

УДК 612.017+929ВавиловН.И.

Н.И. ВАВИЛОВ И ОБЩАЯ ТЕОРИЯ ФИТОИММУНИТЕТА

Среди многообразных научных проблем, находившихся в поле зрения Н.И. Вавилова, проблема фитопатологии и фитоиммунитета была самой постоянной. Интерес к фитопатологии, приобретенный им в годы студенчества на стажировке у выдающегося миколога А.А. Ячевского, он пронес через всю жизнь. В двух книгах, посвященных иммунитету растений, Н.И. Вавилов обобщил накопленные к тому времени сведения о природе фитоиммунитета и наметил основные направления будущих исследований. В частности, в этих книгах было обращено внимание на отсутствие общей теории фитоиммунитета, создание которой он считал *“делом будущего и, вероятно, не очень близкого”* [1], ибо *“свести все явления невосприимчивости растений к грибным и бактериальным заболеваниям к единой физиологической или биологической причине... нам представляется невозможным”* [там же, с. 161]. И действительно, уже в то время Н.И. Вавилов проанализировал около десятка гипотез и теорий, объясняющих устойчивость растений к болезням различными механическим, химическими и другими факторами. Попытки свести эти и еще большее число вновь открытых факторов устойчивости в единую теорию закончились через 50 лет после выхода сводки Н.И. Вавилова созданием *“мультикомпонентной гипотезы”* фитоиммунитета [2], авторы которой расписались в своей бессилии к пониманию единства в явлениях и механизмах иммунитета не только растений и животных, но и разных растений к различным патогенным организмам.

Вехами к созданию общей теории иммунитета Н.И. Вавилов считал 1) изучение симбиотических взаимоотношений между растениями и грибами, ибо *“явления восприимчивости растений к паразитическим грибам вопреки тому, что мы знаем из области инфекционной патологии в животном мире, нередко связаны с очевидными симбиотическими отношениями между клетками хозяев и гифами грибов, по крайней мере в течение некоторого времени”* [1, с. 199]; 2) культивирование *“таких облигатных паразитов, как ржавчина и мучнистая роса на искусственных средах”* [с. 199]; 3) изучение грибных токсинов и энзимов и ответных реакций на них клеток растений-хозяев; 4) изучение причин гибели паразита в зараженных клетках, которая происходит не от голодания, как предполагало тогда большинство фитопатологов, а вследствие накопления *“антитоксинов”*.

Со времени приведенных высказываний прошло почти 90 лет. Методология работы с рекомбинантной ДНК открыла перед биологией возможности, неведомые ранее, причем в каждом из четырех начертанных Н.И. Вавиловым направлениях. В данной статье будут рассмотрены результаты некоторых исследований проведенных в этих направлениях, а также экспериментальные предпосылки для создания общей теории иммунитета.

1. Изучение симбиотических взаимоотношений между растениями и микроорганизмами.

Древнейшей формой симбиоза между растениями и микроорганизмами была **арбускулярная микориза (АМ)**, которая, как полагают, обеспечила существование растений на суше и расселение по разным климатическим зонам [3]. Роль микоризы в жизни растений многообразна. Она увеличивает объем

почвы, охватываемой корнями и выходящими из них гифами гриба, утилизирует нерастворимые соединения фосфора, повышает устойчивость к заражению потенциальными почвенными патогенами. В результате повышается вес и продуктивность растений, их экологическая пластичность и конкурентоспособность [4].

Молекулярные исследования показали, что для взаимодействия, приведшего к созданию арбускулярной микоризы, растения (а также грибы) выработали многие механизмы, используемые ими и при паразитических взаимоотношениях.

1) *Сигнальные молекулы.* Рост в направлении корней и морфологические изменения гиф гломусовых грибов индуцируются корневыми выделениями — CO_2 [5], фенольными соединениями [6], сесквитерпенами [7]. Эти соединения регулируют взаимоотношения с фитопатогенными бактериями и грибами [8] и даже цветковыми паразитами [9].

2) *Факторы, обеспечивающие сбалансированность взаимоотношений.* У микоризообразующих грибов и их растений-хозяев обнаружены те же механизмы нападения и защиты, что и при паразитических взаимоотношениях. Сбалансированный симбиоз обеспечивается а) слабой элиситорной способностью АМ-грибов; б) образованием растением грибных ингибиторов; в) образованием грибных факторов совместимости [10].

3) *Факторы устойчивости.* По отношению к микоризным грибам растения могут проявлять те же типы устойчивости, что и к фитопатогенам, названные Н.И. Вавиловым видовым и сортовым иммунитетом [1].

Иммунитет крестоцветных растений к возбудителям АМ обусловлен горчичными маслами — глюкозинолатами, а крапивовых — лектинами, связывающими хитин [11], т. е. соединениями, играющими важную роль в иммунитете против фитопатогенных грибов.

Сортовой иммунитет исследуют с помощью мутантов, блокирующих развитие АМ-грибов на разных стадиях инфекционного цикла. У бобовых растений, томата и кукурузы получены мутанты, блокирующие развитие гриба до внедрения (прорастание спор, рост и ветвление гиф); внедрение; развитие в кортикальной зоне растений; формирование арбускул [12]. Генетическое и молекулярное изучение таких мутантов представляет огромный интерес для понимания природы фитоиммунитета.

4) *Индукция устойчивости.* При заражении АМ-грибами в растении индуцируется синтез таких же защитных продуктов, как и при заражении патогенами — PR-белки, включая хитиназы, фенилпропаноиды, включая лигнин, и др. [10]. Этим обусловлена локальная и системная индуцированная устойчивость. Последняя проявляется в корнях, защищая растения от нападения почвенными патогенами, но не в листьях.

Другой тип симбиозов, представляющий интерес в данном контексте, — взаимодействие бобовых с клубеньковыми бактериями (ризобиями). Он возник позже, чем АМ-ассоциации, причем растение использовало некоторые механизмы, выработанные в процессе коэволюции с АМ-грибами, и для установления взаимоотношений с ризобиями. Мутанты, блокирующие отдельные этапы развития микоризы, блокируют и развитие клубеньковых бактерий, и наоборот, некоторые мутанты, блокирующие развитие ризобий, блокируют и АМ. Для обоих видов симбиоза имеется общая рецепторная молекула *SYMRK* (symbiosis receptor-like kinase), которая имеет структуру, характерную для toll-подобных рецепторов — факторов врожденного иммунитета беспозвоночных и позвоночных животных и человека [13]. Таким образом, сенсорные белки

растений и животных построены по общему плану: они включают рецепторные и протеинкиназные домены. Структура рецепторных доменов (*LRR* и *CC*) свидетельствует о высокой вариабельности в кодирующих областях генов, подобной вариабельным участкам генов иммуноглобинов. Преобладание несинонимических мутаций в этих областях над синонимическими указывает на направление отбора в пользу новых вариантов белков [14]. *TIR* домен гомологичен белку *Toll*, ответственному за морфогенез и иммунитет дрозодилы, *Tol* Z-подобным белкам и рецептору интерлейкина I позвоночных, участвующему в индукции фактора некроза опухоли в макрофагах, синтеза антител В-лимфоцитами и др. [15]. Следовательно, рецепторы, регулирующие морфогенез, симбиотические взаимоотношения и иммунный ответ, у растений беспозвоночных и позвоночных животных построены по общему плану и контролируются одним семейством генов.

Еще более молодым является симбиоз злаковых трав с **эндофитными аскомицетами из семейства *Clavicipitacea* (спорыньевые)**. Здесь наблюдаются все переходы от выраженного паразитизма до облигатного симбиоза. Исходными для эндофитов были паразитические грибы, вызывающие чехловидную болезнь злаков. В ходе эволюции с растениями-хозяевами они потеряли сначала сумчатую стадию, а затем и конидиальные, так что в тканях растения находится стерильный мицелий, передающийся, подобно хлоропластам и митохондриям, исключительно вертикально — через семена. Такой образ жизни возник вследствие ослабления факторов атаки растений, снижения паразитических свойств настолько, что только растения, несущие мицелий данного эндофита, способны поддерживать его существование; иммунные свойства других растений не позволяют развиваться в них. Поэтому для эндофитов характерна узкая внутривидовая специализация.

Эндофиты повышают жизнеспособность и конкурентоспособность своих хозяев. Они выделяют токсины, защищающие растения от фитофагов — от насекомых до жвачных животных, увеличивают рост зеленой массы, повышают жаростойкость, засухоустойчивость и морозоустойчивость растений [16].

2. Культивирование облигатных паразитов на искусственных питательных средах.

Опыты по культивированию облигатных паразитов в искусственных условиях прошли ряд этапов — от культивирования на каллюсах восприимчивых видов растений до попыток культивирования на искусственных средах [17]. Эти исследования привели к некоторым интересным данным и практически важным результатам. Показана, в частности, роль клеточных коммуникаций в реакциях растений на заражение и разработаны методы отбора устойчивых к паразитам каллюсов. По отношению к ржавчинным грибам, которые представляли большой интерес для Н.И. Вавилова, удалось разработать методы воспроизводства некоторых стадий инфекционного цикла на искусственных агаровых средах. Эти методы работы с ржавчинными и некоторыми другими фитопатогенными грибами позволили установить продукты, участвующие во взаимоотношении партнеров, и клонировать кодирующие их гены [18, 19]. Это

Интегрин, как медиатор взаимодействий. Интегрины — семейство животных белков, которые пронизывают клеточную мембрану и, взаимодействуя с рецепторами интегринов соседних клеток, обеспечивают клеточную адгезию. Поскольку цитоплазматический “хвост” молекул интегринина короткий и не подвержен энзиматическому узнаванию, они через адаптерный белок, связывающий интегрин с цитоскелетом, протеинкиназами и трансмембранными рецепторами факторов роста, осуществляют трансдукцию сигнала. Этот путь транс-

дукции назван интегриновым кластером. Интегрины обнаружены у грибов и оомицетов. Они необходимы для апикального роста гифы, ориентации микрофиламентов цитоскелета и прикрепления гиф к поверхности, а также обеспечивают тигмотропизм — рост гифы строго перпендикулярно антиклинальным клеточным стенкам эпидермальных клеток (такой рост облегчает нахождение устьиц).

Гидрофобины. Среди рано экспрессируемых генов *Magnaporthe grisea* изолирован ген *MPG1*, продукт которого — низкомолекулярный белок гидрофобии необходим для прикрепления гифы к гидрофобной поверхности листа и образования инфекционных структур (апрессориев).

Муцин. У *Phytophthora infestans* группа генов из семейства *Ca2* кодирует внеклеточные белки, сходные с муцином позвоночных. Эти белки экспрессируются в прорастающих цистах и апрессориях перед их внедрением и служат для адгезии на поверхности растения.

Белки, связывающиеся с целлюлозой (CBL-proteins), обеспечивают адгезию гиф *Phytophthora parasitica* с целлюлозосодержащим субстратом.

Выделено также несколько генов, регулирующих морфогенез, — *INF* (infection) или *PIG* (in plants induced genes). Первым белком, связанным с дифференцировкой, оказался кальмодулин — белок, регулирующий организацию цитоскелета. Он необходим для изменения ориентации микротрубочек и микрофиламентов при переходе от растущей по поверхности гифы к апрессорию. В апрессориях *M. grisea* экспрессируется белок *Psilp*, который гомологичен семейству мембранных белков животных тетраспаринов. Эти белки входят в комплекс мембранного сигналинга, ответственного за клеточную адгезию, дифференциацию и движение. Те же функции — адгезию и дифференциацию — контролирует этот белок и в мембранах гаусториев. Интересно, что мРНК *psil* обнаружена во всех клетках, а белок — только в гаусториях, т. е. его регуляция осуществляется на уровне трансляции.

Белки *cap20* и *cap22* — гликопротеины, связанные с клеточной стенкой апрессория. Один из них нужен для формирования гаустория, второй — для его функционирования. Локализованный в мембране гаусторий белок *PIG1* гомологичен гену дрожжевой пермеазы — фермента, осуществляющего транспорт аминокислот через мембрану. Наконец, в цитоплазме апрессориев обнаружен белок ACE1 с комбинированными ферментными свойствами поликетидсинтазы/нерибосомальной пептидсинтазы. Продукт его ферментативной активности неизвестен, но, возможно, играет роль на ранних этапах взаимодействия гаустория с клетками хозяина.

3. Изучение метаболитов фитопатогенных организмов, участвующих во взаимоотношениях с растениями-хозяевами.

Фитопатологи издавна разделяли метаболиты фитопатогенов, влияющие на протекание защитных реакций в растениях (иммуномодуляторы), на супрессоры и элиситоры. Первые подавляют протекание защитных реакций растения вследствие неспецифического токсического действия на клетки (вивотоксины, ферменты деполимеразы) или специфического воздействия на отдельные звенья метаболизма (патотоксины, импедины). Вторые узнаются рецепторными системами растения как чужие и индуцируют экспрессию иммунного ответа, причем, как и супрессоры, элиситоры могут быть неспецифическими, индуцирующими защитные реакции у разных видов растений, и специфическими. Взаимодействие последних регулируется взаимодействующими генопродуктами партнеров в системе “ген на ген”. Долгое время эти метаболиты рассматривались как независимые друг от друга, конкурирующие соеди-

нения, что подтверждало мультикомпонентную гипотезу фитоиммунитета. Однако проведенные в последние годы исследования по расшифровке молекулярной структуры элиситоров и супрессоров позволили выстроить единую систему, включающую поэтапный молекулярный диалог между партнерами.

Специфические элиситоры бактерий [20]

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

Семейство *avrPto*. *Pseudomonas syringae*. Белок *AvrPto* нарушает сборку глюкановых компонентов клеточной стенки, препятствуя тем самым возникновению защитной структуры — папиллы.

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*. Кодированные этими генами белки индуцируют реакции устойчивости, однако их инактивация в результате мутаций приводит к очень сильному 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 варьирует от 13,5 у *AvrB6* до 25,5 у *AvrXa7*. На С-концевом участке расположен 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 а-импортина, связывающегося с доменом NLS. В ядре происходит экспрессия генов, кодирующих а-экспансины, пектатлиазы и белки, индуцирующие синтез ауксинов, которые обеспечивают гипертрофию зараженной ткани.

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 у большинства 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 сиринголидов (конденсацию ксилозы с Р-оксидеканоидной кислотой) — семейства сигнальных молекул, таких как индукторы споруляции и образования антибиотиков актиномицетов бутанолиды, жасмоновая кислота в клетках растений и др. В среде роста фитопатогенных бактерий, имеющих ген *avrD*, содержание сиринголидов очень низкое, но резко возрастает в зараженных растениях [21].

Специфические элиситоры грибов

Avr9 *Cladosporium fulvum*. Ген *avr9* экспрессируется *in vitro* только в условиях низкой концентрации азота [22]. Он не экспрессируется в конидиях и гифах, находящихся на поверхности листа. Значительная экспрессия происхо-

дит 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. По-видимому, Avr9-белок участвует в поступлении азота в мицелий из субстрата или индуцирует освобождение 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.

Avr4 *C. fulvum*. Зрелый белок имеет 8 остатков цистеина, соединенных дисульфидными связями, и имеет гомологию с хитин-связывающим белком беспозвоночных. [22]. 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*. Экстрапеллюлярный 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 [23].

NIP1 (necrosis inducing protein) *Rhizosporium secalis*. Расоспецифический элиситор для сортов ячменя, имеющих ген устойчивости Rrs-1. Белок Nip1 экспрессируется in planta и вызывает некрозы вследствие стимуляции H⁺-зависимой АТФ-азы 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, NIP 1-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 [24].

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

Белок-Ace1 — поликетидсинтаза, участвующая в синтезе вторичных метаболитов, имеющих поликетидную структуру (в частности — меланина) [25]. Роль меланина в инфицировании риса возбудителем пирикулярноза хорошо известна. ACE1 экспрессируется только в зрелых гаусториях, но не в инфекционных гифах, развивающихся в мезофилле. Сигнал Ace1 белка узнается геном устойчивости риса Pi33.

Как вытекает из изложенного материала, специфические элиситоры представлены в основном двумя типами молекул — белками и конъюгатами углеводов. Белки имеют структуры, обеспечивающие прохождение через мембраны, и отщепляются 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 (Нгр-пили бактерий), они участвуют в патогенезе, разлагая

полимеры клетки хозяина (AvrPi-ta *Magnaporthe grisea*), подавляя защитные свойства (NIP1 *Rhinchosporium secalis*). Ранний белок *Phytophthora parasitica* (CBEL), который связывается с целлюлозой и обеспечивает адгезию с целлюлозосодержащими субстратами, индуцирует протекание защитных реакций, т.е. служит для зараженных растений неспецифическим элиситором. AvrPto *Pseudomonas syringae* обеспечивает размножение паразита и формирование симптомов болезни (семейство AvrB3 белков у ксантомонад).

У вирусов в роли специфических элиситоров выступают внутриклеточные белки, как структурные, так и ферментные. Низкомолекулярные элиситоры представляют собой компоненты клеточных стенок или сигнальные молекулы, участвующие в регуляции жизненных циклов, а также необходимые для взаимодействия с окружающей средой.

Таким образом, в процессе коэволюции у растений возникли рецепторные молекулы, настроенные на узнавание соединений паразитов, находящихся на их поверхности или экскретируемых в окружающую среду. Поскольку все элиситорные молекулы функционально небезразличны для паразитов, их модификации, снижающие узнавание рецепторами, или полная их потеря сказываются на приспособленности (fitness) вирулентных рас. А это, в свою очередь, может иметь важное эпидемиологическое значение. Поскольку расширение вирулентности сопровождается потерей или изменением структуры элиситора, оно сопровождается снижением fitness в паразитической или сапрофитной фазе жизненного цикла паразитов. В эпидемиологии есть даже понятие “цена вирулентности”.

Если последовательности, узнаваемые рецептором, находятся на участке молекулы элиситора, функционально не необходимом, 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.

Приведенные данные позволяют сделать два важных вывода.

1. Неспецифические элиситоры — структурные и экскретируемые компоненты паразитов, контактирующие с растительными клетками. Это полисахариды клеточной стенки — глюканы и хитин, белки флагеллин бактериальных жгутиков и элиситины фитофторовых грибов (транспортируют стеринны через мембраны). Они всегда есть у паразитов, поэтому являются надежными молекулами для узнавания и создания базовой устойчивости.

2. Специфические элиситоры — эффекторы, которые паразит выделяет в зараженное растение для подавления его защитного потенциала и улучшения условий питания (неспецифические супрессоры). Поскольку структура многих таких соединений может меняться без потери жизнеспособности, возможны мутации, изменяющие домены, которые узнаются специфическими клеточными рецепторами растения. Однако часто это сопровождается снижением патогенности (“сильные гены устойчивости” Вандерпланка, “цена вирулентности” Леонарда).

Следующим этапом, важным для понимания механизмов взаимодействия растений и паразитов, явилось установление непрямого взаимодействия между специфическими элиситорами и продуктами генов устойчивости растений R-белками.

Элиситорные авр-белки *Cladosporium fulvum* связываются с клетками и протопластами как устойчивых, так и восприимчивых линий томата, а также

других пасленовых и непасленовых растений [26]. Следовательно, у томата имеется неспецифический рецептор, связывающий внеклеточные белки патогена без индукции СВЧ-реакции. Полагают, что клеточный сигнал активизируется после взаимодействия элиситора с гетеродимером, состоящим из R-белка и неспецифического рецептора или, что более вероятно, из R-белка и протеинкиназы (с плазматической мембраной связано несколько типов киназ).

Сиринголиды, синтезирующиеся под контролем гена *avrD Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, вызывают СВЧ-реакцию только у сои, имеющей ген *P204*, но связываются с 34 kD-белком, который есть как у устойчивых, так и у восприимчивых растений [27].

Многие (но не все) гены устойчивости ячменя к мучнистой росе, находящиеся в локусе *M1a*, требуют для проявления специфической устойчивости наличия двух несцепленных генов — *Rar1* и *Rar2* [28].

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 всходов, функционирования меристем и цветения). Этот pathogenicity target (PT) protein после соединения с элиситором фосфорилируется и только после этого приобретает способность к взаимодействию с R-белком.

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 наблюдалась аккумуляция 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*, m.e. приобрели неспецифическую устойчивость. Таким образом, перепродукция внутриклеточной протеинкиназы приводит к трансформации специфической устойчивости в неспецифическую.

С геном *Pto* сцеплен ген *Prf*. Его продукт имеет области LRR, NBS и LZ (как многие R-белки), а также длинную область с двумя прямыми повторами, не гомологичную известным белкам. Белок *Prf* ответственен за СВЧ-реакцию на инсектицид фентион. По-видимому, действие белков *Pto* и *Prf* в зараженной клетке скоординировано — после активизации *Pto* связью с Avr*Pto* сигнал передается на *Prf* [29].

Таким образом, сверхпродукция *Pto* создает базовую устойчивость ко многим патогенам (общность механизмов хозяйской и нехозяйской устойчивости). Связывание с Avr*Pto* может снизить базовую устойчивость. Но такую связь узнает белок *Prf* и индуцирует СВЧ.

Для того чтобы сложить все приведенные факты в единую систему, была предложена **сторожевая модель** фитоиммунитета [30]. Согласно модели сигнальные молекулы фитопаразитов (неспецифические элиситоры) представляют собой метаболиты, выделяемые ими *in planta* и имеющие значение для патогенеза или общего жизнеобеспечения. Мишенями элиситоров могут быть белки, участвующие в защите или в нормальных путях метаболизма. Эффекторы паразита (супрессоры) соединяются с комплексом неспецифический элиситор-рецептор, препятствуя передаче сигнала в ядро. R-белок (сторожевой белок) соединяется с этим комплексом и поворачивает клеточный метаболизм в сторону защитных реакций. Таким образом, одно и то же соединение паразита в разных условиях может служить супрессором или элиситором.

4. Изучение причин гибели паразита в зараженной клетке.

Сигнальные молекулы паразитов, описанные в предыдущем разделе, взаимодействуют с рецепторными белками растений. Иммуномодуляторы (элиситоры или супрессоры) растительных и животных клеток относятся к одним и тем же химическим классам и воздействуют на сходные участки метаболизма. Общей для фито- и зоопатогенных бактерий является система доставки эффекторных белков в цитоплазму хозяйских клеток (секреторная система III типа — TTSS). Молекулярные механизмы рецепции и трансдукции сигнала в ответ на заражение разных фитопатогенных организмов (вирусов, бактерий, грибов, нематод) едины [31]; также едины они, как показано выше, в отношении фитопатогенных и симбиотических организмов (эндомикоризных грибов и клубеньковых бактерий).

Основными показателями иммунного ответа растения на заражение являются: 1) гибель зараженной клетки и окружающих ее здоровых (реакция свехчувствительности) и 2) синтез высокомолекулярных (PR-белки) и низкомолекулярных (фитоалексины) ингибиторов патогенов.

Сверхчувствительная гибель клеток является одной из форм запрограммированной смерти — апоптоза. Сигнальные системы апоптоза животных клеток [32] характерны и для растений [33]. Область связывания нуклеотидов (*NBD*) в R-белках растений гомологична генам, регулирующим запрограммированную гибель клеток животных (*CED-4 Caenorhabditis elegans* и *APAF-1* человека), и, по-видимому, связана с индукцией реакции сверхчувствительности растений [34].

Заключение

Как показано выше, в результате многолетних интенсивных исследований по направлениям, намеченным еще Н.И. Вавиловым, возникли предпосылки к созданию общей теории фитоиммунитета или, шире, общей теории иммунного ответа, основные постулаты которой рассмотрены ниже. Приведенные факты свидетельствуют о единой стратегии врожденного иммунного ответа у растений, беспозвоночных и позвоночных животных. Специфика растений заключается

1. В анатомических особенностях. У растений, во-первых, отсутствует совершенная гуморальная система, интегрирующая отдельные клетки, ткани и органы, и, во-вторых, имеются полисахаридные клеточные оболочки, затрудняющие межклеточные обмены сигнальными молекулами (цитокинами). Поэтому в растении каждая вегетативная клетка обладает набором иммунных молекул и иммунных ответов, которые у позвоночных животных разделены между специфическими иммунными клетками разных типов.

2. В биохимических особенностях. Главные защитные молекулы позвоночных животных — антитела — высокоспецифичны к определенным видам и даже штаммам патогенных микроорганизмов. Такая специфичность требует, во-первых, огромного разнообразия в строении иммунных молекул, которое может быть обеспечено только белками, и, во-вторых, наличия механизма преимущественного размножения только того клона, который продуцирует нужное антитело. Ясно, что каждая клетка растения, несущая все иммунные функции, не может обеспечить такую сложную систему защиты. Функцию узнавания у растений выполняют LRR-домены конституционных R-белков, вариабельность которых не может быть столь высокой, как вариабельность антител. Поэтому генетическое разнообразие растений по факторам устойчивости создается на *популяционном* уровне. Природные популяции многих исследованных видов растений высокогетерогенны по генам устойчивости. Преимущественное размножение того или иного клона также решается на основе популя-

ционных механизмов отбора более приспособленных генотипов. Эти закономерности использованы в селекционных программах создания мультилинейных сортов, т. е. выращивания смеси семян почти изогенных линий одного сорта, имеющих разные гены устойчивости.

Основные защитные молекулы растений низкомолекулярны (фенолы, терпеноиды) и неспецифичны, т. е. токсичны к большому числу видов патогенных грибов и бактерий. Специфичен, и то относительно, их синтез в ответ на инфекцию. И хотя в зараженном растении обычно образуется семейство близких по строению защитных молекул (например, фитоалексинов), все они неспецифичны и отличаются лишь степенью патогенности к разным микроорганизмам и чувствительностью к деградации ферментами паразитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вавилов Н.И.* 1919. Иммуитет растений к инфекционным заболеваниям. Цит. по Вавилов Н.И. Иммуитет растений к инфекционным заболеваниям. М.: Наука. 1986, с. 198. — 2. *Heitefuss R.* 1982. General review of active defense mechanisms in plants against pathogens. In "Active Defense Mechanisms in Plants". Ed. R.K.S. Wood. Plenum Press. P. 2-18. — 3. *Каратыгин И.В., Снегиревская Н.С.* Палеонтологические свидетельства о происхождении основных таксономических групп грибов // Микол. и фитопатол. Т.38. 2004, с. 15-32. — 4. *Воронина Е.Ю.* Микоризы и их роль в формировании сообществ. Вестник московского университета. Сер. 16. Биология. №4. 2006, 17-26. — 5. *Staddon P.L., Fitter A.H.* 1998. Does elevated atmospheric carbon dioxide affect arbuscular mycorrhizas? TREE. V.13. 455-458. — 6. *Spaink H.P.* 2002. A receptor in symbiosis dialogue. Nature. 417. 910-911. — 7. *Akiyama K., Matsuzaiki K-i., Hayashi H.* 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature. V.435. 824-827. — 8. *Peters N.K., Verma P.S.* 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. Molec-Plant-Microbe Interactions. V.3. 4-8. — 9. *Albrecht H., Yoder J.I., Philips D.A.* 1999. Phlavanoids promote haustoria formation in the root parasite *Triphysaria versicolor*. Plant Physiol. V.119. 585-591. — 10. *Hause B., Fester T.* 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. Planta. V.221. 184-196. — 11. *Koide R.T., Schreiner R.P.* 1992. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. V.43. 557-581. — 12. *GadJcar V., David-Schwartz R., Kunik T., Kapulnik Y.* 2001. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. Plant Physiol. V.127. 1493-1499. — 13. *Stracke S., Kistner K. et al.* 2002. A plant receptor-like kinase required for booth bacterial and fungal symbiosis. Nature. V.417. 959-962. — 14. *Michelmores R.W., Meyers B.C.* 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. Genome research. V.8. 1131-1130. — 15. *Yamamoto M., Yamazaki S., Uematsu S et al.* 2004. Regulation of Toll/IL-1 receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein Ikb. Nature. V.430. 218-219. — 16. *Благовещенская Е.Ю., Дьяков Ю.Т.* Эндофитные грибы злаков. Микол. и фитопатол. Т.39. 2005. 1-15. — 17. *Андреев Л.Н., Плотникова Ю.М.* Ржавчина пшеницы. М.: Наука. 1989. — 18. *Tucker S.L., Talbot N.J.* 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant-pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. V.39. 385-417. — 19. *Dyakov Yu.T., DzhavaJchiya V.G., Korpela T. (editors).* 2007. Comprehensive and Molecular Phytopathology. Elsevier. 483 p. — 20. *Leach J.E., Vera Cruz C.M., Bai J., Heung H.* 2001. Pathogen fitness penalty as a predict of durability of disease resistance genes. Annu. Rev. Phytopathol. V.39. 187-224. — 21. *Keen N.T., Tamaki S. et al.* 1990. Bacterial expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. Mol. Plant-Microbe Interact. V.3.112-121. — 22. *Joosten MHAJ, de Wit PJGM,* 1999. The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: a versatile experimental system to study plant-pathogen interactions.

Annu. Rev. Plant Pathol V.37.335-367. — 23. Rooney C.E., van't Klooster J.W. et al. 2005. Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. Science. V.308.1783-1786. — 24. Li Y., Fiegen M., Gierlich A., Knogge W. 1996. NIP1 — a bifunctional signal molecule from the barley pathogen *Rhynchospodium secalis*. Abstr. 3rd. Europ. Conf. Fungal Genet. Munster. P.92. — 25. Bonert H.U. et al. 2003. Secondary metabolism and avirulence in *Magnaporthe grisea*: is ACE1 part of avirulence gene clusters? XXII Fungal. Genet. Conf. USA. P. 119. — 26. Hammond-Kozak K.E., Jones D.A., Jones J.D.G. 1994. Identification of two genes required in tomato for full Cf-9-dependent resistance to *Cladosporium fulvum*. Plant Cell. V.6. 361-374. — 27. Ji C., Okinaka Y et al. 1997. Specific binding of the syringolide elicitors to a soluble protein fraction from soybean leaves. Plant Cell. V.9. 1425-1433. — 28. Schulze-Lefert P., Vogel J. 2000. Closing the ranks to attack by powdery mildew. Trends in Plant Science. V.5. 343-348. — 29. Xiao F., Lu M. et al. 2003. Pto mutants differentially activate Pr/-dependent, aurPto-independent resistance and gene-for-gene resistance. Plant Physiol. V.131. 1239-1249. — 30. Dangl J.L., Jones J.D.G. 2001. Plant Pathogens and integrated defence responses to infection. Nature. V. 411. 826-833. — 31. Холл М.А., Новикова Г.В., Мошков И.Е., Мур Л.А., Дж., Смит А.Р. Протеинкиназы растений в трансдукции абиотических и биотических сигналов. Физиология растений. Т.49. 2002.121-135. — 32. Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. Apoptosis signalling. Annu. Rev. Biochem. V.69. 217-245. — 33. Jones A.M. 2001. Programmed cell death in development and defense. Plant Physiol. V.125. 94-97. — 34. Van den Biezen E.A., Jones J.D.G. 1998. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. Current Biol. V.8. 226-227.

Ю.Т. Дьяков, доктор биологич. наук, профессор,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова