



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ СРЕДЫ

УДК 575.1/.2:574.2

© О. А. Кулаева^{1,2}, В. Е. Цыганов¹

¹ ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН

² Санкт-Петербургский

государственный университет

☼ Кадмий (Cd) является одним из наиболее широко распространенных и опасных загрязняющих элементов для всех живых организмов, включая растения. В настоящее время ведутся интенсивные исследования механизмов накопления Cd в тканях растений и их устойчивости к его токсичному действию. Были получены данные о варьировании признаков устойчивости и накопления Cd в природных популяциях как видов-гипераккумуляторов, так и ценных сельскохозяйственных культур. Получен ряд мутантов с измененной чувствительностью к данному тяжелому металлу. В последнее десятилетие выявлено несколько классов белков, участвующих в ответах клетки на действие ионов Cd. Недавно была показана важная роль микроРНК в адаптации растений к Cd. Исследования молекулярно-генетических механизмов аккумуляции Cd и устойчивости к нему растений служат теоретической базой для разработки методов фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами, а также селекции сортов сельскохозяйственных растений с пониженной аккумуляцией Cd.

☼ **Ключевые слова:** генетический анализ устойчивости к кадмию; гипераккумуляция; переносчики металлов; металлотионены; фитохелатины; микроРНК; фиторемедиация; транскриптомный анализ; сверхэкспрессия гена; РНК-интерференция.

Поступила в редакцию 09.12.2009.

Принята к публикации 12.05.2010.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ К КАДМИЮ И ЕГО АККУМУЛЯЦИИ

Тяжелые металлы являются одними из основных загрязнителей окружающей среды, причем они поступают в почву, водоемы и атмосферу как в результате естественных процессов (выветривание горных пород, вулканическая деятельность), так и в результате хозяйственной деятельности человека (горнодобывающая, металлургическая, химическая промышленность, транспорт, внесение минеральных удобрений) (Титов и др., 2007). Cd является одним из наиболее опасных и широко распространенных загрязняющих элементов. За последние 50 лет в окружающую среду было выброшено 22000 тонн Cd (Singh et al., 2003). Передача Cd по пищевым цепям может вызывать серьезные нарушения жизнедеятельности у многих живых организмов (Sanita di Toppi et al., 1999).

У растительных организмов выделяют два вида устойчивости: **основная** устойчивость, присущая большинству растений, и **гиперустойчивость** к определенным металлам (Clemens, 2001). Гиперустойчивость может быть опосредована, как за счет механизмов исключения Cd, так и за счет гипераккумуляции металлов в наземной части растения (Baker, 1981; Clemens, 2006). К растениям-гипераккумуляторам принято относить растительные организмы, способные накапливать металлы в надземной части в концентрации в 100–1000 раз превышающей таковую у обычных растений (Brooks, 1998). Гипераккумуляция Cd и гиперустойчивость к Cd были описаны только для четырех видов растений (*Thlaspi caerulescens*, *Thlaspi praecox*, *Arabidopsis halleri* и *Sedum alfredii*), которые также являются гипераккумуляторами цинка, некоторые исследователи относят к гипераккумуляторам Cd также и *Brassica juncea* (Verbruggen et al., 2009). Исследование механизмов гиперустойчивости к Cd и его гипераккумуляции вызывает огромный интерес как основа для разработки технологий фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами (Peer et al., 2005).

Многие аспекты устойчивости растений к Cd были подробно освещены в ряде обзоров (Серегин, 2001; Титов и др., 2007; Sanita di Toppi et al., 1999; Clemens, 2006; DalCorso et al., 2008; Grant et al., 2008; Verbruggen et al., 2009). В нашем обзоре мы уделим особое внимание последним достижениям в области исследований молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений к Cd.

ВЛИЯНИЕ Cd НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Cd не является элементом, необходимым для роста большинства растений и животных и не участвует в каких-либо процессах клеточного метаболизма за редким исключением диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii*, у которой он присутствует в молекуле карбоновой ангидразы вместо цинка (Lane et al., 2005). Другим возможным исключением являются некоторые популяции *T. caerulescens* с юга Франции, в которых Cd требуется растениям для оптимального роста (Roosens et al., 2003; Liu et al., 2008).

Cd поступает в живые организмы через переносчики металлов (цинка, железа) и кальциевые каналы. Довольно низкие концентрации Cd ингибируют основные физиологические процессы растений, такие как: рост, развитие, фотосинтез, дыхание, водный обмен, минеральное питание и продуктивность (Титов и др., 2007).

Показано, что большое сходство Cd к тиольным группам белков, замена ионом Cd иона цинка и других ионов в связывающих сайтах белков может вызывать ингибирование или изменение активности различных белков, вовлеченных в разнообразные процессы метаболизма, и также ингибировать репарацию ДНК (Clemens, 2006). Конкуренция Cd за сайты связывания с кальцием может изменять некоторые кальций-кальмодулин зависимые пути передачи сигнала (Rivetta et al., 1997). Cd также негативно влияет на функционирование элементов цитоскелета (Fusconi et al., 2007).

Также было описано негативное влияние Cd на развитие и функционирование симбиотических систем бобовых растений. Так, например, исследование влияния серии концентраций Cd на развитие симбиотических клубеньков и азотфиксирующую активность у сои показало, что хотя число клубеньков снижалось уже при самых низких концентрациях Cd (2 мг/кг почвы), в то же время наблюдалась некоторая стимуляция азотфиксирующей активности при концентрациях до 5 мг/кг почвы (Chen et al., 2003). Стимуляция азотфиксирующей активности при определенных невысоких концентрациях Cd наблюдалась нами для клубеньков модельного бобового *Lotus japonicus* (Цыганов и др., 2010).

В ряде исследований была показана роль микоризы в увеличении устойчивости растений к Cd. Так, при изучении нескольких генотипов гороха было показано, что инокуляция микоризным грибом *Glomus intraradices* увеличивает устойчивость растений к Cd (Rivera-Becerril et al., 2002). Тем не менее, механизмы такой устойчивости до конца не изучены (Rivera-Becerril et al., 2005).

МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К Cd И ЕГО АККУМУЛЯЦИИ

Обезвреживание поглощенных металлов может включать в себя разнообразные процессы, среди которых иммобилизация в клеточной стенке, образование комплексов с хелаторами, синтез стрессовых белков, синтез металлотионеинов и фитохелатинов, активное выведение ионов тяжелых металлов из клетки, компартиментализация. Следует отметить, что в основном данные механизмы вовлечены в проявление как основной, так и гиперустойчивости к Cd. Тем не менее, имеются определенные различия. Основная устойчивость возникает в результате компартиментализации Cd, связанного с фитохелатинами или другими хелаторами, в вакуоли. При этом большая его часть остается в корне,

и лишь незначительная часть Cd поступает в наземные органы. В возникновении гиперустойчивости синтез фитохелатинов не играет существенной роли (Ebbs et al., 2002), в то же время значительно усилен транспорт Cd в ксилему, по которой он поступает в наземные органы, в которых происходит его компартиментализация (Hanikenne et al., 2008). В основном нами будут рассмотрены механизмы, вовлеченные в проявление растениями основной устойчивости, на примере *Arabidopsis thaliana* (рис. 1).

Иммобилизация

Иммобилизация ионов Cd в клеточной стенке происходит как за счет необратимого связывания с ограниченным числом участков на поверхности клеточной стенки, так и с образованием комплексов с экстраклеточными углеводами (каллоза), гистидильными группами белков, а также с карбоксильными группами, размещенными на поверхности пектинов (рис. 1) (Zornoza et al., 2002).

Хелатирование органическими кислотами и аминокислотами

Органические кислоты (цитрат, малат) присутствуют в высоких концентрациях в растениях-гипераккумуляторах (Ueno et al., 2005), хотя их роль в феномене гиперустойчивости отвергается из-за их низких констант ассоциации с металлами (Callahan et al., 2006).

Недавно была показана важная роль триптофана в проявлении основной устойчивости растений к Cd (Sanjaya et al., 2008). Мутант *A. thaliana trp5-1*, характеризующийся сверхпродукцией триптофана, также характеризовался повышенной устойчивостью к Cd, в то время как ауксотрофный по триптофану мутант *trp2-1*, напротив, — пониженной. Также была показана индукция экспрессии гена *AtTSB1*, кодирующего бета-субъединицу триптофансинтазы, в ответ на воздействие Cd. Трансгенные растения со сверхэкспрессией *AtTSB1* и повышенным уровнем триптофана проявляли повышенную устойчивость к Cd, но не его аккумуляцию. Предполагается, что триптофан может выполнять хелатирующую функцию по отношению к ионам Cd (рис. 1). Кроме того, было показано, что увеличенный уровень триптофана в трансгенных растениях *A. thaliana* может супрессировать экспрессию генов, кодирующих переносчики металлов. Полученные результаты открывают интересные перспективы для селекции сельскохозяйственных растений с повышенной устойчивостью к Cd, сниженным его накоплением и повышенным содержанием триптофана (Sanjaya et al., 2008).

Синтез стрессовых белков

Было установлено, что у различных растений Cd индуцирует синтез ряда стрессовых белков, в том числе, белков теплового шока (БТШ) и шаперонов (Clemens, 2001). У *A. thaliana* был выявлен металлошаперон Cd119, представляющий собой белок массой

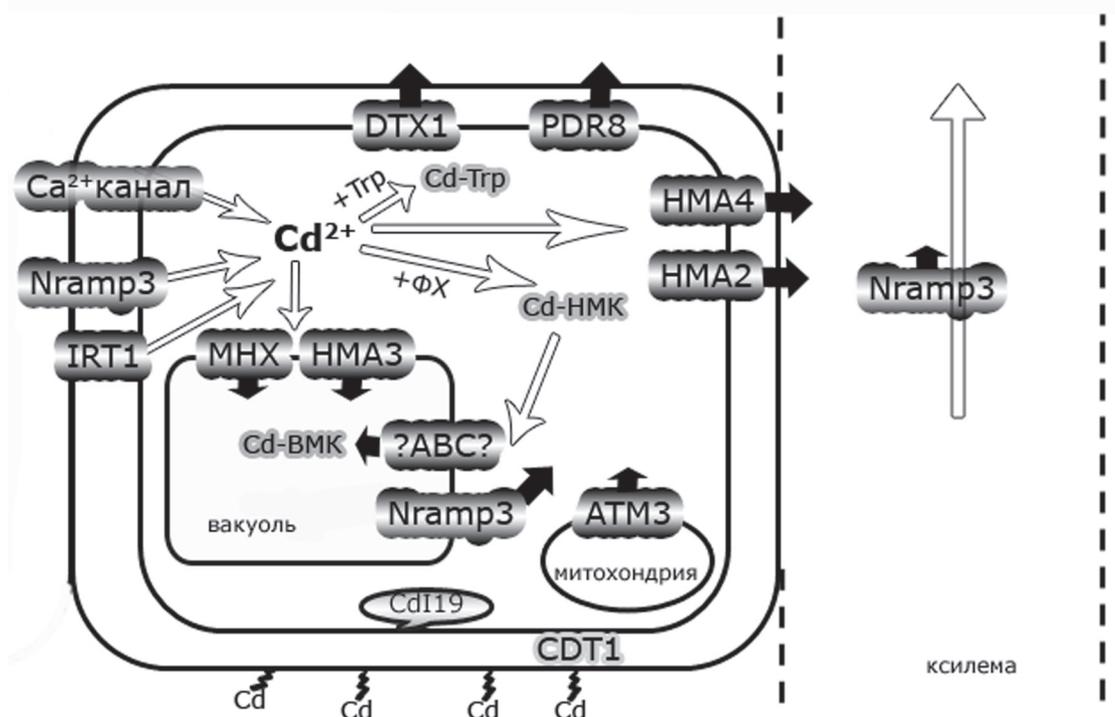


Рис. 1. Пути транспорта кадмия в растительной клетке на примере *A. thaliana*. Представлено схематичное изображение клетки и ксилемы корня. Стрелками показано направление переноса кадмия. Из окружающей среды кадмий попадает в клетку через переносчики железа или цинка, относящиеся к ZIP семейству, а также через кальциевые каналы. Часть ионов кадмия связывается с элементами клеточной стенки клеток корня и короткими пептидами семейства CDT1. При попадании в цитоплазму кадмий связывается с фитохелатинами (ФХ) с образованием низкомолекулярных комплексов (НМК), которые переносятся в вакуоль через неидентифицированный ABC переносчик, где происходит формирование высокомолекулярных комплексов (ВМК). Также ионы кадмия могут транспортироваться в вакуоль посредством переносчиков HMA3 и MHX. Часть кадмия может транспортироваться из вакуоли обратно в цитоплазму через переносчик Nrapm3. В ксилему кадмий попадает благодаря работе белков HMA2 и HMA4, по которой он транспортируется в надземные органы переносчиком Nrapm. Предполагается, что в цитоплазме часть кадмия может быть переведена в неактивную форму посредством связывания с триптофаном (Трп). Металлошапероны (CdI19) играют важную роль в поддержании концентраций металлов в клетке на соответствующем уровне, связывая и доставляя их хелаторам металлов, например, фитохелатинам. PDR8, являющийся представителем ABC переносчиков, играет ключевую роль в выбросе кадмия из клетки. Другой представитель ABC переносчиков ATM3 вовлечен в поддержание гомеостаза Cd в митохондриях. Переносчик DTX1, локализованный на плазматической мембране, осуществляет транспорт различных токсичных веществ (алкалоидов, антибиотиков), в том числе и Cd, из цитоплазмы клетки.

42,2 кДа с двумя металл-связывающими мотивами CXXC, в которых два остатка цистеина ответственны за связывание с тяжелым металлом (Suzuki et al., 2002). Наряду с Cd, данный белок способен связывать ртуть и медь. Для CdI19 характерно посттрансляционное присоединение к его С-концу изопреноида, обеспечивающего прикрепление белка к плазматической мембране (рис. 1). Трансгенные растения со сверхэкспрессией CdI19 проявляли бóльшую устойчивость к Cd по сравнению с исходными растениями. Предполагается, что металлошапероны играют важную роль в поддержании концентраций металлов в клетке на соответствующем уровне, связывая и доставляя их хелаторам металлов, например, фитохелатинам (Suzuki et al., 2002).

Цистеин-богатые пептиды и белки

В один из основных механизмов проявления основной устойчивости к Cd вовлечены гены, контролирующие уровень синтеза цистеина, а также кодирующие разнообразные семейства белков и пептидов, отличительной особенностью которых является высокое содержание цистеина в их составе.

Важная роль в устойчивости растений *A. thaliana* была показана для гена *Atcys-3A*, кодирующего фермент О-ацетилсерин(тиол)лиазу, который катализирует финальный шаг в синтезе цистеина (Dominguez—Solís et al., 2001). Нозерн-блоттинг показал, что Cd через 18 часов вызывает максимум индукции экспрессии данного гена. *In situ* гибридизация выявила быструю аккумуляцию мРНК в листовой пластинке, коре корня и стеб-

ля и проводящих тканях стебля после обработки Cd. Было показано, что трансгенные растения с 9-кратной сверхэкспрессией гена *Atcys-3A* характеризуются повышенной устойчивостью к Cd, подтверждая, что данная устойчивость обусловлена увеличенной доступностью цистеина. Фармакологический подход также показал, что экзогенный цистеин может частично улучшать рост растений на среде, содержащий Cd (Dominguez—Solis et al., 2001).

У *A. thaliana* было выявлено семейство AtPcr, состоящее из 10 цистеин-богатых белков, 4 из которых обеспечивают устойчивость растений к Cd, изменяя мембранный транспорт Cd и снижая его поступление в клетку (Song et al., 2004). Все белки этого семейства характеризуются наличием на N-конце гидрофобного домена, формирующего 2 трансмембранные спирали и гидрофильного C-конца. При этом гидрофобный N-конец обогащен остатками цистеина и содержит консервативный для всех членов семейства Pcr мотив CCXXXCPC. Данные остатки цистеина играют важную роль в детоксикации Cd, поскольку делеции этой области или мутации, приводящие к заменам цистеина, снижают способность AtPcr1 поддерживать устойчивость к Cd у дрожжей, экспрессирующих гены *AtPcr*. Обработка растений *A. thaliana* Cd приводит к увеличению уровня экспрессии генов *AtPcr1* and *AtPcr2*, что соответствует их роли в обеспечении устойчивости к Cd. Предполагается, что белки семейства Pcr могут быть вовлечены в поддержание гомеостаза тяжелых металлов (Song et al., 2004). Тем не менее, возможно, что они могут иметь дополнительные функции, не связанные с устойчивостью к тяжелым металлам, поскольку гены *AtPcr* экспрессируются конститутивно в зрелых листьях. Более того, один из возможных гомологов данного семейства у петунии *PGP/D12* индуцируется во время прорастания пыльцевой трубки (Guyon et al., 2000).

У *Digitaria ciliaris* был выявлен ген *DcCDT1*, который кодирует пептид, состоящий из 55 а. к., 15 из которых являются цистеином. У однодольных растений выявлены мультигенные семейства, гомологичные *DcCDT1*. В то же время, у двудольных растений выявлено только по единичному гомологу данного гена. Для *DcCDT1* показана локализация, как в клеточной стенке, так и на плазматической мембране. Трансгенные растения *A. thaliana*, с конститутивной экспрессией *DcCDT1*, более устойчивы к кадмию за счет снижения накопления кадмия в клетке (рис. 1) (Matsuda et al., 2009).

Синтез металлотионеинов

Металлотионеины — это небольшие (45–85 а. к.) богатые цистеином белки, которые считаются специфичными в отношении связывания ионов металлов и синтезируются в клетках животных и растений в ответ на воздействие тяжелых металлов. В отличие от животных у растений металлотионеины кодируются большими генными семействами (Palmiter, 1998). Примечательно,

что различия в нуклеотидных последовательностях между генами металлотионеинов различных видов растений меньше, чем различия между генами, представляющими разные классы металлотионеинов, что свидетельствует о том, что разные классы возникли до дивергенции на одно- и двудольные (Zimegi et al., 2005). Роль металлотионеинов в детоксикации Cd все еще остается практически неизученной (DalCorso et al., 2008). Так, было показано связывание PsMTa из гороха с различными металлами, в том числе и с Cd, при гетерологичной экспрессии этого гена в *Escherichia coli* (Tommeey et al., 1991). Сверхэкспрессия мышинового металлотионеина в растениях табака увеличила устойчивость растений к Cd *in vivo* (Pan et al., 1994), в то время как эктопическая экспрессия гена *MT2 B. juncea* в *A. thaliana* привела к повышенной устойчивости к Cd и меди (Zhigang et al., 2006).

Синтез фитохелатинов

Одним из важнейших ответов растений на действие тяжелых металлов является индукция синтеза фитохелатинов, синтезирующихся из трипептида глутатиона (Глу-Цис-Гли) фитохелатинсинтазой. 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. Основная структура этих пептидов следующая: (γГлу (Цис)) n–Гли, где n = 2–11 (обычно не более 6-ти) (Серегин, 2001). Фитохелатины обладают высоким сродством к ионам Cd (Reese, Wagner, 1987). Cd стимулирует синтез фитохелатинов, которые быстро образуют низкомолекулярные комплексы (НМК) с ионами Cd и транспортируются через тонопласт в вакуоль. Предполагается, что у растений НМК транспортируются через неидентифицированный ABC переносчик (см. раздел ABC переносчики), гомологичный ABC переносчику HMT1 *Schizos pombe* (Ortiz et al., 1992). Недавно было показано, что через такой переносчик в вакуоль могут поступать не только НМК, но и комплексы Cd с глутатионом (Prévéral et al., 2009). В вакуоли, по всей видимости, образуется высокомолекулярный комплекс (ВМК), служащий для более эффективной изоляции металла. В условиях кислой среды вакуоли, ВМК диссоциируют, и Cd связывается органическими кислотами (цитратом, оксалатом, малатом) (Krotz et al., 1989). Сравнительный анализ уровня синтеза фитохелатинов у гипераккумулятора *T. caerulescens* и негипераккумулятора *T. arvense*, выявил более низкий их уровень у *T. caerulescens*, что, по всей видимости, свидетельствует о том, что фитохелатины вовлечены в поддержание основной устойчивости к Cd, но не играют заметной роли в гиперустойчивости (Ebbs et al., 2002). При этом следует отметить, что недавно гены, кодирующие фитохелатинсинтазу, а также

АВС переносчик комплексов фитохелатинов с Cd были выявлены у животных (Vatamaniuk et al., 2001, 2005), что свидетельствует о консервативности механизма устойчивости, опосредованного фитохелатинами. Поэтому представляется целесообразным проведение дальнейших исследований для выявления возможной роли фитохелатинов в проявлении устойчивости к Cd у растений-гипераккумуляторов.

Переносчики Cd

В последние годы достигнут большой прогресс в понимании молекулярных механизмов транспорта металлов через мембраны клетки. Это стало возможным благодаря активному использованию молекулярно-биологических методов с использованием *S. cerevisiae* и применению полученных результатов для других эукариот, в том числе — для *A. thaliana* (Hall, Williams, 2003). В результате было выявлено, что в растительных клетках присутствуют различные семейства белков-переносчиков металлов, вовлеченных в поддержание гомеостаза металлов и играющих ключевую роль в возникновении устойчивости к ним. Также в настоящее время проводятся сравнительные исследования транскриптомов видов гипераккумуляторов и родственных им негипераккумулирующих видов, например, *A. halleri* и *A. thaliana* (Becher et al., 2004; Weber et al., 2004; Talke et al., 2006). Показано, что виды-гипераккумуляторы характеризуются повышенным уровнем транскрипции генов, кодирующих переносчики металлов. При этом установлено, что повышенный уровень транскрипции не связан с дивергенцией генов видов гипераккумуляторов и негипераккумуляторов, а обуславливается изменением на уровне регуляции генов, либо изменением количества их копий (Hanikenne et al., 2008; Oomen et al., 2009).

АТФ-азы тяжелых металлов (НМА)

АТФ-азы тяжелых металлов являются членами большого суперсемейства АТФ-аз Р-типа, характерного для всех царств живого мира. Подсемейство P1В АТФаз делится на две группы: переносчики одно и двухвалентных металлов (Hall, Williams et al., 2003). У *A. thaliana* подсемейство P1В включает в себя 8 различных белков (Mills et al., 2003). НМА2 и НМА4, расположенные в плазмаллеме, играют важную роль в ксилемном транспорте из корневой системы в наземную часть растения, как цинка, так и Cd (Kim et al., 2009) (рис. 1). Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *НМА4* показали увеличенную устойчивость к Cd и аккумуляцию Cd в листьях (Verret et al., 2004). Недавние исследования показали, что белок НМА3, расположенный на вакуолярной мембране, принимает участие в транспорте Cd и цинка в вакуоль (рис. 1). Растения со сверхэкспрессией гена *НМА3* характеризовались повышенной устойчивостью к Cd (Morel et al., 2009).

Недавно с использованием РНК-интерференции было показано, что белок НМА4 играет ведущую роль в гипераккумуляции цинка и устойчивости к цинку и Cd у *A. halleri*. Гипераккумуляция и гиперустойчивость к Cd у этого растения связаны с трипликацией гена *AhHMA4*, а также изменением цис-регуляции генов *AhHMA4*, в результате чего наблюдается их повышенная экспрессия у *A. halleri* по сравнению с *A. thaliana* (Hanikenne et al., 2008).

Nramp

Представители семейства белков Nramp участвуют в транспорте ряда двухвалентных металлов, включая железо и Cd. Nramp высококонсервативны, содержат 12 трансмембранных доменов с характерным «консенсусным транспортным мотивом» (Hall, Williams, 2003). Экспрессия генов *AtNramp1*, *AtNramp3* и *AtNramp4* в дрожжевых клетках вызывает повышенную чувствительность к Cd и накопление данного тяжелого металла. Показано, что дизрупция гена *AtNramp3* вызывает небольшое увеличение устойчивости к Cd, но в то же время сверхэкспрессия этого гена вызывает гиперчувствительность к Cd у *A. thaliana* (Thomine et al., 2000). У *A. thaliana* экспрессия генов *AtNramp3* выявлена в проводящей системе корней, стеблей и листьев, что свидетельствует о том, что белок AtNramp3 может функционировать в переносе металлов на дальние расстояния. При этом показано, что он локализуется в вакуолярной мембране и может мобилизовать пул металлов из вакуоли (рис. 1) (Thomine et al., 2003). У гипераккумулятора *T. caerulea* был выявлен повышенный уровень экспрессии генов *TcNramp3* и *TcNramp4* по сравнению с генами *AtNramp3* и *AtNramp4* у *A. thaliana*, хотя и те, и другие присутствуют в геноме в единичной копии (Oomen et al., 2009). В единичной копии эти гены также присутствуют у родственных видов *T. minimum* и *T. praecox*, в то время как у *T. perfoliatum* — в двух копиях, а у *T. japonicum* были выявлены несколько копий этих генов. По всей видимости, повышенный уровень экспрессии генов *TcNramp3* и *TcNramp4* по сравнению с генами *AtNramp3* и *AtNramp4* у *A. thaliana* связан с различиями в цис- или трансрегуляторных элементах (Oomen et al., 2009).

CDF

Семейство белков CDF участвует в транспорте цинка, кобальта и, по всей видимости, Cd. Белки данного семейства содержат 6 трансмембранных доменов, катион-связывающий домен на С-конце, а также гистидин-богатый домен, вероятно участвующий в связывании цинка между 4-м и 5-м трансмембранными доменами (Hall, Williams, 2003). У *A. thaliana* гены, кодирующие CDF белки, были названы ZAT генами, они вовлечены в перенос Zn в вакуоль, обеспечивая тем самым его гомеостаз (Van der Zaal et al., 1999). У гипераккумулятора

никеля *T. goesingense* был выявлен ортолог *ZAT* гена *A. thaliana* — ген *TgMTP1*. Данный ген кодирует два транскрипта, один из которых — *TgMTP1t1* подвергается сплайсингу, а второй — *TgMTP1t2* — нет. Транскрипты различаются по последовательности гистидин-богатого домена, что, вероятно, обеспечивает специфичность этих переносчиков к разным металлам. Так, *TgMTP1t1*, экспрессируясь в дрожжевых клетках, способствует их устойчивости к Cd, кобальту и цинку, а *TgMTP1t2* к никелю (Persans et al., 2001).

ZIP

К настоящему моменту у *A. thaliana* выявлено около 15 белков ZIP семейства. ZIP белки содержат 8 трансмембранных доменов, при этом С и N концы расположены на внешней поверхности плазматической мембраны. Между 2-м и 3-м трансмембранными доменами располагается варибельный участок, содержащий потенциальный металл-связывающий домен, обогащенный гистидином (Hall, Williams, 2003). У *A. thaliana* с использованием функциональной комплементации мутанта дрожжей, неспособного поглощать железо, был клонирован ген *AtIRT1*, кодирующий основной переносчик железа в корнях, при этом растения со сверхэкспрессией *AtIRT1* аккумулировали более высокие концентрации Cd и Zn по сравнению с растениями дикого типа (рис. 1) (Connolly et al., 2002; Vert et al., 2002). У *T. caerulescens* был клонирован ген переносчика *ZNT1*, гомолог ZIP генов, участвующий в транспорте цинка и Cd (Pence et al., 2000).

ABC переносчики

ABC переносчики представлены большим семейством мембранных белков, выполняющих различные транспортные функции. Для всех белков данного семейства характерны высокогидрофобный трансмембранный домен и цитоплазматический АТФ-связывающий домен (Hall, Williams et al., 2003). Ранее был упомянут гипотетический переносчик НМК и комплексов глутатиона в вакуоль — гомолог НМТ1 *S. pombe*. Недавно были выявлены другие ABC переносчики, принимающие участие в детоксикации Cd в растительной клетке.

У *A. thaliana* путем анализа микрочипа, содержащего гены, кодирующие потенциальные ABC переносчики, было выявлено усиление экспрессии гена *AtPDR8* под воздействием ионов Cd^{2+} , Pb^{2+} или Cu^{2+} . В случае воздействия Cd^{2+} наблюдалось усиление уровня экспрессии *AtPDR8* в 1,5 раза в стеблях и в 1,8 раз в корнях. Трансгенные растения со сниженным уровнем экспрессии *AtPDR8* характеризовались резким снижением устойчивости к Cd^{2+} и Pb^{2+} . Напротив, трансгенные растения со сверхэкспрессией *AtPDR8* характеризовались повышенной устойчивостью к Cd^{2+} и Pb^{2+} . Устойчивость растений к тяжелым металлам коррелировала со снижением уровня Cd и свинца у растений со сверхэкспрессией *AtPDR8*. Анализ экспрессии репортерной конструкции

GFP:*AtPDR8* показал локализацию *AtPDR8* на плазматической мембране (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о действии *AtPDR8* как важнейшего переносчика Cd из клетки (Kim et al., 2007).

Другой представитель ABC переносчиков — белок *AtATM3*, участвующий в поддержании гомеостаза железа в митохондриях (Kushnir et al., 2001). Было выявлено повышение уровня экспрессии гена *AtATM3* в 2,5 раза в корнях *A. thaliana* после 24 ч обработки трехнедельных растений 50 мкМ $CdCl_2$, сходные результаты наблюдались и при обработке растений 500 мкМ $Pb(NO_3)_2$ (Kim et al., 2006). Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *AtATM3* показали повышенную устойчивость к Cd^{2+} и Pb^{2+} . Предполагается, что *AtATM3* участвует в экспорте конъюгатов Cd с глутатионом из митохондрии в цитоплазму (рис. 1).

Другие переносчики

У *A. thaliana* был выявлен переносчик *AtDTX1*, локализованный на плазматической мембране, который осуществляет транспорт различных токсичных веществ (алкалоидов, антибиотиков) из цитоплазмы клетки, в том числе и Cd (рис. 1). Ген *AtDTX1* является представителем большого мультигенного семейства, имеющего сходство с бактериальным семейством генов, кодирующих переносчики многих лекарственных препаратов (MATE — multidrug and toxic compound extrusion) (Li et al., 2002).

Белок *AtMNX*, транспортирующий Cd в вакуоль, представлен в геноме в единичной копии (рис. 1) (Shaul et al., 1999). Позднее было показано, что трансгенные растения табака со сверхэкспрессией гена *AtMNX*, в отличие от контрольных растений, проявляют некротические повреждения листьев при росте при повышенных концентрациях Mg^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+} , что свидетельствует о том, что переносчик *AtMNX* может переносить *in vivo* ионы тяжелых металлов, в том числе Cd^{2+} (Berezin et al., 2008).

Недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что механизмы устойчивости к Cd могут различаться у однодольных и двудольных растений (Kim et al., 2008). С использованием скрининга кДНК библиотеки *Triticum aestivum* на функциональную комплементацию мутанта дрожжей *Δycf1*, чувствительного к Cd, был выявлен ген *TaTM20*, предположительно кодирующий переносчик Cd. Дрожжи, трансформированные *TaTM20*, аккумулируют меньше Cd и выводят его быстрее, по сравнению с контролем, что определяет повышенную устойчивость трансформантов к Cd. Интересно отметить, что уменьшение содержания Cd в клетках дрожжей не сопровождается изменением в гомеостазе других двухвалентных элементов. Гомологи *TaTM20* были выявлены у других однодольных растений, но не были обнаружены у *A. thaliana*. Более того, эктопическая экспрессия *TaTM20* у *A. thaliana* не влияла на устойчивость растений к Cd и его аккумуляцию, что подтверждает уникальность механизма устойчивости, опосредованного *TaTM20*, для однодольных.

Другие белки

Совсем недавно была проведена трансформация *S. pombe* библиотекой кДНК *B. juncea* и отобран клон, проявляющий повышенную устойчивость к Cd, а также к другим металлам (мышьяку, меди и цинку) и окислителям (Blanvillain et al., 2009). Была предположена роль данного гена в адаптации растений к окислительному стрессу. Действительно, отобранный клон продуцировал меньшее количество супероксид радикалов, по сравнению с контролем. Выявленный ген *BjOXS3* (*B. juncea* OXIDATIVE STRESS 3) кодирует белок из 175 а. к., который принадлежит к семейству, включающему в себя 22 BjOXS3-подобных белка, которые были найдены только у растений. Все эти белки характеризуются наличием консервативного каталитического домена, обладающего потенциальной N-ацетилтрансферазной или тиолтрансферазной активностью. Важность данного домена для проявления устойчивости к Cd и другим стрессовым факторам была установлена с помощью направленного мутагенеза. Белок BjOXS3 был ко-локализован в ядре с гистоном H4. Это позволило предположить, что BjOXS3 вовлечен в ацетилирование гистона H4, изменяя тем самым стабильность нуклеосомы. Таким образом, предполагается, что BjOXS3 запускает специфичную экспрессию генов в ответ на стресс посредством реорганизации структуры хроматина (Blanvillain et al., 2009).

МикроРНК

Недавно было выявлено, что микроРНК играют важную роль в возникновении устойчивости растений к Cd. У *Medicago truncatula* выявлено шесть микроРНК, уровень экспрессии которых менялся после воздействия Cd. При этом уровень экспрессии miR393, miR171, miR319, miR529 увеличивался, в то время как miR166 и miR398 — снижался. Снижение уровня экспрессии miR398 связано с необходимостью усиления экспрессии генов *CSD1* и *CSD2*, кодирующих супероксиддисмутазы, вовлеченных в адаптацию растения к окислительному стрессу, вызванному Cd (Ding, Zhu, 2009). При исследованиях риса, *M. truncatula* и *Brassica napus* при действии Cd стресса были выявлены общие микроРНК: miR393 и miR171, ингибирующие действия генов-мишеней, участвующих в убиквитинном пути передачи сигнала и связанных с передачей ауксинового сигнала и развитием цветка. Это свидетельствует о том, что ряд микроРНК играют важную роль в ответах растения, как на абиотические стрессы, так и в регуляции развития (Ding, Zhu, 2009).

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К Cd И ЕГО АККУМУЛЯЦИИ

Для изучения генетического контроля устойчивости растений к тяжелым металлам были использованы два подхода: анализ варьирования данных признаков в природных популяциях и экспериментальный мутагенез.

Генетический анализ популяций ряда высших растений показал, что основная устойчивость к некоторым металлам (мышьяк, медь, цинк) скорее всего, определяется одним или двумя основными генами и работой геномодификаторов, определяющих уровень устойчивости (Schat et al., 1993; Smith, Macnair, 1998). Устойчивость к определенному металлу обычно контролируется геном (или генами), отличными от генов, определяющих устойчивость к другому металлу (Tilstone et al., 1997). Исследования природных популяций арахиса, гороха, кукурузы, пшеницы, риса, сои, ячменя, и гипераккумуляторов *B. juncea* и *T. caerulescens* выявили широкий полиморфизм по признакам основной и гиперустойчивости к Cd и его аккумуляции и гипераккумуляции (Arao, Ae, 2003; Bell et al., 1997; Belimov et al., 2003, 2007; Clarke et al., 1997; Liu et al., 2005; Roosens et al., 2003). Так, например, у гороха содержание Cd в сухой биомассе при выращивании растений в присутствии 5 мг Cd на кг⁻¹ варьировало между различными генотипами от 35 мг Cd на кг⁻¹ до 135 мг Cd на кг⁻¹, а индекс устойчивости варьировал от 54 до 100 % (Belimov et al., 2003).

Для твердой пшеницы было показано, что признак пониженного содержания Cd в зерне контролируется доминантной аллелью одного гена (Clarke et al., 1997), который локализован на хромосоме 5B (Grant et al., 2008). Линии с признаком пониженного содержания Cd характеризовались сниженным переносом Cd из корневой системы в наземную часть, что ограничивало его поступление в зерно (Chan, Hale, 2004). Было показано, что признак пониженного поглощения Cd не влияет на поглощение других элементов, хотя имеются указания, что он может быть связан с уменьшением аккумуляции в зерне цинка при дефиците цинка (Hart et al., 2005). Выполнение 10-летней программы по созданию сортов пшеницы с пониженным содержанием Cd в Канаде привело к регистрации новых сортов. Первый такого рода коммерческий сорт Strongfield начал возделываться в 2004 г. и в настоящее время занимает 25 % от площадей, занятых посевами твердой пшеницы в Канаде (Grant et al., 2008).

Однако до сих пор остается нерешенным вопрос, являются ли гиперустойчивость и гипераккумуляция Cd связанными событиями или независимыми. Для решения данной проблемы проводят исследование результатов направленных скрещиваний растений, различающихся по признакам устойчивости и аккумуляции тяжелых металлов, в том числе — межвидовых гибридов. Группой исследователей было получено поколение F₁ от скрещивания растения-гипераккумулятора *A. halleri* и не аккумулялирующего вида *A. petraea* (Macnair et al., 1999), которое затем было скрещено с родительскими видами. Поколение F₂ сильно варьировало по признаку аккумуляции цинка: были выявлены индивидуальные растения, аккумулялирующие также мало цинка как *A. petraea*, также много как *A. halleri* и промежуточные варианты. Ге-

нетический анализ признака устойчивости показал, что устойчивость к меди, цинку и Cd, по видимому, определяется одним геном (Schat et al., 1996). Анализ поколения F_2 , полученного от скрещивания *A. halleri* и *A. petraea* (Bert et al., 2003; Masnair et al., 1999), а также анализ поколений, полученных в результате скрещиваний различных популяций *T. caerulescens* (Zha et al., 2004), показали, что гипераккумуляция Cd и устойчивость к Cd не связаны между собой. Однако при исследовании Lombi с коллегами (Lombi et al., 2000) 4 различных популяций *T. caerulescens* были получены противоположные данные. В ходе исследований была выявлена разница между популяциями по способности накапливать Cd в побегах и по признаку устойчивости к данному тяжелому металлу. Растения из популяции, накапливающие наибольшее количество Cd, были также и наиболее устойчивыми к его токсическому действию. Таким образом, результаты данных исследования указывают на общий генетический контроль признаков гипераккумуляции Cd и гиперустойчивости к нему растений (Lombi et al., 2000).

Хотя экспериментальный мутагенез представляет собой эффективный метод изучения молекулярно-генетических механизмов, однако к настоящему времени описано только несколько мутантов растений с измененными чувствительностью к Cd или его аккумуляцией.

У растений мутанта *cad1-1 A. thaliana*, в отличие от дикого типа, на питательной среде с 0,6 мкМ Cd замедлялся рост, наблюдались хлороз листьев и выработка корнями коричневого пигмента (Howden, Cobbett, 1992). Предполагается, что коричневый пигмент — это результат образования металл-сульфидных комплексов. Особенности фенотипа данного мутанта были использованы для идентификации трех других аллельных мутаций *cad1*. Генетический анализ полученных мутантов показал, что повышенная чувствительность к Cd наследуется как моногенный рецессивный признак. Мутант *cad1-3* был получен с использованием химического мутагена ДЭБ (диэпоксидбутан) (Dolezal, Cobbett, 1991). Мутанты *cad1-4* и *cad1-5* были получены с использованием ЭМС (этилметан-сульфоната). При сравнении полученных мутантов по чувствительности к Cd было установлено, что мутанты *cad1-3* и *cad1-4* чувствительны к концентрации Cd 0,3 мкМ, в то время как мутанты *cad1-1* и *cad1-5* — к 0,6 и 1,5 мкМ соответственно. С использованием высокоэффективной гель-фильтрации было показано, что у мутантов *cad1-1* и *cad1-3* снижена способность образовывать Cd-связывающие комплексы. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии выявило снижение способности *cad1* мутантов запасать фитохелатины. Содержание фитохелатинов, у каждого мутанта коррелировало с уровнем его чувствительности к Cd. Таким образом, проведенные эксперименты показали, что у мутантов по гену *cad1* снижена активность фитохелатинсинтазы (Howden et al., 1995a). Локус *CAD1* был локализован на 5-й хро-

мосоме *A. thaliana*. Позиционное клонирование показало, что ген *CAD1* является выявленным ранее в процессе секвенирования генома *A. thaliana* геном *MRH10.11*. Показано, что мутации *cad1-1*, *cad1-4* и *cad1-5* — это транзиции, а мутация *cad1-3* — это трансверсия G-C → C-G. кДНК, полученная обратной транскрипцией данного участка, содержит открытую рамку считывания, кодирующую белок массой 55 кДа, содержащий 485 а.к. Экспрессия кДНК *CAD1* в клетках *E. coli* показала, что экстракты из этих клеток катализируют синтез фитохелатинов, активируемый тяжелыми металлами, что подтвердило, что ген *CAD1* кодирует фитохелатинсинтазу (Ha et al., 1999).

Во время исследований *cad1* мутантов, был выделен еще один мутант *A. thaliana*, чувствительный к Cd, — *cad2*. Генетический анализ показал, что чувствительность к Cd — моногенный рецессивный признак. В отсутствие Cd не было выявлено разницы в росте между мутантом *cad1-1*, *cad2* и диким типом. При концентрации Cd 6 мкМ дикий тип продолжал расти, в то время как у мутанта *cad1-1* наблюдалось снижение темпов роста уже при концентрации Cd 1 мкМ. Мутант *cad2* проявил промежуточный фенотип: ингибирование роста наблюдалось при концентрации Cd 3 мкМ, и не было выявлено при концентрации, критичной для *cad1-1* мутанта (Howden et al., 1995b).

У мутанта *cad2* снижена способность изолировать Cd. Уровень Cd-связывающих комплексов, формирующихся *in vivo*, у растений *cad2* был снижен по сравнению с диким типом. Аккумуляция фитохелатинов составляла порядка 10% от их количества у дикого типа. Уровень глутатиона, субстрата для биосинтеза фитохелатинов, в тканях *cad2* мутанта был снижен до 15–30% по сравнению с диким типом. Также был снижен уровень γ -глутамилцистеин-синтазы. Уровень цистеина был вдвое выше, чем у растений дикого типа. Данные факты позволили предположить, что у мутанта был нарушен биосинтез глутатиона, а именно снижена активность γ -глутамилцистеин-синтазы. Данное предположение подтвердилось биохимическими исследованиями *in vitro*, показавшими снижение активности данного фермента по сравнению с диким типом, в то время как активность глутатион-синтазы не менялась (Howden et al., 1995b).

Локус *CAD2* был локализован на 4-й хромосоме и показал тесное сцепление с локусом *GSHA*, который кодирует γ -глутамилцистеин-синтазу. Дальнейшими исследованиями было установлено, что ген *CAD2* содержит 15 интронов, размер которых варьирует от 77 до 359 п. о. Размер экзонов варьирует от 69 до 340 п. о. Нуклеотидная последовательность гена *GSHA cad2* мутанта содержит делецию 6 п. о. в 6-м экзоне (Cobbett et al., 1998).

Характеристика полученных мутаций показывает, что модификации в единичных генах существенно влияют на основную устойчивость к тяжелым металлам или на их накопление. Однако до недавнего времени не было описано

успешных экспериментов, в ходе которых был бы получен мутант с обеими измененными характеристиками.

Недавно у гороха был описан новый мутант, полученный после ЭМС мутагенеза исходной линии SGE, характеризующийся повышенным накоплением Cd и устойчивостью к токсичным концентрациям Cd (Tsyganov et al., 2007). Мутант SGE^{Cd} был охарактеризован как имеющий моногенное наследование и рецессивное проявление фенотипа. Мутантный локус был локализован в VI группе сцепления гороха (Tsyganov et al., 2008). Биохимический анализ маркеров стресса (хитиназа, пероксидаза и пролин) показали, что у данного мутанта снижен уровень стрессового ответа на действие Cd. Установлено, что устойчивость мутанта SGE^{Cd} к Cd не связана с процессами синтеза глутатиона и работой фитохелатинсинтазы. Таким образом, этот мутант одновременно аккумулирует Cd и является устойчивым к его токсическому действию и представляет собой новую и уникальную модель для изучения адаптаций растений к токсическим концентрациям тяжелых металлов (Tsyganov et al., 2007). Примечательно, что мутант способен как формировать клубеньки при более высоких концентрациях Cd, по сравнению с исходной линией, так и поддерживать их функциональную активность (Tsyganov et al., 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 10 лет наши представления о механизмах устойчивости растений к Cd и его аккумуляции значительно расширились. Исследовано распределение этих признаков между экотипами некоторых видов-гипераккумуляторов Cd и ценных для сельского хозяйства видов. Были выявлены различные классы белков, влияющие на проявление устойчивости к Cd. Было показано, что у растений-гипераккумуляторов Cd наблюдается повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих переносчики металлов, который связан с изменением регуляции генов и количества их копий. Т. е., по всей видимости, при проявлении растением основной и гиперустойчивости к кадмию в основном используются одни и те же механизмы (за исключением синтеза фитохелатинов при основной устойчивости). Однако в случае гиперустойчивости ряд механизмов значительно активирован. Тем не менее, в этом направлении требуется проведение дальнейших исследований. Так, у растений до сих пор не выявлен ABC переносчик, вовлеченный в перенос комплексов Cd с фитохелатинами в вакуоль, хотя данный механизм рассматривается как главный в проявлении основной устойчивости. В то же время, было показано, что фитохелатины играют важную роль детоксикации Cd не только у растений, но и у животных. Достижения в генетике устойчивости растений к Cd позволили успешно реализовать в Канаде программу по селекции сортов твердой пшеницы с пониженным поглощением

Cd. В настоящее время такие программы проводятся для риса и сои. Активное использование экспериментально-го мутагенеза является перспективным методом, стимулирующим генетические исследования в данной области. Расширение наших знаний о молекулярно-генетических механизмах устойчивости растений к Cd будет способствовать решению другой важной практической задачи — разработки новых перспективных технологий, основанных на использовании фиторемедиации для очистки почв, загрязненных тяжелыми металлами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была финансово поддержана: Федеральным агентством по науке и инновациям (государственный контракт № 02.740.11.0276), Федеральным агентством по образованию (государственные контракты № П290, П1746), РФФИ (08-04-01565-а; 08-04-90051-Бел_а), грантом Президента РФ (НШ-5399.2008.4), Администрацией Санкт-Петербурга (договор 368/08).

Литература

1. Серегин И., 2001. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений // Усп. биол. химии. Т. 41. С. 283–300.
2. Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М. и др., 2007. Устойчивость растений к тяжелым металлам. — Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 172 с.
3. 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). Выпуск 38. С. 343–354.
4. Arao T., Ae N., 2003. Genotypic variations in cadmium levels of rice grain // Soil Sci. Plant Nutr. Vol. 49. P. 473–479.
5. Baker A. J. M., 1981. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals // J. Plant Nutr. Vol. 3. P. 643–654.
6. Becher M., Talke I., Krall L., Krämer U., 2004. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // Plant J. Vol. 37. P. 251–268.
7. Belimov A. A., Safronova V. I., Tsyganov V. E. et al., 2003. Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea (*Pisum sativum* L.) // Euphytica. Vol. 131. P. 25–35.
8. Belimov A., Safronova V., Demchinskaya S., Dzyuba O., 2007. Intraspecific variability of cadmium tolerance in hydroponically grown Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) seedlings // Acta Physiol. Plant. Vol. 29. P. 473–478.

9. Bell M. J., McLaughlin M. J., Wright G. C., Cruickshank J., 1997. Inter- and intra-specific variation in accumulation of cadmium by peanut, soybean, and navy bean // *Aust. J. Agr. Res.* Vol. 48. P. 1151–1160.
10. Berezin I., Mizrachy-Dagry T., Brook E., Mizrahi K., 2008. Overexpression of *AtMHX* in tobacco causes increased sensitivity to Mg^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size // *Plant Cell Rep.* Vol. 27. P. 939–949.
11. Bert V., Meerts P., Saumitou-Laprade P. et al., 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri* // *Plant Soil.* Vol. 249. P. 9–18.
12. Blanvillain R., Kim J., Wu S., Lima A., 2009. OXIDATIVE STRESS 3 is a chromatin-associated factor involved in tolerance to heavy metals and oxidative stress // *Plant J.* Vol. 57. P. 654–665.
13. Brooks R. R., 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals. Wallingford: CAB Intl., 381 p.
14. Callahan D. L., Baker A. J. M., Kolev S. D., Wedd A. G., 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants // *J. Biol. Inorg. Chem.* Vol. 11. P. 2–12.
15. Chan D. Y., Hale B. A., 2004. Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation // *J. Exp. Bot.* Vol. 55. P. 2571–2579.
16. Chen Y., He Y., Yang Y., Yu Y., 2003. Effect of cadmium on nodulation and N_2 -fixation of soybean in contaminated soils // *Chemosphere.* Vol. 50. P. 781–787.
17. Clarke J. M., Leisle D., Kopytko G. L., 1997. Inheritance of cadmium concentration in five durum wheat crosses // *Crop Sci.* Vol. 37. P. 1722–1726.
18. Clemens S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // *Planta.* Vol. 212. P. 457–486.
19. Clemens S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // *Biochimie.* Vol. 88. P. 1707–1719.
20. Cobbett C. S., May M. J., Howden R., Rolls B., 1998. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase // *Plant J.* Vol. 16. P. 73–78.
21. Connolly E. L., Fett J. P., Guerinot M. L., 2002. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation // *Plant Cell.* Vol. 14. P. 1347–1357.
22. DalCorso V., Farinati S., Maistri S., Furini A., 2008. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression // *J. Integr. Plant Biol.* Vol. 50. P. 1268–1280.
23. Ding Y., Zhu Ch., 2009. The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 386. P. 6–10.
24. Dolezal O., Cobbett C., 1991. Arabinose kinase-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* Vol. 96. P. 1255–1260.
25. Dominguez-Solis J., Gutierrez-Alcalá G., Vega J., Romero L., 2001. The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance // *J. Biol. Chem.* Vol. 276. P. 9297–9302.
26. Ebbs S., Lau I., Ahner B., Kochian L., 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // *Planta.* Vol. 214. P. 635–640.
27. Fusconi A., Gallo C., Camusso W., 2007. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L. Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution // *Mut. Res.* Vol. 632. P. 9–19.
28. Grant C., Clarke J., Duguid S., Chaney R. L., 2008. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation // *Sci. Total Environ.* Vol. 390. P. 301–310.
29. Guyon V., Astwood J., Garner E., Dunker A., 2000. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia // *Plant Physiol.* Vol. 123. P. 699–710.
30. Ha S., Howden R., Dietrich W., Bugg S., 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *Plant Cell.* Vol. 11. P. 1153–1163.
31. Hall J. L., Williams L. E., 2003. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Bot.* Vol. 54. P. 2601–2613.
32. Hanikenne M., Talke I. N., Haydon M. J. et al., 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4* // *Nature.* Vol. 453. P. 391–395.
33. Hart J. J., Welch R. M., Norvell W. A. et al., 2005. Zinc effects on cadmium accumulation and partitioning in near-isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium concentration // *New Phytol.* Vol. 167. P. 391–401.
34. Howden R., Cobbett C. S., 1992. Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* Vol. 100. P. 100–107.
35. Howden R., Andersen C. R., Goldsbrough P. B., Cobbett C. S., 1995a. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* Vol. 107. P. 1067–1073.
36. Howden R., Goldsbrough P. B., Andersen C. R., Cobbett C. S., 1995b. Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient // *Plant Physiol.* Vol. 107. P. 1059–1066.
37. Kim D., Bovet L., Kushnir S., Noh E., 2006. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* Vol. 140. P. 922–932.
38. Kim D., Bovet L., Maeshima M., Martinoia E., 2007. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance // *Plant J.* Vol. 50. P. 207–218.
39. Kim Y., Kim D., Shim D., Song W., 2008. Expression of the novel wheat gene *TM20* confers enhanced cadmium

- tolerance to bakers' yeast // J. Biol. Chem. Vol. 283. P. 15893–15902.
40. Krotz R. M., Evangelou B. P., Wagner G. J., 1989. Relationships between cadmium, zinc, Cd-binding peptide, and organic acid in tobacco suspension cells // Plant Physiol. Vol. 91. P. 780–787.
41. Kum Ch., Wong E., Cobbett Ch., 2009. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana* // New Phytol. Vol. 181. P. 71–78.
42. Kushnir S., Babiychuk E., Storozhenko S., Davey M., 2001. A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik* // Plant Cell. Vol. 13. P. 89–100.
43. Lane T. W., Saito M. A., George G. N. et al., 2005. A cadmium enzyme from a marine diatom // Nature. Vol. 435. P. 42.
44. Li L., He Z., Pandey G. K. et al., 2002. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification // J. Biol. Chem. Vol. 277. P. 5360–5368.
45. Liu J., Zhu Q., Zhang Z. et al., 2005. Variations in cadmium accumulation among rice cultivars and types and the selection of cultivars for reducing cadmium in the diet // J. Sci. Food Agr. Vol. 85. P. 147–153.
46. Liu M. Q., Yanai J., Jiang R. F. et al., 2008. Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? // Chemosphere. Vol. 71. P. 1276–1283.
47. Lombi E., Zhao F. J., Dunham S. J., McGrath S. P., 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense* // New Phytol. Vol. 145. P. 11–20.
48. Macnair M. R., Bert V., Huitson S. B. et al., 1999. Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters // Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci. Vol. 266. P. 2175–2179.
49. Matsuda T., Kuramata M., Takahashi Y. et al., 2009. A novel plant cysteine-rich peptide family conferring cadmium tolerance to yeast and plants // Plant Sign. Behav. Vol. 4:5. P. 419–421.
50. Mills R., Krijger G., Vaccarini P. et al., 2003. Functional expression of *AtHMA4*, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass // Plant J. Vol. 35. P. 164–176.
51. Morel M., Crouzet J., Gravot A., 2009. *AtHMA3*, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis* // Plant Physiol. Vol. 149. P. 894–904.
52. Oomen R. J. F. J., Wu J., Lelievre F. et al., 2009. Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // New Phytol. Vol. 181. P. 637–650.
53. Ortiz D. F., Kreppel L., Speiser D. M. et al., 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter // EMBO J. Vol. 11. P. 3491–3499.
54. Palmiter R. D., 1998. The elusive function of metallothioneins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95. P. 8428–8430.
55. Pan A., Yang M., Tie F. et al., 1994. Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants // Plant Mol. Biol. Vol. 24. P. 341–351.
56. Peer W. A., Baxter I. R., Richards E. L., Freeman J. L., Murphy A. S., 2005. Phytoremediation and hyperaccumulator plants // Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification / Eds. M. J. Tamás, E. Martinoia, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P. 299–340.
57. Pence N. S., Larsen P. B., Ebbs S. D., 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97. P. 4956–4960.
58. Persans M., Nieman K., Salt D., 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 98. P. 9995–10000.
59. Prévéral S., Gayet L., Moldes C. et al., 2009. A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans. Heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides // J. Biol. Chem. Vol. 284. P. 4936–4943.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Rivetta A., Negrini N., Cocucci M., 1997. Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination // Plant Cell Environ. Vol. 20. P. 600–608.
64. Roosens N., Verbruggen N., Meerts P. et al., 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from Western Europe // Plant Cell Environ. Vol. 26. P. 1657–1672.
65. Sanita di Toppi L., Gabbriellini R., 1999. Response to cadmium in higher plants // Environ. Exp. Bot. Vol. 41. P. 105–130.
66. Sanjaya P., Hsiao P., Su R., Ko S., 2008. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* tryptophan synthase beta 1 (*AtTSB1*) in *Arabidopsis* and tomato confers tolerance to cadmium stress // Plant Cell Environ. Vol. 31. P. 1074–1085.

67. Schat H., Kuiper E., Ten Bookum W. M., Vooijs R., 1993. A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerant populations // *Heredity*. Vol. 70. P. 142–147.
68. Schat H., Vooijs R., Kuiper E., 1996. Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris* // *Evolution*. Vol. 50. P. 1888–1895.
69. Shaul O., Hilgemann D. W., de-Almeida-Engler J. et al., 1999. Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^{+} exchanger // *EMBO J*. Vol. 18. P. 3973–3980.
70. Singh O., Labana S., Pandey G. et al., 2003. Phytoremediation: an overview of metabolic ion decontamination from soil // *Appl. Microb. Biotech.* Vol. 61. P. 405–412.
71. Smith S. E., Macnair M. R., 1998. Hypostatic modifiers cause variation in degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus* // *Heredity*. Vol. 80. P. 760–768.
72. Song W.-Y., Martinoia E., Lee J. et al., 2004. A novel family Cys-rich membrane proteins mediates cadmium resistance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* Vol. 135. P. 1027–1039.
73. Suzuki N., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H., 2002. Functional characterization of a heavy metal binding protein Cd119 from *Arabidopsis* // *Plant J.* Vol. 32. P. 165–173.
74. Talke I. N., Hanikenne M., Krämer U., 2006. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // *Plant Physiol.* Vol. 142. P. 148–167.
75. Thomine S., Lelievre F., Debarbieux E. et al., 2003. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency // *Plant J.* Vol. 34. P. 685–695.
76. Thomine S., Wang R., Ward J. M. et al., 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 97. P. 4991–4996.
77. Tilstone G., Macnair M., Smith S., 1997. Does copper tolerance give cadmium tolerance in *Mimulus guttatus*? // *Heredity*. Vol. 79. P. 445–452.
78. Tommey A. M., Shi J., Lindsay W. P. et al., 1991. Expression of the pea gene *PsMTa* in *E. coli* — metal binding properties of the expressed protein // *FEBS Letters*. Vol. 292. P. 48–52.
79. Tsyganov V., Belimov A., Borisov A. et al., 2007. A chemically induced new pea (*Pisum sativum*) mutant SGECd¹ with increased tolerance to, and accumulation of, cadmium // *Ann. Bot.* Vol. 99. P. 1–11.
80. Tsyganov V., Zhernakov A., Kulaeva O. et al., 2008. Cadmium influence on legume-*Rhizobium* symbioses. In: Proceedings of 8th European Nitrogen Fixation Conference. Gent, Belgium. August 30 – September 3, P. 201.
81. Ueno D., Ma J. F., Iwashita T. et al., 2005. Identification of the form of Cd in the leaves of a superior Cd accumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* using Cd-NMR // *Planta*. Vol. 221. P. 928–936.
82. Van der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E. et al., 1999. Over-expression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation // *Plant Physiol.* Vol. 119. P. 1047–1055.
83. Verbruggen N., Hermans Ch., Schat H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants // *New Phytol.* Vol. 181. P. 759–776
84. Verret F., Gravot A., Auroy P. et al. 2004. Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance // *FEBS Letters*. Vol. 576. P. 306–312.
85. Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth // *Plant Cell*. Vol. 14. P. 1223–1233.
86. Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Sundaram M. V., Rea P. A., 2005. CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans* // *J. Biol. Chem.* Vol. 280. P. 23684–23690.
87. Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Ward J. T., Rea P. A., 2001. A new pathway for heavy metal detoxification in animals: phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans* // *J. Biol. Chem.* Vol. 276. P. 20817–20820.
88. Weber M., Harada E., Vess C. et al., 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotinamine synthase, a zip transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors // *Plant J.* Vol. 37. P. 269–281.
89. Zha H. G., Jiang R. F., Zhao E. J. et al., 2004. Co-segregation analysis of cadmium and zinc accumulation in *Thlaspi caerulescens* interecotypic crosses // *New Phytol.* Vol. 163. P. 299–312.
90. Zhigang A., Cuijie L., Yuangang Z. et al., 2006. Expression of *BjMT2*, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings // *J. Exp. Bot.* Vol. 57. P. 3575–3582.
91. Zimeri A. M., Dhankher O. P., McCaig B., Meagher R. B., 2005. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation // *Plant Mol. Biol.* Vol. 58. P. 839–855.
92. Zornoza P., Vazquez S., Esteban E. et al., 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity // *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 40. P. 1003–1009.

MOLECULAR-GENETIC BASIS OF HIGHER PLANTS TOLERANCE TO, AND ACCUMULATION OF, CADMIUM

Kulaeva O. A., Tsyganov V. E.

✿ **SUMMARY:** Cadmium (Cd) is one of the most wide-ranged and dangerous pollutants for all living organisms, including plants. At present time the intensive studies of mechanisms of Cd accumulation in plant tissues and plant tolerance to its toxic influence are performed. Data about variation of Cd tolerance and accumulation traits in natural populations of hyperaccumulators species as well as important crops were obtained. A series of mutants with changed sensitivity to Cd was ob-

tained. In recent decade several classes of proteins involving in cell responses to Cd ions were revealed. An important role of microRNA in plant adaptation to Cd was recently demonstrated. Studies of molecular-genetic mechanisms of Cd accumulation and plant tolerance to it are theoretical basis for development of phytoremediation technologies of soil contaminated with heavy metals and breeding of crop varieties with decreased Cd accumulation.

✿ **KEY WORDS:** genetic analysis of cadmium tolerance; hyperaccumulation; metal transporters; metallothioneins; phytochelatins; microRNA; phytoremediation; transcriptomic analysis; gene overexpression; RNA interference.

✿ Информация об авторах

Кулаева Ольга Алексеевна — инженер-исследователь, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория молекулярной и клеточной биологии. 196608 Санкт-Петербург, Пушкин 8, шоссе Подбельского д. 3
E-mail: koa1983@yandex.ru.

Цыганов Виктор Евгеньевич — заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии, кандидат биологических наук. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: viktor_tsyganov@arriam.spb.ru.

Kulaeva Olga Aleksseevna — engineer. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: koa1983@yandex.ru.

Tsyganov Viktor Evgenevich — head of the laboratory. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: Viktor_Tsyganov@arriam.spb.ru.