

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ДЕПАРТАМЕНТ КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
МОСКОВСКАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ  
имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА

---

КАФЕДРА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

## ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

НА ТЕМУ: «КЛОНИРОВАНИЕ АНАЛОГОВ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ  
К ЗАБОЛЕВАНИЯМ КЛАССА NBS-LRR ПОДСОЛНЕЧНИКА  
(*Helianthus argofillus*)»

**Исполнитель:** студент 56 группы  
V курса агрономического факультета

Куклев М.Ю.

**Руководитель:** Карлов Г.И.

МОСКВА 2003

<http://yadyra.ru>

## *Введение.*

Долгое время в селекции сельскохозяйственных культур использовались фенотипические маркеры. Они могли проявляться на различных этапах развития растений, идентифицироваться визуально или в результате биохимических исследований. Проведение таких работ требует значительных затрат труда и времени. Селекционный процесс затягивался на 10-15 лет.

В последнее время, в связи с развитием методов молекулярной биологии, в селекции сельскохозяйственных культур все чаще применяются молекулярные маркеры. Это позволяет значительно сократить затраты труда, ускорить селекционный процесс, а также молекулярные маркеры позволяют наиболее точно отследить передачу генов от одного организма другому. Т.о. удается удешевить селекционный процесс. Селекция, основанная на молекулярных маркерах, получила название MAS – marker assisted selection.

Молекулярно-генетическое маркирование представляет собой группу аналитических методов, позволяющих охарактеризовать тот или иной организм на молекулярном уровне - на уровне ДНК. В основе этих методов лежат знания о структуре и функциях нуклеиновых кислот и механизмах реализации закодированной в них генетической информации. По сравнению с фенотипическими и белковыми маркерами молекулярные ДНК-маркеры затрагивают самую основу всех процессов происходящих в живых организмах. В целом, молекулярно-генетическое маркирование заключается в выявлении специфических последовательностей ДНК, способных охарактеризовать организм: 1) как набор отдельных генов, отвечающих за те или иные признаки; 2) как целостную генетическую структуру, отличающуюся от других на молекулярном уровне. Использование подобных маркерных последовательностей имеет большие перспективы связанных с изучением генетических ресурсов организмов и их использованием.

В настоящее время существуют следующие основные методы молекулярного маркирования: RFLP (restricted fragments length

polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), ISSR (inter simple sequence repeat), AFLP (amplified fragments length polymorphism), SSR (SSRP) (simple sequence repeat), RGAs (resistance gene analogs).

Селекция сельскохозяйственных культур на устойчивость к болезням и вредителям связана с созданием инфекционных фонов, долгой работой по оценке растений на устойчивость к патогену. К тому же, как правило, провести полноценную оценку на устойчивость возможно лишь по прошествии практически всего периода вегетации растения. Использование молекулярных маркеров в селекции на устойчивость к заболеваниям позволит проводить оценку селекционного материала на ранних этапах развития растений. Таким образом, будет возможно выбраковать неустойчивые растения, а, следовательно, сократить объем работ по созданию инфекционного фона и проводить дальнейшую работу и оценку уровня устойчивости только у растений, которые были отобраны по молекулярным маркерам.

Подсолнечник является основной масличной культурой в нашей стране, поэтому развитие технологий возделывания и интенсификация селекционного процесса данной культуры являются приоритетными областями сельского хозяйства.

Значительные потери урожая подсолнечника связаны с поражением данной культуры различными заболеваниями. В частности поражение подсолнечника фомопсисом (*Diaporthe helianthi* Munt-Cvet. et al.) вызывает потери урожая до 40%

Особенности строения генов устойчивости к заболеваниям позволяют проводить их молекулярное маркирование и интенсифицировать селекцию на устойчивость.

## ***1. Литературный обзор.***

### ***1.1. Ботаническая характеристика рода *Helianthus*.***

Подсолнечник относится к семейству Астровые – Asteraceae. Установленный Линнеем вид подсолнечника *Helianthus annuus* L.

рассматривается сейчас как сборный. Его делят на два самостоятельных вида: *Helianthus cultus* Wenzl. – подсолнечник культурный и *Helianthus ruderalis* Wenzl. – подсолнечник дикорастущий.

Подсолнечник культурный делят на два подвида: *ssp. sativus* Wenzl. – подсолнечник культурный посевной (Рис. 1) и *ssp. ornamentalis* Wenzl. – подсолнечник культурный декоративный.



Рис. 1. Растение подсолнечника культурного посевного (*H. annuus* spp. *sativus*, Wenzl.).

Подсолнечник культурный посевной – однолетнее растение. Корень у него стержневой; стебель прямостоячий, деревянистый, выполнен рыхлой сердцевинной, неветвящийся; листья на длинных черешках, крупные овально-сердцевидной формы с заостренным концом и пильчатыми краями; соцветие – корзинка в виде плоского, выпуклого или вогнутого диска, окруженного оберткой из нескольких рядов листочков. Плод – семянка сжатояйцевидной формы, с четырьмя не резко выраженными гранями.

Подсолнечник – перекрестноопыляющееся растение. В естественных условиях часть цветков остается неоплодотворенной, что вызывает

пустозерность. Ее можно снизить, если на посевы подсолнечника вывозить ульи с пчелами (П.П. Вавилов, 1986).

## ***1.2. Болезни подсолнечника.***

Значительная часть урожая подсолнечника теряется из-за поражения растений болезнями и вредителями. На подсолнечнике наиболее распространены и вредоносны заразиха, белая гниль, серая гниль, ржавчина, увядание, ложная мучнистая роса, бактериальное увядание, мозаика и позеленение цветков.

### **1.2.1. Белая гниль.**

Очень распространенное заболевание подсолнечника, почти во всех районах возделывания. Поражает молодые и взрослые растения.

Возбудитель заболевания – сумчатый гриб *Whetzelinia sclerotiorum* (d By. Korf. Et Dumont (= *Sclerotinia sclerotiorum* d By.) из порядка Helotiales.

При попадании на растение сумкоспоры прорастают и образуют росток, который внедряется в растение. С момента заражения до проявления болезни проходит от 7 до 10 дней. Склероции могут прорасти весной и летом, а значит и заражение растений может происходить в течение всей вегетации.

Распространение от растений к растению может происходить с помощью грибницы. Гриб сначала поселяется на отмерших частях растений, а затем поражает и живые части органы.

Вредоносность белой гнили огромна. Подсолнечник, пораженный в молодом возрасте, погибает, а на пораженном в более поздний период растениях семена хотя и образуются, но они легковесные, часто имеют разрушенный зародыш и содержат меньше жира.

Относительно устойчивы к белой гнили сорта ВНИИМК 8883 улучшенный и Харьковский 50.

### **1.2.2. Ржавчина.**

Болезнь широко распространена во многих областях сеяния подсолнечника. Интенсивность же развития неодинакова в различных районах.

Возбудитель заболевания – базидиальный гриб *Puccinia helianthi* Schw. из порядка *Uredinales*. Все стадии гриба развиваются на подсолнечнике.

После заражения подсолнечника эциоспорами на нижней стороне листа образуются ржаво-коричневые мелкие подушечки – урединии с урединиоспорами.

От момента заражения растений базидиоспорами до образования спермогониев и эций проходит 10-11 дней, а от заражения эциоспорами до появления урединий с урединиоспорами и от заражения урединиоспорами до образования новых урединий – 5-7 дней.

Вредоносность ржавчины заключается, прежде всего, в уменьшении ассимиляционной деятельности листьев и преждевременном усыхании их. Пораженные растения недоразвиваются и дают пониженный урожай. При средней и сильной степени развития ржавчины заметно уменьшаются размеры корзинок, урожай семян и содержание жира в ядрах.

### 1.2.3. Фомопсис.

Фомопсис (*Diaporthe helianthi* Munt-Cvet et al., класс Аскомицеты) был впервые обнаружен в Югославии в 1960 году (В.И. Якуткин, 1991), а идентифицирован в 1980 году (Muntanola-Cvetkovic et al.) (Р.-Ф. Bert и др, 2002). Он быстро распространился и был найден во многих соседних странах, в том числе во Франции, и даже в США (Р.-Ф. Bert и др, 2002). До сих пор этот патоген не может контролироваться химическими средствами защиты растений, классические методы селекции на устойчивость к данному заболеванию также не дали пока никаких результатов. Устойчивость к фомопсису у различных форм растений проявляется в разной степени и постоянно варьирует. Также различные генотипы проявляют устойчивость к различным стадиям развития возбудителя этого заболевания (Р.-Ф. Bert и др, 2002).

В нашей стране фомопсис на подсолнечнике зарегистрирован в 1985 году в Закарпатской области. В 1990 году фомопсис впервые был обнаружен на подсолнечнике в Ставропольском крае (В.И. Якуткин, 1991).

Генетические исследования показали, что устойчивость подсолнечника к фомопсису возможно является горизонтальной, характер контроля – главным образом аддитивный. Но, скорее всего устойчивость к фомопсису моногенна или олигогенна, в отличие от устойчивости к белой гнили (*Sclerotinia sclerotiorum*), которая контролируется полигенно (Anne Viguie et al. 1999).

Полевые исследования устойчивости к фомопсису в значительной мере затруднены из-за высокой степени влияния климатических условий на развитие заболевания. Но в благоприятных условиях заболевание носит характер эпифитотии (Anne Viguie et al. 1999).

Различные изолянты гриба *Diaporthe hilianthi* в значительной степени отличаются по биологии развития и эпидемиологии, что также осложняет селекцию на устойчивость (Anne Viguie et al. 1999).

На первом этапе развития заболевания, аскоспорами растения подсолнечника в возрасте от 4 до 12 настоящих листьев при температуре воздуха 15-30°C (В.И. Якуткин, 1991). Затем мицелий гриба по черешкам листьев распространяется на стебель растения, а затем и на корзинку (Anne Viguie et al. 2000). Заболевание не проявляется на ювенильной стадии развития растения, окончательное заключение о поражении подсолнечника фомопсисом можно сделать только после изоляции возбудителя в чистую культуру и изучения его морфолого-культуральных признаков, поэтому оценка образцов на устойчивости требует больших затрат труда (В.И. Якуткин, 1991). В связи с этим получение молекулярных маркеров на гены устойчивости является важнейшим направлением в развитии селекции на устойчивость к данному заболеванию.

### *1.3. Селекция подсолнечника на устойчивость к болезням.*

#### *Источники генов устойчивости.*

Введение в культуру и возделывание масличного подсолнечника постоянно связано с созданием устойчивых к болезням и вредителям сортов. На первых этапах культуры серьезную проблему представляла ржавчина, завезенная вместе с подсолнечником из Америки. Слабопоражаемые местные сорта (Зеленки и др.) были получены в результате народной селекции. Вскоре культуре стало угрожать поражение семян подсолнечной молью. Эта угроза была снята с созданием панцирных сортов. С полыни на подсолнечник перешел цветковый паразит – заразиха, вначале раса А, затем Б, в последние годы новые и более агрессивные расы. Борьба с заразихой ведется постоянно. С 60-х гг. наиболее существенный вред стали наносить такие болезни, как ложная мучнистая роса, пепельная белая и серая гнили и др. С начала 80-х гг. – фомопсис, который является карантинным заболеванием в нашей стране.

Считают, что на подсолнечнике паразитируют 65 видов грибов, 10 бактерий, два вируса и четыре вида цветковых паразитов.

При поражении болезнями не только резко падает урожайность, но и ухудшается качество семян – снижаются полевая всхожесть, масса и масличность, значительно повышается кислотное число масла, что ухудшает его пищевые свойства.

В селекции подсолнечника используют местные, старые и современные отечественные селекционные сорта; образцы, сорта, линии и гибриды зарубежной селекции; дикие виды. В зависимости от задач и методов селекции привлекают различный исходный материал.

В селекцию на устойчивость к заболеваниям широко вовлекаются дикорастущие виды и формы из Северной Америки, так как многие из них обладают как устойчивостью к отдельным болезням, так и комплексным иммунитетом.



Например, ценным источником иммунитета к новым расам заразики служили межвидовые гибриды старших лет репродукции *H. tuberosus* и *H. annuus*, созданные Г.В. Пустовойт во ВНИИМК, и ряд иммунных линий, полученных на этом материале в ВСГИ.

Из коллекции ВИР выделены толерантные формы, при этом высокой устойчивостью к различным заболеваниям отличались некоторые образцы из Африки и Чили, относящиеся к высокорослым формам разновидности *australis*.

Донорами генов устойчивости к различным заболеваниям служат устойчивые формы из дикорастущих популяций подвидов однолетнего и диплоидного подсолнечника *H. lenticularis* и *H. petiolaris*, а также *H. argophyllus* (Ю.Б. Коновалов и др., 1990).

#### ***1.4. Гены устойчивости.***

##### 1.4.1. Механизмы устойчивости.

Успешная защита от болезней требует своевременного распознавания патогена. Последние несколько лет был достигнут значительный прогресс в изучении защитных механизмов растений. Информация о врожденном иммунитете закодирована в нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Предположительно изначально все формы иммунных ответов были филогенетически близки (Robert Fluhr, 2001). Но в ходе эволюции произошла множественная дивергенция генов, и в частности генов устойчивости.

Основная концепция защитных реакций – это распознавание чужеродных компонентов с помощью различных конститутивных рецепторов (Рис.2). Рецепторы заставляют организм активизировать различные системы защиты. Те чужеродные агенты, которые распознает организм, называются факторами авирулентности. Они продуцируются патогеном и, возможно, играют одну из главных ролей в заселении хозяина паразитом (Robert Fluhr, 2001).

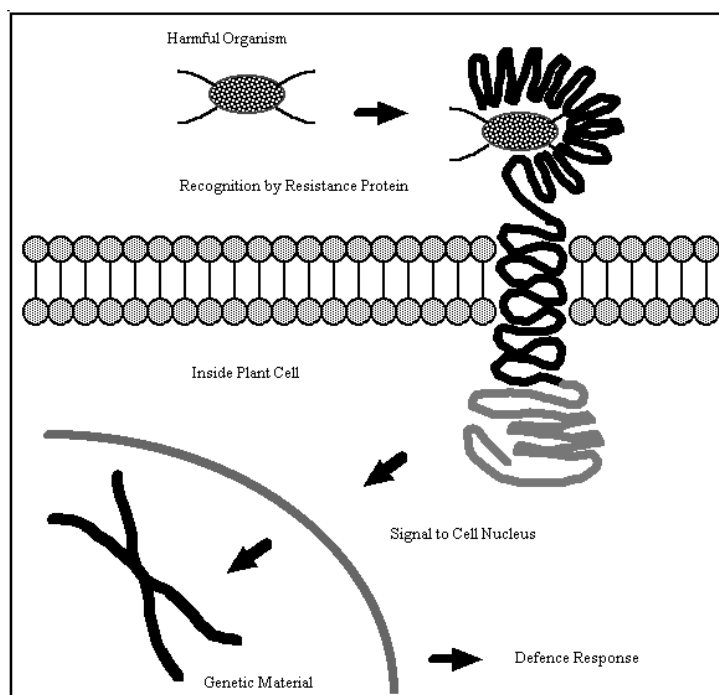


Рис. 2. Схема распознавания патогена рецептором.

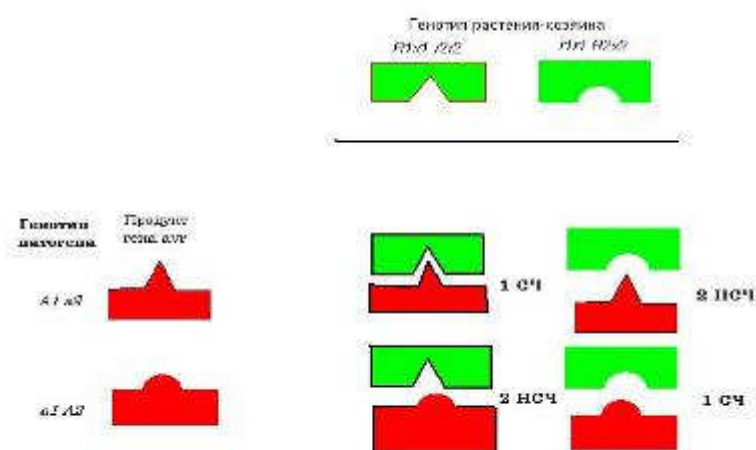


Рис. 3. Иллюстрация взаимодействия ген-на-ген. СЧ – реакция сверхчувствительности есть; НСЧ – реакции сверхчувствительности нет.

В ходе эволюции у растений выработались различные эффективные механизмы, с помощью которых они противостоят вредителям и заболеваниям или которые помогают им усилить свою выносливость. Наиболее хорошо изучен механизм устойчивости, основанный на взаимодействии ген-на-ген (рис. 3). При этом растение обладает геном,

продукт которого специфично распознает продукт гена авирулентности (*Avr*) патогена. Но многие другие защитные реакции и механизмы их действия остаются неясными. Более того, некоторые эволюционные процессы, воздействующие на гены устойчивости (*R*-гены), приводят к возникновению новых механизмов распознавания патогена растением (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000).

Пассивная защита растений (клеточная стенка, восковой налет, химические барьеры) обуславливает устойчивость к широкому спектру патогенов (Knogge, 1996; Osbourn, 1996). Если патоген преодолевает этот первый рубеж защиты растений, то сталкивается с защитными белками, которые кодируются специфическими генами устойчивости. На этом уровне может быть выделено как минимум четыре фундаментальных механизма защиты растений (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000):

1. Продукт гена устойчивости инактивирует токсин, который продуцируется патогеном, который приводит к некрозу или инактивирует защитную реакцию организма. Например, ген *Hm1* кукурузы (Johal and Briggs, 1992), который кодирует НАДФ-зависимую редуктазу токсина НС, продуцируемого расой 1 гриба *Cochliobolus carbonum*. Этот токсин вызывает симптомы заболевания у чувствительных растений из-за подавления гистондеацетилазы (Brosch et al., 1995).
2. Продукт гена устойчивости является мишенью для токсина. Отсутствие этого продукта проявляется в устойчивости растений. Например, митохондриальный ген *T-urf13* кукурузы обуславливает не только мужскую стерильность, но и чувствительность к Т-токсину, продуцируемому *Bipolaris maydis* раса Т, а, следовательно, и неустойчивость к данному патогенному грибу (Braun et al., 1989). Сорты кукурузы не несущие этот ген являются устойчивыми к данному грибу.

3. Продукт гена устойчивости сам является ответом организма на заражение. До настоящего времени единственным примером такого взаимодействия является устойчивость ячменя к паразиту *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, обусловленная геном *mlo*. Этот тип устойчивости получен при обработке мутагенами чувствительных растений, несущих аллели *Mlo* (Buschges et al., 1997). Продукт гена *Mlo* мог действовать как негативный регулятор гибели растительных клеток и других механизмов защиты. Присутствие только рецессивного аллеля данного гена проявлялось в низком пороговом уровне индукции защитной реакции. Защитная реакция проявлялась в спонтанном соединении клеточных стенок и появлении точечных некрозов на листьях растений с генотипом *mlo* (Wolter et al., 1993).
4. Продукт гена устойчивости (R-гена) обуславливает специфическое распознавание патогена, в котором экспрессируется ген авирулентности *Avr* (модель ген-на-ген). Специфическое распознавание продукта *Avr*-гена, так называемого элиситора, хозяином, вызывает передачу каскада сигналов, в который вовлекаются фосфорилирование белков, потоки ионов, синтез реакционных кислородных радикалов (ROS – reactive oxygen species) и другие сигналы (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). Эти сигналы запускают транскрипцию генов защитных реакций растений, кодирующих протеины, такие как глутатион S-трансферазы, пероксидазы, белки клеточной стенки, ингибиторы протеаз, энзимы гидролиза, белки, связанные с внедрением патогена и ферменты, вовлеченные во вторичный метаболизм (Zhue et al., 1996). Кроме того, клетки, которые непосредственно контактируют с патогеном, отмирают. Этот феномен

называется реакцией сверхчувствительности, которая является признаком взаимодействия ген-на-ген. Сверхчувствительность – активный процесс, который требует синтеза специфических протеинов, этот процесс очень схож с программируемой смертью клеток у животных (PCD – programmed cell death) (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). Сверхчувствительность зачастую коррелирует с индукции защитных реакций в неинокулированных частях растений. Эта приобретенная системная устойчивость проявляется в значительном уменьшении симптомов заболеваний многих патогенов (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000).

#### 1.4.2. Структура и функции протеинов, кодируемых генами устойчивости.

Гены устойчивости с определенными специфическими функциями и структурой были выделены и клонированы как у однодольных, так и двудольных растений. Эти гены обуславливают устойчивость к широкому кругу патогенов, включающему вирусы, бактерии, грибы, нематоды и даже клещей. Хотя образ жизни и механизм инфекции у этих патогенов значительно отличается друг от друга, продукты генов устойчивости очень схожи между собой. Все протеины устойчивости содержат богатые лейцином повторы (LRR). Внутриклеточные белки также содержат сайт связывания с нуклеотидами (NBS) и в некоторых случаях домен, называемый «лейциновой молнией» (LZ) или домен гомологичный рецептору Toll и interleukin-1 рецептору (TIR). Во внеклеточных белках домен LRR может быть дополнен районом связывания с мембраной и доменом цитоплазматической протеинкиназы (см. табл. 1).

#### Структура домена LRR.

Основываясь на определенном положении домена LRR, который может быть как внутри-, так и внеклеточным, гены устойчивости могут быть поделены на два класса. Домен LRR представляет собой повторяющуюся последовательность, состоящую из остатков лейцина, а иногда аспарагина и пролина в строго консервативных положениях (Kobe and Deisenhofer, 1994). Среднее количество повторов – 24. Оно является относительно константным между продуктами различных генов устойчивости. Минимальное число повторов в гене устойчивости RPS2 (Арабидопсис, устойчивость к *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) – 14, максимальное – в гене Cf2 (Томат, устойчивость к *Cladosporium fulvum*) – 37. LRR районы белков, содержащих домен NBS, имеют несовершенные повторы, имеющие сходство с цитоплазматической аденилатциклазой дрожжей (Kataoka et al., 1985). Белки устойчивости без NBS домена, содержат LRR домены с более строгой консенсусной последовательностью, содержащей консервативный остаток глицина (Bent, 1996). Эти белки также содержат сигнальный пептид для внеклеточного распознавания и, очевидно, трансмембранной функцией.

LRR домены с длинными повторами, очевидно имеют подковообразную структуру. С более короткими – линейную или изогнутую (дугообразную) структуру (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). Внеклеточные домены LRR чаще всего имеют консервативный гидрофобный конец, который выполняет структурную роль. В то время как другая сторона содержит неконсервативные фрагменты остатков аминокислот, которые могут взаимодействовать со специфическими лигандами (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000).

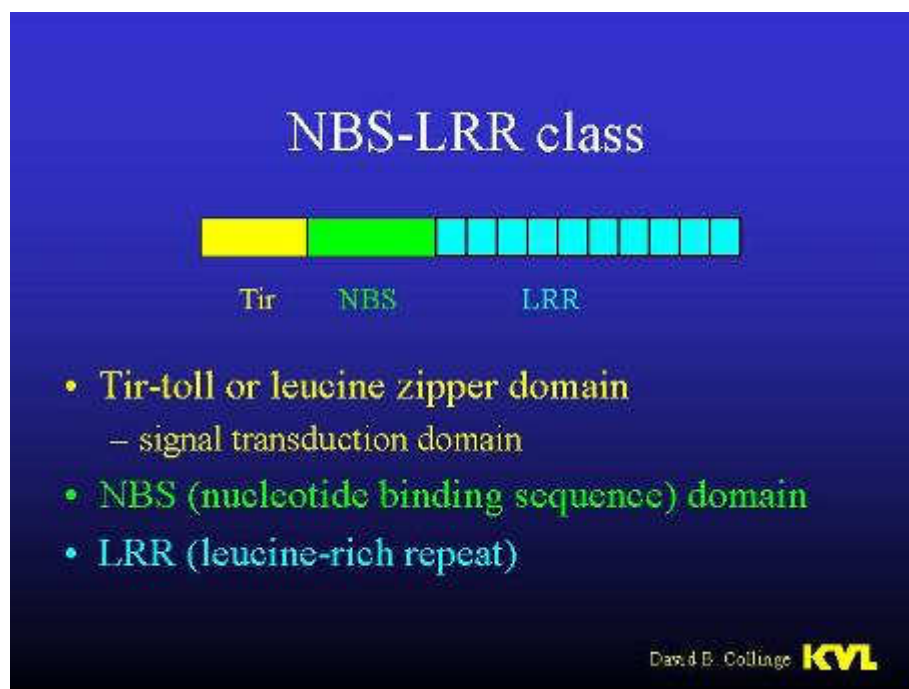


Рис. 4. Схематическое изображение области NBS-LRR.

Самый большой по длине домен LRR кодируется геном устойчивости *Cf-2*. Отличительная черта белков *Cf-2* – регулярность длины доменов LRR и строгая консервативность отдельных аминокислот внутри доменов LRR. Разные лейциновые повторы могут быть сгруппированы в два класса – А и В. Действие доменов LRR белков *Cf-2* сходно с таковым у белка-ингибитора рибонуклеаз (PRI) и заключается в обеспечении взаимодействия внутри повторов, которое стабилизирует третичную структуру этих белков.

У белка PRI соседние повторы поворачиваются на  $17^\circ$  вокруг своей оси, чтобы создать третичную структуру типа «подкова». У протеинов с числом повторов LRR 21 и более концы должны сводиться вместе. Число повторов у протеина *Cf-2* – 38, таким образом, скручивание должно породить структуру подобную спирали. Домен LRR белка *Cf-2* представляет собой комбинацию короткой  $\beta$ -спирали и правозакрученной  $\alpha$ -спирали, образующей три поворота. Длина домена в среднем 24 аминокислоты, в петле, образуемой доменом, содержится остаток пролина, однако этот остаток может располагаться и в N-терминальном конце петли. Домен LRR белка *Cf-2* является внеклеточным и гидрофильным. Скорее

всего, он имеет линейную структуру длиной 182 Å (Mark S. Dixon et al., 1996).

#### Функции домена LRR.

Очевидно, домен LRR выполняет рецепторную функцию. Белки с LRR доменом помогают взаимодействовать другим белкам (Kobe and Deisenhofer, 1994), которые выполняют, например, передачу каскадов сигналов или действуют как рецепторы белковых гормонов (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). Растения, несущие мутации в домене LRR R-генов, обладают пониженной устойчивостью. Эксперименты по обмену доменами между различными L-протеинами льна, выявили, что LRR домен является важнейшим компонентом в специфичном распознавании патогена (Elis et al., 1997). Вариации в структуре домена LRR гена *Cf*, строго коррелирует со спецификой распознавания патогена (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000).

#### Локализация белков устойчивости и их элиситоров.

Предполагалось, что продукты генов *Avr* действуют как лиганды для рецепторов, кодируемых генами устойчивости хозяина (Jones, 1997). Если эта гипотеза верна, то продукты генов устойчивости и их элиситоры должны появляться в большинстве случаев в одном клеточном компартменте. Продукты генов устойчивости к облигатным внеклеточным паразитам, например, гена *Rx* (устойчивость картофеля к вирусу X) и *N* (устойчивость табака к ВТМ), действительно локализуются в цитоплазме. Большинство продуктов бактериальных генов авирулентности вызывают реакцию сверхчувствительности попадая внутрь клетки.

Продукт гена авирулентности патогена *Cladosporium fulvum* локализуется в апопласте. Белок устойчивости к данному токсину является трансмембранным и также обнаруживается в апопласте.

Во многих исследованиях не показана локализация элиситоров или белков устойчивости. Но из большинства полученных данных, из



исследований, в которых была определена локализация и элиситора, и протеина устойчивости, можно сделать вывод, что R-протеин и его элиситор появляются в одном клеточном компартменте, либо в апопласте (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000).

#### Взаимодействие между белками устойчивости и их элиситорами.

Прямое взаимодействие между R-протеином и его элиситором показано в некоторых случаях. Элиситор Avr-Pita из *Magnaporthe grisea* взаимодействовал в дрожжевой двугибридной системе с LRR доменом протеина, кодируемого геном *Pi-ta*. Продукт данного гена, несущий мутацию не взаимодействовал с элиситором (Fields and Song, 1989, Bryan et al., 1999).

Невозможность показать прямое взаимодействие между элиситором и R-протеином наводит на мысль, что в других случаях взаимодействие происходит не напрямую и возможно вовлекается какой-либо посредник. Однозначного ответа на вопрос о механизме взаимодействия R-белка и элиситора на данный момент нет. Это также видно из следующих трех наблюдений.

Во-первых, исследования связывания с использованием меченных элиситоров с целью выявить рецептор часто указывали на присутствие сайта связывания у растений с очень низким уровнем устойчивости. Например, изучение связывания элиситора AVR9 (*C. fulvum*), меченного  $^{125}\text{I}$ , показало, что есть сайт связывания с цитоплазматической мембраной как у томатов имеющих ген *Cf-9*, так и у тех, которые не имели данного гена (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). И устойчивые, и неустойчивые растения содержали протеин размером 34-кДа, который связывал элиситор.

Во-вторых, используя дрожжевую двугибридную систему, было обнаружено прямое взаимодействие между Pto, серин/треонин киназой без явных сайтов связывания, и AvrPto, элиситором из бактерии *P. syringae* pv *tomato* (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). Обмен доменов между Pto и продуктом родственного ему гена *Fen*, который не

взаимодействует с AvrPto, выявил регион из 25 аминокислот в Pto, содержащихся в консервативном киназном домене, необходимых для связывания AvrPto. Используя точечный мутагенез, выяснили, что одна единственная аминокислота (треонин 204) в этом домене оказалась необходимой для взаимодействия с AvrPto и индукции защитной реакции. При внесении мутаций в элиситор AvrPto выяснилось, что и мутантные формы патогенного белка связывались с продуктом R-гена. И способность к связыванию мутантных форм элиситора тесно коррелировала с возникновением реакции сверхчувствительности у устойчивых форм.

В-третьих, исследования по иммунопреципитации выявили совместное осаждение комплекса, содержащего как продукта R-гена, так и его элиситора. RPS2, продукт гена устойчивости *Rps2* арабидопсиса, осаждался в комплексе, когда использовались антитела, вырабатываемые против продукта гена авирулентности AvrRpt2 (*P. syrigae*). Таким образом, в исследованиях редко выявлялось прямое взаимодействие между продуктом R-гена и его элиситором, но оба компонента могут обнаруживаться в комплексе.

#### Белки устойчивости и передача сигналов.

Как было ранее сказано, белки устойчивости действуют специфично по отношению к своим элиситорам, но в большинстве случаев не взаимодействуют с ними напрямую. Современная модель предполагает, что белки устойчивости обнаруживают взаимодействие между фактором вирулентности патогена и его «мишенью», присутствующей в организме хозяина. В этой, так называемой модели «защиты», взаимодействие белка устойчивости с комплексом вызывает активацию реакции сверхчувствительности (Van der Biezen and Jones, 1999). Эта модель помогает объяснить тот факт, что патоген несет в своем геноме гены, позволяющие его обнаружить. Модель предполагает, что в норме функция элиситора – заражение (вирулентный фактор). Эта гипотеза подтверждается и тем, что некоторые Avr гены всегда поддерживаются в популяции патогена. Для

многих бактериальных и грибных генов авирулентности было показано, что внесение делеций или мутаций в кодирующую область гена, приводит к потере вирулентности по отношению к чувствительному хозяину, но не всегда (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000).

«Мишенями» элиситора могут быть белки, вовлеченные в защиту или метаболизм хозяина. Свидетельством того, что они могут быть вовлечены в защитные реакции, служат исследования белков, взаимодействующих с Pto. Прямое взаимодействие между Pto и факторами транскрипции Pti4, Pti5, Pti6 (*Pto interacting*) было обнаружено и при отсутствии AvrPto. До фосфорилирования с помощью Pto, эти факторы транскрипции связывались с элементами в промоторных областях этилен-индуцируемых генов, включающих много основных PR-протеинов. Pto также взаимодействует с Pti1 (серин/треонин киназой, которая также фосфорилируется с помощью Pto). Это говорит о том, что Pto активирует, по меньшей мере, две различных реакции. Сверхэкспрессия Pto проявляется в усилении основных защитных реакций (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). Связывание AvrPto с Pto может повлиять на функцию Pto и снизить уровень устойчивости растения. Prf, белок с доменами NBS-LRR, может обнаруживать взаимодействие Pto-AvrPto и запустить цепь реакций, ведущих к проявлению сверхчувствительности (Van der Biezen and Jones, 1999). В этой модели «мишень» (Pto) в различной степени защищена продуктом гена устойчивости Prf.

#### Проведение сигналов R-белками с помощью предполагаемых сигнальных доменов.

После распознавания патогена, активируется множество защитных реакций, таких как сверхчувствительность, накопление защитных белков усиление окислительных реакций. Каким образом R-белки способствуют активации этих ответов в большинстве случаев остается неясным. Вероятно LZ, NBS и TIR домены играют роль сигнальных. Область LZ («лейциновый

зиппер») способствует гомо- и гетеродимеризации, во время образования комплекса с элиситором (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000).

Теоретически, домен NBS активирует киназы G-белков с помощью переноса фосфата. Многие белки, содержащие домен NBS, необходимы для процессов развития, дифференциации и везикулярного транспорта. Наличие такого высококонсервативного региона во многих R-генах, наводит на мысль, что роль домена NBS в R-белках очень важна. Наличие мутаций в NBS регионе гена *RPS2* приводит к нарушению реакции сверхчувствительности при наличии элиситора AvrRPT2. Такой же эффект наблюдается при наличии мутаций в NBS регионе гена *N* табака (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). Хотя NBS домены необходимы для функционирования R-белков, нет биохимических доказательств, что эти домены активируются связыванием с АТФ или ГТФ.

Несмотря на то, что TIR домены белков N, M, L6, RPP-1, -5, -10 и -14 и RPS4 (Таблица 1) имеют низкую степень гомологии с цитоплазматическими доменами рецепторов Toll и interleukin-1, предполагается, что они выполняют свою функцию сходным образом. Toll – рецепторный белок с внецитоплазматическим LRR доменом, который контролирует полярность развития эмбрионов дрозофилы и экспрессию анти-грибного пептида дрозомидина в мушках, пораженных грибом (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). После связывания со Spätzle (малым лигандом), Toll активирует цитоплазматический протеин Tube. Tube рекрутирует Pelle (серин/треонин киназа гомологичная Pto) с помощью переноса его к плазмалемме. Pelle фосфорилирует белковый комплекс Cactus-Dorsal, что приводит к деградации Cactus и синтезу Dorsal. Dorsal является фактором транскрипции для семейства белков Rel/NF- $\kappa$ B, которые затем активируют экспрессию генов в ядре (Схема 1).

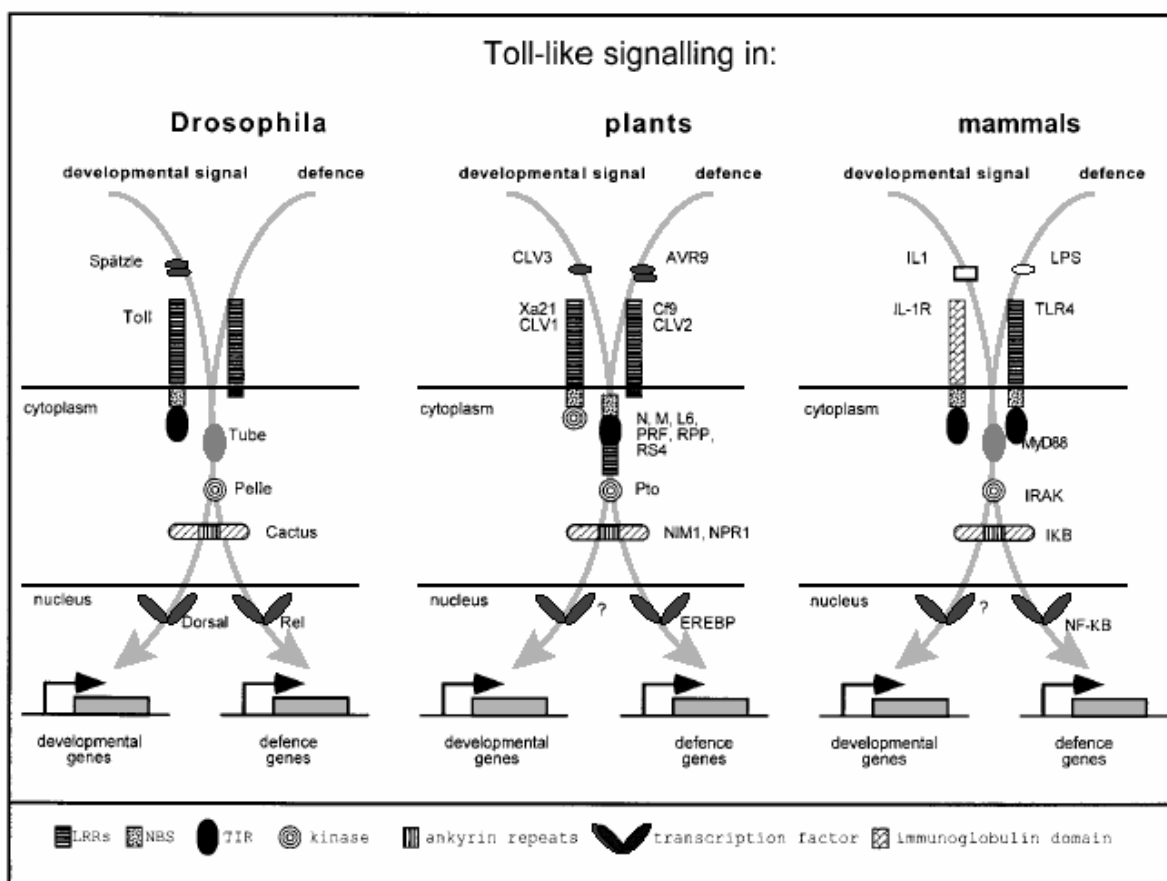


Схема 1. Схема передачи сигналов R-белками (пояснения в тексте).

Interleukin-1 система человека, которая участвует в иммунных ответах, регулируется сходным образом. В макрофагах, после активации рецептора подобного Toll и interleukin-1, активируется протеинкиназа IRAK (гомологичная Pelle). IRAK активирует IκB/NF-κB комплекс, что приводит к освобождению белка-ингибитора IκB из комплекса, и транскрипционный фактор NF-κB активирует экспрессию генов.

Сходство между контролем активации защитных реакций у животных и растений распространяется и на Toll-подобные домены, найденные в некоторых растительных защитных белках. Для многих белков, участвующих в проведении сигналов подобно Toll, были найдены растительные гомологи, которые также участвуют в защитных реакциях. Spätzle имеет структурную гомологию с элиситором AVR9 из *C. fulvum*. Toll, следующий белок участвующий в каскаде сигналов, в добавок к Toll домену,

имеющему внеклеточную область LRRs, сходен с протеинами Cf и Xa21. Pelle имеет гомологию с Pto, а также с серин/треонин киназным доменом белка Xa21.

Еще одно подтверждение гипотезы, что растения активируют защитные реакции подобно животным, исходит из того, что в макрофагах транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, активируемый IRAK, регулируется ROS, а появление ROS у растений и млекопитающих зависит от собирания НАДФ-оксидазного комплекса, локализуемого на мембране (Frank L.W. Takken and Matthieu H.A.J. Joosten, 2000). Компоненты этого комплекса были обнаружены и в растениях (Groom et al., 1996).

Продукты R-генов могут активировать дальнейшие компоненты с помощью NBS/TIR или LZ доменов, но они также могут запускать реакцию сверхчувствительности с помощью NB-ARC домена. Этот домен был недавно обнаружен во многих продуктах R-генов, он также присутствует в белках CED-4 и APAF-1, которые играют важную роль в апоптозе (Kumar and Colussi, 1999).

#### 1.4.3. Использование аналогов генов устойчивости (RGAs) класса NBS-LRR для разработки молекулярных маркеров генов устойчивости.

Множество последовательностей ДНК были клонированы с помощью метода ПЦР с вырожденными праймерами, построенными на основе аминокислотной последовательности доменов NBS-LRR. Как уже указывалось выше, эти домены консервативны для многих генов устойчивости. Таким образом, такие праймеры могут быть использованы для маркирования еще неизвестных генов устойчивости, при помощи построения праймеров для ПЦР на основе уникальных последовательностей. После того, как множество последовательностей ДНК были получены на основе вырожденных праймеров класса NBS-LRR, они получили название аналогов генов устойчивости (RGAs) или «кандидатов» в гены устойчивости (RGCs).

Эти последовательности или сами являются частью гена устойчивости, или тесно сцеплены с ним в геноме. Таким образом, RGAs могут быть использованы в селекции, основанной на молекулярных маркерах (MAS). Более того, они могут быть использованы для клонирования новых генов устойчивости к заболеваниям.

Работа по поиску и клонированию аналогов генов устойчивости была проведена Z. Deng и др. на цитрусовых *Citrus* и *Poncirus*. Культурные виды цитрусовых чувствительны ко многим патогенам (вирусы, виоиды, грибы и бактерии). Эти заболевания наносят значительный урон урожайности. Классические методы селекции цитрусовых на устойчивость не дали результатов из-за малого количества доноров генов устойчивости, которые легко могли бы передавать их.

Быстрое развитие технологий молекулярного маркирования в последние десять лет позволило локализовать и картировать гены устойчивости к вирусу цитрусовых tristeza (*Ctv*) и главный ген устойчивости к цитрусовой нематоде (CN, *Tylenchulus semipenetrans*, ген назван *Tyr1*) (Z. Deng et al., 2000). Пока идентификация ДНК маркеров в значительной степени проводилась на основе метода RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – случайно амплифицированная полиморфная ДНК).

Z. Deng и др. в своей работе клонировали и охарактеризовали несколько аналогов генов устойчивости класса NBS-LRR. В качестве источника матричной ДНК они использовали ДНК межвидового гибрида *Poncirus trifoliata* и *Citrus grandis*. Для этих последовательностей были созданы специфические праймеры и эти последовательности были амплифицированы с помощью ПЦР. Эти последовательности в дальнейшем будут использованы для маркирования и картирования генов устойчивости. На основе RGAs были созданы CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) маркеры, которые тесно сцеплены с генами *Ctv* и *Tyr1*.

После проведения ПЦР с вырожденными праймерами были получены последовательности ДНК размером 200 и 500 bp. Только последовательность

размером 500 bp оказалась родственной фрагментам того же размера из ранее исследованных генов устойчивости *N*, *L6*, *RPS2*. Эти последовательности были позднее клонированы. Рестрикционный анализ вставок случайно отобранных клонов показал, что все варианты последовательностей 500 bp имеют гетерогенные участки.

Всего было секвенировано 39 клонов. Поиск в банке данных GenBank показал, что два клона были высоко идентичны хромопластной rDNA, два клона не имели аналогов в базе данных, пять клонов или не имели вообще или имели очень слабое сродство к генам устойчивости; эти клоны были исключены из дальнейшей работы. Восемь последовательностей имели сродство к уже клонированным генам устойчивости, но в их состав входили один или несколько стоп-кодона или сдвиг рамки считывания. Остальные 22 последовательности транслировались в полипептиды без стоп-кодонов. Они имели очень высокую степень сродства к различным генам устойчивости растений и другим RGAs, клонированных из различных видов растений по сходной методике.

Проведение дальнейшего рестрикционного анализа полученных последовательностей выявило полиморфизм у 9 из них. Для них были получены CAPS маркеры.

Три полиморфных фрагмента ДНК, амплифицированных с помощью праймеров, полученных на основе RGAs, были сцеплены с геном устойчивости *Ctv* рода *Poncirus*. Один из фрагментов был также полиморфным для Swingle citrumelo и линий LB6-2 (донора и рекуррентных родителей, соответственно) из беккроссированной CN семьи. Этот маркер был картирован в середину ранее идентифицированного региона, который содержит ген устойчивости *Tyr1* к CN (цитрусовая нематода). Таким образом, полученные данные указывают, что последовательности RGAs являются ценным источником для разработки маркеров к генам устойчивости. Несколько, полученных на основе ПЦР, специфичных маркеров (SCAR и CAPS маркеры) для генов *Ctv* и *Tyr1* должны повысить



эффективность селекции на устойчивость у цитрусовых и ускорить интрогрессию этих генов устойчивости в новые виды.

Подобная работа по маркированию гена устойчивости к ржавчине (*Albugo candida*) репы (*Brassica rapa*) была начата Pirjo Tanhuanpää и Juha Vilkki в 1999 г. 409 RAPD праймеров было использовано для маркирования этого признака, но ни один из них не дал подходящего молекулярного маркера. Поэтому для маркирования этого признака применили метод, основанный на аналогах генов устойчивости класса NBS-LRR. Pirjo Tanhuanpää и Juha Vilkki использовали две пары различных вырожденных праймеров. Устойчивость к данному патогену, скорее всего, контролируется одним главным геном, а остальные локусы контролируют споруляцию (Pirjo Tanhuanpää и Juha Vilkki, 1999).

Первая пара праймеров для амплификации RGAs дала один фрагмент ПЦР размером около 500 bp. ПЦР проводили на основе ДНК устойчивого родителя. 74 клон с ПЦР продуктом было секвенировано. Большинство клонов были сходными, за исключением некоторых, которые имели замену 1-3 пар оснований. Эти замены, скорее всего, обусловлены ошибками Taq-полимеразы во время амплификации. Таким образом, с первой парой праймеров удалось амплифицировать ген *B. rapa*, соответствующий гену *RPS2* арабидопсиса. Последовательность размером 506 bp *B. rapa* содержала замены 62 пар оснований по сравнению с геном *RPS2* арабидопсиса, что привело к замене 24 аминокислот в полипептиде.

Всего с вырожденными праймерами было получено 4 фрагмента размером около 500 bp (Pirjo Tanhuanpää и Juha Vilkki, 1999).

Также была проведена идентификация аналогов генов устойчивости винограда (*Vitis vinifera* L.), сцепленных с локусом устойчивости к мучнистой росе (*Uncinula necator*) (Т.М. Donald et al., 2002).

Олигонуклеотидные праймеры, созданные на основе консервативных районов NBS-LRR ранее клонированных генов устойчивости к патогенам, были использованы для амплификации аналогов генов устойчивости

винограда. 28 уникальных последовательностей RGAs были идентифицированы и разбиты на 22 группы в соответствии с их нуклеотидными последовательностями. Сходство последовательностей составляло 70% и более. Представители каждой группы были использованы в анализе методом BSA для исследования на полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (RFLP) локуса устойчивости к мучнистой росе, *Run1*, введенный в *Vitis vinifera* L. из дикого винограда *Muscadinia rotundifolia*. Три RGA маркера оказались тесно сцепленными с локусом *Run1*. Среди этих маркеров, два (GLP1-12 и MHD145) совместно расщепляются в 167 тестах потомства. А третий маркер (MHD98) был картирован на расстоянии 2,4 сМ от локуса *Run1*. Результаты показывают, что последовательности аналогов генов устойчивости могут быть очень полезными, когда используются совместно с методом BSA для быстрого создания молекулярных маркеров тесно сцепленных с локусами генов устойчивости сельскохозяйственных культур (Т.М. Donald et al., 2002).

Устойчивость подсолнечника к облигатному паразиту *Plasmopara halstedii* обусловлена специфическими доминантными генами, названными *Pl*. Локус *Pl6* обуславливает устойчивость ко всем расам *Plasmopara halstedii*, кроме одной, и должен содержать, по меньшей мере, 11 тесно сцепленных генов, каждый из которых дает устойчивость к одной из рас мучнистой росы. Специфические праймеры были созданы и использованы для амплификации 13 маркеров, покрывающих генетическое расстояние размером около 3 сМ с центром в локусе *Pl6*. Клонирование и секвенирование этих 13 маркеров показали, что локус *Pl6* содержит консервативные гены, принадлежащие к классу генов устойчивости TIR-NBS-LRR (М.Ф. Bouzidi et al., 2002).

А.Д. Hayes и др. в своем эксперименте использовали короткие последовательности ДНК сои, предварительно клонированные на основе их консервативных NBS последовательностей, в качестве пробы для идентификации аналогов генов устойчивости. Два гомологичных, но генетически независимых гена были идентифицированы. Один ген был

картирован в молекулярную группу сцепления F сои, а второй – в группу E. Первый ген содержит открытую рамку считывания размером 3279 нуклеотидов и обладает всеми функциональными особенностями ранее клонированных генов устойчивости класса NBS-LRR. N-конец полученного продукта гена очень характерный для других продуктов генов устойчивости подгруппы NBS-LRR, которые обнаруживают гомологию с рецепторными TIR-генами. С-конец несколько отличался от продуктов других генов устойчивости. Эта область гена, отнесенного к группе F, содержит LRR область, которая характеризуется двумя альтернативно сплайсируемыми продуктами, которые дают генные продукты с 4 или 10 повторами LRR. Второй клонированный ген, отнесенный к группе E, имел открытую рамку считывания размером 1565 нуклеотидов в N-концевом домене. Несмотря на сильную гомологию, 3' область этого гена содержала несколько стоп-кодонов и явное смещение рамки считывания по сравнению с геном группы F. Этот факт ставит под вопрос участие этого гена в реакциях устойчивости. Эти два аналога генов устойчивости являются тесно связанными друг с другом и относятся к классу NBS-LRR (A.J. Hayes et al., 2000).

У сои также был клонирован NBS-регион многих гомологов генов устойчивости *N* и *RPS2* (см. табл.1) при помощи вырожденных олигонуклеотидных праймеров. У сои было обнаружено большое количество генов устойчивости, содержащих домен NBS. Они могут быть разбиты на 11 групп, каждая из которых содержит небольшое количество генов (Yong G. Yu et al., 1996).

Последовательности, содержащие NBS, кластеризованы в различных хромосомах сои, как и гены устойчивости. Две различные группы RGAs располагаются в участке хромосомы, расположенном около ранее картированных генов устойчивости *Rsv1*, *Rpv*, *Rps3*, а две другие группы – вблизи кластера генов *Rps2*, *Rj2* и *rmd*.

Клонирование полученных аналогов генов устойчивости должно помочь выделить полную нуклеотидную последовательность генов устойчивости и в дальнейшем клонировать их (Yong G. Yu et al., 1996).

Для выделения связанных фрагментов генов с помощью ПЦР из однодольных растений (рис, ячмень) были также использованы консервативные домены NBS-LRR генов устойчивости (Dario Leister et al., 1998). Сравнение полипептидных последовательностей продуктов генов устойчивости двудольных и однодольных растений показало наличие общих областей и говорит о том, что у однодольных нет специфических особенностей. Это наводит на мысль о том, что эволюция генов устойчивости шла сходным образом у всех видов растений (Dario Leister et al., 1998).

## ***2. Материалы и методы.***

### ***2.1. Цель и задачи исследования.***

2.1.1. Цель работы: клонирование аналогов генов устойчивости к заболеваниям класса NBS-LRR подсолнечника *Helianthus argophilus*.

2.1.2. Задачи исследования: амплификация (с использованием метода ПЦР), клонирование (в *E. coli* с помощью плазмидного вектора pUC19) и характеристика (на основе секвенирования нуклеотидной последовательности) аналогов генов устойчивости подсолнечника.

#### 2.1.3. Место проведения исследований.

Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии МСХА имени К.А. Тимирязева, лаборатория регуляторов роста и развития растений. Работа проводилась с апреля 2002 по июнь 2003 года.

### ***2.2. Растительный материал.***

В работе была использована геномная ДНК, выделенная из семян дикого вида подсолнечника *H. argofillus* 1856, полученного из Вейделевского института подсолнечника, Россия.

### **2.3. Выделение ДНК.**

Геномную ДНК выделяли из семян подсолнечника *H. argofillus* по следующей методике:

1. 300-400 мг очищенных семян помещали в пробирки емкостью 1,5 мл и заливали 500 мкл DEB с  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (на 5 мл – 0,019 г), охлажденным на льду, и затем растирали песиком.
2. Центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин на центрифуге Eppendorf при 4°C.
3. Сливали надосадочную жидкость и затем добавляли 125 мкл DEB к осадку.
4. Добавляли 175 мкл NLB и 60 мкл 5% sarkosyl, осторожно перемешивали и оставляли на водяной бане на 30 мин при 65°C.
5. Добавляли 500 мкл хлороформ/изоамилового спирта (24:1) и перемешивали 15 мин при комнатной температуре.
6. Центрифугировали на центрифуге Eppendorf 10 мин при 14000 об/мин.
7. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и добавляли один объем изопропанола со льда.
8. Центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин.
9. Промывали осадок в 100 мкл 70% этанола.
10. Центрифугировали 5 мин при 14000 об/мин.
11. Сливали супернатант, осадок сушили с помощью вакуумной инфльтрации на оборудовании SpeedWac.
12. Выделенную ДНК растворяли в 50 мкл MQ-H<sub>2</sub>O на водяной бане при 60°C.

Концентрацию выделенной ДНК и степень загрязненности РНК оценивали электрофорезом в 1% агарозном геле. Выделенную геномную ДНК использовали для проведения ПЦР.

#### **2.4. ПЦР-анализ.**

Для идентификации аналогов генов устойчивости класса NBS-LRR использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод основан на способности ДНК-полимеразы строить комплементарную цепь ДНК при наличии одноцепочечной матрицы, нуклеотидтрифосфатов, праймеров и при определенных условиях.

Для проведения ПЦР были использованы вырожденные праймеры описанные Z. Deng et al., 2000):

- F11 (forward), последовательность: 5' – GG(A/G/T) GT(A/G/T) GGN AA(A/G) AC(A/T)AC;

- R11 (reverse), последовательность: 5' – AGI GC(A/C/T) AGN GGN AGN CC;

- R16 (reverse), последовательность: 5' – AGN GC(A/C/T) AGN GG(C/T) AAN CC;

- R18 (reverse), последовательность: 5' – AAN GC(A/C/T) AGN GG(C/T) AAN CC.

Объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал 2,5 мкл 10x буфера для Taq-полимеразы, 2,5 мкл dNTP (10x – 2,5 mM каждого нуклеотида), 0,5 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы (2,5 ед./мкл), 0,5 мкл ДНК-матрицы, 18 мкл MQ-H<sub>2</sub>O.

Аmplификацию проводили в амплификаторе «Терцик-МЦ2» («ДНК-технология», Москва) при следующих параметрах: начальная денатурация – 94<sup>0</sup>С в течение 2 мин, затем проводились 42 цикла – 92<sup>0</sup>С - 1 мин, 50<sup>0</sup>С – 1 мин и 2 минуты при 72<sup>0</sup>С.

## ***2.5. Электрофорез в агарозном геле.***

Продукты ПЦР разделяли в 1% агарозном геле при напряжении 6 В/см в TBE-буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ EDTA pH 8).

## ***2.6. Очистка продуктов ПЦР.***

Очистку продуктов ПЦР проводили следующим образом:

1. К 25 мкл реакционной смеси добавляли 125 мкл воды.
2. Добавляли 150 мкл хлороформ/изоамилового спирта (24/1).
3. Центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин.
4. Отбирали надосадочную жидкость и переносили в новую пробирку.
5. Добавляли 2 объема холодного этанола (96%) и 0,1 объема 4М ацетата натрия.
6. Инкубировали 30 мин при  $-20^{\circ}\text{C}$ .
7. Центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин.
8. Сливали надосадочную жидкость.
9. Промывали осадок в 100 мкл 70% этанола.
10. Центрифугировали 3 мин при 14000 об/мин.
11. Сушили осадок вакуумной инфльтрацией.
12. Растворяли осадок в 50 мкл MQ- $\text{H}_2\text{O}$ .

Далее ПЦР продукт лигировали в T-A-вектор.

## ***2.7. Приготовление T-вектора.***

Для приготовления T-вектора используется вектор, разрезанный рестриктазой EcoRV, дающей тупые концы. Инкубация с Taq-полимеразой и dTTP добавляет 3'-концевой тимин. Затем проводят самолигирование. Самолигирование изменяет размер тех молекул вектора, которые по каким-либо причинам не приобрели 5'-концевой тимин. Размер молекул с двумя 3'-концевыми T не изменяется и это позволяет очистить их с помощью препаративного электрофореза. В качестве вектора использовали плазмиду pUC19 (СибЭнзим, Новосибирск).

1. Смешивали 10 мкг вектора, 20 мкл 10х буфера «В», 20 мкл 10х BSA, 20 U EcoRV и доводили объем смеси до 200 мкл MQ-H<sub>2</sub>O.
2. Оставляли на 1-2 часа при 37<sup>0</sup>С на водяной бане.
3. Полноту рестрикции контролировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.
4. Далее проводили экстракцию в равном объеме (200 мкл) смеси (1:1) фенола и хлороформ/изоамилового спирта (24:1). Проводили вторичную экстракцию в хлороформ/изоамиловом спирте (24:1).
5. Добавляли 8 мкл 5М NaCl и 500 мкл 96% этанола. Оставляли при комнатной температуре на 10 мин.
6. Центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин.
7. Промывали осадок в 70% этаноле.
8. Растворяли осадок в 88 мкл H<sub>2</sub>O.
9. Добавляли 10 мкл Taq-буфера (с 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 2 мкл dTTP (100 мМ) и 5 U Taq-полимеразы. Проводили амплификацию на амплификаторе «Терцик-МЦ2» при 72<sup>0</sup>С в течение 2 часов.
10. Проводили экстракцию (п. 4).
11. Добавляли 4 мкл 5М NaCl и 250 мкл 96% этанола. Оставляли при комнатной температуре на 10 мин.
12. Центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин.
13. Промывали 70% этанолом и растворяли ДНК в 45 мкл H<sub>2</sub>O.
14. Проводили самолигирование в смеси: 5 мкл T4 лигазного буфера, 2U T4 ДНК-лигазы. Оставляли смесь на ночь при 16<sup>0</sup>С.
15. Проводили препаративный электрофорез в 0,8% агарозном геле.
16. Выделяли незалигировавшуюся плазмидную ДНК в PEG.
17. Выделенную ДНК хранили в объемах по 15 мкл при -20<sup>0</sup>С.



## 2.8. Лигирование вставки в T-вектор.

Продукт ПЦР размером 500 н.п. лигировали в полученный T-вектор (схема 2). Лигазная смесь включала: 200 нг T-вектора, 65-70 нг вставки, 2,5 мкл 10x лигазного буфера, 5U T4-лигазы. Оставляли смесь на ночь при 16<sup>0</sup>С.

Полноту лигирования проверяли разделением продуктов в 1% агарозном геле.

Далее полученным вектором со вставкой трансформировали бактерии *E. coli*, штамм DH10B.

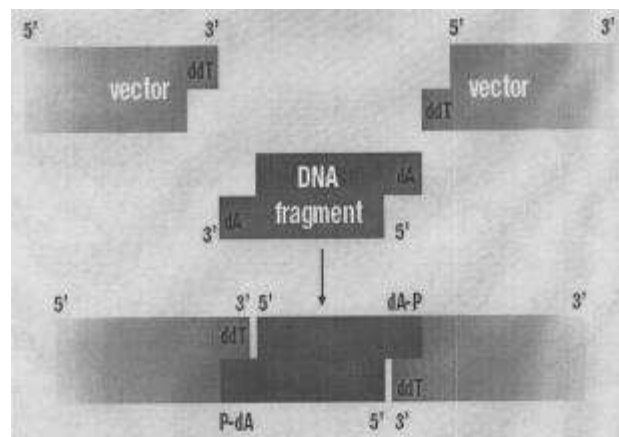


Схема 2. Схематическое изображение лигирования вставки в вектор.

## 2.9. Трансформация бактерий.

Для перенесения вектора со вставкой в бактерию (трансформации), необходимо особым образом обработать клеточные стенки бактерий. Такие клетки называются компетентными. Компетентные клетки получали по следующей методике:

1. Бактериальную колонию добавляли к 5 мл среды жидкой LB-среды (10 г/л Triptone, 5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl) и инкубировали в течение ночи на водяной бане с шейкером при 37<sup>0</sup>С.

2. 1 мл ночной культуры добавляли к 100 мл LB-среды и инкубировали при 37<sup>0</sup>С на водяной бане с шейкером 3 часа (до OD<sub>650</sub> = 0.3).
3. Разливали культуру по 5 мл в 10 мл пробирки и оставляли на льду на 10 мин.
4. Центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин и 4<sup>0</sup>С.
5. Сливали надосадочную жидкость и растворяли осадок в 2 мл охлажденного 0,1М CaCl<sub>2</sub> и оставляли на льду на 25 мин.
6. Центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин и 4<sup>0</sup>С.
7. Сливали супернатант и ресуспендировали осадок в 0,2 мл 0,1М CaCl<sub>2</sub>.

Полученные компетентные клетки можно использовать немедленно для трансформации, либо оставить на ночь на льду для повышения способности к трансформации. Хранить компетентные клетки можно в жидком азоте (при -70<sup>0</sup>С).

#### Трансформация.

Трансформацию проводили методом теплового шока.

1. Добавляли 20 нг ДНК к 50 мкл компетентных клеток и оставляли на льду на 10 мин.
2. Тепловой шок – 50 сек при 42<sup>0</sup>С.
3. После теплового шока к компетентным клеткам немедленно добавляли 100 мкл LB-среды, предварительно нагретой до 37<sup>0</sup>С и инкубировали помешивая в течение 1 часа.
4. Переносили трансформированные клетки на чашки Петри с твердой LB-средой (1,5% агара), содержащей ампициллин (50 мг/мл), X-Gal (1 мг/мл) (МБИ-Fermentas, Литва) и IPTG (0,8 мг/мл) (МБИ-Fermentas, Литва).

## 2.10. Отбор колоний, несущих вектор со вставкой.

Бактерии, несущие вектор со вставкой или без нее, будут образовывать колонии на среде, содержащей ампициллин, т.к. вектор pUC19 несет в себе ген устойчивости к ампициллину (схема 3, 4).

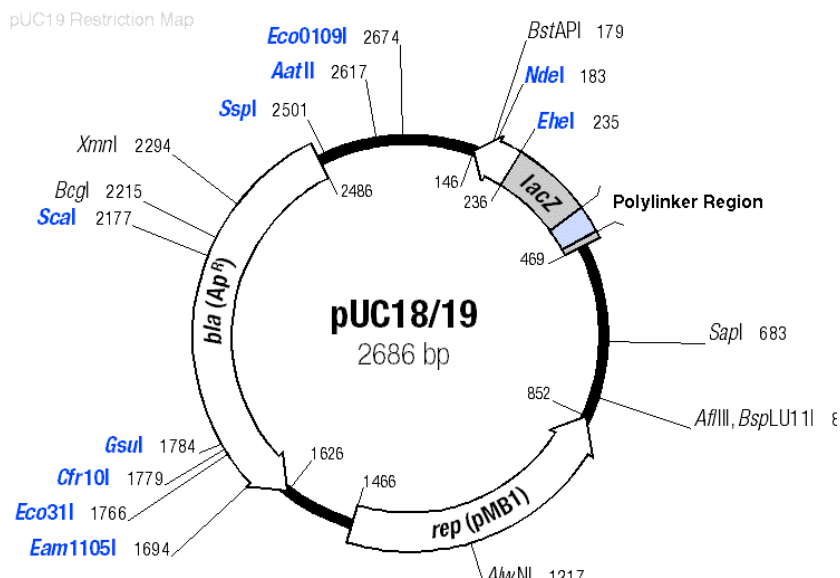


Схема 3. Схематическое изображение плазмиды pUC19.

pUC19 Polylinker Region

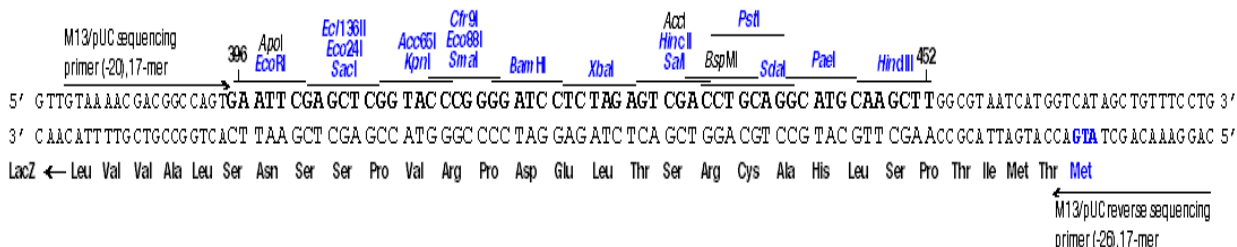


Схема 4. Нуклеотидная последовательность полилинкера плазмиды pUC19 с нанесенными сайтами рестрикции.

Для отбора колоний, несущих вектор со вставкой, применяли белую селекцию. Для этого добавляли на твердую LB-среду смесь, содержащую 4 мкл IPTG и 40 мкл X-Gal. Вектор pUC19 несет в себе часть гена *lacZ* (*lacZα*), другая часть данного гена содержится в бактериальной хромосоме. Продукт этого гена обуславливает голубую окраску колоний, несущих вектор, на среде, содержащей X-Gal и IPTG. Но при лигировании

вставки в вектор, последовательность *lacZα* прерывается, т.к. содержит внутри себя полилинкер (Multiple Cloning Site). Таким образом, клетки, несущие вектор со вставкой, образуют белые, неокрашенные колонии.

Отобранные таким образом колонии пересеивались на отдельные чашки Петри с твердой LB-средой, содержащей ампициллин. А затем проводился их скрининг с помощью ПЦР.

### **2.11. Скрининг отобранных колоний с помощью ПЦР.**

Скрининг полученных колоний на наличие вставки проводили с помощью ПЦР с праймерами на последовательность M13. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик-МЦ2» при следующих условиях: начальная денатурация – 94<sup>0</sup>С в течение 2 минут, затем проводили 35 циклов – 94<sup>0</sup>С - 30 сек, 55<sup>0</sup>С – 30 сек, 72<sup>0</sup>С – 1 минута.

## **3. Результаты и обсуждение.**

Использование метода ПЦР с вырожденными олигонуклеотидными праймерами, созданными на основе домена NBS уже клонированных генов устойчивости, позволило клонировать последовательности аналогов генов устойчивости различных видов растений (Kanazin et al. 1996; Leister et al. 1996; Yu et al. 1996; Aarts et al. 1998; Seah et al. 1998; Speulman et al. 1998; Deng et al. 2000). Сцепление и совместное с известными генами устойчивости расщепление данных последовательностей было подтверждено документально.

Селекция на устойчивость к заболеваниям является приоритетным направлением, а ДНК-маркирование значительно ускоряет селекционный процесс.

В нашей работе мы проводим поиск ДНК-маркеров генов устойчивости к заболеваниям на основе дикого вида подсолнечника *H. argofillus*.

### 3.1. Амплификация с вырожденными праймерами.

Как уже говорилось выше, все гены устойчивости к заболеваниям имеют консервативные нуклеотидные последовательности. Это домены NBS, LRR, LZ, TIR, CC и другие. Основываясь на этом, мы применяли в нашей работе вырожденные олигонуклеотидные праймеры на консервативную последовательность домена NBS.

В качестве матрицы мы использовали тотальную геномную ДНК дикого вида подсолнечника *H. argofillus*. ДНК мы выделяли из семян, так как полученные нами из Вейделевского Института Подсолнечника семена не прорастали.

Для проведения ПЦР на матричной геномной ДНК *H. argofillus* нами были использованы вырожденные олигонуклеотидные праймеры, описанные Z. Deng et al. (2000). Это прямой праймер F11 и три обратных R11, R16 и R18 (описание см. п. 2.4). Праймеры использовались в следующих комбинациях: F11+R11, F11+R16, F11+R18. Полученные продукты ПЦР показаны на рисунке 5.

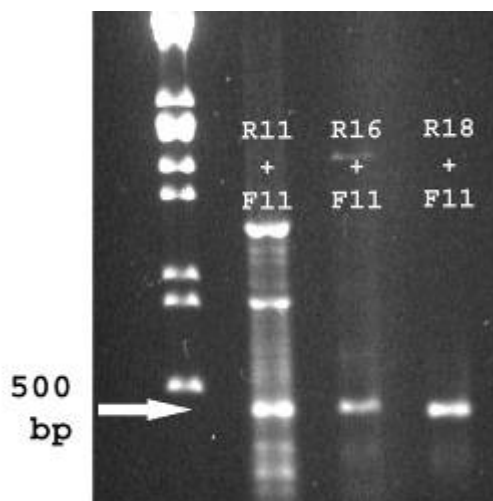


Рис. 5. Продукты ПЦР, разделенные в 1% агарозном геле.

Каждая из пар праймеров дала один главный фрагмент ДНК размером около 500 н.п. Кроме того, пара F11+R11 дала еще несколько фрагментов

размером от 200 до 500 н.п., а также значительно более 500 н.п. Только фрагмент длиной около 500 н.п. является близким по размеру к уже описанным последовательностям генов устойчивости *N*, *L6*, *RPS2* и др. (Z. Deng et al. 2000).

Присутствие после амплификации фрагментов ДНК размером менее 500 н.п. наводит на мысль о наличии гомологичных участков внутри последовательности домена NBS. Так как только в этом случае мог происходить отжиг праймера внутри данной последовательности.

Для оптимизации условий ПЦР мы брали различное количество матричной ДНК. После проведения ПЦР с разным количеством матричной ДНК выяснилось, что увеличение ее количества, по сравнению с исходным, ухудшает амплификацию, и в результате нарабатывается меньшее количество продукта (рис. 6).

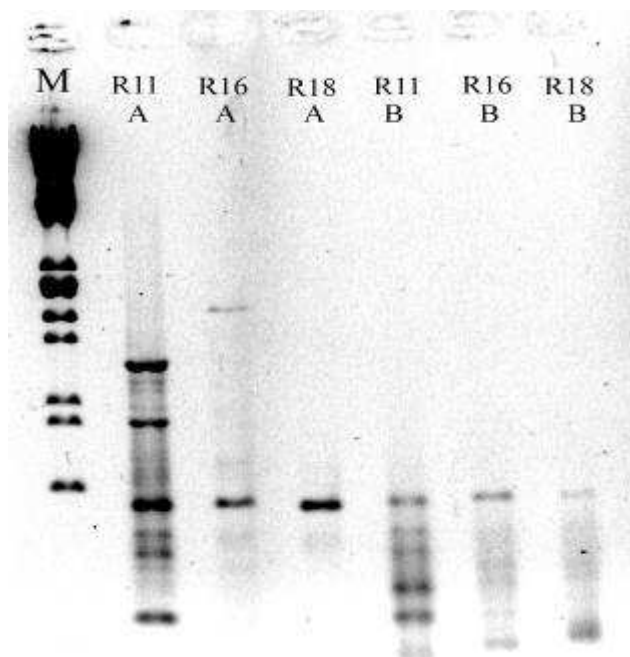


Рис. 6. Результаты ПЦР с разным количеством матричной ДНК.

М – маркер; R11, R16, R18 – обратные праймеры (в качестве прямого праймера использовался F11); А – 0,5 мкл матричной ДНК (концентрация ~100 нг/мкл); В – 1 мкл матричной ДНК.

Таким образом, мы оптимизировали условия ПЦР и получили амплифицированные фрагменты домена NBS.

Аналогичные фрагменты ДНК размером около 500 н.п. были получены на других растениях (Z. Deng et al. 2000).

### 3.2. Реамплификация полученных фрагментов.

Для увеличения количества нужного фрагмента ДНК мы проводили повторную амплификацию (реамплификацию). Для этого фрагмент размером 500 н.п. вырезали из геля и далее использовали его в качестве матрицы при ПЦР (рис. 7).

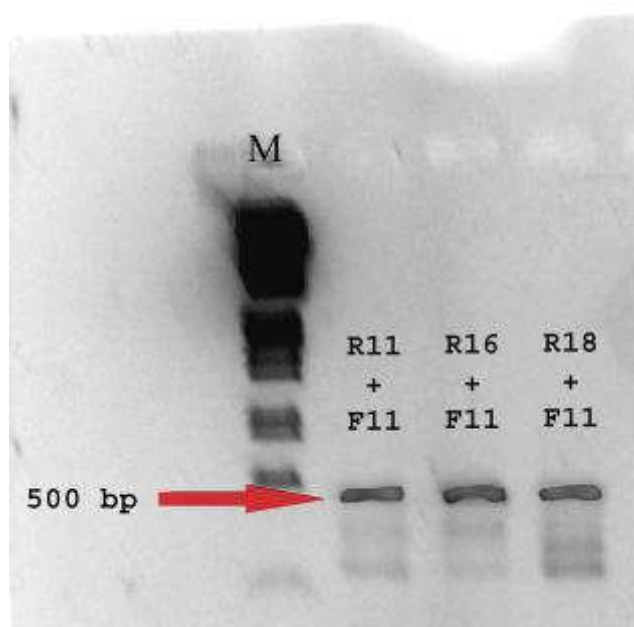


Рис. 7. Продукты ПЦР, разделенные в 1% агарозном геле, после реамплификации.

Таким образом, при реамплификации уже не появлялись фрагменты размером более 500 н.п. и нарабатывалось большее количество нужного фрагмента. Как видно из рисунка 7, при амплификации со всеми тремя комбинациями праймеров появлялись шмеры (большое количество фрагментов ДНК, которые незначительно отличаются друг от друга по размеру). При проведении ПЦР с этими же праймерами на цитрусовых также обнаруживались шмеры (Z. Deng et al. 2000). Это еще раз подтверждает

возможность присутствия гомологичных районов внутри нуклеотидной последовательности домена NBS, а также сходство этих доменов у различных растений.

### 3.3. Лигирование последовательности размером 500 н.п. в вектор.

Для клонирования мы использовали плазмиду pUC19. Данный вектор хорошо зарекомендовал себя для проведения работ по клонированию небольших участков ДНК в *Escherichia coli*.

Кольцевую молекулу вектора pUC19 мы резали рестриктазой HindIII, сайт рестрикции которой находится в полилинкере вектора. Для снижения количества молекул вектора подвергшихся самолигированию мы готовили T-вектор. Для приготовления T-вектора используется вектор, разрезанный рестриктазой, дающей тупые концы. Таq-полимераза способна добавлять один нуклеотид к тупому концу ДНК. Если доступны все четыре нуклеотида, она предпочитает использовать для этого dATP. Но если предоставлен только один d(G,C,T)TP, она использует его, хотя и менее эффективно, чем dATP. Инкубация с Таq-полимеразой и dTTP добавляет 3'-концевую Т. Самолигирование изменяет размер тех молекул вектора, которые по каким-либо причинам не приобрели 5'-концевую Т. Размер молекул с двумя 3'-концевыми Т не изменяется и это позволяет очистить их с помощью препаративного электрофореза.

В полученный T-вектор по сайту рестрикции в полилинкере мы лигировали амплифицированный фрагмент размером 500 н.п. (рис. 8).

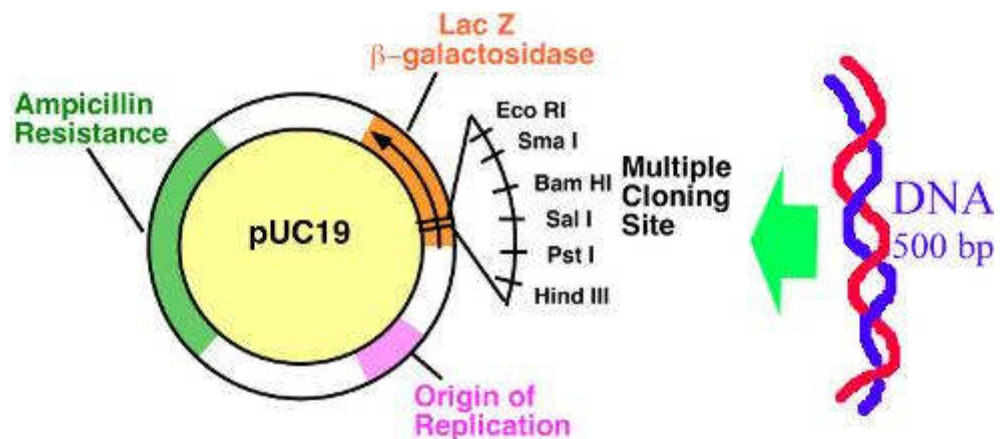


Рис. 8. Схематическое изображение лигирования вставки в вектор.



### 3.4. Селекция клонов, несущих вставку.

В качестве носителя плазмиды мы использовали бактерию *Escherichia coli*, штамм DH10B. Данный штамм пригоден для проведения так называемой бело-голубой селекции, так как бактериальная хромосома несет части гена *lacZ*. Вектор же pUC19 несет в себе ген *lacZα*, в конец которого вшит полилинкер. Вместе, продукты указанных генов в бактериальной хромосоме и векторе ответственны за переработку сахара X-Gal, а индуктором данной реакции является сахарид IPTG. Оба сахара добавлялись в бактериальные среды. Наличие одного полилинкера серьезно не нарушает третичную структуру продукта гена *lacZα* и колонии, получившие вектор, при совместной работе генов бактериальной хромосомы и плазмиды по переработке X-Gal, приобретают голубую окраску. Если же вставка лигировалась в область полилинкера, то третичная структура продукта гена *lacZα* серьезно нарушается, и клетки, несущие плазмиду со вставкой, не способны перерабатывать X-Gal. Колонии, образованные такими клетками, имеют белую окраску.

В своей работе мы использовали бело-голубую селекцию, и результаты показаны на рисунке 9.



Рис. 9. Бело-голубая селекция.

Всего, с помощью бело-голубой селекции, было отобрано 24 клон, которые, предположительно, могли нести вставку.

### 3.5. Скрининг клонов на наличие вставки.

Нуклеотидная последовательность места лигирования вставки в вектор pUC19 синтезирована так, что вставку фланкируют не только сайты рестрикции для рестриктаз, но и небольшая последовательность ДНК фага M13. Таким образом, при проведении ПЦР с праймерами на последовательность ДНК M13, амплифицируется вставка вместе с местами отжига праймеров. На основе ПЦР с этими праймерами мы проводили скрининг клонов на наличие вставки в векторе. Результаты скрининга представлены на рисунке 10.

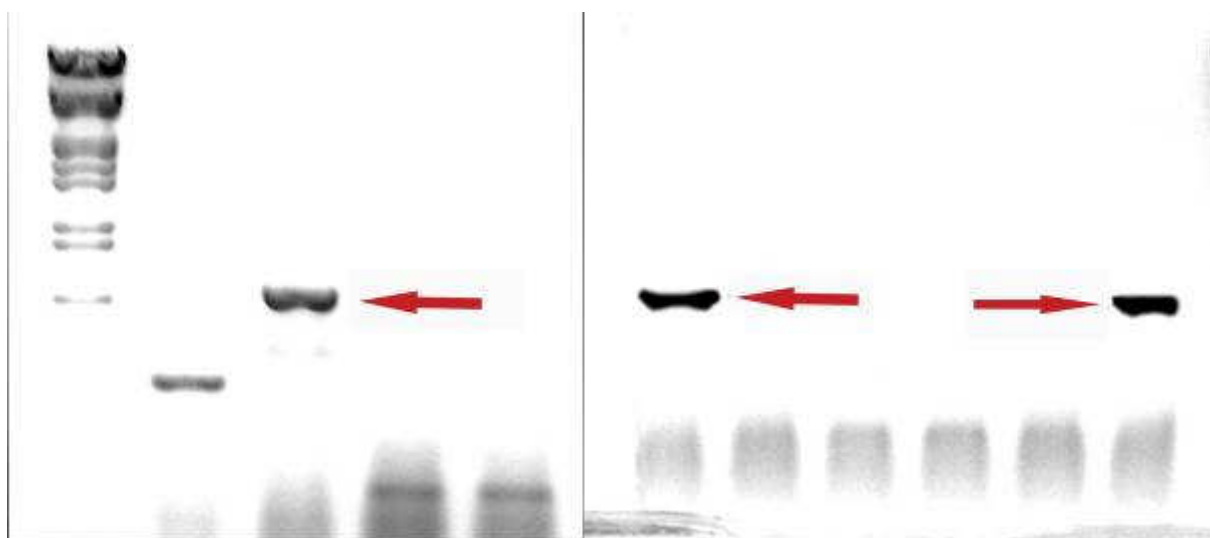


Рис. 10. Скрининг клонов на наличие вставки с помощью ПЦР.

На рисунке 10 стрелкой показана искомая вставочная последовательность размером около 500 н.п. Таким образом, после проведения скрининга, из 24 полученных клонов было отобрано, только 3, так как только эти клоны несли в векторе вставку нужного размера.

Один из полученных клонов, несущий вставку, был просеквенирован (рис. 11). На основе сиквенса был проведен поиск гомологичных последовательностей в базе данных , был просеквенирован (рис. 11). На основе сиквенса был проведен поиск гомологичных последовательностей в базе данных GeneBank и были обнаружены следующие гомологичные последовательности: *NBS2*, *NBS5* (аналоги генов устойчивости культурного подсолнечника); *RLG5*, *c27* (гомологи генов устойчивости сои); *FRGA-A5* (аналог генов устойчивости яблони) и другие гомологичные последовательности.

## R1

```

AGG GCAAGGGGGA GGCCGGAAGC TAAGAAACCA CACGCGATGA
AAGTGTCTCA TAATTCCTCT ACAGGGTTGT CTTGATTATA CGCATGTCTT TTTAGAAGTT
GGTGAGCCTC ATCATCTGAT AAAAAAGTGA CACGGTAGAT ATGATCTACC CTGTGGATTT
GTAGCAAATG TTTATCTCTA GATGTGACTA TTATTCTGCT CCCACTACCA AACCAATTTT
GATTCACAGC TAACGCCTCT AGTTGGTCAA GTTGATCCAC ATCATCCAGA ACTACCAGCA
CTTTCTAAA ACAAAACACA CGTCTCATCA TGTGTTTTCC TTCCGAAACA CTATGTACTC
TCACATCTGT TTTCAATAGA GCTGATATAA TATTCTCTTG TAGTTTATTC AAGCCATACT
TTCTTGTTT TTCTCTAACA TTCTCCACAA CGCAGTGAAC TTCAAAATGT TGAGAGATTT
CCCTATAAAA GGAAGTTGGA AGGGTAGTCT TTCCCACCCC

```

## F1

Рис. 11. Нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента.

### ***4. Правила техники безопасности при работе в химической лаборатории***

В химических, биохимических и других лабораториях проводятся работы, связанные с применением различных химических веществ, которые могут оказывать вредное воздействие на организм человека или обладают огне- и взрывоопасными свойствами. Кроме того, неосторожное обращение с различными электрическими приборами и оборудованием создаёт опасность поражения электрическим током. Поэтому от работников лабораторий требуется серьезное внимание к обеспечению безопасных условий труда.

К работе в лаборатории допускаются лица, прошедшие инструктаж, о чём делается соответствующая запись в книге инструктажа.

Во избежание несчастных случаев при обращении с реактивами необходимо руководствоваться следующими правилами.

1. При разбавлении серной или азотной кислоты надо осторожно приливать по стенкам сосуда кислоту в воду; в противном случае, быстро выделяется тепло и возможны ожоги от разбрызгивания кислоты.

2. Для приготовления растворов щёлочи необходимо предварительно раздробить её на мелкие кусочки, чтобы не разбить посуду крупными кусками. Дробят щёлочь на чистом железном листе в защитных очках, наглухо застёгнутом халате и резиновых перчатках. Кусочки щёлочи берут фарфоровой или металлической ложкой-шпателем, тигельными щипцами, пинцетом. Следует также помнить, что растворение щёлочи в воде сопровождается значительным выделением тепла, при этом раствор сильно нагревается.

3. Работы, связанные с сжиганием анализируемых продуктов, а также с применением ядовитых, огнеопасных или дымящихся реактивов, проводят в вытяжном шкафу. Во время использования вытяжных шкафов их дверцы должны быть закрыты. Для безопасной работы разрешается поднимать дверцы шкафа на высоту 20-30 см.

4. Запрещается при взвешивании насыпать химические вещества непосредственно на чашу весов. Работая в лаборатории, нужно быть аккуратным и не загрязнять лабораторные столы и пол. Запрещается мыть лабораторные столы и пол керосином, бензином, скипидаром, бензолом.

5. Всю посуду после работы с минеральными кислотами, щелочами, ядовитыми веществами нужно сразу же тщательно вымыть.

6. При обращении с химической стеклянной посудой и приборами необходимо соблюдать меры предосторожности. Стеклянную посуду и приборы следует держать осторожно, не сжимая сильно пальцами. При мойке посуды ершами или стеклянной палочкой надо быть очень

осторожным, так как ими легко пробить дно или стенки. Для предотвращения этого на оголённый проволочный конец ерша надевают кусочек резиновой трубки.

7. Химическую посуду и приборы нельзя резко ставить на стол, особенно если он покрыт металлической обшивкой или керамическими плитками. При разрезании стеклянных трубок и палочек руки надо защищать полотенцем.

8. При работе с нагревательными и электрическими приборами также необходимо соблюдать определённые меры предосторожности. Токоведущие части лабораторного оборудования и электроприборов должны иметь хорошую изоляцию. Запрещается воздействовать на кнопки и выключатели, назначение которых неизвестно.

9. Запрещается перегружать электропроводку, розетки, распределительные щиты, рубильники. Запрещается оставлять без надзора действующие муфельные печи, электроплитки. Спиртовую горелку содержать в чистоте, заправлять спиртом вдали от открытых источников огня, не допускать сильного нагревания резервуара, не оставлять зажжённую горелку без надзора.

10. Нагревание в стеклянной посуде надо проводить на асбестовой сетке; нагревание на открытом огне допускается только при пользовании специальной посудой, например колбами Кьельдаля.

11. Подогревая жидкость в пробирке, необходимо её часто встряхивать и держать открытой частью от себя во избежание выброса жидкости на лицо и одежду. Огнеопасные вещества нагревают на водяных или других банях с потушенной горелкой. Электрические, газовые и другие нагревательные приборы не ставят непосредственно на доску стола, под них подкладывают асбест толщиной 8-10 мм, либо ставят их на подставку из шамотных кирпичей, покрытых листом асбеста. Горячую посуду нельзя брать голыми незащищёнными руками.

12. Запас спирта и других летучих жидкостей в лаборатории должен быть небольшим, необходимым для текущей повседневной работы. Хранить его надо в изолированном отделении шкафа, удалённом от источников огня и снабжённом плотно закрывающейся дверцей, покрытой войлоком или асбестом и обитой поверху кровельным железом.

13. При возникновении пожара огонь тушат водой, песком или огнетушителем. В случае воспламенения нефтяных продуктов хорошими средствами тушения являются песок и войлок; вода в данном случае будет способствовать распространению огня.

14. В лаборатории в легко доступном месте должны быть нейтрализующие вещества (2, 3 и 5%-ные растворы гидрокарбоната натрия и 3 и 5%-ные растворы уксусной кислоты) и аптечки с необходимыми медикаментами и перевязочными средствами. Работники лаборатории должны уметь оказывать первую помощь при порезах, ожогах и отравлениях. Лаборатория должна быть оснащена необходимыми противопожарными средствами (огнетушителями, песок, войлок, листовой асбест).

15. После окончания работы необходимо тщательно вымыть руки и выключить электроприборы.

## Список литературы

1. Вавилов П.П., Гриценко В.В., Кузнецов В.С. и др.; под ред. Вавилова П.П. «Растениеводство». М.: Агропромиздат, 1986. 512 стр.
2. Коновалов Ю.Б., Долгодворова, Л.И., Степанова Л.В. и др.; под ред. Коновалова Ю.Б. «Частная селекция полевых культур». М.: Агропромиздат, 1990. 543 стр.
3. Пересыпкин В.Ф. «Сельскохозяйственная фитопатология» - 4-е изд. М.: Агропромиздат, 1989. 480 стр.
4. Якуткин В.И. «Идентификация возбудителя фомопсиса подсолнечника и методы его учета (методические указания)». Л.: ВИЗР, 1991. 23 стр.
5. Aarts M.G., te Lintel Hekkert B., Holub E.B., Beynon J.L., Stiekema W.J., Pereira A. "Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*". Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 251-258, 1998.
6. Braun C.J. Siedow J.N. Williams M.E. Levings C.S.D. "Mutations in the maize mitochondrial *T-urf13* gene eliminate sensitivity to a fungal pathotoxin". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4435-4439, 1989.
7. Bent A.F. "Plant disease resistance genes – function meets structure". Plant Cell 8: 1757-1771, 1996.
8. Bert P.-F., Jouan I., Tourvieille de Labrouhe D., Serre F., Nicolas P., Vear F. "Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*". Theor. Appl. Genet., 2002 105:985-993.
9. Bouzidi M.F., Badaoui S., Cambon F., Vear F., Tourvielle De Labrouhe D., Nicolas P., Mouzeyar S. "Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers". Theor Appl Genet 104: 592-600, 2002.
10. Brahm L., Rocher T., Friedt W. "PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew". Crop Sci. 40: 676-682, 2000.
11. Bryan C.T., Jia Y., Farral K.S., Hershey H.P., McAdams S.A., Faulk K.N., Donaldson G.K., Tarchini R., Valent B. "Molecular characterization of resistance gene/avirulence gene interactions in the rice blast system". 9<sup>th</sup> International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Amsterdam. In: Wit PJGM, Bisseling T. and Stiekema W.J. (eds) Biology of Plant-Microbe Interactions, Vol. 2 (pp 35-39) De 0-9654625-1-X, 1999.
12. Brosch G., Ransom R., Lechner T., Walton J.D., Loidl P. "Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*". Plant Cell 7: 1941-1950, 1995.
13. Brotman Y., Silberstein L., Kovalski I., Perin C., Dogimont C., Pitrat M., Klingler J., Thompson G.A., Perl-Treves R. "Resistance gene homologues

- in melon are linked to genetic loci conferring disease pest resistance". *Theor Appl Genet* 104: 1055-1063, 2002.
14. Buschges R., Hollricher K., Panstruga R., Simons G., Wolter M., Frijters A., van Daelen R., van der Lee T., Diergaarde P., Groenendijk J., Topsch S., Vos P., Salamini F, Schulze-Lefert P. "The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance". *Cell* 88: 695-705, 1997.
  15. Deng Z., Huang S., Ling P., Chen C., Yu C., Weber C.A., Moore G.A., Gmitter Jr. F.G. "Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidates sequences in citrus". *Theor Appl Genet* 101: 814-822, 2000.
  16. Dixon M.S., Jones D.A., Keddie J.S., Thomas C.M., Harrison K., Jones J.D.G. "The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins". *Cell*, vol. 84, pp. 451-459, 1996.
  17. Donald T.M., Pellerone F., Adam-Blondon A.-F., Bouquet A., Thomas M.R., Dry I.B. "Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine". *Theor Appl Genet* 104: 610-618, 2002.
  18. Ellis J., Lawrence G., Ayliffe M., Anderson P., Collins N., Finnegan J., Frost D., Luck J., Pryor T. "Advances in the molecular genetic analysis of the flax-rust interactions". *Annu Rev Phytopathol* 35: 271-291, 1997.
  19. Feys B.J., Parker J.E. "Interplay of a signaling pathways in plant disease resistance". *TIG*, Vol. 16, No. 10, October 2000.
  20. Fields S. and Song O. "A novel genetic system to detect protein-protein interactions". *Nature* 340: 245-246, 1989.
  21. Fluhr Robert "Sentinels of Disease. Plant Resistance Genes". *Plant Physiology*, December 2001, vol. 127, pp. 1367-1374.
  22. Groom Q.J., Torres M.A. Fordham-Skelton A.P., Hammond-Kosack K.E., Robinson N.J., Jones J.D.G. "*rbohA*, a rice homologue of the mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene". *Plant J* 10: 515-522, 1996.
  23. Hayes A.J., Yue Y.G., Saghai Maroof M.A. "Expression of two soybean resistance gene candidates shows divergence of paralogous single-copy genes". *Theor Appl Genet* 101: 789-795, 2000.
  24. Johal G.S. and Briggs S.P. "Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize". *Science* 258: 985-987, 1992.
  25. Kanazin V., Marek L.F., Shoemaker R.C. "Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11746-11750, 1996.
  26. Kataoka T., Broek D., Wigler M. "DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase". *Cell* 43: 493-505, 1985.
  27. Knogge W. "Fungal infection of plants". *Plant Cell* 8: 1711-1722, 1996.
  28. Kobe B., Deisenhofer J. "The leucine-rich repeat: a versatile binding motif". *Trends Biochem. Sci.* 19: 415-421, 1994.
  29. Kumar S., Colussi P.A. "Prodomains-adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis". *Trends Biochem Sci* 24: 1-4, 1999.



30. Lawson W.R., Goulter K.C., Henry R.J., Kong G.A., Kochman J.K. "Marker-assisted selection for two rust resistance genes in sunflower". *Molecular Breeding* 4: 227-234, 1998.
31. Leister D., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. "A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants". *Nature Genet* 14: 421-429, 1996.
32. Leister D., Kurth J., Laurie D.A., Yano M., Sasaki T., Devos K., Garner A., Schulze-Lefert P. "Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 95, pp. 370-375, January, 1998.
33. Luderer R., Takken Frank L.W., Pierre J.G.M. de Wit, Joosten H.A.M., "Cladosporium fulvum overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins". *Molecular Biology* 45(3): 875-884, 2002.
34. Osbourn A.E. "Performed antimicrobial compounds and plants defense against fungal attack". *Plant Cell* 8: 1821-1831, 1996.
35. Penuela S., Danesh D., Yuong N.D. "Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of nonTIR NBS-LRR genes in soybean". *Theor Appl Genet* 104: 261-272, 2002.
36. Pierre de Wit J.G.M., Lauge R., Honee G., Joosten M.H.A.J., Vossen P., Kooman-Gersmann M., Vogelsang R., Vervoort J.J.M. "Molecular and biochemical basis of the interactions between tomato and its fungal pathogen *Cladosporium fulvum*". *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 137-141, 1997.
37. Richter T.E., Ronald P.C. "The evolution of disease resistance genes". *Plant Molecular Biology* 42: 195-204, 2000.
38. Rodriguez M.A., Venedikian N., Godeas A. "Fungal populations on sunflower (*Helianthus annuus*) anthosphere their relation to susceptibility or tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* attack". *Mycopathologia* 150: 143-150, 2000.
39. Seah S., Sivasithamparam K., Karakousis A., Lagudah E.S. "Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley". *Theor Appl Genet* 97: 937-945, 1998.
40. Speulman E., Bouchez D., Holub E.B., Beynon J.L. "Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*". *Plant J* 14: 467-474, 1998.
41. Takken L.W. Frank and Joosten H.A.J. Matthieu "Plant resistance genes: their structure, function and evolution". *European Journal of Plant Pathology* 106: 699-713, 2000.
42. Tanhuanpaa P., Vilkki J. "Tagging of a locus for resistance to *Albugo Candida* in *Brassica rapa* spp. *oleifera*". *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 1999.*
43. Van der Biezen E.A. and Jones J.D.G. "Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept". *Trends Biochem Sci* 23: 454-456, 1999.
44. Viguie A., Vear F., Tourvieille de Labruohe D. "Interactions between French isolates of *Phomopsis/Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. et al. and

- sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes”. European Journal of Plant Pathology 105: 693-702, 1999.
45. Viguie A., Vear F., Tourvieille de Labruohe D. “Inheritance of several sources of resistance to Phomopsis stem canker (*Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.)”. Euphytica 116: 167-179, 2000.
  46. Wolter M., Hollricher K., Salamini F., Schulze-Lefert P. “The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defense mimic phenotype”. Mol. Gen. Genet. 239: 122-128, 1993.
  47. Yu Y.G., Buss G.R., Saghai-Marooif M.A. “Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 11751-11756, October 1996.
  48. Zhu Q., Droge-Laser W., Dixon R.A., Lamb C. “Transcriptional activation of plant defense genes”. Curr. Opin. Gen. Dev. 6: 624-630, 1996.