

Agrovoc descriptors: plants, disease resistance, defence mechanisms, genes, gene expression, viruses, bacteria, nematoda, fungi

Agris category codes: H20, F30, F60

COBISS koda: 1.02

Geni za odpornost proti škodljivim organizmom pri rastlinah

Petra KOZJAK¹, Branka JAVORNIK²

Prispelo 15. septembra 2007; sprejeto 15. novembra 2007.

Received Sept. 15, 2007; accepted Nov. 15, 2007.

IZVLEČEK

Pri rastlinah so znani različni mehanizmi obrambe proti škodljivim organizmom, med katerimi so nekateri pogojeni z izražanjem genov za odpornost proti škodljivim organizmom, ki jih krajše imenujemo *R* geni. *R* geni kodirajo proteine (*R* proteine) za odpornost proti virusom, bakterijam, ogorčicam in glivam. Večina kloniranih *R* genov kodira proteine, ki spadajo v NBS-LRR razred, za katere je značilna domena za vezavo nukleotidov (NBS domena) in domena bogata z levcini (LRR domena). Za delovanje *R* proteinov so postavljeni modeli receptor-ligand interakcij, ki predvidevajo, da produkti *R* genov delujejo kot receptorji za posredno ali neposredno prepoznavanje patogena. Večina *R* genov in *R* genom podobnih sekvenc je izoliranih z insercijsko mutagenozo, pozicijskim kloniranjem in z verižno reakcijo s polimerazo.

Ključne besede: geni za odpornost, NBS-LRR geni, odpornost pri rastlinah

ABSTRACT

PLANT DISEASE RESISTANCE GENES

Plants defend themselves against pathogens using different mechanisms, some of which rely on the expression of disease resistance genes (*R* genes). *R* genes encode proteins (*R* proteins) that provide resistance to a wide spectrum of pathogens including viruses, bacteria, nematodes and fungi. Most of the isolated *R* genes code for the protein of NBS-LRR class with characteristic nucleotide binding domain (NBS domain) and leucine-rich domain (LRR domain). Models of defence mechanism initiated by *R* gene products are proposed, based either on direct or indirect interaction of the plant *R* protein with the product of avirulence pathogen gene. Most of the *R* gene and *R* gene-like sequences are isolated by insertional mutagenesis, map-based cloning and amplification by polymerase chain reaction (PCR).

Key words: disease resistance genes, NBS-LRR genes, plant disease resistance

¹ dr. genetike, Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, Slovenija, petra.kozjak@kis.si

² Prof.dr. znanosti, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

1 UVOD

Eden od pomembnejših ciljev žlahtniteljskih programov v kmetijstvu je uspešna kontrola bolezni. Namen žlahtnjenja je poiskati ali razviti take kultivarje za katere je značilen kakovosten in stabilen pridelek z ustreznimi lastnostmi za predelovalno industrijo ter z odpornostjo proti boleznim in škodljivcem. Večino bolezni nadzorujemo z uporabo kemičnih preparatov, s čimer se povečajo stroški pridelave in s tem posledično zmanjša konkurenčnost na trgu, poveča pa se tudi obremenitev okolja, kar ogroža ekološko upravičenost pridelave. Velik problem predstavljajo karantenski škodljivci, proti katerim ni učinkovitih kemičnih sredstev, dodaten problem pa predstavlja sočasen razvoj odpornosti škodljivih organizmov na aplicirane kemične preparate. Rastline so v preteklosti požlahtnili s križanjem, kot alternativna metoda klasičnemu križanju pa se v zadnjem času pojavlja prenos genov s transformacijami. Glavna prednost te metode je vključitev gena/genov za zelene lastnosti brez spreminjanja lastnosti obstoječega kultivarja. Druga, zelo pomembna prednost je, da lahko gen izhaja iz druge rastlinske vrste ali rodu s podobnih mehanizmom odpornosti.

2 ODPORNOST PROTI ŠKODLJIVIM ORGANIZMOM

Rastline napadajo številni škodljivi organizmi, vendar se bolezensko stanje razmeroma redko pojavi. V večini primerov rastlina škodljivemu organizmu ne nudi ustreznih življenjskih razmer za razmnoževanje in razvoj, ker ne zagotavlja esencialnih hranil, ima strukturne bariere in proizvaja toksične komponente ali pa ima razvite obrambne mehanizme s katerimi omeji napad patogenov.

Odpornost pri rastlinah lahko v grobem delimo na dve vrsti, na nespecifično (bazalno) in specifično odpornost, čeprav bi bilo verjetno bolj ustrezno govoriti o odpornosti proti širokemu ali ozkemu spektru škodljivih organizmov. Nespecifična odpornost je takrat, ko je rastlinska vrsta odporna na vse izolate ali rase enega patogena in jo imenujemo negostiteljska rastlina. Pri tej vrsti se odpornost sproži z nespecifičnim stimulansom biotskega izvora. Genetski ustroj nespecifične odpornosti je zapleten in vključuje veliko število genov, ki kodirajo proteine s številnimi funkcijami, tako pri rastlini kot patogenu. Nekateri izmed genov, ki so vključeni v bazalno odpornost se izražajo konstitutivno.

Z razliko od nespecifične odpornosti temelji specifična odpornost na izražanju enega ali nekaj genov. Pri odpornosti, ki temelji na prepoznavanju škodljivega organizma z receptorjem rastline, se na mestu infekcije sprožijo celični in sistemski signalni procesi, ki aktivirajo multikomponentne odgovore na lokalnem in sistemskem nivoju. Gen pri škodljivem organizmu, katerega produkt sproži obrambne mehanizme pri rastlini imenujemo avirulenten gen, v nadaljevanju *Avr* gen. Gen pri rastlini, ki kodira protein za detekcijo *Avr* genskega produkta imenujemo gen za odpornost proti škodljivim organizmom, v nadaljevanju *R* gen. *Avr* gen kodira signalno molekulo, ki služi kot ligand za vezavo na receptor, ki ga kodira *R* gen. Odkritje specifičnosti delovanja med produkti *R* in *Avr* genov je bil

povod za nastanek termina gen-za-gen odpornosti, ki ga je predlagal Harold Flor v 50-ih letih prejšnjega stoletja (Flor, 1955).

Prvi proces izražanja (specifične) odpornosti je zaznavanje zunajceličnih signalov in njihov prenos skozi plazma membrano. Zgodnje reakcije rastlinskih celic na prisotnost škodljivih organizmov so spremembe v permeabilnosti plazemske membrane, kar vodi do vnosa protonov in kalcija ter izgubo kalija in kloridov. Spremembe v koncentraciji ionov sprožijo ekstracelularno sintezo reaktivnih kisikovih spojin kot sta superoksid in vodikov peroksid (McDowell in Dangl, 2000), sintezo dušikovega monoksida, odpiranje ionskih kanalov v plazma membrani, preoblikovanje citoskeleta in indukcijo fosforilacijskih/defosforilacijskih kaskad, kar je glavni sistem za aktivacijo *R* genov. Produkti teh genov posredno ali neposredno prepoznajo produkte *Avr* genov.

Lokalna produkcija reaktivnih kisikovih intermediatov inducira hipersenzitivni odgovor in ekspresijo *R* genov (Piffanelli in sod., 1999). Inducirana odpornost je sprva omejena na nekrotično mesto kar imenujemo lokalna odpornost. S terminom hipersenzitivni odgovor označujemo programirano celično smrt. Nanaša se na lokalizirano, samo-inducirano celično smrt na mestu infekcije in je rezultat izražanja obrambnih mehanizmov, ki se sprožijo s prepoznavanjem specifičnih signalnih molekul škodljivega organizma (Agrios, 1997). Po prepoznavanju škodljivega organizma se aktivirajo celični signali za odpornost, ki sprožijo aktivacijo genov in sintezo proteinov, produkcijo inhibitornih substanc in mobilizacijo antimikrobnih produktov na mesto napada. Sinteza nekaterih alarmnih substanc in poti signalne transdukcije potekajo le intracelularno, v večini primerov pa se signal prenaša na sosednje celice in pogosto sistemsko po celi rastlini. Posledično se izražanje odpornosti širi na oddaljena, neokužena mesta po rastlini, kar imenujemo sistemsko odpornost. Lokalna odpornost se razvije hitro v primerjavi s sistemsko, ki se razvija počasneje. Sistemsko odpornost se razvije, ko so bile rastlinske celice že predhodno okužene in omogoča trajnejšo zaščito pred infekcijo s širokim spektrom škodljivih organizmov.

3 GENI ZA ODPORNOST PRI RASTLINAH

Prvi rastlinski *R* gen je bil izoliran leta 1992 iz koruze (*Hm1*) za odpornost proti glivi *Cochliobolus carbonum* sev 1 z metodo sprožanja genskih mutacij s transpozoni (Johal in Briggs, 1992). Kodira od NADPH odvisno reduktazo, ki inaktivira toksin pri glivi. V tem primeru odpornost ne temelji na zaznavanju produkta *Avr* gena, zato ne spada v model gen-za-gen interakcije.

Prvi primer *R* gena, katerega produkt spada v model gen-za-gen interakcije je gen *Pto*, izoliran iz paradižnika. Gen kodira protein serin-treonin kinazo, ki pogojuje odpornost proti bakteriji *Pseudomonas syringae* (Martin in sod., 1993). Po letu 1993 je bila izolirana skupina *R* genov, ki kodirajo proteine z domenami, ki so bogate z levcini – LRR domenami. To je bilo prvo odkritje, da *R* geni, izolirani iz različnih rastlinskih vrst, ki pogojujejo odpornost proti bakterijam, virusom in glivam, kodirajo strukturno podobne proteine.

Med najbolj reprezentativne sodijo naslednji *R* geni:

- gen *RPS2* navadnega repnjakovca *Arabidopsis thaliana*, ki pogojuje odpornost proti sevu bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *paradižnik* in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, ki imajo avirulenten gen *avrRpt2* (Bent in sod., 1994),
- gen *N* tobaka *Nicotiana tabacum*, ki pogojuje odpornost proti tobačnemu mozaičnemu virusu TMV (Whitham in sod., 1994),
- gen *Cf9* paradižnika *Lycopersicon esculentum* za odpornost proti različnim rasam glive *Cladosporium fulvum*, ki so nosilci avirulentnega gena *avr9* (Jones in sod., 1994) ter
- gen *L6* lana *Linum lewisii* za odpornost proti določenim rasam glive *Melampsora lini*, ki imajo avirulenten gen *avr6* (Lawrence in sod., 1995).

Nekateri drugi *R* geni za odpornost proti virusom, ogorčicam, bakterijam, glivam in žuželkam so podani v preglednici 1.

4 STRUKTURNE DOMENE PROTEINOV ZA ODPORNOST PROTI ŠKODLJIVIM ORGANIZMOM (R PROTEINOV)

Za večino *R* proteinov so značilne ohranjene strukturne domene. V grobem delimo *R* proteine na rasno specifične in rasno ne-specifične. Glede na strukturne motive rasno specifičnih *R* proteinov, ki jih kodirajo *R* geni, *R* gene razdelimo v pet razredov (Hammond-Kosack in Parker, 2003). V prvi razred uvrščamo *R* gene, ki kodirajo serin/treonin kinaze. V ta razred sodi gen *Pto* paradižnika za odpornost proti bakteriji *Pseudomonas syringae*. Serin/treonin kinaze sodelujejo pri signalni transdukciji s spremembo fosforilacijskega stanja proteinov, kar je eden glavnih mehanizmov kontrole aktivnosti proteinov. Za ostale štiri razrede *R* genov je značilno, da kodirajo domene bogate z levcini (LRR domene), razrede pa med seboj ločimo glede na to, kje se LRR domene nahajajo. Za drugi in tretji razred *R* proteinov je značilna ekstracelularna LRR domena, za četrti in peti pa intracelularna. V drugi razred spadajo *R* geni, ki kodirajo transmembranske receptorje z ekstracelularno LRR domeno (*Cf* genska družina pri paradižniku), za tretji razred *R* genov pa je značilno, da kodirajo ekstracelularno LRR domeno povezano z kinazno domeno (gen *Xa21* pri rižu), in jih krajše imenujemo LLR-RK geni. Slednji zajemajo največjo poddružino kinaz, ki so podobne transmembranskim receptorjem pri rastlinah. LRR-RK regulirajo številne razvojne in obrambne procese.

Za *R* gene, ki spadajo v četrti in peti razred je značilno, da kodirajo intracelularne proteine z NBS in LRR domeno in jih imenujemo NBS-LRR geni. Geni, ki kodirajo NBS-LRR proteine zajemajo največje število kloniranih rastlinskih *R* genov. Aminokislinski motivi kažejo na to, da so vključeni v začetek signalne poti. Do zdaj je edina njihova znana vloga pri odpornosti proti škodljivim organizmom. Na podlagi genomskih sekvenc vsebuje navadni repnjakovec 150 NBS-LRR genov (Meyers in sod., 2003). Za četrti razred je na N-terminalnem koncu proteina značilna struktura obvite vijačnice (CC struktura), za peti razred pa struktura, ki je podobna regiji receptorjem Toll in interleukin-1 pri sesalcih in vinski mušici (struktura TIR) (Martin, 1999).

Preglednica 1: Klonirani rastlinski geni za odpornost proti škodljivim organizmom
Table 1: Cloned disease resistance genes

Rastlina	R gen	Škodljivi organizem	Vrsta škodljivega organizma
Paprika <i>Capsicum annuum</i>	<i>Bs2</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	bakterija
Paradižnik <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	gliva
Solata <i>Lactuca sativa</i>	<i>Dm3</i>	<i>Bremia lactucae</i>	gliva
Krompir <i>Solanum tuberosum</i>	<i>Gpa2</i>	<i>Globodera pallida</i>	ogorčice
Koruza <i>Zea mays</i>	<i>Hml1</i>	<i>Cochliobolus carbonum</i>	gliva
Paradižnik <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>I2C-1</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	gliva
Lan <i>Linum usitatissimum</i>	<i>L6</i>	<i>Melampsora lini</i>	gliva
Paradižnik <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Mi</i>	<i>Meloidogyne</i> spp., krompirjeva uš <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , tobakov ščitkar <i>Bemisia tabaci</i>	ogorčice in žuželke
Ječmen <i>Hordeum vulgare</i>	<i>Mla</i>	<i>Blumeria graminis</i>	gliva
Tobak <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>N</i>	Tobačni mozaični virus	virus
Paradižnik <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Pto</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. paradižnik	bakterija
Koruza <i>Zea mays</i>	<i>Rp1-D</i>	<i>Puccinia sorghi</i>	gliva
Navadni repnjakovec <i>A. thaliana</i>	<i>RPM1</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola	bakterija
Navadni repnjakovec <i>A. thaliana</i>	<i>RPP1</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	gliva
Navadni repnjakovec <i>A. thaliana</i>	<i>RPP5</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	gliva
Navadni repnjakovec <i>A. thaliana</i>	<i>RPS2</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. paradižnik	bakterija
Navadni repnjakovec <i>A. thaliana</i>	<i>RPS4</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. paradižnik	bakterija
Navadni repnjakovec <i>A. thaliana</i>	<i>RPS5</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. paradižnik	bakterija
Krompir <i>Solanum tuberosum</i>	<i>Rx</i>	Virus krompirja X	virus
Riž <i>Oryza sativa</i>	<i>Xa1</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	bakterija

Poleg *R* genov, ki spadajo v opisane razrede poznamo *R* gene, ki kodirajo proteine s specifičnimi strukturnimi domenami. Sem sodita gena *Ve1* in *Ve2*, izolirana iz paradižnika, ki pogojujeta odpornost proti glivi *Verticillium albo-atrum*. Od ostalih *R* genov se razlikujeta v tem, da kodirata domeno za endocitozni signal in sta edina znana primera takih receptorjev pri rastlinah (Kawchuk in sod., 2001).

Večina izoliranih *R* genov se deduje dominantno, manj pa je znanega o recesivni odpornosti. Med recesivne gene sodijo gen *Mlo* ječmena, ki deluje rasno nespecifično proti glivi *Erysiphe graminis* (Buschges in sod., 1997), gen *RRS-1* navadnega repnjakovca za odpornost proti različnim sevom bakterije *Ralstonia solanacearum* (Deslandes in sod., 2002) in gen *Xa5* riža za odpornost proti bakteriji *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Iyer in McCouch, 2004).

5 NBS-LRR GENI ZA ODPORNOST PROTI ŠKODLJIVIM ORGANIZMOM

5.1 Struktura NBS-LRR proteinov

NBS-LRR proteini so sestavljeni iz NBS domene na N-terminalnem koncu ter LRR domene na C-terminalnem koncu aminokislinskega zaporedja. LRR domena označuje aminokislinsko zaporedje bogato z levcini ali drugimi hidrofobnimi aminokislinami, ki so v intervalih, imajo pa lahko tudi pravilno razporejeni aminokislinski prolin in asparagin (Bent in sod., 1996). LRR domeno sestavljajo ponovljivi motivi od 20 do 29 aminokislinskih, ki tvorijo strukturo plošče β . LRR domena je zelo variabilna tako po sestavi kot dolžini ponovitev osnovnega motiva in je sestavni del citoplazemskih, membranskih in ekstracelularnih proteinov. Tandemske ponovitve osnovnega motiva imajo številne funkcije kot je vezava proteinov, ligandov, ogljikovih hidratov,... Analize funkcionalnosti LRR domen pri kvasovki, vinski mušici in človeku so pokazale, da sodelujejo pri proteinskih interakcijah med encimi in inhibitorji in med intracelularnimi komponentami signalne transdukcijske kaskade ter pri vezavi peptidnih hormonov na transmembranske receptorje (Kobe in Deisenhofer, 1994). Pri *R* genih so LRR domene pomembne predvsem za vezavo ligandov in prepoznavanje signalnih molekul škodljivih organizmov.

Druga značilnost NBS-LRR proteinov je ohranjena NBS domena, za katero je značilna homologija z evkariotskimi regulatorji celične smrti, kot sta CED-4 in Apaf-1. NBS domene so značilne za različne proteine, ki imajo sposobnost vezave ATP ali GTP molekul kot so: β podenote ATP sintaz, Ras proteini, ribosomski elongacijski faktorji in adenilat ciklaze. Ohranjenost NBS domene pri nekaterih produktih *R* genov podpira hipotezo, da je vezava trifosfatov ključnega pomena za delovanje teh proteinov (Bent, 1996).

Glede na N-terminalni konec zaporedja NBS-LRR proteinov, jih delimo v dva manjša razreda. Za prvi razred, ki ga označimo s TIR-NBS-LRR, je značilna homologija aminokislinskega zaporedja z receptorji Toll pri vinski mušici in receptorji interlevkin-1 pri sesalcih. Za receptorje Toll in interlevkin-1 ter sorodne

proteine je znano, da so vključeni v nespecifično izražanje odpornosti pri živalih. Glede na analogijo z živalskimi proteini naj bi bili rastlinski proteini s TIR regijo vključeni v signalno transdukcijo (Ellis in Jones, 1998). Novejše raziskave pa kažejo, da so TIR proteini vključeni tudi v prepoznavanje ligandov patogenov. Pri analizi aminokislinskih zaporedij 13 alelov *L* gena pri lanu so Ellis in sod. (1999) ugotovili, da je prepoznavanje različnih ligandov določeno z aminokislinskim zaporedjem znotraj TIR regije. Za drugi razred, ki ga označimo s CC-NBS-LRR je značilna struktura obvite vijačnice. Za strukturo obvite vijačnice so značilne ponovitve sedmih aminokislinskih ostankov. Njihova vloga je znana tudi pri homo- in hetero-dimerizaciji evkariotskih transkripcijskih faktorjev (Bent, 1996). TIR-NBS-LRR proteine krajše imenujemo TNL, CC-NBS-LRR proteine pa CNL. Pri navadnem repnjakovcu so *R* geni ali *R* genom podobne sekvence, ki spadajo v TNL razred, zastopane z okoli 60 % NBS-LRR genov, CNL pa zajemajo preostalih 40 %.

TNL in CNL razred *R* genov se razlikujeta tudi po aminokislinskih motivih znotraj NBS domene. Strukturne razlike med TNL in CNL proteini imajo tudi funkcionalen pomen. Pri navadnem repnjakovcu so z mutacijo dveh genov (*EDS1* in *NDR1*) opazili zmanjšano odpornost proti škodljivim organizmom, ki jo pogojujejo produkti genov *RPP5*, *RPS2* in *RPM1* (Parker in sod., 1996; Century in sod., 1997). Z analizami so Aarts in sod. (1998) dokazali, da TNL genski produkti, med katere spada protein *RPP5*, delujejo po *EDS1* odvisni poti, medtem ko CNL genski produkti, vključujoč proteine *RPS2* in *RPM1* delujejo odvisno od *NDR1* signalne poti. Amino terminalni TIR ali CC regiji imata najverjetneje odločilno vlogo pri razcepu signalnih poti (Aarts in sod., 1998).

5.2 Filogenetske analize NBS-LRR sekvenc

Filogenetske analize NBS-LRR sekvenc podpirajo razlikovanje na TNL in CNL razred proteinov. TNL sekvenc ni znanih pri družini *Poaceae* in so najverjetneje odsotne pri travah. Geni, ki kodirajo TIR motive so sicer prisotni v genomu riža, vendar niso prisotni pri NBS-LRR genih (Bai in sod., 2002).

CNL sekvence so prisotne pri vseh proučevanih vrstah znotraj razreda kritosemenk (*Angiospermae*). Filogenetske analize potrjujejo hipotezo o tem, da je prednik eno- in dvokaličnic imel številne CNL sekvence, ki se od takrat razvijajo. Razdelitev CNL sekvenc v podskupine značilne za eno in dvokaličnice pa kažejo na nedavno diverzifikacijo znotraj vrst in sorodnih rodov (Meyers in sod., 1999; Pan in sod., 2000a). Znotraj dreves sekvenc TNL in CNL razreda je vsaj en *R* gen, kar kaže na to, da je večina NBS sekvenc podobnih znanim *R* genom in je verjetno, da kodirajo funkcionalne *R* proteine. To je pomembno predvsem zato, ker je večina NBS-LRR sekvenc izoliranih z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in ker ni znanih neposrednih povezav z odpornimi fenotipi.

Znotraj filogenetskega drevesa NBS-LRR sekvenc paradižnika se uvrščajo sekvence različnih vrst iz družine *Solanaceae* (jajčevca, krompirja, paprike,...), iz česar Pan in sod. (2000b) domnevajo, da te NBS-LRR sekvence izhajajo iz skupnega prednika, ki je obstajal pred specializacijo znotraj družine *Solanaceae*.

Nekatere sekvence NBS-LRR paradižnika so bolj sorodne sekvencam krompirja kot drugim paradižnikovim sekvencam in predstavljajo potencialne ortologe oziroma sekvence skupnega prednika. Z vključitvijo 12 NBS-LRR sekvenc navadnega repnjakovca v to drevo, se te sekvence nahajajo popolnoma ločeno. Iz tega Pan in sod. (2000b) zaključujejo, da se je glavni dogodek duplikacije genov zgodil pri ločevanju dvokaličnic na različne redove.

5.3 Delovanje NBS-LRR proteinov

NBS-LRR proteini so najverjetneje intracelularni in delujejo kot receptorji za *avr*-kodirajoče ligande, ali pa v obliki proteinskega kompleksa, ki deluje kot receptor. Citoplazemska lokalizacija R proteinov, ki pogojujejo odpornost proti virusom ni presenetljiva, obstoj intracelularnih NBS-LRR proteinov za odpornost proti bakterijam in glivam pa kaže, da morajo biti ligandi teh organizmov tudi intracelularni. Rastlinski in živalski bakterijski organizmi uporabljajo tip III sekrecijskega sistema za prenos proteinov v gostiteljsko celico. Večina glivnih organizmov oblikuje neposreden membranski kontakt z gostiteljsko celico na površini specializirane strukture, ki jo imenujemo havstorijska in služi za prehranjevanje, kar verjetno olajša transport ligandov v gostiteljsko celico, vendar o tem ni trdnih dokazov. Pri nehavstorijskih organizmih verjetno obstajajo drugi načini prenosa, vendar niso poznani. Gliva *Magnaporthe grisea*, ki ni havstorijski organizem, direktno penetrira skozi rastlinsko kutikulo in zunanjo celično steno v epidermalne celice gostitelja (Howard in sod., 1991). Raste intracelularno, ni pa znano ali so intracelularne hife obdane z rastlinsko plazma membrano, kot je to primer havstorijske biotrofnih gliv.

Izraz gen-za gen se nanaša na specifičnost interakcij med *Avr* in *R* geni, a ne predvideva števila *R* genov potrebnih za detekcijo produkta *Avr* gena. Gena *Pto* in *Prf*, ki kodirata različne biokemijske komponente ene signalne poti, sta le en primer multiplih *R* genov vključenih v detekcijo enega patogena. Ravno obratno pa imajo produkti dveh *R* genov na *Cf* lokusu pri paradižniku enako funkcijo pri odpornosti proti glivi *Cladosporium fulvum* (Dixon in sod., 1996). Poznana pa je tudi tretja interpretacija gen-za-gen interakcije, kjer en *R* gen pogojuje odpornost proti več ligandom enega škodljivega organizma. Pri navadnem repnjakovcu pogojuje gen *RPM1* odpornost proti produktom genov *avrB* in *avrRpm1* bakterije *Pseudomonas syringae* (Bisgrove in sod., 1994).

Za *R* gene, ki kodirajo R proteine vezane na odpornost proti različnim škodljivim organizmom je postavljen model receptor-ligand interakcije, ker so za večino R proteinov značilne LRR domene (Bent, 1996). Model predvideva, da produkti *R* genov delujejo kot receptorji za posredno ali neposredno prepoznavanje patogena, vendar direktnih dokazov za večino izoliranih R proteinov pri rastlinah ni.

Dandanes prevladujeta dve hipotezi, ki se medsebojno dopolnjujeta in sicer:

- prva hipoteza temelji na receptor-ligand konceptu, ki domneva, da je fizična interakcija med produkti *R* in *Avr* genov neposredna,
- druga hipoteza izhaja iz angleškega termina »guard hypothesis« (v prevodu pomeni hipoteza nadzovanja) in temelji na predpostavki, da R proteini

delujejo kot nadzorniki nad drugimi proteini in so sestavni del proteinskih kompleksov. Ta hipoteza predvideva, da razvoj R proteinov ni potekal v smeri direktnega prepoznavanja Avr proteinov, kot je mišljeno pri modelu receptor-ligand, ampak za prepoznavanje delovanja številnih virulentnih faktorjev, ki modificirajo ali motijo delovanje gostiteljskih celičnih tarč. Pri tej hipotezi imajo R proteini vlogo nadzorovanja v celični homeostazi (Dangl in Jones, 2001).

Eksperimentalni podatki, ki podpirajo prvo hipotezo so zelo redki. Opisana pa je direktna interakcija med produktom gena *Pto* paradižnika in ustreznim *avrPto* genskim produktom bakterije *Pseudomonas syringae* (Scofield in sod., 1996), ter med produktom gena *Pi-ta* riža, in *Avr-Pita* produktom glive *Magnaporthe grisea* (Jia in sod., 2000).

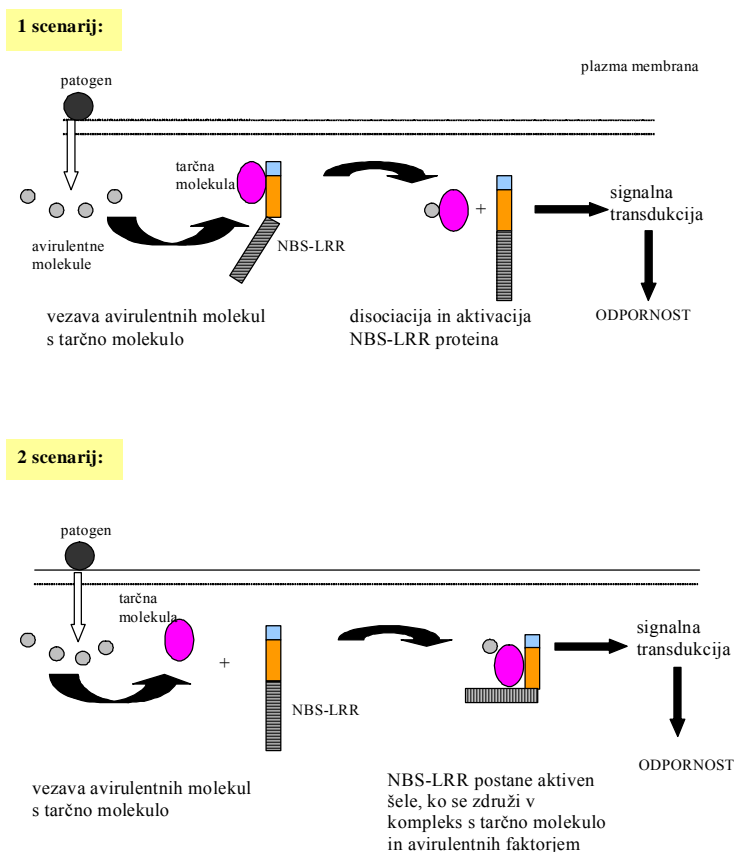
Gen *Pto* kodira serin-treonin kinazo. Prepoznavna specifičnost je v majhni kinazni regiji in raziskave kažejo, da je treonin na 204 mestu aminokislinskega zaporedja ključnega pomena za interakcijo s produktom *avrPto* gena. Produkt *AvrPto* gena je majhen hidrofilen protein, ki preide v rastlinsko celico in vstopi v interakcijo s produktom gena *Pto*, vendar so za aktivacijo odpornosti potrebne še druge komponente kot je gen *Prf*, ki kodira NBS-LRR protein s strukturo levčinske zadrge (LZ-NBS-LRR). Protein *Prf* deluje kot nadzornik proteina *Pto*, ker detektira vezavo proteina *AvrPto* na protein *Pto*, s čimer se sproži obrambni mehanizem.

Za razlago hipoteze nadzorovanja Dangl in Jones (2001) predlagata dva možna scenarija, ki sta prikazana na sliki 1. Pri prvem scenariju, je R protein konstitutivno vezan na pripadajoč partnerski *trans* protein (na sliki 1 označena tarčna molekula). Z vezavo Avr proteina na partnerski oziroma tarčni protein pride do sprostitve R proteina, ki se tako aktivira in sodeluje pri signalni transdukciji hipersenzitivnega odgovora. Ta scenarij podpirajo eksperimentalna opazovanja, da prekomerno izražanje *Prf* proteina vodi do konstitutivne odpornosti (Oldroyd in Staskawicz, 1998). Podobno, tudi prekomerno izražanje NBS-LRR genov *Rx* (za odpornost proti krompirjevemu virusu X), *RPM1* in *RPS2* (za odpornost proti bakteriji *Pseudomonas syringae*), vodi do celične smrti tudi v odsotnosti škodljivega organizma. Že prekomerno izražanje N-terminalnega in NBS zaporedja gena *RPS2* zadostuje za izražanje konstitutivne celične smrti (Tao in sod., 2000). Ta fenomen kaže na pomen regulacije med NBS-LRR proteini in njihovimi *trans* partnerji. Model predlaga, da so NBS-LRR proteini negativno regulirani s partnerskimi proteini.

Pri drugem scenariju je za delovanje R proteinov potrebna predhodna vezava liganda na pripadajoč receptor oziroma tarčno molekulo (slika 1). Konformacijske spremembe ligand-receptor kompleksa povečajo afiniteto za vezavo R proteina na ta kompleks, kar sproži aktivacijo nadaljnje signalne poti za razvoj odpornosti.

Za delovanje R proteinov je pomembna tudi oligomerizacija. NBS-LRR proteini imajo podobno strukturo kot družina proteinov NOD pri sesalcih, ki delujejo pri vnetjih in apoptozi (Inohara in Nunez, 2003).

Poleg R proteinov pri izražanju odpornosti sodelujejo številni drugi proteini, ki jim pravimo »s patogenezo povezani proteini«. Pri rastlinah je opisanih 11 družin proteinov povezanih s patogenezo. Ti proteini sodelujejo pri sintezi fitoaleksinov, sintezi encimov za lignifikacijo in pri popravilu tkiv. Sem spadajo endohitinaze, proteinaze, peroksidaze, proteinazni inhibitorji, RNA-ze, osmotini, glukanaze in proteinski prekursorji. Za delovanje nekaterih NBS-LRR proteinov (RPM1, RPS2 proteinov navadnega repnjakovca in tobačnega proteina N), so potrebni citosolni šaperoni družine Hsp90 (Hubert in sod., 2003; Liu in sod., 2004).



Slika 1: Scenarija, ki ponazarjata delovanje R proteinov pri hipotezi nadzovanja
Figure 1: Guard hypothesis scenarios for R protein function

Nivo ekspresije *R* genov regulirajo transkripcijski faktorji (TF). Prva izolirana genska družina transkripcijskih faktorjev pri rastlinah je WRKY družina. Ekspresijske analize WRKY genske družine pri navadnem repnjakovcu kažejo, da se pri okužbi z bakterijo *Pseudomonas syringae* ali s tretiranjem s salicilno kislino diferencialno izraža 49 transkripcijskih faktorjev, ki spadajo v družino WRKY.

5.4 Genomska organizacija *R* genov

R geni, ki pogojujejo odpornost proti različnim organizmom ali rasam enega škodljivega organizma, so na kromosomu lahko posamezno ali v večjih skupinah, ki jih imenujemo mega skupine. Največji lokus opisan na molekularnem nivoju z *R* geni, je pri solati, regija Dm3. Sestavlja jo vsaj 24 *R* genskih homologov, ki se nahajajo v območju 3,5 milijonov baz (Meyers in sod., 1998). Za kompleksne lokuse je značilno, da jih sestavljajo tudi psevdogeni protein kinaz in retrotranspozonski elementi. Pri številnih vrstah, so geni za odpornost v bližini telomer ali centromer na kromosomu. S fluorescentno *in situ* hibridizacijo so ugotovili, da je pri solati ena skupina *R* genov v bližini telomere, druga skupina *R* genov pa na centromeri (Shen in sod., 1998); gen *Prg1* ječmena je na telomeri, gen *Mi* paradiznika se nahaja blizu centromernega heterokromatina (Zhong in sod., 1999).

5.5 Evolucija in razvoj NBS-LRR genov

Na podlagi nekaterih strukturnih podobnosti *R* genov, izoliranih pri eno- in dvokaličnicah domnevamo, da se je osnovni mehanizem obrambe proti škodljivim organizmom ohranil skozi evolucijo in diverzifikacijo. Prav tako imajo nekateri NBS-LRR proteini nekatere strukturne domene zelo podobne živalskim, ki sodelujejo pri imunskem sistemu. Kljub podobnostim *R* genov v aminokislinskem zaporedju, se v nukleotidnih zaporedjih razlikujejo, čeprav je za večino kloniranih *R* genov znano, da spadajo v genske družine relativno podobnih sekvenc.

Najbolj znana mehanizma za nastanek *R* genov sta duplikacija in rekombinacija. S temi procesi nastajajo novi lokusi, znotraj genske družine pa se spremeni število predstavnikov. Med homolognimi sekvencami prihaja do rekombinacij in do neenakega križanja homolognih kromosomov med mejozo (Richter in Ronald, 2000). V primeru skupin sekvenc z zelo podobnim nukleotidnim zaporedjem, gre lahko za enostavne duplikacije. Podvojeni geni lahko nastanejo na več načinov in sicer z tandemskimi ponovitvami z drsom pri rekombinaciji, z gensko konverzijo, s horizontalnim transferjem in z duplikacijo večjih delov kromosoma. Posledice duplikacije genov se lahko kažejo v povečanem nivoju ekspresije genov, v kolikor imata gena identično ali skoraj identično zaporedje. Indeli in/ali akumulacije točkovnih mutacij pa lahko vodijo do nastanka psevdogenih sekvenc ali pa se z mutacijami razvijeta dva funkcionalno različna gena. Pri skupinah sekvenc z zelo različnim zapisom gre verjetno za druge načine diverzifikacije, med katere sodi preureditev sekvenc. Čeprav je stopnja mutacij in duplikacij NBS-LRR sekvenc podobna kot pri drugih genskih družinah (Meyers in sod., 2003), lahko naravna selekcija različno vpliva na sestavo genske družine (Meyers in sod, 2005).

Glede na analize aminokislinskih zaporedij, ki jih kodirajo izolirani NBS-LRR *R* geni, selekcija poteka predvsem znotraj LRR regij, na izpostavljenih aminokislinskih ostankih, ki omogočajo vezavo liganda (Wang in sod., 1998). Pri sekvenčni analizi 11 alelov gena *L* pri lanu *Linum lewisii*, od katerih jih 10 pogojuje specifično odpornost proti lanovi rji, so odkrili polimorfna mesta razporejena po

vsej kodirajoči regiji z največjo variabilnostjo v LRR domeni (Ellis in sod., 1999). Kot primer, gena *L6* in *L11* kodirata enako TIR-NBS domeno, razlikujeta pa se v 33 aminokislinah v LRR domeni. Ravno obratno, pa se gena *L6* in *L7* razlikujeta le v amino terminalnem delu TIR regije, kar kaže na to, da polimorfizem znotraj te regije tudi vpliva na specifičnost delovanja. Povečanje ali zmanjšanje števila LRR enot vpliva na distribucijo mest za vezavo ligandov in afiniteto ali specifičnost za različne ligande (Ellis in sod., 2000). Pri primerjavi nukleotidnih zaporedij genov *Xa21* in *Xa21D* riža je pogostost nesinonimnih substitucij (sprememba enega nukleotida vodi v spremembo aminokislina) pogostejša znotraj LRR regij, kar sovpada z vlogo LRR domene pri vezavi raso specifičnih ligandov (Wang in sod., 1998). Nesinonimne substitucije omogočajo evolucijsko prednost, saj večja diverziteta omogoča boljšo sposobnost prepoznavanja širšega spektra patogenov.

Nastanek specifične odpornosti pa ni omejen zgolj na razvoj *R* genov, ampak tudi na druge komponentne signalne transdukcije pri odpornosti. To prikazuje primer gena paprike *Bs2* za odpornost proti bakteriji *Xanthomonas sp.*, ki je funkcionalen v številnih vrstah znotraj družine *Solanaceae*, ne pa tudi izven te družine. Ena od interpretacij je, da se tudi druge komponente signalne poti razvijajo sočasno z *R* genom. Ta fenomen imenujemo »restriktivna taksonomska funkcionalnost« (Tai in sod., 1999). To potrjuje tudi dejstvo, da večina proteinov deluje kot kompleks z drugimi komponentami, zato je ko-evolucija drugih komponent potrebna za optimizacijo njihovega delovanja, kar lahko vidimo kot različne kvantitativne lastnosti med vrstami.

Presenetljivi rezultati izhajajo iz medvrstnih primerjav sekvenc *R* genov, ki kažejo na večjo podobnost med ortologi kot paralogi. Avtorja Michelmore in Meyers (1998) domnevata, da se geni za odpornost ne razvijajo sočasno s spreminjanjem virulence škodljivih organizmov, ampak se razvijajo počasneje, da bi vzpostavili odpornost proti heterogeni populaciji škodljivih organizmov.

6 METODE ZA IZOLACIJO IN KLONIRANJE GENOV ZA ODPORNOST PROTI ŠKODLJIVIM ORGANIZMOM

Med najbolj uspešne metode izolacije *R* genov v primeru, ko nimamo informacij o genskem produktu, sodita insercijska mutageneza in pozicijsko kloniranje na podlagi predhodno izdelanih molekularnih kart.

Za izolacijo *R* genov s pomočjo insercijske mutageneze se uporabljajo predvsem transpozoni in T-DNA Ti plazmida, ki jih vključimo v kodirajočo ali regulatorno regijo gena, s čimer se prekine njegovo izražanje. Po infekciji rastlinskih celic z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*, se T-DNA plazmida vključi v rastlinski genom, kar povzroči pri določenemu deležu rastlin spremenjen fenotip. Prvi *R* gen izoliran z insercijsko mutagenezo je gen koruze *Hml* (Johal in Briggs, 1992), z enako metodo pa so izolirani še gen tobaka *N* (Whithman in sod., 1994), gen paradižnika *Cf* (Jones in sod., 1994) in gen lana *L* (Ellis in sod., 1995).

Pri pozicijskem kloniranju je potrebno predhodno določiti približno lokacijo iskanega gena na kromosomu. Ena najbolj uporabnih metod za povezavo mest na kromosomu z določeno lastnostjo je uporaba RFLP markerjev (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov). S pozicijskim kloniranjem je bil s pomočjo RFLP markerja izoliran gen pri paradižniku *Pto* (Martin in sod., 1993). Na podlagi RFLP kart sta bila izolirana tudi gena *RPS2* in *RPM1* navadnega repnjakovca (Bent in sod., 1994; Mindrinos in sod., 1994; Grant in sod., 1995) in gen riža *Xa21* (Song in sod., 1995).

Pri številnih rastlinskih vrstah niso znani funkcionalni *R* geni, čeprav je izoliranih veliko število sekvenc, ki kodirajo zaporedja značilna za *R* gene. Kot alternativna oblika inserijski mutagenezi in pozicijskemu kloniranju se za izolacijo *R* genov uporablja metoda izolacije kandidatnih sekvenc s pomočjo PCR tehnike. Temelji na namnoževanju regij genoma z degeneriranimi začetnimi oligonukleotidi, ki so izdelani na podlagi aminokislinskega zapisa ohranjenih regij kloniranih *R* genov. Ta pristop omogoča hitro in učinkovito izolacijo homologov in analogov *R* genov, brez predhodnega poznavanja genoma.

S PCR metodo so izolirali številne analoge in homologe genov za odpornost proti škodljivim organizmom pri različnih rastlinskih vrstah in sicer pri soji (Kanazin in sod., 1996), krompirju (Leister in sod., 1996), koruzi (Collins in sod., 1998), solati (Shen in sod., 1998), paradižniku (Ohmori in sod., 1998), rižu (Mago in sod., 1999), papriki (Pflieger in sod., 1999), grahu (Timmerman-Vaughan in sod., 2000), pri hibridu citrusa *Poncirus trifoliata* x *Citrus grandis* (Deng in sod., 2000), kavi (Noir in sod., 2001), lucerni (Cordero in Skinner, 2002), čičeriki (Huettel in sod., 2002), vinski trti (Di Gaspero in Cipriani, 2002), navadnem fižolu (Rivkin in sod., 1999; López in sod., 2003), boru (Liu in Ekramoddoullah, 2003), ječmenu (Madsen in sod., 2003), sladkorni pesi (Hunger in sod., 2003), leči (Yaish in sod., 2004), ovsu (Irigoyen in sod., 2004), jablani (Calenge in sod., 2005), bombažu (He in sod., 2004), marelici (Soriano in sod., 2005) in več kot 100 analognih sekvenc *R* genov pri hmelju *Humulus lupulus* na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani (neobjavljeno).

7 LITERATURA

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., Parker, J.E. 1998. Different requirements for *EDS1* and *NDRI* by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95: 10306-10311.
- Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. Fourth Edition. USA, California, Academic Press: 635 str.
- Bai, J., Pennill, L.A., Ning, J., Lee, S.W., Ramalingam, J., Webb, C.A., Zhao, B., Sun, Q., Nelson, J.C., Leach, J.E., Hulbert, S.H. 2002. Diversity in Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich repeat Genes in Cereals. Genome Research, 12: 1871-1884.

- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R.L., Giraudat, J., Leung, J.L., Staskawicz, B.J. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, 265: 1856-1860.
- Bent A.F. 1996. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. *Plant Cell*, 8: 1757-1771.
- Bisgrove, S.R., Simonich, M.T., Smith, N.M., Sattler, A., Innes, R.W. 1994. A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes. *Plant Cell*, 6: 927-933.
- 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. 1997. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88: 695-705.
- Calenge, F., Van der Linden, C.G., Van de Weg, E., Schouten, H.J., Van Arkel, G., Denancé, C., Durel, C.E. 2005. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical Applied Genetics*, 110: 660-668.
- Century K.S., Shapiro A.D., Repetti P.P., Dahlbeck D., Holub E., Staskawicz B.J. 1997. *NDRI*, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science*, 278: 1963-1965.
- Collins N.C., Webb C.A., Seah S., Ellis J.G., Hulbert S.H., Pryor A. 1998. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 968-978.
- Cordero, C., Skinner, Z. 2002. Isolation from alfalfa of resistance gene analogues containing nucleotide binding sites. *Theoretical Applied Genetics*, 104: 1283-1289.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826-833.
- Deng, Z., Huang S., Ling, P., Chen, C., Yu, C., Weber, C.A., Moore, G.A., Gmitter, F.G., Jr. 2000. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. *Theoretical Applied Genetics*, 101: 814-822.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Edd, P., Beynon, J., Marco, Y. 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 2404-2409.
- Di Gaspero, G., Cipriani G. 2002. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theoretical Applied Genetics*, 106: 163-172.
- Dixon, M.S., Jones, D.A., Keddie, J.S., Thomas, C.M., Harrison, K., Jones, J.D.G. 1996. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*, 84: 451-459.
- Ellis, J.G., Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Anderson, P.A. 1995. Contrasting complexity of two rust resistance loci in flax. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 4185-4188.
- Ellis, J., Jones, D. 1998. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 288-293.

- Ellis, J.G., Lawrence, G.J, Luck, J.E., Dodds, P.N. 1999. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene-for-gene specificity. *Plant Cell*, 11: 495-506.
- Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T. 2000. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 279-284.
- Flor, H.H. 1955. Host-parasite interactions in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology*, 45: 680-685.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., Dangl, J.L. 1995. Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269: 843-846.
- Hammond-Kosack, K.E., Parker, J.E. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspective for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 177-193.
- He, L., Du, C., Covaleda, L., Xu, Z., Robinson, A.F., Yu, J.Z., Kohel, R.J., Zhang, H.B. 2004. Cloning, characterization, and evolution of the NBS-LRR-encoding resistance gene analogue family in polyploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 17: 1234-1241.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H., Money, N.P. 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 11281-11284.
- Hubert, D.A., Torner, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., Dangl, J.L. 2003. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO Journal*, 22: 5679-5689.
- Huettel, B., Santra, D., Muehlbauer, J., Kahl, G. 2002. Resistance gene analogues of chickpea (*Cicer arietinum* L.): isolation, genetic mapping and association with a Fusarium resistance gene cluster. *Theoretical Applied Genetics*, 105: 479-490.
- Hunger, S., Di Gaspero, G., Möhring, S., Bellin, D., Schäfer-Pregl, R., Borchardt, D.C., Durel, C-E., Werber, M., Weisshaar, B., Salamini, F., Schneider, K. 2003. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome*, 46: 70-82.
- Inohara, N., Nunez, G. 2003. Nods: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Review of Immunology*, 3: 371-382.
- Irigoyen, M.L., Loarce, Y., Fominaya, A., Ferrer, E. 2004. Isolation and mapping of resistance gene analogs from the *Avena strigosa* genome. *Theoretical Applied Genetics*, 109: 713-724.
- Iyer, A.S., McCouch, S.R. 2004. The rice bacterial blight resistance gene xa5 encodes a novel form of disease resistance. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 17: 1348-1354.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., Valent, B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal*, 19: 4004-4014.
- Johal, G.S., Briggs, S.P. 1992. Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science*, 258: 985-987.

- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., Jones, J.D.G. 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, 266: 789-793.
- Kanazin, V., Marek, L.F., Shoemaker, R.C. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 11746-11750.
- Kawchuk, L.M., Hachey, J., Lynch, D.R., Kulcsar, F., Rooijen, van G., Waterer, D.R., Robertson, A., Kokko, E., Byers, R., Howard, R.J., Fischer, R., Prüfer, D. 2001. Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98: 6511-6515.
- Kobe, B., Deisenhofer J. 1994. The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 19: 415-421.
- Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A., Ellis, J.G. 1995. The L6 gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *Plant Cell*, 7: 1195-1206.
- Leister D., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*, 14: 421-429.
- Liu Y., Burch-Smith T., Schiff M., Feng S., Dinesh-Kumar S.P. 2004. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 2101-2108.
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K. 2003. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Molecular Genetics and Genomics*, 270: 432-441.
- López, C.E., Acosta, I.F., Jara, C., Pedraza, F., Gaitán-Solís, E., Gallego, G., Beebe, S., Tohme, J. 2003. Identifying Resistance Gene Analogs Associated With Resistances to Different Pathogens in Common Bean. *Phytopathology*, 93: 88-95.
- Madsen, L.H., Collins, N.C., Rakwalska, M., Backes, G., Sandal, N., Krusell, L., Jensen, J., Waterman, E.H., Jahoor, A., Ayliffe, M., Pryor, A.J., Langridge, P., Schulze-Lefert, P., Stougaard, J. 2003. Barley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. *Molecular Genetics and Genomics*, 269: 150-161.
- Mago, R., Nair, S., Mohan, M. 1999. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theoretical Applied Genetics*, 99: 50-57.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chungwongse, J., Frary, A., Ganal, M.W., Spivey, R., Wu T., Earle, E.D., Tanksley, S.D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432-1436.
- Martin, G.B. 1999. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 273-279.
- McDowell, J.M., Dangl, J.L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, 25: 79-82.
- Meyers, B.C., Chin, D.B., Shen, K.A., Sivaramakrishnan, S., Lavelle, D.O., Zhan, T., Michelmore, R.W. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell*, 10: 1817-1832.

- Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W., Young, N.D. 1999. Plant Disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal*, 20: 317-322.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., Michelmore, R.W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 809-834.
- Meyers, B.C., Kaushik, S., Nandety, R.S. 2005. Evolving disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 129-134.
- Michelmore, R.W., Meyers, B.C. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*, 8: 1113-1130.
- Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G.L., Ausubel, F.M. 1994. The *Arabidopsis thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine rich repeats. *Cell*, 78: 1089-1099.
- Noir, S., Combes, M.C., Anthony, F., Lashermes, P. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea L.*). 2001. *Molecular Genetics and Genomics*, 265: 654-662.
- Ohmori, T., Muarata, M., Motoyoshi, F. 1998. Characterisation of disease resistance gene-like sequence in near-isogenic lines of tomato. *Theoretical Applied Genetics*, 97: 331-338.
- Oldroyd, G.E.D., Staskawicz, B.J. 1998. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 10300-10305.
- Pan, Q., Wendel, J., Fluhr, R. 2000a. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 50: 203-213.
- Pan, Q., Liu, Y.S., Budai-Hadrian, O., Sela, M., Carmel-Goren, L., Zami, D., Fluhr, R. 2000b. Comparative genetics of NBS-LRR resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. *Genetics*, 155: 309-322.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., Daniels, M.J. 1996. Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. *Plant Cell*, 8: 2033-2046.
- Pflieger, S., Lefebvre, V., Caranta, C., Blattes, A., Goffinet, B., Palloix, A. 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome*, 42: 1100-1110.
- Piffanelli, P., Devoto, A., Schulze-Lefert, P. 1999. Defense signaling pathways in cereals. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 295-300.
- Richter, T.E., Ronald, P.C. 2000. The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology*, 42: 195-204.
- Rivkin, M.I., Vallejos, C.E., McClean, P.E. 1999. Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome*, 42: 41-47.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., Staskawicz, B.J. 1996. Molecular Basis of Gene-for-Gene Specificity in Bacterial Speck Disease of Tomato. *Science*, 274: 2063-2065.

- Shen, K.A., Meyers, B.C., Islam-Faridi, M.N., Chin, D.B., Stelly, M., Michelmore, R.W. 1998. Resistance gene candidates identified using PCR with degenerate primers map to resistance genes clusters in lettuce. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 11: 815-823.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C., Ronald, P. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 270: 1804-1806.
- Soriano, J.M., Vilanova, S., Romero, C., Llacer, G., Badenes, M.L. 2005. Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 110: 980-989.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall R.E., Staskawicz B.J. 1999. Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 14153-14158.
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R.T., Ausubel, F.M., Katagiri, F. 2000. Mutational analysis of the *Arabidopsis* nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene RPS2. *Plant Cell*, 12: 2541-2554.
- Timmerman-Vaughan, G.M., Frew, T.J., Weeden, N.F. 2000. Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 101: 241-247.
- Wang, G.L., Ruan, D.L., Song, W.Y., Sideris, S., Chen, L., Pi, L.Y., Zhang S., Zhang Z., Fauquet C., Gaut B.S., Whalen M.C., Ronald P.C. 1998. *Xa21D* Encodes a Receptor-like Molecule with a Leucine-Rich Repeat Domain That Determines Race-Specific Recognition and Is Subject to Adaptive Evolution. *The Plant Cell*, 10: 765-779.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., Baker, B. 1994. The Product of the Tobacco Mosaic Virus Resistance Gene N: Similarity to Toll and the Interleukin-1 Receptor. *Cell*, 78: 1101-1115.
- Yaish, M.W., Saenz de Miera, L.E., Perez de la Vega, M. 2004. Isolation of a family of resistance gene analogue sequences of the nucleotide binding site (NBS) type from *Lens* species. *Genome*, 47: 650-659.
- Zhong, X.B., Bodeau, J., Fransz, P.F., Williamson, V.M., van Kammen, A., de Jong, H., Zabel, P. 1999. FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato reveals the root-knot nematode resistance gene *Mi1* and the acid phosphatase gene *Aps-1* to be located near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. *Theoretical Applied Genetics*, 98: 365-370.