

# I МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ (28 октября — 2 ноября 1985 г., США)

В г. Саванне (Джорджия, США) состоялся I Международный конгресс по молекулярной биологии растений. В его работе участвовали свыше двух тысяч ученых из разных стран мира, однако подавляющее их количество (около 80 %) составили исследователи США. В работе конгресса приняли участие три советских ученых. Было заслушано 23 пленарных, 66 симпозиальных и 297 кратких докладов, также было представлено большое количество стендовых сообщений. Доклады группировались тематически (шесть пленарных заседаний, 12 симпозиумов, два рабочих семинара). Пленарные заседания были посвящены проблемам экспрессии генов, мобильным генетическим элементам, взаимоотношениям растений с микроорганизмами, системам генетической трансформации, а также прикладным аспектам молекулярной биологии растений. Симпозиальные заседания охватывали все активно развивающиеся направления исследований, в том числе такие, как молекулярная биология хлоропластов и митохондрий, организация и экспрессия ядерных генов, механизмы стресса, мобильные генетические элементы, системы генетической трансформации, клеточная биология и генетика соматических клеток, структура и архитектура клетки, регуляторные механизмы и механизмы азотного метаболизма, вирусы растений. Конгресс оказался, без сомнения, наиболее значительным научным форумом в биологии растений за последние несколько лет, и представленные доклады наилучшим образом отразили многочисленные серьезные успехи в понимании механизмов жизнедеятельности растений, достигнутые с помощью новых методов молекулярной биологии и прежде всего приемов генетической инженерии.

Хотя конгресс и носил порядковый номер первый, молекулярная биология растений, как показали доклады, наконец переросла стадию «гадкого утенка». Объемы, разнообразие и результативность исследований не могут не впечатлять. В работе конгресса приняли участие немногим менее двух тысяч американских ученых, активно работающих в молекулярной биологии растений; по нашим оценкам всего в этой области науки в США занято от 5 до 10 тыс. исследователей. Еще примерно половина названного количества ученых имеется в других развитых западных странах (вместе взятых). Подавляющее большинство молекулярных биоло-

гов обратилось к растениям как объекту исследований пять или менее лет тому назад. Таким образом, закручен огромный маховик, который в ближайшее пятилетие вряд ли уменьшит обороты. Данная область исследований связана с использованием высокосложных технологий эксперимента, а потому предполагает наличие высококвалифицированных кадров. Накачка кадров, наподобие той, которую провели американцы, была возможна лишь потому, что в США ранее имелось большое количество превосходных молекулярнобиологических лабораторий.

Ниже следует перечень (неизбежно субъективный) наиболее важных и интересных результатов, представленных на конгрессе.

Доклады показали, что в настоящее время в распоряжении исследователя имеется целый ряд методов генетической трансформации растений. Наиболее широко применяется очень простой метод трансформации на листовых кружочках с использованием агробактерий, позволяющий получать тысячи и более трансформантов; этот метод, однако, неприменим при работе со злаками. В последнее время все чаще используют прямой метод трансформации, когда протопласты инкубируют в присутствии плазмид, несущих селективный маркерный ген. Предложенные методики трансформации (включая обработку полиэтиленгликолем, растворами с высоким рН и высоким содержанием кальция, холодовой и тепловой шоки, электропорирование) позволяют получать частоты трансформации до  $10^{-2}$ . Впервые доложено о трансформации растительных клеток с помощью микроинъекций ДНК: показана частота трансформации (10—20 %), приближающаяся к таковой при микроинъекции плазмид в животные клетки. Данный метод представляет особый интерес, поскольку в принципе позволяет трансформировать клетки в составе многоклеточных эмбрионов и может оказаться эффективным для введения чужеродных генов в злаки. Целый ряд исследователей сообщает, что им удалось ввести гены не только в ядро, но также и в хлоропласты; многие из исследованных трансформантов обнаруживают материнское наследование приобретенных признаков. Доказана возможность генетической трансформации с использованием тотальной геномной ДНК. Приведены эксперименты, подтверждающие высокую частоту копереноса неселективных

генов при трансформации протопластов смесью двух плазмид. Таким образом, проблема введения в клетки высших растений чужеродной генетической информации на сегодняшний день может рассматриваться как решенная. Выделены и охарактеризованы сильные промоторы, обеспечивающие высокий уровень транскрипции вводимых генов. Так, промотор одного из генов экстензинов обеспечивает в 100 раз более высокую скорость синтеза соответствующих мРНК. Круг видов, для которых предложены протоколы трансформации, расширился и включает помимо пасленовых (табак, петуния, картофель, томат) виды семейств крестоцветных (турнепс, рапс, арабидопсис), бобовых (люцерна, клевер); доказана трансформация у ряда однодольных (аспарагус, нарцисс); получены клеточные линии трансформантов у пшеницы-однозернянки.

Анализ трансформантов показывает, что в большинстве случаев имеет место интеграция нескольких копий гена, часть из которых нефункциональна; вместе с тем в гибридологическом анализе почти всегда интегрированные последовательности ведут себя как одна группа сцепления. Большинство трансформантов обнаруживает стабильность как в митотическом, так и мейотическом процессах, однако описаны и случаи нестабильности.

В настоящее время приемы трансформации широко используются при решении целого ряда проблем: инсерционного мутагенеза, выделения однокопийных генов, анализа механизмов интеграции и т. д. Наиболее интересные результаты получены пока что лишь в одном направлении: изучении тонкой организации и регуляции экспрессии растительных генов. Здесь наиболее впечатляющие результаты были представлены Р. Голдбергом, Дж. Шеллом, Н.-Х. Чуа, Р. Фрейли. Хотя эти ученые изучали механизмы регуляции работы различных генов (гены запасных белков, рибулесодифосфаткарбокксилазы-оксигеназы, хлорофиллсвязывающего белка, хальконсинтазы, белка теплового шока и др.), во всех случаях они использовали одну и ту же методологию, основанную на применении техники рекомбинантных ДНК, а именно: изучаемый ген выделяли и с помощью различных приемов вводили в геном других (обычно филогенетически далеких) видов растений, что позволило изучать поведение гена в гетерологической системе, вдали от обычного места расположения на хромосоме и в новом молекулярном окружении, а также в условиях, когда промоторные участки заменены или модифицированы. Эти исследования убедительно свидетельствуют, что органи-

специфическая и индуцируемая внешними условиями регуляция генной активности определяется прежде всего последовательностями ДНК в области инициации транскрипции. Получены ценные сведения о транскрипции и трансляции генов в гетерологических системах; как правило, они идут корректно, хотя обнаружено, что сплайсинг генов однодольных в клетках двудольных осуществляется неправильно. Охарактеризованы промоторы и энхансеры ряда растительных генов; начато исследование лидерных последовательностей, определяющих транспорт продукта действия гена в хлоропласты. Большое количество работ посвящено активации генов в связи с развитием и изменением факторов внешней среды. Накоплен значительный материал в отношении ответов растительного организма на различные стрессовые факторы (тепловой, анаэробный и солевой стрессы). Начата работа по выявлению и изучению генов, регулирующих активность генов в транс-положении; значительный интерес в этой связи привлекает изучение фитохромной системы регуляции, а также использование с целью выявления регуляторных белков системы транзитной экспрессии при накачке генов с регулируемыми промоторами в протопласты с помощью электропорирования.

Большое количество важных сведений получено в исследованиях по клеточной инженерии. Представлены строгие доказательства возможности рекомбинации хлоропластных ДНК в гибридах соматических клеток; обнаружено, что такое событие сопровождается возникновением очень большого числа сайтов рекомбинации на молекулу ДНК. В ряде экспериментов детально исследована судьба родительских ядерных и цитоплазматических генов при гибридизации соматических клеток. Впервые обнаружено и охарактеризовано явление пространственного разделения родительских геномов в метафазных ядрах соматических гибридов. Получены межвидовые соматические гибриды лимона, люцерны, клевера, рапса, турнепса, картофеля, томата, представляющие собой ценный исходный селекционный материал.

Получен с помощью клеточных технологий и охарактеризован ряд мутантов устойчивости к триазинным гербицидам, гербициду сульфонилмочевине, индолоуксусной кислоте и др. Получены соматические варианты пшеницы, риса, картофеля, представляющие практический интерес; обнаружено явление деградации хлоропластной ДНК в процессе андрогенеза (в андрогенетических гаплоидах) пшеницы.

Достигнут определенный прогресс в разработке методов культивирования прото-

пластов и клеток, регенерации растений у пшеницы, проса, риса, сои, гороха и ряда других культурных видов злаковых и бобовых.

Активизированы исследования структурной организации и экспрессии хлоропластных геномов растений. Наиболее разнообразная информация получена в отношении генов белков тилакоидных мембран. В состав тилакоидных мембран, ответственных за фотосинтез, входит около 45 различных белков, большая часть из них организована в четыре сложных комплекса. Часть этих белков кодируется хлоропластной ДНК (белки реакционного центра хлорофилла *a*, цитохром *b* и др.). Гены, кодирующие белки, найдены на обеих цепях хлоропластной ДНК, большинство генов не имеют интронов. Типичные опероны отсутствуют. Биосинтез тилакоидных мембран хлоропластов контролируется на различных уровнях, включая и посттранскрипционную регуляцию по принципу междистровного сплайсинга. Ряд генов (компоненты АТФ-азы, цитохром *b*/f) экспрессируется независимо от света, работа других (белки светособирающего фактора, хлорофиллсвязывающий, хлорофиллидредуктазы, малой субъединицы рибулезодифосфаткарбоксилазы - оксигеназы) регулируются светом. Большое внимание уделялось кодируемому хлоропластами белку тилакоидных мембран с молекулярной массой 32 000, организации и экспрессии генов большой субъединицы рибулезодифосфаткарбоксилазы-оксигеназы и генов рибосомных белков хлоропластов. Открыты еще несколько генов пластид, содержащих интроны. Широко изучается экспрессия хлоропластных и ядерных генов в процессе биосинтеза хлоропластов.

Заметно выросло количество исследований, посвященных генетическому контролю митохондрий. Размеры геномов митохондрий варьируют от 200 до 2400 тыс. пар нуклеотидов, при этом митохондриальные геномы представлены гетерогенной популяцией кольцевых и линейных молекул ДНК, образующихся в результате внутримолекулярной рекомбинации по коротким прямым повторам. Лишь небольшая часть митохондриальной ДНК обладает кодирующими функциями. По исследованиям продуктов трансляции митохондрий *in vitro* там синтезируется 20—30 полипептидов, видимо представляющих собой в основном компоненты ферментных комплексов на внутренних мембранах (две субъединицы цитохрома *c*, апоцитохром *b*, субъединицы 1, 6 и 9  $F_0$ -АТФ-синтазы, как минимум один белок миторибосом). Значительное число работ связано с изучением реорганизации митохондриаль-

ного генома в связи с культивированием *in vitro*, а также с анализом корреляций между измерениями, ведущими к цитоплазматической мужской стерильности, и реорганизации митохондриальных ДНК. В митохондриях ряда видов помимо крупных субгеномных ДНК обнаружены также линейные и миникольцевые плазмидоподобные ДНК. Некоторые из них содержат несколько генов (скорее всего гены, необходимые для их репродукции). У этих ДНК во всех случаях имеются высокоповторяющиеся последовательности, часть из них гомологична митохондриальным ДНК, однако имеются случаи гомологии с ядерной ДНК.

Ряд интересных сведений был представлен на симпозиумах, посвященных молекулярной биологии вирусов растений. За последние годы полностью расшифрована первичная последовательность ряда РНК-содержащих (вирусы табачной мозаики, мозаики коровьего гороха, мозаики кобры, мозаики люцерны) и ДНК-содержащих вирусов (вирусы мозаики цветной капусты, полосатости кукурузы); стала понятной молекулярная организация этих геномов. Выявлены основные пути экспрессии закодированной в этих геномах информации, стали более ясными функции кодируемых белков. Показано, что в вирусных геномах кодируются вирулентность, круг хозяев, распространение вируса от клетки к клетке, характер симптомов заболевания. Картирован ряд мутаций по этим фенотипам. Для анализа широко используются сайтспецифический мутагенез, метод обратной транскрипции, мутагенез геноинженерными методами, геноинженерное введение генов вирусных геномов в растения. Обнаружено, что молекулы белка оболочки вируса табачной мозаики всех изученных штаммов в зараженных листьях связываются с тилакоидными мембранами хлоропластов, что и приводит к возникновению симптомов болезни. Предположено, что введение в геном растений гена, обеспечивающего конститутивный синтез белка оболочки вируса ВТМ, может придать растению устойчивость к вирусу. В качестве альтернативных подходов в борьбе с вирусными заболеваниями изучается возможность введения в растения генов, обеспечивающих синтез антисенс-мРНК, и блокирования этим путем специфических вирусных РНК, а также детальное изучение механизмов действия белков, отвечающих за межклеточный перенос вируса (белок гена I ВМЦК, белок РЗО вируса ВТМ). Показано, что введение в растения различных фрагментов геномов вируса золотистой мозаики томата при гибридизации растений с дополняющими наборами фрагментов при-

водит к комплементации *in vivo* и развитию инфекции»

Во время конгресса обсуждались возможности решения прикладных вопросов с помощью генноинженерных и клеточных методов. Отмечено, что из технологических проблем неудовлетворительно решена лишь одна — проблема эффективной регенерации целых растений из протопластов и культивируемых единичных клеток у злаковых и бобовых. Есть некоторые основания считать, что в ряде случаев отсутствие регенерационной способности связано с частичной деградацией геномной ДНК в процессе специализации клеток. Таким образом, может оказаться, что соматические клетки злаковых не тотипотентны. Очевидно, что возможность создания растений с теми или иными новыми положительными свойствами с помощью технологии рекомбинантных молекул ДНК зависит от того, насколько проста проблема (генная технология сегодня эффективна лишь в тех случаях, когда проблема может быть решена изменением одного или немногих генов). К сожалению, в большинстве случаев мы плохо знаем молекулярные процессы, лежащие в основе тех или иных свойств растений. Последовательность решений прикладных проблем с помощью новых технологий на сегодняшний день такова (начиная с наиболее простых и близких): устойчивость к гербицидам, устойчивость к вирусам, иммунодиагностика для определения заболеваний, устойчивость к стрессовым факторам, повышенное качество белка, высокий урожай.

О конкретных успехах сообщили группы, занимающиеся созданием резистентных к гербицидам форм растений. Наиболее впечатляющие результаты достигнуты в отношении создания устойчивости к глифосату, этой проблемой занимаются компании Монсанто и Калген. Глифосат — гербицид тотального действия, которое связано с подавлением одного из ферментов шикиматного пути биосинтеза (5-энолпирувилшикимат-3-фосфат-синтаза). Попытки получить устойчивые к гербициду мутанты клеток высших растений оказались малорезультативными, однако резистентные формы удалось выделить у сальмонеллы. Оказалось, что устойчивость связана с единичной нуклеотидной заменой в гене, кодирующем вышеупомяну-

тый фермент, что приводит к полной утрате ингибирования. Ген устойчивости к глифосату уже встроен в растения табака и петунии и обеспечивает устойчивость, на три порядка превышающую таковую исходных форм. Фирма Монсанто планирует выпуск к 1995 г. коммерческих сортов пшеницы и сои, устойчивых к гербицидам, основой действия которых является глифосат. Аналогичные работы ведут с гербицидами хлорсульфурового ряда, действие которых состоит в подавлении активности ацетолактатсинтазы, фермента пути биосинтеза аминокислот с разветвленной молекулой. Здесь, однако, конкретные успехи на модельных растениях достигнуты с помощью клеточной селекции — у табака и арабидопсиса выделены мутанты, у которых ацетолактатсинтаза в 100—1000 раз менее чувствительна к метилсульфону (компания Дюпон). Следует полагать, что в ближайшее время будет найдено и генноинженерное решение проблемы. Наконец, третьим успешным примером могут быть работы по получению устойчивых к гризониновым гербицидам форм растений. Такого рода исследования особенно активно ведет фирма Циба-Гейги. Триазины подавляют фотосистему II, связываясь с так называемым белком 32 000. Устойчивость может быть достигнута, как показали исследования спонтанно возникших биотипов сорняков резушки и черного паслена, путем всего одной аминокислотной замены. Генноинженерное решение проблемы не за горами (трудности, в частности, состоят в том, что ген белка 32 000 находится на хлоропластной ДНК, а сама мутация рецессивна), однако уже сегодня имеются примеры переноса хлоропластов с геном устойчивости к триазинам от резушки к турнепсу, а также от черного паслена к томату с помощью гибридизации соматических клеток. Эти первые практические успехи очень радуют и, если говорить о сегодняшнем «реалистичном» (в противовес вчерашнему «оптимистичному») прогнозе возможностей генетической инженерии растений, то коррективы потребуются лишь в отношении ранее называвшихся сроков. Сами надежды остаются такими же большими, а результаты, вероятно, превзойдут самую необузданную сегодняшнюю фантазию.

Ю. Ю. ГЛЕБА