



© О. А. Кулаева, В. Е. Цыганов

УДК 575.167

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии

✿ В данной работе было исследовано влияние хлорида кадмия на изменение экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты детоксикации кадмия у гороха. В клубеньках исходной линии гороха SGE и мутантной линии SGEcd¹, контрастных по признаку устойчивости к кадмию, было изучено изменение экспрессии генов, кодирующих γ -глутамилцистеин синтетазу (*GSH1*), глутатион синтетазу (*GSHS*), гомоглутатион синтетазу (*hGSHS*) и фитохелатинсинтазу (*PsPCS*). Показано, что повышенная устойчивость клубеньков мутантной линии SGEcd¹ к хлориду кадмия не связана с характером экспрессии проанализированных генов.

✿ **Ключевые слова:** глутатион; фитохелатинсинтаза; устойчивость к кадмию, *Pisum sativum* L., бобово-ризобиальный симбиоз; симбиотический клубенек.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ КЛЮЧЕВЫЕ ФЕРМЕНТЫ ДЕТОКСИКАЦИИ КАДМИЯ В СИМБИОТИЧЕСКИХ КЛУБЕНЬКАХ ГОРОХА

ВВЕДЕНИЕ

В связи с усилением антропогенного воздействия на окружающую среду перед современным сельским хозяйством стоит задача получения сортов растений, устойчивых к разнообразным стрессовым воздействиям. Одним из факторов, оказывающих существенное влияние на большинство растительных организмов, является присутствие тяжелых металлов в почве, воде и атмосфере.

Кадмий является одним из наиболее опасных и широко распространенных загрязняющих элементов, поступление которого в природную среду обусловлено разными видами хозяйственной деятельности человека. Соли данного тяжелого металла хорошо растворяются в воде и могут быть поглощены растениями. Кадмий, поступая в живые организмы через переносчики других металлов, вызывает на клеточном уровне многочисленные физиологические и метаболические нарушения (Han et al., 2006). У гороха довольно низкие концентрации кадмия ингибируют рост корней и побегов, а также поглощение воды и питательных веществ, нарушают фотосинтез и активность многих ферментов и индуцируют окислительный стресс (Sanita di Toppi, Gabrielli, 1999). Взаимовыгодные симбиозы, образуемые бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями, оказывают существенное влияние на плодородие почвы и повышение урожайности (Skeffington, Bradshaw, 1980). Однако развитие симбиотических отношений является чувствительным к разнообразным неблагоприятным воздействиям, в том числе и солям кадмия (Balestrasse et al., 2003). Исследование влияния серии концентраций кадмия на развитие симбиотических клубеньков и азотфиксирующую активность у сои показало, что хотя количество клубеньков снижалось уже при самых низких концентрациях кадмия (2 мг/кг почвы), в то же самое время наблюдалась некоторая стимуляция азотфиксирующей активности при концентрациях до 5 мг/кг почвы (Chen et al., 2003). Стимуляция азотфиксирующей активности при определенных невысоких концентрациях кадмия наблюдалась в клубеньках модельных бобовых растений *Lotus japonicus* и *Medicago truncatula* (Цыганов и др., 2010). В ряде исследований была показана роль микоризы в увеличении устойчивости растений к кадмию. Так, при изучении нескольких генотипов гороха было показано, что инокуляция микоризным грибом увеличивает устойчивость растений к кадмию (Rivera-Becerril et al., 2002). Тем не менее механизмы такой устойчивости до конца не изучены (Rivera-Becerril et al., 2005). Исследование ряда штаммов ризосферных бактерий показало, что АЦК-утилизирующие ризобактерии улучшают образование и функционирование симбиоза бобовых растений с клубеньковыми бактериями в присутствии токсичных концентраций кадмия (Малков и др., 2012).

В ответ на действие токсичных веществ, у растений, также как и у других живых организмов, начинается запуск специальных адаптивных механизмов. Основные механизмы устойчивости живого организма могут формировать-

Поступила в редакцию 17.12.2013
Принята к публикации 06.05.2014

ся двумя путями: уходом от воздействия и перестройкой метаболизма для успешного выживания в условиях действия стрессора (Серегин, Иванов, 2001).

Одним из важнейших защитных механизмов растений, нивелирующим негативное действие кадмия, является поддержание баланса металл–связывающих лигандов, таких как глутатион и фитохелатины (Kulaeva, Tsyganov, 2011). Глутатион в клетке поддерживает окислительно-восстановительный баланс, сдерживает негативное влияние активных форм кислорода, участвует в детоксикации кадмия (Zagorchev et al., 2013). Недавно опубликованные данные показывают, что концентрация глутатиона в различных частях растений увеличивается при засухе, засолении, тепловом стрессе, при воздействии кадмия и свинца (Estrella–Gomez et al., 2012; Gill et al., 2012; Kumar et al., 2013; Pungrope et al., 2013). Синтез глутатиона из глутамата, цистеина и глицина является АТФ-зависимым, двухстадийным процессом (рис. 1). Первая реакция образования γ -Глу-Цис из глутамата и цистеина катализируется γ -глутамилцистеин синтетазой (EC 6.3.2.2), которая кодируется геном *GSH1*. Реакция, катализируемая этим ферментом, рассматривается в качестве лимитирующей стадии синтеза глутатиона (May et al., 1998). Вторая стадия синтеза глутатиона из γ -Глу-Цис и глицина катализируется глутатион синтетазой (EC 6.3.2.3), которая кодируется геном *GSHS* (Xiang, Oliver, 1998). У представителей семейства Fabaceae обнаружен гомолог глутатиона — гомоглутатион, у которого глицин заменен на аланин. Синтез гомоглутатиона осуществляется ферментом гомоглутатион синтетазой (EC 6.3.2.23), кодируемой геном *hGSHS* (рис. 1).

Недавно показано, что в симбиотических клубеньках *M. truncatula* различаются паттерны экспрессии генов *GSHS* и *hGSHS* (в зоне азотфиксации активность экспрессии *GSHS* выше, чем *hGSHS*), что может свидетельствовать о различной их регуляции в разных тканях и зонах клубенька (El Msehli et al., 2011). Сверхэкспрессия *GSH1* приводила к повышенному содержанию (гомо)глутатиона, а также к повышению уровня нитрогеназной активности в клубеньках и уровней экспрессии нескольких генов, активирующихся в азотфиксирующем клубеньке. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли,

которую играет (гомо)глутатион в регуляции азотфиксации в симбиотическом клубеньке, однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы вычленить роль каждого из тиолов (El Msehli et al., 2011).

Важным механизмом детоксикации кадмия растительными организмами является индукция синтеза фитохелатинов, синтезируемых из глутатиона фитохелатинсинтазой (EC 2.3.2.15) (Серегин, 2001). Фитохелатины, представляющие собой олигомеры глутатиона, были открыты около 30 лет назад (Kondo et al., 1984, Grill et al., 1985), и с тех пор растет число публикаций, посвященных роли фитохелатинов в формировании устойчивости к металлам. В настоящее время первичная структура фитохелатинов определена для широкого спектра видов покрытосеменных растений из различных семейств. Они представляют собой небольшие богатые цистеином пептиды, состоящие из линейных цепей остатков глутаминовой кислоты и цистеина и способные связывать ионы тяжелых металлов через SH группы (Серегин, 2001). Фитохелатины обладают высоким сродством к ионам кадмия (Reese, Wagner, 1987). Кадмий стимулирует синтез фитохелатинов, которые быстро образуют низкомолекулярные комплексы с ионами кадмия и транспортируются через тонопласт в вакуоль через ABC переносчик (Park et al., 2012).

К настоящему моменту известно лишь небольшое количество работ, посвященных механизмам детоксикации кадмия в клубеньках бобовых растений. В данном исследовании был проведен анализ влияния хлорида кадмия на изменение экспрессии четырех ключевых ферментов синтеза глутатиона, гомоглутатиона и фитохелатинов в клубеньках гороха посевного (*Pisum sativum* L.). В работе использовалась исходная линия гороха SGE и мутант SGEcd¹ (Tsyganov et al., 2007). Данный мутант характеризуется повышенной устойчивостью к токсичным концентрациям кадмия, по сравнению с линией SGE. Фенотипическое проявление мутации *cdt* (сохранение способности образования боковых корней) наблюдается при выращивании растений в среде, содержащей от 3 до 30 мкМ хлорида кадмия. Также мутант SGEcd¹ характеризуется повышенным в 1,5–2 раза по сравнению с линией SGE накоплением кадмия в биомассе растений

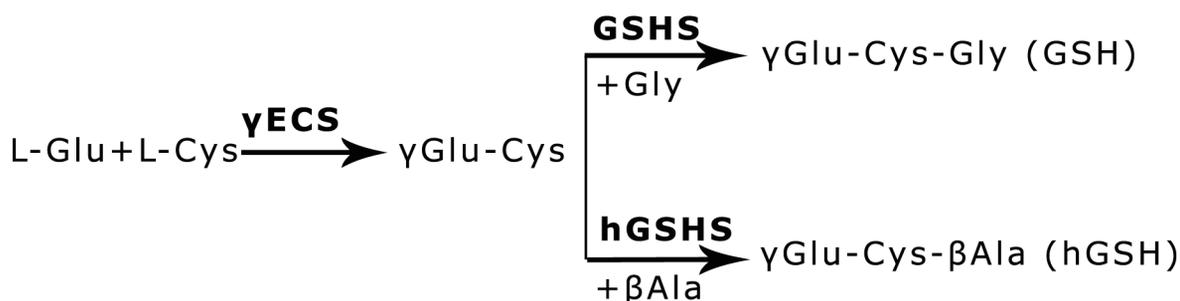


Рис. 1. Схема синтеза глутатиона и гомоглутатиона (по Iturbe-Ormaetxe et al., 2002)

(Кулаева, 2012). Ген *Cdt* (*Cadmium tolerance*) был локализован на генетической карте гороха в VI группе сцепления, но его последовательность к настоящему моменту остается еще не идентифицированной (Tsyganov et al., 2013; Kulaeva, Tsyganov, 2013). Следует отметить, что данный мутант способен формировать симбиотические системы, также более устойчивые к кадмию (Tsyganov et al., 2005). В клубеньках гороха исходной линии SGE и мутанта SGE^{Cd} было изучено изменение экспрессии генов, кодирующих γ -глутамилцистеин синтетазу (*GSH1*), глутатион синтетазу (*GSHS*), гомоглутатион синтетазу (*hGSHS*) и фитохелатинсинтазу (*PsPCS*).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал и штамм клубеньковых бактерий

В исследовании были использованы исходная линия гороха посевного (*Pisum sativum* L.) SGE (Kosterin, Rozov, 1993) и мутант SGE^{Cd}, характеризующийся повышенными устойчивостью к кадмию и его аккумуляцией в тканях растений (Tsyganov et al., 2007).

В работе был использован штамм клубеньковых бактерий из коллекции Центра Джона Иннеса, Великобритания, Норвич) *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *viceae* (*rlv 3841*) — природный стрептомицин-устойчивый мутант. Инокуляцию пятнадцатидневных проростков гороха проводили в условиях гидропоники.

Условия выращивания растений

Семена стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой 6 раз.

Растения выращивались в условиях смены день/ночь — 16/8 ч, температуры — 21 °С, относительная влажность воздуха 75 %, освещенность 38 тыс. люкс, в условиях гидропоники с аэрацией.

Раствор хлорида кадмия (осч, Мерск) концентрацией 0,5 мкМ добавлялся в сосуды с питательной средой (Tsyganov et al., 2007) к шестидневным проросткам гороха.

После добавления кадмия растения выращивали 4 недели, смена гидропонного раствора проводилась каждые три дня.

Анализ сухого веса растений

После выращивания растения были высушены при комнатной температуре в течение недели, после чего был определен сухой вес их корневых систем и побегов. Для каждого варианта обработки было проанализировано 15 растений.

Выделение РНК

Для выделения РНК клубеньки исследуемых растений были гомогенизированы с использованием ступки и пести-

ка с добавлением жидкого азота. Выделение РНК проводилось из навески растительной ткани массой 60–100 мг. РНК выделяли согласно протоколу изготовителя <http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/purezol-rna-isolation-reagent> (BioRad Laboratories, США). Качество выделенной РНК определяли с использованием гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле в 0,5 % трис-ацетатном буфере с окрашиванием бромистым этидием.

Определение концентрации РНК, постановка обратной транскрипции

Определение концентрации выделенной РНК проводилось на спектрофотометре Shimadzu UV mini-1240 (Shimadzu, Япония). Реакция обратной транскрипции проводилась в объеме 20 мкл, из которых 1 мкл — это обратная транскриптаза RevertAid™ M–MuLV Reverse Transcriptase (200 ед/мкл, MBI Fermentas, Литва), 4 мкл 5x буфер для обратной транскриптазы (MBI Fermentas, Литва), 1 мкл 100 мкМ праймеры Oligo (dT)₁₈ (MBI Fermentas, Литва), 0,5 мкл 25 мМ dNTP (MBI Fermentas, Литва), 1 мкл ингибитор РНКаз RiboLock™ RNase Inhibitor (40 ед/мкл, MBI Fermentas, Литва), остальные 12,5 мкл составляли деионизированная вода и РНК (1,5 мкг). Реакцию осуществляли в автоматическом амплификаторе C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США).

Схема проведения реакции ОТ: синтез кДНК на матрице мРНК ферментом обратной транскриптазой: 40 °С, 60 мин; инактивация фермента: 70 °С, 10 мин.

Проведение ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени осуществляли в автоматическом амплификаторе C1000™ Thermal Cycler, совмещенном с оптическим модулем CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием коммерческого набора iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, США). Анализ экспрессии генов проводился в трех повторностях. Реакцию проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1x буфер для ПЦР, 4 мМ MgCl₂, 10 мМ dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы, 10 пМ каждого праймера и 0,5x SYBR Green I. Амплификацию проводили по следующей программе: 95 °С — 30 с, 58 °С — 30 с и 72 °С — 30 с. Флуоресценцию интеркалирующего красителя SYBR Green I регистрировали в конце каждого цикла при 72 °С. Количественную оценку экспрессии анализируемого гена проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.0. Данные по количественной оценке анализируемого гена представлены в относительных единицах, рассчитанных при сравнении с уровнем экспрессии референсного гена *GAPDH* (X73150).

Для проведения ПЦР в режиме реального времени были использованы праймеры, представленные в таблице 1.

Таблица 1

Последовательности праймеров для проведения ПЦР

Ген	Праймер	5'–3'	Номер последовательности в ген. банке
GSH1 γ-глутамилцистеин синтетаза	Прямой	CTCCTCCGCCGCATAACTTC	AF128455.1
	Обратный	GGCGAGATAATCGATGAGATCCTG	
GSHS глутатион синтетаза	Прямой	GCCGCTGATTTTCGTTCCAATA	AF231137.1
	Обратный	CGACGTCGACGGTTTGTTTACC	
hGSHS гомолгутатион синтетаза	Прямой	GTTGTTGATTGATGGCTTGCATG	AF258319.1
	Обратный	GCGCCAAAATCCATTGTGAA	
PsPCS фитохелатин синтаза	Прямой	CATGAAGGTTGGAGCAGTGTTGC	–
	Обратный	TCGCTCAATGTGAGATCCCG	
GAPDH глицеральдегид-3- фосфат-дегидрогеназа	Прямой	AAGAACGACGAACTCACCG	X73150
	Обратный	TTGGCACCCACCTTCAAATG	

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ сухого веса растений

Было проанализировано влияние 0,5 мкМ хлорида кадмия на развитие симбиоза между штаммом *Rh. leguminosarum* *bv. viceae* 3841 и растениями гороха линии SGE и мутанта SGECd^t. Сравнительный анализ контрольных и опытных растений исходной линии SGE и мутанта SGECd^t не выявил влияния 0,5 мкМ CdCl₂ на изменение сухого веса корней и побегов (рис. 2). При этом сухой вес корней и побегов исходной линии SGE не отличался от такового у мутанта SGECd^t как в контрольных условиях, так и при воздействии CdCl₂ (рис. 2).

Анализ экспрессии генов, кодирующих компоненты синтеза глутатиона

Последовательности генов, контролирующих биосинтез (гомо)глутатиона, и их роль в разнообразных биологических процессах выявлены для многих видов, в том числе и для гороха посевного (Matamoros et al., 1999;

Morgan et al., 2000). Нами было проанализировано изменение экспрессии трех генов, продукты которых участвуют в синтезе (гомо)глутатиона: γ-глутамилцистеин синтетазы (*GSH1*), глутатион синтетазы (*GSHS*) и гомолгутатион синтетазы (*hGSHS*).

У исходной линии SGE не наблюдалось изменения уровня экспрессии гена *GSH1* в ответ на действие CdCl₂, в то время как у мутанта SGECd^t было выявлено небольшое снижение экспрессии данного гена. При этом в контрольных условиях уровень экспрессии *GSH1* не различался у обеих линий (рис. 3).

Та же закономерность была выявлена при анализе гена *GSHS*. Уровень экспрессии гена *GSHS* в контрольных условиях практически не различался у исходной линии SGE и мутанта SGECd^t. Обработка растений CdCl₂ приводила к небольшому ослаблению экспрессии данного гена у мутанта, в то время как у линии SGE экспрессия *GSHS* усиливалась (рис. 3).

Экспрессия гена *hGSHS* усиливалась при действии хлорида кадмия как у мутанта SGECd^t, так и у ли-

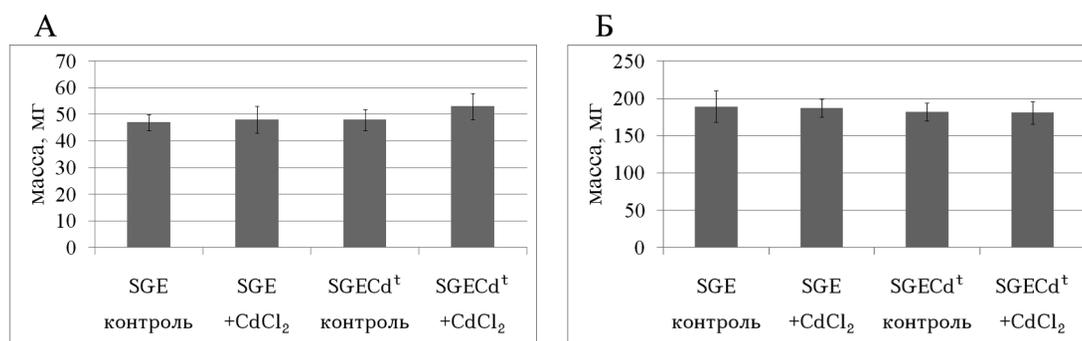


Рис. 2. Сухой вес корней (А) и побегов (Б) исходной линии гороха SGE и мутанта SGECd^t в контрольных условиях и при воздействии 0,5 мкМ CdCl₂. Приведены средние значения со стандартными ошибками

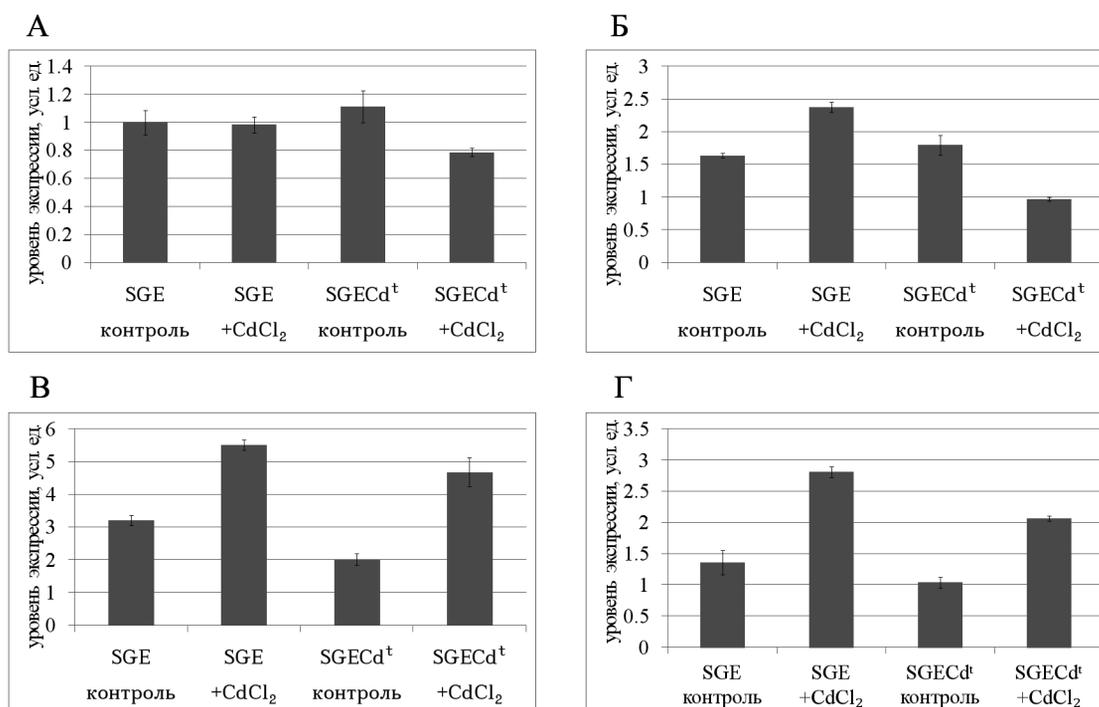


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии генов *GSH1* (А), *GSHS* (Б), *hGSHS* (В), *PsPCS* (Г) в клубеньках исходной линии SGE и мутанта SGEcd^t в контрольных условиях и при воздействии 0,5 мкМ CdCl₂

нии SGE (рис. 3). Сравнение уровней экспрессии исследуемых генов показало, что сильнее всего при контрольных условиях в клубеньках гороха экспрессировался ген *hGSHS*, кодирующий гомоглутатион синтетазу.

Анализ экспрессии гена фитохелатинсинтазы

До недавнего времени последовательность гена фитохелатинсинтазы была расшифрована всего для нескольких видов, однако в последнее время было опубликовано большое количество литературы, посвященной исследованию фитохелатинсинтазы у представителей разных семейств. Нами была выявлена последовательность кодирующей области гена фитохелатинсинтазы гороха посевного (Кулаева О.А., Цыганов В.Е., неопубликованные данные). На основе выявленной последовательности были подобраны праймеры для анализа экспрессии данного гена в клубеньках гороха. Как видно из рисунка 3, обработка растений хлоридом кадмия приводила к усилению экспрессии гена *PsPCS* как у линии SGE, так и у мутанта SGEcd^t. При этом в контрольных условиях уровень экспрессии гена *PsPCS* был выше у исходной линии SGE (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании растения исходной линии гороха SGE и мутантной линии SGEcd^t, инокулированные эффективным штаммом ризобий подвергались длительному (4 недели) воздействию низкой концентрации хло-

рида кадмия (0,5 мкМ). При анализе сухого веса растений не наблюдалось достоверных различий между всеми проанализированными вариантами, что подтверждает тот факт, что сами растения гороха проявляют большую устойчивость, чем формируемые на их корнях клубеньки. Действительно, существенная разница между исходной и мутантной линиями наблюдалась нами при воздействии 3 мкМ хлорида кадмия (Tsyganov et al., 2007). В то же время клубенькообразование у исходной линии SGE было значительно снижено при концентрации хлорида кадмия 0,5 мкМ и полностью ингибировалось при концентрации 1,5 мкМ, а у мутантной линии при концентрации 2,0 мкМ (Tsyganov et al., 2005).

Нами было изучено влияние хлорида кадмия на изменение экспрессии генов, кодирующих γ -глутамилцистеин синтетазу, глутатион синтетазу, гомоглутатион синтетазу и фитохелатинсинтазу, являющихся ключевыми ферментами детоксикации кадмия в клубеньках исходной и мутантной линий с использованием ПЦР в режиме реального времени.

Было показано, что экспрессия гена *GSH1* не изменялась при действии кадмия у исходной линии, и даже снижалась у мутанта SGEcd^t. Фермент γ -глутамилцистеин синтетазу образует комплексы глутамата и цистеина, причем данный этап является лимитирующим в синтезе глутатиона (May et al., 1998). Анализ влияния сверхэкспрессии гена *GSH1* на устойчивость растений арабидопсиса и томата к хлориду кадмия выявил, что, несмотря на повышенное содержание у таких растений глутатиона,

повышенной устойчивости к данному тяжелому металлу выявлено не было (Goldsbrough et al., 1998, Xiang et al., 2001). При изучении факторов, взаимодействующих с γ -глутамилцистеин синтетазой и влияющих на ее активность у арабидопсиса, было показано, что обработка клеточных суспензий хлоридом кадмия не влияет на уровень экспрессии генов *AtGSH1* и *AtGSHS*, что указывает на отсутствие прямой регуляции транскрипции под воздействием стресс-фактора. При этом выявленное увеличение накопления глутатиона коррелирует у арабидопсиса с усилением активности фермента γ -глутамилцистеин синтетазы, а не глутатион синтетазы, что свидетельствует о наличии у растений механизмов посттранскрипционной регуляции активности γ -глутамилцистеин синтетазы (May et al., 1998).

Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты заключительного этапа синтеза глутатиона и гомоглутатиона в клубеньках гороха, показал, что у мутанта SGECD¹ наблюдается снижение уровня экспрессии гена *GSHS*, по сравнению с исходной линией, при воздействии хлорида кадмия, в то же время уровень экспрессии гена *hGSHS* повышался как у мутантой, так и у исходной линий. В целом было показано, что экспрессия *hGSHS* усилена по сравнению с экспрессией *GSHS*, что может косвенно свидетельствовать об участии гомоглутатиона в защитных процессах, протекающих в клубеньках. Гомоглутатион, синтезируемый ферментом гомоглутатион синтетазой, характерен для представителей семейства Fabaceae, у которых он выполняет разнообразные функции, частично сходные с таковыми глутатиона (Noctor et al., 2012). Исследование влияния разнообразных стрессовых воздействий показало, что экспрессия гомоглутатион синтетазы в клубеньках фасоли усиливается только при действии перекиси водорода, и не меняется при засухе, засолении и обработке растений тяжелыми металлами (Loscos et al., 2008). Соотношение количества глутатиона и гомоглутатиона в разных растительных тканях сильно варьирует в зависимости от вида растения. Предполагается, что глутатион и гомоглутатион играют различные роли в процессах развития растений и ответа на стрессовое воздействие. Таким образом, несмотря на то, что многие функции глутатиона и гомоглутатиона перекрываются, у бобовых растений их синтез может изменяться по-разному в ответ на действие стрессора, однако причины таких варьирований еще остаются неизвестными (Frendo et al., 2013).

В клубеньках гороха нами было выявлено усиление экспрессии гена *PsPCS*, кодирующего фитохелатинсинтазу при действии кадмия как у линии SGE, так и у мутанта SGECD¹. Исследования, проведенные на разных видах, свидетельствуют о наличии корреляции между повышенной устойчивостью к кадмию и повышенным уровнем фитохелатинов или гетерологичной экспрессией генов, связанных с синтезом фитохелатинов (Mohamed et al., 2012, Liu et al., 2012, Son et al., 2012). С другой

стороны, показано, что фитохелатины не связаны с развитием процессов длительной адаптации к действию кадмия и процессами гипераккумуляции данного тяжелого металла (Gupta et al., 2010). Дискуссионным остается вопрос о регуляции активности фитохелатинсинтазы. Так, долгое время предполагалось, что у растений происходит саморегуляция активности данного фермента (Loeffler et al., 1989). Исследования гена *TcPCS1* пшеницы показали, что он регулируется на уровне транскрипции (Clemens et al., 1999). Анализ, проведенный на арабидопсисе, выявил, что регуляция гена, кодирующего фитохелатинсинтазу, осуществляется на уровне транскрипции, но только на ранних этапах развития растения (Lee et al., 2002). У некоторых представителей семейства Fabaceae помимо фитохелатинов выявляют еще гомофитохелатины, синтезируемые из гомоглутатиона ферментом гомофитохелатин синтазой. Ген, кодирующий данный фермент, выявлен к настоящему моменту лишь у некоторых видов (Oven et al., 2002). Мало изученным остается роль фитохелатинов и гомофитохелатинов в защитных процессах, происходящих в клубеньках бобовых растений. Так, при обработке растений *L. japonicus* солями кадмия было выявлено повышенное накопление фитохелатинов и гомофитохелатинов в клубеньках (Ramos et al., 2007, 2008). У представителей вида *Vigna angularis* функцию защиты клубеньков от кадмия несут только гомофитохелатины, поскольку синтез фитохелатинов у них не обнаружено (Oven et al., 2001). Таким образом, поскольку регуляция процессов защиты клубеньков от негативного действия кадмия представляется пока достаточно неоднозначной и сильно варьирует в зависимости от вида растения, представляется перспективным клонирование гена, кодирующего гомофитохелатинсинтазу, оценка роли гомофитохелатинов в защитных реакциях и исследование регуляции активности фитохелатин и гомофитохелатинсинтаз у гороха посевного.

В ходе данного исследования при анализе экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты детоксикации кадмия у гороха, не было выявлено усиления экспрессии какого-либо из генов у мутантной линии SGECD¹, по сравнению с исходной линией. Таким образом, вероятно, что ни глутатион, ни фитохелатины не играют значительной роли в повышенной устойчивости клубенькообразования у мутантной линии к токсичным концентрациям хлорида кадмия, по сравнению с исходной линией. В то же время дальнейшие исследования необходимы для выявления возможной роли посттранскрипционной, трансляционной и посттрансляционной регуляции активности данных ферментов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была финансово поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (12-04-31617_мол_а, 11-04-01675-а) и Советом по грантам Президента РФ (НШ-4603.2014.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаева О. А. (2012) Генетический анализ устойчивости гороха посевного (*Pisum sativum* L.) к кадмию. Автореф. дис... канд. биол. наук. Санкт-Петербург.
2. Малков Н. В., Зиновкина Н. Ю., Сафронова В. И., Белимов А. А. (2012) Повышение устойчивости бобово-ризобиального симбиоза к кадмию с помощью ризосферных бактерий, содержащих АЦК деаминазу. Достижения науки и техники АПК. Вып. 9: С. 53–57.
3. Серегин И., Иванов В. (2001) Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения. Физиология растений. Т. 48 (4): С. 606–630.
4. Серегин И. (2001) Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений. Успехи биологической химии. Т. 41: С. 283–300.
5. Цыганов В. Е., Заболотный А. И., Будкевич Т. А. и др. (2010) Влияние кадмия на развитие и функционирование клубеньков у лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) и лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen). Ботаника (исследования). Вып. 38: С. 343–354.
6. Balestrasse K. B., Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. (2003) Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodule and roots of soybean plants. *Funct. Plant. Biol.* Vol. 30: P. 57–64.
7. Chen Y., He Y., Yang Y., Yu Y. (2003) Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. *Chemosphere*. Vol. 50: P. 781–787.
8. Clemens S., Kim E. J., Neumann D., Schroeder J. I. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* Vol. 18: P. 3325–3333.
9. El Msehli S., Lambert A., Baldacci-Cresp F. (2011) Crucial role of (homo)glutathione in nitrogen fixation in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.* Vol. 192: P. 496–506.
10. Estrella-Gomez N. E., Sauri-Duch E., Zapata-Perez O., Santamaria J. M. (2012) Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb²⁺ damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS. *Environ. Exp. Bot.* Vol. 75: P. 188–194.
11. Frendo P., Baldacci-Cresp F., Benyamina S. M., Puppo A. (2013) Glutathione and plant response to the biotic environment. *Free Radical Bio. Med.* Vol. 65: P. 724–730.
12. Goldsbrough P. B. (1998) Metal Tolerance in plants: the role of phytochelatin and metallothioneins. In: Terry N., Banuelos G. S., eds. *Phytoremediation of trace elements*. CRC Press; p. 221–233.
13. Gill S. S., Khan N. A., Tuteja N. (2012) Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Sci.* Vol. 182: P. 112–120.
14. Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1985) Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*. Vol. 230: P. 674–676.
15. Gupta D. K., Huang H. G., Yang X. E. (2010) The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatin but the glutathione. *J. Hazard. Mater.* Vol. 177: P. 437–444.
16. Han S. H., Lee J. C., Oh C. Y. (2006) Alleviation of Cd toxicity by composted sewage sludge in Cd-treated Schmidt birch (*Betula schmidtii*) seedlings. *Chemosphere*. Vol. 65 (4): P. 541–546.
17. Iturbe-Ormaetxe I., Heras B., Matamoros M. et al. (2002) Cloning and functional characterization of a homoglutathione synthetase from pea nodules. *Physiologia plantarum*. Vol. 115 (1): P. 69–73.
18. Kondo N., Imai K., Isobe M. et al. (1984) Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast-separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Lett.* Vol. 25: P. 3869–3872.
19. Kosterin O., Rozov S. (1993) Mapping of the new mutation blb and the problem of integrity of linkage group I. *Pisum Genetics*. Vol. 25: P. 27–31.
20. Kulaeva O. A., Tsyganov V. E. (2011) Molecular-genetic basis of cadmium tolerance and accumulation in higher plants. *Russian journal of genetics: applied research*. Vol. 1 (5): P. 349–360.
21. Kulaeva O. A., Tsyganov B. E. (2013) 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*. Vol. 3(2): P. 120–126.
22. Kumar S., Asif M. H., Chakrabarty D. et al. (2013) Differential expression of rice lambda class GST gene family members during plant growth, development, and in response to stress conditions. *Plant Mol. Biol. Rep.* Vol. 31: P. 569–580.
23. Lee S., Korban S. S. (2002) Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta*. Vol. 215: P. 689–693.
24. Liu Z., Gu C., Chen F. et al. (2012) Heterologous expression of a *Nelumbo nucifera* phytochelatin synthase gene enhances cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Biochem. Biotech.* Vol. 166: P. 722–734.
25. Loeffler S., Hochberger A., Grill E. et al. (1989) Termination of the phytochelatin synthase reaction through

- sequestration of heavy metals by the reaction product. FEB Lett. Vol. 258: P. 42–46.
26. Loscos, J., Matamoros, M. A., Becana, M. (2008) Ascorbate and homoglutathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. *Plant Physiol.* Vol. 146: P. 1282–1292.
 27. Matamoros M. A., Moran J. F., Iturbe-Ormaetxe I. et al. (1999) Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.* Vol. 121: P. 879–888.
 28. May M. J., Vernoux T., Sanchez-Fernandez R., et al. (1998) Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 95: P. 12049–12054.
 29. Mohamed A. A., Castagna A., Ranieri A., di Toppi L. S. (2012) Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 57: P. 15–22.
 30. Moran J. F., Iturbe-Ormaetxe I., Matamoros M. A. (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol.* Vol. 124(3): P. 1381–1392.
 31. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S. et al. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* Vol. 35: P. 454–484.
 32. Oven M., Raith K., Neubert R. H. et al. (2001) Homo-phytochelatin synthetases are synthesized in response to cadmium in azuki beans. *Plant Physiol.* Vol. 126: P. 1275–1280.
 33. Oven M., Page J. E., Zenk M. H., Kutchan T. M. (2002) Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max.* *J. Biol. Chem.* Vol. 277: P. 4747–54.
 34. Park J., Song W., Ko D. et al. (2012) The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant J.* Vol. 69: P. 278–288.
 35. Pyngrope S., Bhoomika K., Dubey R. S. (2013) Reactive oxygen species, ascorbate-glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. *Protoplasma.* Vol. 250: P. 585–600.
 36. Ramos J., Clemente M. R., Naya L. et al. (2007) Phytochelatin synthetases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiol.* Vol. 143: P. 1110–1118.
 37. Ramos J., Naya L., Gay M. (2008) Functional characterization of an unusual phytochelatin synthase, LjPCS3, of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* Vol. 148: P. 536–545.
 38. Reese R., Wagner G. (1987) Effects of buthionine sulfoximine on Cd-binding peptide levels in suspension-cultured tobacco cells treated with Cd, Zn, or Cu. *Plant Physiol.* Vol. 84: P. 574–577.
 39. Rivera-Becerril F., Calantzis C., Turnau K. et al. (2002) Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J. Exp. Bot.* Vol. 53: P. 1177–1185.
 40. Rivera-Becerril F., van Tuinen D., Martin-Laurent F. et al. (2005) Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza.* Vol. 16: P. 51–60.
 41. Sanita di Toppi L., Gabbriellini R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* Vol. 41: P. 105–130.
 42. Skeffington R. A., Bradshaw A. D. (1980). Nitrogen fixation by plants grown on reclaimed china clay waste. *J. Appl. Ecol.* Vol. 17: P. 469–477.
 43. Son K. H., Kim D. Y., Koo N. et al. (2012) Detoxification through phytochelatin synthesis in *Oenothera odorata* exposed to Cd solutions. *Environ. Exp. Bot.* Vol. 75: P. 9–15.
 44. Tsyganov V. E., Zhernakov A. I., Khodorenko A. V. et al. (2005) Mutational analysis to study the role of genetic factors in pea adaptation to stresses during development its symbioses with *Rhizobium* and mycorrhizal fungi. In Wang Y. P., Lin M., Tian Z. X. et al. eds. *Bacterial nitrogen fixation, sustainable agriculture and the environment. Proceedings of the 14th International Nitrogen Fixation Congress.* Springer. P. 279–281.
 45. Tsyganov V., Belimov A., Borisov A. (2007) A chemically induced new pea (*Pisum sativum*) mutant SGEcdt with increased tolerance to, and accumulation of cadmium. *Ann. Bot.* Vol. 99: P. 227–237.
 46. Tsyganov V. E., Kulaeva O. A., Knox M. R. (2013) Using of SSAP analysis for primary localization of mutation cdt (cadmium tolerance) in pea linkage group VI. *Russian journal of genetics: applied research.* Vol. 3(2): P. 152–155.
 47. Xiang C., Oliver D. (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Vol. 10: P. 1539–1550.
 48. Xiang, C., Werner, B. L., Christensen E. M., Oliver, D. J. (2001) The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol.* Vol. 126: P. 564–574.
 49. Zagorchev L., Seal Ch., Kranner I., Odjakova M. (2013) A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 14: P. 7405–7432.

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF GENES CODING KEY ENZYMES OF CADMIUM DETOXIFICATION IN GARDEN PEA SYMBIOTIC NODULES

Kulaeva O. A., Tsyganov V. E.

✿ **SUMMARY: Background.** Cadmium is one of the most wide-ranging and dangerous pollutants for all living organisms, including plants. Currently, the mechanisms of cadmium accumulation in plant tissues and plant tolerance to its toxic effect are intensively studied. Metal-binding ligands, such as glutathione and phytochelatins, are one of the most important components in cadmium homeostasis in plants. **Materials and methods.** The pea line SGE and mutant SGECdt differed by cadmium tolerance were used. Gene expression for γ -glutamylcysteine synthetase (GSH1), glutathione synthetase (GSHS), homoglutathione synthetase (hGSHS) and phytochelatin synthase (PsPCS) was measured in pea nodules using realtime PCR. **Results.** GSH1 expression was slightly influenced by cadmium chloride. GSHS expression was upregulated in SGE and slightly downregulated in SGECdt. Cadmium chloride caused increased expression of hGSHS and PsPCS in both pea line SGE and the mutant SGECdt. **Conclusion.** Increased tolerance to cadmium of symbiotic nodules in the mutant SGECdt is not linked with expression pattern of analyzed genes.

✿ **KEY WORDS:** glutathione, phytochelatin synthase, cadmium tolerance, *Pisum sativum* L., legume-*Rhizobium* symbiosis, symbiotic nodule.

✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

1. Kulaeva O. A. (2012) Geneticheskij analiz ustojchivosti gorosha posevnogo (*Pisum sativum* L.) k kadmiju. [Genetic analysis of pea (*Pisum sativum* L.) tolerance to cadmium]. Avtoref. dis. kand. biol. nauk [PhD dissertation]. SPb.
2. Malkov N. V., Zinovkina N. Yu., Safronova A. A., Belimov A. A. (2012) Povyshenie ustojchivosti bobovo-rizobial'nogo simbioza k kadmiju s pomoshh'ju rizosfernyh bakterij, sodержashhij ACK deaminazu. [Increase in resistance of legume-rhizobial complex to cadmium using rhizosphere bacteria containing acc deaminase] Dostizhenija Nauki i Tehniki APK. [Advances in Science and Technology AIC]. Vol. 9: P. 53–57.
3. Seregin I., Ivanov V. (2001) Fiziologicheskie aspekty toksicheskogo dejstvija kadmija i svinca na vysshie rastenija. [Physiological aspects of the toxic effect of cadmium and lead to higher plants]. Russian Journal of Plant Physiology. Vol. 48 (4): P. 606–630.
4. Seregin I. (2001) Fitohelatiny i ih rol' v detoksikacii kadmija u vysshijh rastenij. [Phytochelatin and their role in the detoxification of cadmium in higher plants]. Special issue. Biological Chemistry Reviews. English translation of Uspekhi Biologicheskoi Khimii. Vol. 41: P. 283–300.
5. Tsyganov V. E., Zabolotnyi A. I., Budkevich T. A. i dr. (2010) Vlijanie kadmija na razvitie i funkcionirovanie kluben'kov u ljadvenca rogatogo (*Lotus corniculatus* L.) i ljadvenca japonskogo (*Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen). [Effect of cadmium on the development and the function of nodules in of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen) Botanika (issledovanija). [Botany (investigations)]. Vol. 38: P. 343–354.
6. Balestrasse K. B., Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. (2003) Funct. Plant. Biol. Vol. 30: P. 57–64.
7. Chen Y., He Y., Yang Y., Yu Y. (2003) Chemosphere. Vol. 50: P. 781–787.
8. Clemens S., Kim E. J., Neumann D., Schroeder J. I. (1999) EMBO J. Vol. 18: P. 3325–3333.
9. El Msehli S., Lambert A., Baldacci-Cresp F. (2011) New Phytol. Vol. 192: P. 496–506.
10. Estrella-Gomez N. E., Sauri-Duch E., Zapata-Perrez O., Santamaria J. M. (2012) Environ. Exp. Bot. Vol. 75: P. 188–194.
11. Frendo P., Baldacci-Cresp F., Benyamina S. M., Puppo A. (2013) Free Radical Bio. Med. Vol. 65: P. 724–730.
12. Goldsbrough P. B. (1998) In: Terry N., Banuelos G. S., eds. Phytoremediation of trace elements. CRC Press; p. 221–233.
13. Gill S. S., Khan N. A., Tuteja N. (2012) Plant Sci. Vol. 182: P. 112–120.
14. Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1985) Science. Vol. 230: P. 674–676.
15. Gupta D. K., Huang H. G., Yang X. E. (2010) J. Hazard. Mater. Vol. 177: P. 437–44.
16. Han S. H., Lee J. C., Oh C. Y. (2006) Chemosphere. Vol. 65 (4): P. 541–546.
17. Iturbe-Ormaetxe I., Heras B., Matamoros M. et al. (2002) Physiologia Plantarum. Vol. 115 (1): P. 69–73.
18. Kondo N., Imai K., Isobe M. et al. (1984) Tetrahedron Lett. Vol. 25: P. 3869–3872.
19. Kosterin O., Rozov S. (1993) Pisum Genetics. Vol. 25: P. 27–31.
20. Kulaeva O. A., Tsyganov V. E. (2011) Russian journal of genetics: applied research. Vol. 1 (5): P. 349–360.
21. Kulaeva O. A., Tsyganov B. E. (2013) Russian journal of genetics: applied research. Vol. 3 (2): P. 120–126.
22. Kumar S., Asif M. H., Chakrabarty D. et al. (2013) Plant Mol. Biol. Rep. Vol. 31: P. 569–580.
23. Lee S., Korban S. S. (2002) Planta. Vol. 215: P. 689–693.
24. Liu Z., Gu C., Chen F. et al. (2012) Appl. Biochem. Biotech. Vol. 166: P. 722–734.
25. Loeffler S., Hochberger A., Grill E., et al. (1989) FEB Lett. Vol. 258: P. 42–46.
26. Loscos, J.; Matamoros, M. A.; Becana, M. (2008) Plant Physiol. Vol. 146: P. 1282–1292.
27. Matamoros M. A., Moran J. F., Iturbe-Ormaetxe I. et al. (1999b) Plant Physiol. Vol. 121 (3): P. 879–888.

28. May M.J., Vernoux T., Sanchez-Fernandez R., et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95: P. 12049–12054.
29. Mohamed A. A., Castagna A., Ranieri A., di Toppi L. S. (2012) Plant Physiol. Biochem. Vol. 57: P. 15–22.
30. Moran J.F., Iturbe-Ormaetxe I., Matamoros M.A. (2000) Plant Physiol. Vol. 124 (3): P. 1381–1392.
31. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S. et al. (2012) Plant Cell Environ. Vol. 35: P. 454–484.
32. Oven M., Raith K., Neubert R.H. et al. (2001) Plant Physiol. Vol. 126 (3): P. 1275–1280.
33. Oven M., Page J.E., Zenk M.H., Kutchan T.M. (2002) J. Biol. Chem. Vol. 277 (7): P. 4747–4754.
34. Park J., Song W., Ko D. et al. (2012) Plant J. Vol. 69(2): P. 278–288.
35. Pyngrupe S., Bhoomika K., Dubey R. S. (2013) Protoplasma. Vol. 250: P. 585–600.
36. Ramos J., Clemente M. R., Naya L. et al. (2007) Plant Physiol. Vol. 143: P. 1110–1118.
37. Ramos J., Naya L., Gay M. (2008) Plant Physiol. Vol. 148: P. 536–545.
38. Reese R., Wagner G. (1987) Plant Physiol. Vol. 84: P. 574–577.
39. Rivera-Becerril F., Calantzis C., Turnau K. et al. (2002) J. Exp. Bot. Vol. 53: P. 1177–1185.
40. Rivera-Becerril F., van Tuinen D., Martin-Laurent F. et al. (2005) Mycorrhiza. Vol. 16: P. 51–60.
41. Sanita di Toppi L., Gabbriellini R. (1999) Environ. Exp. Bot. Vol. 41: P. 105–130.
42. Skeffington R.A., Bradshaw A.D. (1980). J. Appl. Ecol. Vol. 17: P. 469–477.
43. Son K.H., Kim D.Y., Koo N. et al. (2012) Environ. Exp. Bot. Vol. 75: P. 9–15.
44. Tsyganov V.E., Zhernakov A. I., Khodorenko A. V. et al. (2005) Bacterial nitrogen fixation, sustainable agriculture and the environment. Proceedings of the 14th International Nitrogen Fixation Congress. Springer. P. 279–281.
45. Tsyganov V., Belimov A., Borisov A. (2007) Ann. Bot. Vol. 99: P. 227–237.
46. Tsyganov V.E., Kulaeva O.A., Knox M.R. (2013) Vol. 3 (2): P. 152–155.
47. Xiang C., Oliver D. (1998) Plant Cell. Vol. 10: P. 1539–1550.
48. Xiang C., Werner B. L., Christensen E. M., Oliver D. J. (2001) Plant Physiol. Vol. 126: P. 564–574.
49. Zagorchev L., Seal Ch., Kranner I., Odjakova M. (2013) Int. J. Mol. Sci. Vol. 14: P. 7405–7432.

☞ Информация об авторах

Кулаева Ольга Алексеевна — к. б. н. научный сотрудник, лаборатория молекулярной и клеточной биологии. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: koa1983@yandex.ru.

Цыганов Виктор Евгеньевич — к. б. н. заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.

Kulaeva Olga Alekseyevna — Scientific Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS. 196608, Saint-Petersburg, Podbelsky chausse 3. Russia. E-mail: koa1983@yandex.ru.

Tsyganov Viktor Yevgenyevich — Head of the Laboratory of Molecular and Cellular Biology. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS. 196608, Saint-Petersburg, Podbelsky chausse 3. Russia. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.