



## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ СО СТРЕССОМ, У ДВУХ ЛИНИЙ ГОРОХА, КОНТРАСТНЫХ ПО ПРИЗНАКУ УСТОЙЧИВОСТИ К КАДМИЮ

© О.А. Кулаева, Э.С. Грибченко, Е.А. Зорин, М.С. Клюкова, В.А. Жуков

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург

Для цитирования: Кулаева О.А., Грибченко Э.С., Зорин Е.А., и др. Сравнительный анализ экспрессии генов, связанных со стрессом, у двух линий гороха, контрастных по признаку устойчивости к кадмию // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – № 4. – С. 75–84. doi: 10.17816/ecogen16475-84.

Поступила: 24.10.2018

Одобрена: 10.12.2018

Принята: 25.12.2018

❖ Проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами, в том числе кадмием, остро стоит перед современным обществом. В связи с этим изучение молекулярных и генетических механизмов, лежащих в основе устойчивости растений к этим токсичным веществам, является крайне актуальным в настоящее время. В данном исследовании был проведен сравнительный анализ экспрессии генов, связанных с развитием защитных реакций, у двух генотипов гороха, контрастных по устойчивости к кадмию. В исследовании использовали уникальный мутант гороха SGE<sup>Cd</sup>, характеризующийся повышенной устойчивостью к кадмию, и исходную линию SGE. У линии SGE обработка растений кадмием приводила к усилению экспрессии генов, кодирующих каталазу, хитиназу, гевеинподобный антимикробный пептид PRP4A и белок PI206 (относящийся к группе dirigent protein). У мутанта SGE<sup>Cd</sup> кадмий повышал экспрессию генов, кодирующих хитиназу, глутатионредуктазу и дефензин DRR230. В контрольных образцах экспрессия генов, кодирующих белки PRP4A и DRRR230, была усилена у мутанта SGE<sup>Cd</sup> по сравнению с линией SGE. Таким образом, на молекулярном уровне мутация в гене *cdt* модифицирует ответ на кадмий, причем у мутанта SGE<sup>Cd</sup> даже без воздействия кадмия было отмечено повышение уровня экспрессии некоторых генов, вероятно, опосредующих защиту от вредного воздействия данного тяжелого металла.

❖ **Ключевые слова:** горох посевной; кадмий; стресс; экспрессия генов.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF STRESS-RELATED GENES IN TWO PEA GENOTYPES CONTRASTING IN TOLERANCE TO CADMIUM

© O.A. Kulaeva, E.S. Gribchenko, E.A. Zorin, M.S. Kliukova, V.A. Zhukov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, Saint Petersburg, Russia

For citation: Kulaeva OA, Gribchenko ES, Zorin EA, et al. Comparative analysis of the expression of stress-related genes in two pea genotypes contrasting in tolerance to cadmium. *Ecological genetics*. 2018;16(4):75-84. doi: 10.17816/ecogen16475-84.

Received: 24.10.2018

Revised: 10.12.2018

Accepted: 25.12.2018

❖ **Background.** A major problem of the environmental pollution with heavy metals, including cadmium, requires an intensive study of the molecular and genetic mechanisms underlying the tolerance of plants to these toxic substances. In this study we present a comparative analysis of the expression of stress-related genes in two pea genotypes contrasting in tolerance to cadmium. **Materials and methods.** A unique mutant of pea SGE<sup>Cd</sup>, characterized by the increased tolerance to cadmium, and initial line SGE were used. Gene expression was analyzed by Real Time PCR. **Results.** In the line SGE cadmium increase the expression of genes, encoding catalase, chitinase, chitinase-like protein PRP4A and dirigent protein PI206. In the mutant SGE<sup>Cd</sup> cadmium increase the expression of genes, encoding chitinase, glutathione reductase and defensin DRR230. In control samples expression of genes encoding PRP4A and DRRR230 was enhanced in mutant SGE<sup>Cd</sup> versus line SGE. **Conclusion.** It was shown that, the reaction of the mutant SGE<sup>Cd</sup> at the molecular level differs from that of the line SGE. In the mutant SGE<sup>Cd</sup>, a change in the expression of a number of genes is observed, which may indicate that cadmium entering the cell causes activation of defense reactions.

❖ **Keywords:** pea; cadmium; stress; gene expression.

### ВВЕДЕНИЕ

Начавшаяся в конце XIX века эра индустриализации привела к активному росту промышленности и интенсивной добыче полезных ископаемых, следст-

вием которых стало усиление антропогенной нагрузки на окружающую среду, в том числе загрязнение почвы, атмосферы и водных ресурсов тяжелыми металлами. Одним из наиболее опасных и широко распростра-

ненных тяжелых металлов является кадмий, активное накопление которого в окружающей среде связано с горнодобывающей промышленностью, автотранспортной отраслью, использованием фосфатных удобрений. Через переносчики металлов кадмий проникает в растения и может накапливаться в наземной и подземной частях. Аккумуляция кадмия сельскохозяйственно ценными культурами и дальнейшая его передача по пищевым цепям представляет собой крайне актуальную проблему [1].

На молекулярно-клеточном уровне кадмий вызывает нарушение целостности мембран, заменяет некоторые элементы в функциональных центрах молекул, что приводит к инактивации многих белков. Повышение концентрации кадмия внутри клетки приводит к образованию активных форм кислорода [2]. Вышеперечисленные факторы вызывают нарушение процессов развития, питания, фотосинтеза, водного баланса у растений [3]. Для нивелирования негативного действия кадмия у растений функционируют ряд систем связывания данного тяжелого металла и репарации повреждений. Связывание кадмия происходит в основном за счет тиолосодержащих пептидов, таких как металлотионеины, глутатион, синтезируемые из него фитохелатины, и некоторых компонентов клеточной стенки [4]. Показано, что многие представители системы поддержания окислительно-восстановительного баланса, такие как супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы, пероксидазы, принимают активное участие в нивелировании окислительного стресса, вызванного интоксикацией клетки кадмием [5]. Ренатурация белков и восстановление целостности мембран, поврежденных кадмием, происходит при участии белков теплового шока. Ряд компонентов защитных реакций, связанных в основном с реакцией на биотические стимулы, также принимает участие в ответе клетки на проникновение ионов кадмия. К ним относятся гены, кодирующие хитиназы, халькон-изомеразы, дефензины, а также фенилаланин-аммоний-лиазу, представляющую собой ключевой фермент синтеза фенилпропаноидов [6].

Крайне важным является изучение влияния кадмия на не модельные объекты, часто относящиеся к ценным сельскохозяйственным культурам. Полученный во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург, Россия) мутант гороха *SGECd<sup>1</sup>* способен накапливать большее по сравнению с исходной линией количество кадмия. Признаки токсического отравления проявляются у мутанта при использовании более высоких (по сравнению с исходной линией) доз кадмия [7]. Таким образом, данный мутант интересен в качестве модели для изучения механизмов формирования устойчивости растений к кадмию. Ранее мутант *SGECd<sup>1</sup>* был охарактеризован как имеющий моногенное наследование и рецессивный фенотип. Локус *cdt* был локализован в 6-й группе сцепления гороха [8].

Для исследования молекулярных изменений, опосредованных мутацией в локусе *cdt*, в данной работе был проведен сравнительный анализ экспрессии ряда генов, связанных с формированием стрессового ответа на кадмий, у мутанта *SGECd<sup>1</sup>* и исходной линии *SGE*. К исследованным относятся гены, продукты которых связаны с процессами поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки и участвуют в защитных реакциях при абиотических и биотических стрессах. Ранее для некоторых из них было показано участие в ответе на действие ионов кадмия у других линий гороха [9–12], что позволяет рассматривать их в качестве маркеров развития стрессового ответа у гороха посевного. В рамках данной работы методом сравнительного анализа экспрессии генов, связанных со стрессом, было проведено исследование влияния кадмия на развитие защитных реакций у двух линий гороха, контрастных по признаку устойчивости к данному тяжелому металлу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы исходная линия гороха посевного (*Pisum sativum* L.) *SGE* [13] и мутант *SGECd<sup>1</sup>*, характеризующийся повышенными устойчивостью к кадмию и его аккумуляцией в тканях растений [7].

### Условия выращивания растений

Стерилизация семян концентрированной серной кислотой проводилась в течение 30 мин с последующей промывкой дистиллированной водой 6 раз.

Растения выращивались в условиях смены день/ночь — 16/8 ч, при температуре 21 °С, относительной влажности воздуха 75 %, освещенности 38 тыс. люкс, в условиях гидропоники с аэрацией.

Раствор хлорида кадмия (оч, Merck) концентрацией 3 мкМ добавляли в сосуды с питательной средой [7] к четырехдневным проросткам гороха. Срок обработки хлоридом кадмия составлял 1 и 3 суток. Отдельно собранные побеговая и корневая части растений (по 10 растений на вариант) были заморожены в жидком азоте. Было осуществлено три независимых биологических эксперимента.

### Выделение РНК

Для выделения РНК корни и побеги были гомогенизированы с использованием жидкого азота. Были взяты навески 50–100 мг растительной ткани. Выделение проводили с помощью набора NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Германия) согласно рекомендациям производителя.

### Определение концентрации РНК, постановка обратной транскрипции

Определяли концентрацию РНК на флуориметре Qubit 3 (Thermo Fisher Scientific, США). Для реакции

Таблица 1

Последовательности, использовавшиеся для анализа экспрессии генов

Table 1

## Sequences used for gene expression analysis

Ген	Прямой праймер: 5'-3' Обратный праймер: 5'-3'	Идентификатор в GenBank	Продукт гена
<i>PRP4A</i>	GCGTCATTATGGTTGGACTGCC CTGTAAGGTGACCCGCCTGGTA	AF137351	Белок PRP4A
<i>FNR</i>	TTGGCTGTGTCTCAGATGGCTG TCGGCACACTTGCTTGTTC	X99419	Ферредоксин-НАДФ <sup>+</sup> -редуктаза
<i>PI206</i>	GCACTCATCATCAAGGAACC GAAATCTCCAGTACCACCAG	M18250	Белок PI206
<i>CHI</i>	ATGAGTTCACAGCGGTGGTTA CCTTCCCATTAGTGGCAAGAG	U03433	Халкон изомераза
<i>GR</i>	CGGTTGTATCCAATGCTGG TATTAGGACGCTGAGCCCTG	X98274	Глутатионредуктаза
<i>HSP70</i>	GGTACTGTGCCTGCTTAC CCTCGAGCACTGAGACATC	L03299	Белок теплового шока
<i>FeSOD</i>	GCAACCGTACTTCTTCCCTCC GCGGTGGCTTCAGCTCAAAC	AY426764	Fe-супероксиддисмутаза
<i>MnSOD</i>	GGAGCAAGTTTGGTTCCATT AAGGTTATTCGGCCAGATTG	X60170	Mn-супероксиддисмутаза
<i>CHT</i>	GAGCAATGCGGTAGCCAAGC CCAGCACACCGTCCATCGTT	X63899	Хитиназа
<i>APXI</i>	ACCCAATGTTAGTCCCGATTACC TTCCGAAAGGACCACCAGTCTT	M93051	Аскорбат пероксидаза
<i>CAT</i>	AATCCCTATCTTCTGCTCCACCAC TCAGGTGCGAAATATCATGTGTGA	X60169	Каталаза
<i>DRR-230</i>	GCTTGCTTGTCTTCCCTCCTCC GCACCAACAGCGAAAGTCATCC	AF139018	Белок DRR230
<i>PAL1</i>	GAGAATCAACACTTCTCCAAGG GCATTAAGAATTTCACAGAGGT	D10002	Фенилаланин-аммоний-лиаза
<i>PAL2</i>	TTTGGAAATGGAAGTGAGTCAACT GCATTAAGTATTCTCCAGACGGTC	D10003	Фенилаланин-аммоний-лиаза
<i>GapC1</i>	AAGAACGACGAACTCACCG TTGGCACCACCCTTCAAATG	X73150	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа

обратной транскрипции была использована РНК в количестве 1,5 мкг. Реакцию проводили в объеме 20 мкл с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в автоматическом амплификаторе T 100Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США).

**Проведение ПЦР в режиме реального времени**

ПЦР в режиме реального времени осуществлялась в автоматическом амплификаторе C1000Thermal Cycler, совмещенном с оптическим модулем CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием коммерческого набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Реакцию проводили в объеме 10 мкл. Экспрессию генов выполняли в трех технических повторностях. Амплификацию анализировали по следующей программе: 95 °C — 30 с, 58 °C — 30 с и 72 °C —

30 с. Флуоресценцию интеркалирующего красителя SYBR Green I регистрировали в конце каждого цикла при 72 °C. Количественную оценку экспрессии анализируемого гена проводили с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1. В качестве референсного был использован ген *GapC1*, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу.

ПЦР в режиме реального времени осуществляли при помощи праймеров, представленных в табл. 1.

**Статистическая обработка данных**

Для сравнения экспрессии генов между образцами использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Тьюки. Нормальность распределения данных оценивали с помощью теста Шапиро – Уилка в среде статистической обработки R (версия 3.4.3).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ экспрессии генов в побегах и корнях был проведен после 1 и 3 суток инкубации растений в среде, содержащей 3 мкМ хлорида кадмия. Данные сроки были выбраны исходя из предварительных проведенных исследований морфофизиологических особенностей роста корневой системы данного мутанта в стрессовых условиях [14]. После 1 суток инкубации растений в среде с хлоридом кадмия влияние данного тяжелого металла на интенсивность развития корневой системы не было выявлено как у мутанта *SGECd<sup>l</sup>*, так и у исходной линии *SGE*. После 3 суток инкубации растений в среде с хлоридом кадмия скорость роста

корня у линии *SGE* была значительно снижена как по сравнению с контролем, так и по сравнению с мутантом *SGECd<sup>l</sup>*. У мутанта *SGECd<sup>l</sup>* скорость роста корня оставалась неизменной. Достоверности отличия экспрессии оценивали для корней и побегов в пределах одного срока.

После суточной обработки растений хлоридом кадмия в корнях мутанта *SGECd<sup>l</sup>* наблюдалось небольшое снижение экспрессии гена, кодирующего белок *PRP4A* (*PrP4A*), в то время как у исходной линии была выявлена небольшая активация экспрессии данного гена. Следует отметить, что в корнях контрольных образцов ген *PrP4A* экспрессировался активнее у мутанта *SGECd<sup>l</sup>* (рис. 1). В корнях линии *SGE* было

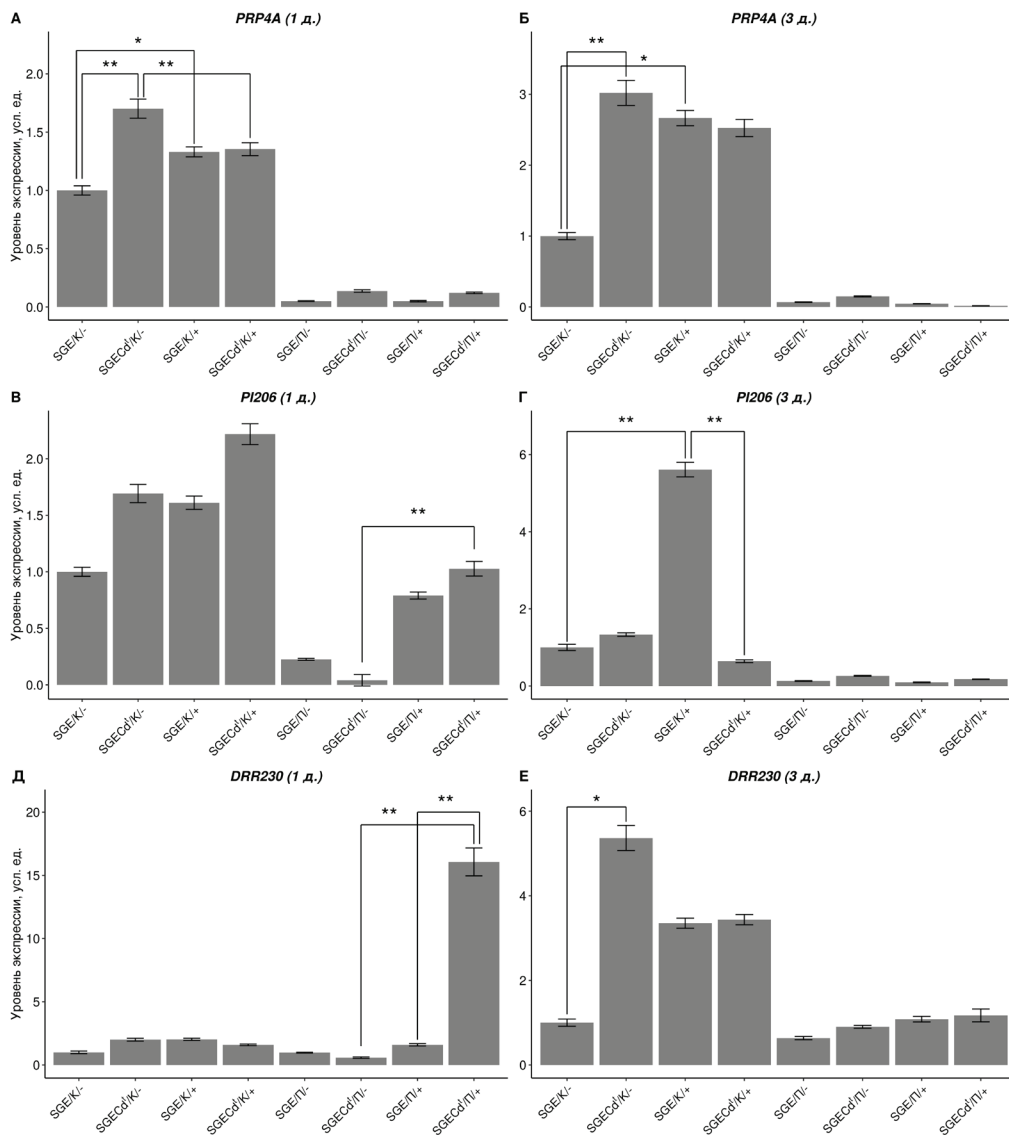


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии генов *PRP4A* (А, Б), *PI206* (В, Г), *DRR230* (Д, Е) в корнях и побегах исходной линии *SGE* и мутанта *SGECd<sup>l</sup>* в контрольных условиях и при воздействии 3 мкМ  $\text{CdCl}_2$ . «1 д.» — срок 1 сутки, «3 д.» — срок 3 суток. \* достоверные отличия,  $p < 0,05$ . \*\* достоверные отличия,  $p < 0,01$ . К — корень, П — побег. Знак «-» — контроль, знак «+» — опыт

Fig. 1. Changes in the expression of the *PRP4A* (A, B), *PI206* (B, Г), *DRR230* (Д, E) genes in the roots and shoots of the *SGE* line and *SGECd<sup>l</sup>* mutant under control conditions and after exposition with 3 μM  $\text{CdCl}_2$ . "1 d." — 1 day, "3 d." — 3 days. \* significant differences,  $p < 0.05$ . \*\* significant differences,  $p < 0.01$ . K — the root, П — shoot. "-" — control, "+" — treatment

обнаружено усиление экспрессии гена, кодирующего каталазу (*CAT*) (рис. 2). Также на данном сроке было показано небольшое снижение экспрессии гена, кодирующего фенилаланин-аммоний-лиазу (*PAL2*) в корнях, как у мутанта, так и у исходной линии (рис. 3). В побеговой части после одних суток инкубации растений в среде с хлоридом кадмия было выявлено значительной усиление экспрессии генов, кодирующих белки PI206 (*PI206*), DRR230 (*DRR230*) (см. рис. 1) и глутатион-редуктазу (*GR*) (см. рис. 2) у мутанта SGECd<sup>1</sup>.

После трех суток обработки растений хлоридом кадмия в корнях растений линии SGE было отмечено усиление экспрессии генов, кодирующих белок PRP4A

(*PrP4A*), белок PI206 (*PI206*) (см. рис. 1), глутатион-редуктазу (*GR*) и хитиназу (*CHT*) (см. рис. 2). В корнях мутанта SGECd<sup>1</sup> было обнаружено небольшое усиление экспрессии гена *CHT* (см. рис. 2). Как у мутанта SGECd<sup>1</sup>, так и у исходной линии SGE было установлено снижение экспрессии гена, кодирующего фенилаланин-аммоний-лиазу (*PAL2*) (см. рис. 3). Также было показано, что на данном сроке экспрессия генов *PrP4A*, *DRR230* (см. рис. 1) и *GR* (см. рис. 2) усилена в корнях контрольных образцов мутанта SGECd<sup>1</sup> по сравнению с линией SGE. Экспрессия гена, кодирующего фенилаланин-аммоний-лиазу (*PAL1*) была снижена в корнях как контрольных, так и опытных растений мутанта SGECd<sup>1</sup>

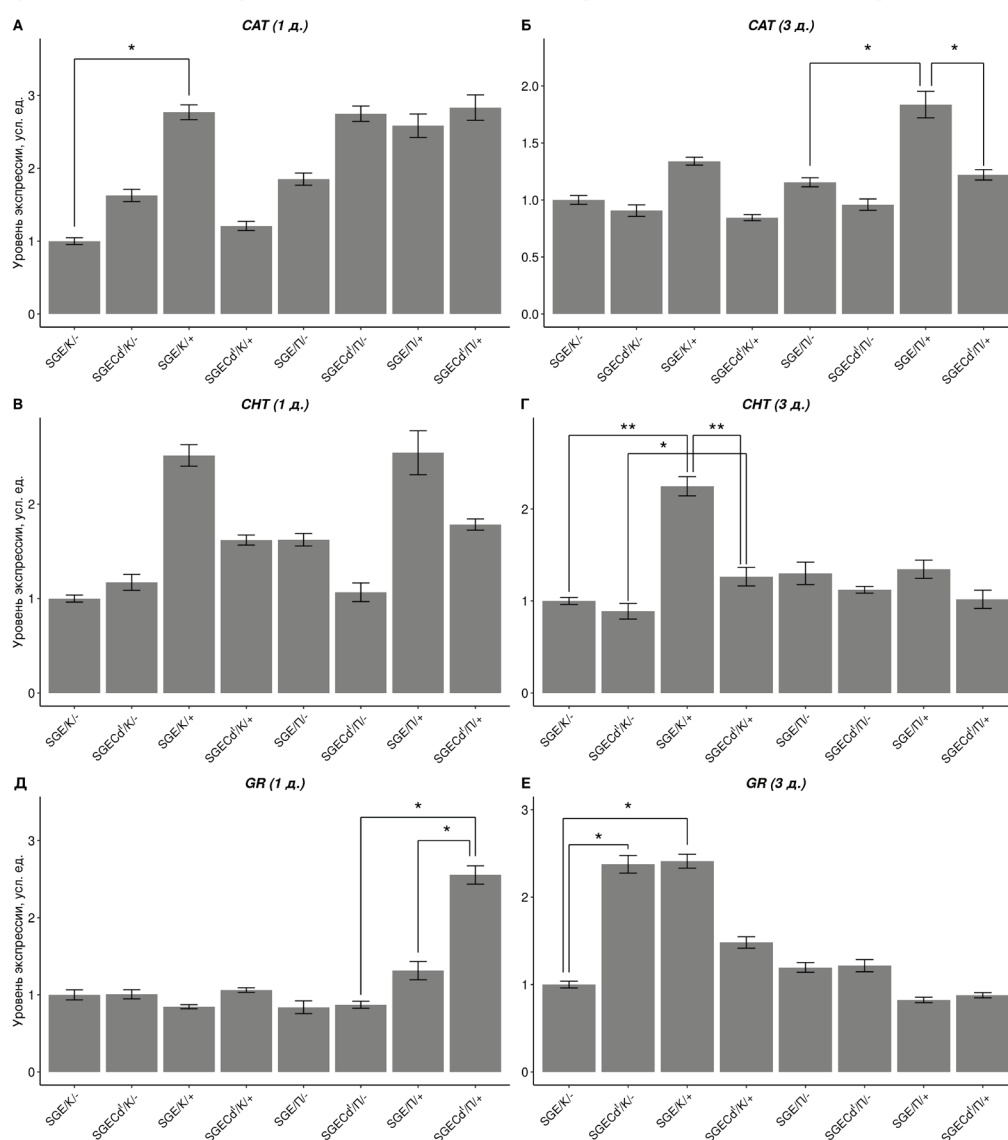


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии генов *CAT* (А, Б), *CHT* (В, Г), *GR* (Д, Е) в корнях и побегах исходной линии SGE и мутанта SGECd<sup>1</sup> в контрольных условиях и при воздействии 3 мкМ CdCl<sub>2</sub>. «1 д.» — срок 1 сутки, «3 д.» — срок 3 суток. \* достоверные отличия,  $p < 0,05$ . \*\* достоверные отличия,  $p < 0,01$ . К — корень, П — побег. Знак «-» — контроль, знак «+» — опыт

Fig. 2. Changes in the expression of the *CAT* (A, B), *CHT* (B, G), *GR* (D, E) genes in the roots and shoots of the SGE line and SGECd<sup>1</sup> mutant under control conditions and after exposition with 3 μM CdCl<sub>2</sub>. “1 d.” — 1 day, “3 d.” — 3 days. \* significant differences,  $p < 0.05$ . \*\* significant differences,  $p < 0.01$ . К — the root, П — shoot. “-” — control, “+” — treatment

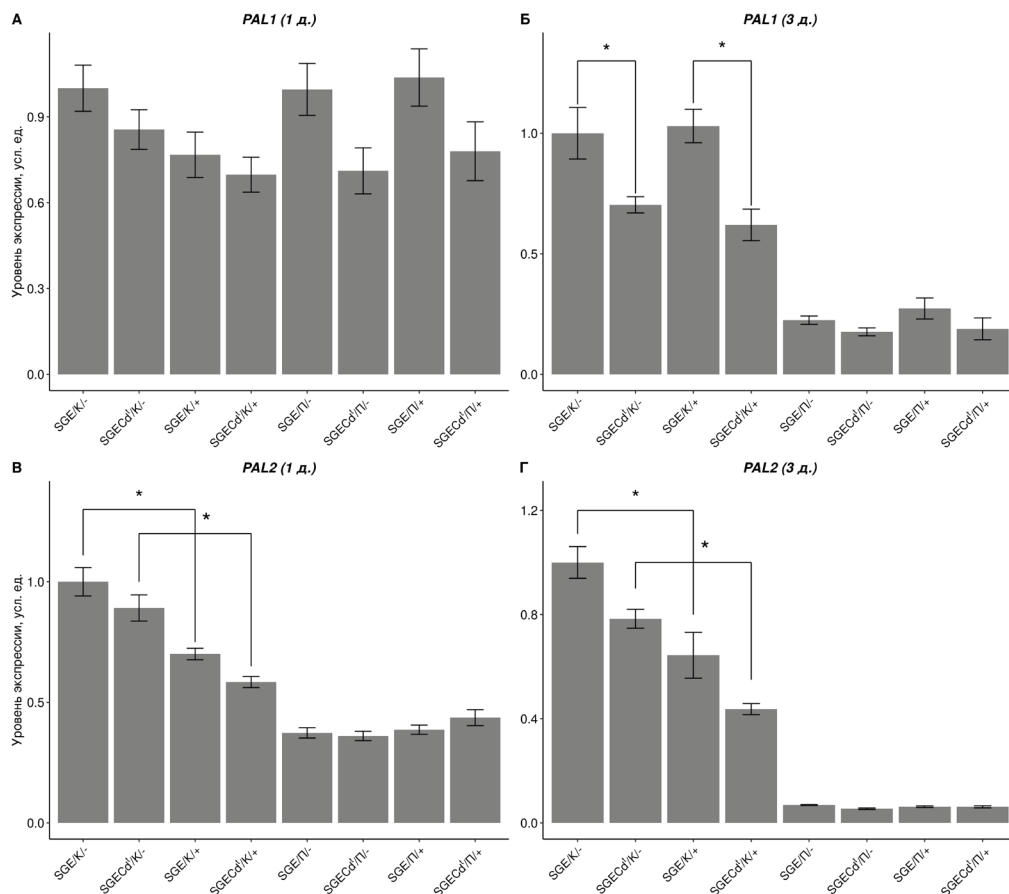


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии генов *PAL1* (А, Б), *PAL2* (В, Г) в корнях и побегах исходной линии SGE и мутанта SGECd<sup>1</sup> в контрольных условиях и при воздействии 3 мкМ CdCl<sub>2</sub>. «1 д.» — срок 1 сутки, «3 д.» — срок 3 суток. \* достоверные отличия,  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . К — корень, П — побег. Знак «-» — контроль, знак «+» — опыт

Fig. 3. Changes in the expression of the *PAL1* (A, Б), *PAL2* (В, Г) genes in the roots and shoots of the SGE line and SGECd<sup>1</sup> mutant under control conditions and after exposition with 3 μM CdCl<sub>2</sub>. “1 d.” — 1 day, “3 d.” — 3 days. \* significant differences,  $p < 0.05$ . \*\* significant differences,  $p < 0.01$ . К — the root, П — shoot. “-” — control, “+” — treatment

по сравнению с таковыми линии SGE (см. рис. 3). В побеговой части растений линии SGE после трех суток инкубации растений в среде, содержащей хлорид кадмия, было установлено усиление экспрессии гена, кодирующего каталазу (*CAT*) (см. рис. 2).

Для ряда генов нами не было выявлено достоверных отличий в уровне экспрессии как при обработке кадмием, так и в контрольных образцах корней и побегов растений разного возраста. К данным генам относятся гены, кодирующие Fe-супероксиддисмутазу (*FeSOD*), Mn-супероксиддисмутазу (*MnSOD*), белок теплового шока *HSP70* (*HSP70*), халкон изомеразу (*CHI*), аскорбат пероксидазу (*APX1*) и ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазу (*FNR*). Также для ряда генов нами был обнаружен органоспецифичный характер экспрессии. Так гены *CHI*, *PrP4A*, *PI206* сильнее экспрессировались в корнях обеих линий по сравнению с побегами. Экспрессия генов *HSP70*, *FeSOD* была усилена в побегах по сравнению с корнями. Органоспецифичный характер эк-

спрессии был одинаков как у линии SGE, так и у мутанта SGECd<sup>1</sup>.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В ответ на поступление ионов кадмия в растительной клетке изменяется характер экспрессии ряда генов, связанных в том числе и с активацией защитных реакций. Достаточно часто в качестве модели используется процесс «острого» стресса с применением концентраций, превышающих естественные в десятки раз. При этом чаще всего после кратковременной экспозиции растения погибают. Однако такие исследования не дают ответ на вопрос о том, какие процессы протекают у растений, выращенных в условиях, приближенных к естественным, когда растение в течение долгого времени сохраняет способность развиваться при наличии стресса, вызванного кадмием.

Ранее было показано, что в результате длительной обработки 3 мкМ хлорида кадмия у мутанта SGECd<sup>1</sup>

выявляется сниженное по сравнению с исходной линией количество некоторых компонентов антиоксидантной защиты, таких как пероксидаза, хитиназа и пролин [7]. Однако данное исследование не затрагивало изменения экспрессии генов и проводилось на сроках, когда у исходной линии наблюдалась уже значительная остановка развития. Таким образом, дискуссионным оставался вопрос об активации защитных механизмов у мутанта SGEcd<sup>1</sup> и исходной линии SGE при действии кадмия на более ранних сроках, когда растение может активно сопротивляться фактору, вызывающему стресс. В настоящем исследовании был проведен сравнительный анализ изменения экспрессии генов, участвующих в защитных реакциях, вызванных кадмием, у мутанта SGEcd<sup>1</sup> и исходной линии SGE. При анализе экспрессии генов была установлена разница в характере изменения экспрессии некоторых генов между мутантом и исходной линией как в контрольных условиях, так и при обработке растений хлоридом кадмия.

Одним из наиболее важных процессов клеточного метаболизма является поддержание окислительно-восстановительного баланса, нарушение которого наносит значительные повреждения ДНК и белкам. Показано, что компоненты системы нейтрализации активных форм кислорода играют значительную роль в устойчивости растений к кадмию. Показана связь повышенной экспрессии генов, кодирующих супероксиддисмутазу, каталазу, аскорбат пероксидазу, глутатионредуктазу, и повышенной устойчивости к кадмию у некоторых генотипов рапса [15]. Связь усиления экспрессии генов, кодирующих ферменты, инактивирующие активные формы кислорода, и повышенной аккумуляции кадмия была продемонстрирована при изучении транскриптомных профилей нескольких генотипов китайской капусты [16]. Сверхэкспрессия гена Cu/Zn-супероксиддисмутазы из гипераккумулятора кадмия *Sedum alfredii* в растениях арабидопсиса приводила к повышенной устойчивости к кадмию трансгенных растений [17]. Среди генов, относящихся к системе поддержания окислительно-восстановительного баланса у линии SGE, значительнее всего усиливалась экспрессия гена, кодирующего каталазу и глутатионредуктазу. В ответ на проникновение ионов кадмия у мутанта SGEcd<sup>1</sup> выявлено усиление экспрессии гена глутатионредуктазы, связанной с процессами превращения окисленной формы глутатиона в восстановленную. Данный процесс является важным элементом поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки.

Представители группы фенилпропаноидов играют ключевую роль в защите растений от биотического и абиотического стресса, в том числе благодаря их способности ингибировать образование активных форм кислорода [18, 19]. Показано, что у разных видов выявляется разнонаправленная реакция некоторых генов биосинтеза фенилпропаноидов на проникновение

ионов кадмия. Так протеомный анализ показал, что кадмий не оказывает какого-либо влияния на компоненты фенилпропаноидного пути у *Arabidopsis thaliana* [20]. В тоже время синтез хальконсинтазы усиливается при действии кадмия в клетках *Glycine max* [21]. Экспрессия гена, кодирующего фенилаланин-аммоний-лиазу, усиливается при действии кадмия у *Brassica juncea* [22] и *G. max* [23]. При этом у люпина выявлено снижение экспрессии гена, кодирующего фенилаланин-аммоний-лиазу [23]. У гороха обнаружено два гена, кодирующих фенилаланин-аммоний-лиазу [24]. В настоящем исследовании было выявлено снижение экспрессии гена *PAL2* в корнях мутанта гороха SGEcd<sup>1</sup> и линии SGE. Вместе с тем уровень экспрессии гена *PAL1* был снижен у мутанта SGEcd<sup>1</sup> по сравнению с линией SGE. Ранее нами было показано, что обработка на более раннем сроке высокими концентрациями хлорида кадмия (30 мкМ) приводит к усилению экспрессии гена *PAL2* в кончиках корней у исходной линии SGE и снижению экспрессии данного гена у мутанта SGEcd<sup>1</sup> [14].

Среди генов, связанных с реакцией на биотические стимулы (pathogen related), значительное усиление экспрессии у линии SGE было продемонстрировано для транскриптов, кодирующих белок PI206, белок PrP4A и хитиназу. Белок PI206 относится к группе dirigent proteins (от латинского dirigere — направлять, руководить), которые определяют структуру химических связей между мономерами [25, 26]. Данные белки необходимы при синтезе лигнина, образование которого усиливается при действии кадмия у некоторых видов растений [27]. Роль хитиназ, катализирующих деградацию хитина, и гевеинподобного антимикробного пептида PrP4A, также относящегося к группе хитиназ, в ответе растительной клетки на действие абиотических стрессоров еще окончательно не ясна. Предполагается, что усиление активности данных ферментов может носить вспомогательный характер для дополнительной защиты от патогенов в период стрессового ответа на абиотические факторы [28]. У мутанта SGEcd<sup>1</sup> кадмий вызывал усиление экспрессии гена *PI206*, а также гена, кодирующего белок DRR230 (относящегося к растительным дефензинам), в побегах после суточной обработки растений кадмием. Дефензины, будучи большой группой антимикробных пептидов растений, принимают участие в основном в ответе на биотические стимулы, однако для небольшого числа дефензинов описано участие в процессах адаптации растений к абиотическим воздействиям, таким как холод [29–31], засоление [32, 33], действие металлов [34–37]. Стоит отметить, что в корнях контрольных растений уровень экспрессии генов, кодирующих глутатионредуктазу и белки PrP4A и DRR230 усилен у мутанта SGEcd<sup>1</sup> по сравнению с таковым у линии SGE. Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что при действии кадмия реакция мутанта SGEcd<sup>1</sup> на молекулярном

уровне отличается от таковой у исходной линии SGE. У мутанта SGE<sup>Cd</sup> наблюдается изменение экспрессии ряда генов, что может свидетельствовать о том, что поступающий в клетку кадмий вызывает активацию защитных реакций. При этом в контрольных условиях было обнаружено усиление экспрессии ряда генов у мутанта по сравнению с исходной линией. Поскольку ген, в котором произошла мутация, еще не выявлен, можно лишь высказать предположение, что разница в экспрессии может быть опосредована мутацией в гене интереса. Наряду с этим возможно предположить, что усиление экспрессии генов, связанных с защитными реакциями, в контрольных условиях приводит к большей готовности мутанта SGE<sup>Cd</sup> к токсическому действию кадмия по сравнению с линией SGE, что позволяет мутанту дольше поддерживать жизнедеятельность в среде, содержащей данный тяжелый металл. Стоит отметить, что в ходе исследования было выявлено влияние кадмия на изменение экспрессии двух генов, кодирующих антимикробные пептиды у растений. Как уже было сказано выше, вопрос о том какую именно функцию выполняют данные вещества при абиотическом стрессе, остается открытым, однако, поскольку данные пептиды являются цистеинбогатыми можно выдвинуть предположение о возможном связывании кадмия тиоловыми группами данных соединений. В недавнем исследовании, проведенном на рисе, был выявлен ген, кодирующий дефензинподобный белок CAL1, связанный с хелатированием кадмия в цитоплазме и переносе его во внеклеточное пространство [38].

Таким образом, изучив развитие защитных реакций на ранних сроках у двух линий гороха, контрастных по устойчивости к кадмию, следует отметить, что исследования механизмов устойчивости, несомненно, должны проводиться в широком диапазоне сроков, чтобы была возможность отследить развитие реакции на фактор, вызывающий стресс. Будущие исследования на уровне регуляторных молекул и конечных продуктов могут внести значительный вклад в изучение формирования устойчивости у мутанта SGE<sup>Cd</sup>.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа по влиянию кадмия на изменение экспрессии генов была финансово поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 16-34-60132 мол\_а\_дк), работа по анализу органоспецифического характера экспрессии была выполнена за счет средств Государственного задания, пункт X10.2. (№ 0664-2015-0020) за 2018 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Clemens S, Aarts MG, Thomine S, Verbruggen N. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci.* 2013;18(2):92-99. doi: 10.1016/j.tplants.2012.08.003.
2. Romero-Puertas M, Palma J, Gomez M, Rio L, Sandalio L. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ.* 2002;25(5):677-86. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00850.x.
3. Wahid A, Arshad M, Farooq M. Cadmium Phytotoxicity: Responses, Mechanisms and Mitigation Strategies: A Review. In: *Organic Farming, Pest Control and Remediation Soil Pollutant*. Ed. by E. Lichtfouse. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. P. 371-403. doi: 10.1007/978-1-4020-9654-9\_17.
4. Kulaeva O, Tsyganov V. Molecular-genetic basis of cadmium tolerance and accumulation in higher plants. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2011;1:349. doi: 10.1134/S2079059711050108.
5. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* 2010;23(5):927-940. doi: 10.1007/s10534-010-9329-x.
6. Repetto O, Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, et al. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytol.* 2003;157(3):555-67. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00682.x.
7. Tsyganov V, Belimov A, Borisov A, et al. A chemically induced new pea (*Pisum sativum*) mutant SGE<sup>Cd</sup> with increased tolerance to, and accumulation of, cadmium. *Ann Bot.* 2007;99(2):227-237. doi: 10.1093/aob/mcl261.
8. Kulaeva O, Tsyganov B. Fine mapping of a *cdt* locus mutation that leads to an increase in the tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to cadmium. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2013;3(2):120-126. doi: 10.1134/S2079059713020020.
9. Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M, Zabalza A, et al. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ.* 2006;29(8):1532-1544. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01531.x.
10. Rivera-Becerril F, Metwally A, Martin-Laurent F, et al. Molecular Responses to Cadmium in Roots of *Pisum sativum* L. *Water Air Soil Pollut.* 2005;168(1-4):171-86. doi: 10.1007/s11270-005-1247-0.
11. Rivera-Becerril F, van Tuinen D, Martin-Laurent F, et al. Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza.* 2005;16(1):51-60. doi: 10.1007/s00572-005-0016-7.
12. Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M, Pazmino D, et al. Cellular Response of Pea Plants to Cadmium Toxicity: Cross Talk between Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, and Calcium. *Plant Physiol.* 2009;150(1):229-243. doi: 10.1104/pp.108.131524.
13. Kosterin O, Rozov S. Mapping of the new mutation blb and the problem of integrity of linkage group I. *Pisum Genet.* 1993;25:27-31.



14. Кулаева О., Цыганов В., Тихонович И. Сравнительный анализ влияния кадмия на развитие и функционирование корневых систем у исходной линии гороха SGE и мутанта SGEcd<sup>1</sup>, устойчивого к кадмию // Ботаника. Исследования. — 2010. — Т. 38. — С. 276–279. [Kulaeva O, Tsyganov V, Tikhonovich I. Sravnitel'nyu analiz vliyaniya kadmiya na razvitie i funktsionirovanie kornevykh sistem u iskhodnoy linii gorokha SGE i mutanta SGEcd<sup>1</sup>, ustoychivogo k kadmiyu. *Botanika Issledovaniya*. 2010;38:276-279. (In Russ.)]
15. Wu Z, Zhao X, Sun X, et al. Antioxidant enzyme systems and the ascorbate-glutathione cycle as contributing factors to cadmium accumulation and tolerance in two oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) under moderate cadmium stress. *Chemosphere*. 2015;138:526-536. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.080.
16. Yu R, Li D, Du X, et al. Comparative transcriptome analysis reveals key cadmium transport-related genes in roots of two pak choi (*Brassica rapa* L. ssp. chinensis) cultivars. *BMC Genomics*. 2017;18:587. doi: 10.1186/s12864-017-3973-2.
17. Li Z, Han X, Song X, et al. Overexpressing the *Sedum alfredii* Cu/Zn Superoxide Dismutase Increased Resistance to Oxidative Stress in Transgenic Arabidopsis. *Front Plant Sci*. 2017;8:1010. doi: 10.3389/fpls.2017.01010.
18. Dixon R, Paiva N. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 1995;7(7):1085-1097. doi: 10.1105/tpc.7.7.1085.
19. Commisso M, Toffali K, Strazzer P, et al. Impact of Phenylpropanoid Compounds on Heat Stress Tolerance in Carrot Cell Cultures. *Front Plant Sci*. 2016;7:1439. doi: 10.3389/fpls.2016.01439.
20. Roth U, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd<sup>2+</sup>. *J Exp Bot*. 2006;57(15):4003-4013. doi: 10.1093/jxb/eri170.
21. Sobkowiak R, Deckert J. Proteins induced by cadmium in soybean cells. *J Plant Physiol*. 2006;163(11):1203-6. doi: 10.1016/j.jplph.2005.08.017.
22. Fusco N, Micheletto L, Dal Corso G, et al. Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L. *J Exp Bot*. 2005;56(421):3017-3027. doi: 10.1093/jxb/eri299.
23. Pawlak-Sprada S, Arasimowicz-Jelonek M, Podgorska M, Deckert J. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part I. Effects of cadmium and lead on phenylalanine ammonia-lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(2):211-216.
24. Yamada T, Tanaka Y, Sriprasertsak P, et al. Phenylalanine Ammonia-Lyase Genes from *Pisum sativum*: Structure, Organ-Specific Expression and Regulation by Fungal Elicitor and Suppressor. *Plant Cell Physiol*. 1992;33(6):715-725. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078310.
25. Davin LB, Lewis NG. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol*. 2000;123(2):453-462. doi: 10.1104/pp.123.2.453.
26. Burlat V, Kwon M, Davin LB, Lewis NG. Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry*. 2001;57(6):883-897. doi: 10.1016/S0031-9422(01)00117-0.
27. Moura J, Bonine C, Viana J, et al. Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. *J Integr Plant Biol*. 2010;52(4):360-376. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x.
28. Cruz-Ortega R, Ownby J. A protein similar to PR (pathogenesis-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiol Plant*. 1993;89(1):211-219. doi: 10.1111/j.1399-3054.1993.tb01808.x.
29. Gaudet D, Laroche A, Frick M, et al. Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiol Plant*. 2003;117(2):195-205. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00041.x.
30. Koike M, Okamoto T, Tsuda S, Imai R. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298(1):46-53. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02391-4.
31. Ahmed N, Park J, Jung H, et al. Identification and characterization of stress resistance related genes of *Brassica rapa*. *Biotechnol Lett*. 2012;34(5):979-987. doi: 10.1007/s10529-012-0860-4.
32. Sui J, Jiang D, Zhang D, et al. The Salinity Responsive Mechanism of a Hydroxyproline-Tolerant Mutant of Peanut Based on Digital Gene Expression Profiling Analysis. *PLoS One*. 2016;11(9): e0162556. doi: 10.1371/journal.pone.0162556.
33. Nishiyama R, Le D, Watanabe Y, et al. Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. *PLoS One*. 2012;7(2):e32124. doi: 10.1371/journal.pone.0032124.
34. Mirouze M, Sels J, Richard O, et al. A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J*. 2006;47(3):329-342. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02788.x.
35. Cabot C, Gallego B, Martos S, et al. Signal cross talk in Arabidopsis exposed to cadmium, silicon, and *Botrytis cinerea*. *Planta*. 2013;237(1):337-349. doi: 10.1007/s00425-012-1779-7.

36. Mith O, Benhamdi A, Castillo T, et al. The antifungal plant defensin AhPDF1. 1b is a beneficial factor involved in adaptive response to zinc overload when it is expressed in yeast cells. *Microbiologyopen*. 2015;4(3):409-422. doi: 10.1002/mbo3.248.
37. Nguyen N, Ranwez V, Vile D, et al. Evolutionary tinkering of the expression of PDF1s suggests their joint effect on zinc tolerance and the response to pathogen attack. *Front Plant Sci*. 2014;5:70. doi: 10.3389/fpls.2014.00070.
38. Luo J, Huang J, Zeng D, et al. A defensin-like protein drives cadmium efflux and allocation in rice. *Nat Commun*. 2018;9:645. doi: 10.1038/s41467-018-03088-0.

✿ Информация об авторах

**Ольга Алексеевна Кулаева** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: okulaeva@arriam.ru.

**Эмма Сергеевна Грибченко** — техник I-й категории, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: gribemma@gmail.com.

**Евгений Андреевич Зорин** — техник I-й категории, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: kjokkjok8@gmail.com.

**Марина Сергеевна Клюкова** — инженер-исследователь, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: marina.kliukova@gmail.com.

**Владимир Александрович Жуков** — канд. биол. наук, заведующий лабораторией, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: vzhukov@arriam.ru.

✿ Information about the authors

**Olga A. Kulaeva** — PhD, Senior Scientist, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: okulaeva@arriam.ru.

**Emma S. Gribchenko** — Technician, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: gribemma@gmail.com.

**Evgeny A. Zorin** — Technician, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: kjokkjok8@gmail.com.

**Marina S. Kliukova** — Research Engineer, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: marina.kliukova@gmail.com.

**Vladimir A. Zhukov** — PhD, Head of the Lab, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: vzhukov@arriam.ru.