

## КАРЛИКОВЫЕ МУТАНТЫ И ИХ РОЛЬ В “ЗЕЛЕННОЙ РЕВОЛЮЦИИ”

О. Н. КУЛАЕВА

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

### DWARF MUTANTS AND THEIR ROLE IN “GREEN REVOLUTION”

O. N. KULAEVA

*Genes coding proteins involved in plant response to gibberellin and dwarf phenotypes obtained as a result of that gene mutations are considered. The role of dwarf mutants in “green revolution” is discussed.*

*В статье рассмотрены гены, кодирующие белки, которые участвуют в ответе растений на гиббереллин, и карликовые фенотипы, полученные в результате мутации этих генов. Обсуждается роль карликовых мутантов в “зеленой революции”.*

[www.issep.rssi.ru](http://www.issep.rssi.ru)

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие идут по нарастающей достижения в области изучения генома растений, выделения генов, ответственных за определенные этапы роста, развития, старения растений, их ответа на стрессовые воздействия и патогены. Выделены гены, контролирующие регуляторные системы растений, начиная от рецепторных белков и кончая генами факторов, определяющих включение определенных генетических программ. В США сформирована и активно выполняется программа секвенирования (установление нуклеотидной последовательности) генома арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*, “резушка Таля”). Большие средства на выполнение программы “Геном арабидопсиса” выделяет правительство США. Геном арабидопсиса будет, по видимому, полностью секвенирован в 2000–2001 годах. В выполнении этой программы принимают участие кроме американских также специалисты Японии и Европы. Почему же эта сорная травка привлекает к себе такое внимание не только ученых, но и правительств?

Арабидопсис – идеальное модельное растение для изучения растительного генома. Это растение характеризуется наименьшим из известных геномом растений, который представлен 120 млн пар оснований. У арабидопсиса всего пять пар хромосом. Очень важно, что арабидопсис дает семена уже через шесть недель развития и этих семян очень много (до 5000 на одно растение). Зрелое растение не превышает 15–20 см. Его легко выращивать в лабораторных условиях, в том числе в стерильных. Все это делает арабидопсис идеальным модельным растением для изучения генома, генетики развития, генетики ответа растений на внешние сигналы. В настоящее время получено несколько тысяч мутантов арабидопсиса (генетических линий с измененным геномом), которые позволили выявить гены последовательных этапов формирования цветка, гены, обеспечивающие эмбриогенез растений, гены контроля морфогенеза светом, гены синтеза и действия фитогормонов и многие другие. Поскольку организация генов у самых

разных растений сходна, используя ген арабидопсиса в качестве “зонда”, можно выделить его аналог из ДНК любых других растений, в том числе из хозяйственно ценных. Поэтому геном арабидопсиса не только “полигон” для исследования генетики практически всех жизненных программ растений, но и “средство” для выделения важных генов из других растений, включая хозяйственно ценные.

Важно, что в настоящее время дело не ограничивается секвенированием генома арабидопсиса. В США приняты программы секвенирования генома кукурузы, томатов, риса, в Японии — генома риса. На программы выделяют большие средства. Все это обеспечит огромный прогресс науки о растениях и даст в руки ученых новые нетрадиционные эффективные средства повышения урожая и устойчивости растений к разнообразным патогенам. Наука о растениях становится все более увлекательной и будет одной из ведущих областей биологии XXI века.

Одно из крупных достижений молекулярной биологии растений последних дней состоит в выделении и секвенировании генов, определивших так называемую “зеленую революцию” в 60–70-е годы. Это позволяет получать новые высокоурожайные сорта растений не в результате десятилетий кропотливой селекционной работы, а прямым введением в геном растений необходимого гена. Прежде чем перейти к рассмотрению этих новейших достижений, обсудим, что такое “зеленая революция”.

## “ЗЕЛЕНАЯ РЕВОЛЮЦИЯ”

В 60–70-е годы произошло резкое увеличение урожая зерновых культур, названное “зеленой революцией”. В ее основе лежало создание селекционерами новых сортов, принципиально отличающихся от старых. В этой связи необходимо отметить работы прежде всего выдающегося американского селекционера и генетика Нормана Эрнстона Борлауга (р. 1914), с 1944 года работающего в Мексике и получившего за исследования в области “зеленой революции” Нобелевскую премию мира в 1970 году. Старые сорта злаковых культур обладали длинным, сравнительно тонким стеблем. В условиях достаточного увлажнения и хорошего минерального питания растения формировали большой колос. Стебель не выдерживал его тяжести и полегал под действием дождя и ветра, что приводило к большим потерям урожая. Чтобы предотвратить полегание хлебов, в сельском хозяйстве применяли ретарданты — вещества, которые подавляли рост стебля в высоту, вызывали его утолщение и защищали посевы от полегания. Доза ретардантов на 1 га составляла несколько килограммов. Поля опрыскивали растворами ретардантов. Это было связано с дорогостоящей технологией и, главное,

приводило к вредной для урожая и почвы нагрузке химическими веществами. Новые сорта, обеспечившие “зеленую революцию”, отличались укороченным толстым стеблем, устойчивым к полеганию. Эти сорта позволили изменить агротехнику, увеличить дозу минеральных удобрений, а в результате выращивать растения с крупными, заполненными полноценным зерном колосьями. Стебель выдерживал повышенную нагрузку. Посевы не нуждались больше в обработке ретардантами. Кроме того, изменилась сама “архитектура” растений, что позволило на единице площади выращивать гораздо большее число колосьев. Все это в сумме привело к невиданному (в отдельных странах в несколько раз) увеличению урожая и получило название “зеленой революции”. Как выяснилось, большая роль в создании новых низкорослых сортов с крепким стеблем, высокой устойчивостью к полеганию и высокой урожайностью принадлежала модификации (мутации) генов, ответственных за передачу в растении сигнала фитогормона — гиббереллина. Рассмотрим кратко его роль в регуляции роста стебля.

## РОЛЬ ГИББЕРЕЛЛИНА В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА СТЕБЛЯ

Рост и вся жизнь растений регулируются фитогормонами (см. [1]). В частности, один тип гормонов растений представлен гиббереллинами. Гиббереллины — дитерпеноиды достаточно сложного строения. В их молекулу входят пять различно организованных колец (рис. 1).

В настоящее время из разных растений выделено около сотни различных представителей этого семейства, но лишь несколько из них обладают регуляторным действием. Остальные представляют собой промежуточные продукты на пути синтеза физиологически

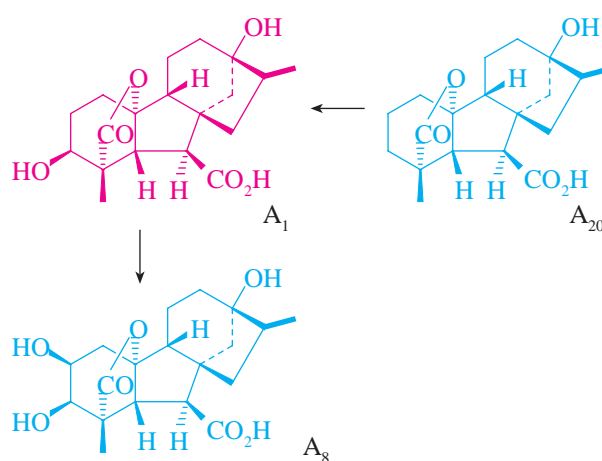


Рис. 1. Формула гиббереллина A<sub>1</sub>, его предшественника A<sub>20</sub> и продукта его инактивации A<sub>8</sub>

активных соединений или возникают в результате их инактивации. Различные гиббереллины принято обозначать буквой А с порядковым номером соединения. Только один гиббереллин А<sub>1</sub> активирует рост стебля в высоту у злаков и некоторых других растений (см. рис. 1). Другие формы гиббереллинов активируют рост стебля лишь потому, что превращаются в растения в А<sub>1</sub>. В результате воздействия гиббереллином можно получить крайне высокие растения, а в природе сорта хлебных злаков, обладающие большим содержанием гиббереллинов, характеризуются длинным и одновременно тонким стеблем. Гиббереллин и был открыт исходно в Японии в 20-е годы как вещество, которое выделяет в растения риса патогенный гриб Гибберелла (*Gibberella fujikuroi*, отсюда и название гиббереллин), что приводит к аномальному вытягиванию стеблей: они становятся очень длинными и ломкими и делаются добычей гриба. Много позже было установлено, что гиббереллины представляют собой собственные гормоны растений, а гриб берет их на вооружение — синтезирует гормон растений, выделяет его в растение в больших количествах, меняет рост растения-хозяина и делает его своей добычей.

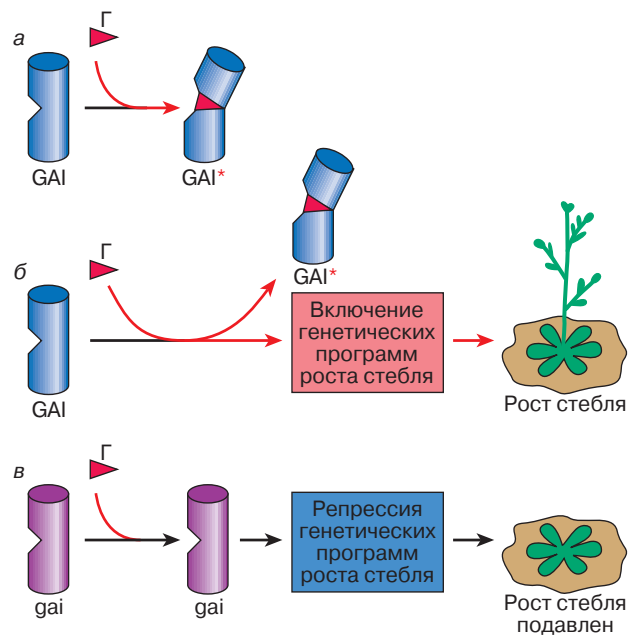
В биосинтезе гиббереллинов принимает участие большое число белков — ферментов, кодируемых определенными генами. Мутации в этих генах нарушают биосинтез А<sub>1</sub>, и такие растения становятся карликовыми (рис. 2). Кстати сказать, действие многих упомяну-



**Рис. 2.** Влияние гиббереллина на рост карликовых растений кукурузы: 1 — контрольное растение, 2 — карликовое растение с нарушением биосинтеза гиббереллина, 2' — его ответ на обработку раствором гиббереллина, 3 — карликовое растение с нарушением системы ответа на гиббереллин, 3' — отсутствие ростовой реакции в ответ на обработку мутанта раствором гиббереллина

тых выше ретардантов сводилось к подавлению определенных реакций биосинтеза гиббереллинов.

На рис. 1 показано, что даже незначительные изменения в молекуле А<sub>1</sub> приводят к потере соединением гормональной активности. Например, А<sub>20</sub> предшественник А<sub>1</sub> отличается от А<sub>1</sub> отсутствием одной ОН-группы, а превращение А<sub>1</sub> в А<sub>8</sub> сопряжено с введением в молекулу дополнительной ОН-группы. Оба соединения А<sub>20</sub> и А<sub>8</sub> не обладают гормональной активностью. Это подчеркивает жесткие требования, которым должна отвечать структура молекулы гормона для того, чтобы она была узнана своим рецептором и образовавшийся в результате этого гормон-рецепторный комплекс передал бы принятый гормональный сигнал дальше, что в конечном итоге привело бы к включению генов, экспрессия которых должна обеспечить специфичный для гормона ответ (рис. 3), в нашем случае активацию роста стебля.



**Рис. 3.** Схема ответа на гиббереллин (Г) у нормального растения и растения с геном карликовости (*gai*): а — инактивация репрессора (GAI) гиббереллиновым сигналом; б — ответ на гиббереллин у нормального растения; в — отсутствие ответа на Г у мутанта с геном карликовости (*gai*). Г — гиббереллиновый сигнал, GAI — репрессор Г-индуцируемых генов, GAI\* — репрессор, инактивированный Г-сигналом, *gai* — репрессор, потерявший чувствительность к гиббереллиновому сигналу в результате мутации его гена

Карликовые мутанты пшеницы, кукурузы и других растений известны давно. Их можно разделить на два типа:

1) мутанты, карликовость которых устраняется при обработке растений гиббереллином (см. рис. 2). Это мутанты с прерванным процессом биосинтеза гиббереллинов в результате мутации гена одного из ферментов биосинтетического пути;

2) мутанты, карликовость которых не устраняется при действии на растения гиббереллина. Это мутанты с нарушениями в системе восприятия и передачи гормонального сигнала. Как показали достижения последних лет, именно такого рода мутации в геноме пшеницы, кукурузы и риса оказались важными для создания новых форм растений, обеспечивших “зеленую революцию”.

Для пшениц давно известно, что снижение высоты растений и формирование низкорослого, утолщенного стебля связано с мутациями в генах, названных *Rht* (*reduced height* – сниженная высота). Содержащие такой мутированный ген растения отличаются сниженной чувствительностью к гиббереллинам и повышенным собственным содержанием гиббереллинов, которое, однако, сочетается не с высокорослостью, а со значительным снижением высоты растений. Был сделан вывод, что у таких растений повреждена система ответа на гиббереллин: восприятие или передача его сигнала. Одновременно растения пшениц, содержащие в геноме мутированные гены *Rht* (названные генами карликовости), отличались повышенной урожайностью. Перечисленные свойства растений пшеницы с мутацией в генах *Rht* характерны также для растений кукурузы, содержащих мутантный ген *d8* (доминантный ген карликовости – *dwarf8*), и для мутантов арабидопсиса с изменениями в гене *GAI* (*gibberellic acid insensitive* – нечувствительность к гибберелловой кислоте). Все перечисленные растения отличаются сниженной высотой и потерей чувствительности к гиббереллину. Это обусловило большой интерес исследователей к генам карликовости.

Возникло предположение, что упомянутые мутанты связаны с нарушениями (изменениями) в структуре генов ответа растения на гиббереллин. Перечисленные гены линий пшеницы *Rht-B1a* и *Rht-D1a* были выделены и секвенированы, то есть была определена нуклеотидная последовательность их ДНК. Основываясь на этой информации, в настоящее время легко предсказать аминокислотную последовательность кодируемых геном белков. Для этого отыскивают в нуклеотидной последовательности гена кодон, с которого начинается трансляция – синтез белка и далее исходя из триплетного кода, определяют последовательность аминокислотных остатков в белке. Такое исследование было проведено для упомянутых генов. В результате получе-

на важная информация, рассмотренная в следующем разделе.

## ЧТО ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ ГЕНЫ КАРЛИКОВОСТИ

Новейшие достижения в исследовании генов карликовости [5], вызывающих снижение высоты растений, их нечувствительность к гиббереллинам, повышение урожайности растений и их устойчивость к полеганию, привели к принципиально важным выводам. Было показано, что карликовость у арабидопсиса, пшеницы, риса и кукурузы происходит за счет мутации тождественных генов, имеющих близкую структуру.

Рассмотрим сначала сведения о неизменных генах, мутации которых приводят к карликовости. Эти гены выделены и секвенированы, то есть определена их первичная структура (нуклеотидная последовательность в ДНК) и на ее основании установлена (рассчитана) первичная структура кодируемых ими белков (*GAI* и *RGA* арабидопсиса, *D8* кукурузы, *Rht-B1* и *Rgt-D1* пшеницы).

При этом было выяснено, что, например, белок, кодируемый *d8*, у кукурузы имеет 89% идентичности аминокислотной последовательности с белками, кодируемыми *Rht-B1a* и *Rht-D1a* пшеницы. Это по сути близкие гены двух видов. Сравнение полученных результатов с базой данных о структуре секвенированных ранее белков оказалось очень результативным. В настоящее время установлены аминокислотные последовательности, ответственные за различные функции белков, а также их локализацию в клетке. Проведенный с помощью специальных программ компьютерный анализ сравнения структуры перечисленных белков (*Rht*, *GAI*, *RGA*, *D8*) показал, что все они имеют близкую структуру С-конца белковой молекулы. (Напомним, что при синтезе пептидных связей в белке у первой аминокислоты остается свободной аминогруппа  $\text{NH}_2$ , поэтому начало белковой цепи называется ее N-концом, а у последней аминокислоты остается свободной  $\text{COOH}$  – карбоксильная группа, поэтому окончание белковой цепи называется ее С-концом.)

Итак, С-конец у белков *GAI*, *G8*, *Rht-D1* оказался очень близким по аминокислотной последовательности и содержал участки, которые ранее были обнаружены в белках-регуляторах транскрипции, называемых трансфакторами. Эти белки регулируют экспрессию генов. Отсюда был сделан вывод, что перечисленные белки могут участвовать в регуляции экспрессии гиббереллинзависимых генов. У всех перечисленных белков найдена последовательность, указывающая на их локализацию в ядре, что также подтверждало их принадлежность к трансфакторам. Последнее обстоятельство

недавно красиво подтверждено в опытах А. Сильверстона и др. [4], которые создали генетическую конструкцию, содержащую под сильным промотором вируса цветной капусты (35S) слитые гены зеленого флуоресцирующего белка медузы и RGA (один из белков, мутация которых вызывала нечувствительность к гиббереллину у арабидопсиса). Эта конструкция была введена в экспрессирующий вектор (обеспечивающий синтез РНК и белка на введенной в клетку чужеродной ДНК) и нанесена на частицы, которыми бомбардировали клетки эпидермиса лука (покровная ткань). В результате в клетках лука синтезировался гибридный белок, включающий в себя белок медузы, обеспечивающий зеленую флуоресценцию, и белок арабидопсиса RGA, который благодаря специальной аминокислотной последовательности вызвал поступление химерного белка в клеточные ядра. Введение в растительные клетки генов, ответственных за синтез светящихся белков (от медузы и светлячков), позволяет решать важную техническую задачу – обнаружение и отбор растений, в которые успешно перенесены генно-инженерные конструкции; проростки этих растений светятся в темноте и сами о себе заявляют: “Мы несем генно-инженерные продукты!” Благодаря белку медузы в обсуждавшихся выше опытах ядра клеток лука светились зеленой флуоресценцией. Это стало изящным доказательством того, что RGA поступает в клетках в ядра и накапливается в них, где он и должен выполнять свою функцию, которая, судя по другим аминокислотным последовательностям белка, должна состоять в регуляции транскрипции. В частности, во всех белках исследуемого семейства обнаружена так называемая SH2-последовательность. Она содержит очень консервативный (не меняющийся в эволюции) остаток аргинина, который участвует у других, нерастительных организмов в узнавании фосфорилированного тирозина при контакте содержащего SH2-участок белка с другим белком, у которого фосфорилирован тирозин. Это позволяет утверждать, что фосфорилирование тирозина какого-то пока еще неоткрытого белка должно принимать участие в передаче гиббереллинового сигнала в клетках растений. Это первое обнаружение SH2 домена (участка белка) в растительных белках. До сих пор он был обнаружен в составе STAT (signal transducers and activators of transcription – переносчики сигналов и активаторы транскрипции) у других организмов, в частности у животных. Можно предполагать, что Rht-D1a, D8, GAI и RGA являются регуляторами транскрипции гиббереллинзависимых генов и сигнал на эти регуляторы поступает от другого белка, который предварительно был фосфорилирован по тирозину. Такая сигнальная система может участвовать в регуляции роста растений гиббереллином, по-

добно тому как она участвует в регуляции роста животных цитокинами.

N-конец молекулы рассматриваемых белков более вариабелен по аминокислотной последовательности. Мутации, вызывающие карликовость растений и их нечувствительность к гиббереллину, затрагивают именно ту часть гена, которая кодирует N-конец молекулы белка. Эти мутации различаются у изученных генов карликовости, однако все они затрагивают участок в 17 аминокислот с N-конца белка, который у мутанта арабидопсиса *gai* отсутствует в белке, кодируемом мутированным геном. Специальные опыты показали, что 17 аминокислотных остатков важны для ответа растения на гиббереллин и этот участок присутствует во всех рассмотренных белках нормальных немутированных растений у арабидопсиса (GAI и RGA), пшеницы (Rht-1) и кукурузы (d8). Эта последовательность присутствует только у белков, имеющих отношение к ответу растений на гиббереллин.

Генетические опыты убедительно доказывают, что рассматриваемые нами белки GAI, RGA, D8 и Rht-D1a должны быть в норме репрессорами индукции гиббереллинзависимых генов (или индуцировать ген репрессора гиббереллиновых программ). N-конец молекулы должен принимать на себя гиббереллиновый сигнал, и в результате белок-репрессор должен терять ингибиторную функцию и открывать дальнейший путь гиббереллиновому сигналу, то есть давать возможность включиться генам активации роста стебля (см. рис. 3). Мутации в гене, затрагивающие упомянутую выше аминокислотную последовательность на N-конце белка, делают белок нечувствительным к гиббереллиновому сигналу. Гиббереллин теряет способность инактивировать белок-репрессор, который через регуляцию транскрипции осуществляет подавление генетических программ, необходимых для роста стебля в высоту. Растение становится карликовым и нечувствительным к гиббереллину. Так на молекулярно-генетическом уровне была раскрыта сущность получения низкорослых, гиббереллин-нечувствительных, устойчивых к полеганию и высокоурожайных сортов.

Сравнительный анализ разных мутантных аллелей показывает, что они имеют разную степень карликовости и чувствительности к гиббереллину. Поэтому дальнейший анализ N-конца белков – продуктов генов карликовости открывает путь к пониманию модулирующей функции белков GAI, RGA, Rht-B1a, Rht-D1a и d8 в чувствительности растений к гиббереллину и проявлении его регуляторной функции.

## ПРОВЕРКА ТЕОРИИ В ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Чтобы проверить, работает ли изложенное выше теоретическое объяснение на практике, Дж. Пенг, Д. Ричардс и др. [5] решили выяснить, можно ли получить карликовое растение путем прямого введения в его геном гена карликовости. Для этого был выбран рис сорта *Basmati 370*, который культивируют на севере и северо-западе Индии. Этот сорт ценят за вкус и аромат зерна, а также за хорошие качества при варке. Вместе с тем растения этого сорта риса высокие, с тонким стеблем и поэтому легко повреждаются ветром и дождями, что приводит к большим потерям урожая. Селекционная работа с этим сортом, направленная на повышение его устойчивости, не была успешной, так как приводила к потере ценных качеств. Для проверки возможности получения низкорослых, гиббереллин-нечувствительных растений путем их трансформации геном карликовости в растения риса была введена генетическая конструкция, экспрессирующая в растении белок *gai*, кодируемый геном *gai* арабидопсиса. Авторы убедились, что проростки трансформированного риса обладали низкой чувствительностью к гиббереллину и выросшие из них растения отличались низкорослостью.

Эти опыты открывают дорогу к получению высокоурожайных, низкорослых, с пониженной чувствительностью к гиббереллину и устойчивых к полеганию сортов любой зерновой культуры путем прямого введения в геном растений гена карликовости без нарушений других генетических свойств сорта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье рассмотрены последние, опубликованные в 1998–1999 годах данные о генах, кодирующих белки, участвующие в передаче гиббереллинового сигнала. Как выяснилось, эти белки должны выступать в растении в роли репрессоров генов роста стебля. Гиббереллиновый сигнал должен инактивировать белки, лишая их репрессорной функции и благодаря этому включать гены роста стебля. Мутации в генах рассматриваемых белков-репрессоров делают эти белки нечувствительными к гиббереллину. Он теряет способность инактивировать репрессор и включать генетическую программу роста стебля. В результате возникают низкорослые растения, нечувствительные к гиббереллину, устойчивые к полеганию и обладающие высокой урожайностью. Гены, кодирующие белки, потерявшие полностью (или

частично) чувствительность к гиббереллиновому сигналу и репрессирующие включение гиббереллином генетических программ роста стебля, получили название генов карликовости. Им принадлежит важная роль в создании низкорослых, высокоурожайных сортов зерновых культур, обеспечивших большое увеличение урожая в 60–70-е годы, что получило название “зеленой революции”. Как показали последние достижения, выделение генов карликовости и их введение в геном высокорослых растений в составе генетических конструкций, обеспечивающих трансформацию растений, открывают путь получения низкорослых высокоурожайных и устойчивых к полеганию растений, минуя многолетний труд селекционеров и избегая других существенных изменений в геномном типе, которые неизбежны в ходе обычного селекционного процесса. Правда, нельзя забывать, что генетическая трансформация растений выдвигает свои специфические задачи для исследователей, связанные с особенностями трансгенных растений. Эта тема заслуживает специального обсуждения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаева О.Н. Как регулируется жизнь растений // Соросовский Образовательный Журнал. 1995. № 1. С. 20–27.
2. Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и дифференцировка. М.: Мир, 1984.
3. Муромцев Г.С., Чканников Д.И., Кулаева О.Н., Гамбург К.З. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. М.: Агропромиздат, 1987.
- 4\*. Silverstone A., Ciampaglio C., Sun T-p. The Arabidopsis RGA Gene Encodes a Transcriptional Regulator Repressing the Gibberellin Signal Transduction Pathway // Plant Cell. 1998. Vol. 10. P. 155–169.
- 5\*. Peng J., Richards D., Hartley et al. “Green Revolution” Genes Encode Mutant Gibberellin Response Modulators // Nature. 1999. Vol. 400. P. 256–261.

\* \* \*

Ольга Николаевна Кулаева, доктор биологических наук, профессор, вице-президент Общества физиологов растений России, зав. лабораторией экспрессии генома растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, специалист в области регуляторных систем растений, включая фитогормоны и ответ растений на стресс. Награждена премией им. К.А. Тимирязева РАН. Автор 260 печатных работ, в том числе двух монографий.

\* Помеченные звездочкой работы введены в список литературы для того, чтобы показать, что обсужденные в статье данные получены в самое последнее время – в 1998–1999 годах.