

MARIUSZ ŚWIĄTEK**JADWIGA ŚLIWKA**

Pracownia Badania Odporności na Grzyby i Bakterie

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Młochowie

Przegląd badań nad regulacją ekspresji genów głównych odporności roślin na patogeny*

Studies review of gene expression regulation of the plant major resistance genes against pathogens

Rośliny, podobnie jak zwierzęta, wykształciły wielopoziomowe mechanizmy obronne, które nadają im odporność na szkodniki i patogeny. Pierwotna odpowiedź obronna nie zawsze jednak zapewnia wystarczający poziom odporności na patogeny, które dysponują szerokim wachlarzem mechanizmów przystosowawczych. Inny typ odporności jest warunkowany przez geny główne odporności — geny *R*. Kodowane przez nie białka, pełniące rolę receptorów, oddziałują z produktami genów awirulencji patogenów i uruchamiają szlak transdukcji sygnału, który prowadzi do reakcji nadwrażliwości, co zapobiega szerzeniu się infekcji. W związku z wysokimi zdolnościami adaptacyjnymi patogenów, poszukuje się nowych genów odporności w dzikich gatunkach roślin, które zapewniłyby roślinom uprawnym trwałą odporność. Mimo dużej liczby zidentyfikowanych i sklonowanych genów *R*, badaniami ekspresji objęto jak dotąd niewiele z nich. Geny *R*, pomimo podobieństw budowy, wykazują różny wzór ekspresji pod wpływem działania czynników biotycznych i abiotycznych. Większość genów *R* ulega konstytutywnej ekspresji, lecz obserwowane są także przypadki wzmocnienia lub indukcji ekspresji w wyniku kontaktu z patogenem. Badania molekularne dotyczące ekspresji genów *R* mogą mieć w niedalekiej przyszłości zastosowanie aplikacyjne w selekcji roślin do hodowli odpornościowej, na co wskazują wyniki dotychczasowych doświadczeń. Celem przeglądu jest usystematyzowanie informacji uzyskanych z dotychczasowych badań nad ekspresją genów odporności roślin na patogeny.

Słowa kluczowe: ekspresja genów, geny *R*, odporność roślin, patogeny roślin

Plants, like animals, have developed multi-layered defense mechanisms that make them resistant to pests and pathogens. Innate basal defense response do not always provide a sufficient level of resistance to pathogens that use a wide range of adaptive mechanisms. Another type of resistance is that conferred by the major resistance genes — *R* genes. Proteins coded by those genes act as receptors that interact with the corresponding products of avirulence genes of the pathogens. They trigger then signal transduction pathway that leads to hypersensitive reaction, thus preventing the spreading of infection. Due to the high adaptability of pathogens, scientists are forced to search for new resistance genes in wild species of plants that would provide more durable resistance in crops. Despite the fact that the large number of *R* genes has been identified and cloned up to date, the expression surveys were

* Praca sfinansowana przez NCBIr grant LIDER /06/82/L-1/09/NCBIr/2010

performed only on a few of them. The *R* genes have structural similarities but often show different pattern of expression under the influence of biotic and abiotic factors. Most of the *R* genes are constitutively expressed, but there are also cases of enhancing or inducing the expression as a result of interaction with the pathogen. Molecular research including gene expression issue may have an application aspect in the near future in selection of plants for resistance breeding programs, as was demonstrated in the some experiments. The objective of this review is to pool the information obtained from previous studies on gene expression of plant resistance genes to pathogens.

Key words: gene expression, plant pathogens, plant resistance, *R* genes

WSTĘP

Rośliny, podobnie jak zwierzęta, wykształciły wielopoziomowe mechanizmy obronne chroniące je przed atakiem szkodników i patogenów (Nurnberger i in., 2004). Przykładem odporności roślin określanej jako bazowa, jest PTI (PAMP-triggered immunity, PAMP-pathogen associated molecular pattern), która zaangażowana jest w rozpoznawanie konserwatywnych czynników, takich jak: flagellina bakterii (Gómez i Boller, 2002), chityna — budująca ściany komórkowe grzybów (Kaku i in., 2006) czy β -glukany, Pep-13 i CBEL (cellulose binding elicitor lectin) z *Oomycetes* (Tör, 2008; Hein i in., 2009 a). W konsekwencji następuje uruchomienie podstawowej odpowiedzi obronnej przejawiającej się wybuchem tlenowym, odkładaniem kalozy, produkcją etylenu czy indukcją genów związanych z patogenezą (PR1, PR5), ale nie występuje reakcja nadwrażliwości (HR — hypersensitive response). Inny rodzaj odpowiedzi obronnej rozpoznaje czynniki awirulencji patogena (avr) specyficzne względem danego gospodarza, tzw. efekторы. W mechanizmie tym, określanym jako ETI (effector-triggered immunity), główną rolę odgrywają produkty genów *R* (Jones i Dangl, 2006). Najprostsza hipoteza „gene-for-gene” opisująca bezpośrednie oddziaływania pomiędzy produktami genów *R* gospodarza i avr patogena zaproponowana została przez Florę już w pierwszej połowie XX wieku (Dangl i Jones, 2001). Dotychczas została potwierdzona między innymi u *Arabidopsis* (Deslandes i in., 2003), ryżu (Jia i in., 2000) i lnu (Catanzariti i in., 2006). Zakłada ona, że geny *R* kodują receptory rozpoznające czynniki avr patogena i w efekcie uruchamiają reakcję odpornościową powodującą zahamowanie rozwoju patogena, co w szczególnych przypadkach może prowadzić do lokalnej programowanej śmierci komórki (PCD — programmed cell death) określanej inaczej jako reakcja nadwrażliwości (Heath, 2000). Obecnie coraz większą popularnością cieszy się hipoteza o pośrednim oddziaływaniu efektorów patogena z białkami *R*, co ma swój oddźwięk w hipotezie strażnika — „guard hypothesis” (Dangl i Jones, 2001), której rozwinięciem są hipotezy „decoy” (van der Hoorn i Kamoun, 2008) i „bait-and-switch” (Collier i Moffett, 2009). Hipoteza strażnika zakłada, że białka *R* rozpoznają efekторы patogena pośrednio poprzez białka dodatkowe, które są bezpośrednim celem efektorów patogena. Efektor będący jednocześnie czynnikiem wirulencji modyfikuje swój białkowy cel w komórkach gospodarza i poprzez zmiany wywołane w wyniku wzajemnych interakcji przyczynia się do powstania infekcji w roślinach wrażliwych. W roślinach odpornych natomiast, następuje rozpoznanie zmian białkowego celu czynnika avr (efektora) przez białko *R*, które pełni rolę strażnika i uruchomienie reakcji odpornościowej, co zapobiega szerzeniu się patogena (Jones i Dangl,

2006). Hipoteza ta znalazła potwierdzenie w *Arabidopsis* na przykładzie reakcji odpornościowej uruchamianej przez gen *RPM1*. Czynniki awirulencji AvrRpm1 i AvrB z *Pseudomonas syringae* wiążą się najpierw z białkiem RIN4, które stanowi ich cel (ang. target). Związanie z nim czynników awirulencji w roślinach bez genu *RPM1* promowałoby rozwój patogena. Białka awirulencji poprzez fosforylację modyfikują białko RIN4, a to z kolei jest sygnałem do aktywacji białka RPM1 i uruchomienia szlaku transdukcji sygnału, w którym uczestniczą białka NDR1, PBS2/RAR1 oraz PBS3, wyzwalającego reakcję odpornościową. W przytoczonym przykładzie białko RPM1 stoi na straży RIN4 i przez to zapobiega kolonizacji rośliny przez patogena (Mackey i in., 2002; Martin i in., 2003). Autorzy hipotezy „decoy” zakładają, że białka, które stanowią cel efektorów patogena, są niestabilne w populacjach roślin polimorficznych pod względem genów odporności. W zależności od obecności lub braku genów *R*, białka te mogą podlegać przeciwnym presjom selekcyjnym zmierzającym albo do uniknięcia zmian powodowanych przez efektor, albo do usprawnienia percepcji patogena. W tym celu, możliwa jest duplikacja genu, który koduje białko docelowe lub niezależna ewolucja prowadząca do powstania białka naśladującego cel — tzw. „przynęty” (ang. decoy), która byłaby jednoznacznie zaangażowana w percepcję patogena (van der Hoorn i Kamoun, 2008). Model „bait-and-switch” zakłada z kolei, że rozpoznanie efektor zachodzi dwustopniowo. Efektor oddziałuje z białkiem docelowym — „przynętą”, co ułatwia raczej bezpośrednie rozpoznanie efektor niż zmodyfikowanego celu jak przewiduje to „hipoteza strażnika”. Modele te stanowią użyteczne koncepcje, pozwalające lepiej zrozumieć skomplikowane oddziaływania, jakie prowadzą do rozpoznania patogena i zainicjowania odpowiedzi obronnej przez roślinę. Należy jednak pamiętać, że proponowane modele są uogólnieniami bazującymi na niewielu przykładach, a ogromna różnorodność efektorów i odpowiadających im receptorów sugeruje możliwość wystąpienia innych mechanizmów, co może doprowadzić w niedalekiej przyszłości do wykrywania się nowych koncepcji na ten temat (Dodds i Rathjen, 2010).

Odporność, w której uczestniczą geny *R*, przenika się wzajemnie z odpornością pierwotną, która jednak nie zapobiega kolonizacji rośliny przez patogena, a jedynie ogranicza jego stopień rozprzestrzeniania się (Glazebrook i in., 1997). Atak patogena staje się efektywny, gdy roślina będąca pod jego wpływem, nie uruchomi na czas mechanizmów obronnych zależnych od posiadanych genów *R*, a także od czynników awirulencji (avr) patogena. Jeśli roślina ma dany gen *R*, ale patogen dokonujący inwazji nie ma odpowiadającego mu czynnika awirulencji, to nie nastąpi rozpoznanie patogena i w efekcie dojdzie do infekcji (Flor, 1970, za: Dangl i Jones, 2001). Genomy roślin zawierają dużą liczbę genów *R*. Tylko w *Arabidopsis* zidentyfikowano 149 potencjalnych sekwencji typowych dla genów odporności i uważa się, że wszystkie mogą ulegać ekspresji (Belkhadir i in., 2004). Jak dotąd sklonowano ponad 40 genów *R* warunkujących odporność na różne patogeny w roślinach jedno i dwuliściennych (Tan i in., 2007). Geny *R* znalazły zastosowanie w hodowli odpornościowej, przykładem jest ziemniak. Badania prowadzone już w pierwszej połowie XX wieku doprowadziły do zidentyfikowania 11 rasowo specyficznych genów głównych odporności na *Phytophthora infestans* (*R1-11*) w gatunku *Solanum demissum* (Black i in., 1953; Malcolmson i Black, 1966). Niektóre z nich zostały

wprowadzone do wielu odmian ziemniaka, na przykład geny *R1*, *R2*, *R3a*, *R3b*, *R6* i *R7* (Śliwka, 2004). Chociaż dziś szybko ewoluujący patogen stał się wirulentny w stosunku do roślin mających te geny, w pewnych regionach świata wciąż warunkują one znaczny stopień odporności (Kramer i in., 2009). W związku z dużym nakładem energii na ekspresję, zwłaszcza pod nieobecność patogena, poziom ekspresji genów *R* jest ściśle regulowany, jednak obecnie brak jest szczegółowych informacji o sposobie, w jaki się to odbywa (Li i in., 2010).

CHARAKTERYSTYKA GENÓW *R*

Geny *R* — geny główne odporności są pojedynczymi, dominującymi genami i odpowiadają za odporność na szeroką gamę patogenów i szkodników, włączając w to bakterie, grzyby, *Oomycetes*, wirusy, nicienie i owady. Większość genów *R*, które zostały obecnie zsekwencjonowane, wykazuje znaczne podobieństwo budowy. Można wśród nich wyróżnić kilka klas, a o przynależności do konkretnej klasy decyduje rodzaj charakterystycznych elementów strukturalnych, kodowanych przez dany gen (Jones, 2001). Produkty genów *R* można podzielić także, w zależności od miejsca ich działania, na białka *R*, które działają zewnątrzkomórkowo i wewnątrz komórki. Powszechnie uważa się, że białka *R* posiadające domeny NBS-LRR są receptorami cytoplazmatycznymi. Drugą grupę białek stanowią receptory zakotwiczone w błonie komórkowej i posiadające zewnątrzkomórkowe domeny eLRR (extracellular LRR) na N-końcu. Jeśli posiadają one na C-końcu kinazę białkową zaliczane są do klasy RLK (Receptor-Like Kinases), jeśli nie posiadają takowej, zalicza się je do klasy RLP (Receptor-Like Proteins), tego typu budowę mają geny odporności na *Cladosporium fulvum* Cf-2, Cf-4/4A, Cf-5, Cf-9/9B sklonowane z *Solanum lycopersicum* (van Ooijen i in., 2007). Najliczniejszą grupę stanowią geny mające domenę NBS — (nucleotide binding site) oraz region bogaty w powtórzenia leucyny LRR — (leucine rich repeats). Domena NBS wykazuje znaczny stopień konserwatywności wśród różnych białek *R*. Posiada zdolność hydrolizy ATP, przez co powoduje zmiany konformacji wymagane w procesie regulacji transdukcji sygnału (van Ooijen i in., 2007). Region LRR bierze natomiast udział w interakcjach białko-białko wśród szerokiego grona organizmów, stąd odpowiada za specyficzność interakcji z patogenem. Świadczyć może o tym chociażby przypadek zaobserwowany przez Chin i in., (2001), w którym uzyskane mutanty z delecjami w regionie LRR genu *Dm3* z sałaty utraciły swoją aktywność w rozpoznawaniu patogena (*Bremia lactucae*). Domenę NBS poprzedzać może domena CC — (coiled-coil), która występuje między innymi w strukturze genów: *I-2* — odporności na *Fusarium oxysporum*, *Prf* — odporności na *Pseudomonas syringae*, *Tm-2-2* — odporności na ToMV wyizolowane z *S. lycopersicum*, *R3a*, — odporności na *P. infestans* z *S. tuberosum*, czy *Rpi-blb1(RB)*, *Rpi-blb2* z *S. bulbocastanum* (van Ooijen i in., 2007) lub domena TIR — (Toll interleukin-1 like receptor), która wykazuje homologię z wewnątrzkomórkową domeną receptora Toll *Drosophila melanogaster* oraz interleukiny-1 człowieka (Radwan i in., 2005). Domenę TIR posiadają na przykład geny: *Bs4* — odporności na *Xanthomonas campestris* sklonowany z *S. lycopersicum* i *N* — odporności na TMV z *Nicotiana tabacum* (van Ooijen i in., 2007).

Możliwe jest także występowanie motywu LZ — (leucine zipper), który zawierają geny: *Rpi-blb3*, *Rpi-abpt* pochodzące z *S. bulbocastanum*, oraz *R2* z *S. demissum*, warunkujące odporność na *P. infestans* (Lokossou i in., 2009). Wśród dotychczas sklonowanych genów odporności na patogeny roślin, znajdują się także takie, które nie mają elementów strukturalnych charakterystycznych dla wyżej wymienionych klas, co może świadczyć o innych możliwych drogach uzyskania odporności w królestwie roślin. Takie geny można znaleźć w bazie danych Plant Resistance Genes Database (Sanseverino i in., 2010).

GENY R O EKSPRESJI NA STAŁYM, NISKIM POZIOMIE - NIE ULEGAJĄCYM ZMIANIE PO KONTAKCIE Z PATOGENEM

Gen *L6* został sklonowany z lnu i odpowiada za rasowo specyficzną odporność na rdzę żdźbłową lnu wywoływaną przez *Melampsora lini*. Należy do klasy genów odporności na patogeny kodujących domeny TIR-NBS-LRR. Ayliffe i in., (1999) zaobserwowali, że gen ten ulega ekspresji na bardzo niskim poziomie w wielu tkankach (korzeń, hipokotyl, liścienie, liście), w roślinach nienarażonych na kontakt z patogenem. Rośliny poddane inokulacji niekompatybilnym izolatem rdzy żdźbłowej, badane techniką RT-PCR, nie różniły się profilem ekspresji tego genu od roślin kontrolnych, począwszy od momentu inokulacji do 48 godzin po inokulacji. Oznacza to, że w przypadku tego genu interakcja z patogenem nie wpływa na poziom jego ekspresji. Badania dotyczące ekspresji prowadzono także dla genu *Dm3* (klasa CC-NBS-LRR) pochodzącego z sałaty, warunkującego odporność na mączniaka powodowanego przez *B. lactucae*. Obecność transkryptów genu została zanotowana począwszy od trzeciego do 12 dnia rozwoju sadzonek, a także w pąkach, kwiatach, korzeniach i liściach dojrzałych roślin. Mimo że w tym przypadku nie poddawano roślin inokulacji, a charakter doświadczenia był raczej jakościowy, potwierdzono, że gen ulega ekspresji na stałym, niskim poziomie podczas rozwoju rośliny (Shen i in., 2002). W kolejnym doświadczeniu Huang i in., (2005) poddali inokulacji rośliny transgeniczne zawierające gen *R3a* (klasa CC-NBS-LRR) odpowiadający za odporność na *P. infestans* w ziemniaku i pomidorze oraz jego potencjalne paralogi. Autorzy zaobserwowali, że wszystkie badane geny ulegały konstytutywnej ekspresji od początku doświadczenia do 72 godzin po inokulacji. Transkrypty były także obserwowane wśród roślin nieinokulowanych. Przypadki genów podlegających stałej ekspresji wskazują na słuszność hipotezy o receptorowej roli białek odpornościowych w procesie rozpoznawania patogenów. Doświadczenie Tan i in., (2007), w którym przeprowadzono analizę profilu ekspresji genów *R* oraz pokrewnych, obejmujących grupę 170 genów *Arabidopsis*, zdają się potwierdzać wcześniejsze przypuszczenia dotyczące genów *R*. Zaobserwowano, że większość genów objętych analizą charakteryzowała się niskim poziomem ekspresji wykazującym różnice w zależności od tkanki.

GENY R O NISKIEJ BAZOWEJ EKSPRESJI ZWIĘKSZAJĄCEJ SIĘ W WYNIKU INTERAKCJI Z PATOGENEM

Wśród wielu sklonowanych i scharakteryzowanych genów odporności na choroby różnych gatunków roślin, tylko niewiele, objętych tego rodzaju badaniami, ulegało indukcji

ekspresji lub wzmożonej transkrypcji w wyniku kontaktu z patogenem (Kramer i in., 2009). Przykładem takiego genu jest gen *RB* (klasa CC-NBS-LRR) wykazujący odporność na zarazę ziemniaka powodowaną przez *P. infestans* sklonowany z dzikiego gatunku ziemniaka — *S. bulbocastanum*. Badane rośliny transgeniczne, charakteryzujące się wysoką odpornością, przejawiały gwałtowny wzrost poziomu ekspresji genu *RB* w pierwszym dniu po inokulacji, co odzwierciedlało profil ekspresji w roślinach będących donorem genu. W trzecim i piątym dniu doświadczenia ekspresja zmniejszała się. W przypadku jednej linii (z czterema kopiami genu) ekspresja zwiększała się stopniowo osiągając swoje maksimum piątego dnia eksperymentu. Badania Kramer i in. (2009) wykazały także korelację pomiędzy liczbą transkryptów genu *RB*, a poziomem odporności na zarazę ziemniaka. Analogicznie zachowywał się gen *Xa3* (klasa RLKs) odporności na *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) z ryżu (Cao i in., 2007). W obu przypadkach poziom odporności związany był z liczbą transkryptów danego genu. Obserwacje te potwierdziły kolejne badania. Wśród testowanych roślin transgenicznych zauważono, że wyższa liczba kopii transgenu *RB* koresponduje ze wzmocnieniem transkrypcji tego genu, co pociąga za sobą wyższy stopień odporności na zarazę ziemniaka. Transgeniczne linie ziemniaków z 15 kopiami transgenu *RB* należały do najbardziej odpornych spośród testowanych 57 linii (Bradeen i in., 2009). Gen *Pib* pochodzący z ryżu, który nadaje odporność na zarazę ryżu (rice-blast) wywoływaną przez *Magnaporthe grisea*, jest jednym z pierwszych genów objętych szeroko zakrojoną analizą ekspresji (Wang i in., 1999). Należy do klasy genów odporności kodujących domeny CC-NBS-LRR. Wykazuje znaczną homologię z takimi genami, jak: *N*, *L6*, *RPM1*, *RPS2*, *Prf*, *Xa1*. Rośliny poddane inokulacji, zarówno izolatem kompatybilnym jak i niekompatybilnym, produkowały transkrypty genu począwszy od godziny zero, a skończywszy na 96 godzinie prowadzonego doświadczenia, przy czym dał się zaobserwować pewien wzór ekspresji. Początkowo liczba transkryptów była na niskim poziomie, po 12 godzinach od inokulacji wzrastała i utrzymywała się na podobnym poziomie do 24 godzin, a następnie w 96 godzinie spadała ponownie do poziomu wyjściowego. Obserwacja ta pozwala sformułować hipotezę o indukcji ekspresji genu pod wpływem interakcji z patogenem, jednakże dalsza część eksperymentu ujawniła, że podobny wzór ekspresji był typowy także w przypadku narażenia roślin na inny rodzaj stresów, a mianowicie inokulację wodą destylowaną, która miała naśladować inokulację, ale bez patogena czy przetrzymywanie roślin w ciemności. Rośliny kontrolne, wobec których nie stosowano czynników stresogennych, produkowały transkrypty genu na stałym poziomie przez cały czas trwania doświadczenia (Wang i in., 1999). W kolejnych pracach tych samych autorów zaobserwowano także efekt indukcji ekspresji genu *Pib* w wyniku traktowania roślin kwasami: salicylowym, jasmonowym i absycynowym. Podobny wpływ na poziom ekspresji genu *Pib* wywierało także zasolenie i podwyższona temperatura. Szczególnie wzrost wilgotności, taki jak po inokulacji wodą, i podwyższona temperatura są czynnikami środowiskowymi sprzyjającymi rozwojowi patogena, a następująca pod ich wpływem indukcja ekspresji tego genu może stanowić niejako działanie zapobiegawcze, przygotowujące roślinę na potencjalny atak patogena. Przypuszczalnie rośliny reagowały najpierw na zmieniające się warunki środowiska sprzyjające infekcji i aktywowały wiele genów związanych z reakcją obronną, w tym rasowo specyficzne geny *R*, zapewniając tym

samym wysoki poziom odporności w przypadku kontaktu z patogenem. Jak wynika z obserwacji autorów, spory patogena zaczynają kiełkować po trzech godzinach od inokulacji, a wzrost poziomu ekspresji genu *Pib* był notowany już po upływie jednej godziny, nie mógł więc być spowodowany przez patogena, ale przez czynniki abiotyczne. (Wang i in., 1999, 2001). Z kolei gen *Hslpro1* warunkujący odporność na mątwika burakowego (*Heterodera schachtii* Schm.) w buraku cukrowym ulegał ekspresji na niskim bazowym poziomie w roślinach niepoddanych działaniu patogena. W kontakcie z patogenem obserwowany poziom transkryptów wzrastał czterokrotnie jeden dzień po infekcji. Gen *Hslpro1* wydaje się być aktywowany wyłącznie przez patogeny, gdyż, jak wykazały dalsze testy, nie następowała zmiana w liczbie transkryptów genu pod wpływem innych czynników zewnętrznych, takich jak: kwas salicylowy, jasmonowy, giberelinowy, absycynowy oraz stres wywołany podwyższonym zasoleniem czy mechanicznym uszkodzeniem roślin poprzez nacinanie korzeni żyłką (Thurau i in., 2003). Kolejnymi genami, których ekspresja regulowana jest w wyniku współdziałania z patogenem, są geny *Mla6* oraz *Mla13* — zaliczane do klasy CC-NBS-LRR — warunkujące odporność na mączniaka prawdziwego jęczmienia powodowanego przez (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). Zarówno gen *Mla6* jak i *Mla13* w testach z inokulacją niekompatybilnym izolatem wykazywał początkowo niski poziom transkryptów, który wzrastał kilkukrotnie po upływie 16–20 godzin od inokulacji, co pokrywa się z czasem, jaki zajmuje haustorium patogena wytworzenie kontaktu z błoną komórkową gospodarza (Haltermann i in., 2003). Również w przypadku genu *Ha-NTIR11b* należącego do klasy CC-NBS-LRR, pochodzącego ze słonecznika zaobserwowano indukcję transkrypcji pod wpływem patogena (*Plasmopara halstedii*) wywołującego mączniaka rzekomego słonecznika. Gen ulegał ekspresji na niskim poziomie w roślinach odpornych, niepoddanych inokulacji przez cały czas doświadczenia. W wyniku inokulacji izolatem niekompatybilnym poziom ekspresji zwiększał się trzeciego dnia, osiągając swoje maksimum szóstego dnia, a po dziewiątym dniu znowu zaczął się zmniejszać. By wykluczyć wpływ innych czynników na ekspresję, przeprowadzono test z użyciem kwasu salicylowego i metylojasmonowego biorących udział w szlaku transdukcji sygnału. Kontrolne rośliny poddano także opryskowi sterylną wodą i uszkodzeniom mechanicznym poprzez pocieranie powierzchni liści sterylną pincetą. W doświadczeniach tych nie zaobserwowano zmian w poziomie transkryptów, co potwierdza wpływ patogena na ekspresję genu (Radwan i in., 2005). Innym genem, którego ekspresja została przeanalizowana pod kątem ewentualnej indukcji, jest gen *N* z tytoniu, zaliczany do klasy TIR-NBS-LRR i nadający odporność na wirusa mozaiki tytoniu (TMV). Jak zaobserwowano, gen ten ulega konstytutywnej ekspresji w roślinach niepoddanych działaniu patogena. Jednak, jak się okazało, profil ekspresji genu *N* zmienia się w wyniku kontaktu z wirusem TMV. W teście przeprowadzonym z użyciem techniki real-time PCR obserwowano ponad 38-krotny wzrost liczby transkryptów genu *N* w liściach inokulowanych, w porównaniu do roślin kontrolnych. Ciekawy wydaje się także fakt wzmocnienia ponad 165-krotnie ekspresji genu w liściach znajdujących się w wyższych piętach rośliny, które nie były inokulowane i nie stwierdzono w nich obecności wirusa. W tym przypadku ekspresja zwiększała się przez 72 godziny i utrzymywała się na podwyższonym poziomie przez dziesięć dni. Obserwowane zjawisko skłania do

przypuszczeń, że ekspresja genu *N* uruchomiła szlak transdukcji sygnału, w którym uczestniczą białka EDS1, NDR1, PBS2/RAR1 i PBS3 (Martin i in., 2003), i który prowadzi do reakcji nadwrażliwości oraz wywołania odporności systemowej. Sprawdzono także możliwość wzmocnienia ekspresji genu *N* w wyniku inokulacji roślin wirusem Y ziemniaka (PVY). Jednak w tym przypadku gen nie ulegał indukcji i utrzymywał się na stałym poziomie przez całe doświadczenie, co potwierdziło wcześniejsze przypuszczenia autorów o specyficzności działania genu (Levy i in., 2004).

GENY *R* O EKSPRESJI NIEWYKRYWALNEJ - INDUKCJA NASTĘPUJE W WYNIKU KONTAKTU Z PATOGENEM

Gen *Xal* (klasa CC-NBS-LRR) wyizolowany z ryżu, warunkujący odporność na *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* jest jednym z nielicznych genów odporności, których ekspresja inicjowana jest pod wpływem kontaktu z patogenem (izolaty niekompatybilne i kompatybilne) oraz zranienia rośliny. Ekspresja genu, badana za pośrednictwem techniki „northern blot”, ujawniła występowanie transkryptów w roślinach odpornych dopiero piątego dnia po inokulacji. Sygnału nie obserwowano bezpośrednio po inokulacji ani trzeciego dnia doświadczenia. Wykorzystując czulszą technikę RT-PCR, transkrypty genu były wykrywane po trzech dniach od inokulacji i później do końca prowadzonego eksperymentu. Piątego dnia po inokulacji roślin wodą destylowaną również zanotowano występowanie transkryptów genu, co może świadczyć o indukcji genu także innymi czynnikami niż infekcja. Nie odnotowano natomiast obecności transkryptów w roślinach niepoddanych działaniu żadnego czynnika. Liczba bakterii, które zainfekowały rośliny testowe, była wyraźnie skorelowana z nagromadzeniem się mRNA genu *Xal* i od momentu ekspresji genu utrzymywała się na stałym poziomie. Stąd nasuwał się wniosek, iż indukcja genu zasadniczo wzmocniała odporność roślin na atak patogena (Yoshimura i in., 1998). Podobnie jak *Xal*, indukcji, w wyniku kontaktu z patogenem, podlega również pochodzący z papryki gen *Bs3* — odporności na *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Gen ten koduje domeny nienależące do żadnej ze znanych klas. W odróżnieniu jednak od wymienionego wcześniej genu, mechanizm regulacji genu *Bs3* został poznany. Rozpoznawanie patogena odbywa się poprzez przyłączenie produktu genu *AvrBs3* patogena do określonego regionu promotora, co aktywuje transkrypcję i uruchamia reakcję obronną (Römer i in., 2007). Na podobnej zasadzie odbywa się także uruchomienie reakcji odpornościowej, w której uczestniczy gen *Xa27* (niesklasyfikowany dotychczas po względem kodowanych domen) warunkujący odporność na zarazę bakteryjną ryżu wywoływaną przez *X. oryzae* pv. *oryzae*. Uważa się, że pod wpływem produktu genu awirulencji patogena (*AvrXa27*) następuje aktywacja promotora tego genu i w efekcie wzbudzenie jego ekspresji, gdyż inokulacja roślin izolatami nieposiadającym czynnika *AvrXa27* nie powodowała indukcji genu odporności, co przejawiało się wystąpieniem objawów towarzyszących infekcji (Gu i in., 2005).

PODSUMOWANIE

Z przedstawionego przeglądu badań nad odpornością roślin można wnioskować, że mimo podobieństw w strukturze genów głównych odporności często występują znaczne różnice w sposobie inicjacji reakcji odpornościowej, w której pośredniczą. Wiele genów zdaje się potwierdzać hipotezę o receptorowej roli białek R, szczególnie te, które ulegają konstytutywnej ekspresji niezależnie od narażenia roślin na kontakt z patogenem. Znane są także przykłady genów, których ekspresja ujawnia się dopiero pod wpływem czynników kodowanych przez patogeny. Przypadki takie wydają się być bardzo uzasadnionym mechanizmem w walce z patogenem, gdyż nie ulega wątpliwości, że utrzymywanie białek biorących udział w reakcjach odpornościowych, gdy nie jest to konieczne, stanowi dla rośliny dodatkowe obciążenie, a w zamian za odporność roślina ponosi koszty energetyczne przejawiające się między innymi niższym plonem. Zostało to udowodnione w przypadku genu *RPM1* z *Arabidopsis*. W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano, że rośliny odporne, posiadające gen *RPM1* charakteryzowały się mniejszą produkcją biomasy, posiadały mniej łuszczyń, a liczba nasion w porównaniu z roślinami bez genu *RPM1* była mniejsza średnio o 9% (Tian i in., 2003). Szybko ewoluujące patogeny, jak na przykład *P. infestans*, który zagraża uprawom ziemniaka i przynosi ogromne straty na całym świecie, zmuszają badaczy do poszukiwań w dzikich gatunkach roślin nowych genów *R*, które mogłyby zapewnić roślinom uprawnym trwałą odporność. W ostatnich latach zidentyfikowano wiele genów *R*, jednak badaniami ekspresji objęto jak dotąd niewiele z nich. W układzie ziemniak — *P. infestans* spośród ponad 25 zmapowanych i siedmiu sklonowanych genów *R* (Hein i in., 2009 b), profil ekspresji określono jedynie w dwóch przypadkach — dla genu *R3a* (Huang i in., 2005) i *RB/Rpi-blb1* (Song i in., 2003, van der Vossen i in., 2003). Badania profilu ekspresji genów odporności mogą przyczynić się nie tylko do poznania samego mechanizmu ich działania i lepszego zrozumienia interakcji rośliny z patogenem, ale także mogą okazać się przydatne w optymalizacji procesu selekcji roślin poprzez wykorzystanie w programach hodowlanych roślin o najwyższej liczbie transkryptów danego genu *R*. O słuszności tego podejścia mogą świadczyć wyniki uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń dotyczących genu *RB* (Kramer i in., 2009, Bradeen i in., 2009, Millet i in., 2009). Zarówno dotychczasowe opracowania, jak i obecnie prowadzone eksperymenty dotyczące regulacji ekspresji genów *R* u roślin, mogą dostarczyć w niedalekiej przyszłości cennych wskazówek mających zastosowanie aplikacyjne w walce z najbardziej zagrażającymi patogenami roślin uprawnych. W efekcie przełoży się to bezpośrednio na korzyści ekonomiczne dla hodowców i rolników poprzez zredukowanie do minimum lub nawet wyeliminowanie stosowanych dotychczas środków ochrony chemicznej. Umożliwi to otrzymywanie zdrowej żywności cieszącej się coraz większym zainteresowaniem konsumentów. Będzie miało także swój pozytywny wpływ na środowisko naturalne.

Skróty występujące w pracy

- PTI — PAMP-trigger immunity
PAMP — pathogen associated molecular pattern
ETI — effector triggered immunity
Pep-13 — element ściany komórkowej patogena soji — *P. sojae*
CBEL — cellulose binding elicitor lectin — proteina w ścianie komórkowej *P. parasitica* var. *nicotianae*
PR1/PR5 — pathogenesis related protein 1/5
PCD — programmed cell death
HR — hypersensitive response
RIN4 — RPM1-interacting protein 4
NBS-LRR — nucleotide binding site-leucine rich repeats
eLRR — extracellular LRR
RLKs — Receptor-Like Kinases
RLPs — Receptor-Like Proteins
CC — coiled coil
TIR — Toll interleukin-1 like receptor
LZ — leucine zipper
EDS1 — enhanced disease susceptibility 1
PAD4 — phytoalexin deficient 4
NDR1 — non-race specific disease resistance-1
PBS2/RAR1 — PPHB susceptible 2
PBS3 — avrPPHB susceptible 3

LITERATURA

- Ayliffe M. A., Frost D. V., Finnegan E. J., Lawrence G. J., Anderson P. A., Ellis J. G. 1999. Analysis of alternative transcripts of the flax L6 rust resistance gene. *Plant J.* 17 (3): 287 — 292.
- Belkhadir Y., Subramaniam R., Dangl J. L. 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS — LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (4): 391 — 399.
- Black W., Mastenbroek C., Mills W. R., Peterson L. C. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica* 2 (3): 173 — 240.
- Bradeen J. M., Iorizzo M., Molloy D. S., Raasch J., Kramer L. C., Millett B. P., Austin-Phillips S., Jiang J., Carputo D. 2009. Higher copy numbers of the potato *RB* transgene correspond to enhanced transcript and late blight resistance levels. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22 (4): 437 — 446.
- Cao Y., Ding X., Cai M., Zhao J., Lin Y., Li X., Xu C., Wang S. 2007. The expression pattern of a rice disease resistance gene *Xa3/Xa26* is differentially regulated by the genetic backgrounds and developmental stages that influence its function. *Genetics* 177 (1): 523 — 533.
- Catanzariti A., Dodds P. N., Lawrence G. J., Ayliffe M. A., Ellis J. G. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18 (1): 243 — 256.

- Chin D. B., Arroyo-Garcia R., Ochoa O. E., Kesseli R. V., Lavelle D. O., Michelmore R. W. 2001. Recombination and spontaneous mutation at the major cluster of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). *Genetics* 157 (2): 831 — 849.
- Collier S. M., Moffett P. 2009. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci.* 14 (10): 521 — 529.
- Dangl J. L., Jones J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826 — 833.
- Dodds P. N., Rathjen J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11 (8): 539 — 548.
- Glazebrook J., Rogers E. E., Ausubel F. M. 1997. Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annu. Rev. Genet.* 31: 547 — 69.
- Gómez-Gómez L., Boller T. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7 (6): 251 — 256.
- Gu K., Yang B., Tian D., Wu L., Wang D., Sreekala C., Yang F., Chu Z., Wang G., White F. F., Yin Z. 2005. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435 (7045): 1122 — 1125.
- Halterman D. A., Wei F., Wise R. P. 2003. Powdery mildew-induced *Mla* mRNAs are alternatively spliced and contain multiple upstream open reading frames. *Plant Physiol.* 131(2): 558 — 567.
- Hein I., Gilroy E. M., Armstrong M. R., Birch P. R. J. 2009 a. The zig-zag-zig in oomycete — plant interactions. *Mol. Plant Path.* 10 (4): 547 — 562.
- Hein I., Birch P. R. J., Danan S., Lefebvre V., Achieng Odeny D., Gebhardt C., Trognitz F., Bryan G. J. 2009 b. Progress in mapping and cloning qualitative and quantitative resistance against *Phytophthora infestans* in potato and its wild relatives. *Potato Research* 52: 215 — 227.
- Heath M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44 (3): 321 — 334.
- Huang S., van der Vossen E. A. G., Kuang H., Vleeshouwers V. G. A. A., Zhang N., Borm T. J.A., van Eck H. J., Baker B., Jacobsen E., Visser R. G.F. 2005. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. *Plant J.* 42 (2): 251 — 261.
- Jia Y., McAdams S. A., Bryan G. T., Hershey H. P., Valent B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19 (15): 4004 — 4014.
- Jones J. D. 2001. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (4): 281 — 287.
- Jones J. D., Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444 (7117): 323 — 329.
- Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiya C., Dohmae N., Takio K., Minami E., Shibuya N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (29): 11086 — 11091.
- Kramer L. C., Choudoir M. J., Wielgus S. M., Bhaskar P. B., Jiang J. 2009. Correlation between transcript abundance of the *RB* gene and the level of the *RB*-mediated late blight resistance in potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22 (4): 447 — 455.
- Levy M., Edelbaum O., Sela I. 2004. Tobacco Mosaic virus regulates the expression of its own resistance gene *NI*. *Plant Physiol.* 135 (4): 2392 — 2397.
- Li Y., Tessaro M. J., Li X., Zhang Y. 2010. Regulation of the expression of plant resistance gene *SNCI* by a protein with a conserved BAT2 domain. *Plant Physiol.* 153 (3): 1425 — 1434.
- Lokossou A. A., Park T., van Arkel G., Arens M., Ruyter-Spira C., Morales J., Whisson S. C., Birch P. R. J., Visser R. G. F., Jacobsen E., van der Vossen E. A. G. 2009. Exploiting knowledge of R/Avr genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22 (6): 630 — 641.

- Malcolmson J. F., Black W. 1966. New *R* genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Euphytica* 15: 199 — 203.
- Mackey D., Holt III B. F., Wiig A., Dangl J. L. 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108 (6): 743 — 754.
- Martin G. B., Bogdanove A. J., Sessa G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 23 — 61.
- Millett B. P., Mollov D. S., Iorizzo M., Carputo D., Bradeen J. M. 2009. Changes in disease resistance phenotypes associated with plant physiological age are not caused by variation in *R* gene transcript abundance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22 (3): 362 — 368.
- Milligan S. B., Bodeau J., Yaghoobi J., Kaloshian I., Zabel P., Williamson V. M. 1998. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10 (8): 1307 — 1319.
- Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198: 249 — 266.
- Radwan O., Mouzeyar S., Nicolas P., Bouzidi M. F. 2005. Induction of a sunflower CC-NBS-LRR resistance gene analogue during incompatible interaction with *Plasmopara halstedii*. *J. Exp. Bot.* 56 (412): 567 — 575.
- Römer P., Hahn S., Jordan T., Strauß T., Bonas U., Lahaye T. 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science* 318 (5850): 645 — 648.
- Salmeron J. M., Oldroyd G. E. D., Rommens C. M. T., Scofield S. R., Kim H., Lavelle D. T., Dahlbeck D., Staskawicz B. J. 1996. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell* 86 (1): 123 — 133.
- Sanseverino W., Roma G., De Simone M., Faino L., Melito S., Stupka E., Frusciante L., Ercolano M. R. 2010. PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Nucleic Acids Res. Database issue* 38: 814 — 821.
- Shen K. A., Chin D. B., Arroyo-Garcia R., Ochoa O. E., Lavelle D. O., Wroblewski T., Meyers B. C., Michelmore R. W. 2002. *Dm3* is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15 (3): 251 — 261.
- Song J., Bradeen J. M., Naess S. K., Raasch J. A., Wielgus S. M., Haberlach G. T., Liu J., Kuang H., Austin-Phillips S., Buell C. R., Helgeson J. P., Jiang J. 2003. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(16): 9128 — 9133.
- Śliwka J. 2004. Genetic factors encoding resistance to late blight caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary on the potato genetic map. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9 (4B): 855 — 867.
- Tan X., Meyers B. C., Kozik A., West M. A., Morgante M., St Clair D. A., Bent A. F., Michelmore R. W. 2007. Global expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 7: 56.
- Tian D., Traw M. B., Chen J. Q., Kreitman M., Bergelson J. 2003. Fitness costs of *R*-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 423 (6935): 74 — 77.
- Thurau T., Kifle S., Jung C., Cai D. 2003. The promoter of the nematode resistance gene *Hs1pro-1* activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 52(3): 643 — 660.
- Tör M. 2008. Tapping into molecular conversation between oomycete plant pathogens and their hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 57 — 69.

- van der Hoorn R. A. L., Kamoun S. 2008. From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 20 (8): 2009 — 2017.
- van Ooijen G., van den Burg H. A., Cornelissen B. J. C., Takken F. L. W. 2007. Structure and function of resistance proteins in *Solanaceous* plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 43 — 72.
- van der Vossen E., Sikkema A., te Lintel Hekkert B., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. 2003. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 36 (6): 867 — 882.
- Wang Z., Yano M., Yamanouchi U., Iwamoto M., Monna L., Hayasaka H., Katayose Y., Sasaki T. 1999. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.* 19(1): 55 — 64.
- Wang Z., Yamanouchi U., Y. Katayose, Sasaki T., Yano M. 2001. Expression of the *Pib* rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favouring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defences. *Plant Mol. Biol.* 47 (5): 653 — 661.
- Yoshimura S., Yamanouchi U., Uchikata Y., Toki S., Wang Z., Kono I., Kurata N., Yano M., Iwata N., Sasaki T. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (4): 1663 — 1668.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy dziękują Pani prof. Ewie Zimnoch-Guzowskiej za cenne uwagi podczas opracowywania manuskryptu