

© Л. Ю. Терентьева<sup>1</sup>,  
Е. Е. Крапивская<sup>1</sup>, Э. М. Мачс<sup>1</sup>,  
А. В. Родионов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ботанический институт  
им. В. Л. Комарова РАН,  
Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский  
государственный университет

✿ **Растения-гипераккумуляторы тяжелых металлов являются основой для разработки технологий очистки загрязненных тяжелыми металлами почв. Наибольшее число гипераккумуляторов содержит семейство *Brassicaceae*, особенно триба *Alyseae*. На основе изучения последовательностей фрагментов ITS1—ген 5.8S рРНК-ITS2 растений трибы *Alyseae* проведен молекулярно-филогенетический анализ, изучено распределение способности к гипераккумуляции Ni внутри трибы. Большинство гипераккумуляторов Ni относятся к секции *Odontarrhena*. Сделан вывод о подразделении трибы на пять клад, компактность которых показана на основе признаков первичной и вторичной структуры ITS2.**

✿ **Ключевые слова:**  
гипераккумуляция; *Brassicaceae*;  
*Alyseae*; *Alyssum*; внутренние  
транскрибируемые спейсеры;  
ITS; молекулярная филогенетика;  
вторичная структура.

## ГИПЕРАККУМУЛЯТОРЫ Ni СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ *ALYSSEAE* СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE* ФЛОРЫ СЕВЕРНОГО КAVKAZA

Сокращения: ITS — internal transcribed spacer (внутренний транскрибируемый спейсер), ПЦР — полимеразная цепная реакция, рДНК — гены рРНК (ядерные, если не указано иного), рРНК — рибосомная рибонуклеиновая кислота (ядерного происхождения — если не указано иного), ТМ — тяжелые металлы.

### ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение воздуха, почв и вод тяжелыми металлами (ТМ) является одним из опасных последствий техногенной нагрузки на окружающую среду, оказывающим влияние на здоровье человека. К ТМ, значительно влияющим на процессы жизнедеятельности живых организмов, относятся, например, свинец, мышьяк, кадмий, медь, цинк, кобальт и ртуть. Металлы, накапливаясь в почвах и воде, попадают в сельскохозяйственные растения и, как следствие, в пищу. Одни ТМ (железо, медь, цинк, кобальт и никель) относятся к необходимым для жизнедеятельности микроэлементам, обладающим токсичностью при концентрациях, значительно превышающих физиологические. Воздействие таких ТМ, как кадмий, ртуть, свинец, приводит к нарушениям в регуляции многих физиологических процессов даже в относительно невысоких дозах (Nawumba et al., 2010).

ТМ могут длительное время находиться в среде, накапливаясь до токсических уровней, поэтому важна разработка стратегий их удаления из окружающей среды и доведения их уровней до безопасных. Для решения проблемы контаминации ТМ за последние три десятилетия было разработано множество физико-химических и биологических технологий, одной из которых является использование растений или фиторемедиация (Memon, Schröder, 2009).

На клеточном уровне растения обладают большим числом механизмов, которые потенциально могут быть связаны с детоксикацией и устойчивостью. Считается, что способность растений к гипераккумуляции не является следствием наличия специфических генов, кодирующих продукты, уникальные для растений-гипераккумуляторов. Предполагается, что это свойство основано на особенностях регуляции транскрипции и/или трансляции белков — компонентов системы гомеостаза металлов и системы детоксикации. Такими компонентами являются, например, мембраносвязанные транспортеры тяжелых металлов, внутриклеточные металлошапероны, необходимые для эффективного распространения малых количеств эссенциальных металлов, хелатирующие агенты и белки, участвующие в процессах связывания металлов. Недостаточность любого элемента системы может привести к гиперчувствительности к ионам ТМ (Gasic, Korban, 2006).

Растения, используемые для фиторемедиации, должны обладать определенными характеристиками. Они должны быть устойчивы к ТМ, способны к накоплению и переносу в надземные части металлов в высоких концентрациях, а также быстро расти и достигать большой биомассы. В природе достаточно редко встречаются растения, одновременно отвечающие всем этим требованиям. Отдельное внимание уделяется категории устойчивых к ТМ видов растений, не являющихся аккумуляторами. Такие растения представляют интерес для биоинженерных исследований, так как могут быть источниками генов, кодирующих пептиды или белки, способные связывать металлы. Многие растения-гипераккумуляторы металлов не только очень медленно растут,

Поступила в редакцию 04.12.2013  
Принята к публикации 18.03.2014

но и обладают небольшими размерами и, как следствие, малой биомассой. При этом многие быстрорастущие и производящие большое количество биомассы растения, такие как злак *Chrysopogon zizanioides*, несмотря на устойчивость к металлам, не являются гипераккумуляторами (Навумба et al., 2010).

Естественными регионами распространения устойчивых растений и аккумуляторов являются природные геохимические аномалии, что делает представителей флоры, обитающей на подобных территориях, привлекательными объектами для исследований. Некоторые виды, произрастающие в таких условиях, устойчивы благодаря способности ограничивать поглощение ТМ из почвы, но некоторые из них могут накапливать значительные количества токсичных металлов. Существуют виды, которые могут аккумулировать ТМ до уровней, в сотни раз превышающих уровни содержания в почве (Метоп, Schröder, 2009). Способность растений накапливать и обезвреживать необычайно высокие концентрации ионов металлов и металлоидов: Ni, Zn, Cd, Se, As, Mn, Co, Cu, Pb, Sb, Tl, в корнях и надземных частях без видимых симптомов токсического воздействия называется гипераккумуляцией (Verbruggen et al., 2009). Чтобы растение могло быть отнесено к гипераккумуляторам, оно должно обладать способностью накапливать металл или металлы в определенной концентрации, отличающейся для каждого элемента в зависимости от степени его токсичности, а также от того, является ли он необходимым для существования растения. Для большинства элементов (Sb As Co, Cu, Ni, Se, Pb, Tl) установлен концентрационный критерий гипераккумуляции > 1000 мкг/г, для Zn и Mn — > 10000 мкг/г, для Cd — > 100 мкг/г. К гипераккумуляторам относят порядка пятисот различных видов растений, что составляет приблизительно 0,2% покрытосеменных. Описанные виды-гипераккумуляторы входят в состав более чем 34 различных семейств, и можно предположить, что способность к гипераккумуляции ТМ имеет полифилетическое происхождение.

Наибольшее число растений-гипераккумуляторов обнаружено в составе семейства *Brassicaceae* (*Канустные*), причем подавляющее большинство относится к родам *Alyssum*, *Noccaea* и *Thlaspi* (Verbruggen et al., 2009). Например, среди 110 видов растений-гипераккумуляторов Ni, произрастающих в умеренной зоне, 93 вида принадлежат семейству *Brassicaceae* (Borhidi, 2001; Алексеева-Попова с соавт., 2013). Считается, что способность к гипераккумуляции металлов независимо возникала внутри семейства несколько раз, как минимум, столько, сколько случаев появления этого признака в различных трибах семейства *Brassicaceae* выявлено на сегодняшний день (Krämer, 2010).

Вышесказанное определяет необходимость подробного изучения видов данного семейства с точки зрения молекулярной биологии, в том числе с точки зрения молекулярной филогенетики. Представляет интерес вы-

яснение происхождения признака гипераккумуляции в семействе *Brassicaceae*, определения триб и родов, наиболее перспективных для поиска потенциально возможных видов-гипераккумуляторов, для поиска новых модельных систем, на которых можно было бы изучать механизмы гипераккумуляции.

Для изучения распределения свойства аккумуляции тяжелых металлов между представителями различных клад внутри трибы *Alyseae* были выделены, амплифицированы и секвенированы районы ITS1–5.8S-ITS2 ядерного гена 35S рРНК семи видов трибы *Alyseae*, затем проведен сравнительный анализ секвенированных последовательностей между собой и с последовательностями ITS1–5.8S-ITS2 других представителей трибы, взятыми из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank (Benson et al., 2005). При использовании методов молекулярной филогенетики были реконструированы их возможные филогенетические отношения (особое внимание было обращено на виды, растущие на богатых металлическими рудами почвах и обладающие способностью к гипераккумуляции тяжелых металлов). Также с помощью построения моделей вторичной структуры была изучена изменчивость участка ITS2 гена рРНК с целью найти молекулярные особенности, характерные для отдельных ветвей филогенетического дерева трибы *Alyseae* в связи со способностью их представителей накапливать ТМ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на материале, собранном в ходе экспедиций сотрудников Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН в районы Северного Кавказа, включающие территории с выходами горных пород, обогащенных тяжелыми металлами, в том числе Ni (ультраосновной массив в среднем течении реки Малка, Кабардино-Балкарская Республика, река Большая Лаба, Карачаево-Черкесская Республика) и в фоновые районы (Ставропольский край), а также на материале растений, выращенных в лаборатории из семян, собранных в ходе экспедиций (Алексеева-Попова с соавт., 2013). Таксономическое определение образцов проведено проф. В.И. Дорофеевым, за что мы ему искренне признательны.

При построении выравниваний и филогенетических деревьев кроме собственных данных использовались последовательности из базы данных GenBank. Для работы (при наличии в базе данных) отбирались последовательности видов-гипераккумуляторов, относящихся к трибе *Alyseae*, и некоторых негипераккумулялирующих представителей трибы. В исследование было взято 77 последовательностей, относящихся к указанной трибе.

Список видов, участки ITS1–ген 5.8S рРНК-ITS2 которых были секвенированы в ходе работы (в скобках приведено место происхождения исследованного образца): *Alyssum alyssoides* (*A. calycinum*) (гора Машук, Став-

ропольский край), *A. gehamense* (выращен в лаборатории Экологии растительных сообществ БИН РАН, место происхождения семян — массив Шалбуздаг, Дагестан), *A. trichostachyum* (бассейн реки Малка, Кабардино-Балкарская республика), *A. hirsutum* (бассейн реки Малка, Кабардино-Балкарская республика), *Berteroa incana* (*syn. A. incana*) (гора Железная, гора Развалка, Ставропольский край), *A. linifolium* (*Meniocus linifolius*) (гора Машук, Ставропольский край), *A. murale* (бассейн реки Большая Лаба, Карачаево-Черкесская Республика).

Список последовательностей, взятых в анализ из GenBank, в скобках приведен индекс последовательности в базе данных GenBank:

*Aethionema arabicum* (AY254539.1),  
*A. saxatile* (GQ284853.1),  
*Alyssum alpestre* (AY237957.1),  
*A. alyssoides* 1 (AF401114.1),  
*A. alyssoides* 2 (EF514594.1),  
*A. americanum* (EF514597.1),  
*A. anatolicum* (AY237956.1),  
*A. argenteum* 1 (AY237955.1),  
*A. argenteum* 2 (GQ284855.1),  
*A. aureum* (EF514601.1),  
*A. baldaccii* (GQ284858.1),  
*A. baumgartnerianum* (EF514602.1),  
*A. bertolonii* (AY237954.1),  
*A. bertolonii subsp. scutarinum* (AY237930.1),  
*A. bertolonii* 2 (GQ284859.1),  
*A. biovulatum* (AY237953.1),  
*A. borzaeanum* (EF514603.1),  
*A. caricum* (AY237952.1),  
*A. chalcidicum* 1 (GQ284869.1),  
*A. chalcidicum* 2 (GQ284874.1),  
*A. condensatum* (AY237951.1),  
*A. corsicum* (AY237949.1),  
*A. corymbosoides* (GQ284878.1),  
*A. cypricum* (AY237948.1),  
*A. dasycarpum* (EF514604.1),  
*A. davisianum* (AY237947.1),  
*A. densistellatum* (GQ284880.1),  
*A. desertorum* (EF514606.1),  
*A. euboeum* (GQ284882.1),  
*A. fallacinum* (AY237946.1),  
*A. floribundum* (AY237945.1),  
*A. fragillimum* (GQ284883.1),  
*A. heldreichii* (GQ284884.1),  
*A. huber-morathii* (AY237943.1),  
*A. lenense* (EF514610.1),  
*A. lesbiacum* (AY237942.1),  
*A. linifolium* (EF514611.1),  
*A. meniocoides* (EF514612.1),  
*A. minus* (AY237939.1),  
*A. montanum* (EU559700.1),  
*A. montanum* 1 (AY237938.1),

*A. montanum* 2 (AM905714.1),  
*A. murale* 1 (AY237936.1),  
*A. murale* 2 (EF514613.1),  
*A. murale* 3 (GQ284887.1),  
*A. nebrodense* (AY237935.1),  
*A. obovatum* (EF514617.1),  
*A. orbelicum* (GQ284888.1),  
*A. oxycarpum* (AY237934.1),  
*A. peltarioides* 1 (AY237940.1),  
*A. peltarioides* 2 (AY237933.1),  
*A. pinifolium* (AY240871.1),  
*A. pintodasilvae* (*A. serpyllifolium ssp. lusitanicum*) (AY237929.1),  
*A. pterocarpum* (AY237931.1),  
*A. repens subsp. trichostachyum* (EF514622.1),  
*A. robertianum* (GQ284889.1),  
*A. serpyllifolium* ('*guitanii*') (AY237944.1),  
*A. serpyllifolium* (EF514623.1),  
*A. serpyllifolium subsp. serpyllifolium* 1 (AY237923.1),  
*A. serpyllifolium subsp. serpyllifolium* 2 (AY237922.1),  
*A. sibiricum* 1 (AY237928.1),  
*A. sibiricum* 2 (GQ284890.1),  
*A. simplex* (EF514624.1),  
*A. smolikanum* (GQ284891.1),  
*A. tenium* (AY237926.1),  
*A. tortuosum* 1 (EF514625.1),  
*A. tortuosum* 2 (GQ284892.1),  
*A. troodi* (GQ284893.1),  
*A. virgatum* (AY237925.1),  
*Berteroa orbiculata* (EF514634.1),  
*Bornmuellera baldaccii* (EF514635.1),  
*B. tymphaea* (EF514638.1),  
*Galitzkya spathulata* (EF514657.1),  
*G. potaninii* (EF514656.1),  
*G. macrocarpa* (EF514655.1),  
*Leptoplax emarginata* 1 (GQ284897.1),  
*L. emarginata* 2 (GQ284896.1).

Выделение ДНК производилось из растительных тканей согласно основному СТАВ-протоколу, модифицированному Дойлами (Doyle, Doyle, 1987), с дополнительными модификациями (Родионов с соавт., 2005). Амплификация производилась методом полимеразной цепной реакции (Mullis et al, 1986). В качестве прямого праймера, комплементарного участку 18S рРНК использовался олигонуклеотид ITS1-Р 5'-aaccttatcatttagaggaagg-3' — 22 н. (Ridgway et al., 2003) («Бигль», Россия). В качестве обратного праймера использовался олигонуклеотид ITS4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' — 20 н. (White et al., 1990) («Бигль», Россия), комплементарный участку гена 26S рРНК. ПЦР производилась в объеме 50 мкл при следующих условиях: 4 мин при 94 °С; 35 циклов: 30 с при 94 °С, 30 с при 56 °С, 1 мин при 72 °С; 7 мин при 72 °С. Секвенирование было выполнено по стандартному протоколу, поставляемому с набором реактивов BigDye™ Terminator Kit vers. 3.1 («Applied Biosystems», США)

на секвенаторе ABI PRIZM 3100 («Applied Biosystems», США) в ЦКП БИН РАН. Секвенирование проводилось в двух направлениях. Для анализа хроматограмм и нуклеотидных последовательностей была использована программа Mega v.5 (Tamura et al., 2011). Поиск высокоомологичных последовательностей в базе данных GenBank был проведен с помощью программы BlastN (Altschul et al., 1990). Выравнивание последовательностей выполнялось с помощью алгоритмов ClustalW (Thompson et al., 1994) и Muscle (Edgar, 2004).

Филогенетический анализ был произведен методом ближайшего соседа (Saitou, Nei, 1987). Достоверность полученных деревьев тестировались бутстреп-методом с 10000 реплик (Felsenstein, 1985). В качестве внешней группы, на основе литературных данных, были выбраны виды *Aethionema arabicum* и *A. saxatile*, относящиеся к роду *Aethionema*, считающемуся базальным для *Brassicaceae* (Al-Shehbaz et al., 2006). Эволюционные дистанции для филодендрограммы вычислялись на основе метода максимального составного правдоподобия (Maximum composite likelihood) (Tamura et al., 2004).

Возможные вторичные структуры РНК рассчитывались с помощью алгоритма Цукера (Zuker et al., 1999) при использовании программы Mfold v. 3.5 на Интернет-сервере Mfold (Zuker, 2003). Полученные модели

сравнивались с так называемой универсальной структурой ITS2 рРНК для цветковых растений (Coleman, 2007).

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

**Оценка генетических расстояний между представителями трибы *Alyseae***

В процессе работы были амплифицированы и секвенированы фрагменты ITS1–ген 5.8S рРНК–ITS2 гена 35S рибосомной РНК. Длина полученных фрагментов варьировала от 672 нуклеотидов до 762 нуклеотидов. С помощью алгоритмов ClustalW и Muscle с последующим редактированием было построено выравнивание, включившее 7 секвенированных последовательностей, внешнюю группу и 77 последовательностей 65 видов из базы данных GenBank, согласно литературным данным относящихся к *Alyseae*. На основе построенного выравнивания с помощью метода ближайшего соседа была получена филогенетическая реконструкция (филогенетическое дерево или филодендрограмма), представленная на рисунке 1. На рисунке отображены только ветви, значения бутстреп-индекса (индекса статистической оценки неслучайного характера топологии) которых составили более 50 % (на рисунках обозначены значения индексов каждой ветви в процентах). Как можно видеть,

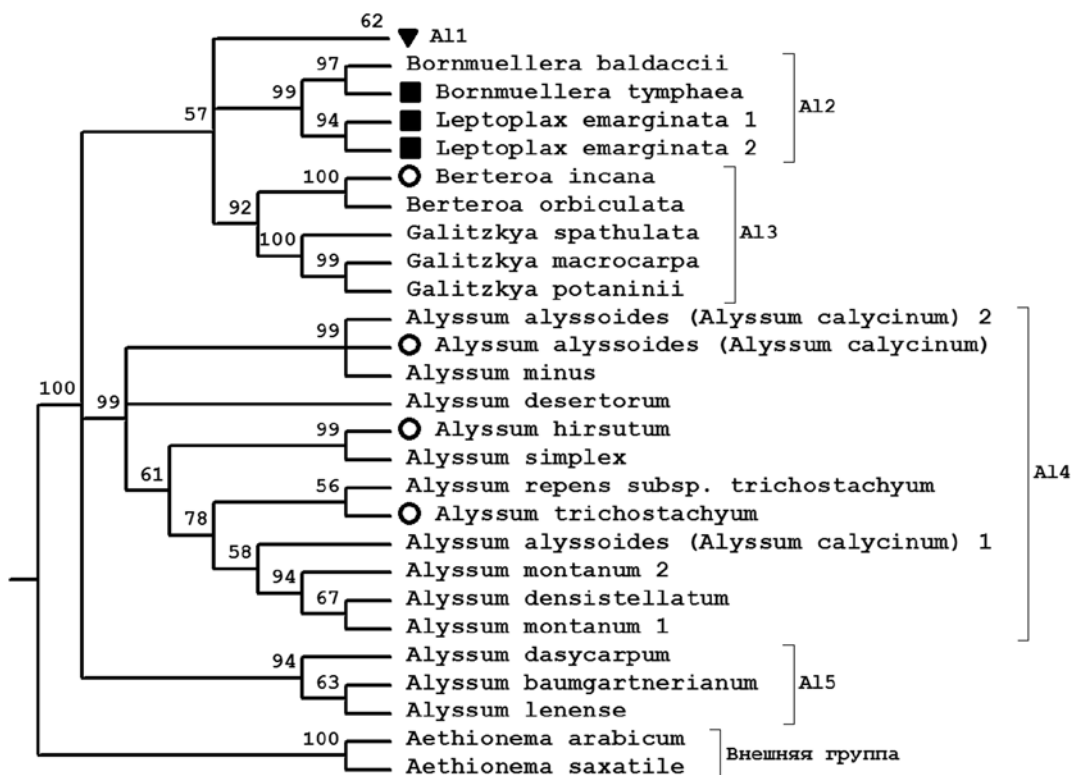


Рис. 1. Дендрограмма последовательностей представителей трибы *Alyseae*. Белым кругом отмечены последовательности, секвенированные в ходе работы, чёрным квадратом обозначены виды-гипераккумуляторы Ni, черным треугольником для удобства отображения обозначена группа A11 (полностью представлена на рис. 2). Над каждой ветвью обозначены значения бутстреп-индекса в процентах (отображены только ветви с индексом более 50 %)

кроме внешней группы, четко выделяется пять клад, на изображении отмеченных как A11 — A15. Так как группа A11 достаточно велика, для удобства отображения на рисунке 1 она свернута и представлена отдельно более крупно на рисунке 2. На филогендерограмме видно, что в группе A14 гипераккумуляторов нет. К ней относятся последовательности *Alyssum alyssoides* (*A. calycinum*),

*A. hirsutum*, *A. trichostachyum*. *Berteroa incana* входит в группу A13, также не имеющую гипераккумуляторов. Свойством гипераккумуляции обладают все рассмотренные виды группы A12. При этом все рассмотренные накапливающие никель представители рода *Alyssum* относятся к наиболее многочисленной группе A11, в том числе *Alyssum murale*, последовательность которого

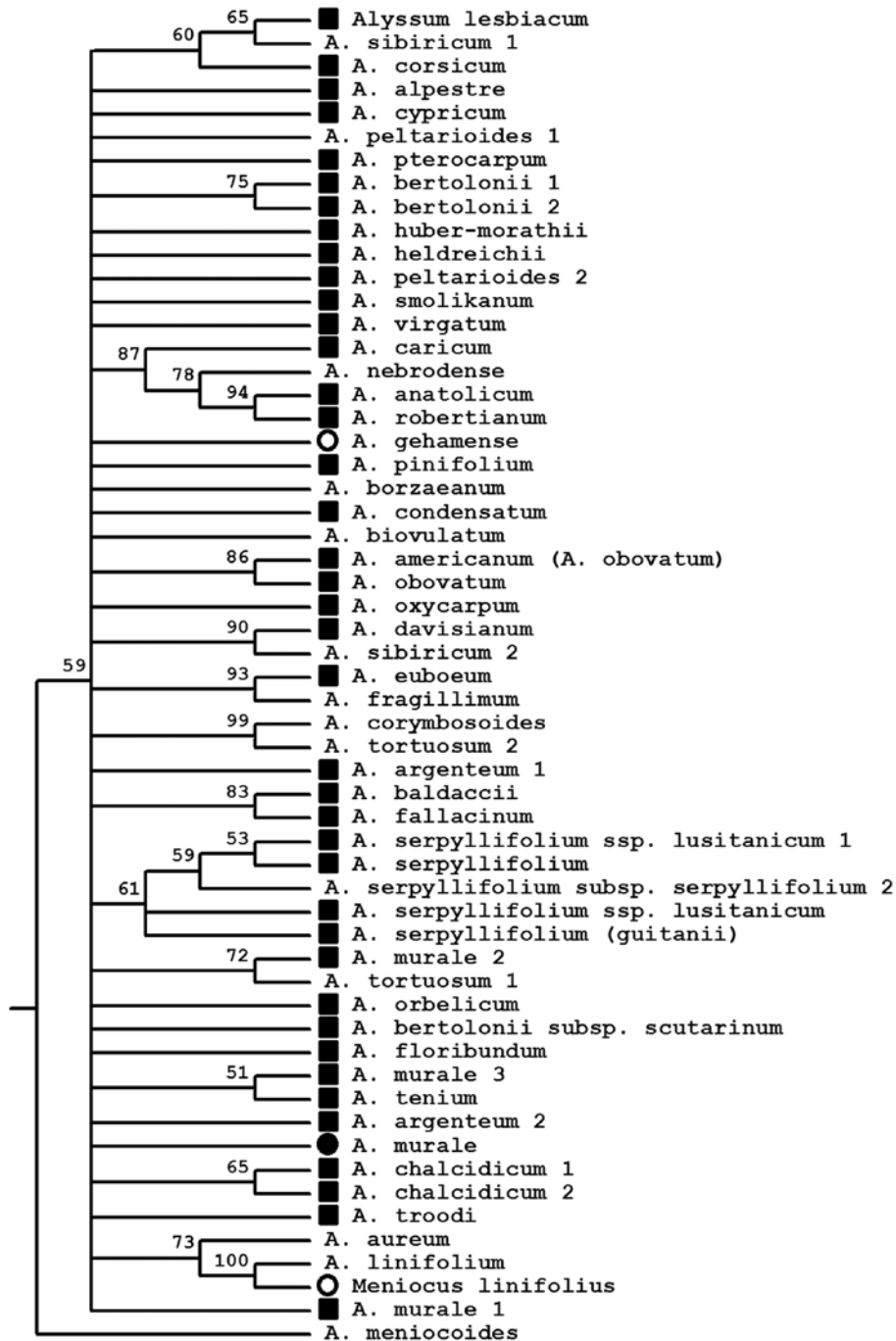


Рис. 2. Дендрогамма последовательностей клады A11 представителей трибы *Alyssae*. Черным квадратом обозначены виды, способные к гипераккумуляции Ni, белым кругом отмечены последовательности, секвенированные в ходе работы, черным кругом — последовательности видов-гипераккумуляторов, секвенированные в ходе работы. Над каждой ветвью обозначены значения бутструп-индекса в процентах (отображены только ветви с индексом более 50 %)

была секвенирована в ходе работы. В группу A11 также входят последовательности негипераккумулирующих видов, в том числе секвенированные последовательности *Meniocus linifolius* и *A. gehamense*.

**Изучение первичной и вторичной структуры ITS2 рДНК представителей трибы *Alyseae***

Длина последовательностей участка ITS2 рДНК рассмотренных представителей трибы *Alyseae* составляет от 203 до 233 оснований. У тринадцати последовательностей длина секвенированного участка была меньше (от 173 до 203 оснований). Рассмотрение первичной структуры ITS2 показало, что абсолютно консервативные, умеренно консервативные и переменные сайты распределены неоднородно по длине участка. В последовательностях имеется два переменных фрагмента: первый — от 17-го (21-го) до 42-го (53-го) основания, второй от 129-го (156-го) до 149-го (178-го) основания от 5'-конца. Номер основания по порядку зависит от общей длины последовательности, указаны номера для последовательностей с минимальным и максимальным (в скобках) количествами вставок. Разделение трибы *Alyseae* на пять клад подтверждается тем, что указанные переменные участки имеют разную первичную структуру для последовательностей, входя-

щих в разные группы согласно результатам построения филогенетической диаграммы. В таблицах 1 и 2 представлены примеры переменных участков для каждой группы. Внутри клад различия менее значительны, чем между кладами, поэтому в качестве примеров были взяты последовательности отдельных видов, типичные для каждой группы (A11 — *Alyssum alpestre*, A12 — *Leptoplax emarginata* 1, A13 — *Berteroa orbiculata*, A14 — *Alyssum simplex*, A15 — *Alyssum lenense*). Подобные характерные для каждой группы отличия подтверждают разделение рассмотренных видов на пять клад.

Для каждой рассмотренной последовательности с помощью программы Mfold (Zuker, 2003) были построены модели вторичных структур ITS2. Для анализа выбирались структуры с наименьшей свободной энергией как наиболее стабильные. Внутри клад A11 и A14 можно выделить наиболее типичные для каждой группы структуры, тогда как для A12, A13 и A15 из-за небольшого числа представленных внутри них видов, говорить об общей структуре ITS2 трудно. Структуры, типичные для A11 и A14, можно видеть на рисунках 3 и 4 соответственно. Переменные участки обозначены строчными буквами. Имеются четыре шпильчатые структуры I — IV (в направлении 5' → 3'), переменные участки расположены внутри шпилек I и III (см. рис. 3, 4), в составе

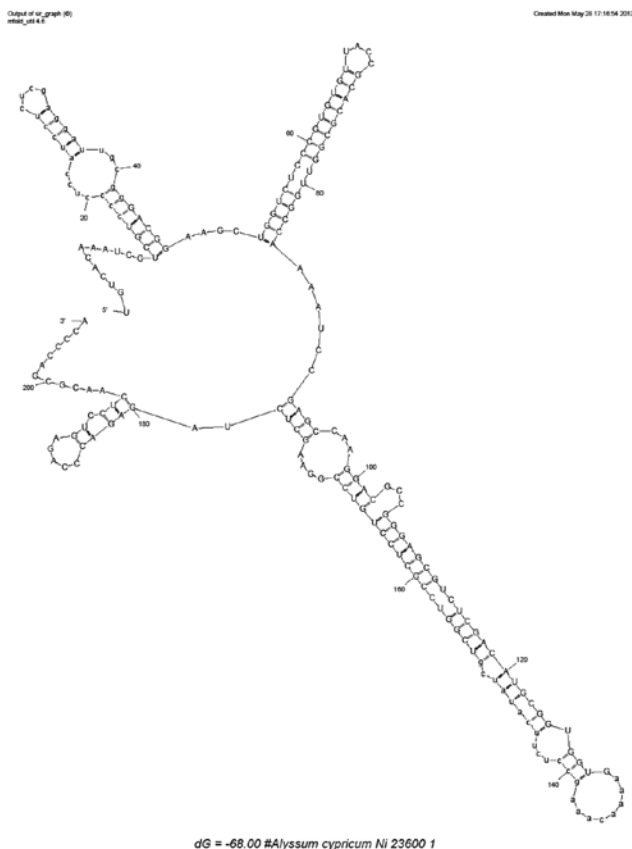


Рис. 3. Вторичная структура участка ITS2, типичная для группы последовательностей A11

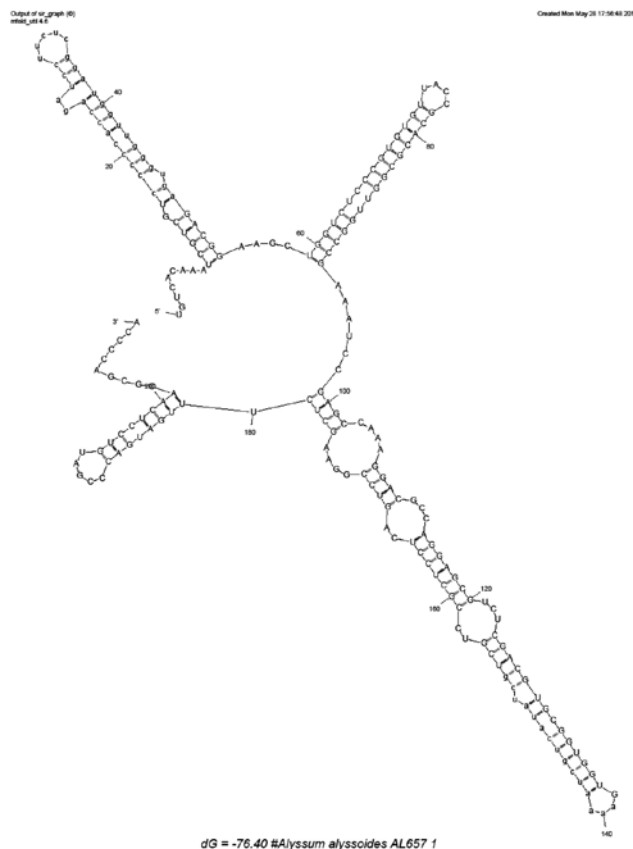


Рис. 4. Вторичная структура участка ITS2, типичная для группы последовательностей A14

шпильки II у всех структур имеется неспаренный участок пиримидин — пиримидин (обозначен как А), на конце шпильки III имеется мотив GUGGU (обозначен как В). Полученные структуры в общем соответствуют так называемой «универсальной» структуре ITS2 наземных растений, хотя второй варибельный участок расположен в шпильке III, а не IV (Coleman, 2007). При этом структура каждой группы имеет характерные особенности, в основном связанные с конфигурацией промежуточных петель в шпильках, что можно видеть на рисунках. Также отличием структуры ITS2 группы A14 является то, что шпилька I является более длинной, чем у структуры A11, что видно по расположению 60-го нуклеотида с 5'-конца (обозначен С). В группе A11 присутствуют три вида (*Alyssum aureum*, *A. linifolium*, *Meniocus linifolius*), у которых 60-й нуклеотид с 5'-конца так же, как и у представителей группы A14, расположен у основания шпильки II. На рисунке 3 видно, что указанные виды на филодендрограмме выделяются в отдельную подгруппу с бутстреп-поддержкой 73 %.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наибольшее число описанных гипераккумуляторов Ni принадлежит трибе *Alysseae*, конкретнее, роду *Alyssum*. Согласно современным взглядам, род *Alyssum* подразделяется на шесть секций: *Meniocus*; *Psilonema*; *Alyssum*; *Gamosepalum*; *Tetradenia*; *Odontarrhena*. Самыми большими секциями являются *Alyssum* и *Odontarrhena*. (Mengoni et al., 2003) Все обнаруженные гипераккумуляторы никеля относятся к секции *Odontarrhena*, в которой негипераккумулярующие виды распределены по различным кладам. Признак мог быть утерян или, что менее вероятно, приобретен неоднократно (Mengoni et al., 2003). Преобладание гипераккумуляторов никеля среди прочих видов, способных к накоплению металлов, соотносится с большим числом природных обнажений Ni-обогащенных ультрамафических горных пород (Krämer, 2010).

Представляемая работа является частью совместного проекта лабораторий Биосистематики и цитологии и Экологии растительных сообществ БИН РАН, имеющего целью изучение популяций различных видов *Brassicaceae*, растущих на территориях, обогащенных ТМ, в том числе на ультраосновных породах с высокими концентрациями никеля. Параллельно получению представленных в данной работе результатов сотрудниками лаборатории Экологии растительных сообществ изучалась способность к гипераккумуляции видов, последовательности ITS1—ген 5.8S рРНК-ITS2 которых были секвенированы в ходе представляемого исследования. Изучение химического состава растений показало, что среди исследованных видов к гипераккумуляторам Ni может быть отнесен только один, *Alyssum murale*, который накапливал в надземной части >1 % (12130 мг/кг) этого элемента (Дроздова с соавт., 2013). Следует отметить, что способ-

ность к гипераккумуляции Ni у *Alyssum murale* наблюдалась и в других географических районах (Tang et al., 2012). Единственным видом, который оказался способен накопить Zn в значительной концентрации (1640 мг/кг), оказался *Alyssum gehamense* (Дроздова с соавт., 2012). По принятой классификации данный вид нельзя отнести к гипераккумуляторам, но подобные данные говорят о специфической способности аккумулировать цинк, что необычно для вида рода *Alyssum*, так как считается, что представители *Alyssum* цинк в гиперконцентрациях не накапливают (Verbruggen et al., 2009).

На сегодняшний день имеется не так много молекулярно-филогенетических исследований, касающихся вопроса о распределении свойства гипераккумуляции никеля внутри трибы *Alysseae*. В некоторых значимых работах по этой теме (Mengoni et al., 2003; Cecchi et al., 2010) исследования проводились с использованием анализа внутренних транскрибируемых спейсеров генов рРНК. Однако количество видов, которые рассматривались авторами, было меньше, чем в представляемой работе (около тридцати пяти и около пятидесяти соответственно). Полученное в ходе данной работы на филодендрограмме (рис. 1) выделение родов *Bornmuellera* и *Leptoplax*, а также *Berteroa* и *Galitzkaya* в отдельные клады (A12 и A13) соответствует известным данным (Cecchi et al., 2010). Выделение клады A11, содержащей наибольшее число представителей рода *Alyssum*, накапливающих никель, а также клады A14, содержащей неаккумулярующие виды *Alyssum*, также соответствует имеющимся сведениям о том, что все гипераккумуляторы *Alyssum* входят в секцию *Odontarrhena*, тогда как имеется вторая большая секция *Alyssum*, не имеющая в составе аккумуляторов (Mengoni et al., 2003). Однако клада A11 включила не только представителей *Odontarrhena*, но и представителей секции *Meniocus* (*Alyssum aureum*, *A. linifolium*, *A. meniocoides*, *Meniocus linifolius*). При этом все эти виды образовали небольшую подгруппу внутри A11, за исключением *Alyssum meniocoides*, который оказался удаленным от большинства видов, вошедших в A11. Выделение *Alyssum aureum*, *A. linifolium*, *M. linifolius* в отдельную подгруппу подтверждается тем, что вторичные структуры участков ITS2 указанных видов имеют характерную особенность: расположение 60-го нуклеотида с 5'-конца у основания шпильки II, как у вторичных структур видов группы A14 (см. рис. 3, 4). При этом первичные последовательности этих видов имеют такую же структуру варибельных участков, как и у остальных видов, вошедших в A11. Исследование первичной и вторичной структур участков ITS2 рДНК всех рассмотренных видов *Alysseae* показало наличие характерных для каждой полученной клады особенностей (см. табл. 1, 2 и рис. 3, 4), что подтверждает компактность выделенных групп. При этом структура клады A11 и распределение признака гипераккумуляции в ней требует дополнительного исследования.

Таблица 1

Сравнение переменных участков 17 (21)–42 (53) (номера положений в ITS2), типичных для групп последовательностей A11–A15. Выделены позиции, в которых наблюдаются различия между группами

Клада	Последовательность
A11	----CCCTCC--ATCCTCTC----GAGGATTGC-----GG
A12	CCCCCCCCCTCC--ATCCTTGCTTGGCAGGATGCCGGAC--GG
A13	---CCCCCAT---ATCCTTT-----GAGGATGAT-----CG
A14	--CCCCCACCCAGATCCTTC-----TCGGACGGATGGTGGA
A15	---CCCCCACCT-ATCCTTT-----TCGGATGGATGGTGGA

Таблица 2

Сравнение переменных участков 129 (156) – 149 (178) (номера положений в ITS2), типичных для групп последовательностей A11–A15. Выделены позиции, в которых наблюдаются различия между группами

Клада	Последовательность
A11	AAAA <b>CAAAG</b> -CCTCTTC-ATATCG--TCG
A12	AAAA <b>C-TTG</b> -CCTCTTT-GTACGG--TCG
A13	AAAA <b>C-AAG</b> -CCTCCTA-CTATTG--TTT
A14	AAAA-----TCGTC-ATATCG--TCG
A15	AAAA-----TCCTC-ATACTG--TCG

Интересным является тот факт, что в кладе A11 вошел вид *Alyssum gehamense*, не накапливающий никель, но способный к аккумуляции цинка. Это говорит о том, что, вероятно, представители трибы *Alysseae*, в особенности, относящиеся к кладе A11, обладают высоким адаптивным потенциалом и их способность накапливать высокие концентрации других металлов, помимо Ni, требует дополнительных исследований, так как это свойство в трибе ранее зафиксировано не было (Verbruggen et al., 2009). Одним из потенциальных направлений будущих исследований может быть поиск корреляций между количеством ТМ, которые может накопить тот или иной представитель *Alysseae*, и его положением в системе трибы. Изучение растений, способных накапливать различные уровни ТМ, может помочь в создании новых моделей для изучения свойства гипераккумуляции. Исследование видов, накапливающих достаточно высокие концентрации ТМ, но при этом не являющихся гипераккумуляторами, может позволить получить новые данные о молекулярных механизмах накопления ТМ растениями.

Работа финансировалась из средств грантов РФФИ 11-04-02108, 12-04-01470, 12-04-31524.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам БИН РАН: д.б.н., проф. В.И. Дорофееву, к.б.н., вед.н.с. Н.В. Алексеевой-Поповой, к.б.н., с.н.с. И.В. Дроздовой, к.б.н., н.с. И.Б. Калимовой за помощь в осуществлении работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева-Попова Н.В., Дроздова И.В., Калимова И.Б., Беляева А.И. (2013) **Аккумуляция и ги-**

**пераккумуляция тяжелых металлов видами крестоцветных в природных и экспериментальных условиях. Современная ботаника в России. Труды XIII съезда Русского ботанического общества и конференции «Научные основы охраны и рационального использования растительного покрова Волжского бассейна».** Т. 2: С. 196–197.

2. Дроздова И.В., Калимова И.Б., Беляева А.И. (2012) **Аккумуляция тяжелых металлов видами растений семейства Cruciferae флоры Северного Кавказа. Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования: материалы IV Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием.** Ч. 1: С. 282.
3. Родионов А.В., Тюпа Н.Б., Ким Е.С. с соавт. (2005) **Геномная конституция автотетраплоидного овса *Avena macrostachya*, выявленная путем сравнительного анализа последовательностей ITS1 и ITS2: к вопросу об эволюции кариотипов овсов и овсюгов на ранних этапах дивергенции видов рода *Avena*.** *Генетика.* Т. 41 (5): С. 646–656.
4. Al-Shehbaz I.A., Beilstein M.A., Kellogg E.A. (2006) **Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview.** *Pl. Syst. Evol.* V. 259: P. 89–120.
5. Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. (1990) **Basic local alignment search tool.** *J. Mol. Biol.* V. 215: P. 403–410.
6. **Basic local alignment search tool. National Center for Biotechnology Information.** Cited: 2012–2013. URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
7. Benson D.B., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J. et al. (2005) **GenBank.** *Nucleic Acids Res.* V. 33: P. 34–38.



8. Borhidi A. (2001) **Phylogenetic trends in Ni-accumulating plants.** *South African J. of Sci.* V. 97: P. 544–547.
9. Cecchi L., Gabbriellini R., Arnetoli M. et al. (2010) **Evolutionary lineages of nickel hyperaccumulation and systematics in European Alysseae (Brassicaceae): evidence from nrDNA sequence data.** *Annals of Botany.* V. 106: P. 751–767.
10. Coleman A. W. (2007) **Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure.** *Nucleic Acids Research.* V. 35: P. 3322–3329.
11. Doyle J.J., Doyle J.L. (1987) **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemical Bulletin.* V. 19: P. 11–15.
12. Edgar R. C. (2004) **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Research.* V. 32: P. 1792–1797.
13. Felsenstein J. (1985) **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** *Evolution.* V. 39: P. 783–791.
14. Gasic K., Korban S.S. (2006) **Heavy metal stress.** In: Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Janardhan Reddy K., editors. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants.* Netherlands.: Springer; p. 219–254.
15. **GenBank. National Center for Biotechnology Information.** Cited: 2012–2013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
16. Hawumba J.F., Sseruwagi P., Hung Y.-T., Wang L.K. (2010) **Bioremediation.** In: Wang L.K. et al., editors. *Handbook of Environmental Engineering. V. 11: Environmental Bioengineering.* LLC.: Springer Science + BusinessMedia; p. 277–316.
17. Krämer U. (2010) **Metal hyperaccumulation in plants.** *Annu. Rev. Plant Biol.* V. 61: P. 517–534.
18. Memon A. R., Schröder P. (2009) **Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation.** *Environ Sci. Pollut Res.* V. 16: P. 162–175.
19. Mengoni A., Baker A.J.M., Bazzicalupo M. et al. (2003) **Evolutionary dynamics of nickel hyperaccumulation in Alyssum revealed by ITS nrDNA analysis.** *New Phytologist.* V. 159: P. 691–699.
20. Mullis K., Faloona F., Scharf S. et al. (1986) **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* V. 51: P. 263–273.
21. Ridgway K. P., Duck J. M., Young J. P. W. (2003) **Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron.** *BMC Ecology.* V. 3: P. 8.
22. **RNA Folding Form. The mfold Web Server.** Cited: 2012–2013. URL: <http://mfold.rit.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>.
23. Saitou N., Nei M. (1987) **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol.* V. 4: P. 406–425.
24. Tang Y., Deng T., Wu Q. et al. (2012) **Designing crop systems for metal-contaminated site: a review.** *Pedosphere.* V. 22: P. 470–488.
25. Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004) **Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* V. 101: P. 11030–11035.
26. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. (2011) **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** *Molecular Biology and Evolution.* V. 28: P. 2731–2739.
27. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res.* V. 22: P. 4673–4680.
28. Verbruggen N., Hermans C., Schat H. (2009) **Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants.** *New Phytologist.* V. 181: P. 759–776.
29. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., editors. *PCR protocols: a Guide to methods and Applications.* San Diego.: Academic Press; p. 315–322.
30. Zuker M. (2003) **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.** *Nucleic Acids Res.* V. 31: P. 3406–3415.
31. Zuker M., Mathews D.H., Turner D.H. (1999) **Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide.** In: Barciszewski J., Clark B.F.C., editors. *RNA Biochemistry and Biotechnology. NATO ASI Series.* Dordrecht.: Kluwer Academic Publishers; p. 11–43.

**NI HYPERACCUMULATORS AMONG NORTH CAUCASIAN PLANT SPECIES OF THE TRIBE ALYSSEAE, BRASSICACEAE**

*Terent'eva L. Yu., Krapivskaya E. E., Machs E. M., Rodionov A. V.*

✿ **SUMMARY:** *Background.* Heavy metals are dangerous industrial pollutants. Phytoremediation technology is a promising way to detoxificate polluted territories. Heavy metals hyperaccumulating plants present the base for development of these technologies. Many hyperaccumulators belong to the family *Brassicaceae* (mostly to the *Alysseae* tribe). *Results.* Analysis of molecular phylogeny and distribution of hyperaccumulation ability within the tribe *Alysseae* has been performed using sequences of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region. Neighbor-joining tree has been reconstructed to investigate affinity within *Alysseae* species. For the first time molecular characters (variable region of the ITS2 structures and compensatory nucleotide substitutions availability) have been used to analyze phylogenetic structure of the tribe. *Conclusion.* Most of the known hyperaccumulators among species of the *Alysseae* tribe belong to the *Odontar-*

*rhena* section. ITS2 primary and secondary structure analysis results in the partition of the tribe *Alyseae* into five clades.

✿ **KEY WORDS:** hyperaccumulation; *Brassicaceae*; *Alyseae*; *Alysum*; internal transcribed spacers; ITS; molecular phylogeny; secondary structure.

✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

- Alekseeva-Popova N. V., Drozdova I. V., Kalimova I. B., Belyaeva A. I. (2013) **Akkumulyatsiya i giperakumulyatsiya tyazhelykh metallov vidami krestotsvetnykh v prirodnykh i eksperimentalnykh usloviyakh [Brassicaceae species heavy metals accumulation and hyperaccumulation in natural and experimental conditions]** *Sovremennaya botanika v Rossii. Trudy XIII syezda Russkogo botanicheskogo obshchestva i konferentsii «Nauchnye osnovy okhrany i ratsionalnogo ispolzovaniya rastitelnogo pokrova Volzhskogo basseyna»*. T. 2: P. 196–197.
- Drozdova I. V., Kalimova I. B., Belyaeva A. I. (2012) **Akkumulyatsiya tyazhyolykh metallov vidami rasteny semeystva Cruciferae flory Severnogo Kavkaza [Family Cruciferae flora plant species of North Caucasus heavy metals accumulation]**. *Biologicheskiye sistemy: ustoychivost, printsipy i mekhanizmy funktsionirovaniya: materialy IV Vseros. nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiyem*. V. 1: P. 282.
- Rodionov A. V., Tyupa N. B., Kim E. S. et al. (2005) **Genomic Configuration of the Autotetraploid Oat Species *Avena macrostachya* Inferred from Comparative Analysis of ITS1 and ITS2 Sequences: on the Oat Karyotype Evolution during the Early Events of the *Avena* Species Divergence**. *Russian Journal of Genetics*. V. 41 (5): P. 646–656.
- Al-Shehbaz I. A., Beilstein M. A., Kellogg E. A. (2006) **Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview**. *Pl. Syst. Evol.* V. 259: P. 89–120.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W. et al. (1990) **Basic local alignment search tool**. *J. Mol. Biol.* V. 215: P. 403–410.
- Basic local alignment search tool. National Center for Biotechnology Information**. Cited: 2012–2013. URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Benson D. B., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J. et al. (2005) **GenBank**. *Nucleic Acids Res.* V. 33: P. 34–38.
- Borhidi A. (2001) **Phylogenetic trends in Ni-accumulating plants**. *South African J. of Sci.* V. 97: P. 544–547.
- Cecchi L., Gabbriellini R., Arnetoli M. et al. (2010) **Evolutionary lineages of nickel hyperaccumulation and systematics in European Alyseae (Brassicaceae): evidence from nrDNA sequence data**. *Annals of Botany*. V. 106: P. 751–767.
- Coleman A. W. (2007) **Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure**. *Nucleic Acids Research*. V. 35: P. 3322–3329.
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1987) **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. *Phytochemical Bulletin*. V. 19: P. 11–15.
- Edgar R. C. (2004) **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput**. *Nucleic Acids Research*. V. 32: P. 1792–1797.
- Felsenstein J. (1985) **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap**. *Evolution*. V. 39: P. 783–791.
- Gasic K., Korban S. S. (2006) **Heavy metal stress**. In: Madhava Rao K. V., Raghavendra A. S., Janardhan Reddy K., ed. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Netherlands.: Springer; p. 219–254.
- GenBank. National Center for Biotechnology Information**. Cited: 2012–2013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Hawumba J. F., Sseruwagi P., Hung Y.-T., Wang L. K. (2010) **Bioremediation**. In: Wang L. K. et al., editors. *Handbook of Environmental Engineering*. V. 11: *Environmental Bioengineering*. LLC.: Springer Science + BusinessMedia; p. 277–316.
- Krämer U. (2010) **Metal hyperaccumulation in plants**. *Annu. Rev. Plant Biol.* V. 61: P. 517–534.
- Memon A. R., Schröder P. (2009) **Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation**. *Environ Sci Pollut Res*. V. 16: P. 162–175.
- Mengoni A., Baker A. J. M., Bazzicalupo M. et al. (2003) **Evolutionary dynamics of nickel hyperaccumulation in *Alysum* revealed by ITS nrDNA analysis**. *New Phytologist*. V. 159: P. 691–699.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S. et al. (1986) **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction**. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* V. 51: P. 263–273.
- Ridgway K. P., Duck J. M., Young J. P. W. (2003) **Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron**. *BMC Ecology*. V. 3: P. 8.
- RNA Folding Form. The mfold Web Server**. Cited: 2012–2013. URL: <http://mfold.rutgers.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>.
- Saitou N., Nei M. (1987) **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Mol Biol Evol*. V. 4: P. 406–425.
- Tang Y., Deng T., Wu Q. et al. (2012) **Designing cropping systems for metal-contaminated site: a review**. *Pedosphere*. V. 22: P. 470–488.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004) **Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method**. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. V. 101: P. 11030–11035.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. (2011) **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance,**

- and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. V. 28: P. 2731–2739.
27. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994) **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res.* V. 22: P. 4673–4680.
  28. Verbruggen N., Hermans C., Schat H. (2009) **Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants.** *New Phytologist*. V. 181: P. 759–776.
  29. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: Innis M. A., Geland D. H., Sninsky J. J., White T. J., editors. *PCR protocols: a Guide to methods and Applications*. San Diego.: Academic Press; p. 315–322.
  30. Zuker M. (2003) **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.** *Nucleic Acids Res.* V. 31: P. 3406–3415.
  31. Zuker M., Mathews D. H., Turner D. H. (1999) **Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide.** In: Barciszewski J., Clark B. F. C., editors. *RNA Biochemistry and Biotechnology. NATO ASI Series*. Dordrecht.: Kluwer Academic Publishers; p. 11–43.

☪ Информация об авторах

**Терентьева Лариса Юрьевна** — аспирант. Лаборатория биосистематики и цитологии. Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. E-mail: akeladc@gmail.com.

**Крапивская Елена Евгеньевна** — ведущий инженер. Лаборатория биосистематики и цитологии. Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. E-mail: plantcaryo@gmail.com.

**Мачс Эдуард Модрисович** — к. б. н., старший научный сотрудник. Лаборатория биосистематики и цитологии. Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. E-mail: plantcaryo@gmail.com.

**Родионов Александр Викентьевич** — профессор, д. б. н., заведующий лабораторией. Лаборатория биосистематики и цитологии. Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. Кафедра цитологии и гистологии. Петербургский гос. университет. E-mail: avrodionov@mail.ru.

**Terent'eva Larisa Yur'evna** — Graduate student. Laboratory of Biosystematics and plant cytology. Komarov Botanical institute, RAS. 197376, Saint-Petersburg, Prof. Popova St., 2. Russia. E-mail: akeladc@gmail.com.

**Krapivskaya Elena Evgen'evna** — Leading Engineer. Laboratory of Biosystematics and plant cytology. Komarov Botanical institute, RAS. 197376, Saint-Petersburg, Prof. Popova St., 2. Russia. E-mail: plantcaryo@gmail.com.

**Machs Eduard Modrisovich** — Senior researcher (PhD). Laboratory of Biosystematics and plant cytology. Komarov Botanical institute, RAS. 197376, Saint-Petersburg, Prof. Popova St., 2. Russia. E-mail: plantcaryo@gmail.com.

**Rodionov Aleksandr Vikent'evich** — Professor (Dr. Biol.), Head of the Laboratory. Laboratory of Biosystematics and plant cytology. Komarov Botanical institute, RAS. 197376, Saint-Petersburg, Prof. Popova St., 2. Russia. Department of Cytology and Histology. Saint-Petersburg state university. E-mail: avrodionov@mail.ru.