточной стенки растений [McCann, Roberts, 1991]

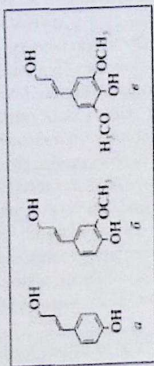
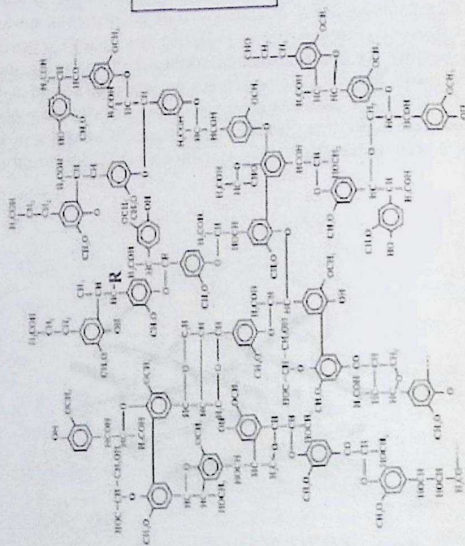


Рис. 1.3. Строение лигнина:

справа — исходные соединения — фенольные спирты; *a* — р-кумарилловый; *b* — кониферилловый; *e* — сингилловый. В центре — место ковалентной связи с углеводом R

чрезвычайно важна, в частности, при любом локальном повреждении стенки в ядро поступает сигнал SOS, и в клетке начинается синтез структурных компонентов стенки, транспорт их к месту повреждения и заделывание бреши.

Преодоление барьера клеточной стенки фитопатогенными микроорганизмами осуществляется разными способами.

Некротрофные грибы и бактерии воздействуют на клетки комплексом ферментов дегполимераз, разрушающих стенку. Это C_x -целлюлазы — целлюлазы, глюканазы и другие ферменты, осуществляющие дегградацию целлюлозы; гемицеллюлазы — арабиназы, галактаназы, ксиланазы, разрушающие молекулы гемицеллюлозы, пектиназы — полигалактуроназы, пектатлазазы, пектинметилэстеразы, деградирующие молекулы пектина. Обозначение перечисленных ферментов во множественном числе означает наличие разнообразных изоформ этих ферментов, различающихся субстратной специфичностью, оптимальном pH и другими свойствами, позволяющими гибко реагировать на химические различия у разных видов растений, разных их возрастных групп и условий окружающей среды. Разрушением стенки паразиты решают три важнейшие для своего существования задачи: 1) продукты дегградации стенки — моно- и олигомеры сахаров служат источниками питания для паразита; 2) снятие стенки приводит к гибели протопласта, а мертвая клетка не способна к синтетической деятельности и, следовательно, теряет иммунные функции; 3) разрушение срединной пластинки приводит к распаду ткани на отдельные клетки и их группы (возникают гнили) и, тем самым, облегчает продвижение паразита в растении, более быстро его оккупацию.

Биотрофные паразиты не должны убивать протопласт, ибо в основе стратегии их паразитизма лежит питание содержимым живых клеток. Поэтому и число продуцированных ферментов и их концентрация значительно ниже, чем у некротрофов. Известны два основных способа взаимоотношений биотрофов со своими хозяевами.

1. Апопластное пребывание. Характерно для псевдомонад некоторых видов и для многих грибов — симбиотических эндофитов (например, эндофитов кормовых злаков из рода *Neotiphodium*, рис. 1.4) и паразитов (например, возбудителя оливковой пятнистости томата *Cladosporium fulvum*). Клетки бактерий и мицелий грибов находятся в межклеточном пространстве, непосредственно не контактируя с клеточными стенками. Выделяемые паразитами в среду роста ферменты размягчают стенки окружающих клеток, а сигнальные моле-

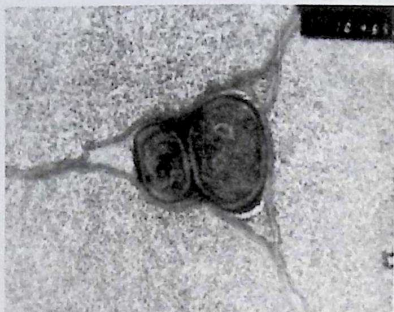


Рис. 1.4. Гифы эндофитного гриба *Neotiphodium* sp. в межклетниках овсяницы. Поперечный срез зараженной ткани (фото Е.Ю. Благовещенской)

кулы (см. ниже) усиливают приток в оккупированную зону продуктов питания.

2. Гаусториальное питание. Характерно для много биотрофных грибов и псевдогрибов, возбудителей настоящих и ложных мучнистых рос, ржавчин и др. Находящийся в апопласте мицелий при контакте с клеточной стенкой выделяет ферменты, вызывающие локальное разрушение стенки. Гифа, называемая *материнской клеткой гаустория*, проходит это отверстие и при контакте с плазмолеммой не разрушает ее, а инвагинирует. Внутриклеточное расширенное окончание гифы получило название *гаустория*. Он находится внутри клетки, но вне симпласта, ибо окружен впяченным участком плазмалеммы — *экстрагаусториальной мембраной*. Между стенкой гаустория и экстрагаусториальной мембраной находится свободное пространство, «нейтральная полоса» — *экстрагаусториальный матрикс*. Отсутствие стенки над участком плазмалеммы, окружающим гаусторий, во-первых, облегчает «молекулярный диалог» между партнерами, и, во-вторых, дает клетке сигнал о необходимости заделывать брешь. В зону экстрагаусториальной мембраны направляются потоки пузырьков, содержащих «строительный материал», которые перехватываются грибом и используются для его питания. Однако в случае «быстрого реагирования» клетка может очень рано заполнить брешь полисахаридами (каллезой), да еще с примесью таких прочных элементов, как кремний, и тогда гаусторий будет «замурован» и растение освободится от паразита.

1.1.3. Барьеры внутри растительной ткани

Продвижению мицелия патогенных грибов могут препятствовать структурные особенности внутренних тканей растения-хозяина. Например, в паренхиме пшеницы наряду с хлоренхимными клетками, имеющими тонкие стенки, многочисленные хлоропласты и подверженными колонизации паразитами, встречаются клетки *склеренхимы*, покрытые толстыми оболочками и имеющие белое содержимое. Как показали Э.Э. Гешеле и Т.Л. Бабаяни, сорта пшеницы, богатые склеренхимой, более устойчивы к стеблевой ржавчине, чем сорта, имеющие редкие, небольшие островки склеренхимы.

1.2. ХИМИЧЕСКИЕ БАРЬЕРЫ

Растения богаты вторичными метаболитами, которые придают окраску цветкам, специфичные запахи, вкусовые характеристики, обладают биологической активностью и поэтому используются в народной и официальной медицине. Число растительных вторичных метаболитов чрезвычайно велико (табл. 1.2), что позволяет выбирать наиболее эффективные против разных патогенов (бактерий, грибов, оомицетов, нематод, насекомых). Многие вторичные метаболиты, обладающие сильными антимикробными свойствами, возникли у растений в ходе коэволюции с паразитами и поэтому играют важную роль в защите от потенциальных патогенов.

Таблица 1.2

Примерное число вторичных метаболитов, описанных у растений [Wink, 1988]

Соединения	Число известных структур
Монотерпены	1000
Сесквитерпены	1500
Дитерпены	1000
Тритерпены / стероиды	800
Тетратерпены	350
Поликетиды	700
Полиацетилены	750
Флавоноиды	1200
Фенилпропанониды	500
Амины	100
Алкалоиды	7000
Небелковые аминокислоты	400
Цианогенные гликозиды	50
Гликозинолаты	100

Химические соединения образуют глубокоэшелонированную оборону из нескольких барьеров, каждый из которых отсекает определенные группы потенциально патогенных организмов.

1.2.1. Фитонцидный барьер

Растения окружены облаком летучих метаболитов, которые высвобождаются как из надземных частей растений, так и из корней. Многие из них, названные Б.П. Токсином фитонцидами, токсичны для микроорганизмов. Являясь «первой линией обороны», фитонциды могут оказывать губительное действие на патогенные для человека бактерии и создают благоприятный микроклимат для больных многими инфекционными болезнями. Но большинство фитопатогенных микроорганизмов в ходе тысячелетней коэволюции с растениями приобрели толерантность к фитонцидам, что позволило им сформировать специфический микробенноз на поверхности корней (в ризоплане), листьев (в филлоплане) и внутри растений (паразиты, эндофиты). Например, в экстрактах летучих веществ эвкалипта обнаружено 270 органических соединений: органические кислоты, эфиры, альдегиды, терпеноиды, фенолы, соединения, содержащие серу и азот. Благодаря этим веществам эвкалиптовая ингаляция помогает в лечении многих инфекционных болезней человека, однако фитонциды эвкалипта не защищают это растение от губительных болезней, вызванных многими паразитами, в частности от корневой гнили, вызываемой *Phytophthora cinnamomi*. В то же время австралийские акации не поражаются этим паразитом, так как экстракты летучих веществ корней акации подавляют радиальный рост его мицелия, продукцию зооспорангиев и прорастание зооспор.

1.2.2. Барьер клеточной стенки

Выше было сказано, что во вторичной клеточной стенке откладывается трехмерный полимер *лигнина*. Он синтезируется из простых фенолов кониферилового, синапилового и кумаринового спиртов (см. рис. 1.3) вследствие их дегидрогенизации и конденсации. У разных растений соотношение этих «строительных блоков» в молекулах лигнина может сильно варьироваться. Лигнин ковалентно связан с целлюлозой, гемицеллюлозой и белками клеточной стенки, богатыми оксипролином, вследствие чего экранирует основные полисахариды стенки, защищая их от атаки микробных деполимераз. Он также препятствует диффузии в клетки растения метаболитов патогенов, может замуровать (лигнифицировать) грибные гифы и обладает прямой токсичностью для микроорганизмов.

Иногда лигнин синтезируется в протоплазме в ответ на инфекцию, причем его композиция отличается от лигнина из здоровой ткани. Быстрая аккумуляция предшественников лигнина часто сопровождается локальным синтезом ферментов фенилаланиламинумулазы (ФАЛ) и пероксидазы, а также пероксида водорода. После обработки растений ингибиторами ФАЛ лигнин не синтезируется и паразиты приобретают способность внедряться в клетки.

1.2.3. Барьер мертвых клеток

Живые ткани многих растений окружены покровами, состоящими из мертвых клеток. Таковы, например, кроющие чешуи луковичных растений и кора древесных. В живых клетках токсичные соединения находятся в нетоксичной растворимой форме гликозидов, токсичный агликон которых соединен гликозидной связью с глюкозой или иным сахаром. В живой клетке имеются ферменты гликозидазы, отщепляющие глюкозу и освобождающие токсичный агликон, но они пространственно разделены внутриклеточными мембранными барьерами. Гликозиды часто локализованы в вакуолях, а гликозидазы — в мембранных пузырьках лизосомах или в клеточной стенке. После отмирания клетки внутриклеточные мембраны разрушаются и субстраты (гликозиды) приходят в контакт с ферментами, вследствие чего в клетке накапливаются токсичные продукты. Поэтому кроющие клетки таких растений представляют собой не только механический, но и химический барьер. Например, сорта лука с желтыми и красными чешуями содержат в живых внутренних клетках фенольный гликозид флавоновый пигмент *кверцетрин*, у которого сложный дифенол *кверцетин* соединен гликозидной связью с моносахаридом рамнозой. В отмирающих кроющих чешуях вследствие разрушения вакуолей гликозидаза отщепляет сахарный остаток от фенола, который фенолоксидазами расщепляется до простых водорастворимых высокотоксичных фенолов — *протокатеховой кислоты* и *о-катехола* (рис. 1.5). Диффундируя в инфицированные капли на поверхности лука, они убивают находящиеся там

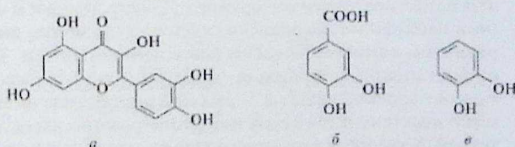


Рис. 1.5. Фенольный агликон лука кверцетин (а) и продукты его окисления протокатеховая кислота (б) и о-катехол (в)

споры фитопатогенных грибов. Поэтому окрашенные сорта лука, в отличие от белых, устойчивы к гниlostным грибам, а луковичы с поврежденными кроющими чешуями поражаются независимо от их окраски.

В мертвых клетках коры хвойных деревьев присутствует токсичный дифенол *пиносильвин* (рис. 1.6), а в клетках коры ильмов — сесквитерпен *мазон* — фактор устойчивости к голландской болезни.

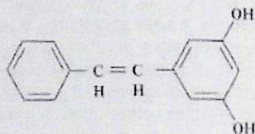


Рис. 1.6. Фенол пиносильвин, накапливающийся в коре деревьев хвойных пород

1.2.4. Барьер живых клеток

Как сказано выше, большинство антимикробных соединений в живых клетках гликозилированы, так как гликозиды менее токсичны, чем их агликоны, и поэтому не повреждают клетки, в которых находятся. К тому же, будучи растворимыми в воде, гликозиды легко транспортируются к инфицированным местам. Обычно они находятся в вакуолях и отделены от остальных клеточных компарментов барьером тонопласта. При повреждении внутриклеточных мембран содержимое вакуоли выливается в цитоплазму, где оно вступает в контакт с ферментами, отщепляющими сахарные остатки и осуществляющими различные модификации агликонов. Таким образом, агликоны в живых клетках — это готовое к отражению атаки, но «незаряженное оружие». Для его зарядки и стрельбы по цели необходимо повреждение клеточных мембран, вызванное заражением или механическим повреждением клетки. Такова генеральная стратегия защиты от паразитов и иных стрессов. Частный случай подобной защиты — рассмотренное выше высвобождение токсичных продуктов в естественно отмирающих клетках покровных тканей. Классификация гликозидов основана на химическом строении их агликонов.

Фенольные гликозиды. В качестве агликонов служат производные ароматических соединений — фенолов, играющих разнообразные роли в жизни клетки и ее взаимоотношениях с окружающей средой

[Peters, Verma, 1990]. Многие фенолы оказывают антимикробное действие и блокируют развитие фитопатогенов; они служат «строительным материалом» в синтезе лигнина и укреплении клеточной стенки; регулируют гормональную деятельность растения, играющую важную роль в развитии патогенных организмов; индуцируют гены катаболизма бактерий и гены, требующиеся для паразито-хозяйных взаимоотношений. Производные фенолов, такие как ацетосирингол, флавоноиды и др., выделяемые растениями в окружающую среду, индуцируют экспрессию *vir*-генов у фитопатогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* и нодуляцию клубеньковых бактерий.

Фенольные гликозиды обнаружены у большого числа растений. Выше описаны реакции превращения фенольного гликозида кверцитрина в кроющих чешуях окрашенных сортов лука. А в листьях разных видов яблони фенольный гликозид *флоризин* (рис. 1.7) накапливается в количестве до 3–7% к массе сухих листьев. При механическом повреждении листьев и заражении их грибами сначала происходит отщепление сахара, а затем серия химических реакций с образованием флороглюцина, флоретиновой и β -оксibenзойной кислот. Ни одно из этих соединений не токсично для специализированного паразита — возбудителя парши яблони *Venturia inaequalis*, но они могут подавлять развитие гнилостных грибов из родов *Penicillium* и *Aspergillus* и гликозид груши *арбутин* β -глюкозидазами хозяина и превращается до глюкозы и агликона *гидрохинона* (гидрохинон превращается в *меланин*), через серию окислительных реакций превращения в *меланин*. Полимеризация последнего приводит к образованию темных пигментов *меланинов*. С образованием *меланина* устойчивость груши серьезному заболеванию (возбудитель *Erwinia amylovora*), например, *парша* (яблони), *ржавчина* (яблони), *ржавчина* (кукурузы) описаны гликозиды, в которых агликон — циклические *гидрохиноны* и *флоризин* (содержащий полный цикл азотсодержащий (рис. 1.9). Фермент β -глюкозидаза локализован в клеточной стенке,

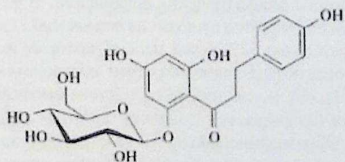


Рис. 1.7. Фенольный гликозид яблони флоризин

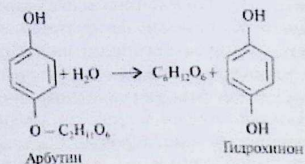


Рис. 1.8. Фенольный гликозид груши арбутин и его агликон гидрохинон

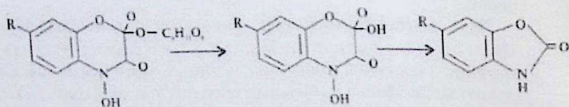


Рис. 1.9. Гликозид злаков бензоксазин и продукты его распада

разрушение которой патогеном вызывает появление агликонов *бензоксазинов*, токсичных для ржавчинных грибов, возбудителей снежных плесеней, тлей и других патогенов.

Цианогенные гликозиды. У растений более 800 видов из 670 семейства (сорго, лядвенца, проса, льна, миндаля и др.) в процессе прорастания семян из аминокислот (тирозина, валина, лейцина, изолейцина) синтезируются цианогенные гликозиды — *дуринин, лимамарин, лотаустролин, амигдалин*. Ферменты, осуществляющие поэтапное превращение аминокислоты в цианогенный агликон, находятся на внутриклеточных мембранах в состоянии комплекса, эффективно канализующего поток углерода из 1-тирозина в агликон, по схеме: тирозин — N-окситирозин — альдоксим — нитрилл — d-оксинитрилл — цианогенный агликон, а затем и в глюкозид [Сопп et al., 1979]. При повреждении мембран сначала β-гликозидаза отщепляет глюкозу, а затем фермент оксинитрилаза высвобождает сильную кислоту — сильнейший дыхательный яд (рис. 1.10).

Гликозиды алифатических соединений. В разных органах тюльпанов накапливаются гликозиды *тиолипозиды* (их содержание в пес­тиках превышает 32% сухой массы), которые после отщепления сахарных остатков β-гликозидазами замыкаются в лактонный цикл (рис. 1.11), очень токсичный вследствие высокой реакционной способности (связывается по месту двойных связей с SH-группами белков). Образование лактона — важный фактор устойчивости тюльпанов к серой гнили (возбудитель *Botrytis cinerea*). А в корнях некоторых видов авокадо обнаружен активный окислитель лактон *бар-*

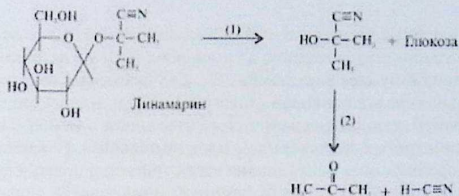


Рис. 1.10. Пути деградации гликозида линамарина с образованием синильной кислоты:

1 — β -глюкозидаза; 2 — оксинитрилаза

бонол (рис. 1.12) — фактор устойчивости к возбудителю корневых гнилей древесных растений *Phytophthora cinnamomi* [Zaki et al., 1980].

Терпеноидные гликозиды и гликоалкалоиды. Тритерпеноиды и стероиды формируют с сахарами гликозиды, образующие в воде мыль-

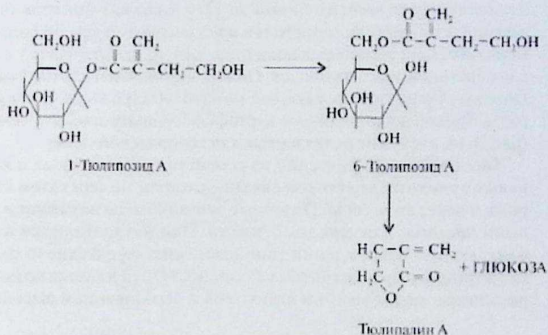


Рис. 1.11. Деградация гликозида тюльпана тюлопозид А в клетках, зараженных *Botrytis cinerea*

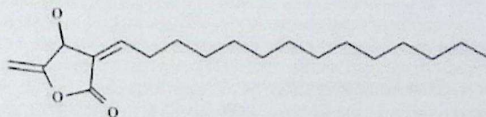


Рис. 1.12. Антигрибной лактон авокадо барбонол

ноподобные растворы и названные *сапонинами* (от лат. *sapo* — мыло). У большинства сапонинов олигосахаридная цепь прикреплена к терпеноидному ядру в положении C_3 , но у некоторых имеется дополнительная связь с глюкозой в положении C_{26} или C_{28} . Сапонины очень ядовиты, так как связываются со стеринами в мембранах (эргостерин грибов, холестерин млекопитающих). Накапливающийся в корешках овса пентациклический тритерпеновый гликозид *авенацин* (рис. 1.13) является фактором устойчивости к офиоболезной корневой гнили, вызываемой грибом *Gaeumannomyces graminis*. Стероидные гликозиды пасленовых растений имеют в своем составе азотсодержащий гетероцикл, поэтому отнесены к химической группе гликоалкалоидов. Синтез гликоалкалоидов картофеля *соланина* и *чаконина* (рис. 1.14, а) индуцируется освещением, поэтому они накапливаются в листьях, ягодах (обуславливают горький вкус ягод) и озелененных на свету клубнях, которые становятся ядовитыми, но хорошо хранятся, не повреждаясь гнилями. Соланин и чаконин подавляют рост многих грибов *in vitro* и служат факторами возрастной устойчивости картофеля к альтернариозу и другим болезням. Гликоалкалоид томата *томатин* (рис. 1.14, б) накапливается в вакуолях листьев и зеленых плодах. Он высокотоксичен для *Cladosporium fulvum* и других грибов, вызывая потерю электролитов через мембраны. Гликоалкалоид дикого картофеля *Solanum demissum demissum* (рис. 1.14, в) служит репеллентом для колорадского жука.

Тиогликозиды. У растений из семейств крестоцветных и каперецевых в гликозидах агликон связан с сахаром не через атом кислорода, а через атом серы. Подобные тиогликозиды называют *горчичными маслами*, или *гликозинолятами*. Они накапливаются в вакуолях, но при повреждении тонопласта специфические ферменты (мирозиназа и др.) отщепляют сахар, после чего в клетке возникают различные модификации агликонов с образованием высокоток-

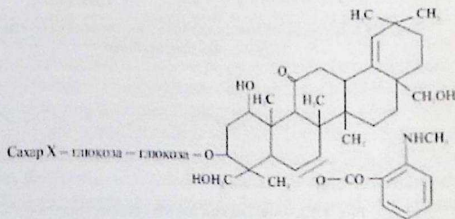


Рис. 1.13. Сапонин овса авенацин

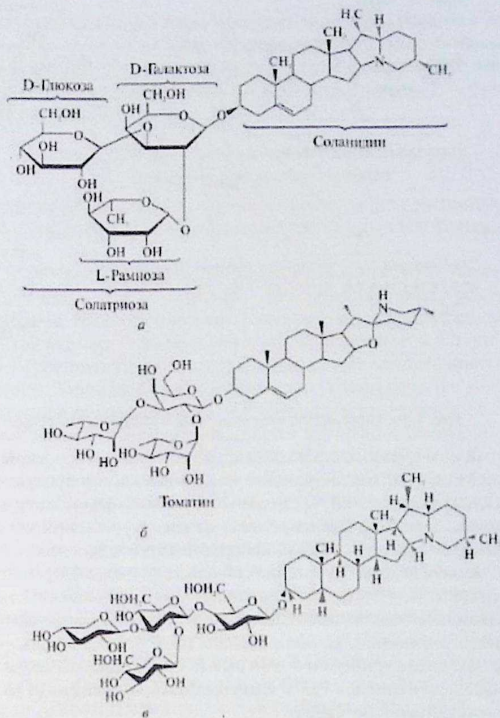


Рис. 1.14. Гликоалкалоиды пасленовых:
 а — соланин картофеля; б — томатин томата; в — демиссин *Solanum demissum*

сичных продуктов (например, летучих изороданидов — $R-N=C=S$), слезоточивых ядов, оказывающих выраженное антимикробное действие (рис. 1.15). Их слезоточивый эффект ощущается, например, при натирании корня хрена. Представители семейства капустных содержат около 80 структурно идентифицированных гликонолятов, имеющих одинаковую функциональную группу и различающихся радикалами.

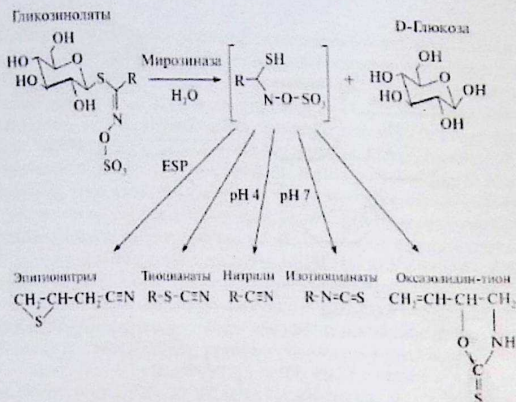


Рис. 1.15. Тиогликозид крестоцветных и продукты его деградации

Таким образом, стратегия клеточной защиты, основанная на высвобождении токсичных для микроорганизмов продуктов из запасных соединений — гликозидов, высокоэффективна и универсальна. Однако и в неповрежденных клетках растений могут накапливаться токсичные для микроорганизмов соединения.

Аминокислоты. В растениях обнаружено около 400 различных небелковых аминокислот; некоторые из них токсичны. В частности, накапливающийся в бобовых растениях (до 5% массы сухих семян) аналог аргинина L-канаванин очень токсичен для микроорганизмов (в том числе грибов) и животных (в том числе насекомых) и, как полагают [Rosenthal, 1977], является фактором защиты от вредителей и возбудителей болезней.

Алкалоиды. Азотсодержащие гетероциклические соединения, содержащиеся в клеточном соке многих растений. Они нерастворимы, но обычно находятся в форме водорастворимых солей. В зависимости от химической природы азотистого гетероцикла алкалоиды разделяют на несколько групп: 1) производные пиридина; 2) производные пирролидина; 3) производные хинолина и изохинолина (хинин, морфин); 4) производные индола (алкалоиды спорыньи); 5) производные пурина (кофеин, теобромин); 6) комбинированные алкалоиды (никотин содержит группы пиридина и пирролидина). Большинство алкалоидов растений являются сильными нервно-па-

раликтическими ядами и высокотоксичны для позвоночных и беспозвоночных животных. Защитное действие против насекомых-фитофагов продемонстрировано многими опытами. Однако показано, что многие алкалоиды токсичны и для микроорганизмов — бактерий и грибов [Joosten, van Veen, 2011].

1.2.5. Пути преодоления химических защитных барьеров микроорганизмами

Многие фитопатогены в процессе коэволюции с растениями выработали механизмы, преодолевающие химические барьеры растений.

1. Биотрофные паразиты, как сказано выше, воздействуют на клетки мягко, «интеллигентно», и не повреждают внутриклеточные мембраны. Например, возбудитель килы крестоцветных, внутриклеточный паразит *Plasmiodiophora brassicae*, проникает в клетки корня в мембранном пузырьке, который отделяет его от клеточного содержимого. Зараженная клетка длительное время остается живой, ее мембраны не повреждаются, и изороданиды не появляются. В процессе разрастания зараженных клеток покровные ткани растрескиваются, и ранки заселяются почвообитающими раневыми некротрофными паразитами, которые разрушают клетки и индуцируют образование токсичных веществ. Но плазмодий возбудителя килы к этому времени распадается на покрытые прочными оболочками покоящиеся споры, устойчивые к токсинам.

2. Изменение сайта, чувствительного к токсическому действию агликона. Синильная кислота (цианид), высвобождающаяся из цианогенных гликозидов, — сильнейший дыхательный яд, блокирующий цитохромоксидазную дыхательную цепь в митохондриях. У паразита лядвенца (*Lotus* spp.) гриба *Stemphylium loti* в присутствии цианида происходит активизация ферментов альтернативного, не чувствительного к цианиду дыхания [Rissler, Millar, 1977].

3. Модификация токсичных веществ до менее токсичных. Как сказано выше, фактором устойчивости тюльпанов к неспецифическому паразиту *Botrytis cinerea* служит агликон гликозида тюлипозид, который после отщепления остатка сахара замыкается с образованием токсичного лактона. Паразит тюльпана *Botrytis tulipae* препятствует замыканию тюлипозид в кольцо, как это происходит при заражении неспециализированным паразитом *B. cinerea*. Поэтому образуется не высокотоксичный лактон, а гораздо менее токсичная кислота (рис. 1.16, D).

Локализованный в корнях овса сапонин авенацин защищает корни от заражения возбудителем офиоболезной корневой гнили

рессирует индукцию защитного ответа, поскольку интерферирует с фундаментальными путями трансдукции сигнала, ведущими к возникновению резистентности [Bouarab et al., 2002]. Томатиназа обнаружена также у паразита томата *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, но не у f. sp. *lini* и *conglutinans*.

Патогены цианогенных растений — сорго *Gloeosporium sorghi* и лядвенца *Stemphylium lotii* — имеют фермент цианид-гидролиазу, который осуществляет конверсию цианида в менее токсичный формамид (рис. 1.16, 2). Процесс конверсии энергозависим, а цианид, подавляя цитохромоксидазное дыхание, лишает клетки гриба энергии. Вот для получения энергии, необходимой для конверсии цианида, и нужен описанный выше альтернативный путь дыхания, не зависящий от цианида.

А гриб *Penicillium corymbiferum*, в отличие от других пенициллов, вызывает гниль чеснока благодаря наличию фермента аллииндиазы, разлагающего фитонцид чеснока аллиин. Многие штаммы насекомых и грибов выработали способность разлагать алкалоиды и использовать продукты распада в качестве углеродного и азотного питания [Joosten, van Veen, 2011]. В частности, эти адаптации заставляют растения вырабатывать новые и новые формы защитных веществ. По-видимому, «гонкой вооружений» обусловлено огромное разнообразие вторичных метаболитов, приведенное в табл. 1.2.

Некоторые насекомые-фитофаги в ходе коэволюции с растениями приобрели толерантность ко многим летучим токсичным веществам и даже стали использовать их. Так, гликонолаты (горчичные масла) капустных растений бабочки капустной белянки используют как аттрактанты для откладки яиц. Гусеницы белянки станут есть даже фильтровальную бумагу, смоченную соком капустных растений. Другой пример: в ответ на механическое повреждение тканей в растениях табака индуцируется продукция никотина — нейротоксина, токсичного для большинства насекомых. Однако гусеница специализированной к табаку бабочки *Manduca sexta*, во-первых, индуцирует низкий уровень никотина, во-вторых, толерантна к нему, и в-третьих, использует его для собственной защиты от паразитических ос.

1.3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ БАРЬЕРЫ

В процессе вегетации растения выделяют в окружающую среду огромное число различных метаболитов как полезных для микроорганизмов (аминокислоты, сахара и др.), так и токсичных для них (фитонциды). Виды и штаммы бактерий и грибов, приобретших то-

лерантность к вредным продуктам, получили возможность обитать как вблизи корней растений (в ризосфере), так и непосредственно на поверхности корней (в ризоплане) и листьев (в филлоплане), и использовать для питания полезные метаболиты растений. Более того, многие микроорганизмы — бактерии и грибы — стали жить внутри растений, эндофитно; например, у сельскохозяйственных растений обнаружено не менее 220 видов эндофитных бактерий, принадлежащих к 71 роду. Многие из них (а, возможно, все) оказывают как прямое (вследствие поставки биологически активных веществ), так и косвенное положительное влияние на рост растений, в частности благодаря защите своего хозяина от потенциально патогенных организмов. Микробиологическая защита растений многопланова.

1. *Конкуренция за источники питания.* В почвах почти все железо представлено окисными формами Fe^{3+} , которые нерастворимы и недоступны для организмов. Однако железо абсолютно необходимо, так как входит в состав многих окислительно-восстановительных ферментов. Поглощение железа микроорганизмами осуществляется с помощью хелатных соединений — сидерофоров, у которых свободные атомы кислорода соединяются с атомом железа и захватывают его в свою молекулу. Клетки микроорганизмов выделяют сидерофоры в окружающую среду, а затем связывают их рецепторами, находящимися на поверхности клеток, и переносят в цитоплазму. Бактериальные сидерофоры (рис. 1.17), обладающие гораздо более высоким сродством к железу, чем грибные (рис. 1.18), могут активно препятствовать поступлению железа в клетки грибов и тем самым ингибировать железосодержащие ферменты.

2. *Прямой антагонизм.* Многие бактерии из родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, а также грибы из родов *Trichoderma*, *Tolyocladium* и др. образуют противогрибные антибиотики, такие как феназины, флороглюцины, пиллолотеорин, пирролнитрил, оомицин А, триходермины и др. Они обладают фунгицидным и фунгистатическим свойствами и тормозят рост и размножение потенциальных патогенов.

Некоторые виды бактерий, в частности многие мицелиальные бактерии — актиномицеты, обладают набором хитиноподобных ферментов, разрушающих хитин — важнейший компонент клеточных стенок грибов, и тем самым вызывают гибель мицелия.

Сумчатые грибы — эндофиты мелкозерных злаков — образуют ядовитые алкалоиды, которые накапливаются в зараженных растениях и защищают их от травоядных млекопитающих, насекомых, слизней и некоторых фитопатогенных грибов.

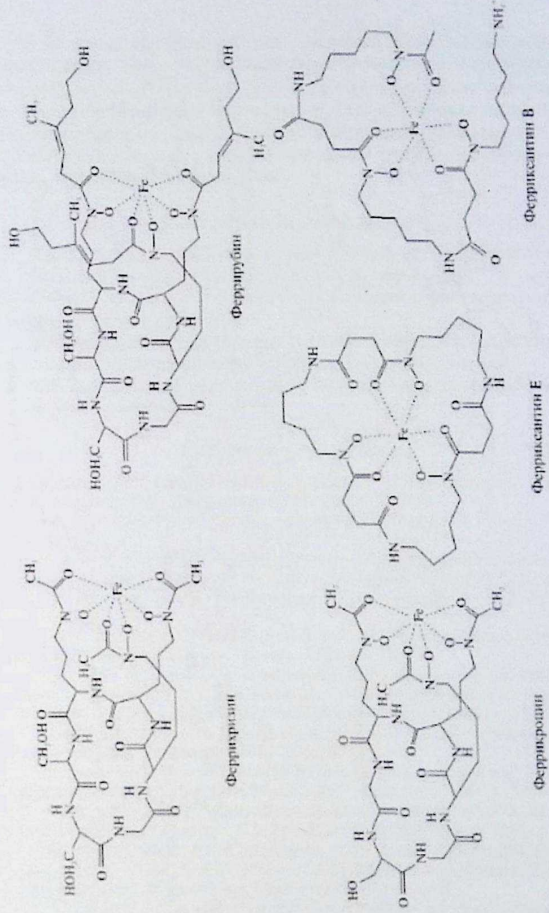


Рис. 1.17. Сидерофоры ризосферных бактерий

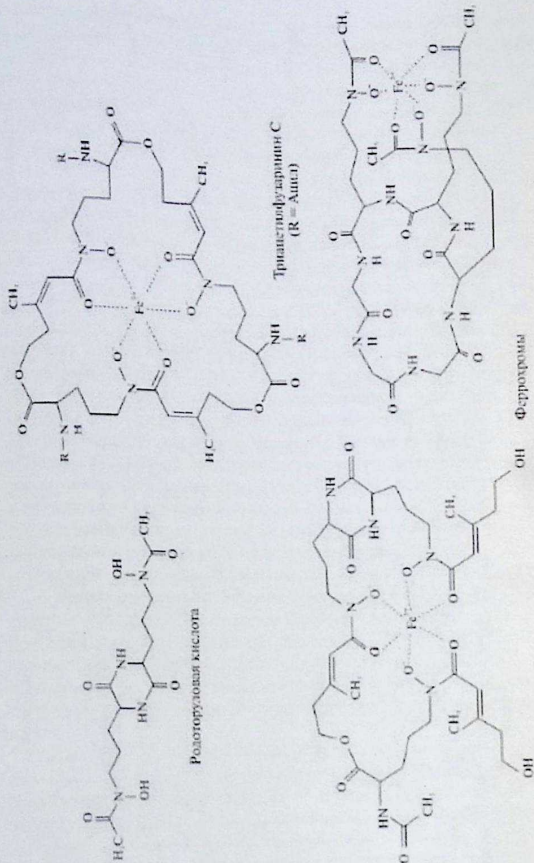


Рис. 1.18. Сидерофоры фитопатогенных грибов

3. *Индукция защитных свойств у растений.* Ризосферные микроорганизмы не только непосредственно препятствуют развитию потенциально патогенной микобиоты, но своими метаболитами индуцируют у растений защитные реакции, которые приводят к возникновению системной приобретенной устойчивости (SAR) (подробнее о ней будет рассказано ниже) и тем самым снижают восприимчивость к развитию фитопатогенов.

Контрольные вопросы и задания

1. Какова роль кутикулярного покрова в защите растений от болезней и способы преодоления барьера кутикулы паразитами?
2. Каковы строение клеточной стенки растений и роль отдельных ее компонентов в иммунитете?
3. Назовите химические барьеры растения и охарактеризуйте стратегию защитного действия вторичных метаболитов растений.
4. Как паразиты нейтрализуют действие токсичных вторичных метаболитов растений?

Цитированная литература

Андреев Л.И. Ржавчина пшеницы. Цитология и физиология [Текст] / Л.И. Андреев, Ю.М. Плотникова. — М.: Наука, 1989.

Гойман Э. Инфекционные болезни растений [Текст] / Э. Гойман. — М.: ИЛ, 1954.

Юдкина Н.Б. Эктофитная стадия развития бурой ржавчины на различающихся по устойчивости сортах яровой пшеницы [Текст] / Н.Б. Юдкина, Б.Г. Рейтер, Л.Ю. Юдкин // Сб. трудов СИБНИИСХОЗ. — 1979. — 27. — С. 22–27.

Bourab K., Meton R., Peart J., et al. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defenses // *Nature*. 2002. 418: 889–892.

Conn E.E., McFarlane I.J., Lindberg Möller B., Shimada M. Channeling of intermediates during the biosynthesis of cyanogenic glycosides. In "Regulation of Secondary Products and Plant Hormone Metabolism". 1979. Pergamon Pr. 63–71.

Joosten L., van Veen J.A. Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms // *Phytochem. Rev.* 2011. 10: 127–146.

McCann M.C., Roberts K. Architecture of primary stem wall. In "The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form". Acad. Press. 1991. L: 109–129.

Peters N.K., Verma P.S. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 1990. 3: 4–8.

Rissler J.F., Millar R.L. Contribution of as cyanogene-insensitive alternate respiratory system to increase in formamide hydro-lyase activity and to growth in *Stemphylium loti* in vitro // *Plant Physiol.* 1977. 60: 857–861.

Rosenthal G.A. The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine // *Quart. Rev. Biol.* 1977. 52: 155–178.

Serrano M., Torres M., L'Haridon F., Metraux J.-P. The cuticle an plant defense to pathogens // *Front. Plant Sci.* 2014. 5: 274.

Wink M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores // *Theoret. Appl. Genet.* 1988. 75: 225-233.

Zaki A.J., Zenmyer G.A., Peltus J., et al. Borbonol from *Persea* spp. — chemical properties and antifungal activity against *Phytophthora cinnamomi* // *Physiol. Plant Pathol.* 1980. 16: 205-212.

Глава 2

ЕСТЕСТВЕННЫЙ ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

Итак, факторы устойчивости растений к патогенам, описанные в предыдущей главе, не являются панацеей, так как многие паразиты научились справляться с ними. Но преодолевшие эти факторы организмы сталкиваются с новым барьером — факторами врожденного иммунитета, описанию которых посвящена настоящая глава.

В процессе роста и развития на поверхности и внутри растения происходит неизбежный контакт поверхностных структур паразитов с поверхностными структурами клеток растения-хозяина. Например, жгутики и клеточные стенки бактериальных клеток, проникших в свободное пространство паренхимной ткани или в сосуды ксилемы, контактируют с клеточными стенками растительных клеток. Материнские клетки гаусториев биотрофных грибов непосредственно контактируют с плазмалеммой клетки растения (экстрагаусториальной мембраной), которую они инвазируют. Кроме структурных элементов паразиты для внедрения и питания должны секретировать в растение разнообразные химические продукты — ферменты, фитогормоны и др., которые также контактируют с поверхностями растений. А вирусные белки, как ферментные, так и капсидные, синтезируются внутри зараженных клеток и контактируют с внутриклеточными структурами. В связи с этим у растений в ходе коэволюции с паразитами возникла и эволюционировала система рецепции секреторных и поверхностных молекул патогенов и инициации в ответ на их появление иммунного ответа — система врожденного иммунитета. Эта система очень древняя, она присуща не только растениям, но и беспозвоночным и позвоночным животным, следовательно, возникла у общего предшественника до расхождения его на современные группы растений и животных. По-видимому, она эволюционировала из древней системы регуляции смены стадий онтогенеза и морфогенеза в ответ на изменения в окружающей среде, ибо аналогичные системы рецепции регулируют не только иммунный ответ, но и морфогенез.

Таким образом:

- врожденный иммунитет защищает все виды позвоночных и беспозвоночных животных и растений;
- он представляет собой первую линию клеточной защиты, ибо распознает сенсорам;

- он контролируется небольшим числом генов (нет большого разнообразия рецепторов);
- сенсоры распознают не индивидуальный патоген, а группы патогенов (классы соединений, выделяемых патогенами).

Настоящая глава посвящена рассмотрению индукции, рецепции и конечным результатам, т.е. основным этапам формирования врожденного иммунитета растений.

2.1. ЭЛИСИТОРЫ

Термин «элиситоры» предложил выдающийся американский фитохимик и фитоиммунолог Н. Кин. Английское *elicit* означает извлекать, вызывать, выявлять. 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, пришлось подразделить элиситоры на *абиогенные* и *биогенные*, а последние — 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*. Согласно этим определениям метаболиты паразитов, индуцирующие реакции врожденного иммунитета, следует относить к биогенным экзогенным неспецифическим элиситорам. Однако патогенные организмы образуют и выделяют эти вещества отнюдь не для того, чтобы провоцировать иммунный ответ растений. Естественный отбор просто не позволил бы паразитам быть настолько «глупыми». Очевидно, с их помощью паразиты решают какие-то иные задачи, просто растения в ходе эволюции научились индукции защитных реакций в ответ на контакт с ними. Поэтому термин «элиситоры» уступил место более нейтральному термину PAMPs (pathogen-associated molecular patterns — молекулярные структуры, ассоциированные с патогенами) или, поскольку индуцировать защитные реакции могут и сапротрофные микроорганизмы, еще более нейтральному — MAMPs (молекулярные структуры, ассоциированные с микроорганизмами). Молекулы MAMPs имеют структуры или мотивы, отсутствующие у растений-хозяев и узнающиеся растением как чужие. А метаболиты самого растения, вызывающие протекание защитных реакций (эндогенные элиси-

торы) были названы DAMPs (damage-association molecular patterns). Такое название они получили благодаря источникам их возникновения: как было указано в предыдущей главе, патогенные микроорганизмы секретируют в растение ферменты деполимеразы, разрушающие полимеры, из которых построены клеточные покровы. Образующиеся в результате повреждения кутикулы или клеточной стенки олигомерные обрывки молекул и служат эндогенными индукторами защитных реакций или DAMPs. Все эти структуры, разнообразные по происхождению и химической природе (табл. 2.1), приводят, в конце концов, к одинаковому результату — иммунному ответу.

Таблица 2.1

**Разнообразие неспецифических элиситоров (PAMPs, MAMPs, DAMPs)
[Nurenberger, Kemmerling, 2009]**

Соединения	Продуценты
Липополисахариды	Грам (-) бактерии
Пептидогликаны	Грам (-) и грам (+) бактерии
Флагеллин	Грам (-) бактерии
Фактор элонгации (EF-Tu)	Грам (-) бактерии
Харпин (HrpZ)	Грам (-) бактерии
Белки холодового шока	Грам (-) и грам (+) бактерии
Некроиндуцирующие белки (NIP)	Бактерии, грибы, оомицеты
Трансглутаминазы	Оомицеты
Лектин, связывающий целлюлозу (CBEL)	Оомицеты
Белки — переносчики липидов (элиситины)	Оомицеты
Ксиланазы	Грибы
И invertазы	Грибы (дрожжи)
β-Глюканы	Бурые водоросли, грибы, оомицеты
Сульфатированные фуканы	Бурые водоросли
Хитин	Грибы
Эргостерин	Грибы
Цереброзиды	Грибы
Олигосахариды	Растения (пектин)
Целлодекстрины	Растения (целлюлоза)
Мономеры кутина	Растения (кутикула)
Сидерофоры	(Бактерии) <i>Pseudomonas fluorescens</i>

Рассмотрим некоторые из этих структур подробнее.

2.1.1. Липиды

Наиболее хорошо исследованы липидсодержащие элиситоры *Phytophthora infestans* — две полиненасыщенные жирные кислоты: 20:4 — 5,8,11,14-эйкозотетраеновая (арахидоновая — АК) кислота и 20:5 — 5,8,11,14,17-эйкозопентаеновая (ЭПК) кислота (рис. 2.1) [Озерецковская и др., 1987]. Эти полиеновые жирные кислоты индуцировали защитные реакции у картофеля. Исключительно важным свойством АК и ЭПК была их способность индуцировать в картофеле системную продолжительную болезнестойчивость [Озерецковская и др., 1986]. АК и ЭПК отсутствуют у растений и настоящих грибов, но синтезируются клетками оомицетов. Они найдены как в составе всех кислых липидов *P. infestans*, так и в немемляемых липидах (церамидаминоэтилфосфонате и инозитолфосфосерамиде). Для проявления элиситорной активности необходимо присутствие в липиде свободной карбоксильной группы. Замещение этой группы на спиртовую заметно понижало индуцирующую активность. Оптимальной для элиситорной активности оказалась длина цепи в 20 атомов углерода.

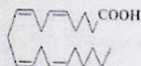


Рис. 2.1. Арахидоновая кислота

АК и ЭПК участвуют во взаимодействии паразита и хозяина [Richer, Bostock, 1982]. Авторы инфицировали картофель суспензией спор возбудителя фитофтороза, содержащего радиоактивную АК. Последняя быстро высвобождалась из спор патогена и накапливалась в нескольких рядах клеток, прилегающих к месту инфицированных, но не далее, чем 1 см от места заражения.

У животных АК и ЭПК окисляются до оксипинов-эйкозаноидов, которые выполняют критические сигнальные функции в ответах клеток на стресс. Под действием циклооксигеназы образуются простагландины и тромбоксаны, которые ответственны за возникновение боли, воспаления, сыпей, а другой фермент — липооксигеназа — формирует лейкотриены, вызывающие аллергию и астму.

Индукцией защитных реакций обладают и DAMPs липидной природы — олигомерные обрывки кутина — ω -оксигирные кислоты, образующиеся в результате деградации кутина грибными кутиназами.

2.1.2. Полисахариды

Аминосакара. В состав клеточных стенок настоящих грибов входят линейный полимер ацетилацетилглюкозамина — хитин (рис. 2.2) и его деацетилированное производное — хитозан. В клеточных стенках

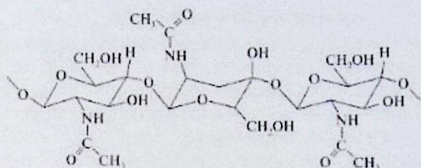


Рис. 2.2. Структура хитина

грибов хитин связан ковалентными и ионными связями с другими полисахаридами, пигментами и белками, что и придает ему особую устойчивость к литическим ферментам.

В высших растениях аminosахара отсутствуют, однако ферменты, способные расщеплять их цепи, широко представлены, причем их уровень резко повышается под действием биотических и абиотических стрессов.

Хитин и хитозан обладают элиситорными свойствами и вызывают протекание защитных реакций у разных растений, причем молекулярные механизмы действия ацетилированных и деацетилированных хитиновых производных различны. В первом случае, вероятно, имеет место высокоспецифичное связывание с мембранными рецепторами лектиновой природы, тогда как фрагменты хитозана активны за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных молекул элиситора с отрицательно заряженными компонентами мембран или молекулами ДНК.

Глюканы. β -Глюканы — главный компонент клеточных стенок фитогворовых оомицетов (составляют до 80% сухой массы стенок), но присутствуют и в стенках настоящих грибов. У оомицетов они включают β -1 \rightarrow 4-глюкан (целлюлозу) и нерастворимые β -1 \rightarrow 3-, β -1 \rightarrow 6-глюканы. В определенных стадиях жизненного цикла образуются и растворимые запасные β -1 \rightarrow 3-глюканы (ламинарин).

Элиситор, выделенный из клеточных стенок и культуральной жидкости *Phytophthora glycinea*, представляет собой гептаглюкозид, пять глюкозных остатков которого связаны в линейную цепь β -1 \rightarrow 6-связями, тогда как два боковых остатка присоединены β -1 \rightarrow 3-связями (рис. 2.3). При неполном кислотном гидролизе клеточных стенок гриба были получены 300 аналогов элиситора, из которых только один оказался активным. Он отличался от неактивных лишь положением, в котором два боковых остатка глюкозы присоединились к основе, состоящей из пяти остатков. Гептаглюкозид индуцировал устойчивость только у растений из семейства бобовых.

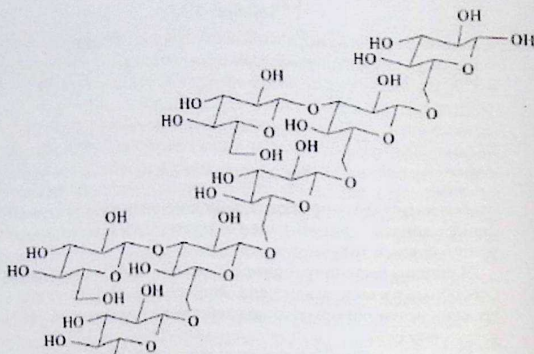


Рис. 2.3. β -1,3 — β -1,6-глюкановый элиситор *Phytophthora sojae*

β -1 \rightarrow 3-глюканы *Phytophthora infestans* также являются иммуномодуляторами: среди них есть элиситоры, индуцирующие устойчивость, и супрессоры, снижающие устойчивость у сортов картофеля, устойчивых к фитофторозу. Последние содержат от 17 до 23 единиц глюкозы с β -1 \rightarrow 3- и β -1 \rightarrow 6-связями. Кроме того, обнаружено взаимное влияние полисахаридных и липидных элиситоров. Глюканы, будучи более слабыми элиситорами, чем эйкозаноиды, усиливают элиситорную активность арахидоновой кислоты в 10–100 раз по сравнению с ее применением в чистом виде.

В культуральных фильтратах и экстрактах различных видов *Colletotrichum* также присутствовали полисахаридные элиситоры — глюканы со связями β -1 \rightarrow 3 и β -1 \rightarrow 4. По всей видимости, по своей структуре эти глюканы отличались от глюканов *P. megasperma*.

Ксилоглюканы. Это основной компонент гемицеллюлозы, входящей в состав клеточных стенок растений. Под действием грибных или бактериальных глюканаз образуются ксилоглюкановые олигомеры (DAMPs), содержащие ксилозу, глюкозу и галактозу. Причем для проявления элиситорной активности необходимо наличие цепочки, содержащей не менее 12 моносахаридных молекул и терминальной молекулы фукозы.

Олигогалактурониды. Это продукты расщепления молекул пектина пектиназами (пектат-лиазами, полигалактуроназами) микроорганизмов. Для проявления элиситорных свойств этих DAMPs необходима степень полимеризации их молекул 9–15.

2.1.3. Белки и гликопротеиды

Элиситины — семейство гидрофильных белков с молекулярной массой около 10 кДа, которые образуются всеми исследованными до сих пор видами родов *Phytophthora* и *Pythium*. Все элиситины отличаются высокой степенью гомологии. Наиболее отчетливо элиситины ведут себя как элиситоры при обработке табака, у которого они вызывают четко выраженный иммунный ответ. Изолаты *Phytophthora parasitica*, не поражающие табак, продуцируют кислый элиситин *na-razumitsheini*. Патогенные для табака изолаты не продуцируют этот пептид, что может свидетельствовать о негативной связи продуцирования паразитицина со специфической патогенностью возбудителя фитофтороза к табаку. *P. cryptogea* и *P. capsici* продуцируют два близкородственных элиситина — криптогенин и капсицин. Обработка этими пептидами защищает табак от патогенных штаммов *P. nicotianae*, не продуцирующих элиситины. Криптогенин вызывает образование очагов некроза на табаке в концентрации 1 мкг на растение, тогда как капсицин в 50 раз менее активен. Оба пептида имеют идентичную последовательность аминокислот во внутренней области и различаются в карбокси- и аминокончаяниях. Элиситины возбудителя фитофтороза картофеля *P. infestans* синтезируются под контролем *INF*-генов, которые экспрессируются в зараженных растениях и в мицелии (но не в спорах), растущем на искусственной среде. Функциональная роль элиситинов для их продуцентов определяется двумя их свойствами: 1) прежде чем достигнуть мембраны зараженного растения они связываются с регуляторным белком клеточной стенки; 2) элиситины обладают способностью соединяться со стеринами и переносить последние между искусственными мембранами, причем биологической активностью обладают только молекулы, нагруженные стеринном. Поскольку оомицеты из родов *Pythium* и *Phytophthora* не способны синтезировать стерины (ауксотрофы по ферменту скваленсинтазе), которые необходимы для формирования спорония (бесполого и полового) и для патогенности, элиситины играют роль транспортеров стеринов из зараженного растения в мицелий.

Элиситины кодируются двумя группами генов: генами элиситинов (*eli*) и элиситиноподобных белков (*ell*). Белки *ELI* высококонсервативны, содержат 98 аминокислотных остатков с шестью цистеинами, участвующими в формировании дисульфидных связей. Элиситиновый домен *ELL* более вариабелен по длине и последовательности нуклеотидов. Защитный ответ растений индуцируют белки *ELI*, например наиболее активный элиситин

Phytophthora infestas INF-1 определяет нехозяйскую устойчивость к *P. infestas* дикого табака *Nicotiana bethamiana*.

Ортологичные белки NPP1 из *Phytophthora parasitica* и PsojNIP из *P. sojae* индуцируют некрозы у всех тестируемых двудольных растений, включая хозяев этих грибов. Ген, контролирующий синтез PsojNIP-белка, экспрессируется в поздней стадии инфекции сои, продуцируя токсин, который обеспечивает колонизацию ткани хозяина во время некротрофной фазы роста. Структурные аналоги этих белков найдены у грибов (*Fusarium oxysporum*) и бактерий (*Bacillus halodurans*, *Streptomyces coelicolor*, *Vibrio* spp.), но не у высших растений и животных. Элиситорной активностью по отношению к двудольным растениям обладает также связанный с клеточной стенкой фитофторовых оомицетов фермент трансглутаминаза молекулярной массой 42 кДа, точнее — его фрагмент молекулярной массой 13 кДа (Per-13). Другой фермент грибного происхождения — ксиланаза (22 кДа) (EIX) индуцирует в растениях табака и томата биосинтез этилена, потерю (leakage) электролитов и другие симптомы иммунного ответа. Элиситорная активность культуральных фильтратов различных штаммов *Fusarium solani*, по-видимому, также зависит от присутствия белкового компонента, поскольку она частично терялась под действием протеолитического фермента проназы и полностью блокировалась при добавлении в среду роста ингибитора синтеза белка циклогексимида. Такую же природу имеет высокомолекулярный индуцирующий фактор из культурального фильтрата *Botrytis cinerea*, стимулирующий накопление фитоалексина (ФА) фазеолина в тканях фасоли. Вместе с тем на индуцирующую активность этих препаратов не оказывали влияния обработки, которые должны были бы денатурировать большую часть белка (нагревание, экстремальные значения pH, органические растворители, детергенты и др.). Это ставит под сомнение важность нативной конформации белка для экспрессии элиситорной активности.

Элиситорную активность имеют и *флагеллины* — белковые субъединицы, из которых построены бактериальные жгутики. Флагеллины, изолированные из различных фитопатогенных бактерий, имеют варьирующие центральные домены и консервативные N- и C-терминальные области, которые и обладают элиситорной активностью.

Многие элиситоры фитопатогенов являются *гликопротеидами* (ГП). Так, из клеточных стенок *Phytophthora megasperma* выделен ГП, обладающий способностью индуцировать защитный ответ в семенах сои. Однако концентрация ГП, требующаяся для индуцирования, была значительно более высокой, чем у описанных выше

β -1 \rightarrow 3-глюкана и глюкоманнана. Активность ГП полностью подавлялась под действием ингибитора углеводов периодата, тогда как обработка проназой не затрагивала индуцирующую активность. Поэтому возможно, что для проявления элиситорной способности необходима углеводная, а не белковая часть молекулы.

Элиситорная активность культурального фильтрата *Phytophthora infestans* связана с фракцией, имеющей молекулярную массу 10 кДа и, вероятно, представляющей собой ГП, не обладающий расщепляющим действием. Под влиянием β -1 \rightarrow 3-глюканазы индуцирующая активность элиситора не только не подавлялась, но даже усиливалась, что, возможно, объясняется удалением маскирующих групп, ковалентно связанных с элиситором посредством β -1 \rightarrow 3-связей.

2.2. РЕЦЕПТОРЫ

Рецепторы MAMPs и PAMPs улавливают молекулы паразитов, контактирующие с клеточными поверхностями растений-хозяев, поэтому они должны быть расположены на клеточной мембране. По структуре и функциям рецепторы неспецифических элиситоров (MAMPs) разделяют на несколько групп.

2.2.1. Toll-подобные рецепторы

В 90-х годах XX в. у дрозофилы впервые были исследованы механизмы рецепции метаболитов паразита, приводящие к иммунному ответу. Трансмембранные белки, улавливающие сигналы, были названы Toll-рецепторами. Toll — трансмембранный белок, имеющий:

- выдвинутый наружу рецепторный сайт. Он представляет собой домен из повторяющихся последовательностей аминокислот, обогащенных лейцином (LRR — leucine rich repeat). Такая структура характерна для многих рецепторных белков и ответственна за взаимодействия белок — белок, так как способна осуществлять взаимодействия с определенными белками;
- погруженный в клетку сайт, структурно схожий с цитоплазматическим доменом рецептора сигнального белка интерлейкина-1 (ИЛ-1) позвоночных животных. Он связывается с внутриклеточной протеинкиназой (ПК) и способен к передаче сигнала. Таким образом, LRR воспринимает сигнал от внешнего источника, а ПК передает его через каскад протеинкиназ в геном.

Мутации по toll-генам делали мух не только чувствительными к грибным и бактериальным инфекциям, но и нарушали морфогенез личинок вследствие репрессии белка Dorsal — фактора экспрессии

зиготических генов, необходимых для дорсо-вентральной ориентации клеток мезодермы. Таким образом, toll-рецепторы ответственны не только за иммунитет, но и за морфогенез, причем последние функции были, по-видимому, первичными.

Вскоре после этого у мышей обнаружили рецептор, структура которого была аналогичной toll-рецептору насекомых и который при возбуждении, подобно рецептору ИЛ-1, активизировал защитные реакции. Рецепторы позвоночных животных получили название TLR (toll-like receptors — рецепторы, подобные toll). К настоящему времени описано более десяти таких рецепторов, узнающих разные метаболиты микроорганизмов. Поскольку весьма ограниченное число рецепторов связывает огромное число PAMPs, один и тот же рецептор может узнавать несколько разных соединений. Например, TLR4 рецептирует бактериальный липополисахарид (ЛПС), связывается с белками теплового шока, олигосахаронидами, фосфолипидманнанами, является фактором защиты от аспергиллов, в частности легочных аспергиллезов, и от криптококков, а также связывает хозяйские DAMPs Hsp70 и галактуронан. TLR2 рецептирует 15 микробных и хозяйских агентов, узнает грибы, в частности препарат клеточных стенок дрожжей зимозан, является фактором защиты от *Candida albicans*.

У растений рецепторы неспецифических элиситоров (PAMPs, MAMPs и DAMPs), как и TLR-рецепторы животных, имеют трансмембранный LRR-домен, однако внутриклеточный участок имеет протеинкиназную активность.

2.2.2. Рецепторные протеинкиназы (RLK)

У *Arabidopsis* 340 генов кодируют мембранные протеинкиназы, обладающие рецепторными свойствами (RLK — receptor like kinases). Описано несколько семейств мембранных протеинкиназ.

Киназы серин-треонинового типа:

- RLK1 *Arabidopsis*. Индуцируется разными патогенами; вызывает окислительный стресс, накопление салициловой кислоты;
- SFR1 капусты. Индуцируется ранением, бактериями;
- StRPK картофеля. Индуцируется пектиназами бактерий, олигосахаронидами;
- WAK *Arabidopsis*. Индуцируется патогенами.

Гистидиновые киназы:

- ETR1 — рецептор этилена;
- CRE — рецептор цитокининов;
- Ca²⁺-зависимые протеинкиназы (CDPK) — большое семейство белков (у *Arabidopsis* 34 члена). Активируются бактериальными, оомицетными и грибными элиситорами.

Приведем несколько примеров рецепторных киназ растений.

1. Белок *FLS2 Arabidopsis thaliana*. Мембранный рецептор FLS2 (Flagellin Sensitive-2) содержит трансмембранную LRR-область и цитозольный домен с протеинкиназной активностью. Этот белок рецептирует флагеллины — белковые субъединицы, из которых построены бактериальные жгутики. Флагеллины, изолированные из различных фитопатогенных бактерий, имеют варьирующие центральные домены и консервативные N- и C-терминальные области, которые и обладают элиситорной активностью.

В связи с такой структурой построена модель взаимодействия элиситора с мембранным рецептором клетки растения — пептидом fls2 (рис. 2.4), включающая два этапа: первый — соединение N-конца (кислого пептида из 22 аминокислот — flg22) с воспринимающим участком рецептора и второй — соединение C-конца с передающим участком. Аналоги FLS2 найдены и у других видов. Различия между ними — в LRR-домене. Рецептор томата узнает короткий участок молекулы флагеллина, названный flg15, и консервативную область вблизи C-конца из 28 аминокислот (flg1128), а риса — весь белок.

После узнавания образуется комплекс FLS2 с расположенной рядом регуляторной киназой BAK1 (регулятором синтеза brassinостероидных гормонов) и активируются пути сигнальной трансдукции.

2. *Рецепторная киназа EFR*. Аналогично предыдущей киназа EFR (elongate factor reception) после узнавания PAMP также связывается с киназой BAK1, только рецептирует она не флагеллин, а бактериальный фактор элонгации и-РНК Tu (вернее, его 18-аминокислотный участок el18).

3. *Рецептор Xa21 риса*. Ген *Xa21* изолирован из дикого риса *Oryza longistaminata*. Его продукт узнает сульфатированный пептид AxY22³.

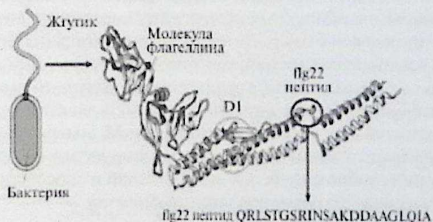


Рис. 2.4. Структура белка флагеллина, из которого построены бактериальные жгутики. Обведен участок белка flg22, который узнает рецептор *Arabidopsis thaliana* [Albersheim, Darvill, 2010]

который секретируется многими видами бактерий ксантомонад и входит в состав липополисахаридной (LPS) капсулы, окружающей бактериальную клетку. Следовательно, как у животных Toll-рецептор (дрозофилы) и TLR1-рецептор (мыши), так и у риса Xa21-рецептор узнают бактериальные LPS.

Изоляты, не секретирующие пептид или не сульфатирующие его, слабопатогенны. Сульфатацию осуществляет фермент сульфотрансфераза, кодируемая геном *raxST*. Штаммы, лишенные его, не узнаются Xa21 и, в опытах в теплице, — вирулентны.

У ксантомонад изолировано 8 *rax*-генов, экспрессия которых регулируется густотой бактериальной суспензии и индуцируется при низкой густоте. Таким образом, AxY22 — фактор, необходимый для формирования бактериальных пленок (quorum sensing, QS) ксантомонад. Он контролирует подвижность, формирование биопленки и вирулентность. Белок риса Xa21 рецептирует RaxH.

Формирование бактериальных пленок необходимо для проявления патогенных свойств многими бактериями — паразитами животных и растений. Оно управляется группой диффундирующих в среду сигнальных молекул — *кворумонов*. У большинства грамотрицательных бактерий — это лактоны ацилглюкозаминидина (AHLs), у *Ralstonia solani* — метиловый эфир 3-оксипальметиновой кислоты.

Растения имеют механизмы, ингибирующие QS, вследствие деградации AHLs.

4. *Рецепторы хитина*. Рецепторы хитина у растений — мембранные протеинкиназы AtCERK1 резушки (*Arabidopsis*) и CERK1 риса. Они связывают хитин через лизинсодержащий мотив (LysM) эктодомена AtCERK1-ECD резушки и CERK1-ECD риса. Октамер хитина индуцирует димеризацию рецептора, а более короткие олигомеры ингибируют ее. Следовательно, предварительно грибной хитин должен быть расщеплен хитиназами растения на фрагменты из восьми молекул глюкозамина — октамеры. Димеризация рецептора — критическая фаза для индукции иммунного ответа, так как фосфорилирование киназного домена молекулы рецептора происходит только в состоянии димера. LysM-содержащие растительные рецепторы узнают также содержащие хитин факторы эндомикоризных грибов и клубеньковых бактерий и способствуют внедрению, размещению и развитию эндосимбионтов.

2.2.3. Рецепторы лектинового типа

Глюкановые рецепторы растений принадлежат к группе химических соединений, называемых *лектинами*. Это трансмембранные белки или гликопротеиды, специфически связывающиеся с углевод-

ными (олигосахаридными) компонентами макромолекул и клеточных структур. Они принимают участие в разнообразных процессах, в частности, у растений — в узнавании и иммобилизации патогенов и их элиситоров, а флюэзные лектины участвуют в транспорте виroidных патогенов и других РНК. Интересно, что лектиновые домены обнаружены в составе характерных для TLR рецепторных киназ (LecRK — lectin-like receptor kinase). Например, гаптен картофельного лектина, отщепляющий N,N'-диацетил-D-хитобиозу (фрагмент молекулы хитина) ингибирует защитный ответ на заражение у сортов картофеля, устойчивых к фитофторозу. По-видимому, лектин, связывающий хитобиозу, имеет структурные гомологии с глюкановыми рецепторами, и хитобиоза может конкурировать с глюкановыми элиситорами за сайты рецепции. Об этом свидетельствует также структурное сходство с картофельным лектином рецептора β -глюканов позвоночных животных — белка дектина-1, локализованного на мембранах макрофагов, нейтрофилов и дендритных клеток.

У бобовых растений β -глюканы рецептируются мембранными белками молекулярной массой 75–150 кДа. Они имеют два активных домена: первый связывает β -глюкан, а второй обладает глюканазной активностью, т.е. отщепляет от огромных молекул олигомеры, имеющие элиситорную активность (гептамеры). Этот рецептор не имеет киназного домена, обеспечивающего трансдукцию сигнала, но входит в состав мембранного белкового комплекса размером 240 кДа, в котором, по-видимому, находятся и белки, обеспечивающие трансдукцию.

Выше было отмечено, что у разных рас *Phytophthora infestans* нарушены олигомеры β -глюканов, обладающие как элиситорной (индуцируют устойчивость), так и супрессорной (ингибируют устойчивость) активностью. Супрессия может быть следствием сходства олигосахаридных мотивов, которые конкурируют за сайты связывания у рецепторов [Robinson, Bostock, 2015], т.е. определенные глюканы могут связываться рецептором, причем такое связывание, во-первых, уменьшает число рецепторных сайтов, доступных для связывания элиситорными олигомерами, и, во-вторых, само по себе не сопровождается активизацией генов иммунного ответа.

2.3. ТРАНСДУКЦИЯ (ПЕРЕДАЧА) СИГНАЛА

2.3.1. Сигнальные системы растительной клетки

Первый этап возбуждения рецептора после взаимодействия с MAMPs (microbe-associated molecular patterns) — фосфорилирование киназного домена. У животных после связывания внеклеточ-

ного домена LRR с MAMPs сигнал через адаптерный белок передается на не-аргининовую аспараткиназу (non-RD), IRAK1 (interleikin receptor-associated kinase-1) у мыши и RIP1 (receptor associated kinase-1) у дрозофилы. А у большинства растительных рецепторов белковая молекула непосредственно включает интруклеточный non-RD киназный домен (рис. 2.5). После этого происходит серия фосфорилирований различных протеинкиназ, в результате чего сигнал многократно усиливается. Центральная роль в этих процессах принадлежит митогенактивирующим протеинкиназам серин-треонинового типа (MAPK). Свое название они получили благодаря участию в процессах митоза. MAP-киназный путь трансдукции сигнала представляет собой каскад, состоящий из трех сигнальных мо-

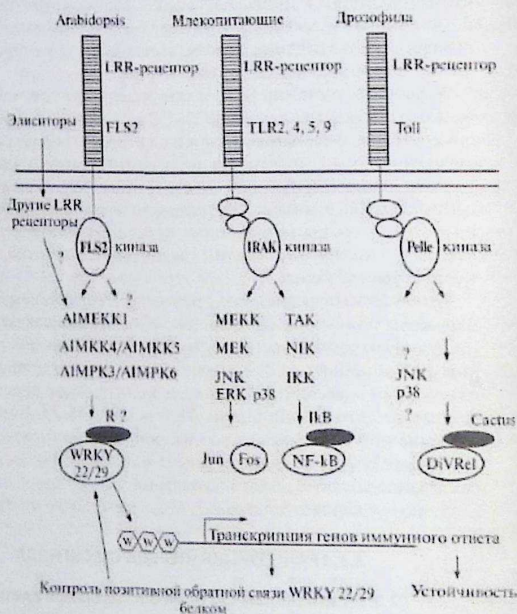


Рис. 2.5. Сходство и различия в рецепции и путях трансдукции сигнала при врожденном иммунитете у растений и животных [Asai et al., 2002]

дулей. Фосфорилирование последней в этом каскаде — МАРК — обеспечивает МАРК-киназа (МАРКК), которая, в свою очередь, фосфорилируется МАРКК-киназой (МАРККК). Фосфорилированная МАРК активирует фактор регуляции транскрипции (NF- κ B у животных, WRKY у растений), который взаимодействует с промоторными участками генов, разрешающими или запрещающими их экспрессию. Необходимым условием активизации факторов регуляции транскрипции является переход из олигомерных форм в мономерные, который зависит от процессов фосфорилирования/дефосфорилирования.

В клетках содержится несколько протеникиназных модулей, выполняющих разные функции, в том числе функцию иммунного ответа. Например, специфическая МАР-киназа SIPK (salicyl acid induced kinase) — индуцирует синтез важнейшей сигнальной молекулы, салициловой кислоты (СК). Ассоциация киназных модулей друг с другом с помощью поддерживающих (scaffold) белков обеспечивает очень быстрый и эффективный ответ клетки на получаемые сигналы. Например, соединение рецептора резуски FLS2 с белком бактериальных жгутиков флагеллином (flg22) вызывает в течение 30 мин транскрипционные изменения в активности 1100 генов. Это вызвано каскадом протеникиназ и активизацией белка анкирина — транскрипционного фактора WRKY, играющего роль, сходную с таковой NF- κ B млекопитающих. А потеря киназной активности вследствие мутации в кодирующем FLS2-гене делает растение нечувствительным к флагеллину.

Однако передача киназами остатка фосфорной кислоты от одного белка другому, подобно мячу на футбольном поле, и активизация, в конечном счете, фактора регуляции транскрипции — не единственный путь изменения активности генов в зараженных клетках. Помимо этого пути есть и более быстрые отклики на заражение. Различные метаболиты патогенных организмов узнаются разными же рецепторами, т.е. узнавание специфично. Однако отклик клетки на заражение такими различными микроорганизмами, как грибы, бактерии и вирусы, и даже на поедание нематодами и насекомыми удивительно единообразно. Дело в том, что возбуждение рецепторной молекулы (в частности фосфорилирование) передается на одни и те же универсальные регуляторные белки, расположенные в клеточной мембране и в цитоплазме.

Например, первой визуальной реакцией на обработку корней сои глюконовым элиситором было накопление Ca^{2+} в цитозоле. Приток его через кальциевые каналы в мембране приводит к деполимеризации мембраны и быстрому изменению концентрации свободных

ионов на поверхности растения и в апопласте (рис. 2.6), вследствие чего изменяются в неблагоприятном направлении условия для атаки клеток паразитом [Mithofer et al., 2005]. Избыток кальция связывается кальций-зависимыми протеинкиназами (CDPK) — критическими сенсорами иммунного ответа. Активизация CDPK происходит под воздействием различных MAMPs — бактериальных, грибных, оомицетных. Другим важным белком, связывающим Ca^{2+} , является *кальмодулин*, который участвует во многих регуляторных внутриклеточных процессах. Так, Ca^{2+} -кальмодулин может активировать протеинкиназы и фосфопротеинфосфатазы, а также фосфолипазу C, которая гидролизует фосфорилированные фосфолипиды с образованием важных регуляторных молекул. Например, ненасыщенные жирные кислоты с помощью фосфолипаз высвобождаются из фосфолипидов и далее окисляются липооксигеназами. В конечном счете образуются молекулы универсального активного сигнального соединения — *жасмоновой кислоты* (ЖАК) (рис. 2.7), которая индуцирует экспрессию генов *PDF1* и *PDF2* и проявление иммунного ответа, в частности синтез антимикробных белков дифензинов. При ранении, поедании насекомыми или заражении некротрофными паразитами из крупного белка-предшественника образуется мелкий пептид *системин*, состоящий всего из 18 аминокислот (рис. 2.8). Он способен транслоцироваться по флоэме, вызывая системный ответ.

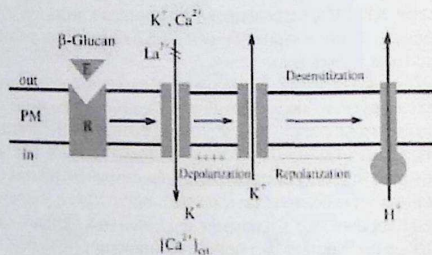


Рис. 2.6. Модель трансмембранного тока ионов в мембранах, деполаризованных в результате рецепции бета-глюкана [Mithofer et al., 2005]

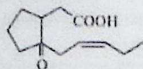


Рис. 2.7. Жасмоновая кислота

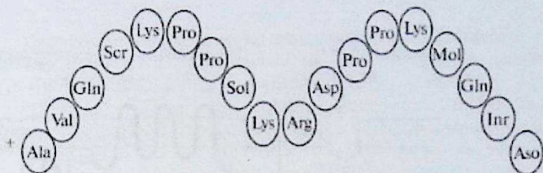


Рис. 2.8. Первичная структура пептида системина. В кружочках — обозначения аминокислот

Основное действие системина заключается в гидролизе фосфолипидов, в результате которого образуется пул линоленовой кислоты — предшественника ЖАК. Как регулятор иммунитета к насекомым ЖАК, во-первых, индуцирует синтез белка — ингибитора сериновых протеиназ вредителя, препятствуя поглощению им белковой пищи, и, во-вторых, активизирует синтез алкалоида никотина, который транслоцируется по всему растению, включая корни.

Ca^{2+} также участвует в процессах генерации активных форм кислорода (АФК) — супероксид-аниона (O_2^-), гидроксильного радикала (OH^\cdot) и пероксида водорода (H_2O_2). Эти соединения, с большой скоростью появляющиеся в клетках, подверженных различным стрессорным воздействиям (окислительный взрыв), оказывают сильное противомикробное действие. Однако они участвуют также и в сигнальных системах, влияющих на экспрессию генов защитного ответа. При окислении молекулярным кислородом НАДФ-Н, локализованного в цитоплазматической мембране (рис 2.9), образуется супероксид-анион, который под действием фермента супероксиддисмутазы (СОД) превращается в пероксид водорода. А последний вызывает активацию факторов регуляции транскрипции и, следовательно, экспрессию генов иммунного ответа. В частности, H_2O_2 индуцирует экспрессию генов, контролирующих синтез системина, олигосахаридов и метил-жасмоната [Юрочко-Cardenas et al., 2001]. У человека синтез мембранного белка нейтрофилов НАДФ-Н оксидазы контролирует ген *gp92 phox*. У картофеля аналогичную функцию выполняют гены *StbohA* и *StbohB*. Их активность регулируется Ca^{2+} -зависимыми протеинкиназами СРК и СДПК (рис. 2.9). Следовательно, и этот путь трансдукции сигнала завязан на концентрации ионов кальция в цитозоле.

Очень важную роль играет и активизация фенольного метаболизма в зараженных клетках. Он начинается с действия фермента фенилаланинаммонийлиазы, который называют стрессовым энзимом, так как его активность усиливается при разных стрессорных воздействиях.

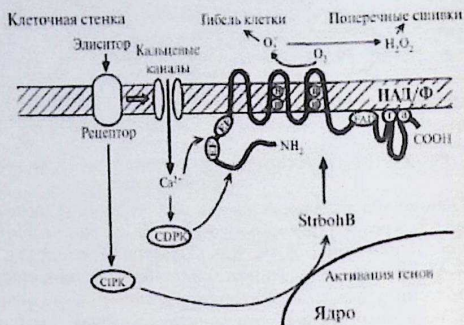


Рис. 2.9. Структура мембранной НАДФ-оксидазы и регуляция ее активности [Yoshioka et al., 2001]. CDPK — Ca-зависимая протеинкиназа; PKC — независимая от Ca^{2+} протеинкиназа. Экспрессия гена *StrobhB* регулируется неспецифическим элиситором *Phytophthora*. Продукт *StrobhB* — белок с шестью трансмембранными доменами и двумя гемами — FAD и НАДФ (r — рибоза, a — аденин)

Под действием этого фермента происходит дезаминирование ароматических аминокислот и превращение фенольных продуктов вплоть до образования важнейшего сигнального соединения *салициловой кислоты* (СК) (рис. 2.10) и антигрибных *фенилпропаноидов*. СК, являясь хелатором железа, ингибирует ферменты, содержащие гем, в том числе каталазу, которая разлагает пероксид водорода, вследствие чего концентрация пероксида в клетке повышается. Кроме того, СК может непосредственно связываться с каталазой.

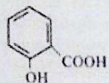


Рис. 2.10. Салициловая кислота

2.3.2. Системы регуляции сигнального траффика

Выше было сказано, что регуляция врожденного иммунитета и морфогенеза осуществляется через структурно подобные рецепторы и общие пути сигнальной трансдукции, причем системы морфогенеза и иммунитета интерферируют друг с другом, так как они используют сходные наборы рецепторов.

Важнейшими регуляторами внутриклеточных процессов, связанных с ростом и иммунитетом, являются низкомолекулярные (20–24 нуклеотидов) РНК — small (s-RNA) [Seo et al., 2013].

sРНК представляют собой некодирующие молекулы РНК, вызывающие подавление экспрессии генов вследствие транскрипционного (TGS) или посттрансляционного (PTGS) молчания. Молчание РНК — эволюционно консервативный, генетически специфичный механизм, который регулирует экспрессию генов, состояние хроматина и защиту от инвазии «эгоистических» нуклеиновых кислот, таких как транспозоны, псевдогены, вирусы. Описано два семейства sРНК: micro (miРНК) и short interfering (siРНК). Индукция ими молчания генов протекает через несколько этапов:

- генерация двухцепочечной структуры (РНК);
 - превращение их в две одноцепочечные структуры (sРНК);
 - соединение со специфической мишенью и индукция молчания вследствие инкорпорирования РНК в элиситором.
- sРНК работают в системе со специфическими белками:
- RDR-белки. Объединяют одноцепочечные РНК (ssРНК) в двухцепочечные (dsРНК), которые поступают на DCL. У *Arabidopsis* описано шесть RDR;
 - Dicer-like-белок (DCL) из семейства РНКазы III. Превращает dsРНК в дуплекс sРНК. У *Arabidopsis* описано четыре DCL. Мутанты *del1* сильно поражаются штаммами бактерии *Pseudomonas tomato*; DCL1 — позитивный регулятор врожденного иммунного ответа РТИ;
 - AGO-белки. Молекулы коадаптерного комплекса, который вызывает молчание генов, направляемое короткими РНК. sРНК, загрузившись в AGO-белки, приобретают способность специфично регулировать экспрессию генов. У *Arabidopsis* описано десять AGO, каждый из которых связывается с определенной sРНК.

Роль miРНК в иммунном ответе можно продемонстрировать на примере miR393 *Arabidopsis*. Рецептор FLS2 *Arabidopsis* узнает белок жгутиков флагеллин, после чего образуется комплекс FLS2 с киназой ВАК1, в норме индуктором синтеза фитогормонов брассиностероидов. Одновременно индуцируется аккумуляция miРНК393, которая специфически связывается с белками AFB, участвующими в системе регуляции синтеза ауксина. Эта система включает следующие компоненты: ARF — фактор регуляции трансляции генов синтеза ауксина; Auh/IAA — репрессор ARF; AFB — деградирует репрессор.

Таким образом, miR393, связывая AFB, высвобождает репрессор Auh/IAA и поворачивает метаболизм и потоки энергии с ростовых процессов на иммунитет.

miR393, связываясь с AFB-белками, модулирует также баланс между салициловой кислотой (СК) и ауксином. СК — первичный медиатор защиты против биотрофных паразитов, а ауксин — антагонист функций СК. Сверхпродукция AFB1 снижает уровень индукции СК бактериальным инфектом, так как активный синтез ауксина конкурирует с синтезом СК.

А вторая цепь с того же гена, miR393b*, ассоциируется с белком AGO2, транскрипция которого индуцируется бактериальным элиситором avR Rpi2. Это приводит к индукции синтеза СК и модулирует экспрессию антимикробного белка PR1. Схематически процесс переключения ростовых процессов на иммунный ответ miРНК показан на рис. 2.11.

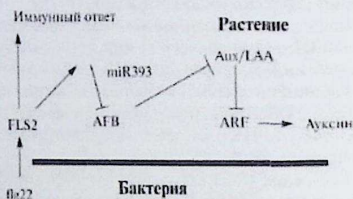


Рис. 2.11. Схема переключения сигнальной трансдукции с ростовых процессов на иммунный ответ с помощью miРНК (объяснения в тексте)

Взаимодействие сигнальных систем, усиливающих действие друг друга, приводит через фосфолирированные факторы регуляции транскрипции к активизации экспрессии генов иммунного ответа (рис. 2.12), вследствие чего в зараженной и примыкающих к ней клетках происходят кардинальные изменения, такие как реакция сверхчувствительности (СВЧ), локальная приобретенная устойчивость (LAR) и системная приобретенная устойчивость (SAR).

2.4. ЛОКАЛЬНАЯ ПРИОБРЕТЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ: РЕЖИМ РАБОТЫ УСТЬИЦ

Устойчивость *Arabidopsis* к авирулентным штаммам *Pseudomonas syringae* теряется, если бактериальные клетки не поместить на поверхность листа, а инфильтрировать внутрь, в межклеточное пространство. Поскольку бактерии попадают туда естественным путем через устьица, было предположено, что первый этап приобретенной устойчивости связан с режимом работы устьиц. Исследования

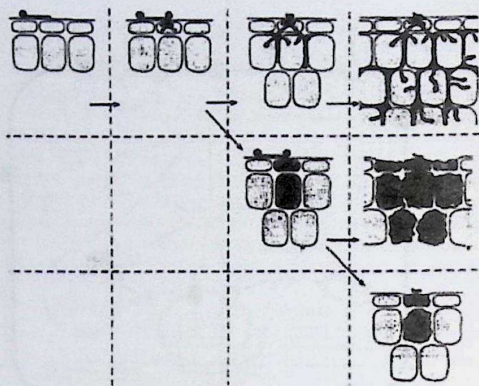


Рис. 2.13. Проявление реакции сверхчувствительности в клетках ткани картофеля, зараженной *Phytophthora infestans* [Kamoun et al., 1999]. Верхний ряд: развитие мицелия в ткани восприимчивого сорта; средний и нижний ряды — гибель зараженной (нижний ряд) и прилегающих к ней (средний ряд) клеток

чувствительность немедленного и замедленного типов. Медиаторы 1-го типа — vasoактивные амины (гистамин и серотонин), ферменты, протеогликаны; гепарин в тучных клетках и хондроитинсульфат в базофилах. При гиперчувствительности замедленного типа под действием шитокинов (ИЛ-3, фактора некроза опухолей и др.) происходят локальное разрушение зараженных участков ткани, усиление экспрессии адгезивных молекул на кровеносных сосудах, активация макрофагов и привлечение их в зону реакции, усиление секреции медиаторов воспаления.

Среди фитопатологов долгое время бытовали два взгляда на причины СВЧ: 1) реакция сверхчувствительности — не причина устойчивости, а ответ на биохимический стресс, возникший в клетках от разных причин, в том числе от заражения несовместимой (авирулентной) расой; 2) реакция сверхчувствительности предшествует гибели паразита. Она индуцируется метаболитом авирулентного паразита, повреждающего мембранные структуры клетки хозяина. Вследствие этого происходит гибель основного трофического органа паразита — гаустория. Эти споры остались достоянием истории. Уже в прошлом веке было четко показано [Мустафа, Дьяков, 1979], что:

1) для индукции СВЧ-реакции необходимы живые гифы патогена; 2) реакция СВЧ индуцируется раньше, чем начинается синтез антимикробных молекул, и является первичным ответом на заражение, а не побочным продуктом ответа на биохимический стресс; 3) некротизация клеток при СВЧ снимает мембранный барьер и обеспечивает приток антимикробных молекул к зараженным и убитым вследствие СВЧ-реакции (а поэтому не способным к синтетической деятельности) клеткам из прилегающих живых.

Отмирание клеток зараженного растения возможно вследствие двух причин: 1) выделения некротрофными паразитами, которые способны оккупируют только мертвые, лишённые иммунных свойств клетки, токсичных продуктов. Гибель клеток от вредных биотических или абиотических воздействий называют *некрозом*; 2) ответной реакцией самого растения на заражение, т.е. не вынужденной, а запрограммированной смерти, получившей название *апоптоз*. СВЧ-реакция — одна из форм апоптоза растений. Об этом свидетельствуют, в частности, структурные различия клеток, погибших в результате апоптоза и некроза (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Различия в структуре клеток, погибших от некроза и апоптоза [Bagirova, 2007]

Признак	Апоптоз	Некроз
Объем клетки	Уменьшается	Увеличивается
Целостность цитоплазматической мембраны	Сохраняется до момента образования апоптозных везикул	Происходят разрывы
Содержимое клетки	Распределяется по апоптозным везикулам	Попадает в межклеточное пространство
Состояние ядра	Фрагментируется с образованием олигонуклеосомных частиц, окруженных мембраной	Лизировано
Органеллы	Во внешней мембране образуются поры, через которые высвобождаются индукторы апоптоза	Набухают и разрушаются

Основная роль в разрушении клетки при апоптозе принадлежит цистеиновым протеазам — *каспазам*, синтез которых индуцируется апоптогенными факторами. Каспазы вызывают: 1) гидролиз белков ламин, армирующих ядерную мембрану, распад ядерной оболочки и конденсацию хроматина; 2) расщепление антиапоптозных белков,

протеолиз ингибитора ДНКазы DFF и освобождение апоптозной ДНКазы CAD, нуклеосомные разрывы хроматина; 3) угнетение репарации ДНК; 4) разрушение белков цитоскелета; 5) участие в регуляции экспрессии генов вследствие разрушения гистонов.

Таким образом, роль реакции сверхчувствительности в явлениях устойчивости растений можно свести к следующему:

- индукция окислительного взрыва, активизация токсичных АФК — супероксид-аниона, пероксида водорода и др.;
- АФК, в свою очередь, важный индуктор цепи трансдукции сигнала в зараженных и прилегающих к ним клетках, приводящей к возникновению факторов локальной и системной устойчивости;
- нарушение мембранного барьера гиперчувствительной клетки усиливает приток этих факторов (PR-белков, фитоалексинов и др.) в зараженную клетку, т.е. непосредственно в контакт с паразитом.

2.6. ЛОКАЛЬНАЯ ПРИОБРЕТЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ: АНТИМИКРОБНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

В гл. 1 было рассказано об антимикробных соединениях, которые присутствуют в живой клетке или образуются после ее отмирания. Их возникновение происходит не в результате синтеза, а вследствие гидролиза. Ферменты, осуществляющие высвобождение токсичных продуктов из исходных нетоксичных субстратов, уже находятся в клетке, но пространственно разделены с субстратами. Гибель клетки приводит к разрушению мембранных барьеров между внутриклеточными компартментами, вследствие чего возникают контакты между ферментами и субстратами. При реакциях врожденного иммунитета в результате рецепции MAMPs через описанные выше этапы трансдукции сигнал достигает фактора регуляции транскрипции. Последний влияет на экспрессию ряда генов, на матрице которых *de novo* синтезируются антимикробные белки или ферменты, необходимые для синтеза антимикробных низкомолекулярных соединений (вторичных метаболитов).

2.6.1. Вторичные антимикробные соединения — фитоалексины

Термин *фитоалексины* (ФА) предложил немецкий фитопатолог К. Мюллер; согласно его определению ФА — это антибиотики растительного происхождения, которые синтезируются в растениях в ответ на микробную инфекцию и участвуют в механизмах болезнестойкости.

Строение и биогенез. ФА — хорошо исследованная группа вторичных метаболитов растений. Как и для других вторичных метаболитов, для ФА характерны следующие общие черты.

1. У таксономически родственных видов растений пути биосинтеза ФА одинаковы.

В пасленовых растениях ФА синтезируются через ацетат-мевалонатный путь (рис. 2.14). Активность раннего фермента этого пути оксиметилглутарил-СоА-редуктазы возрастает в пораненных и зараженных *Phytophthora infestans* клубнях картофеля. Но при поранении активизируется также фермент скваленсинтеза, конъюгирующий две молекулы фарнезила с образованием С-30 сквалена и преобразованием его в дальнейшем в стероидные гликоалкалоиды соланин и чаконин, а при заражении этот фермент оказывается супрессированным, но индуцируется активность сесквитерпенсиклазы, которая циклизуется молекулу фарнезила с образованием С-15 циклических сесквитерпеновых фитоалексинов. Ферменты, регулирующие конечные этапы синтеза ФА, также подвержены регуляции, осуществляемой участниками разных путей трансдукции сигнала. Например, в клубнях картофеля, обработанных препаратом клеточных стенок *P. infestans*, накапливается больше ФА ришитина, чем любви-

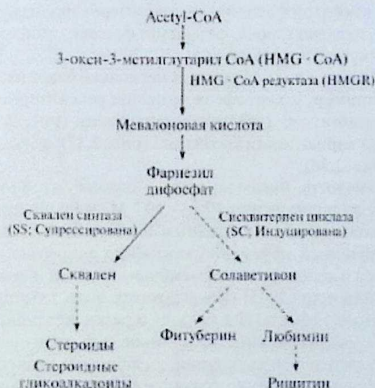


Рис. 2.14. Биосинтез фитоалексинов картофеля ришитина, любимина и фитуберина [Yoshioka et al., 2001]. Молекула фарнезилпирофосфата циклизуется в устойчивом сорте с образованием сесквитерпеновых фитоалексинов, но полимеризуется в восприимчивом сорте с образованием тритерпена сквалена

мина, а в присутствии ингибитора НАДФ-оксидазы дифенилйодида, наоборот, накапливается больше любимина, чем ришитина. Поскольку НАДФ-оксидаза — ключевой фермент процесса генерации окислительного взрыва (см. раздел 2.3.1), полагают [Yoshioka et al., 2001], что АФК регулирует активность ферментов конечных этапов образования ФА.

Большинство ФА у растений из семейства бобовых обладают С-15 флавоноидным скелетом, содержащим два фенольных кольца. Первое кольцо синтезируется через шикимовую кислоту и ароматические аминокислоты (шикиматный путь). Ключевым ферментом его синтеза является *фенилаланинаммоноумлиаза* (ФАЛ), дезаминирующая фенилаланин. Второе фенольное кольцо синтезируется конденсацией ацетил-козима А с образованием малоновой кислоты (ацетат-малонатный путь). Оба кольца соединяются в молекулу дифенола халкона ферментом *халконсинтаза*, активность которого, также как и активность ФАЛ, возрастает при стрессах. Дальнейшие модификации халкона приводят к образованию большого числа химически и функционально разнообразных соединений — флавонов, флаванов, флаванолов, птерокарпанов (рис. 2.15), выполняющих функции пигментов, ФА, антиоксидантов и проч. Например, ФА бобовых растений относятся к простым изофлавонам (веститол люцерна, киевитол фасоли и вигны), птерокарпанам (меликарпин люцерны, пизатин гороха, фазеоллин фасоли, глицеоллин сои), куместанам (куместрол клевера).

2. У одного вида образуется несколько близких по строению ФА.

Например, у картофеля описаны сексвитерпеноидные соединения ришитин, любимин и фитуберин (рис. 2.16), у сои — несколько вариантов глицеоллина (рис. 2.17), у лука — цибулины 1d и 2d (рис. 2.18).

Токсичность. Фитоалексины — слабые антибиотики. Их эффективная доза составляет 10^{-3} — 10^{-6} М. В большинстве случаев они относятся к мембраноактивным соединениям. Показано, например, что первичный эффект ФА картофеля ришитина и любимина проявляется в деполаризации мембран модельной водоросли *Nitellopsis* [Воробьев и др., 1975]. По-видимому, этим действием объясняются различные эффекты ФА на рост и развитие грибов — скручивание ростковых трубок, гибель кончиков гиф, грануляция цитоплазмы, дезорганизация митохондрий, разобщение транспорта электронов и фосфорилирования, подавление дыхания конидий, индукция апоптоза [Jeandet et al., 2013]. Менее токсичны ФА для бактерий, хотя грамположительные бактерии чувствительны ко многим ФА [Дмитриев, 1999]. По-видимому, мембранными эффектами ФА обу-

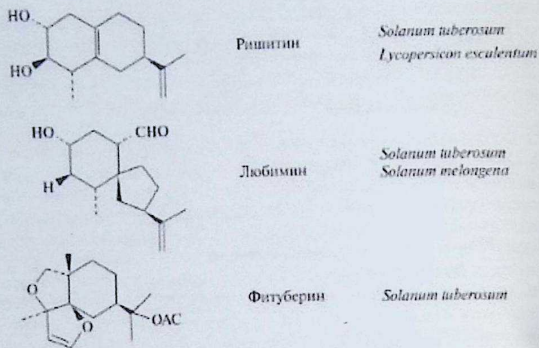


Рис. 2.16. Сесквитерпеновые фитоалексины пасленовых

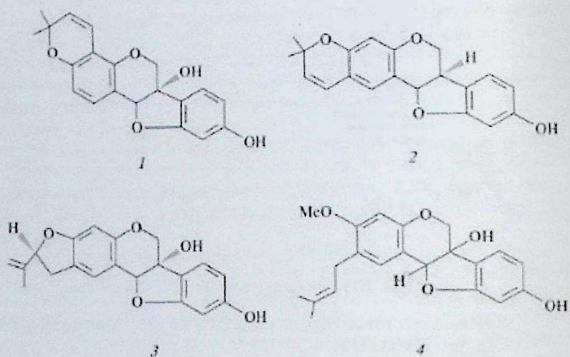


Рис. 2.17. Фитоалексины сои глицеоллины:

1 — глицеоллин I; 2 — глицеоллин II; 3 — глицеоллин III; 4 — глицеоллин IV

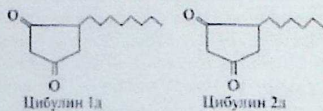


Рис. 2.18. Фитоалексины лука цибулины

- от соотношения продукции ФА и чувствительности к нему разных структур паразита. Например, при заражении *Colletotrichum lindemutianum* устойчивых сортов фасоли ФА фазеолина накапливается сразу после внедрения, когда некротизированы одна—три клетки. В восприимчивых сортах накопление фазеолина начинается через 17—18 ч, когда некротизировано 4—5 тыс. клеток, причем конечная концентрация фазеолина примерно одинакова в сортах обеих групп. Эксперименты показали, что 10 мг/г ткани фасоли подавляет прорастание спор *S.lindemutianum*; 3 мг/г уменьшает длину ростковых трубок и 100 мг/г ингибирует рост мицелия. Следовательно, в устойчивых сортах ФА контактирует с высокочувствительной стадией гриба и подавляет ее, а в восприимчивых — с высокоустойчивой;
- от условий окружающей среды. При температуре 25°C в листьях фасоли накапливается фазеолин в гораздо более высокой концентрации, чем при 17°C;
- от присутствия в растении соединений, влияющих на антигрибную активность. Например, фитостерины снижают чувствительность *Phytophthora infestans* к ришитину и любимину.

Роль ФА в явлениях фитонимунитета. ФА участвуют в явлениях видового и сортового иммунитета (нехозяйской и хозяйской устойчивости), а также — приобретенной устойчивости. Роль ФА в видовом иммунитете показана в табл. 2.3.

Таблица 2.3

Образование ФА пизатина в листьях гороха, зараженных мучнисторосяными грибами двух видов [Oku et al., 1975]

Виды грибов	Начало образования ФА после заражения, ч	Максимальная концентрация, мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл
<i>Erysiphe pisi</i>	48	78	530
<i>E. (Blumeria) graminis</i>	15	>2000	40

Как видно, синтез пизатина в ответ на заражение гороха паразитом злаков начинается значительно раньше, чем в ответ на заражение такономически близким «собственным» патогеном; пизатин достигает в 25 раз более высокой концентрации и в 13 раз более токсичен, т.е. концентрация пизатина в горохе, зараженным пшеничным патогеном, в 50 раз превышает летальную для него дозу, а в горохе, зараженном «своим» патогеном, в 7 раз ниже ее.

Роль ФА в сортовой устойчивости продемонстрирована во многих опытах. Например, в устойчивых к корончатой ржавчине сортах овса

в ответ на заражение ФА авеналюмины образуется раньше и в более высокой концентрации, чем в восприимчивых (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Реакция на заражение расой 203 *Puccinia coronata* устойчивых и восприимчивых сортов овса [Mayama et al., 1982]

Группы сортов	Число сортов	Тип инфекции	Длина гиф через 36 ч, мкм	Срок остановки роста, ч	Авеналюмин, мкг/г, через	
					48 ч	144 ч
Высокоустойчивые	8	0	199	36–48	156,5	300
Умеренноустойчивые	10	1–3	342	72–96	13,4	95,7
Восприимчивые	4	4	424	—	следы	следы

Наконец, ФА играют заметную роль в явлениях приобретенной устойчивости. Внедряясь в клетки устойчивых сортов и линий, проростки авирулентных к ним рас индуцируют защитные реакции, включая синтез ФА, и тем самым иммунизируют их против заражения проростками вирулентной расы. Показано, например, что продукция спор вирулентной расы желтой ржавчины пшеницы при заражении на 4-е сутки после авирулентной расы упала вдвое по сравнению с контролем (с 108 до 56 мг/см²).

2.6.2. Антимикробные белки

В 70-х годах прошлого века вирусологи обнаружили в листьях табака, зараженного некротическими штаммами вирусов, белки, которые отсутствовали как у вирусов, так и у незараженных растений. Затем новые белки были выявлены и у других растений, зараженных различными патогенами. Они получили название белков, связанных с патогенозом (PR — pathogen-relation proteins). Большинство PR-белков обладают ферментативными свойствами и токсичны для микроорганизмов. На основании комплекса физико-химических и биологических свойств PR-белки объединены в 14 групп (табл. 2.5).

Ниже приведена характеристика важнейших групп PR-белков.

PR-1. Обладает антигрибными свойствами *in vitro* и *in planta*. Найден в рисе, пшенице, кукурузе, табаке и других растениях. Гомологичен суперсемейству белков, богатых цистеином. Предполагается, что токсическое действие обусловлено образованием мембранных каналов в клетках-мишенях и ингибированием поступления

Группы PR-белков [Ebrahim et al., 2011]

Семейства	Растение-продукцент	Свойства
PR-1	Табак, PR-1a	Антигрибной белок
PR-2	Табак, PR-2	β -1,3-Глюканаза
PR-3	Табак, PQ	Хитиназа, типы I, II, IV, V, VI
PR-4	Табак, «R»	Хитиназа, типы I, II
PR-5	Табак, «S»	Тауматинподобный белок
PR-6	Томат, ингибитор	Ингибитор протеиназы
PR-7	Томат, P69	Эндопротеиназа
PR-8	Огурец, хитиназа	Хитиназа, тип III
PR-9	Табак, липинпероксидаза	Пероксидаза
PR-10	Петрушка, PR1	Рибонуклеаза
PR-11	Табак, хитиназа, класс V	Хитиназа, тип I
PR-12	Редис, Rs-AFP3	Дефензин
PR-13	<i>Arabidopsis thaliana</i> , TN12.1	Тионин
PR-14	Ячмень, LTP4	Белок — транспортер липидов

в клетки Ca^{2+} [Seltrennikoff, 2001]. Интересно, что образующийся в клетках мозга млекопитающих, пораженных глиомобластомой, белок GliPR имеет 35% гомологии аминокислотных последовательностей и сходства трехмерной структуры с PR-1 томата, что свидетельствует о сходстве путей иммунного ответа у растений и животных [Szyperski et al., 1998].

Хитиназы. Катализируют разрывы между C1- и C4-мономерами N-ацетил-D-глюкозаминов в линейной молекуле хитина. Хитиназной активностью обладают PR-белки из многих групп (табл. 2.5). Различают эндо- и экзохитиназы. Эндохитиназы расщепляют молекулу хитина на хитотриозы, хитотетраозы и другие фрагменты. Экзохитиназы также разделяют на две подгруппы: хитобиозидазы, высвобождающие диацетилхитобиозы, и β -1,4-N-ацетилглюкозаминидаза, которая отщепляет олигомерные продукты, полученные под действием эндохитиназ и хитобиозидаз, с образованием из них мономера N-ацетилглюкозамина.

На основании различий в первичной структуре хитиназы разделяют на несколько классов:

Класс I имеет N-терминальный домен, связывающий хитин, обогащенный цистеином. Он гомологичен гевенину — связывающему хитин лектину из гевеи. Подкласс Ia — кислые хитиназы и Ib — щелочные. Кислые хитиназы локализованы в межклеточном пространстве (апопласте), а щелочные — в вакуолях.

Класс II лишен домена, сходного с гевенином; изолирован у табака, картофеля, злаков и других растений.

Класс III принадлежит к семейству гликозил-гидролаз, обладает лизоцимной активностью, имеет сходство с бактериальными хитиназами.

Класс IV — экстраклеточный низкомолекулярный белок вследствие наличия четырех делеций. Встречается главным образом у двудольных растений.

Класс V гомологичен бактериальным экзохитиназам.

Класс VI имеет длинный спейсер, обогащенный пролином.

Растительные хитиназы разрушают клеточные стенки грибов, блокируют их рост и высвобождают олигомеры хитина, имеющие элиситорную активность (см. разд. 2.1.2).

β -Глюканазы. Это PR-белки класса II. Описаны у табака, *Arabidopsis*, злаковых и плодовых культур. По результатам секвенирования их подразделяют на несколько классов: класс I — белок молекулярной массой 33 кДа, локализованный в вакуолях; классы 2 и (реже) 3 и 4 — 36–40 кДа, кислые экстраклеточные белки. В геноме табака обнаружено не менее 14 генов, контролирующих синтез глюканаз. Воздействие глюканаз, как и хитиназ, сильнее всего проявляется на кончики растущих гиф, ферменты вызывают лизис клеточной стенки и разрушение мицелия. Кроме того, глюканазы при совместном действии с хитиназами усиливают токсичность последних. Фибриллы хитина составляют внутренний слой клеточной стенки гриба, вследствие чего наружные глюкановые слои защищают его от атаки хитиназами. Так как хитин находится в прилегающем к цитоплазматической мембране внутреннем слое клеточной стенки (рис. 2.19), глюканазы, разрушая глюкановый слой, делают хитин доступным для хитиназ.

Изменение активности деполимераз, разрушающих полисахариды, — важный фактор возрастной устойчивости растений к паразитам. Например, устойчивость стареющих листьев винограда к мильдью (возбудитель *Plasmopara viticola*) вызвана высокой активностью в них β -глюканазы; у табака также с возрастом увеличивается активность β -глюканазы, хитиназы и пероксидазы и, как следствие, устойчивость к *Peronospora tabacina*.

Тауматин-подобные белки (PR-5). Имеют высокий процент гомологии с тауматином — сладким белком из тропического кустарника *Taumatococcus daniellii* (но сладким вкусом не обладают), поэтому их называют TL- (taumatococin-like) белки. Обнаружены у табака, *Arabidopsis*, кукурузы, сои, риса, пшеницы, томата и других растений. Молекулярная масса — около 22 кДа, белок содержит восемь дисульфидных связей, что делает его структуру устойчивой к протеазам, которыми богато межклеточное пространство растений. Представи-

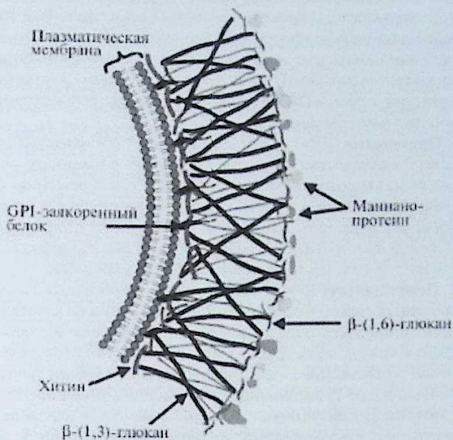


Рис. 2.19. Схематическое строение клеточной стенки грибов

тели семейства TL-белков у различных растений выполняют разные функции: 1) они изменяют клеточную проницаемость у клеток, но не у протопластов, влияя, следовательно, на структуру стенки; 2) многие TL-белки связываются с β -1,3-глюканами и обладают глюканазной активностью; 3) TL-белок кукурузы зеаматин ингибирует α -амилазу насекомых и трипсины млекопитающих; 4) гомологичный осмотину (белку, обеспечивающему адаптацию растений к осмотическому стрессу) TL-белок табака нарушает регуляцию синтеза компонентов клеточной стенки грибов. Различные TL-белки действуют синергично, обеспечивая разнообразные механизмы токсичности. В связи с высокой антигрибной активностью они привлекли внимание медицинских микологов, которые предложили использовать их для терапии при кандидозах.

Ингибиторы протеиназ (PR-6). Это белки, специфически связывающиеся с протеиназами и подвергающие их медленному и ограниченному протеолизу. Двуглавые ингибиторы имеют два независимо действующих центра связывания, благодаря чему они могут ингибировать действие двух молекул ферментов, часто разных (например, субтилизина и α -амилазы). Описаны у многих растений, но наиболее изучены у пасленовых (картофеля, томата) и у злаков. В семенах последних они синтезируются конституционно и, по-види-

тому, несут функции запасных белков, расходуемых в процессе прорастания семян. Защитная роль этих белков заключается в способности подавлять активность сериновых протеиназ фитопатогенных грибов и насекомых-фитофагов и, следовательно, лишать их способности поглощать растительные белки. Их синтез индуцируется не только грибами MAMPs (хитином и хитозаном), но также эндогенными элиситорами DAMPs — продуктами распада клеточных стенок растения в зоне заражения.

Протеиназы (PR-7). В межклеточном пространстве (апопласте) растений находятся различные ферменты, в том числе протеиназы, многие из которых синтезируются в ответ на заражение. Такова, например, протеиназа томата Per-1, образующаяся в ответ на заражение возбудителем оливковой пятнистости *Cladosporium fulvum*. Растительные протеиназы разрушают как белоксодержащие MAMPs (см. разд. 2.3.1), так и структурные белки паразитов.

Пероксидаза (PR-9). В гл. 1 было указано на роль лигнификации клеточных стенок в повышении их устойчивости к инвазии патогенами. В процессе образования лигнина важное значение принадлежит ферментам пероксидазам, активность которых усиливается в ответ на заражение или механическое повреждение ткани растения. Пероксидазы: 1) катализируют полимеризацию коричневого спирта в лигнин; 2) продуцируют перекрестные связи между целлюлозой, пектином, гликопротеидами клеточной стенки и лигнином; 3) участвуют в процессах заживления ран — отложении водонепроницаемого барьера из полимеризованных алифатических и ароматических соединений (суберинизации ткани); 4) участвует в катаболизме растений (разрушении ауксина). В геномной библиотеке *Arabidopsis* найдено более 70 генов, кодирующих пероксидазы, и структурно сходные с ними белки. В клетках растений пероксидазы локализованы в различных компартментах и существуют в нескольких изоформах:

- катионные формы (pH 8,1–11,0). Они катализируют формирование пероксида водорода из НАД-Н и воды. Локализованы в центральной вакуоли. Обладают свойствами оксидазы индолил-уксусной кислоты и регулируют уровень ауксинов в клетке;
- слабоанионные формы (pH 4,5–6,5). Локализованы в клеточной стенке. Умеренно активные лигнификаторы; участвуют в суберинизации ран;
- анионные формы (pH 3,5–4,0). Локализованы в клеточной стенке. Принимают участие в лигнификации и перекрестных связях лигнина с полисахаридами клеточной стенки.

RIPs (РНК-ингибирующие белки, PR-10). Представляют собой слабокислые N-глюкозидазы молекулярной массой 16–19 кДа, разрушающие молекулы РНК. Вследствие разрушения рибосом ингибируют синтез белка на стадии элонгации. Имеют два домена: 1) петлю, связывающую фосфаты (АТФ и ГТФ), консервативный домен у белков, связывающих нуклеотиды; 2) *Bet v 1* мотив. RIPs подразделяют на три группы: 1) одноцепочечные N-глюкозидазы молекулярной массой 30 кДа; 2) двухцепочечный высокотоксичный ринин (из клещевины) и гомологичные ему нетоксичные эбулин-1 и нагрин-б; 3) четырехцепочечные молекулы, организованные в два димера, аналогичные типу (2). У RIPs типа (2) одна цепочка связывается с клеточной стенкой грибов и образует каналы, через которые вторая цепочка проникает внутрь клетки и ингибирует рибосомы. RIPs имеют также слабую ДНКазную активность и участвуют в индукции программированной клеточной смерти. Они генерируют устойчивость к вирусам, но активны и против рибосом грибов.

RIPs обнаруживаются в различных органах растений — пыльце, цветках, плодах, семенах, корнях и листьях. Их синтез индуцируется различными патогенами и стрессорными факторами: УФ-облучением, тяжелыми металлами, ранением, а также фитогормонами, жасминовой, салициловой и абсцизовой кислотами.

Геном винограда содержит 17 RIP-генов, кластеризованных на хромосоме 15 [Xu et al., 2014].

Дефензины (PR-12). Это низкомолекулярные (45–54 аминокислот) белки, богатые цистеином (имеют четыре дисульфидные связи). Продуцируются млекопитающими, грибами, насекомыми и растениями. У животных они представлены очень мелкими белками (молекулярной массой 3–5 кДа), которые формируют каналы в мембранах. Растительные дефензины подразделяют на четыре группы: 1) морфогенные (вызывают морфологические изменения у восприимчивых видов грибов); 2) неморфогенные (ингибируют рост без морфозов); 3) неактивные против грибов, но ингибируют α -амилазу *in vitro*; 4) высокоспецифичные антигрибные белки: связываются со сфинголипидными рецепторами на мембранах грибов, усиливают потерю ионов калия и поступление ионов кальция.

Тионины (PR-13). Это также богатые серой низкомолекулярные (3–5 кДа) белки, накапливающиеся в семенах и проростках растений. Взаимодействуют с мембранными фосфолипидами и вызывают образование пор в мембранах (ионные каналы, селективные для катионов) вследствие связывания с фосфатидилсериновыми головками мембранных фосфолипидов. В результате этого изменяется

мембранная проницаемость, возникает окислительный взрыв и клетки погибают вследствие СВЧ-реакции.

ЛТР (белки, транспортирующие липиды, PR-14). Небольшие (9–10 кДа) пептиды, имеющие восемь цистеиновых остатков, соединенных дисульфидными связями. Играют важную роль в метаболизме липидов, в частности в построении мембран, и, возможно, участвуют в трансдукции системной приобретенной устойчивости (SAR) (см. ниже).

Оксалатоксидаза (PR-16, PR-17). Исследования уфимских биохимиков [Яруллина и др., 2003] показали, что оксалатоксидаза играет важную роль в генерации АФК (сравнимую с ролью НАДФ-оксидазы у животных) при стрессе и заражении растений патогенами, а также разрушает оксалаты, выделяемые грибами, которые могут ингибировать защитные реакции растительных клеток.

2.7. СИСТЕМНАЯ ПРИОБРЕТЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

Системная приобретенная устойчивость (SAR — system acquired resistance) проявляется в том, что части зараженного растения, удаленные от инфицированного локуса, приобретают повышенную устойчивость к повторному заражению. Этот термин предложил в 1961 г. немецкий вирусолог Росс, показавший, что SAR вызывается некрогенными паразитами. В дальнейшем выяснилось, что SAR образуется также в ответ на ризосферные бактерии и MAMPs — хитин, глюканы, липополисахариды, флагеллин, фактор элонгации Tu и другие белки микроорганизмов. Более того, SAR может быть инцинирована метаболитами и самих растений — фитогормонами брассиностеринами, жасмонатами, олигогалактуронидами, оксалатами, спермином, этиленом. Для визуализации явлений SAR используют соединения, появляющиеся в системно индуцированных частях растений. Такой маркерной молекулой является, в частности, белок PR-1.

Большую роль в индукции SAR играет салициловая кислота (СК). Показано, например, что обработка растений бензотиазолами (BTH) повышает эндогенный уровень СК, активирует СК-зависимый сигнальный путь и индуцирует SAR [Song et al., 2013]. К тому же СК способна передвигаться внутри растения, так что она рассматривалась и в качестве кандидата на носитель транслокации сигнала. Гипотеза о решающем вкладе СК в SAR была отвергнута после:

- обнаружения независимой от СК индуцированной системной устойчивости (ISR), вызванной ризосферными бактериями;
- исследования мутантов по регуляторным генам *NPR1* и *NIM1* *Arabidopsis thaliana*. *NPR1* — ключевой регулятор SAR. Хотя его

продукт участвует в регуляции синтеза СК, он также играет роль в ISR. У некоторых мутантов при нормальном уровне СК не было индукции SAR. У мутанта *Arabidopsis dir1* сохраняется LAR, но нет SAR. В экссудатах мутанта отсутствовал апопластный белок, гомологичный (по результатам секвенирования) транспортному белку липидов [Maldonado et al., 2002]. А у мутантов *Arabidopsis eds1* (не индуцируется устойчивость) и *rad4* (не синтезируются PR-белки) не развивается SAR и обнаружены дефекты в липазах. Поэтому предположено, что SAR контролируется сигнальной системой, связанной с метаболизмом липидов [Contrath, 2006]. В связи с этими предположениями можно вспомнить высказанную ранее гипотезу о роли арахидоновой кислоты в индукции SAR [Ильинская и др., 1981].

В последние годы большое внимание в качестве возможных сигнальных молекул привлекают *mi*PHK. Они найдены во флоэнном соке огурца, люпина и других растений и способны передвигаться по растениям [Yoo et al., 2004]. Найден также белок, связывающийся с одноцепочечными *mi*PHK.

В качестве сигнальных молекул в явлениях SAR рассматривают также летучие продукты, которые могут воздействовать не эндогенно, передвигаясь внутри зараженного растения, а через воздушную среду. Это могут быть: 1) газообразный *метилсалицилат* — основной летучий продукт листьев табака, зараженных ВТМ, функционирующий как воздушный сигнал для собственных и соседних растений; 2) *этилен*, который, во-первых, образуется при различных стрессах, включая заражение, во-вторых, является летучим продуктом и, в-третьих, имеет свойства фитогормона и регулятора сигнальной трансдукции. Давно было экспериментально показано [Weber, Stahman, 1966], что этилен, образующийся в клубнях устойчивого к фитофторозу сорта батата, индуцирует через воздушную среду устойчивость у клубней восприимчивого сорта.

С индукцией SAR связано еще одно интересное явление — *сенсбилизация*. Оно обнаружено впервые в лаборатории известного биохимика Л.В. Метлицкого [Озерцковская, 1994]. Было показано, что при обработке среза картофельного клубня элиситорами из мицелия *Phytophthora infestans* в концентрации 100 мкг/мл возникает реакция СВЧ и накапливаются ФА, что не удивительно. При разведении элиситорного комплекса до 5 мкг/мл никакого видимого эффекта не наблюдалось, однако при повторном заражении предварительно обработанного клубня возникает гораздо более быстрый и интенсивный защитный ответ, чем у не обработанного предварительно клубня. При этом приобретенная устойчивость сохранилась для

тельное время — до 3 мес. Авторы назвали обнаруженное явление сенсibilизацией. После повторного открытия его американцем Дж. Кучем оно получило общее признание и название *priming*. Это явление имеет важное экологическое значение. Ведь SAR полезна только в том случае, если произойдет повторное инфицирование ранее зараженного растения. Если же этого не случится, то SAR вызовет лишь бесполезную трату энергетических ресурсов [Smedegard-Petersen, Tolsrup, 1985], поскольку СВЧ-реакция и синтеза защитных продуктов — высокоэнергoзависимые процессы. Показано, например, что здоровые растения пшеницы, у которых SAR была индуцирована синтетическим элиситором, характеризовались задержкой роста и снижением продукции семян по сравнению с неиндуцированными растениями. Аналогичные данные получены и для *Arabidopsis* [Van Hulften et al., 2006].

Полагают, что за сенсibilизацию ответственна активизация киназ [Conrath, 2006]. У сенсibilизированных растений возрастают объем агранулированного эндоплазматического ретикулаума, число митохондрий, концентрация цАМФ. Показана также модификация гистонов в промоторах некоторых генов. По-видимому, структура хроматина была подготовлена к транскрипции генов защитного ответа.

Ключевой регулятор SAR и *priming*-белок NPR1, который содержит два домена, обеспечивающих взаимодействие белок — белок (анкириновые повторы и *zink-finger*-домен) и сайт фосфорилирования.

Контрольные вопросы и задания

1. Что представляют из себя неспецифические элиситоры? Расшифруйте сокращенные названия PAMPs, MAMPs и DAMPs.
2. Охарактеризуйте разнообразие рецепторных киназ растений, черты их сходства и различия с Toll-рецепторами животных.
3. Опишите основные сигнальные системы растительных клеток.
4. Какова роль нетранслирующихся miRNA в регуляции путей внутриклеточных сигналов?
5. Какие признаки характеризуют реакцию сверхчувствительности (СВЧ) как форму программируемой клеточной смерти и какова роль СВЧ в защите от патогенов?
6. Что представляют собой фитоалексины и какова их роль в иммунитете растений?
7. Перечислите группы PR-белков и охарактеризуйте их свойства.
8. Что представляет собой системная приобретенная устойчивость и каковы способы обмена растений сигналами тревоги?

Цитированная литература

- Воробьев Л.Н. Мембраноактивное действие фитоалексинов картофеля на клетки харовых водорослей [Текст] / Л.Н. Воробьев, Л.А. Юрганова, Ю.Т. Дьяков // Биол. науки. — 1975. — №11. — С. 54–59.
- Дмитриев А.П. Фитоалексины и их роль в устойчивости растений [Текст] / А.П. Дмитриев. — Киев, 1999.
- Ильинская Л.И. Биохимические аспекты индуцированной устойчивости и восприимчивости растений [Текст] / Л.И. Ильинская, Н.И. Васюкова, О.Л. Озерцковская // Итоги науки и техники: сер. «Защита растений». — 1991. — 7. — М.: ВИНТИ.
- Озерцковская О.Л. Индуцирование устойчивости растений биогенными элиситорами фитопатогенов [Текст] / О.Л. Озерцковская // Прикл. биохим. и микробиол. — 1994. — 30. — С. 325–339.
- Яруллина Л.Г. Участие оксалактоксидазы в неспецифической защитной активации окисления ортофенилендиаминна в проростках пшеницы при стрессе [Текст] / Л.Г. Яруллина, М.Б. Трошина, Н.В. Максимов, Р.М. Хайруллин // Агробиохимия. — 2003. — Т. 12. — С. 55–59.
- Abersheim P., Darvill A. (editors). Plant Cell Walls, 2010.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., et al. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity // Nature. 2002. 415: 977–983.
- Bagirova S.F. Hypersensitivity. In: Yu.T. Dyakov, V.G. Dzhavakhia, T. Korpela (eds). Comprehension and Molecular Phytopathology. Elsevier, 2007. 247–264.
- Contrath U. Systemic acquired resistance // Plant Signaling and Behavior. 2006. 1: 179–184.
- Ebrahim S., Usa K., Singh B. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. In "Sci. against microbial pathogens: communicating current resistance and technol. advances". A. Mandes-Vilas (ed.). 2011. 1043–1054.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., et al. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Molec. Plant Microbe Interact. 2006. 19: 711–724.
- JeanDET P., Clement C., Courat E., Cordelier S. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants disease // Internat. J. Molec. Sci. 2013. 14: 14136–14170.
- Kamoun S., Huitema E., Vleeshouwers G.A.A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? // Trends in Plant Sci. 1999. 4: 196–200.
- Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis* // Nature. 2002. 419: 399–403.
- Mayama S., Matsuura Y., Iida H., Tani T. The role of avenalumin in the resistance of oat to crown rust *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* // Physiol. Plant Pathol. 1982. 20: 189–199.
- Melotto M., Underwood W., Koesan J., et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion // Cell 2006. 969–980.
- Mithofer A., Ebel J., Felle H.H. Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in β -glucan elicitor — signaling in soybean roots // Molec. Plant-Microbe Interact. 2005. 18: 983–99.
- Oku H., Oushi S., Shiraishi T., Baba T. Pisatin production in powdery mildewed pea seedlings. Phytopathology. 1975. 65: 1263–1267.

Orozco-Cardenas M.L., Narvaez-Vasquez J., Ryan C.A. Hydrogen peroxide acts as second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyljasmonate // *Plant Cell*. 2001. 13: 179–191.

Poswillo D.E., Sopher D., Mitchell S. Experimental induction of fatal malformation with blighted potato. A preliminary report // *Nature*. 1972. 239: 462–464.

Seltrennikoff C.P. Antifungal proteins // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. 67: 2883–2894.

Seo J.-K., Wu J., Lii Y., Jin H. Contribution of small RNA pathway components in plant immunity // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 2013. 26: 617–625.

Smedegard-Petersen V., Tolsrup K. The limiting effect of disease resistance on yield // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1985. 23: 475–490.

Song G.C., Choi H.K., Ryu C.-M. The foliate precursor para-aminobenzoic acid elicits induced resistance against cucumber mosaic virus and *Xanthomonas axonopodis* // *Annals Bot.* 2013. 111: 925–934.

Szyperski T., Fernandez C., Mumenthaler C., Wuthrich K. Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the plant pathogenesis-related protein PI4a indicates a functional link between the human immune system and plant defense system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. 95: 2262–2266.

Van Hulften M., Pelsler M., van Loon L.C., et al. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. 103: 5602–5607.

Weber D.J., Stahman M.A. Induced immunity to *Ceratocystis* infection in sweet potato root tissue // *Phytopathology*. 1966. 56: 1066–1070.

Xu T.-F., Zhao X.-C., Jiao J.-T., Wang L., Xu Y. A pathogenesis related protein VPR-10.1 from *Vitis pseudoreticulata*. An insight of its mode of antifungal activity. 2014. *PLOS One*. DOI 10.1371.

Yoo B.-C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., et al. A systemic small RNA signaling system in plants // *Plant Cell*. 2004. 16: 1979–2000.

Yoshioka H., Sugiek N., Perk H.J., et al. Induction of plant gh91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 2001. 14: 725–736.

Глава 3

КАК ПАЗАРИТЫ ПРЕОДОЛЕВАЮТ ЕСТЕСТВЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

3.1. КАК ПАЗАРИТЫ МАНИПУЛИРУЮТ СВОИМИ ХОЗЯЕВАМИ

В процессе обитания на растениях паразиты вступают со своими хозяевами в молекулярный диалог, цель которого — во-первых, пройти покровы, защищающие ткани и клетки; во-вторых, подавить защитные свойства живых клеток и, в-третьих, осуществить то, ради чего потребовалось все остальное, — питание содержимым клеток хозяина. Как писал известный английский этолог и эволюционист Р. Доккинз, «Случайно ли то, что, простудившись, мы чихаем, или же это вирусы манипулируют нами, чтобы повысить свои шансы попасть в другого хозяина? Не усиливают ли какие-либо венерические заболевания половое влечение — хотя бы только за счет вызывания зуда, как экстракт испанской мушки? Увеличивают ли поведенческие симптомы бешенства вероятность дальнейшей передачи вируса...? Когда собака заражается бешенством, ее характер быстро меняется. В первые день — два она часто становится более ласковой и склонна лизать людей, с которыми общается, а это опасно, так как у нее в слюне уже содержится вирус. Вскоре в ней нарастает беспокойство, и она блуждает далеко от дома, готовая укусить каждого, кто попадается ей на пути. Вирус бешенства делает злыми и кусачими даже нехищных животных... Очевидно, что укусы хорошо способствуют передаче содержащегося в слюне вируса, но помимо этого его эффективному распространению могло бы превосходно содействовать и "беспокойное блуждание"... в некоторых случаях симптомы хозяина справедливо можно рассматривать, как приспособление паразита... Если поведение или физиология хозяина — это адаптация паразита, то у паразита должны быть... "гены модификации хозяина", а происходящие с хозяином изменения являются, следовательно, частью фенотипической экспрессии этих генов паразита» [Доккинз, 2011].

В отличие от животных, большинство растений ведет прикрепленный образ жизни, поэтому манипулировать их локомоторным поведением в смысле движений в направлении, благоприятном для распространения паразита, невозможно. Однако паразиты научились влиять на морфологию и физиологию растений-хозяев двумя основными путями.

1. *Адресовать потоки метаболитов в инфицированные места.* Для этого паразиты выделяют в зараженное растение фитогормоны, которые не принимают никакого участия в метаболизме самих паразитов и нужны им только для одной цели: манипулировать метаболизмом зараженного растения. Под действием фитогормонов гиббереллинов, шитокининов, индолилуксусной кислоты, выделяемых грибами и бактериями, в зараженном растении происходят следующие процессы:

- усиливается приток продуктов фотосинтеза в зараженные участки растения. Это показано при использовании метода автордиографии зараженных ржавчиной листьев пшеницы, которая росла в атмосфере радиоактивно меченного диоксида углерода ($^{14}\text{CO}_2$). Радиоактивная метка концентрируется в местах, где развиваются пустулы ржавчинного гриба;
- происходит разрастание зараженных тканей, формирование опухолей, галлов и других новообразований. Галлы на растениях образуются при действии самых разных паразитов — миксомицетов, оомицетов, бактерий, грибов, нематод, клещей, насекомых. Находящийся в галле паразит защищен от внешних воздействий, длительное время пребывает в комфортных условиях; кроме того, для формирования галла растения направляют в зараженное место поток питательных веществ, которые подкармливают и паразита;
- зараженные участки растений стареют медленнее незараженных, дольше сохраняют ювенильное состояние. Листья после обрывания быстро желтеют вследствие разрушения хлоропластов. Однако вокруг пустул возбудителей ржавчины долго сохраняются зеленые островки ювенильных клеток, снабжающих питанием паразита;
- увеличивается общая неспецифическая стойкость растительных протопластов к повреждающим воздействиям.

2. *Изменить иммунный статус растения с помощью иммуномодуляторов.*

Система врожденного иммунитета, как писал Г.И. Абилов (1998), «создает мощный заслон для инвазий бактерий, вирусов, грибов, простейших или многоклеточных паразитов и содержит эффективные механизмы для их распознавания и удаления из макроорганизма». Однако многие паразиты способны преодолевать барьер врожденного иммунитета, образуя для этих целей *факторы вирулентности, эффекторы* или *супрессоры*.

Метаболиты-манипуляторы влияют главным образом на иммунный статус растений; поэтому их можно отнести к иммуномоду-

ляторам. Иммуномодуляторы, подавляющие иммунный потенциал растений и индуцирующие их восприимчивость, названы *супрессорами*, а иммуномодуляторы, индуцирующие устойчивость, вызывающие защитные реакции в ответ на заражение — *элиситорами*. В свою очередь элиситоры подразделяют на неспецифические и специфические. Первые вызывают иммунный ответ у разных сортов и даже видов растений-хозяев, а вторые — только у определенных сортов. Весьма популярные во второй половине XX в., эти термины в XXI в. постепенно были заменены другими. Во-первых, естественный отбор не позволит патогенным грибам секретировать в растения вещества только для того, чтобы индуцировать защитный ответ. По-видимому, эти вещества функционально необходимы паразиту, а индукция ими защитных реакций обусловлена развившимся в ходе коэволюции узнаванием их некими рецепторами растений. Подобные соединения были рассмотрены в предыдущей главе под названием PAMPs или MAMPs. Во-вторых, одно и то же вещество паразитов в растениях разных видов может вести себя по-разному. Например, токсин *Fusarium moniliforme* фумонизин — фитотоксин для кукурузы (т.е. супрессор, убивающий клетки хозяина и подавляющий их защитный потенциал) и, наоборот, элиситора защитных реакций для *Arabidopsis*; бактериальный токсин коронатин в разных растениях может выступать как токсин, фитогормон и элиситор. Белок NIP1 *Rhizosporium secalis* в одних генотипах ячменя является токсином, подавляющим защитные реакции, а в других — элиситором, вызывающим их протекание. Кроме того, у фитопатогенных бактерий и грибов были найдены секретлируемые в зараженные растения белки, функция которых заключалась в подавлении защитных реакций, вызванных неспецифическими элиситорами. Поскольку в устойчивых растениях эти белки узнавались продуктами генов устойчивости к данному паразиту (R-белками) как индукторы защитных реакций, они получили название специфических элиситоров, Авт-белков (белков, связанных с авирулентностью), или *эфф-факторов*. То есть, в устойчивых растениях (обладающих R-генами), эфф-факторы — это белки, индуцирующие устойчивость, поэтому они и названы Авт-белками. Но в восприимчивых генотипах эти же белки, наоборот, являются факторами вирулентности. Эта двойственность в действии одних и тех же веществ стала причиной снижения популярности терминов «элиситор», «супрессор», «Авт-белок» и более широкого использования термина «эфф-фактор»; под которым стали понимать «все белки и низкомолекулярные соединения патогенов, которые влияют на структуру и функции хозяйских клеток, т.е. факторы вирулентности (токсины), индукторы ответа (элиси-

торы) или оба эти типа» [Hogenhout et al., 2009]. В этой главе будут рассмотрены структуры и биологическая активность эффекторов паразитов.

3.2. ЭФФЕКТОРЫ, ИЗМЕНЯЮЩИЕ СТРУКТУРУ ЛИГАНДА, РЕЦЕПТИРУЕМОГО МЕМБРАННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Возбудитель оливковой пятнистости томата *Cladosporium fulvum* секретирует в апопласт зараженного растения LysM, содержащий эффектор Eсrb, который, подобно LysM рецепторам растений, связывает хитин, защищая его от связывания мембранными рецепторами хозяина. Помимо *C. fulvum* LysM-эффекторы найдены у фитопатогенов *Mycosphaerella graminicola*, *Magnaporthe oryzae*, *Verticillium dahliae*, патогена человека *Trichophyton rubrum*, санротрофа *Trichoderma arthrovirides*. Некоторые из них не только экранируют молекулы хитина от LysM-рецепторов, но и защищают от действия хитиназ как почвообитающих микроорганизмов-микопаразитов, так и от собственных. Грибы секретируют хитиназы, чтобы локально размягчить клеточную стенку в процессах роста и ветвления гиф, морфогенеза и прорастания спор. А LysM-белок у *Trichoderma arthroviride* ингибирует прорастание собственных спор *in vitro*.

Выше было сказано, что хитин в клеточных стенках грибов индуцирует защитный ответ, в частности синтез фермента хитиназы, разрушающего клеточные стенки. Поэтому кроме Eсb6 *Cladosporium fulvum* выделяет в апопласт томатов еще один эффектор — белок Avr4, который содержит домен связывания хитина, гомологичный домену беспозвоночных. Он экранирует хитин и защищает его от действия растительных хитиназ.

3.3. ВИВОТОКСИНЫ

Функции веществ, токсичных для растительных клеток, мигрирующих от места инфицирования по растению и создающих плацдармы для дальнейшей его оккупации паразитом, выполняют *вивотоксины*. В качестве критериев токсина предложено учитывать, во-первых, воспроизводство данным химическим соединением симптомов болезни и, во-вторых, обнаружение его не только в колбе, где растет патоген (*in vitro*), но и в зараженном данным патогеном растении (*in vivo*).

Вивотоксины неспецифичны, они вызывают повреждения не только хозяина данного паразита, но и видов растений, находящихся за пределами его пищевой специализации. Поэтому вивотоксины относят к факторам неспецифической (горизонтальной) патосистемы.

По химической природе вивотоксины разделяют на несколько групп (рис. 3.1):

- органические кислоты, например шавелевая кислота возбудителя белой гнили *Sclerotinia sclerotiorum*;
- циклические ароматические соединения (кумаринны, азотсодержащие алкалоиды и др.). Таковы альтернариевая кислота (продуцент — *Alternaria solani*), фузариевая кислота (*Fusarium oxysporum*) и др.;
- циклические пептиды, состоящие из нескольких аминокислот, замкнутых в кольцо — фазеолотоксин (продуцент *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*), тентоксин *A. tenuis* (syn. *A. alternata*) и др.;
- гликопептиды, такие как токсины *Clavibacter michiganense* (возбудитель бактериального рака томатов) и *Phoma tracheophylla* (возбудитель мальсекко цитрусовых);
- тиоипиперазины (эпиполитиодиоксипиперазины — ЕТР) имеют как фитопатогенные грибы, например токсин сиродесмин возбудителя черной ножки капустных *Leptosphaeria maculans*, так и оппортунистические (способные развиваться как сапротрофы в почве и на растительных остатках и как паразиты у людей с поврежденным иммунным статусом, например, ВИЧ-инфицированных) возбудители микозов человека — глиотоксины *Aspergillus fumigatus*;
- полисахариды (токсин бактерий *Xanthomonas campestris*);
- полипептиды, например цератоульмин — токсин молекулярной массой 13 кДа возбудителя голландской болезни ильмов *Ophiostoma ulmi* и NIP-белки *Rhynchospirium secalis*.

У многих грибов, оомицетов и бактерий найдены NLP-белки: Necr-like proteins (necrosis and ethylene induced proteins), вызывающие образование некрозов. В геномах грибов обнаружено небольшое число контролирующих генов (1–4), а у оомицетов их много: у *Phytophthora sojae* — 29, у *P. ramorum* — более 40, причем только 7 — ортологи [Tillett, 2009]. Быстрая амплификация и дивергенция указывают на большую роль этих белков в патогенезе. Дезеруция генов NLP у возбудителя мокрой бактериальной гнили овощей и картофеля *Pectobacterium (Erwinia) carotovorum* сопровождается редукцией патогенности. NLP-белки вызывают гибель клеток и иммунный ответ только у двудольных, хотя встречаются и у паразитов злаков из родов *Magnaporthe* и *Fusarium*, а также сапротрофных грибов и бактерий. Считают, что бактерии получили их горизонтальным переносом из грибов.

По механизму действия выделяют несколько групп токсинов.

3.3.1. Ингибиторы ферментов растений

Гидролазы, разрушающие хитин, глюканы, белки и другие полимеры гриба, служат мощным защитным оружием растений. Они часто секретируются в межклеточное пространство — первоначальное место оккупации грибами гифами. Поэтому большинство апопластных эффекторов представляют собой ингибиторы растительных гидролаз — протеаз, глюканаз, хитиназ. Апопластные эффекторы *Cladosporium fulvum* AVR2, возбудителя ржавчины льна *Melampsora lini* AvrP123 и *Phytophthora infestans*: EPI1 и EPI10 — ингибиторы сериновых протеаз из семейства Kazal; эти эффекторы связывают PR-белок P69B — субтилизин-подобную сериновую протеазу томата [Hogenhout et al., 2009]. А некоторые фитофторовые оомицеты секретируют также ингибиторы глюканаз. Так, белок GIP1 *P. sojae*, ингибитор растительных глюканаз, препятствует образованию низкомолекулярных глюкановых MAMPs — фрагментов β -глюкана клеточной стенки паразита.

Ингибиторами ферментов растений являются метаболиты не только грибов, но и бактерий. Несколько примеров:

- *табтоксин* — токсин *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* — дипептид, соединенный с β -лактамовым кольцом. В зараженном растении протеазы отщепляют активную часть токсина — *табтоксинин*- β -*лактам* — ингибитор фермента глютаматсинтазы. В результате снижения активности фермента накапливается его предшественник аммоний, вызывающий разобщение фосфорилирования, ингибирование фотосинтеза и фотодыхания. Эти нарушения обмена проявляются как системный хлороз и задержка роста;
- *фазеолотоксин* — циклический трипептид *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*. В растении протеазы отщепляют активное начало *фазеотоксин орнитидин* — специфический ингибитор фермента орнитинкарбамоилтрансферазы, которая катализирует конверсию орнитина в цитруллин и аргинин. В зараженных растениях содержание орнитина увеличивается в 100 раз.

3.3.2. Мембраноактивные вещества и ингибиторы дыхания

Очень многие токсины, такие как фузариевая кислота (*F. oxysporum*), токсины бактерий из рода *Clavibacter*, токсины многих патоваров *P. syringae* (коронатин, сирингомицины), токсины фитопатогенных грибов из родов *Rhizoctonia*, *Cephalosporium*, *Fusicoccus*, *Cercospora*, *Phoma* и др. обладают сильным мембранотропным эффектом. Они индуцируют потерю метаболитов из клеток и некрозы, влияют на трансмембранный перенос ионов и открывают устьица, вызывая увядание растений.

Токсин возбудителя ранней пятнистости листьев картофеля *Alternaria solani* альтернариевая кислота вызывает деполаризацию мембран и подавляет реакцию сверхчувствительности клубней устойчивых к фитофторозу сортов картофеля в ответ на заражение *Phytophthora infestans*.

Теймотоксин — токсин гриба *Alternaria alternata* — циклический тетрапептид, вызывающий хлороз вследствие связывания с сопрягающим фактором (CF1) и ингибирования фотосинтетического фосфорилирования.

Паразит злаков *Rhynchosporium secalis* секретирует *in planta* три белка — NIP1, NIP2 и NIP3 (necrosis inducing proteins), — которые вызывают образование некрозов вследствие стимуляции H^+ -зависимой АТФазы плазмалеммы. Мутация, приводящая к замене одной аминокислоты в этом белке, снижает патогенность гриба.

3.3.3. Генераторы активных форм кислорода

Некоторые фитопатогенные грибы из родов *Cercospora*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Elsinoe*, *Hypocrella* образуют циклические соединения (рис. 3.2), для проявления токсичности которых в отношении растений-хозяев требуется свет, т.е. они относятся к группе веществ — фотосенсибилизаторов. В результате абсорбции энергии света фотосенсибилизаторы конвертируются в энергетически активное состояние и приобретают способность при взаимодействии с молекулярным кислородом генерировать его активные формы — радикалы: супероксид (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (ОН) и не радикальный синглетный кислород (1O_2). Все они обладают высокой токсичностью и вызывают повреждения в клетках растений. У *Cercospora nicotianae* обнаружен ген *CRQ1*, кодирующий белок, который имеет ДНК-связывающий мотив *Cys6Zn2*, т.е. является активатором транскрипции. Мутанты по этому гену, во-первых, чувствительны к собственному токсину церкоспорину и, во-вторых, производят его на 30–55% меньше, чем штаммы дикого типа. Полагают, что белок Crq1 нужен как для активации генов синтеза церкоспорина, так и для устойчивости к продуцируемым им активным формам кислорода.

3.3.4. Ингибиторы интеграции тканей и клеток растений

Эффектор *Phytophthora infestans* *ipfO* содержит мотив, обеспечивающий адгезию клеток млекопитающих, Арг-Гли-Асп-RGD (имеется у белковых лигандов и обеспечивает взаимодействие их с белком интегринам). Интегрины — семейство животных белков, которые пронизывают клеточную мембрану и, взаимодействуя с рецепторами

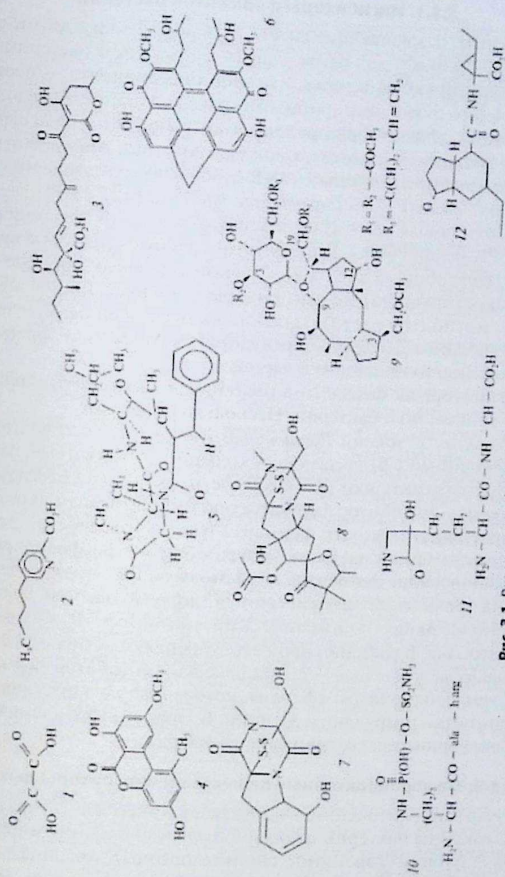


Рис. 3.1. Выводкины фитопатогенных грибов и бактерий.

1 — Щавелевая кислота *Sclerotinia sclerotiorum*; 2 — фузариевая кислота *Fusarium oxysporum*; 3 — альтернариновая кислота, 4 — афлатоксин; 5 — тетрациклин; 6 — трихотецин; 7 — цереспорин *Cercospora beticola*; 8 — афлатоксин *Aspergillus fumigatus*; 9 — фузикоцин *Fusiscccis strobilalis*; 10 — фазеолютоксин *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; 11 — табтоксин *P. syringae* pv. *syringae*; 12 — норнатиин *P. syringae* pv. *coronatafaciens*.

3.3.1. Ингибиторы ферментов растений

Гидролазы, разрушающие хитин, глюканы, белки и другие полимеры гриба, служат мощным защитным оружием растений. Они часто секретируются в межклеточное пространство — первоначальное место оккупации грибными гифами. Поэтому большинство апопластных эффекторов представляют собой ингибиторы растительных гидролаз — протеаз, глюканаз, хитиназ. Апопластные эффекторы *Cladosporium fulvum* AVR2, возбудителя ржавчины льна *Melampsora lini* AvrP123 и *Phytophthora infestans*: EPI1 и EPI10 — ингибиторы сериновых протеаз из семейства Kazal; эти эффекторы связывают PR-белок P69B — субтилизин-подобную сериновую протеазу томата [Hogenhout et al., 2009]. А некоторые фитофторовые оомицеты секретируют также ингибиторы глюканаз. Так, белок GIP1 *P. sojae*, ингибитор растительных глюканаз, препятствует образованию низкомолекулярных глюкановых MAMPs — фрагментов β -глюкана клеточной стенки паразита.

Ингибиторами ферментов растений являются метаболиты не только грибов, но и бактерий. Несколько примеров:

- **табтоксин** — токсин *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* — дипептид, соединенный с β -лактамовым кольцом. В зараженном растении протеазы отщепляют активную часть токсина — **табтоксиин- β -лактам** — ингибитор фермента глутаматсинтегазы. В результате снижения активности фермента накапливается его предшественник аммоний, вызывающий разобщение фосфорилирования, ингибирование фотосинтеза и фотодыхания. Эти нарушения обмена проявляются как системный хлороз и задержка роста;
- **фазеолотоксин** — циклический трипептид *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*. В растении протеазы отщепляют активное начало **фазеотоксин орнитидин** — специфический ингибитор фермента орнитинкарбамоилтрансферазы, которая катализирует конверсию орнитина в цитруллин и аргинин. В зараженных растениях содержание орнитина увеличивается в 100 раз.

3.3.2. Мембраноактивные вещества и ингибиторы дыхания

Очень многие токсины, такие как фузариевая кислота (*F. oxysporum*), токсины бактерий из рода *Clavibacter*, токсины многих патогенов *P. syringae* (коронатин, сирингомисины), токсины фитопатогенных грибов из родов *Rhizosporium*, *Cephalosporium*, *Fusicoccus*, *Cercospora*, *Phoma* и др. обладают сильным мембранотропным эффектом. Они индуцируют потерю метаболитов из клеток и некрозы, влияют на трансмембранный перенос ионов и открывают устьица, вызывая увядание растений.

Токсин возбудителя ранней пятнистости листьев картофеля *Alternaria solani* *альтернариевая кислота* вызывает деполаризацию мембран и подавляет реакцию сверхчувствительности клубней устойчивых к фитофторозу сортов картофеля в ответ на заражение *Phytophthora infestans*.

Тенотоксин — токсин гриба *Alternaria alternata* — циклический тетрапептид, вызывающий хлороз вследствие связывания с сопрягающим фактором (CF1) и ингибирования фотосинтетического фосфорилирования.

Паразит злаков *Rhynchosporium secalis* экскретирует *in planta* три белка — NIP1, NIP2 и NIP3 (necrosis inducing proteins), — которые вызывают образование некрозов вследствие стимуляции H^+ -зависимой АТФазы плазмалеммы. Мутация, приводящая к замене одной аминокислоты в этом белке, снижает патогенность гриба.

3.3.3. Генераторы активных форм кислорода

Некоторые фитопатогенные грибы из родов *Cercospora*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Elsinoe*, *Hypocrella* образуют циклические соединения (рис. 3.2), для проявления токсичности которых в отношении растений-хозяев требуется свет, т.е. они относятся к группе веществ — фотосенсибилизаторов. В результате абсорбции энергии света фотосенсибилизаторы конвертируются в энергетически активное состояние и приобретают способность при взаимодействии с молекулярным кислородом генерировать его активные формы — радикалы: супероксид (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (ОН) и не радикал синглетный кислород (1O_2). Все они обладают высокой токсичностью и вызывают повреждения в клетках растений. У *Cercospora nicotianae* обнаружен ген *CRQ1*, кодирующий белок, который имеет ДНК-связывающий мотив Cys6Zn2, т.е. является активатором транскрипции. Мутанты по этому гену, во-первых, чувствительны к собственному токсину церкоспорину и, во-вторых, производят его на 30–55% меньше, чем штаммы дикого типа. Полагают, что белок Crq1 нужен как для активации генов синтеза церкоспорина, так и для устойчивости к продуцируемым им активным формам кислорода.

3.3.4. Ингибиторы интеграции тканей и клеток растений

Эффектор *Phytophthora infestans* *irpO* содержит мотив, обеспечивающий адгезию клеток млекопитающих, Arg-Ели-Asp-RGD (имеется у белковых лигандов и обеспечивает взаимодействие их с белком интегрином). Интегрины — семейство животных белков, которые пронизывают клеточную мембрану и, взаимодействуя с рецепторами

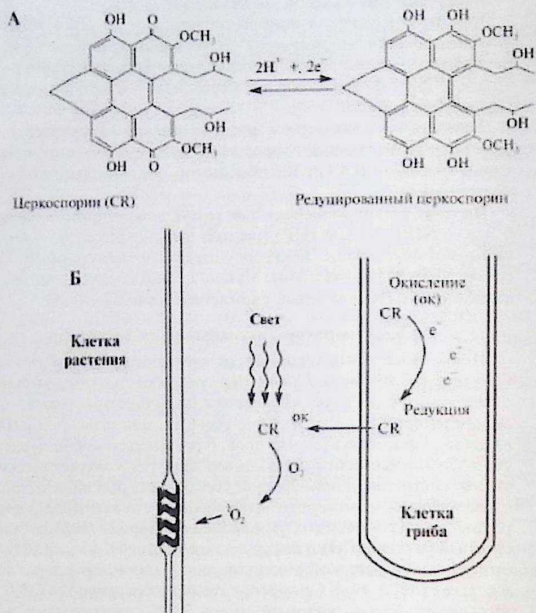


Рис. 3.2. Механизм токсичности грибных фотосенсибилизаторов: А — реакции окисления — восстановления молекулы церкоспорина под действием света; Б — генерация активных форм кислорода на свету и повреждение мембранных структур клетки растения [Daub, Ehrenschaft, 2000]

интегринов соседних клеток, обеспечивают клеточную адгезию. Поскольку цитоплазматический «хвост» молекул интегрин короткий и не подвержен энзиматическому узнаванию, они через адаптерный белок, связывающий интегрин с цитоскелотом, протеинкиназами и трансмембранными рецепторами факторов роста, осуществляют трансдукцию сигнала. Этот путь трансдукции назван интегриновым кластером. Интегрины обнаружены у грибов и оомицетов. Они необходимы для апикального роста гифы, ориентации. У *Arabidopsis* клонированы гены, гомологичные интегриновым генам млекопита-

ющих, а в цитоплазматической мембране найдены сайты, аффинные RGD-связям [Mellersh, Heath, 2001]. Лектин-рецепторная киназа мембраны — рецептор RGD — связывает интегрины, пронизывающие клеточные мембраны и объединяющие соседние клетки. RGD-мотив белка *iprO* насыщает рецепторы и, конкурируя с интегрином, вызывает распад ткани. Поскольку клеточная адгезия играет важную роль в защитных реакциях, данный механизм также является антииммунитетным.

RGD-мотив важен не только для адгезии соседних клеток, но и для интеграции важнейших клеточных структур — клеточной стенки, плазмалеммы и цитоскелета — в единый комплекс. Именно этот комплекс обеспечивает первичный ответ клетки на контакт с паразитом или его метаболитами. Патогенные организмы, которые выделяют RGD-содержащие эффекторные белки, нарушают связи клеточной стенки с мембраной (как это происходит во время плазмолиза) и тем самым ингибируют первичный иммунный ответ [Mellersh, Heath, 2001]. Однако вопрос этот не имеет однозначного ответа. Опыты с плазмолизированными клетками клубней картофеля показали, что они реагируют СВЧ-реакцией и накоплением ФА даже при совместимых взаимоотношениях с расами *Phytophthora infestans*, т.е. при отсутствии генов устойчивости хозяина и генов вирулентности паразита [Терехова, Дьяков, 1979]. Следовательно, в данном случае разрыв связей клеточной стенки с плазмалеммой, наоборот, усиливает защитный ответ.

3.3.5. Ингибиторы синтеза белка

Генетическую регуляцию синтеза низкомолекулярных вторичных метаболитов, обладающих свойствами вивотоксинов, рассмотрим на примере трихотеценовых токсинов фузариевых грибов. Эти токсины представляют интерес, во-первых, потому, что их продуценты вызывают экономически очень важные болезни пшеницы, ячменя, кукурузы, и, во-вторых, потому, что содержащие токсины растительные продукты токсичны для человека и сельскохозяйственных животных (вызывают потерю аппетита, дерматиты, анемию, геморрагический сепсис, иммуносупрессию). Эти соединения, к которым принадлежит несколько антибиотиков грибного происхождения, ингибируют синтез белка у эукариот.

Биосинтез трихотеценовых токсинов показан на рис. 3.3. Как видно, ключевой фермент, осуществляющий циклизацию фарнезилпирофосфата в триходиеп (триходиепсинтетаза) контролируется геном *Tri5*. После серии окислений, изомеризации и вторичной циклизации образуются соединения двух классов (А и В), различа-

ющихся наличием или отсутствием кето-группы при атоме С-8 трихотеценового скелета. — Т-2-токсин *Fusarium sporotrichoides* и дезоксиниваленон (ДОН) *F. graminearum*.

Молекулярные исследования биосинтеза трихотеценовых токсинов начались после того, как был очищен ключевой фермент триходиенсинтететаза и с его помощью клонирован ген *Tri5*. Было обнаружено, что космида, несущая этот ген, комплементирует мутации и по другим генам, влияющим на последующие этапы синтеза трихотеценов. Отсюда сделан вывод о сцеплении этих генов в общем кластере размером 25 тыс. пар нуклеотидов.

Кластеры для *Fusarium* обоих видов (*F. sporotrichoides* и *F. graminearum*) имеют высокую степень гомологии, фланкированы одинаковыми генами тирозиназы и полисахариддеацетилазы и содержат по крайней мере 11 генов, связанных с биогенезом трихотеценов. Среди них есть биосинтетические гены — *Tri4* (цитохром-Р450 монооксигеназа, осуществляющая гидроксилирование триходиена), *Tri3* (15-0-ацетилтрансфераза), *Tri11* (Р450 монооксигеназа, участвующая в гидроксилировании С-15) и регуляторные — *Tri6* (активатор транскрипции), *Tri12* (регулятор выхода трихотеценов из клетки). Ген *Tri7* (4-О-ацетилтрансфераза) *F. sporotrichoides* у *F. graminearum* отсутствует, а *Tri13* (белок типа Р450) находится в форме псевдогена. По-видимому, эти ферменты не необходимы в синтезе токсинов В-типа, поэтому кодирующие их гены утрачены в ходе эволюции.

Роль токсинов в патогенезе разнообразна и до конца не расшифрована. Для многих паразитов установлены выделение токсинов в зараженное растение и их миграция по растению, опережающая миграцию самих возбудителей. Поэтому такие системные симптомы болезней, как увядание и хлороз, могут быть обусловлены миграцией токсинов из точки заражения. Токсины, несомненно, — атрибут некротрофных и гембиотрофных паразитов, которые на всех или на отдельных стадиях паразитического цикла оккупируют только предварительно убитые клетки.

Значение токсинов в патогенезе показано с помощью мутантов, лишенных способности их продуцировать (tox-). У фитопатогенных бактерий получены нетоксигенные штаммы с помощью транспозонного мутагенеза. Как правило, такие мутанты вызывают более слабые симптомы болезни и накапливаются в зараженных растениях в значительно меньшей концентрации. В частности, мутанты *Pseudomonas syringae*, не продуцирующие токсин коронатин, оказались непатогенными к *Arabidopsis*. Выяснилось, что они неспособны преодолеть один из механизмов естественного иммунитета — за-

крывание устьиц в ответ на рецепцию МАМs (см. гл. 2). Бактериальный вивотоксин коронатин имеет структурное сходство с ЖАК и индуцирует сигнальный путь по ЖАК-пути. Сигнал на закрытие устьиц передается по АБК- (абсцизовая кислота) сигнальному пути, который интерферирует с ЖАК-путем, вследствие чего устьица открываются. Однако степень снижения патогенности непатогенных штаммов для разных паразитов неодинакова. Показано, например, что патогенность бестоксигенных мутантов *Alternaria brasicaicola* снизилась лишь немного — на 10% [Cho, 2015].

У возбудителя голландской болезни ильмов *Ophiostoma ulmi* штаммы, не продуцирующие цератоульмин, не только не патогенны, но характеризуются измененными морфолого-культуральными признаками и медленно растут *in vitro*. Влияние токсина на морфогенез продуцента обусловлен тем, что цератоульмин относится к семейству гидрофобинов — гидрофобных белков, имеющих морфогенетические функции. А токсичность цератоульмина является следствием его способности к полимеризации, после чего он приобретает свойства высокотоксичных амилоидных белков — прионов.

Хотя вивотоксины неспецифичны, у многих фитопатогенов вивотоксины имеют узкоспецифичные сайты действия (определенные ферменты); данная неспецифичность вызвана тем, что эти сайты есть у большинства растений и часто они являются ключевыми в метаболизме растений. Некоторые токсины (например, цератоульмин) бифункциональны и наряду с токсическим для растения действием несут иные функции, которые, возможно, первичны.

3.4. ПАТОТОКСИНЫ

В отличие от неспецифических вивотоксинов патотоксины повреждают только растения определенных видов или даже сортов. Некоторые из них являются первичными факторами патогенности (без токсина организм не способен быть паразитом) и получили название «токсины, специфичные для хозяев», другие, как и вивотоксины, представляют собой вторичные факторы, усиливающие патогенность для определенных видов или сортов растений (токсины, селективные для хозяев). Объединяющим эти группы соединений названием служит термин «патотоксины». Большинство продуцентов патотоксинов принадлежат к темноокрашенным гифомицетам из родов *Bipolaris* (телеоморфа *Cochliobolus*), *Alternaria*, хотя есть и бактериальные продуценты.

Для всех исследованных в настоящее время патотоксинов характерны очень низкие токсические концентрации по отношению

к восприимчивым растениям и высокая селективность (отношение минимальных действующих концентраций для устойчивого и восприимчивого сортов) (табл. 3.1). Часто один ген растения может сделать его высоковосприимчивым к грибу — продуценту токсина. Например, ген *Pc-2* придает устойчивость к корончатой ржавчине у сорта овса Виктория, что сделало этот сорт чрезвычайно чувствительным к заражению *Cochliobolus victoriae*. Также митохондриальный Т-ген у сортов кукурузы, обеспечивающий стерильность пыльцы и используемый для получения высокопродуктивных гетерозисных гибридов, привел к массовой гибели этих сортов от южного гельминтоспориоза.

Таблица 3.1

Патотоксины некоторых фитопатогенных грибов

Гриб	Хозяин	Токсин	Летальная доза для чувствительного сорта	Селективность
<i>Cochliobolus victoriae</i>	Овес	Викторин (HV-токсин)	0,3 нг/мл	$>10^6$
<i>C. carbonum</i>	Кукуруза	НС-токсин	0,5 мкг/мл	10^1
<i>Bipolaris sacchari</i>	Сахарный тростник	НС-токсин	30 нг/мл	>10
<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>citri</i>	Тангарин	АС-токсин	30 нг/мл	10^4
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>kekuchiana</i>	Груша	АК-токсин	10 нг/мл	$>10^4$
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>mali</i>	Яблоня	АМ-токсин	2 нг/мл (нанесение на листья) 0,1 нг/мл (погружение черешков)	10^6 10^5

3.4.1. Химический состав

По химическому составу патотоксины объединяют в несколько групп.

Циклические пептиды. Это пептиды, в которых аминокислоты соединены нематричным синтезом. Таковы викторин *Cochliobolus victoriae*, НС-токсин *C. carbonum*, АМ-токсин *Alternaria alternata* f. sp. *mali* (рис. 3.4). Все они содержат наряду с тривиальными аминокислотами также и необычные. Так, группа пентациклических пептидов (викторины *a*, *b*, *c*) содержат 5,5-дихлорлейцин-трео-β-оксилизин,

эритро- β -оксилейцин, α -амино- β -хлорарилловую кислоту. Специфичность рецепции, по-видимому, связана с остатком глиоксиловой кислоты.

Тетрапептид НС-токсин наряду с молекулой пролина и двумя молекулами аланина содержит 2-амино-8-оксо-9,10-эпоксидекановую кислоту (рис. 3.4), которая, по-видимому, определяет токсичность пептида, ибо разрыв эпоксидного кольца приводит к потере токсичности. Сходную с НС-токсином структуру имеет ингибитор деацетилирования гистонов *трапоксин*, поэтому полагают, что аналогичное действие на гистоны НС-токсина приводит к подавлению экспрессии иммунного ответа. В геноме токсигенных штаммов *S. carboxim* клонирована область, в которой находится ген, контро-

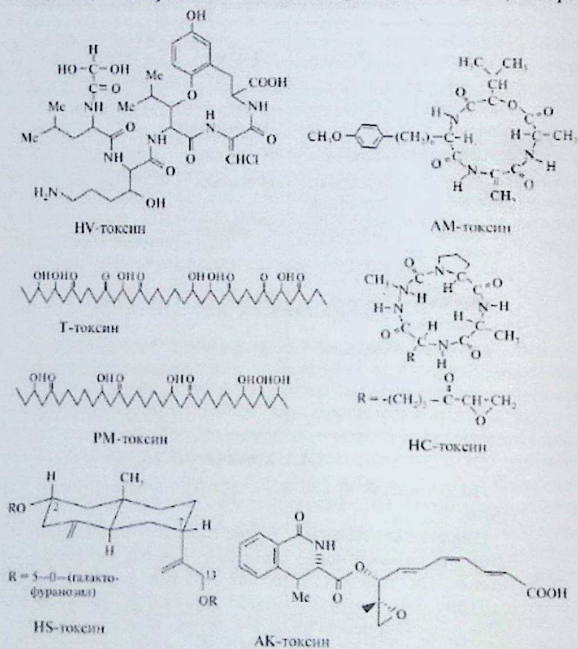


Рис. 3.4. Патотоксины фитопатогенных грибов

лирующий синтез (соединения и циклизации аминокислот) токсина фермента (HC-toxin synthase) — *HTS-1*. Для синтеза и трансмембранного переноса HC-токсина необходим также сложный локус *Tox2*, включающий гены *TOXA* (кодирует утечку метаболитов под влиянием HC-токсина), *TOXC* (кодирует синтетазу жирных кислот); *TOXF* (кодирует аминотрансферазу, управляющую разветвлением боковых цепей аминокислот); *TOXE* (регуляторный белок).

AM-токсин представлен двумя формами, обладающими разной токсичностью, и имеет вид циклического тетрапептида, содержащего *L*-аланин, дегидроаланин, изоформы *L*-аминовалериановой кислоты, замкнутые в кольцо лактонной связью и соединенные с *p*-метоксифенильной группой (рис. 3.4). Циклизацию аминокислот осуществляет фермент синтетазы циклических пептидов (циклаза), контролируемый геном *AMT*.

Линейные поликетолы (рис. 3.4). Эти соединения образуют два гриба — *T*-раса возбудителя южного гельминтоспориоза *Cochliobolus heterostrophus* (*T*-токсин) и *Phyllosticta (Mycosphaerella) maydis* (PM-токсин), специфически патогенные для кукурузы с техасским типом цитоплазматической мужской стерильности (*T*-цмс). Несколько гомологичных *T*-токсинов различаются длиной цепи (от 39 до 41 атомов углерода). Синтез *T*-токсина находится под контролем нескольких генов. Ген *FKSI (ToxIA)* ответственен за синтез фермента поликетидсинтетазы, который строит поликетидную цепочку, а ген *DEC1 (ToxIB)* — за синтез декарбоксилазы, удаляющей терминальные карбоксилы. Эти гены находятся на разных хромосомах. PM-токсины имеют более короткие цепи (33–35 атомов углерода). Для проявления токсичности важны общая длина цепи и наличие не менее трех окисленных групп (кластеры =O–OH=O).

Гликозидная структура. Такую структуру имеют HS-токсины возбудителя глазковой пятнистости сахарного тростника *Bipolaris sacchari* — β -галактофуранозиды, у которых две молекулы галактозы соединены гликозидными связями с сесквитерпеновым агликоном. Отщепление сахаров от агликона снимает токсичность, но не снимает способности защищать ткани от повреждения нативным токсином. Следовательно, сесквитерпеновая часть молекулы ответственна за токсичность, а галактофуранозидная — за связывание рецептором (специфичность).

Токсины *Alternaria alternata* f. *kekuchiana* (AK), *A. alternata* f. *fragariae* (AF) и *A. alternata* f. *citri* (AC) представляют собой замещенные продукты 9-метилдекатриеновой кислоты (рис. 3.4). Сходство строения обуславливает перекрестную патогенность — все три токсина, как и их продуценты, вызывают некрозы на листьях

груши. У *A. alternata* f. *kekuchiana* методом REMI (restriction enzyme-mediated integration) обнаружено 15 генов, связанных с токсинообразованием. Один из них (AKTS1) уникален для паразита груши, а остальные присутствуют также в геномах *A. alternata* f. *fragaria* и *A. alternata* f. *citri*. По-видимому, общие гены участвуют в синтезе общего предшественника трех токсинов.

Сфинголипидная структура. Характерна для патотоксинов *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* и *Fusarium moniliforme* (рис. 3.5). Являясь структурными аналогами сфингана, они ингибируют синтез церамида (соединение двух молекул сфингана ферментом церамидсинтетазой). Церамид, в свою очередь, необходим для фосфорилирования ретинобластомы — регулятора клеточного цикла (перехода стадии G1 в стадию S) и апоптоза. Гибель протопластов (апоптоз) томата и *Arabidopsis*, вызванная фумонизином, происходит при участии сигнальных путей, идущих с участием жасмоновой и салициловой кислот. В зараженных растениях сфинголипидные токсины подавляют защитные реакции, ингибируют транспорт сахаров, вызывают неопластический рост и некрозы. Кормление сельскохозяйственных животных кукурузой, зараженной продуцентом фумонизина *F. moniliforme*, вызывает тяжелые, часто летальные отравления, сопровождающиеся гепатокенкозами, различными формами неопластозов, гибелью клеток.

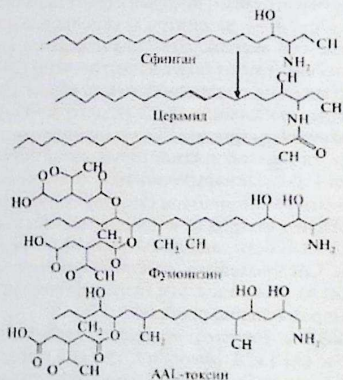


Рис. 3.5. Синтез церамида (вверху) и его ингибиторы токсины фумонизин (продуцент *Fusarium moniliforme*) и AAL-токсин (продуцент *Alternaria alternata* *lycopersici*)

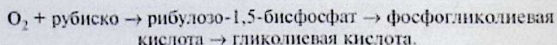
Некрогенные пептиды. Паразиты злаков *Stagonospora nodorum* и *Pyrenophora tritici-repentis* продуцируют хозяиноспецифичные токсины SnTox1 и PtToxA, которые узнаются рецепторами хозяев. Первый взаимодействует с продуктом гена восприимчивости пшеницы *Snn1*, второй — с белком *Tsn1* (по-видимому, разные названия одного локуса). Белок PtToxA молекулярной массой 132 кДа взаимодействует с сайтом хлоропластов (ТОХАВР1). Этот белок имеет гомологию с сайтом связывания фосфатидилинозита, который есть в животном белке, участвующем в эндозитозе.

3.4.2. Механизмы специфичности и токсичности

Низкая летальная доза и высокая селективность указывают на рецепторный механизм специфичности (устойчивые растения не имеют сайта связывания токсина). Первые симптомы, наблюдаемые уже через несколько минут после обработки клеток чувствительных растений токсинами, выражаются в утечке метаболитов и электролитов, деполяризации мембранного потенциала, инвагинации мембран. Поэтому считают, что рецепторы патотоксинов расположены на мембранах. АК-, HS-, AF-, АСТ-токсины связываются с цитоплазматической мембраной, Т-, РМ-, АСР-токсины — с мембраной митохондрий, АМ-токсин — с плазмалеммой и мембраной хлоропластов. Для поиска рецепторов культуру гриба выращивают на среде, содержащей радиоактивно меченную соль, и по радиоактивной метке определяют фракцию мембран, с которой связался токсин. Для установления специфичности рецепции необходимо соблюдение нескольких условий: 1) связывание должно быть генетически специфичным (с фракцией чувствительного, но не устойчивого сорта); 2) оно должно коррелировать с биологической активностью (химические модификации токсина, снижающие токсичность, уменьшают и аффинность связывания); 3) связывание должно быть лигандоспецифичным (немеченый токсин защищает от связывания с меченым). Для некоторых токсинов эти условия были соблюдены, выделены растительные сайты связывания и исследованы механизмы токсичности.

Меченный ^{125}I викторин связывается с двумя белками овса: молекулярной массой 100 кДа (Р-компонент) и молекулярной массой 15 кДа (Н-компонент). Соединение с первым рецептором происходит только *in planta* и в комбинации с мембранными фракциями чувствительного сорта, со вторым — как в чувствительном, так и в устойчивом сортах, *in planta* и *in vitro*. Функционально оба белка представляют собой формы фермента *глициндекарбоксилазы* — продукта, образующегося при фотодыхании с участием рибулозобисфосфат-

кокарбоксилазы (рубиско). При недостатке кислорода рубиско является ключевым ферментом фотосинтеза, выполняя роль карбоксилазы, но при избытке кислорода он участвует в фотодыхании, как оксидаза:



Последняя поступает в пероксисомы, где окисляется пероксидазой до глиоксидовой кислоты, которая конвертируется в глицин. В митохондриях глицин декарбоксилируется глициндекарбоксилазой и ацетируется сериноксиометилтрансферазой до CO_2 , NH_3 , NAD^+ и серина. Это — очень важный цикл в функционировании растительных клеток, ибо мутации по гену глициндекарбоксилазы, как правило, летальны. У человека мутации этого гена вызывают тяжелое заболевание — гиперглицинемию. Собственно ферментом является Р-белок, но в присутствии Н-белка его активность увеличивается в 10 000 раз.

Побочным эффектом связывания викторина с глициндекарбоксилазой является индукция специфических протеолитических разрывов большой субъединицы рубиско, которая кодируется хлоропластным геномом, и потеря хлорофилла.

Т- и РМ-токсины вызывают повреждение мембран митохондрий кукурузы, имеющей цитоплазматическую мужскую стерильность (цмс) техасского типа. В результате их воздействий на митохондрии происходит потеря Ca^{2+} и NAD^+ , разобщение окислительного фосфорилирования. Во внутренней мембране Т-митохондрий имеется белок молекулярной массой 13 кДа (Ugf13), отсутствующий в нормальных митохондриях. Он ответственен за мужскую стерильность и чувствительность к токсинам. По-видимому, при соединении с токсином белок Ugf13 полимеризуется и образует трансмембранные каналы, через которые происходит утечка электролитов. Ген, контролирующий синтез этого белка (Т-ugf13), был клонирован и перенесен в модельные про- и эукариоты (кишечную палочку, дрожжи, дрозофилу, табак). Все трансгенные объекты стали чувствительными к Т-токсину.

НС-токсин — структурный аналог *трапоксина*, который ингибирует фермент диацетилазу гистонов (HDAC). Такое же действие оказывает и НС-токсин в тканях растений, дрожжей, беспозвоночных и позвоночных животных. Какими путями ингибирование HDAC приводит к подавлению защитных реакций, не ясно, показано, однако, что этот фермент полифункционален и способен деацетилировать не только гистоны, но и другие функционально важные белки

(факторы активации транскрипции, тубулины) и выступать в качестве позитивных регуляторов транскрипции.

Устойчивость растений к патотоксинам обусловлена главным образом отсутствием рецепции. Однако известны случаи, когда устойчивость связана с деградацией токсина в растении. Так, устойчивые к *S. carbonum* сорта кукурузы образуют фермент HC-токсинредуктазу, разрушающий HC-токсин.

3.4.3. Биологическая роль патотоксинов и экология продуцентов

Патотоксины многих грибов являются первичными детерминантами их патогенных свойств. Это показано многими опытами. Например, после нанесения на лист овса сорта Виктория капли раствора викторина обработанный лист становится восприимчивым к заражению не только различными фитопатогенными грибами, но даже условно патогенными видами. Аскоспоровое потомство гибридов между штаммами *Cochliobolus victoriae* и *S. carbonum* расщеплялось на четыре класса: патогенные для овса, патогенные для кукурузы, патогенные для обеих культур и непатогенные, причем штаммы, относящиеся к первому классу, продуцировали викторин, ко второму — HC-токсин, к третьему — оба токсина, а к четвертому — токсинов не образовывали. Таким образом, патотоксины полностью парализуют защитный потенциал растительных клеток, делают их беззащитными против нападения. Супрессия патотоксинами защитных реакций зараженного растения показана прямыми опытами. Так, в листьях лимона, инфицированного непатогенным штаммом *Alternaria alternata*, индуцируется синтез липооксигеназы (ген *RlemLOX*), халконсинтазы, типерпероксидазы (*RlemHPL*), алленоксидосинтазы, ингибитора полигалактуроназы (*RlemPGIP*) и хитиназы (*RlemAchi*). При заражении штаммами, продуцирующими ACR-токсин, экспрессии перечисленных генов не наблюдали.

Грибы — продуценты патотоксинов, вызвали несколько жестоких эпифитотий сельскохозяйственных культур. Однако причина этих эпифитотий — селекционная деятельность человека, выражающаяся в придании растениям таких противоестественных свойств, как, например, мужская стерильность. В природных фитоценозах эти грибы не накапливаются и не имеют эпидемиологического потенциала вследствие двух обстоятельств:

- продуценты патотоксинов высокопатогенны, часто детально для восприимчивых растений. Поскольку мутации, приводящие к устойчивости (потере или изменению структуры рецептора), возникают часто, а давление отбора очень высокое, появление

- подобного паразита в растительной популяции быстро приведет к отмиранию чувствительных особей и накоплению устойчивых; штаммы — продуценты патотоксинов имеют пониженную приспособленность и выдерживают конкуренции с лишними токсина мутантами того же вида только при наличии восприимчивых растений. Если устранить таковые из популяций, концентрация токсигенных штаммов быстро падает. Так случилось с грибом *Cochliobolus victoriae* после прекращения выращивания овса сорта Виктория и его потомков и с расой *T. C. heterostrophus* после снятия с производства гибридов кукурузы, имеющих Т-цитоплазму. У некоторых грибов отбор против токсигенных штаммов настолько высок, что даже на восприимчивых культурах они встречаются очень редко. Так, в садах, где выращивали восприимчивые к *Alternaria alternata* f. *kekuchiana* сорта груши, из 510 изолированных штаммов *A. alternata* только 11 (2%) продуцировали токсин, а в популяциях гриба, изолированных из листьев резистентных сортов, доля таких штаммов составляла 0,1%. Среди штаммов *Periconia circinata*, изолированных в посевах чувствительных сортов сорго, только 25% продуцировали токсин, причем в корнях сорго токсигенных штаммов было гораздо больше, чем в почве (34 против 13%). Снижение приспособленности токсигенных штаммов по сравнению с нетоксигенными, возможно, вызвано высокими энергетическими затратами на синтез токсина (в мицелии Т-расы *C. heterostrophus* содержание токсина достигает 3% сухой массы) или сцеплением с летальными генами (область гена *Tox1* того же гриба сцеплена с реципрокной транслокацией).

3.5. СУПРЕССОРЫ ИМПЕДИНЫ

В противоположность токсинам некротрофных патогенов, которые разрушают растительную ткань, молекулы супрессоров лишь предотвращают проявление устойчивости, позволяя патогенам проникать в растение и существовать в нем. Такие нетоксичные вещества по предложению японских исследователей [Ouchi, Oku, 1981] были названы *импединами* (в медицине этим термином обозначали нетоксичные вещества бактериального происхождения, способные подавлять противомикробные механизмы защиты), или *супрессинами*.

Благодаря действию импединов, предварительное заражение патогенным грибом делает растение доступным для последующего инфицирования авирулентной расой того же гриба или даже непатогеном. Подобный тип предрасположенности был изучен на широком

наборе мучнисторосяных грибов. Было обнаружено, что 45 изолятов патогенов из 51 оказались способными инфицировать листья ячменя, не являющегося для них хозяином, если листья предварительно были заражены совместимой расой патогена ячменя *Blumeria (Erysiphe) graminis* f. sp. *hordei*. Этот эффект не ограничивался клетками, содержащими гаустории, но распространялся с помощью диффузии на соседние окружающие клетки. Действующее вещество было изолировано из апопластного пространства пораженных клеток и оказалось низкомолекулярным.

Нетоксичные эффекторы данной группы прерывают на том или ином этапе каскад сигнальной трансдукции. Супрессины А и В паразита гороха *Mycosphaerella pinodes* — гликопептиды, активной частью которых является белок. В листьях гороха, обработанных смесью неспецифического элиситора и супрессора *Mycosphaerella pinodes*, отмечена задержка экспрессии мРНК фенилаланинаммонийлиазы (ФАЛ) и халконсинтетазы по сравнению с листьями, обработанными только элиситором [Yamada et al., 1989]. Это свидетельствует о действии супрессора в претрансляционной стадии ответной реакции на заражение. Супрессор паразита свеклы *Cercospora beticola* (абсизовая кислота) также супрессирует синтез и активность ФАЛ и 4-гидролазы коричной кислоты.

Супрессором вирулентных для данного сорта картофеля рас *Phytophthora infestans* является специфический β -1,3, β -1,6-глюкан. Его нанесение на поверхность среза клубней картофеля усиливало патогенность не только оомицета-продуцента, но и других фитопатогенных грибов, даже не способных поражать картофель (табл. 3.2).

Интересно отметить, что, во-первых, выделенные одинаковым способом фракции глюкана из разных рас одного паразита влияют на восприимчивость противоположным образом, и, во-вторых, если супрессия неспецифична (достоверно повышается восприимчивость к различным патогенам), то индукция специфична, так как достоверное снижение поражаемости наблюдается только в отношении паразитов картофеля, а для паразитов других растений снижение очень слабое или даже не наблюдается вовсе.

Активные супрессоры белковой природы, названные ЕСП1 и ЕСП2, были получены из апопластной жидкости листьев томата, зараженных возбудителем оливковой плесени томата несовершенным грибом *Cladosporium fulvum*. Интересно, что ген *ecp1* гомологичен гену рецептора фактора некроза опухолей млекопитающих (*TNFR*). Потеря этих белков вследствие инактивации кодирующих генов приводила к сильному снижению агрессивности [Honee et al., 1994].

Число отмерших клеток картофеля, зараженного разными грибами, после предварительной обработки β -1,3, β -1,6-глюканами совместимой (вирулентной) и несовместимой (авирулентной) рас *Phytophthora infestans* (в процентах к обработке водой) [Васюкова и др., 1985]

Гриб	Число отмерших клеток (% от обработки водой) после обработки глюканами	
	совместимой расы	несовместимой расы
<i>Phytophthora infestans</i>	224	73
<i>Colletotrichum lindemutianum</i>	225	117
<i>Fusarium culmorum</i>	138	61
<i>Helminthosporium solani</i>	157	43
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	120	70
<i>Botrytis cinerea</i>	270	118
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	155	95
<i>Pyricularia oryzae</i>	192	89
<i>Alternaria alternata</i>	154	92

Активной составляющей супрессора из межклеточного пространства зараженных листьев пшеницы, также как и жидкости, в которой прорастали уредоспоры *Puccinia graminis*, было низкомолекулярное соединение молекулярной массой менее 5 кДа.

Интересно действие *коронатина* — метаболита многих патогенов *Pseudomonas syringae*, в частности возбудителя ожога листьев овса *P. syringae* pv. *coronafaciens*. Он вызывает пожелтение листьев табака, ингибирует рост корней пшеницы, повышает активность амилазы и гипертрофию клубней картофеля. По своей структуре коронатин схож с растительным гормоном жасмоновой кислотой, перепродукция которой вызывает сходные симптомы у растений. Вероятно, коронатин замещает жасмоновую кислоту и ингибирует трансдукцию сигнала по пути, регулируемому жасмонатом.

Некоторые секретируемые эффекторы прерывают сигнальную индукцию еще более оригинальным способом. Например, возбудитель пузырчатой головни кукурузы *Ustilago maydis* секретирует в клетки кукурузы эффектор *smi1* — фермент хоризматмутазу, которая катализирует первый шаг в синтезе ароматических аминокислот — конверсию хоризмовой кислоты в префеновую (у незараженных растений этот процесс осуществляется в хлоропластах). В цитоплазме растений *smi1* димеризуется ферментом *ZmCm2*

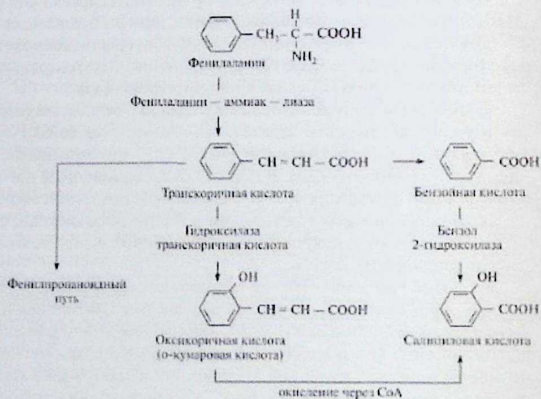
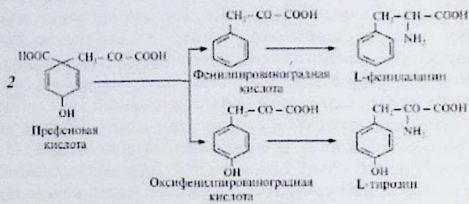


Рис. 3.6. Этапы биосинтеза салициловой кислоты

продуцируемая мицелием, убивает клетки, что проявляется в виде черных пятен вдоль жилок, появляющихся через 11–12 ч после заражения. Таким образом, биологические концентрации токсинов, «используемые» грибами для заражения, как раз достаточны для подавления защитного потенциала клеток, но не являются летальными, т.е. продуценты патотоксинов взаимодействуют с растением как гембиотрофы — развиваются биотрофно на первых этапах инфекционного процесса и некротрофно на последующих этапах.

А хозяиноспецифичный токсин паразита банана *Mycosphaerella fijiensis*-2,4,8-триокситетралон в устойчивом сорте банана индуцировал реакцию СВЧ и синтез фитоалексинов, а в восприимчивом он синтезируется грибом позже, когда уже установились взаимоотношения совместимости и произошла замена биотрофной фазы на некротрофную [Sagi, 2003]. Таким образом, если токсин образуется рано, он является фактором, индуцирующим устойчивость, а если поздно, то становится фактором вирулентности, причем время его индукции может регулироваться геномом устойчивого хозяина.

Эффекторы ATR1 и ATR13 *Hyaloperonospora parasitica* обеспечивают высокий титр размножения (в 30 раз больший, чем в их отсутствии) псевдомонад, снижают в 100 раз отложение каллезы и продукцию АФК, как базального защитного эффекта [Ellis et al., 2009; Tiller, 2009].

Возбудитель пузырчатой головни кукурузы, биотроф *Ustilago maydis*, после заражения кукурузы пробивает клетку хозяина, но не мембрану, и проходит в мембранном мешке до противоположной стенки. В это время экспрессируется эффектор Per1, который секретируется в межмембранный интерфейс и ингибирует гибель зараженной клетки, обеспечивая биотрофное питание. Делеционные по Per1 мутанты пробивают клеточную стенку, но не могут проходить клетку, которая реагирует на присутствие паразита апоптогической гибелью. Такое же действие показано при заражении ячменя мучнистой росой. Соседние с зараженной клетки эпидермиса и мезофила гибнут вследствие СВЧ-реакции, а клетка с гаусторией остается живой.

Эти факты имеют огромное эпидемиологическое значение, ибо объясняют многие явления, давно наблюдаемые фитопатологами, а также могут быть использованы в защите растений от болезней.

1. Развитие некротрофов на листьях, зараженных биотрофными паразитам. Например, гриб *Colletotrichum dematium* вызывает антракноз шпинатов в штате Арканзас (США). Болезнь распространяется вслед за поражением белой ржавчиной, которую вызывает биотрофный оомицет *Albugo occidentalis*. Фузариевые грибы распростра-

няются по листьям льна, зараженным ржавчиной, и листьям пшеницы, зараженным мучнистой росой.

2. *Смешанная инфекция клубней картофеля*. Клубни, зараженные фитофторозом, обычно гнивают не от первичной инфекции, а вследствие ингибирования иммунного ответа на повторное заражение некротрофными бактериями и грибами.

3. *В опытах с двойной инокуляцией* показано, что клетки, зараженные вирулентной расой, не гибнут от повторного заражения авирулентной расой.

3.6. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭФФЕКТОРНЫХ ГЕНОВ В ГЕНОМАХ ГРИБОВ И МЕХАНИЗМЫ ИХ ПРИОБРЕТЕНИЯ

Гены, контролирующие синтез эффекторов, распределены в хромосомах грибов не случайно. Описаны несколько наиболее распространенных случаев их организации [Raffaele, Kamoun, 2012]:

- кластеры генов: разбросанные генные области (gene-sparse regions, транспозонные островки, островки патогенности). Группы корегуляторных генов, кодирующих секреторные белки. У *Ustilago maydis* на хромосоме 19A — группы из 3–26 генов, перемежающихся с ретротранспозонами. А островки патогенности фитофторовых оомицетов представляют собой 10–100 участков длиной 10–1000 тыс. пар нуклеотидов. Эффекторный ген *PiAvr4* *P. infestans* в области протяженностью 100 тыс. пар нуклеотидов имеет гомологию с геномными областями *P. sojae* и *P. ramorum*;
- изохорные области: участки, содержащие около 300 генов, обогащенные парами Г+Ц. У *Leptosphaeria maculans* 10 областей длиной 10–350 тыс. пар нуклеотидов кодируют мелкие секретлируемые белки — вероятные эффекторы;
- субтеломерные области: эффекторный ген часто расположен вблизи теломер. Ген *AvrPita* *Magnaporthe oryzae* локализован в нестабильной области вблизи теломерных повторов на хромосоме 6;
- диспензабельные (необязательные, CDC) хромосомы. В геноме многих грибов обнаружены мелкие (часто не превышающие 1 млн пар нуклеотидов) хромосомы. Поскольку эти хромосомы нестабильны в процессе мейоза, они инертны и не несут информации, необходимой для жизнедеятельности гриба. Однако у некоторых грибов на CDC-хромосомах локализованы кластеры генов, обуславливающих патогенность. Так, у *Nectria haematococca* (анаморфа *Fusarium solani* f. sp. *pisii*) на CDC-хромосоме размером 1,6 млн пар нуклеотидов обнаружен кластер, включающий три

гена патогенности к гороху (*Pep1*, *Pep2* и *Pep6*) и два гена (*Pda6* и *Mak1*), контролирующие синтез ферментов, которые деградируют фитоалексины гороха пизатин и медикарпин. Гены, участвующие в синтезе патотоксинов у различных патогенов *Alternaria alternata*, также кластеризованы и находятся на CDC-хромосомах размером 0,39–0,77 млн пар нуклеотидов. В геноме *Fusarium oxysporum* обнаружены четыре CDC-хромосомы, отсутствующие у *F. verticilloides*. Одна из них обогащена эффекторами (*SIX*).

Описанная выше организация свидетельствует о важной роли горизонтального переноса (ГП) генов в миграции факторов устойчивости в популяциях фитопатогенных грибов [обзор: van der Does, Rep, 2007]. В отличие от вертикальной передачи через мейоз при половом процессе или митоз при бесполом, ГП между вегетативными клетками более характерен для прокариот, однако осуществляется и у грибов. Возможны несколько способов ГП.

1. *Перенос отдельных генов.* В 1941 г. были обнаружены штаммы гриба *Pyrenophora tritici-repentis*, вызывающие сильное поражение пшеницы. У этих штаммов выделен токсин белковой природы и охарактеризован кодирующий ген *ToxA*. При исследовании генома другого паразита пшеницы, *Phaeosphaeria* (syn. *Septoria*) *nodorum*, обнаружена гомологичная последовательность, также контролирующая производство аналогичного токсина. Поскольку оба гриба вызывают сходные симптомы поражения листьев пшеницы, был сделан вывод о едином происхождении гена токсинообразования. Высокое сходство охватывало область ДНК протяженностью 11 тыс. пар нуклеотидов, которая включает кроме гена *ToxA* ген, аналогичный транспозазам. Эти данные заставили рассматривать ГП в качестве механизма встречаемости аналогичных генов у разных патогенов пшеницы. Поскольку патогенные штаммы *Phaeosphaeria* обнаружены гораздо раньше, чем штаммы *Pyrenophora*, и варибельность *ToxA*-области у природных штаммов *Phaeosphaeria* значительно выше, чем у *Pyrenophora*, был сделан вывод о приобретении вторым грибом гена токсинообразования у первого [Egiesen et al., 2006].

2. *Перенос генных кластеров.* Выше было сказано, что у многих грибов эффекторный ген кластеризован и образует «островки патогенности», в которых структурные гены фланкированы транспозонами или перемежаются с ними. Благодаря такой организации группы необходимых для патогенности генов могут быть вырезаны из генома, перенесены и вставлены в другой геном. Три гена вирулентности *Nectria hematococca* *PEP1*, *PEP2* и *PEP5* плюс ген фермента пизатиндеметилазы *PDA6* локализованы внутри геномной области размером 25 тыс. пар нуклеотидов вместе с четырьмя открытыми

рамками считывания, имеющими гомологию с транспозонами грибов, в частности транспозазой *FotI* [Han et al., 2001]. По проценту пар ДНК Г+Ц этот кластер отличается от остальных областей генома. Все эти данные свидетельствуют в пользу ГП кластера генов, необходимых для паразитирования в горохе.

3. *Перенос целых хромосом.* Гены патотипов *Alternaria alternata* клас-теризованы и расположены на мелких CDC-хромосомах [Akai et al., 2009; Natta et al., 2002]. Собранные в различных районах мира штаммы, патогенные для томата, различались по геномной структуре, но имели идентичные гены, кодирующие токсины. Потеря CDC-хромосомы приводила к лишению патогенности к томату, но не влияла на выживаемость в сапротрофной фазе. С помощью слияния протопластов авторы осуществили гибридизацию «томатного» и «земляничного» штаммов. Гибриды оказались патогенными для растений обоих видов, так как продуцировали оба патотоксина, хотя генетическую основу гибрида составили хромосомы земляничного патотипа, который лишь приобрел CDC из томата. Все это свидетельствует о ГП, как основном механизме передачи Tox-генов. Грибы рода *Alternaria* утратили половой процесс и размножаются кло-нально, вследствие чего могут в поколениях сохранять стабильный кариотип, включая CDC-хромосомы. Выше было сказано, что токсигенные штаммы *Alternaria* имеют пониженную конкурентоспособность в сапротрофной фазе жизненного цикла. Частые и быстрые процессы потери и приобретения Tox-генов с помощью ГП обеспечивают быструю смену высокоприспособленных штаммов при смене условий жизни.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое эффекторы?
2. Какие соединения паразитов называют вишотоксинами и патотоксинами? Каковы их различия в химической структуре, механизмах действия на растения и какова их экологическая роль?
3. Что такое супрессоры-импедины? Охарактеризуйте их роль в патогенезе.

Цитированная литература

- Абилев Г.А. Взаимодействие врожденного и приобретенного иммунитета в защите организма от инфекции [Текст] / Г.А. Абилев // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 2. — С. 53–58.
- Васюкова И.И. Специфическая иммуносупрессия паразитизма β -1,3, β -1,6 глюкозаминов [Текст] / И.И. Васюкова, Т.Е. Медведева, Г.И. Чаленко, О.Л. Озерецковская // Докл. АН СССР. — 1985. — 283. — С. 502–505.
- Доккинз Р. Расширенный фенотип [Текст] / Р. Доккинз. — М.: АСТ, 2014.

Терехова В.А. Влияние плазмализирующих растворов на взаимоотношения клубней картофеля и *Phytophthora infestans* [Текст] / В.А. Терехова, Ю.Т. Дьяков // Вестник МГУ. — 1979. — Сер. 16. Биология. — № 3. — С. 25–31.

Akagi Y., Akamatsu H., Otani H., Kodama M. Horizontal Chromosome Transfer, a Mechanism for the Evolution and Differentiation of a Plant-Pathogenic Fungus // *Eukaryot Cell*. 2009. 8: 1732–1738.

Burki F., Shalhian-Tabrizi K., Minde M., et al. Phylogenomics reshuffles the eukaryotes supergroups. *PLOS One*. 2007. 268. e790.

Chop Y. How the necrotrophic fungus *Alternaria brassicola* kills plant cells remains an enigma // *Eukaryot. Cell*. 2015. 14: 335–344.

Daub M.E., Ehrenshajt M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2000. 38: 461–490.

De Jonge R., Bolton M.D., Thomma B.P.H.J. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. 14: 1–7.

DeWit P.J.G.M., Mehrabi R., van den Burg H.A., Stergiopoulos I. Fungal elicitor proteins. *Molec // Plant Microbe Interact.* 2009. 10: 735–747.

Djamei A., Schipper K., Rabe F., et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector // *Nature*. 2011. 478: 395–398; doi:10.2038/nature.10454.

Ellis J.G., Rafiqi M., Gan P., et al. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens // *Current Opin. in Plant Biol.* 2009. 12: 399–405.

Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z., et al. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // *Nat. Genet.* 2006. 38: 953–56.

Han Y., Liu X., Benny U., Kistler H.C., VanEtten H.D. Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* // *Plant J.* 2001. 25: 305–14.

Hata R., Ito K., Hosaki Y., et al. A Conditionally Dispensable Chromosome Controls Host-Specific Pathogenicity in the Fungal Plant Pathogen *Alternaria alternata* // *Genetics*. 2002. 161: 59–70.

Hogenhout S.A., Van den Hoorn R.A.L., Terauchi R., Kamoun S. Emerging concept in effector biology of plant-associated organisms // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 2009. 22: 115–122.

Honee G., van den Ackerveken G.A.J.M., van den Broek H.W.J., et al. Molecular characterization of the interaction between the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* and tomato // *Euphytica*. 1994. 79: 219–222.

Kimura M., Anzai H., Yamaguchi I. Microbial toxins in plant-pathogen interactions: biosynthesis, resistance mechanisms, and significance // *J. General. Appl. Microbiol.* 2001. 47: 149–160.

Mellersh D.G., Heath M.C. Plasma membrane — cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration // *Plant Cell*. 2001. 13: 413–424.

Nishimura S., Kohmoto K., Otani H., et al. The involvement of host-specific toxins in the early step of infection by *Alternaria kikuchiana* and *A. mali*. In *Biochem. and Cytol. of Plant-Parasit Interact.* Nogyo. 1976. 94–101.

Ouchi S., Oku H. Susceptibility as a process induced by pathogens. In "Plant Disease Control: Resistance and Susceptibility". John Wiley & Sons. 1981. 33–44.

(В русском переводе: Оучи С. Восприимчивость как процесс, индуцируемый патогенами [Текст] // С. Оучи, Н. Оку; Дыков Ю.Т. (ред.). Борьба с болезнями растений: устойчивость и восприимчивость. — М.: Колос, 1984. С. 38–49.)

Petre B., Kamoun S. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cell? // PLOS Biology. 2014. DOI:10.1371/journal.pbio.1001801.

Raffaie S., Kamoun S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better // Nature Rev. Microbiol. 2012. DOI:10.1038.1–14.

Sagi L. Engineering resistance to pathogenic fungi. In Atkinson H. et al. (editors) Genetic Transformation Strategies to Address the Major Constraints to Banana and Plantain Production in Africa. Promusa, 2003, 1–38.

Tiller B.H. Effectors. In "Oomycete Genetics and Genomics". Editors K. Lamour and S. Kamoun. Wiley-Blackwell: 2009, 361–386.

Van der Does H.C., Rep M. Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi // Mol. Plant-Microbe Interact. 2007, 20: 1175–1182.

Yamada T., Hashimoto H., Shiraishi T., Oku H. Suppression of pisatin, phenylalanin-ammonia lyase, mRNA accumulation by a putative pathogenicity factor from the fungus *Mycosphaerella pinodes* // Molec. Plant-Microbe Interact. 1989, 2: 256–261.

Глава 4 ПРИБРЕТЕННЫЙ, ИЛИ АДАПТИВНЫЙ, ИММУНИТЕТ

Как показано в предыдущей главе, паразиты обладают широким набором средств преодоления врожденного неспецифического иммунитета, который, следовательно, не может служить панацеей и, чтобы защитить растения от губительного влияния множества паразитических организмов, должен быть дополнен более эффективными средствами защиты.

Паразитов высших животных, преодолевших барьер врожденного неспецифического иммунитета, ждет встреча с факторами адаптивного, или приобретенного, иммунитета — *антителами*, которые узнают не ограниченное число химических соединений — МАРPs, а поверхностные структуры и высокомолекулярные метаболиты неограниченного числа штаммов микроорганизмов и, соединяясь с ними, делают их доступными для атаки разнообразными факторами гуморального и клеточного иммунитета. Как было рассказано в гл. 2, TLR после рецепции МАРPs инициируют сигнальный каскад, приводящий к продукции цитокинов, медиаторов воспаления и других эффекторных молекул, а также стимулируют дендритные клетки к захвату чужеродных пептидов, транспорту их к лимфатическим узлам и в конечном счете — к производству Т- и В-клеток. В этом проявляются связи между врожденным и приобретенным иммунитетом и пути перехода первого во второй.

Растения в силу структурных особенностей не имеют специализированных тканей и клеток, несущих иммунные функции, не способны к синтезу антител, у них каждая клетка должна обладать всеми необходимыми иммунными функциями. Но и растения в процессе коэволюции выработали систему специфической защиты от патогенов, преодолевающих факторы неспецифического, базового иммунитета. Эта система получила название *вертикальной устойчивости* [Ван дер Планк, 1972].

4.1. ВЕРТИКАЛЬНАЯ И ГОРИЗОНТАЛЬНАЯ ПАТОСИСТЕМЫ

Патосистемой принято называть систему сосуществования растения и его паразита.

Ван дер Панк подразделил все формы проявления устойчивости растений к болезням на две категории: горизонтальную (ГУ) и вертикальную (ВУ), которые различаются рядом свойств.

Взаимодействие разных сортов с различными штаммами (расами) паразитов. В случае ГУ сорта могут различаться по устойчивости к разным штаммам, а штаммы — различаться по патогенности к разным сортам, но при использовании двухфакторного дисперсионного анализа взаимодействующая компонента (сорта \times расы) не достоверна, т.е. не наблюдается специфичности во взаимодействиях, при которой один сорт высокоустойчив к расе *a*, но поражается расой *b*, а второй, наоборот, высокоустойчив к расе *b*, но поражается расой *a*. Иными словами, если сорт устойчив, то почти одинаково ко всем расам, а если раса патогенна, то одинаково ко всем сортам. Напротив, при ВУ взаимодействующая компонента достоверна, т.е. наблюдается специфичность устойчивости к отдельным расам. Например, сорт картофеля Любимец устойчив (проявляет реакцию СВЧ в ответ на заражение) по отношению к расе 3 *Phytophthora infestans*, но поражается расой 1, а сорт Домодедовский, наоборот, устойчив к расе 1, но поражается расой 3. Однако между крайними (как в приведенном выше случае или, наоборот, при полном отсутствии различий в реакции сортов на заражение разными расами) случаями исследователи наблюдали большое число промежуточных. Дело в том, что статистическая достоверность или недостоверность результатов анализа обусловлена, в частности, критерием, выбранным исследователем. Во многих биологических опытах критерием достоверности принимается показатель 0,05 (как говорил на своих лекциях В.Н. Максимов, если из ста шагов, сделанных вдоль дороги, наша нога только пять раз попала в яму, мы заключаем, используя критерий достоверности 0,05, что дорога ровная). Но по данным И.Г. Одинцовой и Л.Ф. Шеломовой (1983), сорт пшеницы Дербентская черноколосая, обладающий несомненной ГУ, показал взаимодействующую с тремя штаммами *Puccinia triticina* вариансу, не достоверную при использовании критерия 0,01, но достоверную при использовании критерия 0,05 (табл. 4.1). Более того, пассажи гриба на сорте Дербентская черноколосая привели к достоверному увеличению вирулентности к этому сорту. Подобных примеров накоплено достаточно много.

Взаимодействие генов, влияющих на проявление устойчивости. Если между аллелями нет взаимодействия, то общая генетическая варианса будет обусловлена лишь числом локусов, определяющих данный признак; такую вариансу называют невзаимодействующей, или *аддитивной*. Обычно аддитивные гены определяют количественное выражение признака (высота растения, продолжительность вегетации, степень устойчивости к заражению, проявляющуюся в числе пятен, которые образуются на листьях, и т.п.). Чем больше в геноме аддитивных генов, тем сильнее проявляется данный признак.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа числа пустул *Rustinia triticea* на листьях сортов пшеницы Дербентская черноколосая и Саратовская 29 [Одинцова, Шеломова, 1983]

Источники варииро- вания	Сумма квал- ратов	Степени свободы	Сумма квал- ратов	F факти- ческое	F табличное	
					0,05	0,01
Штаммы	14,4	2	7,2	4,56	3,32	5,39
Сорта	20	1	20,7	13,23	4,70	7,30
Взаимодей- ствие	16,2	2	8,10	5,13	3,32	5,40

Взаимодействие генов может быть аллельным (*доминантность*) или неаллельным (*эпистаз*).

Аллельное взаимодействие проявляется в том, что один аллельный (доминантный) ген частично или полностью подавляет фенотипическое проявление другого аллеля (рецессивного). Например, культурный картофель — тетраплоид, имеющий четыре генома. Если хотя бы в одном геноме есть доминантный ген устойчивости к фитофторозу *RI*, то растение будет устойчиво к расе 0 *Phytophthora infestans* даже при наличии в трех остальных геномах рецессивного аллеля (гена восприимчивости *ri*).

При эпистазе подавляется фенотипическое проявление неаллельных генов. Например, сорта лука с окрашенными кроющими чешуями (желтыми или красными) устойчивы к некротрофным грибам из родов *Botrytis*, *Aspergillus* и др. вследствие накопления в мертвых клетках токсичных фенолов (см. гл. 1). Желтая окраска чешуй контролируется не полностью доминантным геном *C* (гомозигота *CC* — имеет желтые чешуи и устойчива, гетерозигота *Cc* — кремовые чешуи и слабо поражается, гомозигота *cc* — белые чешуи и восприимчива). Но эти правила соблюдаются только в том случае, если лук гомозиготен по рецессивному несцепленному гену *i* (*ii*). При наличии *Ii* или *Ii*, независимо от состояния локуса *C*, лук будет белый и восприимчивый. Следовательно, ген *I* проявляет эпистатическое взаимодействие с геном *C*. Взаимодействующие гены обычно контролируют качественные признаки, ибо, как мы видели в отношении картофеля и фитофтороза, только один доминантный ген устойчивости к болезни может придать растению полную устойчивость, независимо от числа рецессивных аллелей, или, наоборот, полностью подавить устойчивость, как мы видели в отношении лука.

Ван дер Планк постулировал, что ГУ контролируется не взаимодействующими генами и выражается в количественном проявлении

устойчивости (чем большее число генов, контролирующих ГУ, содержит геном растения, тем выше степень проявления устойчивости, независимо от заражающей это растение расы паразита). ВУ контролируется взаимодействующими (чаще, доминантными) генами и выражается в качественном проявлении устойчивости (в приведенном примере с фитофторозом картофеля наличие гена *R1* делает растение абсолютно устойчивым к расе 0, но не к расе 1, которая одинаково вирулентна для сортов картофеля, имеющих доминантный аллель гена *R1* или не имеющих его).

Однако и это правило не универсально, есть много случаев количественного проявления устойчивости при ВУ (например, некоторые случаи устойчивости пшеницы к бурой ржавчине) и качественного при ГУ (например, устойчивость кукурузы к *Cochliobolus carbonum*).

Взаимодействие генотипа и условий жизни (экологическая вариация). Фенотипическое проявление генов происходит в определенном диапазоне внешних условий, т.е. на фенотип оказывает влияние не только генотип, но и условия жизни; степень их влияния называют экологической вариацией. Некоторые гены экспрессируются в широком диапазоне внешних условий, поэтому фенотип определяется главным образом генетической вариацией, а экологическая оказывает незначительное влияние на фенотип; для проявления других генов условия жизни оказывают достоверно высокое влияние. Считается, что гены ВУ экспрессируются в широком диапазоне внешних условий, в то время как на проявление генов ГУ внешние условия оказывают гораздо большее влияние. Это различие обусловлено, прежде всего, качественным и количественным характером наследования. Как правило, количественные признаки подвержены более сильному влиянию внешних условий, чем качественные. Простой пример: будет ли корова рогатая или комолая, определяется исключительно ее генотипом и не подвержено влиянию условий содержания, а надой молока от этой коровы в значительной степени определяется условиями кормления. Поэтому гены ГУ труднее контролировать и анализировать, так как необходимо, во-первых, исключить вариабельность внешних условий (проводить опыты в контролируемых лабораторных условиях) и, во-вторых, подбирать такие условия эксперимента, при которых проявление ГУ будет максимальным (при неблагоприятных для паразита условиях не заразить восприимчивый контроль, а при очень благоприятных заражение устойчивых генотипов будет сходным с восприимчивыми).

Однако и в отношении этих различий между ВУ и ГУ имеется много исключений.

Прежде всего, реакции СВЧ как наиболее частое проявление ВУ — энергозатратный процесс, поэтому ее развитие можно затормозить дыхательными токсинами и другими воздействиями, препятствующими накоплению АТФ или иных энергонакопителей. Правда, эти «внешние условия» находятся за пределами естественных колебаний (температуры, влажности, освещенности, почвенного питания и т.п.). Но и такие, естественные, колебания также могут модифицировать фенотипическое проявление генов ВУ. Многие гены ВУ относятся к группе температурочувствительных (ts) генов, которые показывают функциональный фенотип (в данном случае устойчивость к болезни) только в условиях пермиссивной (оптимальной для растения) температуры. При повышении температуры до близкой к максимальной (при рестриктивных температурах) устойчивость сменяется на восприимчивость. Подобными свойствами обладают некоторые гены устойчивости, используемые в практической селекции растений. Например, ген *N* дикого табака *Nicotiana glutinosa* придает растению реакцию СВЧ к вирусу табачной мозаики (ВТМ). После натирания листьев соком, содержащим частицы ВТМ, на листьях образуются точечные некрозы в местах внедрения вируса, за пределы которых вирус не распространяется. Но если зараженные табаки перенести в камеру с температурой 35–37°C, то вирус из очагов некроза будет распространяться по всему растению. После снижения температуры вновь до 25°C все участки растения, в которые успели проникнуть вирусные частицы, некротизируются, а остальные участки останутся свободными от вируса.

Температурочувствительностью обладают и другие гены ВУ. Например, присутствующий в популярном канадском сорте пшеницы Селкирк ген *Srb* при температуре 18–20°C показывает реакцию устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* (тип реакции 0–1), а при температуре 26°C — реакцию восприимчивости (тип реакции 3–4). Растения *Arabidopsis* (резушка) более чувствительны к бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* при температуре 28°C, чем при 22°C, а их устойчивость к мучнистой росе пропадает при температуре 30°C. Также устойчивость томата к галловой нематоде (ген *Mi1*) и к *Cladosporium fulvum* (гены *Cf4* и *Cf9*) не проявляется при температурах выше 30°C [см. Zhu et al., 2010].

Реакция на заражение некоторыми генами ВУ чувствительна и к другим внешним условиям, например, у гена устойчивости льна к ржавчине *N2* она варьируется в зависимости от степени освещенности. А растения гороха, гетерозиготные по генам устойчивости к вирусам желтой мозаики фасоли и желтой мозаики бобов, при температуре 18°C и ниже устойчивы (устойчивость доминантна), а при

устойчивости (чем большее число генов, контролирующих ГУ, содержит геном растения, тем выше степень проявления устойчивости, независимо от заражающей это растение расы паразита). ВУ контролируется взаимодействующими (чаще, доминантными) генами и выражается в качественном проявлении устойчивости (в приведенном примере с фитофторозом картофеля наличие гена *R1* делает растение абсолютно устойчивым к расе 0, но не к расе 1, которая одинаково вирулентна для сортов картофеля, имеющих доминантный аллель гена *R1* или не имеющих его).

Однако и это правило не универсально, есть много случаев количественного проявления устойчивости при ВУ (например, некоторые случаи устойчивости пшеницы к бурой ржавчине) и качественного при ГУ (например, устойчивость кукурузы к *Cochliobolus carbonum*).

Взаимодействие генотипа и условий жизни (экологическая вариация). Фенотипическое проявление генов происходит в определенном диапазоне внешних условий, т.е. на фенотип оказывает влияние не только генотип, но и условия жизни; степень их влияния называют экологической вариацией. Некоторые гены экспрессируются в широком диапазоне внешних условий, поэтому фенотип определяется главным образом генетической вариацией, а экологическая оказывает незначительное влияние на фенотип; для проявления других генов условия жизни оказывают достоверно высокое влияние. Считается, что гены ВУ экспрессируются в широком диапазоне внешних условий, в то время как на проявление генов ГУ внешние условия оказывают гораздо большее влияние. Это различие обусловлено, прежде всего, качественным и количественным характером наследования. Как правило, количественные признаки подвержены более сильному влиянию внешних условий, чем качественные. Простой пример: будет ли корова рогатая или комолая, определяется исключительно ее генотипом и не подвержено влиянию условий содержания, а надой молока от этой коровы в значительной степени определяется условиями кормления. Поэтому гены ГУ труднее контролировать и анализировать, так как необходимо, во-первых, исключить вариабельность внешних условий (проводить опыты в контролируемых лабораторных условиях) и, во-вторых, подбирать такие условия эксперимента, при которых проявление ГУ будет максимальным (при неблагоприятных для паразита условиях не заразится восприимчивый контроль, а при очень благоприятных заражение устойчивых генотипов будет сходным с восприимчивыми).

Однако и в отношении этих различий между ВУ и ГУ имеется много исключений.

Прежде всего, реакция СВЧ как наиболее частая проявление ВУ — энергозатратный процесс, поэтому ее развитие может сопровождаться дыхательными токсинами и другими физиологическими, препятствующими накоплению АТФ или иным энергетическим процессам. Правда, эти «внешние условия» находятся за пределами естественных колебаний (температуры, влажности, биологического ритма и т.п.). Но и такие, естественные, колебания могут модифицировать фенотипическое проявление генов ВУ. Многие гены ВУ относятся к группе температурочувствительных генов, которые показывают функциональный фенотип (в данном случае устойчивость к болезни) только в условиях температурной стрессовой (оптимальной для растения) температуры. При повышении температуры до близкой к максимальной (при рестриктивных температурах) устойчивость сменяется на восприимчивость. Подобными свойствами обладают некоторые гены устойчивости, используемые в практической селекции растений. Например, ген *N* дикога табака *Nicotiana glutinosa* придает растению реакцию СВЧ к вирусу табачной мозаики (ВТМ). После натирания листьев соком, содержащим частицы ВТМ, на листьях образуются точечные некрозы в местах внедрения вируса, за пределы которых вирус не распространяется. Но если зараженные табачки перенести в камеру с температурой 35–37°C, то вирус из очагов некроза будет распространяться по всему растению. После снижения температуры вновь до 25°C все участки растения, в которые успели проникнуть вирусные частицы, тизируются, а остальные участки останутся свободными от вируса.

Температурочувствительностью обладают и другие гены ВУ. Например, присутствующий в популярном канадском сорте пшеницы Селкирк ген *Sr6* при температуре 18–20°C показывает реакцию устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* (тип реакции 0–1), а при температуре 26°C — реакцию восприимчивости (тип реакции 3–4). Растения *Arabidopsis* (резушка) более чувствительны к бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* при температуре 28°C, чем при 22°C, а их устойчивость к мучнистой росе пропадает при температуре 30°C. Также устойчивость томата к галловой нематодe (ген *M1*) и к *Cladosporium fulvum* (гены *Cf4* и *Cf9*) не проявляется при температурах выше 30°C [см. Zhu et al., 2010].

Реакция на заражение некоторыми генами ВУ чувствительна и к другим внешним условиям, например, у гена устойчивости льна к ржавчине *N2* она варьируется в зависимости от степени освещенности. А растения гороха, гетерозиготные по генам устойчивости к вирусам желтой мозаики фасоли и желтой мозаики бобов, при температуре 18°C и ниже устойчивы (устойчивость доминантна), а при

температуре 27°C и выше — восприимчивы (устойчивость рецессивна); при этом гомозиготы не меняют реакции на заражение при любой температуре. Можно полагать, что при низких температурах для придания устойчивости достаточно одной дозы гена и гетерозигота устойчива, а при высоких — необходимы две дозы.

Генетика взаимоотношений генотипов растения-хозяина и паразита. При ВУ она описывается концепцией, получившей название «ген на ген» (“Gene for gene”, Flor, 1971): растение устойчиво к паразиту, если обладает доминантным геном ВУ. Но паразит может преодолеть такую устойчивость при наличии рецессивного гена, соответствующего доминантному гену хозяина. Следовательно, если у растения имеется доминантный ген *RI* (*R* — от Resistance — устойчивости), а у паразита — доминантный ген *AVRI* (avirulence), то растение будет устойчиво, а паразит — авирулентен. Но если в результате мутации паразит приобретет изменившийся рецессивный аллель *avrI*, то он будет вирулентным к растению с геном *RI*. Поскольку паразит может обладать несколькими *AVR*-генами, в растении в процессе коэволюции с паразитом возникали гены *R2*, *R3* и т.д., продукты которых узнают продукты соответствующих *AVR*-генов. Однако на основании результатов опытов, аналогичных приведенным выше опытам Однцовоной и Шеломовой, было предположено, что и в случае ГУ функционируют взаимоотношения типа «ген на ген», только, вследствие более низкой экспрессивности генов, контролирующих количественные признаки, фенотипические различия между аллелями генов устойчивости растений, как и генов вирулентности паразитов, слабые и часто могут маскироваться влиянием экологической вариации [Parlevliet, Zadoks, 1977].

Таким образом, многочисленные исключения из правил, установленных Ван дер Планком, делают концепцию ГУ и ВУ достаточно условной, а с точки зрения молекулярных механизмов устойчивости и вирулентности — лишенной смысла. Однако это не совсем так. Исследования взаимоотношений картофеля и возбудителя фитофтороза показали, что ни у одного образца культурного картофеля *Solanum tuberosum*, родина которого — Южная Америка, нет генов ВУ, эти образцы могут отличаться друг от друга только уровнем ГУ. Зато ВУ обладают дикие клубненосные виды картофеля (*Solanum demissum*, *S. bulbocastanum* и др.), обитающие в Центральной Америке — Мексике, Гватемале. Поскольку там на них паразитируют местные штаммы *Phytophthora infestans*, Центральная Америка рассматривается как родина этого оомицета, именно здесь сформировался вид, поражающий пасленовые растения из секции *Petota* (образующие клубни). И это касается не только картофеля и фитофто-

роза. Многочисленные исследования над растениями разных видов и их паразитами привели крупнейших российских генетиков культурных растений Н.И. Вавилова и П.М. Жуковского к созданию законов естественного иммунитета растений, которые, в частности, выражаются в том, что наибольшее разнообразие генов устойчивости к болезням возникает на совместной родине партнеров [Вавилов, 1940; Жуковский, 1971]. Именно здесь протекает длительная коэволюция партнеров, а гены ВУ и их разнообразие возникают как результат этой коэволюции. Таким образом, ГУ — это базисная устойчивость, основанная главным образом на факторах, описанных в гл. 1 и 2, а ВУ возникла для предотвращения поражаемости растений штаммами паразита, преодолевшими защитные свойства каких-либо этих факторов с помощью эффекторов, описанных в гл. 3. По аналогии с иммунитетом у животных, который разделяют на врожденный и приобретенный, ГУ растений можно рассматривать как врожденный неспецифический иммунитет, а ВУ — как приобретенный, или адаптивный, специфический иммунитет.

Диаллельное взаимодействие растения и паразита в системе «ген на ген» выражается в виде квадратной сетки (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Реакция на заражение в системе «ген на ген»

Аллельные состояния генов вирулентности	Аллельные состояния генов устойчивости	
	<i>rr</i>	<i>RR(Rr)</i>
<i>AVR</i>	S	R
<i>avr</i>	S	S

Примечание: R — устойчивость, S — восприимчивость

Как видно из приведенных в табл. 4.2 отношений, растение устойчиво только в том случае, если «комплементарные» гены паразита и хозяина находятся в доминантном состоянии. При наличии рецессивного аллеля взаимодействующего гена хозяина, паразита или обоих партнеров растение восприимчиво. Это касается любого «взаимодействующего» гена: реакция устойчивости (несовместимости) будет развиваться при наличии *R1-AVR1*, *R2-AVR2*, *R3-AVR3* и т.д. При этом вне зависимости от того, сколько имеется взаимодействующих локусов, наличия только одного в доминантном состоянии у обоих партнеров достаточно для развития реакции устойчивости.

Наиболее простое объяснение этих исследований следующее.

Паразит выделяет продукт *AVR*-гена — *Avr*-белок, который необходим ему для усиления своего паразитического потенциала (например, для нейтрализации факторов неспецифического иммуни-

тета), но этот белок узнается продуктом гена ВУ растения — R-белком. Такое узнавание приводит к развитию иммунного ответа. Делеция AVR-гена или рецессивная мутация делает его неузнаваемым для R-белка, а паразита — вирулентным. Различные варианты подобных интерпретаций генетических данных уже много лет предлагались фитопатологами, но только в 90-х годах XX в. были изолированы и секвенированы продукты первых AVR- и R-генов, подтвердившие и уточнившие высказанные ранее гипотезы. Например, паразит томата *Cladosporium fulvum* имеет хитин в составе клеточной стенки. Клетки томата в ответ на заражение выделяют хитиназу, которая расщепляет хитин с образованием октамерных олигомеров — MAMPs. Последние, в результате взаимодействия с lysM-рецептором хитина, на мембране (протеинкиназный рецептор — компонент системы врожденного неспецифического иммунитета) вызывают иммунный ответ PTI. Однако вирулентные расы *C. fulvum* образуют рецепторы, экранирующие молекулы хитина и защищающие их от растительной хитиназы (Avr4) и от рецепции (ESP6). Устойчивый сорт томата синтезирует R-белок Cf4, который узнает Avr4 и включает иммунный ответ, в частности синтез пептидазы Per1, разрушающей Avr4. В ответ на это вирулентная для данного сорта раса гриба образует эффектор Avr2 — ингибитор пептидаз, который защищает белки паразита от разрушения. У устойчивого к новой расе сорта томата образуется белок Cf2, который узнает соединение Avr2 с Per1 и включает защитные реакции ETI. И так далее... Таким образом,

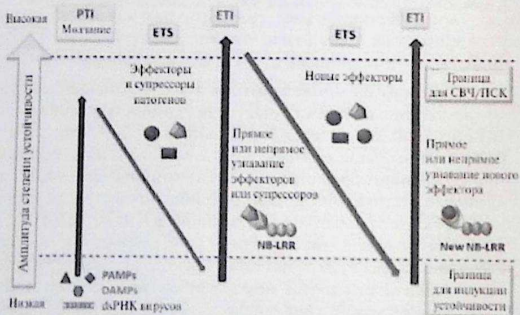


Рис. 4.1. Модель «зигзаг» взаимоотношений растений с паразитами [Zvereva, Poodgin, 2012]

концепция «ген на ген» приобретает облик модели «зигзаг» (рис. 4.1). Рассмотрим компоненты этой системы подробнее.

4.2. AVR-БЕЛКИ

4.2.1. Avr-белки вирусов

Вирусы относятся к группе мельчайших самореплицирующихся паразитов. Например, РНК вируса табачной мозаики (ВТМ) содержит только 6400 нуклеотидов, а его белковая оболочка (капсид) состоит из 2130 субъединиц (капсомеров); каждый капсомер построен из 158 аминокислот. РНК ВТМ кодирует всего несколько транскриптов (от 5'-конца к 3'-концу): фермент РНК-полимераза (126 кДа), вспомогательный белок (183 кДа), транспортный белок (30 кДа) и белок оболочки (капсидный белок) (17,5 кДа) (рис. 4.2).

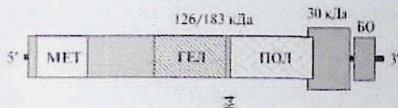


Рис. 4.2. Геном ВТМ. От 5'-к 3'-концу: 126/183 — ген РНК полимеразы с доменами метилтрансферазы, геликазы и полимеразы; ген транспортного белка 30 кДа; БО — белок оболочки (капсидный белок, 18 кДа)
[Пухальский и др., 2007]

Взаимоотношения штаммов ВТМ с видами табака в системе «ген на ген» показаны в табл. 4.3.

Таблица 4.3

Реакция видов рода *Nicotiana* на заражение штаммами ВТМ

Штаммы ВТМ	Виды табака		
	<i>N. tabacum</i> (ген <i>n</i>)	<i>N. sylvestris</i> (ген <i>N'</i>)	<i>N. glutinosa</i> (ген <i>N</i>)
U1	S	R	R
U2	S	S	R
Об	S	R	S

Примечание: S — реакция восприимчивости, R — реакция устойчивости

Для того чтобы установить, какой белок узнается продуктами генов *N* и *N'*, достаточно просеквенировать геномы всех трех штаммов и выяснить, в каких генах штаммов U2 и Об возникли изменения нуклеотидной последовательности по сравнению со штаммом U1, которые сделали кодируемый белок не способным уз-

наваться продуктами генов устойчивости. Оказалось, что для продукта гена *N N. sylvestris* — это капсидный белок, а для продукта гена *N N. glutinosa* — РНК-полимераза (хеликазный домен молекулярной массой 50 кДа, входящий в РНК-полимеразный комплекс молекулярной массой 126 кДа). РНК-полимераза ВТМ — истинный эффектор вируса, так как она супрессирует молчание генов растения — процесс, необходимый для протекания защитных реакций (см. гл. 2). У томата описаны два гена устойчивости к ВТМ — *TM-1* и *TM-2*; продукт гена *TM-2* узнает транспортный белок молекулярной массой 30 кДа. Таким образом, все белки ВТМ разными растениями-хозяевами разобраны на элиситоры.

Интересно, что капсидный белок X-вируса картофеля (ХВК), содержащий треонин в положении 121, индуцирует реакцию СВЧ у своего обычного хозяина картофеля и растения-сухоцвета *Gomphrena globosa*, не являющегося хозяином ХВК. Таким образом, один и тот же белок паразита вызывает реакцию устойчивости у устойчивых сортов восприимчивого вида (сортовой иммунитет по терминологии Н.И. Вавилова) и растений-нехозяев (видовой иммунитет).

4.2.2. Avr-белки бактерий

Молекулярные исследования Avr-белков бактерий, а тем более грибов, — гораздо более сложная задача. Некоторые подходы к ее решению представлены в книге «Фундаментальная фитопатология» (2012). Здесь же приведем лишь данные относительно структуры и биологических свойств этих белков у некоторых фитопатогенных бактерий.

Семейство *avrBs2* Ген *avrBs2* *Xanthomonas vesicatoria* и его гомолог у *X. campestris* pv. *alfalfae*. Белок AvrBs2 гомологичен ферменту, участвующему в синтезе и гидролизе фосфолиэфирных связей между углеводами или фосфолипидами.

Семейство *avrPto* *Pseudomonas syringae*. Белок AvrPto нарушает сборку пептиновых компонентов клеточной стенки, препятствуя тем самым возникновению защитной структуры — папилы. Связывается с рецепторной протеинкиназой ВАК1 и препятствует формированию ее комплекса с FLS2 (см. гл. 2), вследствие чего ингибирует активацию MAP-киназ.

Семейство *avrBs3*. Включает *avrBs3* *X. vesicatoria*; *Avrb4*, *Aavrb5*, *AvrB6*, *AvrB101*, *AvrB102*, *AvrBln*, *avrB7*, *PthN* *X. campestris* pv. *malvacearum*; *PthA* *X. citri*; *AvrXa7*, *AvrXa10*, *avrxa5* *X. oryzae* pv. *oryzae*. Кодлируемые этими генами белки индуцируют реакции устойчивости, однако их инактивация в результате мутаций приводит к общему снижению патогенности. Семейство AvrBs3 белков необходимо для

размножения фитопатогенных бактерий в растении и генерирования симптомов болезней. Белок PthA *X. citri* необходим для формирования опухолей в зараженных растениях; AvrB6 *X. vesicatoria* усиливает освобождение бактериальных клеток на поверхность зараженного растения; AvrBs3 индуцирует гипертрофию. Эти белки имеют центральный домен, включающий повторы из 34 аминокислот, число которых варьируется от 13,5 у AvrB6 до 25,5 у AvrXa7. На С-концевом участке расположены кислый фактор активации транскрипции (AAD) и домен, передающий сигналы в ядро (NLS). Центральный домен необходим для проявления специфичности белка, а С-концевой — для проявления элиситорной активности. В растении белок AvrBs3 димеризуется и в таком виде транспортируется в ядро с помощью растительного белка α -импортина, связывающегося с доменом NLS. В ядре происходит экспрессия генов, кодирующих α -экспансины, пектацетилазы и белки, индуцирующие синтез ауксинов, которые обеспечивают гипертрофию зараженной ткани.

Белок хорD *Xanthomonas vesicatoria*. Это цистеиновая протеаза, состоящая из 545 аминокислот. Супрессирует РТИ вследствие деградации ферментов на пути синтеза СК, вследствие чего подавляет экспрессию генов *PR1* и *PDF1.2*, экспрессия которых контролируется СК-сигнальным путем.

Семейство *avrD*. *avrD*-ген *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* гомологичен многим генам, обнаруженным в геноме *P. syringae* pv. *glycinea*, в частности *avrPg4*. Гомология по белку составляет 86%, по рамке считывания — 98%. Следовательно, гомологичные гены есть и у других бактерий, но вследствие точковых мутаций их продукты перестали индуцировать СВЧ-реакцию у своих хозяев (как *avrD* не индуцирует несовместимость у томата), т.е. являются рецессивными (неактивными) аллелями. Ген *avrD*, как и некоторые другие *avr*-гены, локализован на плазмиде. Он кодирует ферментный белок, катализирующий синтез синринголидов (конденсацию кеилозы с β -оксидоканонидной кислотой) — семейство сигнальных молекул, таких как индукторы споруляции и образования антибиотиков актиномицетов бутанолиты, жасмоновая кислота в клетках растений и др. В среде роста фитопатогенных бактерий, имеющих ген *avrD*, содержание синринголидов очень низкое, но резко возрастает в зараженных растениях.

В целом, проведенные исследования показали, что 1) инактивация (*disruption*) доминантных генов авирулентности приводит к возникновению вирулентности, причем инактивация структурных участков восстанавливает вирулентность полностью, а регуляторных — частично; 2) продукты одного и того же гена могут

вызывать СВЧ-реакцию как у устойчивых сортов своего вида растения-хозяина, так и у растений-нехозяев. Следовательно, на молекулярном уровне подтверждена правильность концепции «ген на ген»: установлено, что принципиальная разница между сортовым и видовым иммунитетом отсутствует как для вирусов, так и для бактерий.

4.2.3. Avr-белки грибов и псевдогрибов

Некоторые сведения об Avr-белках грибов изложены в гл. 3. Здесь приведены дополнительные материалы, необходимые для развития представлений об адаптивном иммунитете у растений.

Avr9 *Cladosporium fulvum*. Первичный продукт гена *AVR9* — белок, содержащий 63 аминокислоты. В процессе транспорта через мембрану гриба и попадания в апопластную жидкость он подвержен посттрансляционным модификациям, и под действием грибных и растительных протеаз остается белок из 28 аминокислот. Ген *avr9* экспрессируется *in vitro* только в условиях низкой концентрации азота. Он не экспрессируется в конидиях и гифах, находящихся на поверхности листа. Значительная экспрессия происходит после внедрения гриба в устьица и очень сильная — в межклеточном пространстве, причем около сосудов больше, чем в мезофилле. Функции Avr9-белка неизвестны, но его промотор имеет 12 сайтов, предположительно способных связываться с белком *AREA Aspergillus nidulans* — главным позитивным регуляторным геном репрессии и дерепрессии усвоения нитратного азота. *In vitro* он экспрессируется только в условиях дефицита азота. По-видимому, Avr9-белок участвует в поступлении азота в мицелий из субстрата или индуцирует высвобождение и перераспределение азота в растении. Повышенная экспрессия *avr9* в районе сосудов, возможно, связана с тем, что его продукт интерферирует с транспортом питательных веществ в растении. Однако эффекторная активность *avr9*, по-видимому, связана не с этими его свойствами. Данный белок модулирует поток K^+ в замыкающих клетках устьиц табака. Возможно, он играет роль в открывании устьиц, через которые мицелий внедряется в межклеточное пространство листьев. Ген *AVR9* фланкирован прямыми повторами, по которым, вследствие рекомбинации, может происходить его делетирование. Поэтому часто встречаются авирулентные расы, в геноме которых этот ген отсутствует.

Avr4 *C. fulvum*. Зрелый белок имеет восемь остатков цистеина, соединенных дисульфидными связями, и гомологичен хитинсвязывающему белку беспозвоночных. Он защищает *Trichoderma viride* и *Fusarium solani* от литического действия растительных хитиназ и,

возможно, этим обусловлена его функциональная роль в патогенезе *C. fulvum*.

Avr2 *C. fulvum*. Экстрацеллюлярный белок, состоящий из 58 аминокислот; восемь цистеиновых остатков этого белка соединены в узелок дисульфидными связями. Этот белок — ингибитор цистеиновых протеаз семейства папаина, в чем, возможно, заключается его функциональная роль в патогенезе.

***Rhynchosporium secalis* NIP1** (necrosis inducing protein) — распецифический элиситор для сортов ячменя, несущих ген устойчивости *Rrs-1*. Белок Nip1 экскретируется *in planta* и вызывает некрозы вследствие стимуляции H^+ -зависимой АТФазы плазмалеммы. Мутация, приводящая к замене одной аминокислоты в этом белке, устраняет несовместимую реакцию устойчивых сортов, но снижает патогенность даже в отношении восприимчивых сортов. Таким образом, NIP1-белок наряду со специфической авирулентностью выполняет роль фактора неспецифической патогенности. Детерминанты патогенности и индукции СВЧ-реакции находятся на разных концах молекулы. По-видимому, в растительной клетке содержатся разные рецепторы этих детерминант.

AVR-Pita *Pyricularia oryzae* (телеоморфа *Magnaporthe grisea*). Кодированный ген локализован в теломерной области хромосомы, что обуславливает его нестабильность вследствие частых перестроек. Элиситорный белок — цинкзависимая протеаза. Ген AVR-Pita экспрессируется на поздних этапах патогенеза, что связано, по-видимому, с необходимостью использовать находящиеся в зараженной клетке белки для питания.

ACE1 *M. grisea*. Это поликетидсинтегаза, участвующая в синтезе вторичных метаболитов, имеющих поликетидную структуру (в частности — меланина). Роль меланина в инфицировании риса возбудителем пирикулярноза хорошо известна. Показано, в частности, что мутации, нарушающие синтез меланина, препятствуют внедрению проростков спор в ткани листа. ACE1 экспрессируется только в зрелых гаусториях, но не в инфекционных гифах, развивающихся в мезофилле. Сигнал Ace1 белка узнается геном устойчивости риса *Pi33*.

Avr3a *Phytophthora infestans*. Взаимодействует с убиквитин-3-лигазой картофеля — ферментом, осуществляющим присоединение белка убиквитина к другим белкам-мишеням, после чего убиквитинизированные белки разрушаются в протеосомах или осуществляют регуляторные функции. В связи с этим убиквитин-3-лигазы участвуют в управлении процессами, приводящими к клеточной смерти (реакции СВЧ). Стабилизация фермента эффекторным

белком фитофторы ингибирует его активность и подавляет иммунный ответ растений.

Avrblb2 *Phytophthora infestans*. Препятствует секреции из клеток зараженного растения в апопласт протеазы С14, гидролизующей белки паразита.

Avr3b *Phytophthora sojae*. Представляет собой фермент АДФ-рибозо/НАДН-пирофосфорилазу, модулирующий иммунный ответ растений на заражение.

4.2.4. Транспорт Avr-белков (эффекторов) в растительную клетку

Для прохождения в клетку растения эффекторный белок должен преодолеть четыре барьера: плазмалемму и клеточную стенку самого паразита, плазмалемму и клеточную стенку растения-хозяина.

Проще всего эти барьеры преодолевают вирусы; их частицы целиком попадают в клетку через ранки в клеточных покровах, сделанные членистоногими переносчиками, или, реже, через механические повреждения клеточных покровов. Затем в клетке начинается синтез пулов вирусных нуклеиновых кислот и белков, в том числе узнающихся как Avr-белки.

Большинство генов авирулентности бактерий кодирует элиситорные белки, транспортирующиеся через hcr-систему. Транспорт белков через бактериальную клеточную стенку осуществляют белки-переносчики. Известны несколько типов переноса белков; большинство Avr-белков переносится с помощью секреторной системы типа III при участии нескольких различных белков (рис. 4.3). Фитопатологи называют ее харп- (hcr-) системой (от англ. hypersensitive — pathogenicity), так как мутации или делеции *hcr*-генов приводят к потере реакции СВЧ у устойчивых видов или сортов растений и к потере патогенности на восприимчивых растениях. Кластеры *hcr*-генов в геномах фитопатогенных бактерий кодируют гликопротеиды *харпины*, способные индуцировать реакцию СВЧ. Харпины остаются в апопластном пространстве и образуют ионные каналы в липидном бислое мембран, т.е. они представляют собой не только часть секреторной системы типа III, но и вспомогательные «хелперные» белки, которые усиливают выход питательных веществ в апопласт. А Avr-белки или остаются в апопласте, или попадают в растительную клетку через hcr-пилы — белковые выросты, выходящие из бактериальной клетки и пронизывающие стенку клетки растения. Интересно, что аналогичным способом через секреторную систему типа III экскретируются в клетки хозяина и факторы патогенности — токсичные белки бактерий из родов *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, опасных для человека.

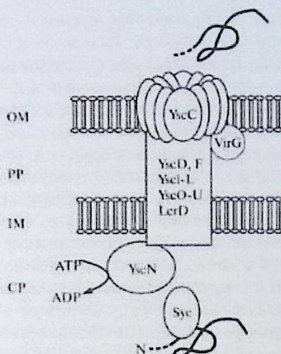


Рис. 4.3. Белки секреторной системы типа III грамотрицательных бактерий [Hueck, 1998]:

OM — наружная мембрана; PP — перипласт; IM — внутренняя мембрана; CP — цитоплазма; N — аминотерминальный участок секретируемого белка; Syc — цитоплазматический шаперон, связывающийся с пресекретируемым белком. Секретция осуществляется мультимерным компонентом наружной мембраны YscC и ассессорным белком VirG.

Внутриклеточный мицелий некоторых биотрофных и гембиотрофных грибов может целиком находиться в межклеточном пространстве (апопласте), туда же экскретируются и Avr-белки. Таковы, например, летально исследованные Avr2, Avr4 и Avr9 *Cladosporium fulvum*.

Большинство биотрофных и гембиотрофных грибов, мицелий которых растет в межклеточном пространстве, образуют внутриклеточные «питательные» органы — гаустории. При развитии гаустория гриба происходит разрушение растительной клеточной стенки, а также химическая и структурная модификация плазмалеммы, окружающей тело гаустория (экстрагаусториальной мембраны — ЭГМ). Между ЭГМ и стенкой гаустория находится экстрагаусториальная матрица, интерфейс, вдоль которого движутся продукты питания от хозяина и эффекторный белки от паразита. Поэтому гаусторий можно считать идеальным органом для секретиции метаболитов паразита в зараженные клетки. Впервые мысль о том, что гаусторий предназначен не только для питания, но, прежде всего, для обмена регу-

литорными метаболитами, высказал физиолог растений В.В. Мазин (личное сообщение, 1986). Он исходил из фундаментального свойства грибов — участия в питании всех клеток мицелия, благодаря чему для поглощения пищи не нужны специальные структуры. Сейчас эта точка зрения стала общепринятой [Petre, Kamoun, 2014].

Результаты опытов, показавшие, что метаболиты паразитов распространяются по клетке не свободной диффузией, а направленно — в растительных везикулах (эндосомах) — явились прорывными и оказали большое влияние на направления современных исследований. У растений в зависимости от срока появления в клетке различают ранние и поздние эндосомы. Последние обычно движутся в направлении плазмалемма — вакуоль и переносят из цитоплазмы в вакуоль ненужные «отработанные» белки (освобождают клетки от мусора). Присутствие эффекторов заставляет поздние эндосомы менять векторы своего движения в направлении гаустории.

Мицелиальные эвкарриотные паразиты не имеют механизмов активного внедрения в клетки хозяев, подобных секреторной системе тип III бактерий. Эффекторы многих паразитов растений и животных способны проникать в клетки хозяев даже в отсутствие их продуцентов. Большинство изученных симпластных эффекторных белков имеет мотив, обеспечивающий прохождение в клетку хозяина. У оомицетов это N-терминальная область, названная RXRL-dEEF: аргинин, любая аминокислота, лейцин, аргинин — аспартат (не часто), глутамат, глутамат, аргинин. По наличию этого мотива были идентифицированы многие *avr*-гены — *Avr1a*, *Avr1b*, *Avr1k*, *Avr3a*, *Avr3c*, *Avr4/6 Phytophthora sojae*; *Avr1, 2, 3a, 3b/10/11, 4*, *Bhb1*, *Sto1*, *ipi0*, *BIB2 P. infestans*, *AvrG1*, *AvrB Hyaloperonospora arabidopsidis*. У всех исследованных белков обнаружен сильный полиморфизм в C-терминальной области. Так, у представителей рода *Phytophthora* обнаружено 700 эффекторов, несущих этот мотив, а у *Hyaloperonospora* — 150 [см. Goldfry et al., 2010]. Но все гены этого суперсемейства произошли от раннего предка пероноспорных оомицетов. А поскольку у малярийного плазмодия (*Plasmodium falciparum*), относящегося к отряду *Apicomplexa* (царство *Alveolata*), гомологичная последовательность PEXEL/VTS (*Plasmodium Export Element/Vacuolar Targeting Signal*) присутствует также в секреторной области внеклеточного белка, причем эти области у плазмодиев и оомицетов взаимозаменяемы без потери функций, можно опустить этого предка до самых ранних этапов эволюции эвкарриот. Предполагается объединить три огромных царства эвкарриот — *Stramenopiles*, *Alveolata* и *Rhizaria* в одну супергруппу SAR, так как они имели общего фотосинтетического предка [Burki et al., 2007]. Так что система трансмембранного транс-

порта белков возникла у предка, общего для оомицетов (царство *Stramenopila*) и апикомплексов (царство *Alveolata*). Эффекторы оомицетов продуцируются в эндоплазматической сети и секретируются в везикулах, формирующихся в комплексе Гольджи [de Jonge et al., 2011]. Мотив RXLR оомицетов связывает эффектор на поверхности клеток хозяина с фосфатидилинозит-3-фосфатом (Pi-3-P), после чего эффектор внедряется с помощью везикулярного эндоцитоза. Молекулы Pi-3-P находятся на поверхности эндосом и регулируют их движение, аутофагию, цитокинез, а также, будучи вторичными мессенджерами, протекание различных внутриклеточных процессов. Они синтезируются не только растениями и животными, но и грибами, в частности, показано, что некоторые эффекторы фитопатогенных оомицетов высвобождаются в соединении с собственными Pi-3-P, что облегчает связывание с растительными эндосомами; RXLR-мотив обнаружен и у некоторых белков растений, ассоциированных с мембранным траффиком [Sun et al., 2013], т.е. паразиты научились использовать механизмы передвижения растительных эндосом для собственного транспорта.

Сходные с RXLR (но не идентичные) мотивы найдены и у некоторых настоящих грибов.

У возбудителя мучнистой росы ячменя *Blumeria graminis* в гаусториях образуются ранние белки; из них два (AvrRK1 и AvrA10) клонированы. Кодирующие их гены относятся к большому мультигенному семейству (более 30 паралога) [de Wit et al., 2009]. Эти белки не имеют сигнальных пептидов, т.е. используют альтернативные способы прохождения через мембраны. Например, эффекторы возбудителей ржавчин бобовых *Uromyces fabae* и *U. striatus* переходят через мембраны в гликозилированной форме.

4.2.5. Avr-белки и приспособленность паразитов

В многочисленных опытах было показано, что гены вирулентности оказывают влияние на приспособленность. Приспособленность (fitness) — важнейший популяционный показатель, обозначающий вклад индивидуума, который он вносит в генный пул популяции в следующем поколении. Она описывается уравнением

$$W = k \cdot v,$$

где k — плодовитость, а v — выживаемость.

Таким образом, приспособленность — интегрированный показатель скорости размножения данного генотипа относительно других генотипов, составляющих популяцию. Ван дер Планк (1972) одним из первых обратил внимание на тот факт, что гены вирулентности па-

разитов (рецессивные аллели генов авирулентности) влияют на приспособленность, снижая паразитический потенциал носителя этих генов. Он сформулировал следующее правило: *раса, имеющая больше генов вирулентности, вытесняется расой, имеющей меньшее их число, при паразитировании на сортах, восприимчивых к обеим расам.*

В табл. 4.2 приведены показатели влияния генов устойчивости и вирулентности на взаимоотношения паразита и растения-хозяина в системе «ген на ген». В модифицированной таблице (табл. 4.4) представлены данные не устойчивости или восприимчивости растения, а вирулентности или авирулентности паразита. За скобками даны качественные показатели (A — авирулентность, V — вирулентность), а в скобках — количественные показатели, при этом скорость размножения авирулентной расы на восприимчивом сорте обозначена как единица.

Таблица 4.4

Влияние генов вирулентности на патогенность паразитов в системе «ген на ген»

Аллельные состояния генов вирулентности	Аллельные состояния генов устойчивости	
	rr	$RR(Rr)$
AVR	$V(1)$	$A(1-t)$
avr	$V(1-s)$	$V(1-s)$

В табл. 4.4 t — показатель степени устойчивости сорта. Он определяется соотношением числа зараженных растений, пятен болезни, числа спор в одном пятне и т.д. при инфицировании вирулентной и авирулентной расами сорта, устойчивого к авирулентной расе и восприимчивого к вирулентной. Как правило, при наличии генов ВУ размножение авирулентной расы подавлено полностью или почти полностью, так что показатель t близок к единице, а приспособленность W близка к нулю; S — цена вирулентности, т.е. цена, которую паразит платит за возможность заражать устойчивый сорт растения. Определение показателя s более сложно, чем t , так как на него влияет гораздо больше факторов. Тем не менее во многих экспериментах были получены следующие количественные показатели s [Ennos, McKonnell, 1995]:

- *Puccinia graminis avenae* (против лишних генов вирулентности) — 0,126;
- *Cochliobolus heterostrophus* (против расы θ на Т-цитоплазме кукурузы) — 0,302;
- *Puccinia striiformis* (против вирулентной расы на восприимчивом сорте) — 0,435;

- *Phytophthora infestans* (против лишнего гена расы 1) — 0,622;
- *Cochliobolus carbonum* (против расы 3) — 0,17;
- *Ohiosoma novo-ulmi* (против неагрессивного вида *O. ulmi*) — 0,517.

Как видно, цена вирулентности может достигать 50% и более, значительно снижая паразитический потенциал. Было также показано, что приобретение вирулентности по отношению к сортам, имеющим некоторые гены устойчивости, приводит к сильному снижению паразитической активности (вирулентные расы элиминируются после снятия этих сортов с производства), а другие гены устойчивости влияют на приспособленность вирулентных рас незначительно, поэтому такие расы сохраняются в популяциях даже после удаления устойчивых к ним сортов. Например, концентрация расы *Phytophthora infestans*, вирулентной для сортов картофеля с геном устойчивости *R1*, после удаления таких сортов быстро падает, а концентрация расы, вирулентной для сортов с геном *R4*, сохраняется. Гены, подобные гену *R1*, Ван дер Планк назвал *сильными*, а подобные гену *R4*, — *слабыми*.

Более того, было установлено, что гены вирулентности факультативных паразитов снижают приспособленность их носителей не только в паразитической стадии. Ряд опытов показывает, что расширенный паразитизм, связанный с дополнительными генами вирулентности, ухудшает способность расы выживать в сапротрофном или покоящемся состоянии.

Изложенные опыты были сделаны еще до начала серьезных молекулярных исследований, когда ничего, кроме доминантного или рецессивного состояния локусов устойчивости и вирулентности, не было известно.

Молекулярные исследования показали, что специфические элиситоры представлены в основном молекулами двух типов — белками и (редко) конъюгатами углеводов.

Белки имеют структуры, обеспечивающие прохождение через мембраны и отщепляемые протеазами в процессе созревания элиситора (у грибов) или транспортируются из клетки секреторным механизмом типа III (у бактерий). Находясь вне протопласта клетки хозяина, они играют роль во взаимоотношениях с внешней средой (например, продукт *avr9 Cladosporium fulvum* участвует в метаболизме азота в условиях азотного голодания). Попадая в клетку из внутриклеточных паразитических структур (гаусторий) или с помощью секреторных систем (Нтр-пилы бактерий), они участвуют в патогенезе, разлагая полимеры клетки хозяина (*AvrPi-ta Magnaporthe grisea*), подавляя защитные свойства (*NIP1 Rhinchosporium secalis*). *AvrPto Pseudomonas syringae* и семейство *AvrB3*-белков у ксантомонад обез-

печивают размножение паразита и формирование симптомов болезни. У вирусов в роли специфических элиситоров выступают внутриклеточные белки, как структурные, так и ферментные.

Поскольку расширение вирулентности сопровождается потерей или изменением структуры эффектора, оно сопровождается снижением приспособленности в паразитической или сапротрофной фазе жизненного цикла паразитов. В этом причина эпидемиологического понятия «цена вирулентности». Если последовательности, узнаваемые рецептором, находятся на участке молекулы элиситора, функционально не необходимым, то цена вирулентности не будет очень высокой, и вирулентные мутанты смогут быстро накопиться и поразить устойчивые сорта. Если же вариация молекулы элиситора драматически скажется на выполнении им первоначальных функций, то вирулентные расы вообще не смогут существовать. Например, RXLR-эффектор *Phytophthora infestans* Avr3a кодируется двумя аллелими, продукты которых — Avr3a^{KI} и Avr3a^{EM} — различаются двумя аминокислотами [Bos et al., 2010]. Первый (Avr3a^{KI}) активирует белок картофеля R3a и включает иммунный ответ E.NI, а второй не узнается R3a-белком (прекрасная иллюстрация концепции «ген на ген» на молекулярном уровне). Оба они супрессируют СВЧ в ответ на RAMPs фитогоры — элиситины, т.е., как и полагается эффекторам, преодолевают факторы неспецифического иммунитета благодаря соединению с убиквитин-3-лигазой картофеля (см. разд. 4.2.3). Однако взаимодействие с этим ферментом белка Avr3a^{KI} осуществляется более интенсивно, чем белка Avr3a^{EM}, вследствие чего последний слабее первого ингибирует защитный ответ клеток картофеля. Следовательно, потеря узнавания эффекторного белка дается паразиту ценой снижения его функций и, следовательно, снижения приспособленности паразита на растениях, не имеющих соответствующего гена ВУ.

Еще более наглядный пример сказанному выше — устойчивость табака разных видов к ВТМ. Элиситор, узнающийся продуктом гена № *Nicotiana sylvestris*, — капсидный белок вируса. Вирулентные для табака этого вида штаммы вируса часто обнаруживаются в природе, их легко можно получить с помощью искусственного мутагенеза. Найдены две горячие точки в первичной последовательности белка, замены которых делают белок неузнаваемым для растительных рецепторов. Следовательно, эти замены серьезно не сказываются на функции белка оболочки вируса (цена вирулентности низкая, а ген № — слабый ген по терминологии Ван дер Планка). Штаммы, вирулентные для *N. glutinosa*, практически не встречаются в природе. Сорта табака, в которые селекционеры внесли его ген устойчи-

ности *N*, выращиваются на больших площадях и сохраняют устойчивость к вирусу многие десятилетия. Продукт гена *N* узнает геликазный домен РНК-полимеразы вируса на участке, изменение которого трагически сказывается на функциях белка, поэтому вирулентные штаммы нежизнеспособны, цена вирулентности очень высока, а ген *N* принадлежит к сильным генам.

4.3. R-БЕЛКИ

Изучение генов устойчивости растений (*R*-генов) классическими методами, их картирование, взаимное расположение и прочие характеристики продолжается уже более 100 лет, однако история изучения их продуктов, *R*-белков, насчитывает всего пару десятилетий: только в 1993 г. появилась первая публикация, посвященная структуре и функциям одного *R*-белка томата [Martin et al., 1993]. После этой статьи число публикаций на эту тему резко увеличилось, и к настоящему времени изучены уже около 100 *R*-белков из растений разных видов, придающих устойчивость к различным патогенам — вирусам, бактериям, грибам (включая оомицеты), нематодам и насекомым.

4.3.1. Структура и функции

Большинство молекул *R*-белков имеет трехдоменную структуру, состоит из нескольких структурно-различающихся участков, соединенных линкерными областями (рис. 4.4). Эти участки обозначают следующими символами (от *N*-конца молекулы — к *C*-концу): CC-NBS-LRR (сокращенно, CNL) или (реже) TIR-NBS-LRR (сокращенно, TNL). Это очень крупные белки, содержащие от 860 до 1900 аминокислот. Они имеют сходство с семейством NOD-LRR белков млекопитающих, которые функционируют при воспалениях и иммунном ответе. В клетках томата обнаружены также уникальные *R*-белки, имеющие только один функционально значимый LRR-домен, или киназный домен, а у риса обнаружен *R*-белок, включающий оба эти домена (LRR-киназа). Рассмотрим эти домены подробнее.

LRR-область (leucine rich repeats — область, богатая повторами лейцина). Каждый повтор состоит из 23–24 аминокислот; число повторов в разных белках — 14–37. Консенсусная последовательность включает пять аминокислот xLxx (L-лейцин, x — любая аминокислота). Лейцин включен в гидрофобный кор, другие аминокислотные остатки образуют гидрофильную поверхность, связывающуюся с лигандом. LRR-мотив встречается более чем в 2000 белках разных ор-

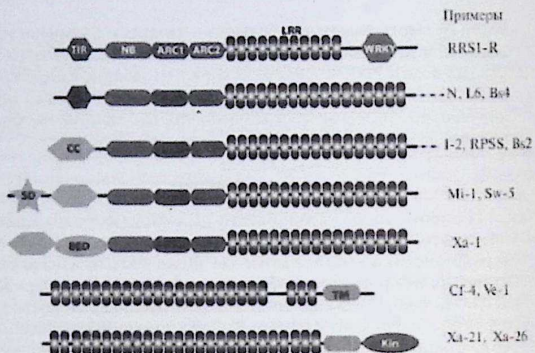


Рис. 4.4. Доменная организация R белков растений [Tamelang, Takken, 2008]: TIR — область гомологии с Toll и ИЛ-1-рецептор; CC — суперскрученная область белка; NB — область связывания с нуклеотидами; ARC1/2 — область гомологии с ARAF1 и CED4 животных; LRR — область, богатая лейциновыми повторами; SD — домен R белков пасленовых растений (Solanaceous domain); BED — цинк-пальцевый белок BEAF/DREAF, транскрипционный фактор (zink-finger); TM — трансмембранный домен; Kip — киназа; WRKY — транскрипционный фактор

ганизмов: от вирусов до млекопитающих. Его С-терминальный участок служит платформой для взаимодействия белок — белок по принципу лектин-лиганд, поэтому он отвечает за специфичное узнавание эффекторов. Противоположный участок LRR-домена может связывать молекулы, необходимые для трансдукции сигнала (киназы и др.), т.е. участвует в начальных этапах индукции иммунного ответа. Кроме того, взаимодействие LRR-области с Авт-белком патогена может вызвать явление, названное «Jack Knife» — внутримолекулярные разрывы R-белка на отдельные домены, которые вследствие изменения конфигурации приобретают способность взаимодействовать с другими клеточными белками и инициировать трансдукцию сигнала.

NBS (nucleotide binding site — сайт связывания нуклеотидов) имеет три домена: киназа 1a (P-петля); киназа 2, связывающая ион металла, что необходимо для реакции передачи фосфора; киназа 3a, у которой аргинин обеспечивает взаимодействие с пуриновым основанием АТФ. Следовательно сайт NBS обеспечивает соединение с АТФ и ГТФ и активирует киназный или G-белковый путь трансдукции сигнала. Специфическое связывание и гидролиз АТФ при-

водят к конформационным изменениям молекулы, а эти изменения регулируют переходы к следующим этапам сигнального пути. Кроме киназ имеется короткий мотив NB-ARC (AraF1, R-gene products and Sed4). Такое название указывает на структурное сходство NBS-области R-белков растений и белков, регулирующих состояние апоптоза (активаторов апоптотической протеазы — каспазы) у животных (AraF1 млекопитающих и Sed4 нематоды *Caenorhabditis elegans*). Это означает, что NBS-область принимает участие и в индукции реакции СВЧ как формы апоптоза у растений.

СС (суперскрученная) область состоит из повторяющихся гептадных последовательностей, чередующихся с интерпейсерными гидрофобными остатками аминокислот, например с лейцином (другое название этого домена LZ — lucine zipper — лейциновая застежка). Две или больше альфа-петли, взаимодействуя, образуют суперскрученные области и обеспечивают олигомеризацию белков. В интактной клетке R-белки могут быть мономерными. Гетеродимеризация с сторожевой молекулой (см. ниже) или белками сигнального пути активизирует эти молекулы. Показано также, что СС-домен является индуктором реакции СВЧ.

TIR (Toll-Interleukin1 receptor Resistance) область гомологична толл-подобному белку и рецептору цитокина ИЛ-1 млекопитающих. Также обеспечивает взаимодействие с белками сигнального пути.

4.3.2. Локализация R-белков

Поскольку основная функция R-белков — рецепция эффекторов паразитов, эти белки должны находиться местах, где такая рецепция будет наиболее доступна. Рецепторы MAMPs локализованы на мембранах (подобно погранзащитам находятся на границе), так как взаимодействуют с поверхностными молекулами паразитов. В отличие от неспецифических элиситоров (или MAMPs), Avr-белки-эффекторы вносятся внутрь клеток (вирусные — переносчиками, бактериальные — секреторной системой типа III, грибные — через гаустории с помощью эндосом), поэтому нахождение в мембране с выдвинутым наружу LRR-сайтом известно только для нескольких R-белков, в частности Cf-белков томата, рецептирующих эффекторы *Cladosporium fulvum* — гриба, мицелий которого целиком находится в апопласте и не образует гаустории. Большинство R-белков находится в цитоплазме, а белки N табака (устойчивость к ВТМ), Rx1 картофеля (устойчивость к ХВК) и MLA10 ячменя (устойчивость к мучнистой росе) локализованы в ядре. Некоторые из них связаны с транскрипционным фактором WRKY, т.е. возможна рецепция эф-

фактора, непосредственно, без промежуточных киназ, приводящая к регуляции экспрессии генов.

В зависимости от локализации R-белков в клетке может меняться их роль в типе сигнального ответа. Например, нахождение R-белка устойчивости ячменя к мучнистой росе MLA10 в ядре супрессирует передачу сигнала, вызывающего СВЧ, а присутствие этого белка в цитоплазме — индуцирует СВЧ. Однако нахождение белка в ядре обеспечивает устойчивость к мучнистой росе, т.е. в данном случае имеется компартментзависимая бифуркация триггерной роли MLA10 в индукции устойчивости и клеточной смерти [Magone et al., 2013]. Носитель устойчивости табака к ВТМ — N-белок — в интактной клетке локализован в цитоплазме. Элиситор ВТМ геликазный домен р50 вызывает активизацию N-белка и переход его в ядро, где он индуцирует СВЧ.

В целях экономии в интактных клетках многие R-гены не экспрессируются вследствие молчания, вызванного miРНК из суперсемейства miR482. РНК фитопатогенных вирусов и вирулентных штаммов бактерий псевдомонад снимают молчание генов и индуцируют синтез R-белков, т.е. растения используют эффекторы патогенов для активизации процессов защиты от них.

4.3.3. Непрямое взаимодействие R-белков с эффекторами

Согласно теории «ген на ген» состояние устойчивости развивается после непосредственного взаимодействия продуктов генов устойчивости и авирулентности. Однако еще при использовании методов классической генетики были обнаружены случаи более сложных взаимодействий. В частности, об этом свидетельствуют и опыты по изменению вирулентности штаммов *Puccinia graminis tritici*, обработанных рентгеновскими лучами, на почти изогенных (их геномы различаются только наличием разных R-генов) линиях пшеницы [Gates, Loegering, 1991]. Были получены мутанты, изменившие реакцию на заражение с 0-3 на 4 одновременно у линий, имеющих несколько различных Sr-генов (2, 3, 5, 7, 8 и даже 9 разных генов). Поскольку единичные мутации не могут возникнуть одновременно в разных генах, был сделан вывод, что помимо генов системы «ген на ген», пшеница имеет гены, продукты которых необходимы для экспрессии разных avr-генов паразита и Sr-генов растения.

Молекулярные эксперименты (в частности, исследования взаимодействий эффекторов и R-белков в двугибридной дрожжевой системе) показали, что только небольшое число R-белков, в частности белки Pto томата и Pi-ta риса, непосредственно связывают эффекторы по принципу лектин — лиганд, причем замена только

одной аминокислоты в любом из взаимодействующих белков нарушает рецепцию. У возбудителя ржавчины льна *Melampsora lini* описан полиморфный локус *AvrL567*; продукты трех его генов (*AvrL567A*, *B* и *C*) узнаются R-белками льна L5, L6 и L7.

Большинство R-белков осуществляет взаимодействие с эффекторами более сложными путями.

Приведем несколько примеров непрямого взаимодействия R-белков и эффекторами.

1. Элициторные *Avr*-белки *Cladosporium fulvum* связываются с клетками и протопластами как устойчивых, так и восприимчивых линий томата, а также других пасленовых и непасленовых растений. Следовательно, у томата имеется неспецифический рецептор, связывающий внеклеточные белки патогена без индукции СВЧ-реакции. Полагают, что активизация клеточного сигнала происходит после взаимодействия элицитора с гетеродимером, состоящим из R-белка и неспецифического рецептора или из R-белка и протеинкиназы (с плазматической мембраной связано несколько типов киназ).

2. Спринголиды, синтезирующиеся под контролем гена *avrD* *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, вызывают СВЧ-реакцию только у сои, имеющей ген *Prg4*, но связываются с белком молекулярной массой 34 кДа, который есть как у устойчивых, так и у восприимчивых растений.

3. Устойчивость турнепса к вирусу курчавости (turnip crinkle virus — TCV) обусловлена белком TIR (TCV Interacting Protein) — членом семейства NAC-белков, участвующих в цитодифференцировке растений. TIR-белок связывается с капсидным белком (CP) вируса, однако вследствие морфогенетических функций этот белок экспрессируется как в устойчивых к вирусу, так и в восприимчивых растениях. Связь TIR — CP узнается третьим белком — HRT, который и включает иммунный ответ.

4. Многие (но не все) гены устойчивости ячменя к мучнистой росе, находящиеся в локусе *Mla*, требуют для проявления специфической устойчивости наличия двух несцепленных генов — *Rar1* и *Rar2*.

5. *Avr1*-белок бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* связывается не с R-белком RPM1 *Arabidopsis thaliana*, а с белком RIN4, который принимает участие в нормальной жизни растения (необходим для роста входов, функционирования меристем и цветения). Этот pathogenicity target (PT) protein после соединения с элицитором фосфорилируется и только после этого приобретает способность к взаимодействию с R-белком.

Как сказано выше, продукты генов *Pto* томата и *avr-Pto* псевдомонады после автофосфорилирования белка *Pto* могут непосредственно взаимодействовать. *Pto*, кодирующий ген, был трансформирован в геном томата. В результате палисадные клетки мезофилла некротизировались. Одновременно происходили кумуляции салициловой кислоты, PR-белков, отложение каллезы, лигнификация клеточных стенок, т.е. метаболические эффекты, характерные для СВЧ-реакции. Растения стали устойчивыми к вирулентным расам *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* и *Cladosporium fulvum*, т.е. приобрели неспецифическую устойчивость. Таким образом, перепродукция внутриклеточной протеникиназы приводит к трансформации специфической устойчивости в неспецифическую. С геном *Pto* сцеплен ген *Ppf*. Его продукт имеет области LRR, NBS и CC (CNL-группа R-белков), а также длинную область с двумя прямыми повторами, не гомологичную известным белкам. Белок *Ppf* ответственен за СВЧ-реакцию на инсектицид фентион. По-видимому, действие белков *Pto* и *Ppf* в зараженной клетке скоординировано — после активизации *Pto* связью с *AvrPto* сигнал передается на *Ppf*, который осуществляет дальнейшую сигнальную трансдукцию. Следовательно, сверхпродукция *Pto* создает базовую устойчивость ко многим патогенам (еще одно указание на общность механизмов хозяйской и пехозийской устойчивости). Связывание с *AvrPto* может снизить базовую устойчивость. Но такую связь узнает белок *Ppf* и индуцирует СВЧ.

Предложено несколько гипотез, объясняющих причины непрямого взаимодействия (рис. 4.5). Рассмотрим две наиболее популярные.

1. *Сторожевая (Guard) модель* [Dangl, Jones, 2001]. Эффекторы нормально функционируют в качестве факторов патогенности. Их мишенями могут быть белки, участвующие в защите или в нормальных путях метаболизма. R-белок соединяется с этим комплексом и поворачивает клеточный метаболизм в сторону защитных реакций. Растения имеют сторожевые белки, узнающие факторы патогенности паразита (неспецифические элиситоры и супрессоры). R-белок взаимодействует с комплексом элиситор — сторожевой белок и активизирует защитный процесс. Эта модель основана на описанных выше взаимодействиях между белками *Pto* и *Ppf* томата и *AvrPto* *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Сторожевой белок *Pto* соединяется с эффектором, эту связь узнает белок *Ppf*, активизация которого вызывает трансдукцию иммунного ответа.



Рис. 4.5. Три модели прямого и непрямого взаимодействия Avr-белков фито-паразитов с R белками растений

Можно привести и другой пример, иллюстрирующий концепцию «ген на ген» или модель «зигзаг». Сторожевой белок *Arabidopsis thaliana* RIN4 узнает бактериальные эффекторы AvrRpm1 и AvrRB и фосфорилируется, после чего он активирует R-белок RPM1 и включает иммунный ответ ETI. В ответ на это паразит образует эффектор AvrRpt2 — протеазу, специфически разрушающую RIN4, а растение в ответ синтезирует R-белок RPS2, который активизируется при распаде RIN4 и включает ETI (рис. 4.6).

Эффектор *Phytophthora infestans* Avr2 взаимодействует в растении с фосфатазой BSL1, которая служит сторожевым белком, так как эту связь узнает белок R2 картофеля.

В отличие от прямого взаимодействия, которое позволяет R-белку узнавать ограниченное число структурно-гомологичных эффекторов, при сторожевой модели он может узнавать многие эффекторный белки опосредованно, через их взаимодействие со сторожевыми белками. Например, эффектор *Cladosporium fulvum* Avr2 взаимодействует с R-белком томата Cf2 после предварительного связывания со сто-

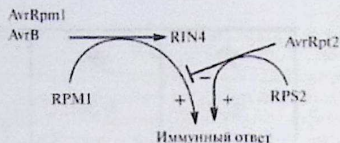


Рис. 4.6. Сторожевая модель взаимодействия Avr-белков паразитических псевдомонад с белками *Arabidopsis* [McHall et al., 2006]. Объяснения в тексте

рожевым белком Rcg3. Непрямое узнавание позволяет растению мониторить множество эффекторов относительно малым числом R-белков и, при этом, мониторить один эффектор разными R-белками. Например, два R-белка рапса Rlm4 и Rlm7 могут через сторожевые белки связывать эффекторный белок гриба *Leptosphaeria maculans* AvrLm4-7.

2. *Модель приманки (decoy)* [Van der Hoorn, Kamoun, 2008]. Мишенями паразитических эффекторов служат молекулы растения-хозяина, связь с которыми снижает иммунные свойства и улучшает условия существования паразита. Растение «подсовывает приманку», которая эффективно взаимодействует с эффектором и, наоборот, связавшись с ним, усиливает иммунный ответ. Примеры:

- эффектор *Pseudomonas syringae* AvrPto — ингибитор киназы. Он блокирует функции мембранных MAMPs рецепторов FLS2 и EFR1, содержащих киназные домены. Благодаря наличию эффектора бактерия может развиваться в растениях томата и *Arabidopsis*, содержащих соответственно EFR1 и FLS2. Белок Pto — серин-треониновая киназа, связываясь с AvrPto, вызывает через CNL-белок PRF иммунный ответ. Следовательно, мишень AvrPto — FLS2, а Pto — приманка;
- AvrB3 *Xanthomonas vesicatoria* — фактор регуляции транскрипции, связывающийся с промоторами определенных генов в ядрах перца и активизирующий эти гены. В частности, при связывании с промотором гена *Upa20* — регулятора размера клеток, происходит гипертрофия зараженных участков растения. В устойчивых сортах активируется промотор необычного R-гена — *rBS3*, который кодирует синтез флавиномоноксигеназы. В здоровых растениях этот фермент не экспрессируется, следовательно, он функционально не нужен, но в зараженных индуцирует иммунный ответ на бактериальное заражение, т.е. *rBS3* — ловушка для эффектора;
- заражение томата *Cladosporium fulvum* вызывает в качестве иммунного ответа синтез апопластного R-белка — протеазы PIP1. Эф-

фактор гриба Avr2 — ингибитор протеазы, связывающий PIP1. Однако растение образует вторую апопластную протеазу RCR3, играющую роль приманки.

4.3.4. Трансдукция сигнала

Связывание эффекторов комплексом белков устойчивого растения приводит к активизации серии ферментов, исследование которых проведено главным образом у *Arabidopsis*. Важнейшие из них следующие:

- EDS1 (enhanced disease resistance1);
- PAD4 — триацилглицеринлипаза;
- SID1, SID2 — белки, участвующие в биосинтезе СК;
- NDR (non-race-specific disease resistance1);
- NPR — ядерный белок, активатор семейства факторов транскрипции TGA;
- SNL1 — ядерный белок, транскрипционный репрессор SAR; NPR снимает репрессию;
- *PDF1*, *PDF2* — гены синтеза дефензина;
- EIN1 — регулятор этилена;
- COL1 — регулятор ЖАК.

В ходе реализации врожденного иммунитета (ответа на MAMPs паразитов) происходит экспрессия генов *COL1* и *EIN1*, активизация липооксигеназного пути трансдукции сигнала и синтез этилена и ЖАК. Последняя индуцирует экспрессию генов *PDF1* и *PDF2* и индукцию иммунного ответа, в частности синтез антимикробных белков дефензинов.

Расоcпецифическая устойчивость (взаимодействие R-белков с эффекторами паразитов) сопровождается экспрессией генов *EDS1*, *NDS1*, *PAD4*, *SID2*, активацией фенольного метаболизма и синтезом СК. Последняя активизирует экспрессию гена *NPR*, продукт которого снимает репрессию с активации генов иммунного ответа (*LAR* и *SAR*). Оба ответа: PTI (PAMPs-Triggered Immunity) и ETI (Effector-Triggered Immunity) качественно сходны, однако ETI обычно развивается быстрее, протекает острее и часто ассоциируется с гибелью клеток, окружающих инфицированную (реакцией СВЧ). На рис. 4.7 отражены этапы прохождения двух типов иммунного ответа и стрелками показана интерференция между ними. В частности, нахождение в клетке СК ингибирует протекание синтеза ЖАК вследствие торможения активности липооксигеназы — ключевого фермента метаболизма липидов. Кстати, противовоспалительное действие ацетилсалициловой кислоты (аспирина) обусловлено тем же процессом — ингибированием липооксигеназы (простагландинсин-

фактор гриба Avg2 — ингибитор протеазы, связывающий PIP1. Однако растение образует вторую апопластную протеазу RCR3, играющую роль приманки.

4.3.4. Трансдукция сигнала

Связывание эффекторов комплексом белков устойчивого растения приводит к активизации серии ферментов, исследование которых проведено главным образом у *Arabidopsis*. Важнейшие из них следующие:

- EDS1 (enhanced disease resistance 1);
- PAD4 — триацилглицеринлипаза;
- SID1, SID2 — белки, участвующие в биосинтезе СК;
- NDR (non-race-specific disease resistance 1);
- NPR — ядерный белок, активатор семейства факторов транскрипции TGA;
- SNL1 — ядерный белок, транскрипционный репрессор SAR; NPR снимает репрессию;
- *PDF1*, *PDF2* — гены синтеза дефензина;
- EIN1 — регулятор этилена;
- COL1 — регулятор ЖАК.

В ходе реализации врожденного иммунитета (ответа на MAMPs паразитов) происходит экспрессия генов *COL1* и *EIN1*, активизация липооксигеназного пути трансдукции сигнала и синтез этилена и ЖАК. Последняя индуцирует экспрессию генов *PDF1* и *PDF2* и индуцирует иммунный ответ, в частности синтез антимикробных белков дефензинов.

Расоспецифическая устойчивость (взаимодействие R-белков с эффекторами паразитов) сопровождается экспрессией генов *EDS1*, *NDS1*, *PAD4*, *SID2*, активацией фенольного метаболизма и синтезом СК. Последняя активизирует экспрессию гена *NPR*, продукт которого снимает репрессию с активации генов иммунного ответа (*LAR* и *SAR*). Оба ответа: PTI (PAMPs-Triggered Immunity) и ETI (Effector-Triggered Immunity) качественно сходны, однако ETI обычно развивается быстрее, протекает острее и часто ассоциируется с гибелью клеток, окружающих инфицированную (реакцией СВЧ). На рис. 4.7 отражены этапы прохождения двух типов иммунного ответа и стрелками показана интерференция между ними. В частности, нахождение в клетке СК ингибирует протекание синтеза ЖАК вследствие торможения активности липооксигеназы — ключевого фермента метаболизма липидов. Кстати, противовоспалительное действие ацетилсалициловой кислоты (аспирина) обусловлено тем же процессом — ингибированием липооксигеназы (простагландинсин-

фактор гриба Avr2 — ингибитор протеазы, связывающий PIP1. Однако растение образует вторую апопластную протеазу RCR3, играющую роль приманки.

4.3.4. Трансдукция сигнала

Связывание эффекторов комплексом белков устойчивого растения приводит к активизации серии ферментов, исследование которых проведено главным образом у *Arabidopsis*. Важнейшие из них следующие:

- EDS1 (enhanced disease resistance 1);
- PAD4 — триацилглицеринлипаза;
- SID1, SID2 — белки, участвующие в биосинтезе СК;
- NDR (non-race-specific disease resistance 1);
- NPR — ядерный белок, активатор семейства факторов транскрипции TGA;
- SNL1 — ядерный белок, транскрипционный репрессор SAR; NPR снимает репрессию;
- *PDF1*, *PDF2* — гены синтеза дефензина;
- EIN1 — регулятор этилена;
- COL1 — регулятор ЖАК.

В ходе реализации врожденного иммунитета (ответа на MAMPs паразитов) происходит экспрессия генов *COL1* и *EIN1*, активизация липооксигеназного пути трансдукции сигнала и синтез этилена и ЖАК. Последняя индуцирует экспрессию генов *PDF1* и *PDF2* и индукцию иммунного ответа, в частности синтез антимикробных белков дефензинов.

Расоцпецифическая устойчивость (взаимодействие R-белков с эффекторами паразитов) сопровождается экспрессией генов *EDS1*, *NDS1*, *PAD4*, *SID2*, активацией фенольного метаболизма и синтезом СК. Последняя активизирует экспрессию гена *NPR*, продукт которого снимает репрессию с активации генов иммунного ответа (*LAR* и *SAR*). Оба ответа: PTI (PAMPs-Triggered Immunity) и ETI (Effector-Triggered Immunity) качественно сходны, однако ETI обычно развивается быстрее, протекает острее и часто ассоциируется с гибелью клеток, окружающих инфицированную (реакцией СВЧ). На рис. 4.7 отражены этапы прохождения двух типов иммунного ответа и стрелками показана интерференция между ними. В частности, нахождение в клетке СК ингибирует протекание синтеза ЖАК вследствие торможения активности липооксигеназы — ключевого фермента метаболизма липидов. Кстати, противовоспалительное действие ацетилсалициловой кислоты (аспирина) обусловлено тем же процессом — ингибированием липооксигеназы (простагландинсин-

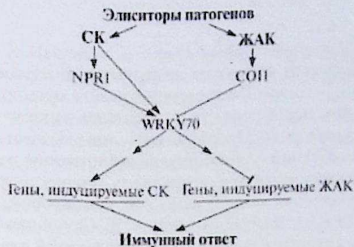


Рис. 4.8. Переключение сигнальных путей фактором регуляции транскрипции WRKY70 [Li et al., 2004]. Высокий уровень WRKY70 активизирует экспрессию по салициловому пути и репрессию генов жасмонового пути трансдукции сигнала. Низкий уровень способствует трансдукции сигнала по жасмоновому пути

вость, индуцированная фузариозом, защитила растения и от вертициллеза, а во втором случае произошла интерференция сигнальных путей, развивающихся в ответ на заражения двумя паразитами. Такие примеры не единичны [Pieterse et al., 2001]. Индукция устойчивости огурца против гриба *Colletotrichum orbiculare* делает его очень чувствительным у жуку *Diabrotica undecimpunctata* и к дынной тле. Устойчивый к ВТМ табак, зараженный вирусом, сильно страдает от повреждения гусеницами *Manduca sexta*, а трансгенный табак, у которого вследствие молчания гена ФАЛ редуцировано образование СК, поражается ВТМ, но обладает повышенной устойчивостью к личинкам *Heliothus virescens*.

Синтез полных и усеченных R-белков может происходить на одних и тех же матрицах вследствие альтернативного сплайсинга, который приводит к возникновению усеченных форм белков с различной комбинацией доменов. Сплайсинг регулируют одноцепочечные формы мiРНК, играющие роль негативных регуляторов, медиаторов молчания генов и промоторов их экспрессии.

4.4. РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ «ГОНКИ ВООРУЖЕНИЙ»

Тонкие механизмы узнавания микробных метаболитов, особенно в случаях адаптивного приобретенного иммунитета, при котором изменение одной аминокислоты в рецептируемом белке делает его «неузнаваемым», создают широкие возможности для паразитов уходить от рецепции с помощью мутационных изменений. Если функ-

циональный сайт эффектора не является одновременно сайтом, рецептируемым иммунной системой, то такие мутации не будут сильно снижать приспособленность их носителей и станут отбираться в популяциях паразитов. Подобная тенденция вызовет селективные накопления мутаций, способствующих узнаванию измененной молекулы паразита хозяином, и так далее. Например, у представителей рода *Phytophthora* обнаружено 700 эффекторов, несущих мотив RXRL-dEEF, а у *Hyaloperonospora* — 150. Семейство белков Y/F/WxС экспрессируется в гаусториях возбудителей злаковых ржавчин *Puccinia graminis tritici* (Pgt) и *P. triticina* (Pt) и мучнистой росы *Blumeria graminis hordei* (Bgh) [Goldfry et al., 2010]. У Bgh таковы 107 белков (19% транскриптома гаусторий), у Pgt — 178, а у Pt — 57.

Аналогичные данные получены и при изучении геномов растений-хозяев. В геномах растений различных видов обнаружено от 50 *R*-локусов (у папайи и огурца) до 653 у риса. Эти данные — показатели длительных коэволюционных конфликтов, вызванных «гонкой вооружений». В подобной ситуации победа всегда останется за паразитом. Поскольку генетические изменения (мутации, рекомбинации) в популяциях — редкие и случайные процессы, частота их фиксации зависит от размера популяций. Микроорганизмы в этом отношении имеют гигантские преимущества перед макроорганизмами. Большинство фитофаговых и зоофаговых грибов формирует несколько бесполой генераций в течение года, причем в каждой генерации единичные споры могут дать потомство из миллионов спор. Например, на одном гектаре площади под пшеницей или картофелем ежедневно формируется 10^{11} – 10^{13} спор мучнисторосяных, ржавчинных грибов и фитофторовых оомицетов [Дьяков, 1998]. Если принять в качестве средней частоты спонтанных мутаций одно ядро на миллиард, то получается, что на площади, равной 1 га посевов, ежедневно образуется от 100 до 10 000 мутантов по каждому гену. Эти расчеты сделаны для относительно сложных эукариотных организмов — грибов. Прокариотные бактерии и, тем более, неклеточные вирусы размножаются значительно быстрее. Так что любое генетическое изменение в структуре белков-рецепторов хозяина вызывает моментальное накопление в паразитической популяции штаммов, имеющих измененный эффектор, не узнающийся хозяином. Но мало этого. Большинство генов, контролирующих синтез эффекторов, образуют кластеры (островки патогенности), перемежающиеся с многочисленными транспозонами, многие гены локализованы в высоковариабельных субтеломерных областях хромосом [Raffaele, and Kamoun, 2012]. Все это увеличивает вероятность возникновения новых вариаций и за счет неканонических механизмов

изменчивости. Например, в геноме возбудителя пирикулярриоза риса *Magnaporthe oryzae* локусы вирулентности фланкированы генами, имеющими до пяти повторов в геноме, в том числе гомологичные мобильным элементам. Вследствие этого, во-первых, вариации Avr-генов в десятки раз превышают частоту вариаций иных, случайно выбранных генов, и, во-вторых, только у вариантов Avr-генов частота несинонимических замен нуклеотидов превышает частоту синонимических замен [Huang et al., 2014].

Позвоночные животные решили проблему «гонки вооружений» путем создания высокозатратной и чрезвычайно сложной системы синтеза избыточного разнообразия узнающих молекул и системы селективной амплификации антигенов, нужных для связывания внедрившегося антигена. Ни беспозвоночные животные, ни, тем более, растения в силу высказанных в начале книги соображений, не способны не только создать, но и эксплуатировать подобную систему.

Беспозвоночные животные пошли по пути увеличения числа рецепторных молекул, структурно гомологичных факторам неспецифического иммунитета, а функционально близких к факторам адаптивного иммунитета. Например, у млекопитающих описано немалым более десяти типов TLR-молекул. В геноме ланцетника выявлено более 70 генов, имеющих гомологию с *Toll*-генами дрозофилы, а у морского ежа — более 200 подобных генов.

В геномах высших растений может находиться информация о наличии сотен *R*-генов, причем около полувека назад было обнаружено [Favret, 1968], что распределение генов устойчивости в сортах пшеницы и других растений отличается от пуассоновского: устойчивые сорта проявляют тенденцию нести более одного гена. Локализация генов устойчивости на хромосомах не случайна: обычно это или «сложные» локусы (в одном локусе локализовано множество аллелей), или сцепленные гены. Например, у льна обнаружено около 30 кодоминантных генов устойчивости к разным расам возбудителя ржавчины *Melampsora lini*, образующих пять локусов. 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 — 1 ген. На коротком плече хромосомы 5 ячменя находится изофенический блок, состоящий из пяти локусов, которые определяют устойчивость к расам возбудителя мучнистой росы *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, причем в локусе M1a (Reg1) картировано около 20 кодоминантных генов (рис. 4.9). Устойчивость кукурузы к расам возбудителя северной ржавчины *Puccinia sorghi* контролируется генами, расположенными в пяти локусах. Два из них (*Rp1* и *Rp5*) тесно сцеплены.

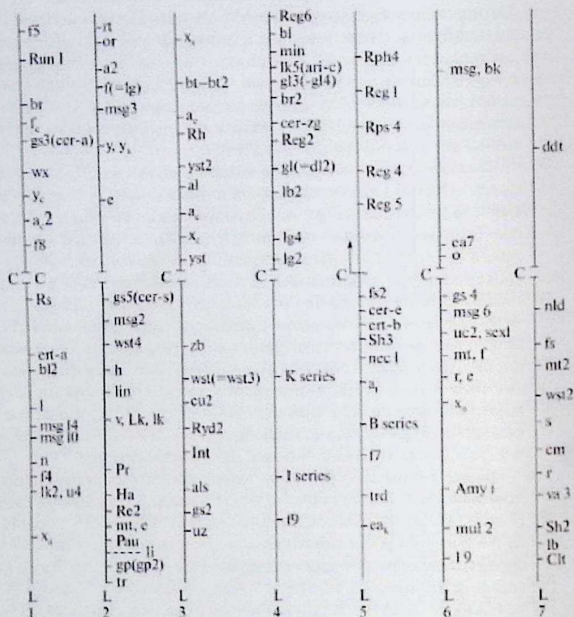


Рис. 4.9. Хромосомные карты ячменя. На коротком плече хромосомы 5 находится блок *R*-генов устойчивости к мучнистой росе

причем в одном из них (*Rp1*) картировано 14 аллельных и сцепленных локусов.

Такие «изофенические блоки» описаны практически у всех изученных растений, причем молекулярные исследования не только подтвердили результаты генетических анализов, но значительно увеличили число аллельных и тесно сцепленных генов [Michelmore, Mayers, 1998]. Поскольку продукты генов, *R*-белки, построены из сходных блоков, эти гены имеют протяженные гомологичные последовательности нуклеотидов. Поэтому между ними при половом процессе протекают внутри- и межгенные эктопические рекомбинации (включая неравный кроссинговер), в результате которых в потомстве наряду с родительскими генотипами возникает большое число ре-

комбинантных, имеющих гены устойчивости, последовательности оснований которых, а, следовательно, и способность к рецепции лиганда, отличаются от исходных (рис. 4.10). Например, в результате внутригенной рекомбинации в гетерозиготе льна *L2/L6* был получен гибрид, имеющий свойства специфичности к расе *L6* [Ellis et al., 1995]. Этим объясняется огромное число *R*-локусов, обнаруживаемых у растений. Компьютерное исследование (*in silico*) геномов растений 33 видов показало наличие у них около 4,5 тыс. предполагаемых *R*-белков [Sanseverino, Ercolano, 2012].

Встречаются два типа кластерной организации *R*-генов [Magone et al., 2013]: 1) увеличение числа генов в кластере происходило вследствие тандемных дупликаций, поэтому гены одного кластера находятся на одной ветви филогенетических деревьев; 2) увеличение числа генов кластера происходило вследствие эктопических реком-

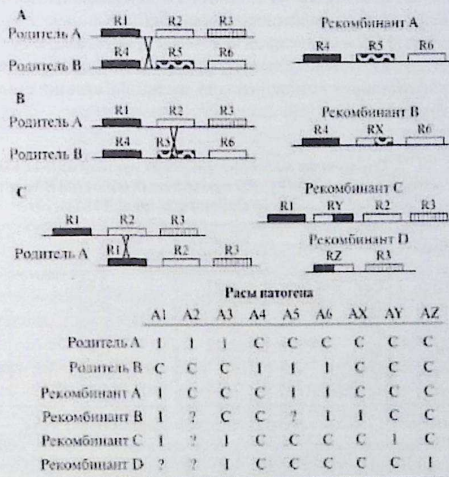


Рис. 4.10. Генерирование новых *R*-белков в результате эктопической рекомбинации участков ДНК, кодирующих LRR область

[Hammond-Kozak, Jones, 1997].

A–C — внутри- и межгенная эктопическая рекомбинация. Внизу — генерация новых генов вертикальной устойчивости: 1 — несовместимость (устойчивость); С — совместимость (восприимчивость)

бинаций, неравного кроссинговера, транспозиций и прочих хромосомных перестроек. В этом типе организации, который встречается чаще первого, гены одного кластера могут располагаться на разных ветвях филогенетического дерева. Бывают и смешанные кластеры генов. Например, гены, контролирующие устойчивость риса к бактерии *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xa21*, относятся к мультигенному семейству из восьми членов. Большинство из них картируются в одном локусе на хромосоме 11, где находится 5 генов ВУ и 1 ген количественной (ГУ). Эволюция этого сложного локуса происходила вследствие тандемных дупликаций, рекомбинаций и транспозиций. В кодирующей части генов обнаружены последовательности двух транспозонов — *Retrofit* и *Truncator*, которые локализованы в области, кодирующей LRR-домен [Song et al., 1997].

Среди доменов белков NBS-LRR наибольшей вариабельностью обладает домен LRR. И это понятно, так как именно данная область ответственна за узнавание варьирующихся молекул эффекторов паразитов. LRR — единственная область ДНК гена, контролирующего R-белок, в которой частота мутаций с несинонимическими заменами нуклеотидов превышает частоту мутаций с синонимическими заменами (табл. 4.5).

Таблица 4.5

Отношения несинонимических нуклеотидных замен к синонимическим ($K_A : K_S$) в различных областях R-генов растений [из Michelmore, Mayers, 1998]

Виды	Гены	Область NBS	Область LRR (между повторами)	Область LRR xx(L)x(L)xx*
Латук	Сем. <i>RG2</i>	0,37	0,63	2,06
Томат	<i>12C1, 12C2</i>	0,47	0,58	1,17
Томат	<i>M1</i>	0,43	0,76	1,93
Лен	<i>L6</i>	0,44	0,83	1,57
Томат	<i>Cf6/Cf9</i>		0,59	1,32
Рис	<i>Xa21 (B, D, F)</i>		0,52	2,11

Примечание. *Консенсусная последовательность xxLxx (L — лейцин, x — любая аминокислота). Лейцин включен в гидрофобный кор, другие аминокислотные остатки образуют гидрофильную поверхность, связывающуюся с лигандом.

При стабилизирующем отборе, направленном на сохранение фенотипа, несинонимические мутации обычно отменяются, вследствие чего соотношение их частот к частотам синонимических мутаций бывает меньше единицы. В локусах, полиморфизм которых благоприятен для существования популяции, наоборот, такое соотно-

шение превышает единицу. Превышение частоты несинонимических замен над синонимическими установлено для переменных доменов комплекса генов гистосовместимости у млекопитающих, поверхностных антигенов у клеточных паразитов и вирусов, генов вегетативной несовместимости у грибов.

Таким образом, в отличие от позвоночных животных, у которых особенностью транскрипции и трансляции антител создают огромный полиморфизм узнающих молекул *внутри индивидуальных организмов*, у высших растений полиморфизм узнающих молекул (R-белков) создается *между индивидуальными организмами*, в потомстве, на популяционном уровне. Популяционные генетики [см. Brown, Tellier, 2011] рассматривают две модели коэволюции растений-хозяев с паразитами: 1) «гонка вооружений», в основе которой лежит балансированный отбор — частая замена потерявших эффективность аллелей R- и Avr-генов; 2) «окопная война» — более долговременные циклы «сосуществования» аллелей взаимодействующих генов, частоты которых в популяциях зависят от степени эффективности нападения и защиты; в основе этой модели лежит частотно-зависимый отбор (модель «белой королевы»). «Гонка вооружений» характерна для моноциклических болезней (возбудители образуют одну генерацию в сезоне — головневые грибы, корневые гнили и др.), а при полициклических болезнях (ржавчинные, мучнисторосяные, пероноспорные и др.) возможны обе модели коэволюции — и «гонка вооружений», и «окопная война» [Tellier et al., 2013]. Также «гонка вооружений» более свойственна взаимоотношениям со специализированными паразитами, а «окопная война» — с неспециализированными. В сельскохозяйственных агроценозах, где селекционеры пытаются компенсировать отставание скорости создания нового «оружия защиты» от изменений «оружия нападения» паразитов, взаимоотношения с паразитом протекают, как правило, по законам «гонки вооружений», а в природных фитоценозах чаще распространены взаимоотношения по принципу «окопной войны».

Приведенные выше данные имеют принципиальное значение для практики защиты растений. Селекция чистых линий, содержащих один или несколько генов ВУ, которая господствовала многие годы в растениеводстве и была направлена на устранение генетического разнообразия растений, не только не решила проблем защиты от болезней, но усугубила эти проблемы. На смену пришли программы создания мультилинейных сортов-популяций, состоящих из линий, единообразных по ботаническим и агрономическим характеристикам, но различающихся генами устойчивости.

Мультилинейный сорт — это попытка вернуться к полиморфизму природных популяций растений при сохранении высокой продуктивности, качества и агротехнических удобств чистопородных сортов. Он имеет следующие преимущества.

1. Генетическая гетерогенность хозяина автоматически приводит к генетической гетерогенности популяции паразита. Поэтому наряду с вирулентными расами в популяции сохраняются маловирулентные, т.е. имеется некий баланс, популяционный гомеостаз, препятствующий накоплению спор отдельных рас до угрожающей концентрации.

2. Одинаковые по восприимчивости экземпляры растения-хозяина пространственно разделены. Поэтому снижается вероятность попадания спор отдельных рас на восприимчивые к ним растения, а попавшие на устойчивые растения споры не оставляют потомства.

3. Внедряясь в клетки устойчивых линий, проростки авирулентных к ним рас индуцируют защитные реакции и тем самым иммунизируют их против заражения проростками вирулентной расы.

4.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заканчивая рассмотрение основных факторов устойчивости растений к болезням, представленных в гл. 1, 2 и 4, следует сделать несколько заключительных замечаний. В учебных целях эти факторы излагались последовательно, как постепенное развитие инфекционного процесса и ответа на него растения-хозяина. Временная последовательность событий обусловлена тем, что столкнувшись с первыми факторами (например, кутикулярным барьером) часть потенциально патогенных микроорганизмов будет отсечена, однако другие смогут этот барьер преодолеть, перейдя на следующий уровень взаимодействий, и так далее до «гонки вооружений» на этапе взаимодействий Avr- и R-белков. Исторически, в процессе коэволюции растений и их паразитов, по-видимому, так и было. Например, сложные фенолы, включая лигнин, растения стали синтезировать в карбоне (каменноугольном периоде), т.е. у таксонов, возникших ранее, этих важных факторов иммунитета не было. Однако сейчас, вследствие коэволюции с паразитами, факторы защиты, описанные в разных главах книги, действуют не изолированно друг от друга: любой стресс, будь то механическое повреждение или заражение, вызывает сеть различного рода взаимодействующих процессов. Например, у растений, как и у животных, обе системы иммунитета (мембранные рецепторы и R-белки) взаимодействуют координированно. У *Arabidopsis*, например, обнаружены три типа TIR-молекул: TNL

(R-белок), TN (нет LRR-домена) и TX (не определенный остаток TIR-молекулы) [Nandety et al., 2013]. В геноме *Arabidopsis* находятся 30 генов TX и 21 ген TN. Они — элементы врожденного иммунитета, в то время как TNL — R-белки. Гены TN и TX образуют сцепленные пары с TNL-генами, что функционально важно. Белки TN и TX способны взаимодействовать как с TNL, так и с EDS1, через который происходит трансдукция сигнала после узнавания эффекторного белка. В этом видится связь факторов врожденного и приобретенного иммунитета у растений.

Более того, в результате ферментативного повреждения первого барьера на пути продвижения паразитов — кутикулы — образуются олигомеры кутина (DAMPs), которые индуцируют накопление в клетке активных форм кислорода (АФК), в частности, участника сигнальной трансдукции пероксида водорода. Возбудитель серой гнили *Botrytis cinerea* выделяет в зараженную клетку оксалаты, ингибирующие образование АФК. Однако растения-мутанты дефектные по синтезу фитогормона абсцизовой кислоты или частично дефектные по синтезу кутина (неполный синтез с наличием непалимеризованных олигомеров), находятся в состоянии предрасположенности (priming) и реагируют быстрым накоплением АФК и защитных продуктов в ответ на заражение. Это означает, что уже на уровне кутикулы возникают сигналы, аналогичные сигналам, вызванному взаимодействием DAMPs с рецепторами. То же самое — ответ на присутствие в ризосфере непатогенных бактерий, метаболиты которых индуцируют системную устойчивость всего растения.

Контрольные вопросы и задания

1. Опишите признаки вертикальной и горизонтальной устойчивости.
2. Что представляют собой Avr-белки вирусов растений?
3. Каково разнообразие Avr-белков фитопатогенных бактерий?
4. Охарактеризуйте Avr-белки гриба *Cladosporium fulvum*.
5. Как осуществляется транспорт эффекторов в растительные клетки?
6. Что такое «цена вирулентности» и от чего зависит ее размер?
7. Охарактеризуйте структуру R-белков растений и роль отдельных доменов.
8. Какие предложены модели взаимодействия эффекторов с R-белками?
9. Какова организация R-генов на хромосомах растений и ее роль в поддержании длительной устойчивости растений к болезням?

(R-белок), TN (нет LRR-домена) и TX (не определенный остаток TIR-молекулы) [Nandety et al., 2013]. В геноме *Arabidopsis* находятся 30 генов TX и 21 ген TN. Они — элементы врожденного иммунитета, в то время как TNL — R-белки. Гены TN и TX образуют сцепленные пары с TNL-генами, что функционально важно. Белки TN и TX способны взаимодействовать как с TNL, так и с EDS1, через который происходит трансдукция сигнала после узнавания эффекторного белка. В этом видится связь факторов врожденного и приобретенного иммунитета у растений.

Более того, в результате ферментативного повреждения первого барьера на пути продвижения паразитов — кутикулы — образуются олигомеры кутина (DAMPs), которые индуцируют накопление в клетке активных форм кислорода (АФК), в частности, участника сигнальной трансдукции пероксида водорода. Возбудитель серой гнили *Botrytis cinerea* выделяет в зараженную клетку оксалаты, ингибирующие образование АФК. Однако растения-мутанты дефектные по синтезу фитогормона абсцизовой кислоты или частично дефектные по синтезу кутина (неполный синтез с наличием неполимеризованных олигомеров), находятся в состоянии предрасположенности (priming) и реагируют быстрым накоплением АФК и защитных продуктов в ответ на заражение. Это означает, что уже на уровне кутикулы возникают сигналы, аналогичные сигналам, вызванным взаимодействием DAMPs с рецепторами. То же самое — ответ на присутствие в ризосфере непатогенных бактерий, метаболиты которых индуцируют системную устойчивость всего растения.

Контрольные вопросы и задания

1. Опишите признаки вертикальной и горизонтальной устойчивости.
2. Что представляют собой Avt-белки вирусов растений?
3. Каково разнообразие Avt-белков фитопатогенных бактерий?
4. Охарактеризуйте Avt-белки гриба *Cladosporium fulvum*.
5. Как осуществляется транспорт эффекторов в растительные клетки?
6. Что такое «цена вирулентности» и от чего зависит ее размер?
7. Охарактеризуйте структуру R-белков растений и роль отдельных доменов.
8. Какие предложены модели взаимодействия эффекторов с R-белками?
9. Какова организация R-генов на хромосомах растений и ее роль в поддержании длительной устойчивости растений к болезням?

Цитированная литература

- Вавилов Н.И. Законы естественного иммунитета растений к инфекционным заболеваниям. Цит. в кн. «Вавилов Н.И. Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям» / под ред. А.Н. Андреева. — М., 1986. — С. 439–493.
- Ван дер Планк Я. Устойчивость растений к болезням [Текст] / Я. Ван дер Планк. — М.: Колос, 1972.
- Дьяков Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов [Текст] / Ю.Т. Дьяков. — М.: Муравей, 1998.
- Жуковский П.М. Происхождение естественного генотипического иммунитета культурных растений и их сородичей (теория сопряженной эволюции растения-хозяина и паразита) [Текст] / П.М. Жуковский // Культурные растения и их сородичи. — Л., 1971. — С. 82–91.
- Одичова И.Г. Горизонтальная устойчивость: генетика и возможность преодоления паразитом [Текст] / И.Г. Одичова, Л.Ф. Шеломова // Изменчивость фитопатогенных микроорганизмов. — М.: Колос, 1983. — С. 51–60.
- Пухальский В.А. Проблема естественного и приобретенного иммунитета растений [Текст] / В.А. Пухальский, Т.И. Олинцова, Л.И. Извекова [и др.] // Вестник ВОГиС. — 2007. — 11. — С. 631–649.
- Фундаментальная фитопатология [Текст] / под ред. Ю.Т. Дьякова. — М.: URSS, 2012.
- Bos J.I.B., Armstrong M.R., Glory E.M., et al. *Phytophthora infestans* effector Avr3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. 107: 9909–9914.
- Brown J.K., Tellier A. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology // Annu. Rev. Phytopathol. 2011. 49: 345–367.
- Burki F., Shalhjian-Tabrizi K., Minde M., et al. Phylogenomics reshuffles the eukaryotes supergroups. PLOS One. 2007. 268. e790.
- Dangl J.L., Jones J.D.C. Plants pathogens and integrated defence responses to infection // Nature. 2001. 411: 826–833.
- De Jonge R., Bolton M.D., Thomma B.P.H.J. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors // Curr. Opinion Plant Biol. 2011. 14: 1–7.
- De Wit P.J.G.M., Mehrabi R., van den Burg H.A., Stergiopoulos I. Fungal elicitor proteins // Molec. Plant Microbe Interact. 2009. 10: 735–747.
- Ellis J.G., Lawrence G.J., Finnegan E.J., Anderson P.A. Contrasting complexity of two rust resistance loci in flax // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. 92: 4185–4188.
- Ennos R.A., MacConnell U.C. Using genetic markers to investigate natural selection in fungal populations // Canad. J. Bot. 1995. 73. Suppl. 1. 300–310.
- Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept // Annu. Rev. Phytopathol. 1971. 9: 275–296.
- Gates J.E., Loegering W.Q. Mutation to wider virulence in *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*: evidence for the existence of loci which allow the fungus to overcome several host resistance genes simultaneously // App. Envir. Microbiol. 1991. 57: 2332–2336.
- Goldfry D., Thlenius H.B., Pedersen C., et al. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/E/WxK-motiv // DMC Genetics. 2010. 11: 317B. DOI:10.1186/1471-2164-11-317.

Hammon-Kozak K.E., Jones J.D.G. Plant disease resistance genes // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 1997. 48. 575–607.

Huang J., Si W., Deng Q., Li P., Yang S. Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* // BMS Genetics. 2014. DOI: 10.1186/1471-2156-15-45.

Hueck C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. 62: 379–433.

Li J., Brader G., Palva E.T. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate mediated and salicylate mediated signals in plant defense // Plant Cell. 2004. 16: 319–331.

McHall L., Koehl P., Michelmore R.W. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards // Genome Biol. 2006. 7.212. doi. 10.1186/96-2006-7-4-212.

Maleck K., Dietrich R.A. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? // Trends in Plant Sci. 1999. 4: 215–219.

Marone D., Russo M.A., Laido G., et al. Plant Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich-Repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses // Int. J. Molec. Sci. 2013. 14: 7302–7326.

Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chimwongse J., et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato // Science. 1993. 262: 1432–1436.

Michelmore R.W., Mayers B.C. Cluster of resistance genes in plants evolve a divergent selection and birth-and-death process // Genome Research. 1998. 8: 1113–1130.

Nandety R.S., Caplan L., Cavanaugh K., et al. The role of TIR-NBS and TIR-X proteins in plant basal defense responses // Plant Physiol. 2013. 162: 1459–1472.

Parlevliet J.E., Zadoks J.C. The integrate concept disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants // Euphytica. 1977. 26: 5–21.

Petre B., Kamoun S. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cell? // PLOS Biology. 2014. DOI:10.1371/journal.pbio.1001801.

Pieterse C.M.J., Ton S., Van Loon L.C. Cross-talk between plant defense signaling pathways: boots or burden? // AgBiotech. 2001. Net. 3. ABN 068.

Raffaële S., Kamoun S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better // Nature Rev. Microbiol. 2012. DOI:10.1038.1-14.

Sanseverino W., Ercolano M.R. *In silico* approach to candidate R-proteins and to define their domain architecture // BMS Res Notes. 2012. 5.608.doi: 10.1186/1756-0500-5-678.

Song W.-Y., Pi L.-Y., Wang G.-L., et al. Evolution of the rice *Xa21* disease resistance gene family // Plant Cell. 1997. 9: 1279–1287.

Sun F., Kale S.D., Azurmendi H.F., et al. Structural basis for interactions of the *Phytophthora soja* RXLR effector Avh5 with phosphatidylinositol-3-phosphate and for host cell entry. Molecular // Plant-Microbe Interact. 2013. 26: 330–344.

Tellier A., Moreno-Ganez S., Stephan W. Speed of adaptation and genomic footprints of host-parasite coevolution under arm races and trench warfare dynamic. 2013. Arxiv.org/ftp/arxiv/1307/1307.6729.

Van der Hoorn R.A.L., Kamoun S. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors // Plant Cell. 2008. 20: 2009–2017.

Zhu Y., Quian W., Hua J. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins // PLOS Pathogens. 2010. DOI: 10.1371.

Zvereva A.S., Poodgin M.M. Silence and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens // Viruses. 2012. 4: 2578–2597.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ НАУКОЙ ДАНЫХ О МЕХАНИЗМАХ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ИХ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ И ВРЕДИТЕЛЕЙ (МЕТОДЫ ИСКУССТВЕННОГО ПОВЫШЕНИЯ ФИТОИММУНИТЕТА)

В предыдущих главах рассмотрены результаты сложных, дорогостоящих экспериментальных исследований интимных механизмов взаимоотношений растений с паразитическими организмами. Эти исследования имеют фундаментальное общепроизводственное значение: во-первых, как подходы к пониманию механизмов взаимодействия таксономически отдаленных организмов, проблемы специфичности, потоков сигнальных молекул и т.п.; во-вторых, для изучения коэволюции организмов в биоценозах, взаимных переходов между симбиотическими и паразитическими взаимоотношениями. Однако наиболее важна третья сторона этих исследований — практическая.

Классик фитопатологии Я. ван дер Планк писал: «...слишком долго в некоторых научных учреждениях фундаментальные исследования понимались как... не связанные с нуждами фермеров и не имеющие вероятного применения в сельском хозяйстве. Я полагаю, что все это меняется; практика показывает, что обычно требуется больше интеллектуальной смелости для решения проблемы непосредственного практического значения, чем проблемы, решаемой главным образом ради опубликования в научном журнале».

Исследования механизмов патогенности микроорганизмов и устойчивости растений к болезням и вредителям важны прежде всего как фундаментальная основа для разработки высокоэффективных мероприятий по защите растений. В основе этих мероприятий могут быть положены следующие приемы:

- индукция защитных свойств растений микробными элиситорами путем обработки определенными микроорганизмами или их метаболитами (MAMPs, эффекторами);
- экзотенное введение в растение сигнальных молекул (СК, ЖАК и др.) или их химически синтезированных имитаторов;

- использование генно-инженерных методов для введения в геном сельскохозяйственных растений желательных генов, контролируемых устойчивостью или регулирующих метаболизм в нежелательном для паразитов направлении.

В учебниках, посвященных традиционным направлениям защиты растений от болезней, разные методы защиты — химический с использованием фунгицидов, биологический с использованием микробов-антагонистов и селекционный с созданием и размещением устойчивых к болезням сортов — рассматривались каждый сам по себе вне связи с другими. Их объединяли только принципы интегрированной защиты растений, использование которых позволяло, например, с помощью частично устойчивых сортов растений уменьшать число химических обработок.

Принципы молекулярной фитопатологии позволили соединить традиционные методы защиты растений от болезней в единый узел, т.е. не сочетать разные методы, а использовать различные факторы и методические подходы как составные части одного защитного мероприятия. Например, можно выделенное из микроба-антагониста антигрибное соединение использовать в качестве фунгицида, сочетая биологический и химический методы защиты, а можно ген, кодирующий это соединение, трансформировать в геном восприимчивого сорта, прибавив к этому сочетанию селекцию устойчивых сортов.

5.1. ИНОКУЛЯЦИЯ НЕПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ («ВАКЦИНАЦИЯ»)

В предисловии к этому учебнику было сказано, что столетие назад исследования в области фитоиммунитета ввели за медицинскими исследованиями в области иммунитета были посвящены главным образом вакцинации — индукции образования антител заражением ослабленными штаммами патогенных организмов. И хотя антител у растений обнаружено не было, эти исследования не остались без продолжения, а в 70–80-х годах XX в. благодаря работам американского фитопатолога Дж. Куча [Kuc, 1982; Kuc, Hammerschmidt, 1978 и др.] приобрели широкий размах.

Методы биологической защиты растений, при которой микробы — антагонисты фитопатогенов вносят в растение или в окружающую среду с целью подавить численность возбудителей болезней или их паразитический потенциал, здесь рассматриваться не будут. Их обычно изучают в курсах «Общей фитопатологии». Приведем лишь данные о влиянии неспецифических для защищаемого рас-

- использование генно-инженерных методов для введения в геном сельскохозяйственных растений желательных генов, контролируемых устойчивостью или регулирующих метаболизм в нежелательном для паразитов направлении.

В учебниках, посвященных традиционным направлениям защиты растений от болезней, разные методы защиты — химический с использованием фунгицидов, биологический с использованием микробов-антагонистов и селекционный с созданием и размещением устойчивых к болезням сортов — рассматривались каждый сам по себе вне связи с другими. Их объединяли только принципы интегрированной защиты растений, использование которых позволяло, например, с помощью частично устойчивых сортов растений уменьшать число химических обработок.

Принципы молекулярной фитоиммунологии позволили соединить традиционные методы защиты растений от болезней в единый узел, т.е. не сочетать разные методы, а использовать различные факторы и методические подходы как составные части одного защитного мероприятия. Например, можно выделенное из микроба-антагониста антигрибное соединение использовать в качестве фунгицида, сочетая биологический и химический методы защиты, а можно ген, кодирующий это соединение, трансформировать в геном восприимчивого сорта, прибавив к этому сочетанию селекцию устойчивых сортов.

5.1. ИНОКУЛЯЦИЯ НЕПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ («ВАКЦИНАЦИЯ»)

В предисловии к этому учебнику было сказано, что столетие назад исследования в области фитоиммунитета велел за медицинскими исследованиями в области иммунитета были посвящены главным образом вакцинации — индукции образования антител заражением ослабленными штаммами патогенных организмов. И хотя антител у растений обнаружено не было, эти исследования не остались без продолжения, а в 70–80-х годах XX в. благодаря работам американского фитопатолога Дж. Куча [Куча, 1982; Куча, Hammerschmidt, 1978 и др.] приобрели широкий размах.

Методы биологической защиты растений, при которой микробы — антагонисты фитопатогенов вносят в растение или в окружающую среду с целью подавить численность возбудителей болезней или их паразитический потенциал, здесь рассматриваться не будут. Их обычно изучают в курсах «Общей фитопатологии». Приведем лишь данные о влиянии неспецифических для защищаемого рас-

- использование генно-инженерных методов для введения в геном сельскохозяйственных растений желательных генов, контролирующей устойчивость или регулирующих метаболизм в нежелательном для паразитов направлении.

В учебниках, посвященных традиционным направлениям защиты растений от болезней, разные методы защиты — химический с использованием фунгицидов, биологический с использованием микробов-антагонистов и селекционный с созданием и размещением устойчивых к болезням сортов — рассматривались каждый сам по себе вне связи с другими. Их объединяли только принципы интегрированной защиты растений, использование которых позволяло, например, с помощью частично устойчивых сортов растений уменьшать число химических обработок.

Принципы молекулярной фитоиммунологии позволили соединить традиционные методы защиты растений от болезней в единый узел, т.е. не сочетать разные методы, а использовать различные факторы и методические подходы как составные части одного защитного мероприятия. Например, можно выделенное из микроба-антагониста антирибное соединение использовать в качестве фунгицида, сочетая биологический и химический методы защиты, а можно ген, кодирующий это соединение, трансформировать в геном восприимчивого сорта, прибавив к этому сочетанию селекцию устойчивых сортов.

5.1. ИНОКУЛЯЦИЯ НЕПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ («ВАКЦИНАЦИЯ»)

В предисловии к этому учебнику было сказано, что столетие назад исследования в области фитоиммунитета вслед за медицинскими исследованиями в области иммунитета были посвящены главным образом вакцинации — индукции образования антител заражением ослабленными штаммами патогенных организмов. И хотя антител у растений обнаружено не было, эти исследования не остались без продолжения, а в 70–80-х годах XX в. благодаря работам американского фитопатолога Дж. Куча [Куча, 1982; Куча, Hammerschmidt, 1978 и др.] приобрели широкий размах.

Методы биологической защиты растений, при которой микробы — антагонисты фитопатогенов вносят в растение или в окружающую среду с целью подавить численность возбудителей болезней или их паразитический потенциал, здесь рассматриваться не будут. Их обычно изучают в курсах «Общей фитопатологии». Приведем лишь данные о влиянии неспецифических для защищаемого рас-

тения видов или слабопатогенных штаммов микроорганизмов на устойчивость растения к последующему заражению патогенными штаммами.

5.1.1. Инокуляция вирусов

Интерференция между генетически или серологически родственными штаммами вирусов обусловлена множественными механизмами, в частности конкуренцией за сайты депротенинизации и репликации. Однако многими опытами показано, что слабопатогенные штаммы вирусов вызывают явления SAR, поэтому данный прием обеспечивает и усиление иммунного ответа растения. Следовательно, как и при вакцинации животных, в организме вырабатывается приобретенный иммунитет в результате заражения ослабленным (аттенуированным) штаммом вируса, хотя, конечно, механизмы приобретенной устойчивости различны. Кроме того, в клетках позвоночных животных вакцина вскоре после введения инактивируется, в то время как для проявления эффекта интерференции необходима постоянная репродукция в клетках растения ослабленного штамма.

Аттенуированные штаммы, используемые в качестве вакцины, получают из нормальных патогенных штаммов с помощью искусственного мутагенеза, пассажей через растения других видов или выделяют из природных популяций вирусов. Подобный штамм ВТМ, слабопатогенный для томата, был выделен в 70-х годах XX в. в лаборатории вирусолога К.С. Сухова и был использован в качестве защитного агента против стрика во многих тепличных хозяйствах, выращивающих томаты. Исследования показали, что у большинства вакцинированных растений симптомы болезни не проявились даже в условиях 100%-ного поражения невакцинированных, урожай повышается на 20–30%, снижается процент шуплых, невсхожих семян. Молекулярные исследования штамма, использованного в качестве вакцины [Пухальский и др., 2007], показали, что снижение его патогенности обусловлено заменой аргинина на гистидин в определенном сайте молекулы белка оболочки вируса. Эти данные позволяют конструировать на молекулярном уровне новые ослабленные вирусные вакцины.

Высокий эффект получен при вакцинации цитрусовых мягким штаммом вируса тристезы, которая является опаснейшим патогеном цитрусовых культур на Американском континенте. К 1980 г. было вакцинировано 8 млн деревьев, и среди них лишь менее чем у 1% проявились симптомы суровой тристезы. Высокий эффект обусловлен тем, что (–)-цепочки РНК сурового штамма в процессе репликации спариваются с (+)-цепочками находящегося в клетках мяг-

кого штамма и, веледствие этого, не могут транскрибировать собственные (+)-цепочки [Palukaitis, Zaitlin, 1984].

Показана также возможность перекрестной защиты между разными видами вирусов и виридов. Например, вириды карликовости хризантем и веретеновидности картофеля защищали хризантемы от вирида экзокортиса цитрусовых, но не от вирида хлоротической крапчатости хризантем [Niblett et al., 1978]. Чаще, однако, при смешанной инфекции, вызванной вирусами разных видов, симптомы болезни, обусловленные каждым компонентом смеси, усиливаются, т.е. проявляется синергизм. И в этом заключается одна из серьезнейших опасностей вакцинации.

5.1.2. Инокуляция бактерий

Ризосферные бактерии — хорошо известные и широко используемые агенты биологической защиты растений от возбудителей болезней. Они могут продуцировать антибиотические соединения, подавляющие рост фитопатогенов, например антибиотики *феназины* псевдомонад, активные против грибов рода *Fusarium*. Некоторые виды бактерий — эффективные антагонисты фитопатогенных грибов, лишаящие их источников железа. Но в контексте данной книги представляет интерес явление ISR (Induced Systemic Resistance) — индуцирование системной устойчивости, которая защищает корни и даже надземные части растений от заражения фитопатогенными грибами или бактериями. ISR, вызываемая некоторыми почвообитающими бактериями, отличается от описанной ранее SAR, так как ее эффект не зависит от салициловой кислоты. В ее основе лежит продукция прикрепившимися к корням бактериальными клетками фермента АЦК-дезаминазы, участвующего в превращении 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) в фитогормон *этилен*, который наряду с ЖАК является важным регулятором сигнальной трансдукции защитных реакций растений. ISR защищает растения различных видов (*Arabidopsis*, фасоль, огурцы, табак, томат и др.) от заражения бактериями, грибами и вирусами.

В настоящее время в России разрешены к использованию в сельском хозяйстве препараты, созданные на основе бактериальных культур. Например, препарат *фитоспорин* (определенный штамм *Bacillus subtilis*) повышает всхожесть семян и снижает пораженность корневыми гнилями и другими болезнями за счет индукции ISR.

5.1.3. Инокуляция грибов

Попытки использовать непатогенные и слабопатогенные виды и штаммы грибов для защиты от патогенных штаммов предприни-

мались уже более 100 лет. Как и в отношении бактерий, наряду с угнетением возбудителей болезней вследствие продуцирования антибиотиков и прямого паразитизма, возможно индуцирование LAR и SAR вследствие выделения MAMPs и PAMPs — олигомеров хитина и глюкана, некоторых белков и др. Многочисленные опыты, проведенные в лаборатории американского фитопатолога Дж. Куча [Kuc, 1982], показали, что заражение нижних листьев растений различных видов непатогенными или слабо патогенными штаммами фитопатогенных грибов иммунизирует все растение и защищает его от последующих заражений. Например, инокуляция в листья огурца *Colletotrichum lagenarium* вызывала экспрессию устойчивости против 13 патогенов, включая грибы, бактерии и вирусы; при этом защитный эффект сохранялся в течение 4–6 нед.

5.2. ОБРАБОТКА РАСТЕНИЙ МЕТАБОЛИТАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ (БИОГЕННЫМИ ЭЛИСИТОРАМИ)

В ряде случаев технологичнее использовать для биологической защиты не микроорганизмы, индуцирующие системную устойчивость, а выделенные из них метаболиты — MAMPs, PAMPs или эф-фекторы. Дело в том, что слаботогенные штаммы могут вследствие мутаций повысить свою патогенность, а численность внесенных почвообитающих сапротрофов может, вследствие почвенного гомеостаза, быстро уменьшаться или они вообще могут быть элиминированы. Поэтому разработаны технологии обработки растений метаболитами микроорганизмов — биогенными элиситорами из разных классов химических соединений.

Полевые опыты свидетельствуют о высокой эффективности биогенных элиситоров, эффективность которых близка к эффективности современных фунгицидов, но которые лишены недостатков, присущих последним. Преимущества иммунизации можно свести к следующим пунктам [Озерецковская и др., 1994, с дополнениями]:

- применение биогенных элиситоров экологически менее опасно, чем фунгицидов, так как основано на активизации природных механизмов устойчивости;
- оно характеризуется системностью и длительностью защитного действия;
- действующие вещества используются в очень низких концентрациях; рекомендуется применять элиситоры в низких концентрациях, вызывающих не возникновение высокоэнергетических защитных реакций, а сенсбилизацию растений к последующему заражению (priming);

- в проявлении устойчивости участвуют множественные защитные системы (АФК, фитоалексины, антимикробные пептиды), что снижает вероятность возникновения и накопления резистентных форм паразитов;
 - иммунизация обладает комплексным защитным эффектом против грибов, вирусов, бактерий, нематод и, возможно, насекомых;
 - при этом отсутствует токсическое действие на полезные организмы — не мишени, окружающие растения;
 - отсутствуют остатки токсичных веществ в урожае;
 - часто эффект иммунизации сопровождается стимуляцией ростовых процессов у обработанных растений.
- Рассмотрим некоторые группы биогенных иммунизаторов.

5.2.1. Липиды

Ненасыщенные жирные кислоты, в частности арахидоновая кислота (АК), важнейшая составная часть РАРPs фитофторозных оомицетов (см. гл. 2). Опыты, проведенные О.Л. Озерецковской и ее сотрудниками, показали, что в клубнях картофеля, обработанных АК, устойчивость к фитофторозу проявляется уже через сутки после обработки и сохраняется до нескольких месяцев. В иммунизированных клубнях накапливаются РR-белки, ферменты пероксидаза, полифенолоксидаза и липооксигеназа [Озерецковская и др., 1994].

Другой пример использования липидов в качестве индукторов устойчивости растений — препарат *альбит*, который представляет собой поли- β -гидроксимасляную кислоту, получаемую из почвообитающей бактерии *Bacillus megaterium*. Препарат взаимодействует с НАДФ-оксидазной системой и индуцирует синтез в клетках СК. Испытания показали высокую эффективность альбита против возбудителей корневых гнилей, мучнистых и ложных мучнистых рос, антракнозов и других болезней на зерновых культурах, сахарной свекле, подсолнечнике, льне, винограде [Минеев, 2008]. Препарат зарегистрирован и разрешен к использованию во многих странах, в том числе в РФ. Важно также, что альбит повышает устойчивость и к абиотическим стрессам — засухе и заморозкам, гербицидам и химическим токсикантам в почве и в воздухе; это единственный антидот биогенной природы для растений.

5.2.2. Аминосакхара

В сельском хозяйстве широкое применение нашли препараты, приготовленные из хитина, особенно деацетилированный хитин *хитозан*. Хитин и хитозан вызывают быструю деполаризацию мембран,

индуцируют LAR и SAR к грибам, бактериям, вирусам и нематодам. Их защитное действие против вирусных инфекций выражается в уменьшении числа некрозов и ингибировании распространения системных вирусов по растению. Хитозан связывается с анионными компонентами растительных мембран и клеточных стенок (фосфолипидами, пектином), затрудняя тем самым адсорбцию вирусов, усиливает синтез каллезы, препятствующей дальнейшему распространению вирусов. В протопластах табака хитозан индуцирует синтез белка (молекулярной массой 130 кДа) — РНК-зависимой РНК-полимеразы, вызывающей посттрансляционное молчание вирусных генов, а также синтез рибонуклеазы (молекулярной массой 123 кДа), деградирующей вирусные РНК. Комплектуясь с анионными пероксидазами, хитозан вызывает утолщение и лигнификацию клеточных стенок, а соединяясь с нуклеиновыми кислотами, выступает как регулятор транскрипции. Вследствие этого хитозан индуцирует синтез фитоалексинов, PR-белков, включая хитиназу и β -глюканазу, АФК, липоксигеназы (ЛОГ) [Максимов, 2013]. Как было сказано в гл. 2, ЛОГ участвует в сигнальных системах, индуцируемых СК и ЖАК. По-видимому, разные сигнальные пути протекают при участии различных изоферментов ЛОГ. Например, при заражении пшеницы возбудителем стеблевой ржавчины или при обработке растений гликопептидным элиситором, выделенным из ростковых трубок ржавчинного гриба, накапливается ЛОГ молекулярной массой 92 кДа (ЛОГ-92), а при обработке хитозаном или МеЖАК — ЛОГ-100, т.е. *Puccinia graminis* и хитозан индуцируют разные пути трансдукции сигнала. В обработанных хитозаном клетках риса изменяется транскрипционная активность 71 гена.

Олигомеры хитина, содержащие менее пяти молекул ацетилглюкозамина, не индуцируют защитных реакций у растений. На большей индуцирующей способности и защитными свойствами обладали гексамеры-октамеры хитозана. В гл. 2 было указано, что октамеры хитина узнаются мембранными рецепторами, содержащими мотив Lis-M; по-видимому, такая протяженность молекул оптимальна для узнавания рецепторами и индуцирования иммунных свойств.

Индукция SAR служит причиной пролонгированной защиты растений, обработанных хитозаном. Например, обработка клубней картофеля повышает фитофтороустойчивость не только самих клубней, но также выросших из них зеленых растений в поле и даже клубней последующего урожая [Переход и др., 1997].

Особенно перспективно применение хитозана для защиты сочной продукции, подверженной быстрому загниванию (например, плодов

земляники, малины). Задержка с ее реализацией всего на несколько дней может привести к потере товарного качества всей партии, а пред- и послеуборочная обработка фунгицидами опасна, поскольку в остаточных количествах препарат сохраняется в продукции, потребляемой в сыром виде. Как показано на рис. 5.1, безвредный для здоровья хитозан не уступает по эффективности рекомендуемым коммерческим фунгицидам, способен продлить сохранность плодов земляники на несколько дней.

Хитозан получают из панцирей морских крабов, погибших после зимовки пчел или в качестве побочного продукта биотехнологий (получения лимонной кислоты из *Aspergillus niger* и др.). На отечественном биотехнологическом рынке можно приобрести содержащие хитозан препараты «Агрохит», «Хитозар» и др.

5.2.3. Белки

Харпины. Среди бактериальных элиситоров первым нашли практическое применение харпины — белки, обеспечивающие транспорт бактериальных эффекторов через бактериальные пок-

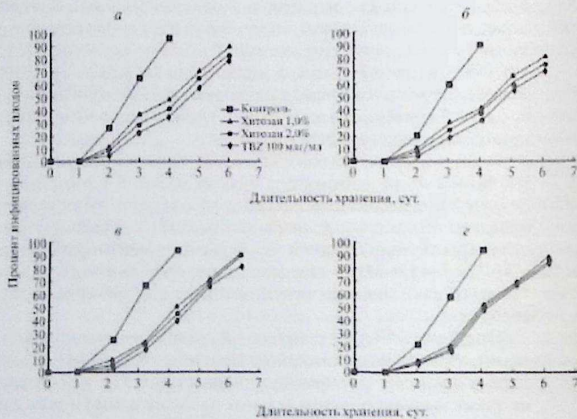


Рис. 5.1. Влияние хитозана и фунгицида тиabendазола (TBZ) на снижение пораженности плодов земляники и малины грибными гнилями в процессе хранения при температуре 13°C [Zhang, Quanick, 1998]: а, б — влияние на пораженность *Botrytis cinerea* земляники (а) и малины (б); в, г — влияние на пораженность *Rhizopus* spp. земляники (в) и малины (г)

- в проявлении устойчивости участвуют множественные защитные системы (АФК, фитоалексины, антимикробные пептиды), что снижает вероятность возникновения и накопления резистентных форм паразитов;
 - иммунизация обладает комплексным защитным эффектом против грибов, вирусов, бактерий, нематод и, возможно, насекомых;
 - при этом отсутствует токсическое действие на полезные организмы — не мишени, окружающие растения;
 - отсутствуют остатки токсичных веществ в урожае;
 - часто эффект иммунизации сопровождается стимуляцией ростовых процессов у обработанных растений.
- Рассмотрим некоторые группы биогенных иммунизаторов.

5.2.1. Липиды

Ненасыщенные жирные кислоты, в частности арахидоновая кислота (АК), важная составная часть РАРPs фитофторовых оомитетов (см. гл. 2). Опыты, проведенные О.Л. Озерецковской и ее сотрудниками, показали, что в клубнях картофеля, обработанных АК, устойчивость к фитофторозу проявляется уже через сутки после обработки и сохраняется до нескольких месяцев. В иммунизированных клубнях накапливаются PR-белки, ферменты пероксидаза, полифенолоксидаза и липооксигеназа [Озерецковская и др., 1994].

Другой пример использования липидов в качестве индукторов устойчивости растений — препарат *альбит*, который представляет собой поли-β-гидроксимасляную кислоту, получаемую из почвообитающей бактерии *Bacillus megaterium*. Препарат взаимодействует с НАДФ-оксидазной системой и индуцирует синтез в клетках СК. Испытания показали высокую эффективность альбита против возбудителей корневых гнилей, мучнистых и ложных мучнистых рос, антракнозов и других болезней на зерновых культурах, сахарной свекле, подсолнечнике, льне, винограде [Минеев, 2008]. Препарат зарегистрирован и разрешен к использованию во многих странах, в том числе в РФ. Важно также, что альбит повышает устойчивость и к абиотическим стрессам — засухе и заморозкам, гербицидам и химическим токсикантам в почве и в воздухе; это единственный антидот биогенной природы для растений.

5.2.2. Аминосакхара

В сельском хозяйстве широкое применение нашли препараты, приготовленные из хитина, особенно деацетилированный хитин *хитозан*. Хитин и хитозан вызывают быструю деполаризацию мембран,

индуцируют LAR и SAR к грибам, бактериям, вирусам и нематодам. Их защитное действие против вирусных инфекций выражается в уменьшении числа некрозов и ингибировании распространения системных вирусов по растению. Хитозан связывается с анионными компонентами растительных мембран и клеточных стенок (фосфолипидами, пектином), затрудняя тем самым адсорбцию вирусов, усиливает синтез каллезы, препятствующей дальнейшему распространению вирусов. В протопластах табака хитозан индуцирует синтез белка (молекулярной массой 130 кДа) — РНК-зависимой РНК-полимеразы, вызывающей посттрансляционное молчание вирусных генов, а также синтез рибонуклеазы (молекулярной массой 123 кДа), деградирующей вирусные РНК. Комплектуясь с анионными пероксидазами, хитозан вызывает утолщение и лигнизацию клеточных стенок, а соединяясь с нуклеиновыми кислотами, выступает как регулятор транскрипции. Вследствие этого хитозан индуцирует синтез фитоалексинов, PR-белков, включая хитиназу и β -глюканазу, АФК, липооксигеназы (ЛОГ) [Максимов, 2013]. Как было сказано в гл. 2, ЛОГ участвует в сигнальных системах, индуцируемых СК и ЖАК. По-видимому, разные сигнальные пути протекают при участии различных изоферментов ЛОГ. Например, при заражении пшеницы возбудителем стеблевой ржавчины или при обработке растений гликопептидным элиситором, выделенным из ростковых трубок ржавчинного гриба, накапливается ЛОГ молекулярной массой 92 кДа (ЛОГ-92), а при обработке хитозаном или MeЖАК — ЛОГ-100, т.е. *Puccinia graminis* и хитозан индуцируют разные пути трансдукции сигнала. В обработанных хитозаном клетках риса изменяется транскрипционная активность 71 гена.

Олигомеры хитина, содержащие менее пяти молекул ацетилглюкозамина, не индуцируют защитных реакций у растений. Наибольшей индуцирующей способностью и защитными свойствами обладали гексамеры-октамеры хитозана. В гл. 2 было указано, что октамеры хитина узнаются мембранными рецепторами, содержащими мотив Lis-M; по-видимому, такая протяженность молекул оптимальна для узнавания рецепторами и индуцирования иммунных свойств.

Индукция SAR служит причиной пролонгированной защиты растений, обработанных хитозаном. Например, обработка клубней картофеля повышает фитопатороустойчивость не только самих клубней, но также выросших из них зеленых растений в поле и даже клубней последующего урожая [Переход и др., 1997].

Особенно перспективно применение хитозана для защиты сочной продукции, подверженной быстрому загниванию (например, плодов

земляники, малины). Задержка с ее реализацией всего на несколько дней может привести к потере товарного качества всей партии, а пред- и послеуборочная обработка фунгицидами опасна, поскольку в остаточных количествах препарат сохраняется в продукции, потребляемой в сыром виде. Как показано на рис. 5.1, безвредный для здоровья хитозан не уступает по эффективности рекомендуемым коммерческим фунгицидам, способен продлить сохранность плодов земляники на несколько дней.

Хитозан получают из панцирей морских крабов, погибших после зимовки пчел или в качестве побочного продукта биотехнологий (получения лимонной кислоты из *Aspergillus niger* и др.). На отечественном биотехнологическом рынке можно приобрести содержащие хитозан препараты «Агрохит», «Хитозар» и др.

5.2.3. Белки

Харпины. Среди бактериальных элиситоров первым нашли практическое применение *харпины* — белки, обеспечивающие транспорт бактериальных эффекторов через бактериальные пок-

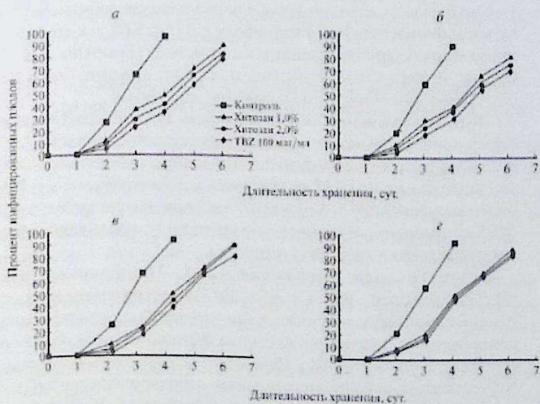


Рис. 5.1. Влияние хитозана и фунгицида тиabendазола (ТВЗ) на снижение пораженности плодов земляники и малины грибными гнилями в процессе хранения при температуре 13°C [Zhang, Quanic, 1998]: а, б — влияние на пораженность *Botrytis cinerea* земляники (а) и малины (б); в, г — влияние на пораженность *Rhizopus* spp. земляники (в) и малины (г)

ровы (см. гл. 4). Они вызывают у растений потерю ионов, подщелачивание среды, деполаризацию мембран, продукцию АФК, а также индукцию SAR через СК-путь трансдукции сигнала [Dong et al., 1999]. Харпин вызывает защитные реакции уже через 5–10 мин после обработки листьев и рекомендован для защиты овощей и винограда от мучнистой росы. Для его практического применения создан препарат *Messemger*[®], который действует в малых дозах и быстро разлагается в природных условиях на экологически безопасные компоненты. Его рекомендуют применять для опрыскивания надземных частей растений, протравливания семян и замачивания корней рассады.

Работы по изоляции из микроорганизмов элиситорных белков, их исследованию и возможному практическому использованию успешно проводятся во Всероссийском научно-исследовательском институте фитопатологии (ВНИИФ). Вот некоторые результаты этих исследований.

Белки холодового шока. В лаборатории В.Г. Джавахия из *Bacillus thuringiensis* был выделен белок MF2, относящийся к группе регуляторных белков холодового шока. Он оказался способным индуцировать устойчивость табака и картофеля к ВТМ, ХВК и к фитофторозу, риса к пирикулярриозу, пшеницы к септориозу [Djavakhia et al., 2000]. Опыты, проведенные на мышах, показали, что этот белок не токсичен по отношению к теплокровным животным.

Пептидил-пролил-гис/траис-изомераза. Изолирована в той же лаборатории из штамма *Pseudomonas fluorescens* под название MF3. Не обладая фунгицидными и фунгистатическими свойствами, этот белок защищал табак от ВТМ и *Alternaria longipes*, ячмень от *Bipolaris sorokiniana*, пшеницу от *Stagonospora nodorum*. Важно также, что белок MF3, примененный совместно с хитозаном, усиливал эффективность каждого компонента комплекса.

Белок *Fusarium sambucinum*. Л.А. Щербаковой и сопр. [Shcherbakova et al., 2013; Семина, 2013] из обитающего в ризосфере непатогенного штамма *Fusarium sambucinum* была изолирована белковая фракция, токсичная для многих фитопатогенных грибов и способная индуцировать SAR у обработанных растений. Выявлена способность данного белка индуцировать деполаризацию мембран растений, накопление АФК, синтез СК. Обработка белковой фракцией семян пшеницы обеспечивала защиту растений от корневых гнилей, вызываемых грибами из родов *Fusarium* и *Bipolaris*, а опрыскивание листьев подавляло развитие возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* (рис. 5.2) и альтернариоза моркови *Alternaria radicina*. Показано также, что выделенный белок повышает чувстви-

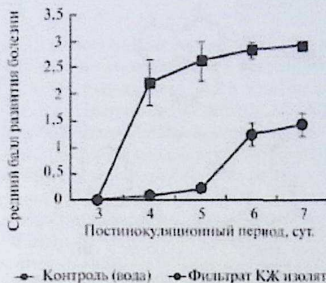


Рис. 5.2. Снижение пораженности пшеницы септориозом в результате обработки всходов фильтратом культуральной жидкости штамма FS-94 *Fusarium sambucinum* [Семина, 2013]

тельность фитопатогенных грибов к фунгицидам, благодаря чему его можно использовать в интегрированной защите растений для уменьшения пестицидной нагрузки на агроэкосистемы без снижения эффективности защитных мероприятий.

5.3. ВВЕДЕНИЕ В РАСТЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ИЛИ ИХ ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ИМИТАТОРОВ

Сигнальные молекулы, оповещающие растительные ткани об опасности, или «алармоны», должны удовлетворять нескольким критериям [Озерецковская и др., 1994]: они синтезируются в растении и способны передвигаться по нему, после повреждения растительной ткани их концентрация увеличивается, они индуцируют защитные механизмы. Многочисленными опытами было показано, что обработка растений сигнальными молекулами — алармонами, такими как СК, ЖАК, этилен, индуцирует LAR и SAR и повышает устойчивость к возбудителям инфекционных болезней. Однако использование этих веществ в практике защиты растений наталкивается на ряд трудностей. СК токсична для растений, к тому же в растении быстро гликозилируется, а в гликозированной форме теряет способность к флоэмному транспорту. Есть недостатки и в экзогенном использовании ЖАК. Поэтому в разных лабораториях синтезированы и запатентованы различные соединения, способные индуцировать LAR и SAR, доступные по стоимости синтеза и удобные в производстве. Многие из них, подобно СК, являются фенольными кислотами, но содержат атомы азота, серы или хлора (рис. 5.3).

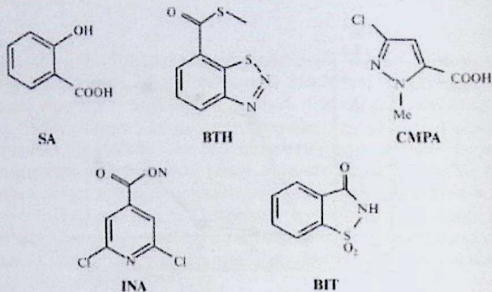


Рис. 5.3. Синтетические элиситоры:

SA — салициловая кислота; INA — 2,6-дихлоризоникотиновая кислота; BTH — 5-метильный эфир бензо-(1,2,3)-тиодиазол-7-карботионовой кислоты; CMPA — 3-хлор-1-метил-1Н-пиразол-5-карбоксилловая кислота; BIT — 1,2-бензизотиазол-1,1-диоксид

Первый коммерческий фунгицид-элиситор — *бион*, созданный на основе 2,6-дихлоризоникотиновой кислоты (INA), был выпущен на рынок в 1997 г. Его полезным свойством является способность сенсibilизировать обработанные растения, т.е. включать реакции устойчивости после вторичного заражения патогенами. INA индуцирует липооксигеназу (ЛОГ) и образование ЖАК, а также синтез PR-белков по альтернативному пути. Полагают, что будучи элиситором и сенсibilизатором растений, INA активирует разные сигнальные пути — путь, приводящий, аналогично заражению, к экспрессии PR-генов, и путь, связанный с экспрессией иных генов, также ассоциированных с индукцией устойчивости. Стресс, вызванный обработкой INA в высоких концентрациях, приводит к накоплению ЖАК, которая активизирует оба пути. Испытания биона в полевых условиях показали его высокую эффективность против грибных, бактериальных и вирусных болезней огурца, табака, фасоли, сахарной свеклы, розы, ячменя, риса.

Другой синтетический коммерческий иммунизатор — 5-метильный эфир бензо-(1,2,3)тиодиазол-7-карботионовой кислоты (BTH) — эффективный активатор SAR. Он не обладает фунгицидной активностью, но способен транслоцироваться по растению и индуцировать SAR по пути, аналогичному СК. Подобно СК BTH подавляет аскорбатпероксидазу и каталазу, однако он значительно более активно ингибирует каталазу, чем СК, причем ингибирование, в от-

личие от СК, не зависит от присутствия пероксида водорода и активность фермента не восстанавливается после удаления ВТН. В отличие от СК, ВТН индуцировал SAR у растений, трансгенных по гену *nahG*, продукт которого разрушает СК, но индукция была блокирована у *nim1* мутантов *Arabidopsis*, у которых СК-сигнальный путь супрессирован. Следовательно, ВТН индуцирует SAR в результате имитации сигнала эндогенной СК. ВТН рекомендован для защиты многих растений (двудольных и однодольных) главным образом от биотрофных паразитов (вирусов, мучнисторосяных грибов, переносчиков оомицетов).

Аналогичные способы индукции SAR проявляют производные пиразола, в частности *СМРА*, 3-хлор-1-метил-1*H*-пиразол-5-карбокислота (рис. 5.3) [Yasuda et al., 2003]. Преимущества этой группы соединений — хорошая растворимость в воде и полное отсутствие фитотоксичности. Пиразолы, как и ВТН, индуцируют SAR по СК-пути, но для этого не требуется синтеза СК, так как индуцируют устойчивость у трансгенных по гену *nahG* растений.

Кроме аналогов СК, на биотехнологическом рынке имеются синтетические и полусинтетические элиситоры из других классов соединений. Например, отечественные производители выпускают препарат *иммуноцитопит*, представляющий собой этиловый эфир арахидоновой кислоты. Его рекомендуют применять для повышения устойчивости растений к широкому кругу болезней — фитофторозам, альтернариозам, ризоктониозам, настоящим и ложным мучнистым росам, серой и белой гнилям и другим.

5.4. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Генная инженерия — хорошо разработанный и широко используемый в селекционной практике прием направленного внесения в геном растения целевых генов. Целевыми являются не только гены, продукты которых улучшают количество и качество получаемого урожая, но и гены, улучшающие несельскохозяйственное назначение растений, в том числе медицинское, например синтез гамма-глобулинов; их потребление с пищей повышает иммунный статус. Ценность генно-инженерных сортов растений заключается, во-первых, в том, что в отличие от традиционных методов селекции в реципиентный сорт можно вводить целевые гены не только из близкородственных растений, но и из абсолютно неродственных организмов — растений, относящихся к разным семействам, бактерий, грибов, животных и т.п. Это позволяет не просто повышать устойчивость стандартными, эволюционно-развитыми способами,

но конструировать метаболизм растений в нужном направлении. Во-вторых, генно-инженерные сорта являются центральным звеном экологизации защиты растений, так как 1) позволяют снизить пестицидный пресс на сельскохозяйственные посевы и 2) в отличие от пестицидов не убивают организмы, не являющиеся мишенями, — опылителей, паразитоидов, медоносцов и др. Риск широкого выращивания подобных сортов заключается в том, что возможен перенос генетических вставок в дикорастущие растения вследствие их случайного опыления пылью генно-инженерного сорта. Например, во многие коммерческие сорта растений введен ген, придающий устойчивость к фунгициду глифосату, вследствие чего подобные сорта можно без опасения обрабатывать этим гербицидом. Но если данный ген будет передан сорным растениям, они также приобретут устойчивость к гербициду. Возможно также приобретение вредными организмами резистентности к антибиотическому метаболиту, как это показано в отношении колорадского жука, некоторые популяции которого потеряли чувствительность к переданному картофелю белковому токсину из *Bacillus thuringiensis*. Но подобное явление давно известно и в отношении многих пестицидов, длительность жизни которых удается продлевать с помощью разнообразных антирезистентных стратегий. Другие возможные риски уже преодолены и будут преодолены в ближайшее время благодаря совершенствованию технологии работ. Что же касается опасности генетических вставок как таковых для здоровья конечных потребителей — человека и сельскохозяйственных животных, то, во-первых, нет ни одной публикации в серьезных журналах, которая подтвердила бы наличие такой опасности, а, во-вторых, ее и быть не может, исходя из знания биологических закономерностей.

По данным на 2010 г., трансгенные растения выращивали на 147 млн га [Kozub et al., 2012]. Основные площади под трансгенными сортами заняты в США, Бразилии, Аргентине, Индии и Канаде. Даже в Европе, где очень сильные позиции имеют зеленые («футбольные болельщики» от экологии), трансгенные растения к 2010 г. выращивали на площади 82 тыс. га. Причем львиная доля коммерческих сортов, полученных генно-инженерными методами, имеют вставки, повышающие их устойчивость к вредителям, болезням и сорнякам.

Рассмотрим некоторые направления исследований по созданию сортов растений, устойчивых к болезням, генно-инженерными методами.

5.4.1. Внесение генов устойчивости из растений других видов

Внутривидовая (межсортовая) передача генов устойчивости (*R*-генов) — хорошо разработанный прием, который используется в селекции растений уже более сотни лет. Но передача генов даже из очень филогенетически близких видов наталкивается на значительные трудности, усиливающиеся по мере увеличения генетического расстояния между видами и приводящие, наконец, к полной взаимной стерильности. Поэтому передача *R*-генов из растений отдаленных видов возможна только генно-инженерными методами. Например, таким способом ген кукурузы *Rxo1* был введен в рис, который приобрел высокую устойчивость к бактериозу, вызванному *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Из одного из наиболее устойчивых к фитофторозу видов дикого картофеля *Solanum bulbocastanum* был передан культурному картофелю ген *Rps-blb2*. Ген устойчивости перца к *Xanthomonas campestris* введен в геном томата, а ген *Arabidopsis RRS1*, придающий устойчивость к другой бактерии — *Ralstonia solanacearum*, — в банан. Таких примеров накапливается все больше.

5.4.2. Введение генов микроорганизмов, продукты которых повышают иммунные свойства растений

5.4.2.1. Создание двухкомпонентной системы устойчивости

Голландский фитопатолог де Вит [de Wit, 1992] предложил вводить в растение генно-инженерными методами одновременно ген авирулентности паразита и соответствующий ему ген устойчивости растения-хозяина (например, *Avr9 Cladosporium fulvum* и *Cf9* томата). Продукты этих генов будут взаимодействовать между собой и индуцировать реакцию СВЧ. Чтобы иммунный ответ, вызывающий гибель клеток растения, не происходил в здоровом, незараженном растении, предлагается соединить ген авирулентности со стресс-индуцибельным промотором; тогда синтез *Avr*-элиситора будет происходить только в условиях стресса (рис. 5.4). Согласно теории заражения любым патогеном как стрессорный фактор вызывало бы защитный эффект, т.е. устойчивость, обусловленная специфическим взаимодействием генопродуктов, стала бы неспецифической. Создание подобных двухкомпонентных систем технически выполнимо, проблема заключается в подборе надежных индуцибельных промоторов.

Идею де Вита можно упростить, если вводить в реципиентное растение из геномов паразитов гены, контролируемые не эффекторы, а МАРPs. Поскольку рецептирующие их мембранные протеинкиназы как факторы врожденного неспецифического иммунитета

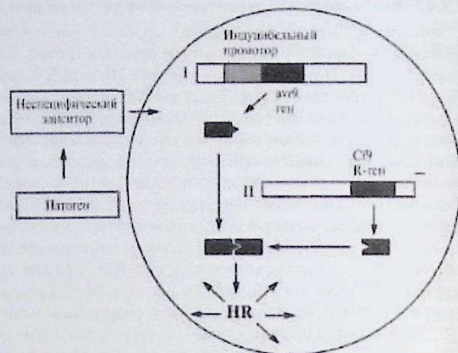


Рис. 5.4. Пути использования трансгенов устойчивости (в данном примере *Cf9 Cladosporium fulvum*) для индукции реакции устойчивости (HR или СВЧ) различными патогенами [de Wit, 1992]. Двухкомпонентная сенсорная система включает растительную клетку, модифицированную двумя генами: сенсором (ген *avr9*, находящийся под контролем промотора, индуцируемого заражением) и эффектором (ген устойчивости *Cf9*). Соединенный с *avr9* промотор активизируется неспецифическими элиситорами разных патогенов (PAMPs). Производимый вследствие этого AvR-белок (черная фигурка) взаимодействует с продуктом гена устойчивости R-белком (серая фигурка), что приводит к СВЧ-реакции

есть у всех растений, второй ген двухкомпонентной системы можно не вводить. Таким способом были созданы растения табака, трансгенные по гену элиситина *Phytophthora cryptogea* криптогенину с промотором вируса мозаики цветной капусты. Они оказались устойчивыми к паразиту табака *P. nicotianae*.

5.4.2.2. Внесение в геном растения гена капсидного белка вирусов

Растения, трансгенные по гену структурного белка оболочки (СБО) вируса, оказались устойчивыми к последующему заражению вирусом. При этом блокируется процесс диссоциации капсидного белка, что необходимо для высвобождения вирусной РНК и запуска начальных этапов вирусной репликации. Кроме того, происходит посттранскрипционная деградация вирусспецифической РНК, вызванная трансгенно кодированной РНК, которая осуществляет разрывы двухцепочечной репликативной формы вирусной РНК. Это многоуровневая эшелонированная защита приводит к блокированию

вирусной инфекции. Гены капсидного белка разных вирусов введены в геномы растений более 30 видов (табак, папайя, картофель, рис, томат, соя, ячмень и др.).

5.4.2.3. Введение генов, кодирующих ферменты, которые деградируют структурные элементы и токсины фитопатогенов

Хитиназы. Гены хитиназ присутствуют в геноме растений, причем их экспрессия активизируется заражением. Показано также, что хитиназы некоторых микроорганизмов более активно разрушают хитин грибов, чем растений. Например, хитиназный ген из гриба *Rhizopus oligosporus*, интродуцированный в табак, повысил его устойчивость к *Sclerotinia sclerotiorum* и *Botrytis cinerea*. Хитиназа микопаразита *Trichoderma harzianum* более активно, чем растительные хитиназы, защищала яблоню от листового паразита *Venturia inaequalis* и почвообитающего *Rhizoctonia solani*. Бактериальные хитиназы из *Serratia marcescens* защищали табак от альтернариоза и ризоктониоза, а хитиназа из *Streptomyces grisea* в ячмене разрушала гаустории *Blumeria graminis*.

Пектастаза. Ген пектастазы из *Pectobacterium carotovorum* усиливал устойчивость клубней картофеля к бактериальным гнилям вследствие разрушения растительного пектина с образованием молекул DAMPs (см. гл. 2).

Ферменты, деградирующие щавелевую кислоту. Щавелевая кислота или ее соль (оксалат) — мобильный вивотоксин гриба *Sclerotinia sclerotiorum*, который: 1) подкисляет зараженную ткань; 2) связывает Ca^{2+} из клеточных стенок растений, делая их полисахариды более доступными для деполимераз грибов; 3) ингибирует активность о-дифенолоксидазы, супрессируя тем самым окислительный взрыв и накопление АФК. У некоторых штаммов бактерии *Pseudomonas fluorescens* обнаружен фермент оксалатдекарбоксилаза; контролирующий его синтез ген был клонирован и перенесен в *Arabidopsis*, который приобрел устойчивость к склеротинии. Однако этот фермент трансформирует оксалат до CO_2 и муравьиной кислоты, которая также может быть токсичной для растений. У многих растений найден другой фермент — оксалатоксидаза, который в присутствии кислорода конвертирует оксалат до диоксида углерода и пероксида водорода; последний быстро разлагается каталазой растений. Ген оксалатоксидазы перенесен из пшеницы и ячменя в подсолнечник, сою и другие растения.

НС-токсинредуктаза. Патотоксин *Cochliobdus carbonum* (анаморфа *Bipolaris zeicola*) — НС-токсин — циклический тетрапептид. Устойчивость к паразиту контролируется доминантным аллелем до-

куса *Hm1*. Его продукт — карбонилредуктаза — НС-токсинредуктаза (НСТР). Фермент нарушает функцию кетона на боковой цепи 2-амино-8-оксо-9,10-эпоксидеканоловой кислоты (рис. 5.5). Ген *Hm1* клонирован и может быть трансформирован в восприимчивые сорта кукурузы в опасных с точки зрения заболевания зонах.

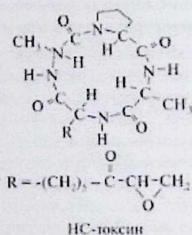


Рис. 5.5. НС-токсин *Cochliobolus carbonum*

5.4.2.4. Введение генов микробных элизиторов

В лаборатории В.Г. Джавахия (ВНИИ фитопатологии) были созданы векторные конструкции, содержащие некоторые бактериальные гены, которые вставлены в сельскохозяйственные растения. Ген, контролирующий белок холодового шока (молекулярной массой 7,2 кДа) *Bacillus thuringiensis* MF2, индуцировал устойчивость табака к ВТМ и ХВК, картофеля к фитофторозу, риса к пирикулярриозу. А ген, кодирующий пролил-*cis-trans*-изомеразу (молекулярной массой 16,9 кДа) из *Pseudomonas fluorescens* MF3, защищает табак от ВТМ, УВК и альтернарии, ячмень от *Bipolaris sorokiniana*. Созданы также трансгенные растения рапса и цветной капусты. Также есть данные о защитном действии бактериальных харинов, синтез которых индуцируется заражением в трансгенных растениях.

5.4.3. Введение генов, продукты которых усиливают действие фитоалексинов

Так как различные виды растений продуцируют разные фитоалексины (ФА), межвидовой перенос биосинтетических генов может обеспечить создание в акцепторном виде растения нового ФА, присутствующего растениям иных видов. Это может быть очень полезно, так как паразиты данного вида вследствие сопряженной эволюции менее чувствительны к ФА своего хозяина, по сравнению с ФА видов, ко-

торые данный паразит не поражает (см. табл. 2.3). Например, штаммы *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, поражающие горох, вырабатывают ферменты, разрушающие ФА гороха пизатин, но не способны деградировать ФА фасоли фазеоллин, в то время как штаммы *F. solani* f. sp. *phaseoli*, поражающие фасоль, разрушают фазеоллин, но не пизатин (рис. 5.6). Поскольку исходными для синтеза большинства ФА являются тривиальные соединения, введение генов, кодирующих последние этапы синтеза ФА, может быть достаточным для их продукции в новых растениях. Например, сесквитерпенциклазы достаточно для синтеза бициклических сесквитерпеновых ФА из фарнезилпирофосфата; касбенциклаза способна изготовить ФА касбены из геранилгераниолпирофосфата, птерокарпансинтаза необходима для образования ФА медикарпина из веститола, птерокарпан-О-метилтрансфераза — для образования пизатина из ба-оксимаакнаина и т.д. [см. Lamb et al., 1992]. Ниже приведены два примера успешных исследований в данном направлении.

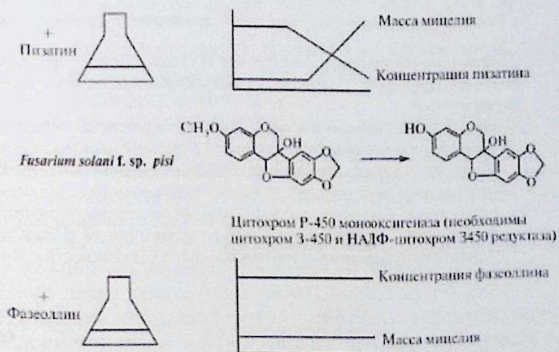


Рис. 5.6. Разрушение ФА гороха пизатина индуцированным ферментом паразита гороха *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (вверху) и неспособность этого гриба разрушать ФА фасоли фазеоллин (внизу)

Синтез стильбеновых ФА. ФА стильбены, в частности ресвератрол, синтезируются у ряда растений (арахиса, винограда) соединением одной молекулы р-кумарол-коэнзима А и трех молекул малонил-коэнзима А с помощью фермента стильбенсинтазы (STS) (рис. 5.7). У многих растений этот фермент отсутствует, но кодирующий его ген

клонирован и был внесен в растения других видов генно-инженерными методами. Например, два гена STS перенесены из винограда в табак. Под действием элиситора из мицелия *Phytophthora megasperma* синтезировалась STS-mРНК. Развитие *Botrytis cinerea* в трансгенных табаках было подавлено на 52–87% по сравнению с исходными растениями. У трансгенных по двум STS-генам из винограда картофеля и томата повысилась также устойчивость к *Phytophthora infestans* и *Fusarium sulfureum*.

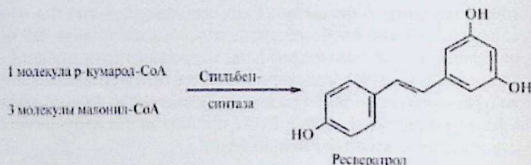


Рис. 5.7. Синтез ФА ресвератрола с помощью фермента стильбенсинтазы

Известно много форм стильбенов. Их токсичность определяется степенью гидрофобности молекул. Гидрофобность можно повысить двумя путями:

- конструцией монометилловых эфиров стильбена и ресвератрола путем метилирования (переносом генов метилтрансфераз);
- заменой ресвератрола более гидрофобной молекулой стильбена пиносильвином с помощью введения гена пиносильвинсинтазы (*PSS*) (рис. 5.8). Оба пути использованы в экспериментах. В частности, ген *PSS* из сосны перенесен в геном табака, в результате чего значительно повысилась его устойчивость к *Botrytis cinerea*.

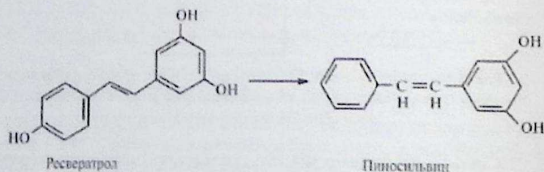


Рис. 5.8. Конверсия ресвератрола в пиносильвин с помощью пиносильвинсинтазы

Регуляция соотношения стереоизомеров ФА. Птерокарпановые ФА (пизатин, мааклаин и др.) синтезируются в растениях в виде (+) или (-) форм. (+) Формы более токсичны (по-видимому, потому что не могут подвергнуться деградации ферментами грибов). Клонирован ген изофлавоноксилоредуктазы, которая осуществляет преимущественный синтез того или иного стереоизомера.

5.4.4. Введение генов, продукты которых контролируют синтез противомикробных пептидов

У растений и животных обнаружено большое число антимикробных белков. Гены, контролирующие некоторые пептиды, клонированы и вставлены в различные векторные конструкции [см. Sagi, 2003a, 2003b].

Ген синтеза *тионина вискотоксина* из омелы перенесен в геном *Arabidopsis*, который приобрел устойчивость к киле и к фузариозному увяданию.

Дефензин из редиса в трансгенном табаке придал частичную устойчивость к альтернариозу, а дефензин из люцерны — устойчивость картофеля к вертициллезу.

Цекропины насекомых взаимодействуют с фосфолипидами бактериальных мембран, вызывая образование каналов. Контролирующие гены из тутового шелкопряда и дрозофилы введены во многие растения, которые приобрели устойчивость к бактериям родов *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium* и др. [Захарченко и др., 2005].

Ген связывающего железо гликопротеида *лактоферрина* из молока млекопитающих перенесен в табак, который приобрел устойчивости к бактериям родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Ralstonia*. Введение гена лактоферрина не в табак, а в пищевые растения (на пример, в салат) полезно и с медицинской точки зрения благодаря его высоким антимикробным и иммуномодулирующим свойствам. Также в геномы разных растений были введены гены антимикробного белка лизоцима, изолированные из яичного белка кур, бактериофага T4 и человека. Во всех случаях получен положительный эффект — повысилась устойчивость к различным фитопатогенным бактериям.

5.4.5. Введение генов, нарушающих отдельные фазы паразитического цикла фитопатогенов

Фито- и зоопаразитические бактерии достигают максимальной патогенности в состоянии формирования густых пленок, получивших наименование *quorum sensing* (QS). При достижении определенной густоты бактериальной суспензии изменяется контроль

экспрессии генов, необходимых для патогенеза. Поскольку обеспечить высокую плотность бактериальных клеток во всем объеме среды обитания практически невозможно, бактерии достигают ее локально, формируя бактериальные пленки. Формированием пленок управляет группа сигнальных молекул — *квормонов*, которые у большинства грамотрицательных бактерий представляют собой лактоны ацилглюкозамиды (AHLs).

Растения обладают механизмами манипулирования QS двумя способами:

- ингибированием синтеза или деградацией AHLs;
- наоборот, секрецией собственных AHLs с целью обмана бактерий и формирования ими QS в ненадлежащее время и в ненадлежащем месте.

Оба эти подхода были использованы в создании генно-инженерных конструкций. Введение в геном растений генов AHL-лактоназы или AHL-ацилазы приводило к разрушению бактериальных AHLs, а внесение в картофель гена AHL-синтазы из *Pectobacterium carotovorum* защищало от заражения бактериями вследствие возникновения защитных реакций в ответ на внедрение.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое «вакцинация растений» и каковы ее отличия от вакцинации животных?
2. Что представляют собой иммунизаторы растений? Назовите достоинства и способы использования.
3. Каковы направления генно-инженерных работ по созданию устойчивости растений к вирусам?
4. Каковы пути повышения эффективности фитоалексинов с помощью методов генной инженерии?

Цитированная литература

Захарченко Р.С. Повышенная устойчивость к фитопатогенным бактериям у трансгенных растений табака с синтетическим геном антимикробного пептида лекропина P1 [Текст] / Р.С. Захарченко, Е.Б. Рукавица, А.Т. Гудков, Я.И. Бурьянов // Генетика. — 2005. — № 41. — С. 1445–1452.

Максимов И.В. Биологическая активность хитина и сферы его применения [Текст] / И.В. Максимов // Изв. Уфимского научного центра РАН. — 2013. — № 2. — С. 38–61.

Минеев В.Г. Биопрепарат альбит для повышения урожая и защиты растений [Текст] / В.Г. Минеев. — М.: Агрорус, 2008.

Озеренковская О.Л. Механизмы индуцирования элиситорами системной устойчивости растений к болезням [Текст] / О.Л. Озеренковская, Л.И. Ильинская, Н.И. Васюкова // Физиология растений. — 1994. — 41Ж. — С. 626–633.

Переход Е.А. Хитозан — регулятор фитотроустойчивости картофеля [Текст] / Е.А. Переход, Г.И. Чаленко, Н.Г. Герасимов, О.Л. Озерецковская // ДАН СССР. — 1997. — 355. — С. 120–122.

Пухальский В.А. Проблемы естественного и приобретенного иммунитета растений [Текст] / В.А. Пухальский, Т.И. Одинцова, Л.И. Извекова [и др.] // Вестник ВОГиС. — 2007. — 11. — С. 631–649.

Семина Ю.В. Защитные свойства внеклеточных метаболитов непатогенного изолята FS-94 (*Fusarium sambucinum*) и их использование против и возбудителя септориоза пшеницы (*Stagonospora nodorum*) и других фитопатогенных грибов [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Ю.В. Семина. — М., 2013.

De Wit P.J.G.M. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. 1992. 30: 391–418.

Djavakhia V.G., Nikolaev J.N., Vainova T.M. DNA sequence of gene and aminoacid sequence of protein from *Bacillus thuringiensis* which induced nonspecific resistance of plants to viral and fungal diseases // J. Rus. Phytopathol. Soc. 1994. 5: 125–130.

Dong H., Delaney T.P., Bauer D.W., Beer S.V. Harpin induced disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene // Plant Journal. 1999. 20: 201. 7–215.

Kozub N.O., Pilipenko L.A., Sozinov I.A., et al. Genetically modified plants and plant protection: progress and estimation of potential risks // Cytol. and Genet. 2012. 46: 251–262.

Kuc J. Plant immunization: mechanisms and practical implications. In "Active Defense Mechanisms in Plants". Ed. R.K.S. Wood. Plenum Press. 1982. 67–84.

Kuc J., Hammerschmidt R. Acquired resistance to bacterial and fungal infections // Ann. Appl. Biol. 1978. 89: 313–317.

Lamb C.J., Ryals J.A., Ward E.R., Dixon R.A. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens // Biotechnology. 1992. 10: 1436–1440.

Niblett C.L., Diekson E., Fernow K.H., et al. Cross protection among four viroids // Virology. 1978. 91: 198–203.

Palukaitis P., Zaitlin M. A model to explain the cross-protection phenomenon shown by plant viruses and viroids. In "Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives". MacMillan Public. 1984. Comp. 420–429.

Sagi L. (2003a). Engineering resistance to pathogenic fungi. In H. Atkinson et al (eds). Genetic Transformation Strategies to Address the Major Constraints to Banana and Plantain Production in Africa. 1–38.

Sagi L. (2003b). Engineering resistance to pathogenic bacteria. In H. Atkinson et al (eds). Genetic Transformation Strategies to Address the Major Constraints to Banana and Plantain Production in Africa. 39–72.

Sheherbakova L., Semina Y., Nazarova T., et al. Potential for integrated control of the wheat pathogen, *Stagonospora nodorum*, by foliar and extracellular compounds produced by isolate FS-94 of *Fusarium sambucinum*. IOBC-WPRS Bulletin. 2013. 89: 455–458.

Yasuda M., Nishioka M., Nakashita H., et al. Pyrazolocarboxylic acid derivative induced systemic acquired resistance in tobacco // Biosei. Biotechnol. Biochem. 2003. 67: 2614–2620.

Zhang D., Quanick P.C. Antifungal effect of chitosan coating of fresh strawberries and raspberries during storage // J. Hort. Sci. and Biotechnol. 1998. 73: 763–767.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Авенацин 28, 31
Аксения 13
Активные формы кислорода (АФК) 55, 62, 86, 87, 114, 148, 156–158, 166
Алармоны 160
Алкалоиды 30, 31
Аллиин 32
Антимикробные (PR) белки 68–70, 156, 157
Антитела 5, 8, 9, 110, 112
Апоптоз 61, 95
Арабиноза 16
Арахидоновая кислота (АК) 42, 156
Арбутин 25, 26
- Барбонил 27
Бензоксалины 26
Бензоксазолиноны 25
- Вертикальная устойчивость (ВУ) 110, 111, 113–117, 145
Витотоксины 82–84, 91
- Галактан 16
Галактоза 17
Гемипеллолазы 19
Гемипеллолоза 16, 17, 22
Гидрохинрон 25, 26
Глицилскообоксилаза 96
Глюканазы 47, 69 70, 85
Глюканы 43, 44, 47, 71, 85, 101
Глюкозиды
 алифатических соединений 26
 терпеноидные 27, 28
 фенольные 24–26
 шаногенные 26, 27, 32, 33
Горизонтальный перенос генов (ГПГ) 106, 107
Горизонтальная устойчивость (ГУ) 110–113, 115, 116, 145
Демиссин 28, 29
- Дефензины 13, 69, 73, 170
Жасмоновая кислота (ЖАК) 54, 55, 138–140, 151, 154, 160, 161
- Импедины 99
- Кальмодулин 54
Канаванин 30
Каспазы 61
Катехол 23
Кверцетин 23
Кверцитрин 23
Кворомоны 50, 171
Ксилан 17
Ксиланаза 46
Ксилоглюкан 16, 44
Ксилозы 17
Кутикула 15, 41, 148
Кутин 13, 14, 148
Кутиназа 15
- Лектины 50, 51, 88
Лигнин 17, 22, 23
Лизоцим 13, 69
Липополисахариды (ЛПС) 48, 50
Локальная приобретенная устойчивость (LAR) 58, 59, 62, 75, 155, 157, 160
- Мазонин 24
Меланин 15, 25, 122
- НАДН-оксидаза 56, 156
Никотин 33
- Оксалатоксидаза 69, 74, 166
Олигогалактуронидазы 44
- Патотоксины 91–93, 95, 98
Пектин 16
Пепсин 13
Пероксидаза 23, 69, 72, 97

- Пиносильвин 24, 169
Полигалактуронан 16
Протеинкиназы 47–54, 56, 59
Протокатеховая кислота 23
- Ретинобластома** 95
- Рецепторы**
Toll-подобные (TLR) 47, 48, 50, 51, 132, 142, 147, 148
Интерлейкина-1 47, 48
- Рибонуклеаза 69
Рибулозобисфосфат кокарбоксилаза (Рубиско) 96, 97
- РНК-ингибиторные белки (RIP) 69, 73
- Салициловая кислота (СК)** 53, 56, 58, 74, 75, 102, 103, 138–140, 151, 154, 158, 160–162
- Сапонины 28
- Сверхчувствительности реакция (свч) 59–62, 88, 104, 114, 121, 123, 133–135, 138, 164, 165
- Сенсибилизация (Priming) 75, 76, 155
- Сидерофоры 34
- Системин 55
- Системная приобретенная устойчивость (SAR) 58, 74–76, 153–155, 157, 160–162
- Соланин 28, 29
- Спирты**
фенольные 18
 конифериловый 18
 кумариловый 18
 синапиловый 18
- Стильбены 168, 169
- Сульфотрансфераза 50
- Супрессоры 80, 81, 99
- Сфинган 95
- Триоглюкозиды (гликоноляты, горчичные масла) 28, 30, 33, 35, 36
- Тионин 69, 73, 170
- Томатин 28, 29, 32
- Феназин** 34, 154
- Фенилаланинаммоний лиаза (ФАЛ) 23, 63, 100
- Фенилпропаноиды 56
- Фитоалексины (ФА) 62–68, 88, 104, 156, 167–170
- Флагеллин 46, 49, 53, 57, 74
- Флоризин 25
- Фукоза 17
- Халкопептидаза** 64, 98, 100
- Харшины 123, 158, 167
- Хитин 34, 42, 43, 50, 69, 71, 82, 85, 117, 156, 157
- Хитиназы 50, 69, 70, 82, 85, 98, 117, 121, 166
- Хитозан 42, 43, 156–158
- Целлюлазы** 19
- Целлюлоза 16, 17, 22
- Церамид 95
- Цитокнины 8, 9, 60
- Чаконин** 28
- Эйкозопентаеновая кислота (ЭПК)** 42
- Элиситины 45
- Элиситоры 40, 41, 46, 81, 161
- Эндофиты 19, 20
- Энистав 112
- Этилен 75, 139, 154
- Эффекторы 80–82, 85, 86, 102, 104, 105, 117, 125, 137, 141

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	3
Вступление.....	5
Предисловие.....	7
<i>Цитированная литература</i>	11
Глава 1. ИММУНИТЕТ НА УРОВНЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА	13
1.1. Физические барьеры растений.....	13
1.1.1. Кутикулярный покров.....	13
1.1.2. Клеточная стенка.....	16
1.1.3. Барьеры внутри растительной ткани.....	21
1.2. Химические барьеры.....	21
1.2.1. Фитонцидный барьер.....	22
1.2.2. Барьер клеточной стенки.....	22
1.2.3. Барьер мертвых клеток.....	23
1.2.4. Барьер живых клеток.....	24
1.2.5. Пути преодоления химических защитных барьеров микроорганизмами.....	31
1.3. Микробиологические барьеры.....	33
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	37
<i>Цитированная литература</i>	37
Глава 2. ЕСТЕСТВЕННЫЙ ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ	39
2.1. Элиситоры.....	40
2.1.1. Липиды.....	42
2.1.2. Полисахариды.....	42
2.1.3. Белки и гликопротеиды.....	45
2.2. Рецепторы.....	47
2.2.1. Toll-подобные рецепторы.....	47
2.2.2. Рецепторные протеинкиназы (RLK).....	48
2.2.3. Рецепторы лектинового типа.....	50
2.3. Трансдукция (передача) сигнала.....	51
2.3.1. Сигнальные системы растительной клетки.....	51
2.3.2. Системы регуляции сигнального трафика.....	56
2.4. Локальная приобретенная устойчивость: режим работы устьиц.....	58
2.5. Локальная приобретенная устойчивость: реакция сверхчувствительности.....	59
2.6. Локальная приобретенная устойчивость: антимикробные соединения.....	62
2.6.1. Вторичные антимикробные соединения — фитоалексины.....	62
2.6.2. Антимикробные белки.....	68
2.7. Системная приобретенная устойчивость.....	74
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	76
<i>Цитированная литература</i>	77

Глава 3. КАК ПАЗАРТЫ ПРЕОДОЛЕВАЮТ ЕСТЕСТВЕННЫЙ ИММУНИТЕТ..... 79

3.1. Как паразиты манипулируют своими хозяевами.....	79
3.2. Эффекторы, изменяющие структуру лиганда, рецептируемого мембранными рецепторами.....	82
3.3. Вивотоксины.....	82
3.3.1. Ингибиторы ферментов растений.....	85
3.3.2. Мембраноактивные вещества и ингибиторы дыхания.....	85
3.3.3. Генераторы активных форм кислорода.....	86
3.3.4. Ингибиторы интеграции тканей и клеток растений.....	86
3.3.5. Ингибиторы синтеза белка.....	88
3.4. Патотоксины.....	91
3.4.1. Химический состав.....	92
3.4.2. Механизмы специфичности и токсичности.....	96
3.4.3. Биологическая роль патотоксинов и экология продуцентов.....	98
3.5. Супрессоры импедины.....	99
3.6. Организация эффекторных генов в геномах грибов и механизмы их приобретения.....	105
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	107
<i>Цитированная литература</i>	107

Глава 4. ПРИОБРЕТЕННЫЙ, ИЛИ АДАПТИВНЫЙ, ИММУНИТЕТ..... 110

4.1. Вертикальная и горизонтальная патосистемы.....	110
4.2. Авт-белки.....	118
4.2.1. Авт-белки вирусов.....	118
4.2.2. Авт-белки бактерий.....	119
4.2.3. Авт-белки грибов и псевдогрибов.....	121
4.2.4. Транспорт Авт-белков (эффекторов) в растительную клетку.....	123
4.2.5. Авт-белки и приспособленность паразитов.....	126
4.3. R-белки.....	130
4.3.1. Структура и функции.....	130
4.3.2. Локализация R-белков.....	132
4.3.3. Непрямое взаимодействие R-белков с эффекторами.....	133
4.3.4. Трансдукция сигнала.....	138
4.4. Решение проблемы «гонки вооружений».....	140
4.5. Заключение.....	147
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	148
<i>Цитированная литература</i>	149

Глава 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ НАУКОЙ ДАННЫХ О МЕХАНИЗМАХ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ИХ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ И ВРЕДИТЕЛЕЙ (МЕТОДЫ ИСКУССТВЕННОГО ПОВЫШЕНИЯ ФИТОИММУНИТЕТА)..... 151

5.1. Инокуляция непатогенных организмов («вакцинация»).....	152
5.1.1. Инокуляция вирусов.....	153
5.1.2. Инокуляция бактерий.....	154
5.1.3. Инокуляция грибов.....	154
5.2. Обработка растений метаболитами микроорганизмов (биогенными элизиторами).....	155

5.2.1.	Липиды.....	156
5.2.2.	Аминосахара.....	156
5.2.3.	Белки.....	158
5.3.	Введение в растение сигнальных молекул или их химически синтезированных имитаторов	160
5.4.	Генная инженерия.....	162
5.4.1.	Внесение генов устойчивости из растений других видов.....	164
5.4.2.	Введение генов микроорганизмов, продукты которых повышают иммунные свойства растений	164
5.4.3.	Введение генов, продукты которых усиливают действие фитоалексинов.....	167
5.4.4.	Введение генов, продукты которых контролируют синтез противомикробных пептидов	170
5.4.5.	Введение генов, нарушающих отдельные фазы паразитического цикла фитопатогенов.....	170
	<i>Контрольные вопросы и задания</i>	171
	<i>Цитированная литература</i>	171
	Предметный указатель	173

По вопросам приобретения книг обращайтесь:
Отдел продаж «ИНФРА-М» (оптовая продажа):
127214, Москва, ул. Полярная, д. 31В, стр. 1
Тел. (495) 280-33-86 (доб. 218, 222)
E-mail: bookware@infra-m.ru

Отдел «Книга—почтой»:
тел. (495) 280-33-86 (доб. 222)

ФЗ № 436-ФЗ	Издание не подлежит маркировке в соответствии с п. 1 ч. 4 ст. 11
----------------	---

Учебное издание

Дьяков Юрий Таричанович

ФИТОИММУНИТЕТ

УЧЕБНИК

Оригинал-макет подготовлен в НИЦ ИНФРА-М
ООО «Научно-издательский центр ИНФРА-М»
127214 Москва, ул. Полярная, д. 31В, стр. 1
Тел.: (495) 280-15-96, 280-33-86. Факс: (495) 280-36-29
E-mail: books@infra-m.ru <http://www.infra-m.ru>

Подписано в печать 28.09.2023.
Формат 60×90/16. Бумага офсетная. Гарнитура Newton.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 11,12.
ИИТ20. Заказ № 00000

ТК 634604-2110943-051016

Отпечатано в типографии ООО «Научно-издательский центр ИНФРА-М»
127214, Москва, ул. Полярная, д. 31В, стр. 1
Тел.: (495) 280-15-96, 280-33-86. Факс: (495) 280-36-29

