

МЕХАНІЗМ ГЕНЕТИЧНОЇ СУПРЕСІЇ СТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ ДО БОРОШНИСТОЇ РОСИ

Расо-специфічна імунна відповідь рослин забезпечується дією продуктів генів стійкості, які розпізнають патогенні молекули та запускають каскади відповіді, в результаті чого активується запрограмована загибель клітин, що запобігає поширенню інфекції в рослині. Враховуючи втрату дієвості генів стійкості через швидшу еволюцію патогенів, актуальним залишається привнесення нового генетичного різноманіття генів стійкості до культурних рослин шляхом віддаленої гібридизації. Однак додатковою перешкодою при створенні генетично стійких рослин є явище генетичної супресії, яке часто спостерігається при віддаленій гібридизації рослин із різним рівнем плоідності геному. На прикладі супресії стійкості пшениці до борошнистої роси було показано, що в основі цього механізму лежить взаємодія близькоспоріднених білків РМ (продуктів генів-ортологів та алельних варіантів) між собою, і N-кінцева частина LRR домену цих протеїнів є важливою для індукції супресії.

Ключові слова: генетична супресія стійкості, NBS-LRR білки, ортологи, алелі *Pm3*.

Вступ

На сьогодні світова спільнота приділяє велику увагу покращенню продуктивності злакових сільськогосподарських видів та боротьбі зі збудниками різних захворювань у цих рослин. Основні країни-виробники та постачальники зерна (Китай, США, Пакистан, Україна та країни Євросоюзу) розташовані в континентальному та субконтинентальному кліматичних поясах, які є оптимальними для розвитку грибних захворювань. Зокрема, для пшениці такі захворювання, як іржа та борошнеста роса, можуть призводити до втрати близько 30–45 % урожайності [1]. Нині одним із найефективніших засобів скорочення таких втрат є вдосконалення власного імунітету рослин шляхом привнесення чужинних генів стійкості (віддалена гібридизація) та їх комбінування в одному генотипі – пірамідинг. Однак додатковою проблемою у стратегії створення стійких рослин стало у деяких випадках спостереження пригнічення прояву ознаки стійкості в новосформованих міжвидових гібридів та пірамідованих лініях із різними комбінаціями споріднених генів стійкості [2]. Цю статтю присвячено дослідженням, які проводилися в пошуках розуміння причин такої супресії та були спрямовані на встановлення її молекулярного механізму. Окрему увагу приділено дослідженням генетичної супресії *Pm*-опосередкованої імунної відповіді у пшениці.

Імунна система рослин

Здатність рослин захищатися у відповідь на біотичні стресові чинники забезпечується дією *R*-генів, продукти яких залучені в розпізнаванні патогенних молекул та активації сигнальних шляхів відповіді. За швидкістю, специфічністю та спрямованістю дії імунної відповіді умовно виділяють дві основні гілки імунної системи рослин: базовий імунітет, активація якого відбувається у відповідь на антигени широкого класу (флагелін бактерій, хітин грибів тощо) і їхня дія спрямована на потовщення клітинної стінки і генерацію вільних радикалів, та расо-специфічний імунітет, що активується на дію специфічних для раси патогенна ефекторів і запобігає поширенню інфекції, призводячи до активації запрограмованої смерті уражених клітин (реакція гіперчутливої відповіді) [3]. Расо-специфічна імунна відповідь є швидшою в реалізації, сильнішою та ефективнішою у своєму прояві та довготривалішою, ніж базовий імунітет [4]. У зв'язку з цим при створенні генетично стійкого рослинного матеріалу основним бажаним ефектом є передача різноманітних варіантів *R*-генів, що забезпечують расо-специфічну стійкість рослин.

Між зазначеними вище імунними системами існує регуляторний зв'язок – білки, які сприймають та передають сигнал, належать до продуктів *R*-генів, та транскрипційні фактори родини WRKY, які активують попередні білки, регулюють експресію генів-відповіді на біотичний

стрес, зокрема експресію *R*-генів [5]. Найбільшим класом серед генів стійкості рослин є NBS-LRR, який так названо у зв'язку з наявними висококонсервативними структурними доменами їхніх продуктів: нуклеотид-зв'язувальним сайтом (NBS – Nucleotide-Binding Site) та регіоном лейцин-збагачених повторів (LRR – Leucine-Rich Repeat). Своєю чергою, за наявністю N-термінального домену цей клас поділяють на два підкласи: підклас TIR-NBS-LRR та підклас CC-NBS-LRR [6].

NBS та LRR домени є ключовими в забезпеченні правильного функціонування R-білків. LRR домен забезпечує білок-білкові взаємодії та залучений у ліганд-рецепторному розпізнаванні специфічних патогенних ефекторів [4]. Цю частину білка вважають потенційним джерелом для утворення нових варіантів генів стійкості через наявність у цих регіонах гарячих точок рекомбінації [7]. NBS – це центральний регуляторний домен, який відповідає за зв'язування із сигнальними нуклеотидами (АТФ/дАТФ/ГТФ), що призводить до зміни конфомації білка та його активації – можливості утворити функціональний комплекс, запустити сигнальний шлях, або безпосередньо зв'язатися з транскрипційним фактором. NBS складається з декількох консервативних мотивів, кількість і наявність яких може варіювати серед *Triticaceae* у зв'язку з видом рослини та групою *R*-генів [8]. До основних мотивів NBS належать: P-loop або Kinase-1 мотив, Kinase-2, Kinase-3a та GPLA мотиви [8]. Однак, наприклад, у злакових, гени стійкості до борошнистої роси

містять ще й мотив MHD, важливий для координації міждомених взаємодій у R-білку [9].

Домени TIR (Toll/Interleukin-1 receptor/Resistance protein domain) та CC (Coiled-coil domain) виконують функції гомотипних чи гетеротипних білок-білкових взаємодій із протеїнами, які також мають TIR або CC домени, відповідно [10; 11]. Гени обох підкласів широко розповсюджені у дводольних рослин, тоді як в однодольних, зокрема у злакових, гени підкласу TIR-NBS-LRR практично повністю відсутні і CC-NBS-LRR є домінуючим підкласом генів стійкості [12]. На мутантах ячменю було встановлено, що CC домен виконує функцію гомодимеризації R-білків із самим собою (самоасоціація) і також здатен безпосередньо зв'язуватися з транскрипційним фактором родини WRKY (продукти генів стійкості до борошнистої роси ячменю MLA6, MLA10, MLA12 взаємодіяли з транскрипційними факторами *HvWRKY1* та *HvWRKY2*) [11].

Т. Маєкава (Maekawa T.) та колеги [11], на основі досліджень взаємодії білків MLA ячменю між собою, запропонували таку модель ініціації расо-специфічної імунної відповіді: білки MLA за участі CC домену формують закриті гомодимерні комплекси, які є авто-репресованими і в такому стані існують у рослинній клітині аж до моменту взаємодії з патогенним ефектором, після чого відбувається активація білків (рис. 1). Під активацією розуміється, що після того, як LRR домен розпізнає специфічний AVR ефектор і взаємодіє з ним, відбуваються конформаційні зміни білків, зокрема, активується NBS домен

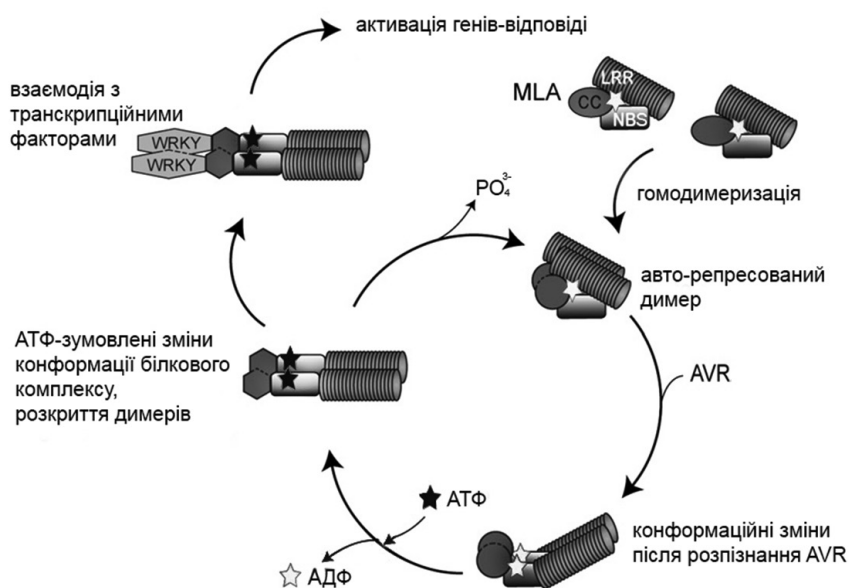


Рис. 1. Гіпотетична модель функціонування білків CC-NBS-LRR підкласу [11]

(заміщення АДФ на АТФ), що призводить до конформаційних змін у СС доменах – розкриття гомодимерного комплексу. За цією гіпотезою, розкриті гомодимерні комплекси білків родини СС-NBS-LRR можуть через СС домени взаємодіяти з транскрипційними факторами родини WRKY. Проте існує й інша гіпотеза, згідно з якою димеризація R-білків відбувається внаслідок зміни їхньої конформації після ліганд-рецепторної взаємодії LRR із Avr патогена, тобто внаслідок активації білків [10].

Механізми утворення нових варіантів генів стійкості

У геномі рослин гени стійкості в основному зібрані в кластери [13]. У більшості випадків кластери генів стійкості виникли в результаті подій дуплікації (великомасштабних або тандемних), що в процесі еволюції відбувалися в геномах рослин [14]. Залежно від типу дуплікації та часу, коли вона відбулась, кластери R-генів можуть бути такими, що спостерігаються в межах філогенетичного дерева одного виду, або ж бути змішаними – складатися з генів стійкості, що походять від різних далеко споріднених видів, які дивергували в процесі еволюції (тобто ортологічні гени) [13].

Відомо, що між кластерами генів розташовані ген-зубожілі регіони, які можуть містити мікросателітні послідовності, мобільні генетичні елементи, псевдогени та інші некодуючі послідовності [15]. Вважається, що, окрім явища мутагенезу, послідовності ген-зубожілих регіонів можуть слугувати джерелом мінливості для створення нових варіантів R-генів у результаті таких подій, як: нерівний кросинговер, дуплікація, рекомбінація, генна конверсія, транспозиція [16].

Пригнічення прояву стійкості в гібридах від віддаленого схрещування

Створення генетично стійких до різних захворювань ліній пшениці шляхом віддаленої гібридизації забезпечує збільшення генетичної різноманітності м'якої пшениці. Однак водночас різні дослідники та селекціонери в деяких випадках зауважували повне або часткове пригнічення прояву стійкості в міжвидових та міжродових гібридів. Було помічено, що при створенні міжвидових гібридів гексаплоїдної пшениці з дикорослим родичем, чий геном має меншу плоідність, фенотипний прояв стійкості був меншим, ніж у донора генів стійкості – дикорослого родича [17]. В інших випадках гібриди

пшениці або похідні амфіплоїди бували повністю чутливими до стресу, що вказувало на генетичне пригнічення стійкості [18]. Припускається, що причиною цього феномену можуть слугувати модифікатори чи часткові інгібітори, наявні в алополіплоїдному геномі пшениці. Іншою гіпотезою ефекту зменшення рівня стійкості є варіація ортологічних локусів [17] або асиметрія геномів – коли прояв певної ознаки забезпечується переважною експресією генів одного субгеному і замовчуванням гомеологічних генів інших субгеномів [19].

Серед злакових відомими є приклади пригнічення стійкості до грибних захворювань. Наприклад, у частини синтетичних гексаплоїдів пшениці, створених від схрещувань стійкого *Triticum turgidum* із чутливим *Aegilops tauschii* і навпаки, спостерігали часткове або повне пригнічення стійкості до жовтої іржі. Зроблено припущення, що гени-супресори стійкості в геномах синтетичних гексаплоїдів походять як від А та/чи В субгеномів *Triticum turgidum*, так і від D геному *Aegilops tauschii* [18]. Нельсон (Nelson) та його колеги [20] виявили, що стійкість до листової іржі, зумовлена дією гена *Lr23*, локалізованого на 2BS хромосомі гексаплоїдної пшениці (*T. turgidum* x *Ae. tauschii*/ *T. aestivum*), пригнічується супресором *SuLr23*, локалізованим у гомеологічному локусі на 2DS хромосомі. *SuLr23* може бути ортологом *Lr23* [20]. Комбінація генів стійкості до корончатої іржі *Pc-62* та *Pc-38* у лініях вівса показала пригнічення *Pc-62*-опосередкованої відповіді. Ця супресія мала домінантний характер та дозалежний ефект – підвищення дози гена *Pc-62* призводило до зниження рівня супресії [21].

Серед дводольних рослин також відомими є випадки пригнічення стійкості. Наприклад, на трансгенних лініях томатів було виявлено домінантну супресію *Cf-9*-опосередкованої стійкості до гриба *Cladosporium fulvum* продуктом недієвого *Cf-9* варіанта з делецією у LRR мотиві [22]. Також, ґрунтуючись на даних експерименту, Баркер (Barker) та його колеги припустили, що частина LRR домену *Cf-9* може бути залучена чи опосередковувати димеризацію цих білків, а інша частина LRR домену – взаємодію з іншими білками для ініціації сигнального каскаду [22].

Виявлення супресора *Pm8*

Приклади повного пригнічення стійкості важче визначити, оскільки наявність конкретних генів стійкості в гаметах від рослин-донорів здебільшого є невизначеною [17]. Тому в таких випадках потрібно мати декілька маркерів, які б

допомогли визначити та простежити наявність конкретних генів стійкості в батьківських формах та їхніх гібридах. Випадковим і зручним прикладом дослідження явища генетичної супресії стало вивчення стійкості до борошністої роси в генотипах пшениці, що несуть житню транслокацію.

Житня транслокація у сортах гексаплоїдної пшениці відома з 1930-х років, коли була привнесена від *Secale cereale* (сорт Petkus). Ця транслокація локалізована на 1BL-1RS хромосомі і містить у собі кластер генів стійкості *Pm8/Sr31/Lr26/Yr9*, які спадкуються зчеплено. Таким чином, ці гени можуть слугувати один одному додатковими маркерами присутності житньої транслокації. Рената Ханусова (Renata Hanusova) та її колеги перевіряли сорти пшениці із житньою транслокацією (або 1R/1B заміщенням хромосом) на стійкість до листової іржі та борошністої роси за допомогою ізолятів патогенів цих хвороб, авірулентних до *Lr26* та *Pm8* генів, відповідно [23]. Вони виявили, що далеко не всі аналізовані сорти пшениці, які показали стійкість до *Lr26*-авірулентного ізоляту збудника листової іржі, були стійкими до *Pm8*-авірулентного ізоляту збудника борошністої роси. Це свідчило про те, що в деяких генотипах відбувалася супресія дії гена *Pm8*, який був присутній у житній транслокації. Вони встановили, що пригнічення *Pm8*-опосередкованої стійкості забезпечується дією одного домінантного гена *SuPm8*, який локалізували на 7D хромосомі [23].

Водночас Рен (Ren) та його колеги [24], досліджуючи спектри гліадинів, випадково виявили кореляцію між *Pm8*-опосередкованою стійкістю досліджуваних сортів пшениці до борошністої роси та наявністю в гліадиновому спектрі специфічного компонента, який назвали «супресорним компонентом». Таким чином, ген-супресор *Pm8* виявився тісно зчепленим із генами запасуючих білків на 1A хромосомі пшениці, а саме з локусом *Glu-A3* [25]. Рен (Ren) працював із гетерогенними сортами: Veery#6 та Bobwhite White – стійкими до борошністої роси, і Veery#5 та Bobwhite Red – чутливими до хвороби. Дослідження Рена (Ren) щодо встановлення гена-супресора *Pm8* продовжили Роберт Макінтош (Robert McIntosh) та його колеги [17], які створили рекомбінантно-імбредні лінії RIL F₅ від схрещування Veery#6/Veery#5 та від Bobwhite Red/Bobwhite White. Завдяки відомим на той час даним щодо близького розташування *Pm3* гена поруч із *Glu-A3* [26], автори заклали в дослід гіпотезу імовірної ортологічної супресії продуктів генів *Pm*. Для перевірки цієї головної гіпотези

експеримент полягав у двоетапному тестуванні. По-перше, перевірили генотипів створених ліній та їхніх батьківських сортів на стійкість до ізолятів *Blumeria graminis* f.s. *tritici* (авірулентного до *Pm8* і вірулентного до *Pm3a*, та навпаки – вірулентного до *Pm8* і авірулентного до *Pm3a*). По-друге, ПЛР скринували цього рослинного матеріалу на наявність «супресорного компонента» і гена *Pm3*. Для іншої мети було використано три пари праймерів, розроблених до ділянок відповідних генів: частини локусу *Glu-A3*, промотерної ділянки гена *Pm3* та його 3'-кінцевої ділянки. Результати аналізу розщеплення популяцій за ознакою стійкості підтвердили, що супресія стійкості забезпечується дією одного домінантного гена (3:1). ПЛР скринування встановило, що лінії, які мали додатковий «супресорний компонент» за локусом *Glu-A3*, також ампліфікували продукти до обох частин гена *Pm3* – всі ці лінії мали чутливий фенотип до захворювання, спричиненого ізолятом NAR (авірулентним до *Pm8*). Стійкі лінії у своїх генотипах не мали «супресорного компонента» і характеризувалися або повною відсутністю продуктів ампліфікації частин гена *Pm3*, або в деяких випадках – наявністю якогось одного з них, тобто присутність у геномі урізаного гена *Pm3* чи, ймовірно, його псевдогена. Таким чином, було встановлено, що повне пригнічення *Pm8*-опосередкованої стійкості у пшениці забезпечують продукти алелів гена *Pm3*, локалізованого на 1A хромосомі. Іншими результатами цієї роботи також стало підтвердження того, що навіть слабкий алель *Pm3a* супресує *Pm8*-опосередковану стійкість у пшениці [17].

Дослідження молекулярного механізму явища пригнічення *Pm*-опосередкованої стійкості пшениці до борошністої роси

Дослідження молекулярного механізму, який лежить в основі явища генетичної супресії *Pm*-опосередкованої стійкості, проводили в лабораторії молекулярної рослинної біології/фітопатології Цюрихського університету UZH.

Після інтрогресії *Pm8* у геном м'якої пшениці сорти із житньою транслокацією не демонстрували *Pm8*-опосередковану стійкість до хвороби і вважалося, що ген *Pm8* втратив свою дієвість. Нині відомо, що житній ген *Pm8* (1RS) та ген пшениці *Pm3* (1AS) є ортологами [27]. Явище пригнічення експресії ортологічних локусів трапляється в геномах поліплоїдних рослин. Гурні (Hurni) та її колеги [28] перевірили, чи викликають супресію *Pm8*-опосередкованої

стійкості продукти різних алелів гена *Pm3* – недієві алелі *Pm3CS* та *Pm3_8152*, та дієві алелі *Pm3a*, *Pm3b*, *Pm3f*. Для цього в роботі було проаналізовано нетрансгенний та трансгенний матеріал: сорти з житньою транслокацією *Veegu#5* (*Pm3_8152*) і *Florida* (*Pm3CS*), F_4 покоління від схрещування *Kavkaz/4*Federation* (носії *Pm8*) з *Chinese Spring* (*Pm3CS*), F_4 покоління від схрещування трансгенної лінії *Pm8#59* з кожною із трансгенних ліній *Pm3a#1*, *Pm3f#1* та *Pm3bHA*. Усі досліджені дієві та недієві варіанти гена *Pm3* спричиняли пригнічення *Pm8*-опосередкованої відповіді рослин, що дало змогу авторам припустити ймовірність цього феномену і для всіх інших відомих алелів гена *Pm3* – 17 дієвих алелів та 37 недієвих [28].

Всі лінії покоління F_4 розщеплялися на ті, які мали у своєму геномі обидва гени (*Pm8* та відповідний алель *Pm3* гена) та ті сестринські лінії, які успадкували лише один ген – *Pm8/ΔPm3*-алель або *Pm3*-алель/*ΔPm8*. Щоб перевірити кореляцію між рівнем супресії імунної відповіді рослин та відповідними алелями *Pm3*, стійкість популяцій F_4 трансгенних ліній до збудника борошнистої роси було проаналізовано з використанням 5 різних ізолятів *Blumeria graminis* f.s. *tritici* (Vgt), авірулентних до *Pm8*. Цей експеримент показав, що сила супресії *Pm8*-опосередкованої стійкості продуктами алелів *Pm3a*, *Pm3b* та *Pm3f* варіювала (повна супресія / часткова супресія / відсутність супресії) залежно від ізоляту. Аналіз реципрочної ситуації – оцінка рівня супресії *Pm3*-опосередкованої імунної відповіді, – показав, що практично у всіх випадках жодного пригнічення стійкості не відбувалося. Отже, у цьому випадку пригнічення стійкості рослин мало кількісний ефект: залежало від алелю гена *Pm3* та було расо-специфічним до Vgt.

Для встановлення молекулярного механізму цієї супресії та виявлення причин різної сили її дії автори вирішили поетапно дослідити рівні

ймовірного пригнічення, починаючи з рівня транскрипції. Супресія *Pm8* могла відбуватися внаслідок замовчування гена або часткового пригнічення його транскрипції. Для перевірки цієї теорії із ДНК рослинного матеріалу було проведено зворотньо-транскрипційну кількісну ПЛР (RT-qPCR) для встановлення кількості експресованих генів *Pm8* та *Pm3*. Було виявлено, що експресія гена *Pm8* у сортах з *SuPm8* та без нього була еквівалентною як у здорових рослин, так і через 24 години після зараження інокулятом Vgt. Окрім того, еквівалентним був рівень експресії обох генів у трансгенних ліній *Pm8/Pm3* щодо їхніх сестринських ліній із успадкованим одним геном *Pm3* чи *Pm8* (рис. 2), що свідчить про те, що пригнічення стійкості відбувається не на транскрипційному чи посттранскрипційному рівні. На рис. 2 видно різницю у співвідношенні кількості мРНК *Pm3:Pm8* у трансгенних лініях *Pm8/Pm3* – для ліній з алелем *Pm3a* воно становить 1:8, для ліній з алелем *Pm3b* – 1:1 і для алеля *Pm3f* – 1:3. Зроблено припущення, що ця різниця у співвідношенні експресованих ортологічних генів у відповідь на дію Vgt конкретної раси і є визначальною для сили супресії – повної, часткової чи відсутньої.

Оскільки супресія *Pm8* викликана не його транскрипційним замовчуванням чи недостатньою експресією, то наступним етапом перевірки стало визначення кількості трансльованого продукту. Перевірка можливого пригнічення трансляції білків PM8 у порівнянні із PM3 була проведена на трансгенних лініях. Завдяки тому, що самі трансгени були злиті з епітопними мітками (НА-епітоп із алелями *Pm3* та епітоп с-трус – із *Pm8*), кількість трансльованих білків було визначено шляхом імуноблотингу, який показав подібну інтенсивність бендів у порівнянні *Pm8/Pm3* трансгенних ліній із їхніми гомозиготними за *Pm* геном сестринськими лініями. Таким чином, супресія *Pm8* не пов'язана зі зменшеною кількістю трансльованого білка в лініях, у яких

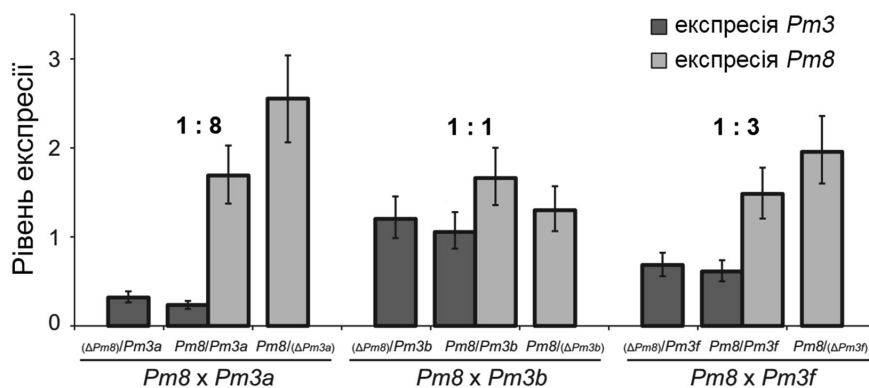
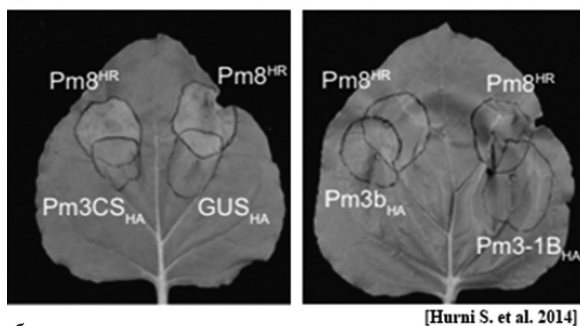


Рис. 2. Рівень експресії мРНК генів *Pm3* та *Pm8* у трансгенних лініях [28]

спостерігається пригнічення *Pm8*-опосередкованої імунної відповіді [28].

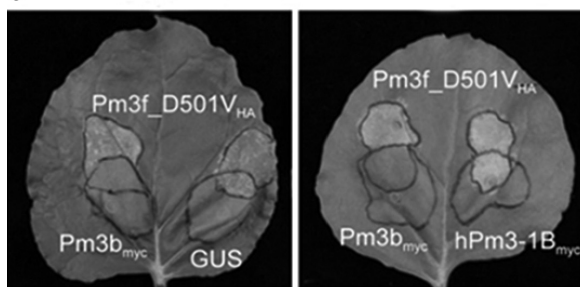
Перевірку посттрансляційного рівня як такого, де відбувається супресія *Pm8*, здійснила команда Гурні (Hurni) за допомогою методів ко-імунопреципітації та транзійтної експресії генів інтересу на листках тютюну *Nicotiana benthamiana*. Метод ко-імунопреципітації показав, що білки PM8 та різні варіанти PM3 (зокрема і гомеолог PM3-1B) взаємодіють. Конструкти з мутантним за MHD мотивом варіантом гена *Pm8*, для якого характерна автоактивація і, відповідно, запуск каскадів запрограмованої загибелі клітин, трансфікували плямою на листок тютюну. Поруч із цією плямою, листок так само трансфікували конструктами з варіантом гена *Pm3* (*Pm3CS*, *Pm3b* або *Pm3-1B*) таким чином, щоб плями перекривалися (рис. 3, а). Спостереження показали, що в місці перекриття плям реакції гіперчутливої відповіді не було, а отже, активований продукт PM8 не міг запустити відповідні каскадні реакції через взаємодію з продуктом PM3CS або PM3B [28]. Однак продукт PM3-1B, гомеолог PM3 із рівнем ідентичності амінокислотної послідовності 78 % [27], не викликав пригнічення імунної відповіді в зоні перекриття з плямою, де експресувався PM8. Це свідчило про те, що сама по собі взаємодія PM-подібних білків є недостатньою для пригнічення імунної відповіді [28].

а



[Hurni S. et al. 2014]

б



[Stirnweis D. et al. 2014]

Рис. 3. Супресія *Pm8*- (а) [28] та *Pm3f*-опосередкованої імунної відповіді (б) [2] продуктами різних алелів гена *Pm3*

Аналогічні дослідження було проведено на гібридах F_1 - F_4 трансгенних ліній із пірамідованими різними комбінаціями алелів гена *Pm3*, де було виявлено факт генетичної супресії між різними алелями [2]. Наприклад, шляхом проведення тестів на інфекцію із застосуванням ізолятів Vgt, авірулентних до певних алелів гена *Pm3*, було виявлено, що в трансгенних лініях *Pm3b/Pm3a* та *Pm3b/Pm3f* була різною мірою пригнічена *Pm3a*- та *Pm3f*-опосередкована стійкість. У трансгенних лініях із комбінаціями алелів *Pm3a/Pm3c*, *Pm3a/Pm3d*, *Pm3b/Pm3d* не спостерігалось явище пригнічення стійкості до різних рас Vgt.

Для характеристики молекулярної основи супресії між алелями вибрали трансгенні лінії з комбінацією *Pm3b_{MYC}/Pm3f_{HA}* та їхні сестринські гомозиготні лінії, оскільки в цій комбінації спостерігався найвищий рівень супресії стійкості – 77 % [2]. За подібною до експерименту Гурні (Hurni) [28] схемою дослідження рівня, на якому відбувається супресія між алелями, було встановлено, що це посттрансляційний рівень і продукт PM3B пригнічує дію PM3F (рис. 3, б). У методі транзійтної експресії на листках тютюну було використано конструкт із мутантним варіантом – Pm3f_D501V (заміщення амінокислоти D на V у MHD домені призводить до автоактивації білка PM). Пригнічення *Pm3f*-опосередкованої стійкості на листках тютюну свідчить про те, що механізм супресії є незалежним від патогенних факторів (раси Vgt абощо). Щоб дослідити, яка частина білка PM3B спричиняє супресію, автори послідовно створювали ряд конструктів із фрагментами *Pm3b_{MYC}* та проводили делеційний аналіз (рис. 4).

Експеримент проводили на листках тютюну шляхом транзійтної експресії конструктів. Перші два конструкти містили в собі фрагменти *Pm3b_{MYC}*, які охоплювали характерні R-генам висококонсервативні мотиви: CC-NBS та LRR. Продукти експресії Pm3b_CC-NBS_{MYC} склали 1-602 а.к.з. PM3B і на транзійтній системі не спричиняли супресії стійкості. Натомість продукти Pm3b_LRR_{MYC} (525-1415 а.к.з. PM3B) викликали супресію *Pm3f*-опосередкованої стійкості. Таким чином, ключовим доменом у супресії PM білків є LRR регіон. Штірнвайс (Stirnweis) та його колеги продовжили пошук частини LRR, що є індуктором супресії, створюючи делеційні конструкти за LRR регіоном гена *Pm3b*. Вони встановили, що основна частина LRR послідовності білка PM3B, яка впливає на прояв супресії, лежить ближче до N-кінця LRR регіону – в межах 826-983 а.к.з, однак сам по собі конструкт, що кодує цей

Рис. 4. Делеційний аналіз супресуючої активності Pm3B_{мус} [2]

фрагмент, супресію не викликав. Також було помічено, що створення вкорочених конструктів N-кінцевої частини LRR регіону супроводжувалося зниженням сили супресії (Pm3b_Sp-LRR15 (525–983 а.к.з.) > Pm3b_Sp-LRR12 (525–879 а.к.з.) > Pm3b_Sp-LRR10 (525–826 а.к.з.)). Всі дані щодо конструктів і рівня викликаної супресії наведено на рис. 4. Таким чином, було встановлено, що супресія Pm3-стійкості відбувається внаслідок взаємодії між собою продуктів різних алелів гена Pm3, очевидно, через N-кінцеву частину їхніх LRR доменів [2].

Враховуючи подібність молекулярного механізму супресії Pm8, автори обох робіт припускають, що цей самий регіон LRR домену гена Pm3 може відповідати за пригнічення Pm8-опосередкованої стійкості рослин [28; 2]. Запропонована модель механізму супресії стійкості полягає в припущенні, що ефективна імунна відповідь забезпечується продуктами PM, коли вони формують гомомерні комплекси, в той час як формування гетеромерних білкових комплексів є несумісним для передачі сигналу або блокує зв'язування активних варіантів білків PM.

Імовірно, ця модель характерна для близько споріднених білків – продуктів різних алелів, ортологів, гомологів чи паралогів [2].

Висновки

Дослідження механізму пригнічення стійкості пшениці до борошнистої роси встановили причину супресії в близькій спорідненості генів, продукти яких взаємодіяли і в клітині, очевидно, формували недієві гетеромерні комплекси.

Відомі приклади пригнічення стійкості в рослин: імовірно, ортологічна супресія гена *Lr23* у гексаплоїдної пшениці; домінуючий характер та дозо-залежний ефект супресії стійкості вівса до корончатої іржі; пригнічення *Cf-9*-опосередкованої відповіді продуктом недієвого *Cf-9* варіанта з делецією у LRR мотиві у томатів та інші, – свідчать про те, що для більшості рослин цей механізм може бути подібним. Тому поєднання на одному генетичному тлі генів спільного походження є фактором ризику втрати бажаної стійкості матеріалу і має враховуватися при створенні генетично стійких рослин.

Список літератури

1. Olivera P. D. *Aegilops sharonensis*: Origin, genetics, diversity, and potential for wheat improvement / P. D. Olivera, B. J. Steffenson // Botany. – 2009. – Vol. 87 (8). – P. 740–756.
2. Suppression among alleles encoding nucleotide-binding-leucine-rich repeat resistance proteins interferes with resistance in F1 hybrid and allele-pyramided wheat plants / D. Stirnweis, S. D. Milani, S. Brunner [et al.] // Plant J. – 2014. – Vol. 79 (6). – P. 1–11.
3. Dodds P. N. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions / P. N. Dodds, J. P. Rathjen // Nat. Rev. Genet. – 2010. – Vol. 11. – P. 539–548.
4. Jones J. D. G. The plant immune system / J. D. G. Jones, J. L. Dangl // Nature. – 2006. – Vol. 444 (7117). – P. 323–329.
5. Genomics of Biotic Interactions in the Triticeae / Roger P. Wise, Nick Lauter, Les Szabo, Patrick Schweizer // Genet. Genomics Triticeae. – 2009. – Vol. 7. – P. 559–589.
6. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards / Leah McHale, Xiaoping Tan, Patrice Koehl, Richard W. Michel // Genome Biol. – 2006. – Vol. 7. – P. 212.
7. Paleo-evolutionary plasticity of plant disease resistance genes / Rongzhi Zhang, Florent Murat, Caroline Pont [et al.] // BMC Genomics. – 2014. – Vol. 15. – P. 187.
8. Large-scale analysis of NBS domain-encoding resistance gene analogs in Triticeae / D. Bouktila, Y. Khalfallah, Y. Habachi-houimli [et al.] // Genet Mol Biol. – 2014. – Vol. 37 (3). – P. 598–610.
9. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins / G. van Ooijen, G. Mayr, M. M. Kassem [et al.] // J. Exp. Bot. – 2008. – Vol. 59 (6). – P. 1383–1397.
10. Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling,

- and autoregulation / M. Bernoux, T. Ve, S. Williams [et al.] // Cell Host Microbe. – 2011. – Vol. 9 (3). – P. 200–211.
11. Coiled-coil domain-dependent homodimerization of intracellular barley immune receptors defines a minimal functional module for triggering cell death / T. Maekawa, W. Cheng, L. N. Spiridon [et al.] // Cell Host Microbe. – 2011. – Vol. 9 (3). – P. 187–199.
 12. Pan Q. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes / Q. Pan, J. Wendel, R. Fluhr // J. Mol. Evol. – 2000. – Vol. 50 (3). – P. 203–213.
 13. Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: Active guardians in host defense responses / D. Marone, M. A. Russo, G. Laidò [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14 (4). – P. 7302–7326.
 14. Leister D. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes / D. Leister // Trends Genet. – 2004. – Vol. 20 (3). – P. 116–122.
 15. Identification of Wheat Chromosomal Regions Containing Expressed Resistance Genes / M. Dilbirligi, M. Erayman, D. Sandhu [et al.] // Genetics. – 2004. – Vol. 166 (1). – P. 461–481.
 16. Michelmore R. W. Cluster of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process / R. W. Michelmore, B. C. Meyers // Genome Res. – 1998. – Vol. 8 (11). – P. 1113–1130.
 17. Rye-derived powdery mildew resistance gene *Pm8* in wheat is suppressed by the *Pm3* locus / R. A. McIntosh, P. Zhang, C. Cowger [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2011. – Vol. 123. – P. 359–367.
 18. Ma H. Suppression/expression of resistance to stripe rust in synthetic hexaploid wheat (*Triticum turgidum* × *T. tauschii*) / H. Ma, R. P. Singh, A. Mujeeb-Kazi // Euphytica. – 1995. – Vol. 83 (2). – P. 87–93.
 19. Genomic asymmetry in allopolyploid plants: wheat as a model / M. Feldman, A. A. Levy, T. Fahima, A. Korol // J. Exp. Bot. – 2012. – Vol. 63 (14). – P. 5045–5059.
 20. Mapping Genes Conferring and Suppressing Leaf Rust Resistance in Wheat / J. C. Nelson [et al.] // Crop Sci. – 1997. – Vol. 37. – P. 1928–1935.
 21. Wilson W. A. Dosage Dependent Genetic Suppression of Oat Crown Rust Resistance Gene *Pc-62* / W. A. Wilson, M. S. McMullen // Crop Sci. – 1997. – Vol. 37 (6). – P. 1699–1705.
 22. Dominant-negative interference with defence signalling by truncation mutations of the tomato *Cf-9* disease resistance gene / C. L. Barker, B. K. Baillie, K. E. Hammond-Kosack [et al.] // Plant J. – 2006. – Vol. 46 (3). – P. 385–399.
 23. Suppression of powdery mildew resistance gene *Pm8* in *Triticum aestivum* L (common wheat) cultivars carrying wheat-rye translocation T1BL·1RS / R. Hanušová, S. L. K. Hsam, P. Bartoš [et al.] // Heredity (Edinb). – 1996. – Vol. 77. – P. 383–387.
 24. A storage-protein marker associated with the suppressor of *Pm8* for powdery mildew resistance in wheat / S. X. Ren, R. A. McIntosh, P. J. Sharp, T. T. The // Theor. Appl. Genet. – 1996. – Vol. 93 (7). – P. 1054–1060.
 25. Ren S. X. Genetic suppression of the cereal rye-derived gene *Pm8* in wheat / S. X. Ren, R. A. McIntosh, Z. J. Lu // Euphytica. – 1997. – Vol. 93 (3). – P. 353–360.
 26. Location of *Pm3g*, a powdery mildew resistance allele in wheat, by using a monosomic analysis and by identifying associated molecular markers / Pierre Sourdil, Patrick Robe, Marie-Hélène Tixier [et al.] // Euphytica. – 1999. – Vol. 110 (3). – P. 193–198.
 27. Rye *Pm8* and wheat *Pm3* are orthologous genes and show evolutionary conservation of resistance function against powdery mildew / S. Hurni, S. Brunner, G. Buchmann [et al.] // Plant J. – 2013. – Vol. 76 (6). – DOI: 10.1111/tbj.12345.
 28. The powdery mildew resistance gene *Pm8* derived from rye is suppressed by its wheat ortholog *Pm3* / S. Hurni, S. Brunner, D. Stirnweis [et al.] // Plant J. – 2014. – Vol. 79 (6). – P. 904–913.

T. Shtefiuk, T. Ternovska

THE MECHANISM OF GENETIC SUPPRESSION OF WHEAT RESISTANCE TO POWDERY MILDEW

The race-specific plant immunity is provided by the action of R-gene products which recognize pathogenic molecules and trigger defense signalling cascades that result in programmed cell death and thus preventing the spread of infection. Taking into account the loss of the R-genes efficiency because of the rapid evolution of pathogens, the introduction of a new genetic diversity of R-genes to cultivated plants via wide hybridization is expedient for culture plants improvement. However, an additional obstacle for the creation of genetically resistant plant material is the phenomenon of genetic suppression, which is often observed in the hybrids created via wide hybridization of plants with different ploidy levels. The molecular mechanism of this suppression effect was investigated on wheat resistance to powdery mildew suppression. It was found out that interaction of closely related PM proteins (products of alleles and orthologs) lies in the basis of genetic suppression; moreover, the N-terminal part of the LRR domain is important for the induction of suppression.

Keywords: genetic suppression of resistance, NBS-LRR proteins, orthologs, *Pm3* alleles.

Матеріал надійшов 25.09.2017