

УДК 577.35'3:632.938.1

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЙ И ФИТОПАТОГЕНОВ: ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

Л. Ф. КАБАШНИКОВА¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Беларусь

Изложены современные представления о молекулярных механизмах врожденного иммунитета растений. Охарактеризованы мембранные паттерн-распознающие рецепторы, которые являются триггером при неспецифическом иммунном ответе и приводят в действие все последующие ответные реакции, а также цитоплазматические специфические рецепторы – белки устойчивости (R-белками), запускающие специфический иммунный ответ. Рассмотрены основные пути трансдукции рецепторных сигналов, обеспечивающих реализацию иммунного ответа в растительной клетке с участием фитогормонов, митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), транскрипционных факторов (TF), что в итоге приводит к выработке связанных с резистентностью метаболитов (RRM) и белков (RRP), которые непосредственно подавляют развитие патогенов.

Ключевые слова: фитопатогены; устойчивость растений; врожденный иммунитет; метаболический путь; рецепторы; эффекторы; паттерн-активированный иммунитет; эффектор-активированный иммунитет.

MOLECULAR MECHANISMS OF PLANTS AND PHYTOPATHOGENS INTERACTION: INNATE IMMUNITY

L. F. KABASHNIKOVA^a

^aInstitute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus,
Akademicheskaya street, 27, 220072, Minsk, Belarus

The article presents modern ideas about the molecular mechanisms of innate plant immunity. Membrane pattern-recognition receptors that are triggered in a nonspecific immune response are characterized and all subsequent responses are triggered, as well as cytoplasmic specific receptors – resistance proteins (R-proteins) triggering the specific immune response. The main pathways of receptor signals transduction providing realization of immune response in a plant cell with the participation of phytohormones, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), transcription factors (TF) eventually leading to the development of resistance-related metabolites (RRM) and proteins (RRP), which directly suppress the development of pathogens, are presented.

Key words: phytopathogens; plant resistance; innate immunity; metabolic pathway; receptors; effectors; pattern-triggered immunity; effector-triggered immunity.

Введение

Микроорганизмы, которые распространены повсеместно, постоянно готовы усваивать доступные им органические вещества, даже если эти вещества являются составными частями другого живого организма. Способность противостоять атаке патогенов определяет биологический успех живого организма.

Образец цитирования:

Кабашникова Л. Ф. Молекулярные механизмы взаимодействия растений и фитопатогенов: врожденный иммунитет // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2018. № 2. С. 26–37.

For citation:

Kabashnikava L. F. Molecular mechanisms of plants and phytopathogens interaction: innate immunity. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2018. No. 2. P. 26–37 (in Russ.).

Авторы:

Людмила Федоровна Кабашникова – доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент НАН Беларуси; заведующий лабораторией прикладной биофизики и биохимии.

Authors:

Liudmila F. Kabashnikava, doctor of sciences (biology), associated professor, corresponding member; head for the laboratory of applied biophysics and biochemistry.
kabashnikova@ibp.org.by

Таким образом, иммунитет (*лат. immunitas* – «освобождение от чего-либо») – это способность живого организма препятствовать вмешательству в его жизнь гетеротрофного организма, и в первую очередь микроорганизма. В настоящее время под иммунитетом понимают невосприимчивость (устойчивость) организма к инфекционной болезни при контакте с ее возбудителем и наличии условий, способствующих заражению.

Растения, в отличие от позвоночных животных, лишены антител и способности к фагоцитозу, не имеют кровеносной системы и гуморальных факторов иммунитета. Взамен этого каждая растительная клетка обладает сформированной заранее и/или индуцируемой защитой от широкого круга фитопатогенов. У растений, как и у животных, различают два типа иммунитета: врожденный (естественный) и приобретенный (или индуцированный). В настоящем исследовании изложены современные представления о молекулярных механизмах врожденного иммунитета растений.

Общие представления о молекулярных механизмах врожденного иммунитета растений

Врожденный или естественный иммунитет – это свойство растений не поражаться (не повреждаться) той или иной болезнью (вредителем). Он передается по наследству из поколения в поколение. В пределах врожденного различают пассивный и активный иммунитет. Однако результаты многочисленных исследований приводят к выводу, что деление иммунитета растений на активный и пассивный весьма условно. *Пассивный* иммунитет представляет собой свойство растений препятствовать внедрению патогена и развитию его в тканях растения-хозяина. Он существует независимо от наличия паразита. *Активным* иммунитетом называют свойство растений активно реагировать на внедрение в него паразита [1, с. 16].

За последние два десятилетия прогресс в молекулярном анализе иммунной системы растений выявил ключевые элементы сложной цепи ответных реакций растительного организма при патогенезе [2, с. 720]. Современные представления о нем характеризуют взаимодействие молекул, секретируемых патогенами, с молекулами растений-хозяев, что приводит к активации множественных сигнальных путей, лежащих в основе иммунного ответа. В последние годы ученые рассматривают системную биологию как перспективный подход для выявления молекулярных механизмов взаимодействий в системе «растение–патоген» и предсказуемость их результатов. По мере изучения данной проблемы становится очевидным, что разработка сложных моделей патогенеза растений, включающих растительные, патогенные и климатические характеристики, представляет собой главную научную проблему, связанную с формированием агротехнологий будущего.

Несмотря на то, что растения не имеют защитных циркулирующих специализированных клеток (лейкоцитов), иммуноглобулинов и др., как животные организмы, тем не менее у растений есть в наличии так называемый врожденный иммунитет, которым обладает каждая растительная клетка. Растения также реализуют механизмы формирования иммунной памяти, которые, например, были продемонстрированы на табаке при заражении вирусом табачной мозаики [3, с. 90].

Иммунитет растений представляет собой сложную многоуровневую систему с несколькими линиями защиты. Чтобы получить доступ к питательным веществам растения-хозяина и завершить свой жизненный цикл, патоген должен пройти сначала пассивные защитные механизмы. К ним относятся такие структурные барьеры, как кутикула, клеточная стенка и конститутивно продуцируемые антимикробные соединения [4, с. 2–3]. В дополнение к этим пассивным механизмам растения обладают двухуровневой активно индуцируемой иммунной системой, которая включает неспецифический и специфический врожденный иммунитет. *Неспецифический иммунитет* – это первый уровень иммунного ответа или паттерн-активированный иммунитет (pattern-triggered immunity, PTI), который ассоциирован с микробными молекулярными структурами (pathogen-associated molecular patterns, PAMP). PAMP представляют собой такие широко консервативные микробные молекулы, как липополисахариды, пептидогликаны, бактериальный флагеллин или грибковый хитин, которые воспринимаются поверхностными рецепторами растительных клеток, называемыми паттерн-распознающими рецепторами (pattern-recognition receptor, PRRs). Хорошо документированным примером является распознавание пептида flg22 из бактериального флагеллина рецептором FLS2 растений арабидопсиса [2, с. 720]. Во многих случаях этой линии защиты (PTI) достаточно для борьбы с атакой патогенов и поддержания здоровья растений. Итак, благодаря эволюции, патогены научились обходить систему защиты растений на уровне распознавания PRRs и проникать в клетки.

Специфический иммунитет – это второй уровень защиты растений или эффектор-активированный иммунитет (effector-triggered immunity, ETI). Он опосредуется белками внутриклеточной резистентности (R-белками), которые распознают молекулы – эффекторы, вводимые патогенами в клетки растений [5, с. 2]. В отличие от PTI, который придает растениям устойчивость к широкой группе микроорганизмов, ETI специфичен для изолятов микроорганизмов, продуцирующих данный эффектор, и приводит

к полному сопротивлению, часто сопровождаемому быстрой запрограммированной клеточной смертью, называемой гиперчувствительной реакцией (hypersensitive response, HR) [6, с. 1249].

Следует отметить, что тысячи генов растений и патогенов по-разному экспрессируются во время патогенеза [7, с. 3058], однако до сих пор функция многих из этих генных продуктов остается неизвестной. Кроме того, в естественной среде растения подвергаются воздействию постоянно изменяющихся условий внешних факторов, находятся в окружении патогенных и непатогенных микроорганизмов (микробиоты), регулируют свои физиологические процессы в изменяющихся условиях произрастания (абиотический стресс) [8, с. 211]. Со стороны микроорганизмов активность клеток должна быть адаптирована не только для преодоления механизмов защиты растений, но и для того, чтобы возбудитель мог питаться ресурсами, предоставляемыми растением-хозяином, конкурировать с другими микроорганизмами, а также адаптироваться к изменениям в окружающей среде. Это, в частности, подразумевает манипулирование функциями клетки-хозяина – превращение молекул-хозяев в легко усваиваемые соединения и их транспорт [9, с. 528]. Следовательно, метаболизм растений и патогенов взаимосвязан и должен рассматриваться как единое целое.

Паттерн-распознающие рецепторы растений

Неспецифический иммунитет растений (PTI) контролируется набором определенных трансмембранных рецепторов – паттерн-распознающих рецепторов (PRRs) [2, с. 720]. Итак, распознавание консервативных микробных доменов (также называемых патоген-ассоциированными молекулярными структурами, PAMP) с помощью PRRs инициирует активацию митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), генерацию активных форм кислорода (АФК), выделение ионов Ca^{2+} , транскрипционное перепрограммирование, биосинтез гормонов и отложение каллозы в клеточной стенке [10, с. 1].

В отличие от животных, которые имеют рецепторные тирозинкиназы (receptor tyrosine kinases, RTK), 7 трансмембранных рецепторов, содержащих G-белок (G protein-coupled receptors, GPCRs) и Toll-подобные рецепторы на плазматической мембране для восприятия гормонов роста, сигналов окружающей среды и сигналов опасности, возникающих при атаке патогенов, растения имеют рецептор-подобные киназы (receptor like kinase, RLK) (~ 410 в *Arabidopsis*) и рецептор-подобные белки (receptor like protein, RLP) (~ 170 в *Arabidopsis*) для выполнения этих разнообразных функций [11, с. 618].

Растительные RLK являются аналогами RTK животных и содержат эктодомен (ectodomain, ECD), представляющий собой одноимпульсный трансмембранный домен, и цитоплазматический киназный домен. RLP растений, по существу, является RLK, которые лишены цитоплазматического домена. ECDs, RLK и RLP сильно варьируют, обеспечивая возможность распознавания широкого спектра лигандов, включая стероиды, пептиды, полисахариды и липополисахариды. Следует отметить, что у растений, наряду с RLK и RLP, которые действуют как паттерн-распознающие рецепторы PRR, воспринимая сигналы опасности, имеются другие аналогичные рецепторы, которые регулируют рост и развитие, размножение, симбиоз и толерантность к абиотическим стрессам [12, с. 2–5].

Рецептор XA21 риса (*Oryza sativa*) является первым обнаруженным PRR, который участвует в формировании устойчивости против бактериальной инфекции *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* [цит. по 13, с. 33]. Лигандом для рецептора является сульфатированный пептид белка Ax21, который представлен во всех видах бактерий рода *Xanthomonas*. У *Arabidopsis* были хорошо изучены два дополнительных PRR растений: чувствительный к флагеллину 2 (FLS2) и фактор элонгации (EF)-Tu (EFR), которые распознают flg22-пептид из жгутиковых бактерий и EF-Tu-пептид elf18 соответственно [цит. по 13, с. 33].

На рис. 1 представлена структура паттерн-распознающих рецепторов PRR, которые состоят из внеклеточного домена, богатого лейцином (leucine-rich repeats domain, LRR domain), трансмембранного домена (transmembrane domain, TM), прилегающего к мембране домена (juxtamembrane domain, JM) и внутриклеточного не-аргинин-аспаратного киназного домена (non-arginine-aspartate kinase, non-RD) [14, с. 1].

Все рецепторные киназы растений, охарактеризованные до настоящего времени и несущие мотив non-RD-киназы, участвуют в распознавании консервативных микробных структур [цит. по 14, с. 2]. Non-RD-киназы обычно содержат цистеин (C) или глицин (G) перед остатком каталитического аспартата (D). Напротив (рис. 1), более обширная группа RD-киназ имеет аргинин (R), непосредственно предшествующий консервативному каталитическому аспартату (D). Известно, что RD-киназы выполняют более разнообразные функции и часто связаны с процессами развития растений. RD-киназы также являются партнерами non-RD-киназ в сети трансдукции иммунного ответа. BAK1-киназа у *Arabidopsis*, являющаяся RD-киназой, первоначально была идентифицирована как положительный регулятор брассиностероидных ответов путем образования *in vivo* лиганд-зависимого комплекса с рецептором BRI1 [цит. по 14, с. 2]. Дальнейшие исследования свидетельствуют, что BAK1 также участвует в PRR-

опосредованной передаче сигналов, физически взаимодействуя с non-RD-киназами FLS2 и EFR. Мутанты, лишенные BAK1, демонстрируют реакции на другие консервативные микробные структуры, включая HrpZ (гиперчувствительный ответ и патогенность Z), липополисахариды и пептидогликаны. Предполагают также, что XA21-ассоциированная киназа 1 риса (XAK1) – ортолог BAK1, необходима для опосредованного XA21 иммунитета. Эти результаты свидетельствуют, что PRR включают core-регулируемые домены, несущие RD-киназы, в качестве сигнальных партнеров для трансдукции иммунного ответа.

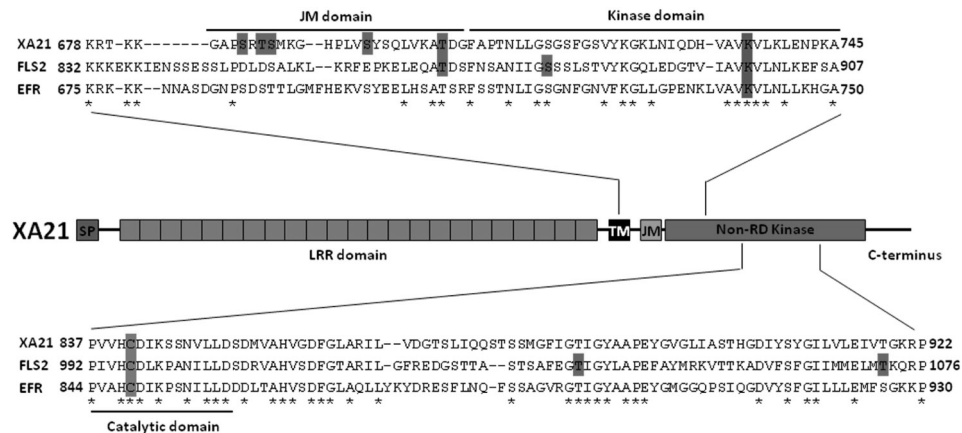


Рис. 1. Характеристика Ser /Thr остатков паттерн-распознающих рецепторов растений [14, с. 2].

Вверху: идентифицированные и предполагаемые сайты автофосфорилирования XA21 риса (*Oryza sativa*) и FLS2 и EFR *Arabidopsis* (красный цвет). Консервативный лизин, который необходим для аутофосфорилирования (зеленый цвет). JM, киназа и каталитические домены (черный цвет). В центре: доменная структура риса XA21. Внизу: Сопоставлены каталитические домены XA21, FLS2 и EFR. Цистеин, который заменяет R в этих non-RD-киназах (синий цвет). Предполагаемые сайты автофосфорилирования FLS2 (красный цвет). Аминокислоты, которые совпадают у XA21, FLS2 и EFR, отмечены «*». SP, сигнальный пептид; LRR – домен, 23 лейцин-богатых повтора; TM – трансмембранный домен; JM – прилегающий к мембране домен; non-RD-киназа – неаргинин-аспартат-киназа; XA21 риса, *Xanthomonas resistance* – 21; FLS2 – *Arabidopsis*, флагеллин-чувствительный – 2; EFR, фактор элонгации арабидопсиса – Tu-рецептор

Fig. 1. Characterized Ser/Thr residues of pattern recognition receptors in plants [14, с. 2].

Top: Identified and proposed autophosphorylation sites on rice XA21 and *Arabidopsis* FLS2 and EFR are highlighted in red. The conserved lysine that is essential for autophosphorylation is highlighted in green. The JM, kinase, and catalytic domains are indicated by black brackets. Center: The domain structure of rice XA21. Bottom: Alignment of the catalytic domains of XA21, FLS2, and EFR. The cysteine that replaces the R in these non-RD kinases is highlighted in blue. Putative autophosphorylation sites of FLS2 are highlighted in red. Amino acids that are conserved between XA21, FLS2, and EFR are marked as «*». SP, signal peptide; LRR domain, 23 leucine-rich repeats domain; TM – transmembrane domain; JM – juxtamembrane domain; non-RD kinase – non-arginine-aspartate kinase; XA21, rice *Xanthomonas resistance* – 21; FLS2 – *Arabidopsis* flagellin sensitive – 2; EFR, *Arabidopsis* elongation factor – Tu-receptor

В последних научных исследованиях раскрыто множество новых PRR, их соответствующие лиганды и механизмы, лежащие в основе активации PRR и внутриклеточной сигнализации. В табл. 1 представлены известные PRRs, которые относятся к генетически подтвержденным рецепторам, чье связывание с микробными структурами было биохимически продемонстрировано [11, с. 620].

Предполагаемые PRRs относятся к рецептор-подобным структурам с генетически подтвержденными функциями в распознавании микробных эффекторов, для которых еще не показано прямое связывание. Как видно из приведенной табл. 1, растения разворачивают большое количество RLK и RLP в качестве паттерн-распознающих рецепторов PRR, которые обнаруживают микробные структуры и ассоциированные с ними молекулы растения-хозяина, образуя первый уровень активной защиты растений при атаке патогенами (PTI).

Таблица 1

Известные и предполагаемые PRRs, вовлеченные в иммунитет растений*

Table 1

Known and probable PRRs involved in plant immunity*

Наименование Name	Семейство Family	Лиганд Ligand	Растение Plant	Литературные источники References
FLS2	LRR-RK	flg22	Arabidopsis	Gómez-Gómez and Boller (2000); Bauer, et al. (2001)
FLS3	LRR-RK	flgII-28	Tomato	Hind, et al. (2016)
EFR	LRR-RK	elf18	Arabidopsis	Kunze et al. (2004); Zipfel, et al. (2006)
PEPR1/2	LRR-RK	Peps	Arabidopsis	Yamaguchi, et al. (2006); Huffaker, et al. (2006); Huffaker, and Ryan (2007); Krol, et al. (2010); Yamaguchi, et al. (2010)
XA21	LRR-RK	RaxX21-sY	Rice	Pruitt, et al. (2015)
DORN1	Lectin-RK	Eatp	Arabidopsis	Choi, et al. (2014)
LORE	Lectin-RK	LPS	Arabidopsis	Ranf, et al. (2015)
WAK1	EGF-Like-RLK	OGs	Arabidopsis	Decreux and Messiaen (2005); Brutus, et al. (2010)
XPS1	LRR-RK	xup25	Arabidopsis	Mott, et al. (2016)
OsCERK1	LysM-RLK	Chitin	Rice	Shimizu, et al. (2010)
CEBiP	LysM-RP	Chitin	Rice	Kaku, et al. (2006)
LYM1/3	LysM-RP	PGNs	Arabidopsis	Willmann, et al. (2011)
LYP4/6	LysM-RLP	PGNs/chitin	Rice	B. Liu, et al. (2012)
RLP23	LRR-RP	nlp20	Arabidopsis	Bi, et al. (2014); Albert, et al. (2015)
NbCSPR	LRR-RP	csp22	<i>N. benthamiana</i>	Saur, et al. (2016)
LeEix1	LRR RP	Eix	Tomato	Bar, et al. (2010)
LeEix2	LRR-RP	Eix	Tomato	Ron and Avni (2004)
ReMax/RLP1	LRR-RLP	eMax	Arabidopsis	Jehle, et al. (2013)
Ve1	LRR-RLP	Ave1	Tomato	de Jonge, et al. (2012)
Cf-2	LRR-RLP	Avr2	Tomato	Dixon, et al. (1996); Luderer, et al. (2002)
Cf-4	LRR-RLP	Avr4	Tomato	Joosten, et al. (1997); Thomas, et al. (1997)
Cf-4E	LRR-RLP	Avr4E	Tomato	Takken, et al. (1999); Westerink, et al. (2004)
Cf-9	LRR-RLP	Avr9	Tomato	Van den Ackerveken, et al. (1992); Jones, et al. (1994)
Cf-5	LRR-RLP	Unknown	Tomato	Dixon, et al. (1998)
RLP30	LRR-RLP	SCFE1	Arabidopsis	Wang, et al. (2008); Zhang, et al. (2013)
ELR	LRR-RLP	Elicitin	Potato	Du, et al. (2015)

Примечание. По [11, с. 620].

Эффектор-распознающие рецепторы растений

Эволюция патогенов позволила им приобрести способность обхода защиты РТИ: становиться либо нераспознаваемыми для рецепторов растений путем мутаций в генах, кодирующих эпитопы, или элиминации распознаваемых участков, либо ингибировать активность последних. Вследствие коэволюции с болезнетворными микроорганизмами, растения приобрели способность синтезировать специфичные белки устойчивости к определенным эффекторам проникших в клетки патогенов, в чем и проявляется специфический иммунный ответ.

Специализированные патогенные микроорганизмы продуцируют специфические внутриклеточные элиситоры [10, с. 39] – эффекторы, кодируемые специфическими генами авирулентности (AVR). Характерные свойства элиситоров: взаимодействие с эффектор-активируемыми рецепторами растительных клеток и запуск сигналов «тревоги». Продуцентами специфических эффекторов являются биотрофы, хотя некоторые некротрофы также продуцируют эффекторы.

Эффекторы, в зависимости от их доменов, распознаются специфическими рецепторами растений (R-белками), кодируемыми генами R [15, с. 19249]. Являясь второй линией защитного ответа, эффекторы «запускают» соответствующие гены, что приводит к специфическому гиперчувствительному ответу, чтобы остановить патоген, который обычно называют эффектор-активированным иммунитетом (ETI), качественной устойчивостью или вертикальной устойчивостью. Такая устойчивость считается моногенной и рассматривается на основе гипотезы взаимодействия «ген-на-ген» [16, с. 275]. Однако эти эффектор-активированные рецепторные гены являются только генами слежения, а настоящие гены устойчивости, которые вызывают гиперчувствительный ответ, представляют собой NADPH-оксидазу, каллозо-синтазу и т. д.

R-белки состоят из 2-х основных компонентов – LRRs и нуклеотид-связывающего домена (NB). Они родственны таким животным белкам, как NOD/NLR/STAND ATPases [цит. по 13, с. 34]. NB-LRRs цитоплазматические рецепторы могут непосредственно взаимодействовать с эффекторами либо опосредованно через белки, на которые воздействуют эффекторы. В связи с тем, что у растений нет соматической перестройки генов иммунных рецепторов, аналогичной той, которая происходит в лимфоцитах животных, число генов, кодирующих рецепторы врожденного иммунитета, в геномах растений значительно выше, чем число генов PRRs в геномах млекопитающих.

R-белки подразделяются на CC-NB-LRRs (содержащие на N-конце домен типа «суперспираль» и на TIR-NB-LRRs (содержащие на N-конце TIR-домен, гомологичный Toll и рецептору IL-1 у животных) (рис. 2). NB участвует в связывании и гидролизе аденозинтрифосфата (АТФ), что приводит к конформационным изменениям в молекуле рецептора и последующей активации сигнального каскада. NB-домен входит в состав NB-ARC-домена, который обнаруживается в таких молекулах, как Araf-1, CED-4, R-белках. Домены NACHT, NOD похожи по своей структуре на NB-ARC, присутствуют в белках цитоплазмы животных. Несмотря на то, что белки, имеющие в своем составе NB-ARC/NACHT/NOD-домены, структурно схожи между собой, считается, что они возникли независимо [цит. по 13, с. 35].

LRRs, как и в случае RPPs, участвует в непосредственном связывании с PAMPs. CC-домен, наряду с TIR-доменом, гомологичным Toll и рецептору IL у животных, могут участвовать в непрямом распознавании патогена, благодаря взаимодействию с модифицированными в результате действия патогена, собственными растительными белками, также TIR-домен участвует в гомотипической олигомеризации. SD-домены, характерные для семейства Solanaceae, относятся к одному из семейств ДНК-связывающих доменов транскрипционных факторов [цит. по 13, с. 35].

Распространенность как в животном, так и в растительном царстве белковых структур, в состав которых входят LRR и NB-домены, по-видимому, указывает на физико-химическую «пригодность» такой структуры для осуществления двух сопряженных процессов: узнавания лиганда и дальнейшей передачи сигнала [17, с. 267]. Факторы транскрипции WRKY являются одним из крупнейших семейств регуляторов транскрипции, обнаруженных исключительно в растениях. Они имеют разнообразные биологические функции: участвуют в регуляции биотических и абиотических стрессовых реакций, процессов старения, развития семян и трихом, эмбриогенеза. WRKY могут функционировать как транскрипционные активаторы или репрессоры в различных гомо- и гетеродимерных комбинациях.

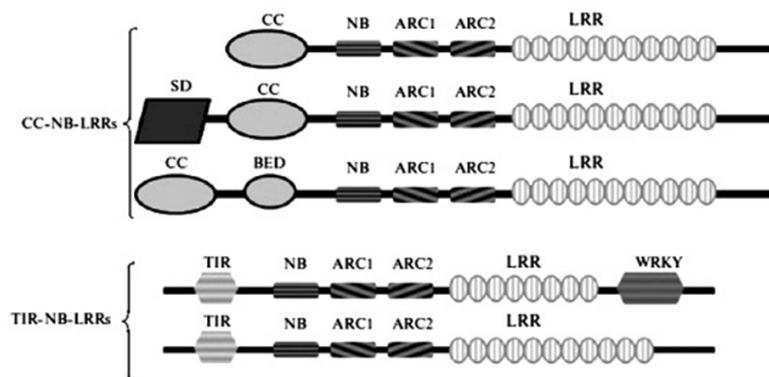


Рис. 2. Схематическое изображение R-белков растений (пояснения в тексте) [13, с. 35]

Fig. 2. Schematic representation of plant R-proteins (detailed description in the text) [13, p. 35]

За последние 15 лет более 50 растительных геномов были секвенированы и собраны [15, с. 19249]. Несмотря на этот большой ресурс, только относительно небольшое количество R-генов было клонировано и полностью охарактеризовано, что обеспечило не только информацию об их структуре, функции и эволюции, но и о создании полезных генетических ресурсов для выведения новых устойчивых сортов. Для сравнения, тысячи аналогов генов резистентности (Resistance Gene Analogs, RGAs) были идентифицированы во многих растительных геномах. Информация о клонированных R-генах для арабидопсиса, ярового ячменя, томатов, пшеницы, картофеля, салата, черного перца, риса, кукурузы, льна, сахарной свеклы и табака представлена в обзоре [15, с. 19251], в котором также содержатся сведения о RGAs в геномах растений.

Молекулярные механизмы иммунного ответа в растительной клетке

В настоящее время уже расшифрованы основные молекулярные механизмы реализации иммунного ответа в растительной клетке. В этом плане, прежде всего, следует охарактеризовать современные представления о молекулярных механизмах взаимодействия между растительными рецепторами и фитопатогенами. Хорошо документированным примером реализации неспецифического иммунного ответа (PTI) является распознавание пептида flg22 из бактериального флагеллина рецептором FLS2 растений арабидопсиса. Этот механизм можно представить как простейшую сигнальную систему, содержащую два компонента – молекулы flg22 и FLS2, связанные между собой лигандами (рис. 3а). [2, с. 720].

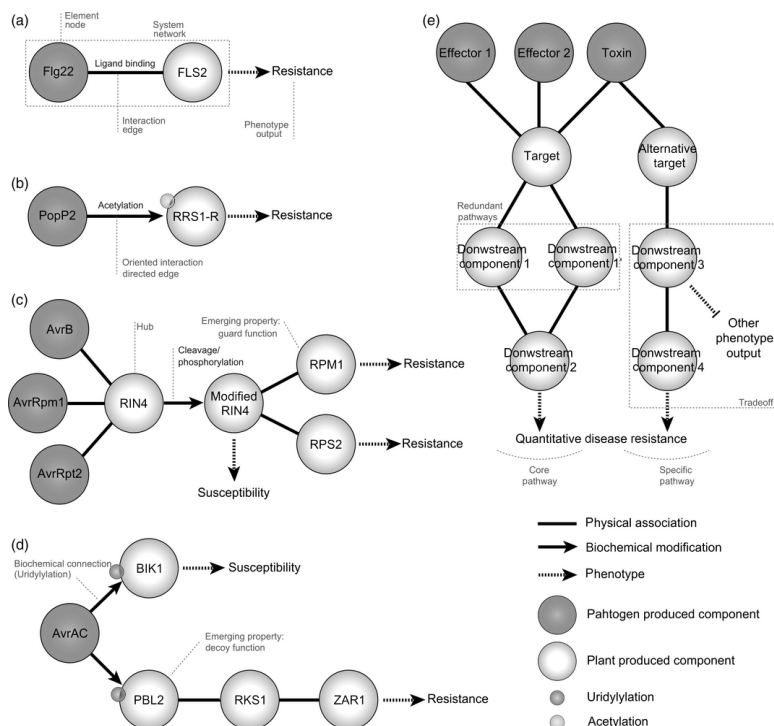


Рис. 3. Известные типы восприятия сигналов в системе «растение–патоген» по [2, с. 721], пояснения в тексте. Молекулы патогенов обозначены коричневыми, а молекулы растений – зелеными кругами

Fig. 3. Known types of signal perception in the «plant–pathogen system» [2, p. 721] (detailed description in the text). Pathogen molecules are shown as brown circles and plant molecules as green circles

В своей простейшей форме специфический иммунный ответ (ETI) может быть результатом взаимодействия такого эффектора патогена, как PopP2 у *Ralstonia solanacearum*, с R-белком растения, как RRS1-R у *Arabidopsis thaliana* (рис. 3б). Это взаимодействие является простой двухкомпонентной сигнальной сетью. На данном конкретном примере показано, что PopP2 модифицирует RRS1-R путем ацетилирования [18, с. 1075]. Данная модификация не является обратимой и взаимодействие строго ориентировано.

Однако исследования последних десятилетий свидетельствуют, что прямое взаимодействие между эффектором и R-белком является скорее исключением, чем нормой, что обуславливает более сложные модели и сигнальные пути. Так, обнаружение эффекторных белков обычно зависит от обнаружения их активности внутри растительной клетки. Для этого R-белки растений контролируют состояние других растительных белков (называемых «стражами»), которые являются прямыми мишенями для эффекторных белков возбудителя. Данная модель называется гипотезой «стража». Типичная защитная система состоит из эффектора AvrB патогенной бактерии *Pseudomonas syringae*, который непосредственно взаимодействует с растительным белком RIN4 (стражем) для его модификации. Затем модифицированный белок RIN4 распознается растительным R-белком RPM1 (рис. 3с). В отсутствие модифицированного белка RIN4, RPM1 не способен обнаружить эффектор AvrB и индуцировать ETI. Этот пример иллюстрирует возникающие свойства сети, которые появляются при взаимодействии между несколькими ее элементами. Еще более сложный пример иллюстрирует ситуацию, когда RIN4 может быть модифицирован несколькими бактериальными эффекторами AvrB, AvrRmp1 и AvrRps2 и защищен двумя R-белками,

RPM1 и RPS2 (рис. 3с). В этом случае RIN4 образует сайт связывания с большим количеством соединений, который часто обозначают как центральный узел (hub).

В некоторых ситуациях модификация белка-стража эффекторами возбудителя может нанести ущерб растениям. В этом случае работает модель «приманки», в которой участвует другая белковая молекула, которая имитирует растительный белок, модифицированный эффекторами возбудителя для повышения восприимчивости. Например, эффекторный белок AvrAC от *Xanthomonas campestris* нацелен на BIK1, центральный компонент передачи сигналов РТИ у *A. thaliana* для повышения восприимчивости. Но вместо того, чтобы непосредственно защищать BIK1, растение имеет связанный с ним белок PBL2, который «ошибочно» также модифицируется AvrAC, но при этом защищен предварительно сформированным комплексом RKS1 и R-белком ZAR1 (рис. 3d). Здесь функция «приманки» PBL2 может быть реализована только в связи с функциями BIK1, RKS1 и ZAR1, что является еще одним примером возникновения новых свойств в сети иммунного ответа растений. Недавно показано, что некоторые R-белки содержат интегрированный домен «приманки», объединяющий функции защиты и восприимчивости [19, с. 8; 20, с. 624].

В контексте молекулярно-рецепторных взаимодействий между растением и патогеном различают еще одну форму иммунного ответа растительного организма, которую обычно называют количественной болезнестойчивостью (quantitative disease resistance, QDR) [21, с. 427]. Эта форма иммунного ответа, широко наблюдаемая в культурных и естественных растительных популяциях, представлена непрерывной шкалой переходов между устойчивыми и восприимчивыми растениями без четкой дифференциации между ними. Ее можно рассматривать как результат взаимодействия между несколькими молекулярными событиями, включающими активность множественных патогенных эффекторов и токсинов на растительных мишенях и активацию множественных путей защитного ответа в растениях (рис. 3е). Однако к настоящему времени получена весьма ограниченная информация о молекулярных механизмах, лежащих в основе QDR. QDR-гены были идентифицированы только в немногих случаях и кодируют разнообразные молекулярные структуры, лежащие в основе долговременной устойчивости растений к широкому спектру фитопатогенов. Интересно отметить, что одним из них является RKS1, нетипичная киназа, которая играет ключевую роль в ETI, взаимодействуя с R-белком ZAR1 [22, с. 286].

В последние годы в связи с расшифровкой молекулярных механизмов ответных реакций растений на атаку конкретных видов патогенных микроорганизмов, терминология и классификация молекулярных структур, участвующих в формировании иммунитета в растительной клетке, претерпела некоторые изменения и уточнения, которые были изложены в обзоре [10, с. 39]. На рис. 4 представлены основные молекулярные структуры, вовлеченные во взаимодействие между растением и патогенами, исходя из сформированных в настоящее время представлений о механизмах восприятия, трансдукции и реализации иммунного ответа. Так, в процессе жизнедеятельности растения постоянно сталкиваются с проблемами, вызванными атакой патогенов (биотрофов, гемибитрофов и некротрофов) и их распространением в апопластах растительных тканей. Эти патогены обычно производят элиситоры (прежнее название – PAMP/MAMP), за исключением специализированных патогенов, которые продуцируют также эффекторы. Растения распознают эти элиситоры/эффекторы и выстраивают иммунный ответ, опосредованный иерархической системой R-генов: элиситор-распознающих рецепторов (elicitor recognition receptor, ELRR), эффектор-распознающих рецепторов (effector recognition receptor, ERR), фитогормонов (phytohormone, PHR), митоген-активируемых протеинкиназ (mitogen-activated protein kinase, MAPKs), транскрипционных факторов (transcription factor, TF), что в конечном итоге, приводит к выработке связанных с резистентностью метаболитов (resistance-related metabolites, RRM) и белков (resistance-related proteins, RRP), которые непосредственно подавляют развитие патогенов. Элиситоры распознаются локализованными на мембранах растительной клетки рецепторами ELRR (прежнее название – PRR), тогда как эффекторы распознаются ERR (прежнее название – PRR, продуцируемые R-генами). Например, эффекторы, продуцируемые биотрофами, часто распознаются белками NBS-LRR, что приводит к гиперчувствительному ответу через путь MAPK / SA / NPR1.

С другой стороны, такие элиситоры (рис. 4), как хитины, продуцируемые главным образом гемибитрофами и некротрофами, воспринимаются рецептор-подобными киназами (receptor-like kinases, RLK) и LysM-доменом хитин-элиситор рецепторной киназой (chitin elicitor receptor kinase, CERK1) соответственно, что активирует MAP-киназный сигнальный каскад через MAPK-киназу киназы (MAPKKK).

Некротрофы (рис. 4) производят такие элиситоры, как ферменты и токсины, которые повреждают оболочки растительных клеток, в результате чего накапливаются фрагменты клеточных стенок и их содержимого (растительные элиситоры, сигнальные молекулы растений, прежнее название – damage-associated molecular patterns (DAMP), которые активируют защитные ответы растений через связанные с клеточной стенкой рецепторные киназы (wall-associated receptor kinases, WAKs).

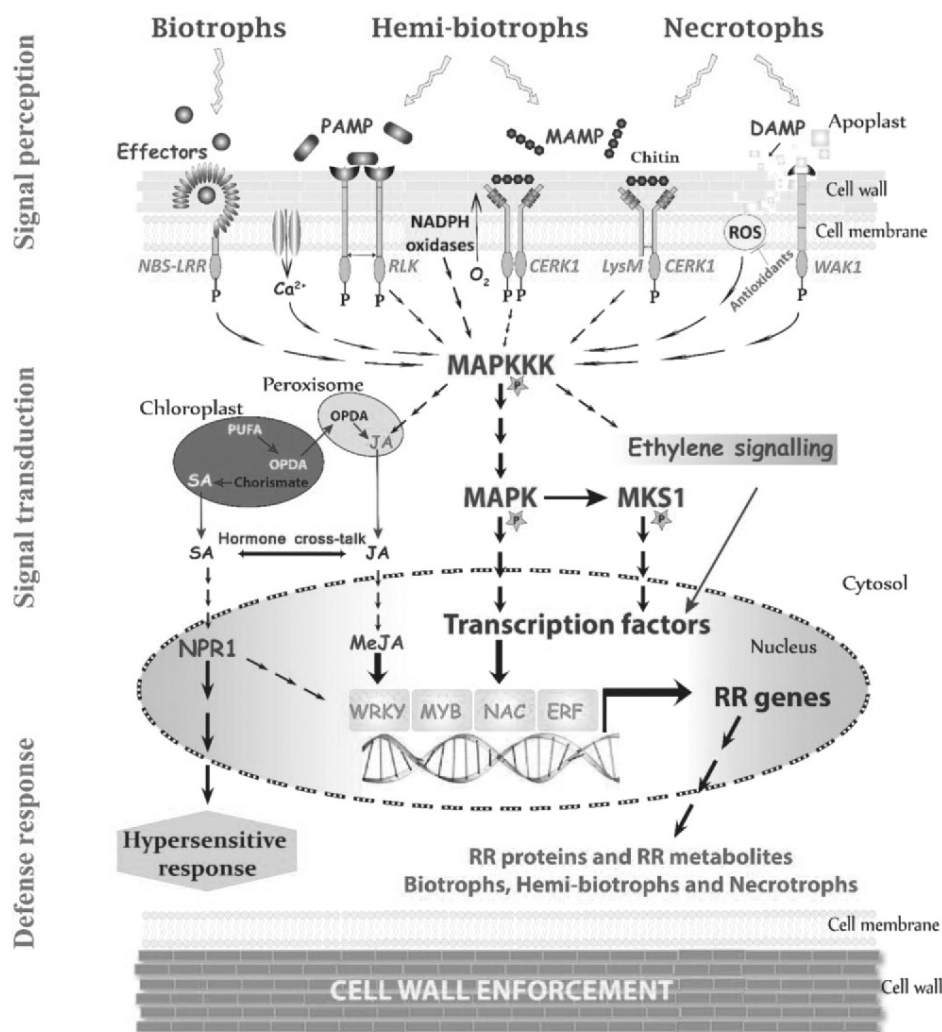


Рис. 4. Ключевые молекулярные структуры, вовлеченные во взаимодействие «растение–патоген» (пояснения в тексте) [10, с. 44]. Митоген-активируемая протеинкиназа (*MAPK*), транскрипционный фактор (*TF*), рецептор подобная киназа (*RLK*), LysM домен хитин-элиситор рецепторной киназы (*CERK1*), MAPK-киназа киназы (*MAPKKK*), киназа, ассоциированная с клеточной стенкой (*WAKs*), активные формы кислорода (*ROS*), гормоны растений (этилен, Ethylene, салициловая кислота, *SA*, жасмоновая кислота, *JA*), транскрипционные факторы (*WRKY*, *MYB*, *NAC* and *ERF*), *RR*-гены, метаболиты, ассоциированные с резистентностью (*RRMs*), белки, ассоциированные с резистентностью (*RRPs*)

Fig. 4. Key molecular players involved in the «plant-pathogen» interaction (detailed description in the text) [10, p. 44]. Mitogen-activated protein kinase (*MAPK*), transcription factor (*TF*), LysM domain chitin elicitor receptor kinase (*CERK1*), MAPK-kinase kinase (*MAPKKK*), wall-associated receptor kinases (*WAKs*), reactive oxygen species (*ROS*), plant hormones (Ethylene, *SA* and *JA*), transcription factors (*WRKY*, *MYB*, *NAC* and *ERF*), *RR*-genes, resistance-related metabolites (*RRMs*), resistance-related proteins (*RRPs*)

Одновременно с этим в результате биотического стресса активируются вторичные такие мессенджеры, как ионы кальция, активные формы кислорода (*ROS*) и опосредованные растительными гормонами (этилен, салициловой и жасмоновой кислотами (Ethylene, *SA* и *JA*) защитные механизмы, которые также вызывают активацию соответствующих генов, приводящую к гиперчувствительной реакции или пониженной восприимчивости. Итак, сигнал, воспринимаемый рецепторными киназами, эффективно передается через цитозольные протеинкиназы, такие как *MAPKKK*-каскад, для активации целого ряда факторов транскрипции растений (*WRKY*, *MYB*, *NAC* и *ERF*), которые регулируют несколько *R*-генов для продуцирования *RRP* и *RRM*.

Биосинтез белков (*RRP*) и метаболитов (*RRM*) растений, связанных с резистентностью, контролируется генами резистентности (R_{RRP} , R_{RRM}) [10, с. 45]. *RRP* и *RRM* являются либо конститутивными метаболитами (*RRC*), присутствующими в растительной клетке перед инвазией патогена, либо индуцированными (*RRI*) в результате инвазии возбудителя. Количество продуцируемых белков и метаболитов

зависит не только от активности генов R_{RRP} и R_{RRM} , но также от иерархии регуляторных R-генов, контролирующих их функционирование.

Белки RRP представляют собой связанные с патогенозом (pathogen-related, PR) белки, которые подавляют патогены, детоксифицируют токсины или факторы вирулентности, продуцируемые патогенами, и предотвращают распространение патогенов путем укрепления клеточных стенок. В настоящее время уже идентифицировано около 17 семейств таких белков. PR-белки, β -1-3-эндоглюканазы (PR-2) и эндохитиназы (PR-3, 4, 8 и 11) разрушают стенки клеток патогенов [10, с. 46]. Семейства PR-белков с молекулярной массой менее 10 кДа включают специфические ингибиторы протеиназ (PR-6), дефензины (PR-12), тионины (PR-13) и белки-переносчики липидов (PR-14), которые характеризуются широкой антибактериальной и противогрибковой активностью. Представители семейства PR-1 и тауматин-подобные белки семейства PR-5 обеспечивают устойчивость растений к мицелиальным микроорганизмам группы Oomycetes. PR-7 представляют собой эндопротеиназы томатов, разрушающие микробные клеточные стенки. Белки семейства PR-9 являются пероксидазами, семейства PR-15 – оксалаатоксидазами, а семейства PR-16 – оксалаатоксидаза-подобными соединениями [23, с. 1043]. Семейство PR-10 представлено рибонуклеаза-подобными белками, участвующими в инактивации рибосом.

Метаболиты RRM представляют собой антимикробные соединения – фитоантиципины (соединения, постоянно присутствующие в растительной клетке) и фитоалексины (соединения, синтез которых в растительной клетке индуцируется патогеном *de novo*), или их конъюгированные продукты, которые осаждаются для укрепления вторичной клеточной стенки, что препятствует дальнейшему распространению патогена по растительным тканям [10, с. 45]. Фитоантиципины обычно вырабатываются растущими растениями и запасаются в трихомах (выростах клеток эпидермы), масляных железах и в эпидермальном слое клеток в форме нетоксичных гликозидов, а их свободные токсичные формы могут высвобождаться путем простого гидролиза. Растения производят тысячи фитоантиципинов: фенолов, флавоноидов, терпенов, жирных кислот и алкалоидов, которые обладают противомикробной активностью. Биосинтез фитоалексинов в растениях индуцируется атакой патогена и контролируется генами R_{RRM} в различных специфических метаболических путях. К фитоалексинам относят *фенилпропаноиды* и *флавоноиды* (изофлавоноиды, изофлавоны, птерокарпаны, изофлаваны, куместаны, арилбензофураны и стильбены); *терпены* (монотерпены, сесквитерпены, карбоксильные сесквитерпены и семейства дитерпенов); *индол* (камалексин) [10, с. 46].

Таким образом, устойчивость растений к фитопатогенам формируется благодаря кумулятивным эффектам RRP и RRM, синтезируемым генами R_{RRP} и R_{RRM} , соответственно, на которые в свою очередь влияют регуляторные R-гены, способные регулировать несколько генов R_{RRP} и R_{RRM} . Эти защитные соединения обычно доставляются к месту заражения в форме везикул такими транспортерами, как ABC и Arabidopsis PEN3-транспортеры (R-гены).

Заключение

Таким образом, расширение международной торговли, массовые передвижения людей и глобальные изменения климата связаны с увеличением числа вспышек новых заболеваний растений. В этой связи глубокие знания о том, как возбудители и их хозяева взаимодействуют между собой и приспосабливаются к окружающей среде, являются предпосылкой для развития новых стратегий идентификации фитопатогенов, защиты растений и эпиднадзора. Тем не менее, прогнозирование болезней растений остается сложной задачей из-за отсутствия знаний об изменении патогенности возбудителей болезней и устойчивости растений-хозяев в разных климатических условиях. Системная биология может служить основой для заполнения этого пробела, предсказывая патогенность микроорганизмов и устойчивость растений-хозяев, их эволюцию с учетом молекулярных знаний, полученных в последние десятилетия.

Библиографические ссылки

1. Шкаликов В. А., Дьяков Ю. Т., Смирнов А. Н. и др. Иммуитет растений. М., 2005.
2. Peyraud R., Dubiella U., Barbacci A., et al. Advances on plant-pathogen interactions from molecular toward systems biology perspectives // The Plant J. 2017. Vol. 90, issue 4. P. 720–737.
3. Spoel S. H., Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells // Nature Reviews Immunology. 2012. Vol. 12. P. 90.
4. Miedes E., Vanholme R., Boerjan W., et al. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens // Front. Plant Sci. 2014. URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00358> (date of access: 01.03.2018).
5. Glowacki S., Macioszek V. K., Kononowicz A. K. Proteins as fundamentals of plant innate immunity // Cellular & Molecular Biology Letters. 2011. Vol. 16. P. 1–24.
6. Coll N. S., Eppe P., Dangl J. L. Programmed cell death in the plant immune system // Cell Death Differ. 2011. Vol. 18. P. 1247–1256.

7. Lewis L. A., Polanski K., de Torres-Zabala M., et al. Transcriptional dynamics driving MAMP-triggered immunity and pathogen effector-mediated immunosuppression in Arabidopsis leaves following infection with *Pseudomonas syringae* pv tomato C3000 // *Plant Cell*. 2015. Vol. 27. P. 3038–3064.
8. Muller D. B., Vogel C., Bai Y., et al. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives // *Annu. Rev. Genet.* 2016. Vol. 50. P. 211–234.
9. Chen L. Q., Hou B. H., Lalonde S., et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens // *Nature*. 2010. Vol. 468. P. 527–532.
10. Kushalappa A. C., Yogendra K. N., Karre S. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance // *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2016. 35:1. 38–55. DOI: 10.1080/07352689.2016.1148980.
11. Tang D., Wang G., Zhou J.-M. Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition // *The Plant Cell*. 2017. Vol. 29. P. 618–637.
12. Breiden M., Simon R. Q&A: How does peptide signaling direct plant development? // *BMC Biol.* 2016. 14:58. DOI: 10.1186/s12915-016-0280-3.
13. Копытина Д. А., Касенова А. М., Омашева М. Е. и др. Молекулярные основы иммунитета растений // *Биотехнология. Теория и практика*. 2012. № 3. С. 31–41.
14. Park C.-J., Caddell D. F., Ronald P. C. Protein phosphorylation in plant immunity: Insights into the regulation of pattern recognition receptor-mediated signaling *Frontiers in Plant Science* // *Plant Proteomics*. 2012. Vol. 3, art. 177. publ.: 03 August. DOI: 10.3389/fpls.2012.00177.
15. Sekhwal M. K., Li P., Lam I. et al. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16(8). P. 19248–19290.
16. Flor H. H. Current status of the gene-for-gene concept // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971. Vol. 9. P. 275–296.
17. Felix G., Duran J. D., Volko S., et al. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin // *Plant J.* 1999. Vol. 18(3). P. 265–276.
18. Le Roux C., Huet G., Jauneau A., et al. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity // *Cell*. 2015. Vol. 161, issue 5. P. 1074–1088.
19. Sarris P. F., Cevik V., Dagdas G., et al. Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens // *BMC Biol.* 2016. Vol. 14. P. 8–18.
20. Kroj T., Chanchud E., Michel-Romiti C., et al. Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread // *New Phytol.* 2016. Vol. 210. P. 618–626.
21. Roux F., Voisin D., Badet T., et al. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map // *Mol. Plant Pathol.* 2014. Vol. 15. P. 427–432.
22. Wang G., Roux B., Feng F., et al. The decoy substrate of a pathogen effector and a pseudokinase specify pathogen-induced modified-self recognition and immunity in plants // *Cell Host Microbe*. 2015. Vol. 18. P. 285–295.
23. Saboki Ebrahim, Usha K., Bhupinder Singh. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism // Méndez-Vilas A. (ed.). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. FORMATEX. 2011. P. 1043–1054.

References

1. Shkalikov V. A., Djakov U. T., Smirnov A. N., et al. [Plant immunity]. Moscow, 2005 (in Russ.).
2. Peyraud R., Dubiella U., Barbacci A., et al. Advances on plant-pathogen interactions from molecular toward systems biology perspectives. *The Plant J.* 2017. Vol. 90, issue 4. P. 720–737.
3. Spoel S. H., Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*. 2012. Vol. 12. P. 90.
4. Miedes E., Vanholme R., Boerjan W., et al. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci.* 2014. URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00358> (date of access: 01.03.2018).
5. Glowacki S., Macioszek V. K., Kononowicz A. K. Proteins as fundamentals of plant innate immunity. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2011. Vol. 16. P. 1–24.
6. Coll N. S., Epple P., Dangel J. L. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* 2011. Vol. 18. P. 1247–1256.
7. Lewis L. A., Polanski K., de Torres-Zabala M., et al. Transcriptional dynamics driving MAMP-triggered immunity and pathogen effector-mediated immunosuppression in Arabidopsis leaves following infection with *Pseudomonas syringae* pv tomato C3000. *Plant Cell*. 2015. Vol. 27. P. 3038–3064.
8. Muller D. B., Vogel C., Bai Y., et al. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annu. Rev. Genet.* 2016. Vol. 50. P. 211–234.
9. Chen L. Q., Hou B. H., Lalonde S., et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*. 2010. Vol. 468. P. 527–532.
10. Kushalappa A. C., Yogendra K. N., Karre S. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2016. 35:1. 38–55. DOI: 10.1080/07352689.2016.1148980.
11. Tang D., Wang G., Zhou J.-M. Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *The Plant Cell*. 2017. Vol. 29. P. 618–637.
12. Breiden M., Simon R. Q&A: How does peptide signaling direct plant development? *BMC Biol.* 2016. 14:58. DOI: 10.1186/s12915-016-0280-3.
13. Копитина Д. А., Касенова А. М., Омасшева М. Е., et al. Molecular base of a plant immunity. *Biotechnology. Theory and practice*. 2012. No. 3. P. 31–41 (in Russ.).
14. Park C.-J., Caddell D. F., Ronald P. C. Protein phosphorylation in plant immunity: Insights into the regulation of pattern recognition receptor-mediated signaling *Frontiers in Plant Science. Plant Proteomics*. 2012. Vol. 3, Art. 177. DOI: 10.3389/fpls.2012.00177.
15. Sekhwal M. K., Li P., Lam I., et al. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16(8). P. 19248–19290.

16. Flor H. H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971. Vol. 9. P. 275–296.
17. Felix G., Duran J. D., Volko S., et al. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 1999. Vol. 18 (3). P. 265–276.
18. Le Roux C., Huet G., Jauneau A., et al. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell.* 2015. Vol. 161, issue 5. P. 1074–1088.
19. Sarris P. F., Cevik V., Dagdas G., et al. Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC Biol.* 2016. Vol. 14. P. 8–18.
20. Kroj T., Chancelud E., Michel-Romiti C., et al. Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. *New Phytol.* 2016. Vol. 210. P. 618–626.
21. Roux F., Voisin D., Badet T., et al. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Mol. Plant Pathol.* 2014. Vol. 15. P. 427–432.
22. Wang G., Roux B., Feng F., et al. The decoy substrate of a pathogen effector and a pseudokinase specify pathogen-induced modified-self recognition and immunity in plants. *Cell Host Microbe.* 2015. Vol. 18. P. 285–295.
23. Saboki Ebrahim, Usha K., Bhupinder Singh. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. FORMATEX. 2011. P. 1043–1054.

Статья поступила в редколлегию 07.05.2018

Received by editorial board 07.05.2018