

ETHYLENE IN PLANT LIFE

O. N. KULAEVA

Plant life regulation by ethylene, its biosynthesis and its practical application are considered. Special attention is paid to ethylene insensitive mutants of Arabidopsis thaliana. New evidences on ethylene perception and signal transduction pathway in plants are discussed.

Рассмотрены регуляция этиленом жизни растений, его биосинтез и практическое применение. Особое внимание уделено этиленнечувствительным мутантам *Arabidopsis thaliana*. Обсуждаются новые данные о системе восприятия и передачи этиленового сигнала в растениях.

ЭТИЛЕН В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ

О. Н. КУЛАЕВА

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Газ этилен (C_2H_4) справедливо относят к гормонам растений, так как он синтезируется в растениях и в крайне низких концентрациях регулирует их рост, активизирует созревание плодов, вызывает старение листьев и цветков, опадение листьев и плодов, участвует в ответе растений на различные стрессовые факторы и в регуляции многих других важных событий в жизни растения [1]. Этилен, точнее, этиленпродуценты – соединения, разрушение которых сопровождается выделением этилена, имеют широкое применение в практике сельского хозяйства. Все это определяет большое внимание биохимиков, физиологов, генетиков, молекулярных биологов и практиков к изучению этилена.

В последние годы большие успехи достигнуты в получении и изучении мутантных растений, нечувствительных к этилену. Эти мутанты обеспечили прогресс в выделении генов, отвечающих за восприятие и передачу этиленового сигнала в растениях, и помогли частично расшифровать молекулярные пути, по которым сигнал проходит, вызывая включение или подавление определенных физиологических программ. Этот успех и побудил автора написать статью об этилене. Ее целью является рассмотрение регуляторной роли этилена в растениях, его практического применения, особенностей его биосинтеза, а также новейших данных о механизме действия этого фитогормона.

ОТКРЫТИЕ ГОРМОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭТИЛЕНА

Участие этилена в регуляции роста растений было открыто Д.Н. Нелюбовым в Санкт-Петербургском университете в 1901 году. Д.Н. Нелюбов установил, что содержащий этилен светильный газ вызывает большие изменения в росте проростков гороха. В крайне малых концентрациях (1 часть на 1600 000 частей воздуха) этилен вызывал тройную реакцию стебля этиолированных (выращенных в темноте) проростков гороха: он подавлял рост стебля в длину, вызывал его утолщение и изгиб в горизонтальном направлении.

Несмотря на публикацию этих сведений, мировая научная общественность не обратила внимание на регуляторное действие этилена на рост растений. Этилен был заново открыт в качестве регулятора физиологических процессов у растений в 20-е годы в результате работ Ф. Денни (США) по ускорению

созревания плодов под воздействием этилена. В последующем был обнаружен широкий спектр физиологических процессов, регулируемых этиленом, и установлены пути его биосинтеза у растений, то есть доказано, что этилен представляет собой один из гормонов растений (фитогормонов), который в соответствии со свойствами гормонов образуется в растениях и в крайне низких концентрациях регулирует важнейшие программы их жизни. Только в отличие от других гормонов он не поступает из одних органов в другие, выполняя роль дистанционного сигнала. Вместо этилена по растению транспортируется его предшественник, который и участвует в передаче сигнала. Сам же этилен, выделяясь из растения в окружающую атмосферу, может обеспечивать сигнализацию между растениями.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТИЛЕНА

Как показано в опытах Д.Н. Нелюбова, этилен угнетает рост стебля в длину и вызывает его утолщение. Впоследствии ученые выяснили, что это происходит за счет изменения направления роста клеток стебля, которому соответствует изменение ориентации элементов цитоскелета. Этилен подавляет рост корня, ускоряет старение, что хорошо прослеживается на листьях и цветках растений. Этилен ускоряет также созревание плодов, вызывает опадение ли-

стьев и плодов (рис. 1). Он индуцирует образование в черешке специального отдельного слоя клеток, по которому происходит отрыв листа от растения, а на месте отрыва вместо ранки остается индуцированный этиленом защитный слой клеток с опробковевшими стенками. Этот фитогормон влияет на пол цветков, вызывая образование женских цветков у растений, для которых характерны раздельные женские и мужские цветки, например у огурца, тыквы и кабачков.

Образование корней на стебле и формирование в стебле особой ткани — аэренхимы, по которой кислород поступает в корни, индуцируются этиленом. Это спасает растения в условиях кислородного голодания корней, в которое они попадают при затоплении почвы. Помимо этого этилен вызывает и другие изменения в растениях. Например, эпинастию, изменяющую угол наклона листа по отношению к стеблю (листья опускаются).

В ответах растений на различные повреждающие воздействия — механические, химические и биологические — также участвует этилен. Он вовлекается в ответ растений на атаку патогенов. Этилен включает системы защиты растений от патогенов. При этом он индуцирует синтез большого числа ферментов, например ферментов, разрушающих клеточную стенку грибов (хитиназы, специфические глюканазы), а также ферментов, участвующих в

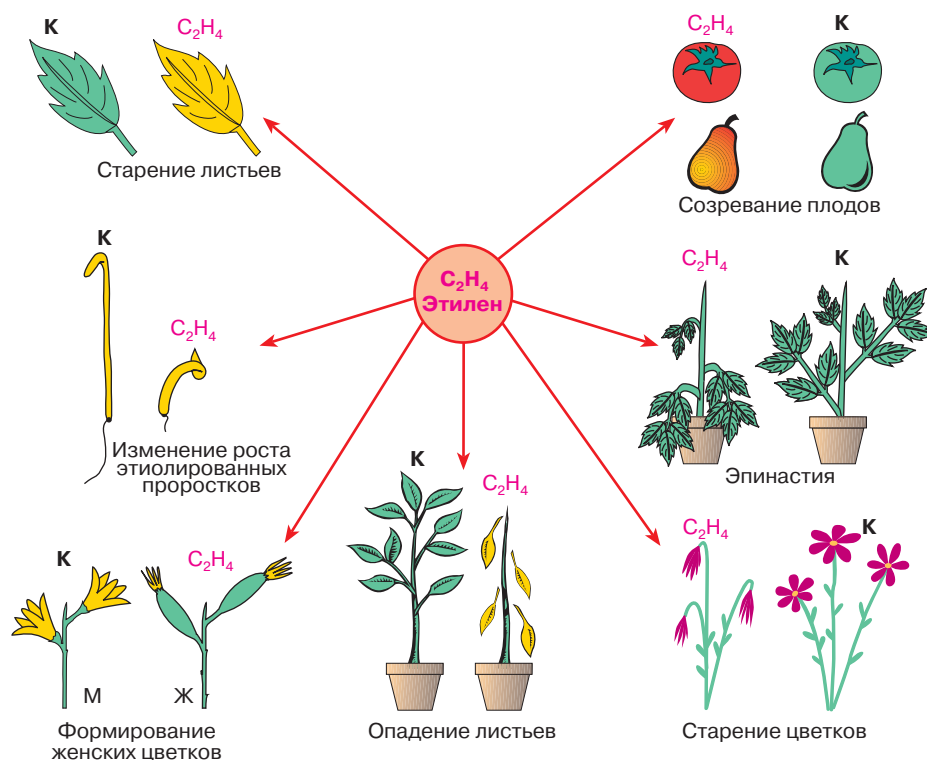


Рис. 1. Схема реакций растений на этилен. К – контроль, без этилена; C_2H_4 – обработка этиленом

синтезе фитоалексинов — соединений, ядовитых для патогена.

При поранении растений происходят синтез и выделение этилена. Есть данные о том, что при объедании листьев древесных растений животными объеденное растение выделяет этилен и под его воздействием в листьях соседних растений могут синтезироваться вещества, делающие листья невкусными для животных.

БИОСИНТЕЗ ЭТИЛЕНА

Ключевым соединением для биосинтеза этилена в растениях является аминокислота метионин. При взаимодействии метионина с макроэргическим соединением АТФ возникает промежуточный продукт S-аденозилметионин, который далее превращается в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК) — непосредственный предшественник этилена в растениях. Затем АЦК в присутствии кислорода разлагается с образованием этилена, аммиака, муравьиной кислоты и CO_2 (рис. 2). Каждый этап катализируется определенным ферментом. Ключевым ферментом, на уровне которого регулируется биосинтез этилена, является АЦК-синтаза. АЦК-синтаза не синтезируется в клетках постоянно, а индуцируется индукторами — веществами, вызывающими ее синтез. Такие ферменты принято называть индуцибельными. Синтез АЦК-синтазы индуцируют высокие концентрации ауксина, молекулы — химические сигналы грибной инфекции, а также сам этилен. Синтез АЦК-синтазы идет до тех пор, пока присутствует индуктор. Затем синтез прекращается, а образованные молекулы фермента быстро разрушаются, так как период их полураспада

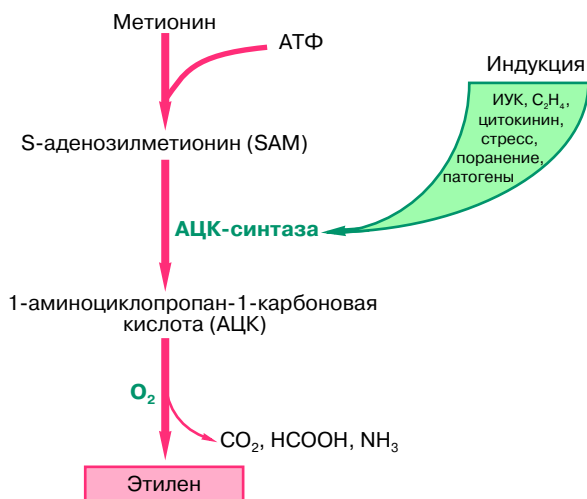


Рис. 2. Схема биосинтеза этилена в растениях. Указаны индукторы АЦК-синтазы и кислородозависимость последнего этапа биосинтеза этилена

составляет 20–30 мин. Это подчеркивает, как жестко растение контролирует синтез этилена на уровне образования и разрушения ключевого фермента биосинтеза АЦК-синтазы.

Существенно, что в геноме растений существует большое семейство генов АЦК-синтазы, которые различаются по своей регуляции: одни включаются на разных стадиях нормального развития растений, другие — при поранении, третьи — при действии патогена и т.д. Это обеспечивает многофакторную систему регуляции синтеза этилена в растениях. Гены АЦК-синтазы и АЦК-оксидазы привлекают большое внимание генных инженеров, так как модификация растений по этим генам позволяет регулировать синтез этилена и, следовательно, регулировать скорость созревания плодов. На этом пути американские генные инженеры получили трансгенные растения томатов с увеличенным на месяц сроком хранения плодов.

Следующий этап биосинтеза этилена сводится к окислению АЦК. Он кислородозависим и не протекает в условиях кислородного голодания (анаэробии). Такая ситуация возникает в корнях при затоплении почвы. Без кислорода подавляются дыхание корня, синтез АТФ и зависящие от нее процессы. Нарушается снабжение побегов водой, элементами минерального питания, гормонами (цитокининами) и другими продуктами жизнедеятельности корня. Все это грозит гибелью растений. И тут включается этиленовая система защиты. В условиях анаэробии превращение в корнях АЦК в этилен прекращается. АЦК поступает в составе пасоки — раствора, поступающего из корней в побеги, в надземные органы, где нет недостатка O_2 , и превращается там в этилен. Этилен индуцирует в побегах эпинастию — изменение угла наклона черешка к стеблю, в результате которого листья опускаются вниз, уходя от прямого действия солнечных лучей (см. рис. 1). При этом листья меньше нагреваются и меньше испаряют воды. Этилен индуцирует образование на стеблях корней, которые не выполняют поглощающей функции, но осуществляют специфические синтетические процессы, необходимые для нормального функционирования побега, в том числе восстанавливают снабжение надземных органов цитокининами. Кроме того, этилен индуцирует образование в стебле аэренхимы — ткани, по которой O_2 попадает из стеблей в корни и обеспечивает их нормальную жизнедеятельность. Этот пример хорошо иллюстрирует, как этилен обеспечивает адаптацию растений к условиям кислородной недостаточности в зоне корней, возникающей при затоплении почвы.

При нормальном протекании жизни растений этилен активно синтезируется в созревающих плодах и стареющих листьях. Это понятно: он индуцирует созревание плодов, старение и опадение листьев. Однако высокий уровень синтеза этилена характерен

также для меристематических тканей — зон клеточного деления. Это пока трудно объяснить. Синтез этилена в растениях вызывают высокие концентрации ауксина, что происходит на уровне индукции генов АЦК-синтазы. Синтезированный этилен подавляет реакции, вызываемые ауксином. Например, в определенном диапазоне концентраций ауксин активирует рост корня. Их превышение индуцирует синтез этилена, который подавляет рост корня. Таким образом, этилен включается в контроль растением действия ауксина по принципу обратной связи. Этилен выполняет такую же роль и в реакциях растений на высокие концентрации цитокининов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЭТИЛЕНА

Этилен находит широкое использование в сельском хозяйстве. Применяют не непосредственно этилен, а так называемые этилен-продуценты, которые разлагаясь образуют этилен. Наиболее распространен среди них этефон — 2-хлорэтилфосфоновая кислота:



Этефон применяют для ускорения созревания и облегчения уборки томатов, для их послеуборочного дозревания (дозаривания), что особенно важно в условиях короткого лета. Обработка этефоном облегчает механизированную уборку яблок, вишен, цитрусовых, облепихи, винограда. На плантациях каучуконосов этефон усиливает отделение латекса у каучуконосных деревьев гевеи, ускоряет выделение живицы у сосны. Его применяют для борьбы с полеганием посевов ржи и ячменя. Этефон способствует формированию укороченного толстого стебля, не лежащего под тяжестью колоса. Его применяют при выращивании огурцов для консервирования. Этефон подавляет развитие мужских цветков и стимулирует формирование женских цветков с последующим партенокарпическим (без оплодотворения) развитием плодов. Этефон используют для опадения листьев хлопчатника перед машинной уборкой коробочек, применяют для регуляции зацветания ананасов и на многих других культурах.

АРАБИДОПСИС – РАСТЕНИЕ, ОБЕСПЕЧИВШЕЕ УСПЕХ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЭТИЛЕНА

Успех в изучении механизма восприятия и передачи этиленового сигнала был достигнут на растениях *Arabidopsis thaliana* (резушка Таля). Это излюбленный объект генетиков и молекулярных биологов растений, подобно плодовой мушке-дрозофиле у генетиков животных.

Арабидопсис обладает самым маленьким среди изученных растений геномом (совокупность генов данного организма) — всего 120 млн пар оснований, что составляет 3% от генома человека. Диплоидная

клетка содержит всего 5 пар хромосом. В отличие от других растений ДНК арабидопсиса содержит мало нуклеотидных последовательностей, которые не принимают непосредственного участия в кодировании белка. У арабидопсиса сравнительно короткий жизненный цикл — около 6 недель. Он дает очень много мелких семян. Само растение тоже небольшое, что позволяет работать с ним в стерильных условиях, выращивая растения в колбах. Все это создает большие преимущества арабидопсиса как модельной системы для изучения генома растений. Правительством США создана специальная программа и выделены фонды для определения нуклеотидной последовательности полного генома арабидопсиса. Исследование генома арабидопсиса важно потому, что существует много общего в геномах всех 250 000 видов растений. Это позволяет выделить интересующий ген из арабидопсиса, а затем, используя его в качестве зонда, извлечь соответствующий ему ген из другого растения с более сложной организацией генома.

В настоящее время получено большое число мутантов арабидопсиса с повреждением единичного гена. Эти мутанты позволяют изучать генетику роста и развития, фотосинтеза, ответ растений на внешние воздействия и генетику метаболических цепей. В частности, в США получены мутанты арабидопсиса, нечувствительные к этилену. Их обработка этиленом не давала типичного ответа проростков на C_2H_4 : у мутантов в отличие от дикого типа (не мутантных растений) не происходило подавление роста стебля в длину, его утолщение и подавление роста корня. Этилен не вызывал у мутантов активации этиленчувствительных генов, например генов хитиназы, не ускорял старения листьев и не вызывал эпинастии. Все это позволило предполагать, что поврежден ген рецептора, через который проявляются все реакции растений на этилен. Полученные мутанты позволили перейти к выделению генов восприятия и передачи этиленовых сигналов.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНА – РЕЦЕПТОРА ЭТИЛЕНА

Исследования, проведенные М. Холлом (Великобритания) и Э. Сислером (США), показали, что: 1) клеткам растений присуща способность обратимо связывать этилен, 2) ингибирование этого процесса приводит к подавлению типичных реакций растений на этилен, 3) этиленсвязывающий белок находится в клеточной мембране. Исследование нечувствительных к этилену мутантов арабидопсиса подтвердило, что у них резко снижено связывание этилена. Это позволяло ожидать, что у мутантов поврежден ген рецептора этого гормона. Большой прогресс был достигнут в результате работ нескольких групп американских исследователей, включая А. Бликера, Дж. Еккера, Х. Клея.

Один из генов, вызывающих нечувствительность к этилену (*etr1*), выделен и клонирован А. Бликером.

Затем ген был введен в клетки дрожжей, в которых и осуществлен синтез кодируемого геном *etr1* белка. Этот белок ETR1 придавал клеткам дрожжей способность связывать этилен, которая отсутствовала у контрольных дрожжей. Связывание происходило с той же кинетикой, что в клетках растений, и подавлялось теми же ингибиторами. Все это позволяло заключить, что в дрожжах синтезирован рецептор этилена. Он представляет собой белок 79 kD, который образует димер (147 kD), две субъединицы которого соединены дисульфидным мостиком. Установление нуклеотидной последовательности гена *etr1* позволило вывести из нее аминокислотную последовательность кодируемого им белка ETR1. Белок проявил высокую гомологию с бактериальной гистидиновой протеинкиназой, входящей в состав бикомпонентной сигнальной системы бактерий. Она называется бикомпонентной потому, что действует в два этапа и включает в себя два белка: сенсор и эффектор (рис. 3).

На первом этапе принятый сенсорной гистидиновой протеинкиназой сигнал возбуждает активность фермента и приводит к фосфорилированию в его молекуле всего одного гистидинового остатка, расположенного в строго определенном участке молекулы, высоко консервативном у всех гистидиновых протеинкиназ. На втором этапе функционирования бикомпонентной сигнальной системы фосфатная группа передается с гистидинового остатка на остаток аспарагиновой кислоты, расположенной у бактерий обычно в другом белке. В результате фосфорилирования он активируется и

приобретает способность регулировать активность генов, включая одни из них и выключая другие. Таким путем осуществляется ответ клетки на принятый сигнал. Гистидиновые протеинкиназы, входящие в состав бикомпонентной сигнальной системы, широко распространены у бактерий и участвуют в их реакциях на изменение осмотических условий среды, концентрации в ней необходимых метаболитов, в явлениях хемотаксиса и взаимодействии с хозяином. В эукариотических клетках широко распространены сериновые и треониновые протеинкиназы, которые фосфорилируют у белков определенные сериновые и треониновые остатки, и тирозиновые протеинкиназы, фосфорилирующие тирозиновый остаток. Гистидиновая протеинкиназа считалась специфичной для бактерий, однако она обнаружена также у дрожжей, где участвует в ответе на солевой стресс, и у млекопитающих. Установленная А. Бликером принадлежность ETR1 арабидопсиса к гистидиновым протеинкиназам является первым сообщением об их присутствии у растений. Анализ аминокислотной последовательности ETR1, выведенной из нуклеотидной последовательности его гена, обнаруживает в белке три различные части (см. рис. 3). Одна из них (расположена на N-конце молекулы) отличается высокой гидрофобностью. Она уникальна по своей структуре, не имеет в банке данных аналогов с другими белками. Эта часть молекулы локализована в мембране и ответственна за связывание этилена. Далее в молекуле расположена гистидиновая протеинкиназа, которая должна фосфорилировать 353-й гистидин и далее передавать фосфатную группу на 659-й остаток аспарагиновой кислоты, расположенной ближе к С-концу молекулы. Судя по аминокислотной последовательности, в молекуле этиленового рецептора содержатся и сенсорная и эффекторная части бикомпонентной сигнальной системы бактерий. Кстати, такая ситуация встречается и у бактерий.

Генетические опыты показали, что у арабидопсиса за рецепторным белком ETR1 в системе переноса этиленового сигнала должен быть расположен белок CTR1, блокирующий в норме прохождение сигнала. Мутация по его гену *ctr1* приводит к морфологическим изменениям у арабидопсиса, которые могли бы возникнуть при постоянном включении этиленовой программы. Этот белок репрессирует этиленовые программы у дикого типа. Изучение первичной структуры (аминокислотной последовательности) белка CTR1 показало его принадлежность к семейству широко распространенных у эукариот серин/треониновых протеинкиназ, участвующих в так называемом MAP-киназном каскаде (MAP от англ. mitogen activated protein), в котором последовательно одна киназа фосфорилирует другую и тем самым активирует ее для фосфорилирования следующей протеинкиназы в цепи передачи сигнала на белки хроматина.

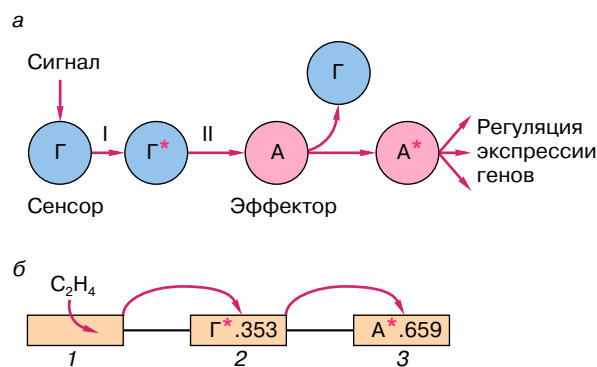


Рис. 3. а – бикомпонентная сигнальная система бактерий. Звездочкой помечены фосфорилирование гистидина в составе гистидиновой протеинкиназы и перенос фосфатной группы на остаток аспарагиновой кислоты в молекуле эффектора. Римскими цифрами помечены два этапа переноса сигнала. б – схематическое изображение структуры этиленового рецептора ETR1 у арабидопсиса: 1 – гидрофобный, этиленсвязывающий домен на N-конце белка; 2 – домен, соответствующий гистидиновой протеинкиназе, автофосфорилирующей 353 гистидиновый остаток в молекуле; 3 – домен, содержащий остаток аспарагиновой кислоты, на который должен переноситься фосфат с гистидина

Таким образом установлено, что в передаче этиленового сигнала в клетках арабидопсиса принимают участие сигнальные системы как бактериального (гистидиновая протеинкиназа — ETR1 — рецептор этилена), так и эукариотического типа (репрессор передачи сигнала CTR1, серин/треониновая протеинкиназа, относящаяся к MAP-киназному каскаду). Необходимы исследования для выяснения конкретного взаимодействия в клетках этих регуляторных систем. Цепочка последующих этапов передачи этиленового сигнала еще не изучена. Она может быть достаточно сложной и включать в себя, например, так называемые G-белки, что показано в лаборатории М. Холла. Эти белки присоединяют к себе GTP (гуанозинтрифосфат) и в результате приобретают способность к передаче сигналов от одного белка к другому.

Известно, что в конечном счете этилен включает определенные генетические программы, обеспечивающие специфический ответ на него растения. Например, индукция этиленом защитных реакций растений на патоген включает в себя активацию генов β -1,3-глюканазы, щелочной хитиназы, PR-белков, халкон-синтазы и богатых оксипролином гликопротеинов. Этого не происходит у нечувствительных к этилену мутантов. В настоящее время несколько этилениндуцируемых генов хорошо изучены и найдены регуляторные элементы (РЭ) в ДНК их промоторов, которые ответственны за включение генов этиленом. Эти РЭ имеют общие нуклеотидные последовательности у разных этилензависимых генов. Обнаружены белки, способные узнавать РЭ этилениндуцируемых генов, представляющие собой, по-видимому, трансфакторы, взаимодействие которых с РЭ включает гены. В этих белках имеется общая аминокислотная последовательность (59 аминокислотных остатков), обеспечивающая их связывание с ДНК. Допускают, что эти белки могут быть мишенью для рассмотренного выше сигнального каскада, хотя это еще необходимо доказать. Поэтому на схеме, суммирующей все приведенные сведения о возможном механизме действия этилена, стрелки, идущие к трансфакторам, показаны пунктиром (рис. 4). В основу представленной схемы положена одна из гипотез А. Бликера [4]. Исследования механизма действия этилена развиваются настолько быстро, что нет сомнения в том, что в ближайшее время будет выяснена вся цепь событий от взаимодействия этилена с его рецептором до включения этилениндуцируемых генетических программ.

Достигнутый на *Arabidopsis thaliana* прогресс в изучении этиленового рецептора и его гена позволил выделить соответствующий ген из генома томатов и синтезировать в дрожжевой системе закодированный в нем белок со свойствами рецептора этилена (Х. Клей). Этот белок TAE1 организован по тому же принципу, что и ETR1 у арабидопсиса. Кроме того, у томатов выделены другие гены, гомоло-

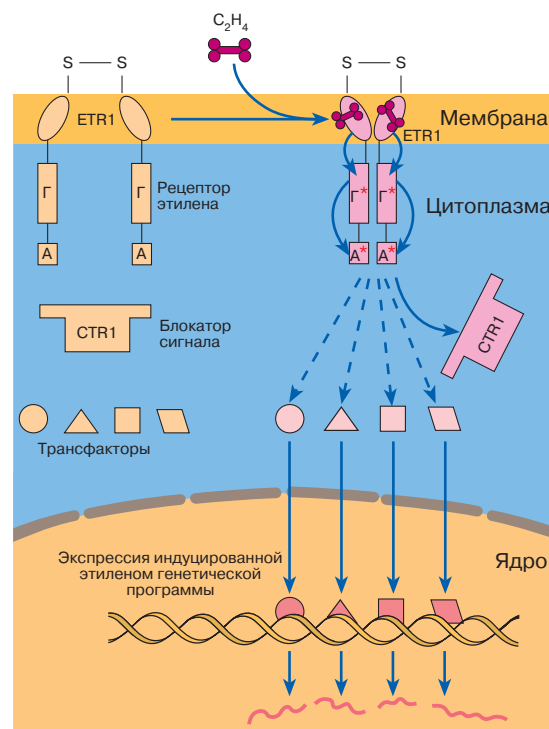


Рис. 4. Гипотетическая схема передачи этиленового сигнала у растений. ETR1 — димерный белок рецептора этилена; CTR — блокатор этиленовой программы, который инактивируется сигналом с ETR1. Пунктиром показана предполагаемая передача сигнала на трансфакторы, которые в результате этого приобретают способность взаимодействовать с регуляторными элементами этилензависимых генов и вследствие этого включать их активность

гичные *etr1* арабидопсиса, но имеющие определенные отличия от него (Х. Клей). Исследования на арабидопсисе и томатах показали, что, по-видимому, рецепторы этилена кодируются мультигенным семейством, отдельные гены которого по-разному экспрессируются в ходе роста и развития растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Почти за 100 лет, прошедших с момента открытия действия этилена на растения, исследования в этой области прошли через несколько пиков. Первый был связан с выяснением всей полноты эффектов этилена на растения и с его практическим применением в сельском хозяйстве. Второй определился успехами в области изучения биосинтеза этилена в самом растении и выяснении роли этого процесса в ответе растений на внешние воздействия. Третий проходит в наши дни. Он связан с изучением генетики и молекулярной биологии восприятия и передачи гормонального сигнала в растениях. Этот этап обещает дать в руки исследователей

принципиально новые пути управления жизнью растений через получение генноинженерным путем трансформантов с заданными параметрами роста, плодоношения и скорости созревания плодов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаева О.Н. Как регулируется жизнь растений // Соросовский Образовательный Журнал. 1995. № 1. С. 20–27.
2. Полевой В.В. Фитогормоны. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 249 с.
3. Ecker J.R. The Ethylene Signal Transduction Pathway in Plants // Science. 1995. Vol. 268. P. 667–675.
4. Bleecker A.B., Schaller G.E. The Mechanism of Ethylene Perception // Plant Physiol. 1996. Vol. 111. P. 653–660.

* * *

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. Читает спецкурс “Регуляторные системы растений” на кафедре физиологии растений Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и спецкурс “Фитогормоны” в Пущинском государственном университете. Автор 254 печатных работ, в том числе двух монографий. Награждена премией им. К.А. Тимирязева РАН.