

С.И. ФЕНИК¹, В.Г. СОЛОДУШКО²,
Т.Б. КАЛИНЯК³, Я.Б. БЛЮМ⁴

¹ Университет Дарэма, Дарэм, Великобритания

² Университет Южной Алабамы, США

³ Университет Британской Колумбии, Ванкувер, Канада

⁴ Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

РОЛЬ Cd-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ И ФИТОХЕЛАТИНОВ В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA* К КАДМИЮ



Одинаковые по устойчивости к кадмию каллусные линии *Nicotiana plumbaginifolia* получены при разных селективных условиях — без подавления синтеза фитохелатинов (линия Cd-R) и при их подавлении бутионинсульфоксимином (линия Cd-Ri). Уровень синтеза фитохелатинов в линии Cd-R превышает контрольные значения примерно в пять раз, в то время как в линии Cd-Ri — только в два раза. Показано, что в контрольной линии экспрессируются в основном три белка, способных связывать кадмий — 41, 34 и 19 кД. Общим для обеих устойчивых линий является экспрессия Cd-связывающих белков с молекулярной массой 40, 37 и 19 кД. В то же время устойчивые линии отличаются по синтезу относительно низкомолекулярных Cd-связывающих белков — линия Cd-R экспрессирует такие белки с молекулярной массой 12,5; 11,5 и 9 кД, в то время как линия Cd-Ri — 13 и 10 кД. Сделано предположение, что в устойчивости каллусных линий *N. plumbaginifolia* к кадмию принимают участие одновременно и фитохелатины, и Cd-связывающие белки, при этом недостаток фитохелатинов может быть компенсирован за счет изменений в синтезе низкомолекулярных Cd-связывающих белков.

© С.И. ФЕНИК, В.Г. СОЛОДУШКО, Т.Б. КАЛИНЯК,
Я.Б. БЛЮМ, 2007

Введение. Роль фитохелатинов в повышении устойчивости растений к кадмию изучена достаточно хорошо [1—5]. Известно, что эти пептиды являются вторичными метаболитами, образующимися из глутатиона в результате работы фермента фитохелатинсинтазы (γ-глутамилцистеинилдипептидилтрансфераза, КФ 6.3.2.2) [1]. В цитоплазме фитохелатины образуют комплексы с ионами Cd²⁺, после чего транспортируются в вакуоль (процесс является Mg²⁺АТФ-зависимым) [4]. Однако в вакуоли при значениях рН 4,5—5,0 примерно 50 % таких комплексов распадаются [6], что неизбежно должно приводить к повышению количества свободного кадмия, т.е. к снижению эффективности детоксикации ионов Cd²⁺ фитохелатинами.

Известно, что для устойчивых к кадмию растений-металлофитов, растущих в естественных условиях, характерно низкое содержание фитохелатинов [7, 8], что свидетельствует в пользу существования нескольких механизмов устойчивости к этому металлу. В последнее время много внимания уделяется поиску у растений металлотионеинов — низкомолекулярных, богатых цистеином белков, которые в отличие от фитохелатинов кодируются генами и специфически связывают тяжелые металлы в организмах человека, животных и некоторых грибов [9]. Поэтому не исключено, что металлотионеины или же металлотионеинподобные белки принимают участие в формировании устойчивости растений к кадмию.

Для того чтобы проанализировать те механизмы устойчивости к кадмию, которые функционируют наряду со связыванием этого металла фитохелатинами, можно прибегнуть к использованию специфических ингибиторов синтеза фитохелатинов, например бутионинсульфоксимином (БСО) [10]. В связи с этой целью настоящей работы было получено устойчивых к кадмию каллусных линий *Nicotiana plumbaginifolia* без подавления и в условиях подавления синтеза фитохелатинов, а также изучение роли фитохелатинов и Cd-связывающих белков в формировании устойчивости этих линий к кадмию.

Материал и методика. Для получения устойчивых линий использовали каллусную ткань, полученную из гаплоидных растений *N. plumbaginifolia*, которые культивируются в Институте клеточной биологии и генетической ин-

женерии НАН Украины. Каллусы содержали на среде Марусиге—Скуга (МС) [11] в темноте при температуре +25 °С. В одной серии экспериментов каллусную ткань облучали γ -лучами (доза 1,5 крад) и переносили на среду МС, содержащую 500 мкМ CdCl_2 . В другой серии экспериментов после облучения каллусы высаживали на среду МС, содержащую 400 мкМ CdCl_2 и 100 мкМ БСО. Каллусы, способные к росту в таких условиях, переносили на среду МС, содержащую 500 мкМ CdCl_2 и 100 мкМ БСО. В обоих случаях устойчивыми считали линии, способные к непрерывному стабильному росту на среде МС, содержащей 500 мкМ CdCl_2 .

Тестирование устойчивых линий на способность к регенерации проводили на среде RМОР [12], а также на этой среде с внесением 500 мкМ CdCl_2 . Оценку роста отселектированных линий проводили путем сравнения относительного прироста сырой массы каллусов после их роста в течение 30 сут на средах, содержащих 100—500 мкМ CdCl_2 . Относительный прирост сырой массы каллуса рассчитывали, как соотношение разницы конечной и начальной массы к начальной массе каллуса и выражали в процентах, принимая за 100 % показатель для контрольного каллуса, растущего в отсутствие кадмия.

Количества фитохелатинов определяли с помощью иммуноферментного метода [13]. Каллусы гомогенизировали в натрий-фосфатном буфере (137 мМ NaCl , 8 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 2,7 мМ KCl , 1,5 мМ KH_2PO_4 , рН 7,3) и центрифугировали при 8000 g. Супернатанты наносили на нитроцеллюлозу и высушивали. Нитроцеллюлозу блокировали 3%-ным бычьим сывороточным альбумином («Reanal», Венгрия) в натрий-фосфатном буфере, а затем инкубировали в течение 1 ч с кроличьими антителами против фитохелатинов (любезно предоставленных проф. Э.В. Вайлером (E. W. Weiler), Рурский университет, Бохум, Германия). После промывки натрий-фосфатным буфером нитроцеллюлозу инкубировали со вторичными антикроличьими антителами, мечеными щелочной фосфатазой («Promega», США), снова промывали буфером и проводили цветную реакцию с субстратом для щелочной фосфатазы. Для получения субстрата 1 мл 5%-ного раство-

ра *p*-нитротетразолиевого голубого («Sigma», США) в 70 % *N-N*-диметилформамиде («Sigma») и 1 мл 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат-*p*-толуидина («Sigma») растворяли в 1 мл буфера, содержащего 0,1 М Трис- HCl , 0,1 М NaCl , 5 мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, рН 9,5, на протяжении 5—10 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Относительную оценку количества фитохелатинов проводили по интенсивности окраски продукта реакции, принимая за единицу количество фитохелатинов в контрольной линии.

Для электрофоретического анализа Cd -связывающих белков каллусы исследуемых линий растирали в жидком азоте и суспендировали в 62,5 мМ Трис- HCl , рН 6,8, содержащем 2,3 % додецилсульфата натрия. Затем образцы центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин, отбирали супернатант и добавляли к нему 10 % глицерина (об./об.), 0,05 % бромфенолового синего и 100 мМ дитиотрейтола. Электрофорез белков проводили в 18%-ном полиакриламидном геле при 220 В [14]. После завершения электрофореза гель на протяжении 15 мин выдерживали в 10 мМ Трис- HCl , рН 8,0. Гель на протяжении 15 мин инкубировали с 500 мкМ раствором CdCl_2 в этом же буфере с целью максимального насыщения белков кадмием. После тщательной промывки в 10 мМ Трис- HCl , рН 8,0, гель погружали в щелочной раствор дитизона. Для этого предварительно 3 мг дитизона растворяли в 3 мл диметилсульфоксида и 10 мМ раствором KOH доводили объем до 100 мл [15]. Через 7 мин гель промывали в 10 мМ KOH и на светло-желтом фоне идентифицировали полоски белков, окрашенные в красный цвет, который характерен для нерастворимых в воде комплексов дитизона с кадмием.

На рис. 1—3 представлены средние арифметические из трех повторностей и их среднеквадратические ошибки (повторностью служили результаты отдельного эксперимента). Обсуждаются различия, достоверные при 5%-ном уровне значимости.

Результаты исследований. Устойчивые к кадмию линии *N. plumbaginifolia* были получены при разных селективных условиях — без ингибирования синтеза фитохелатинов (линия Cd-R) и при их ингибировании (линия Cd-Ri).

Отселектированные линии характеризовались непрерывным устойчивым ростом на среде с токсичным содержанием кадмия и по внешнему виду не отличались от контрольной линии. Обе устойчивые линии, Cd-R и Cd-Ri, не проявили способности к регенерации как в присутствии, так и в отсутствие кадмия.

Сравнение роста исследуемых линий на средах, содержащих CdCl₂ в концентрации от 0 до 500 мкМ, показало, что для линии Cd-R и Cd-Ri характерны примерно одинаковые уровни устойчивости (рис. 1). При 500 мкМ CdCl₂ — концентрации, вызывающей некроз контрольной линии, наблюдали 50%-ное ингибирование относительного прироста сырой массы каллусов этих линий. Концентрации ниже 200 мкМ CdCl₂ почти не влияли на рост устойчивых линий, в то время как относительный прирост сырой массы контрольной линии уменьшался на 25–30 %.

Внесение в среду с кадмием 100 мкМ БСО (условия ингибирования синтеза фитохелатинов) приводило к повышению чувствительности к этому металлу контрольной и Cd-R линий, но не линии Cd-Ri (рис. 2). При этом разницу между относительным приростом сырой массы каллусов Cd-R и Cd-Ri линий наблюдали уже при наличии в среде 100 мкМ CdCl₂, а в присутствии 400 мкМ CdCl₂ она превышала 50 %. Некроз линии Cd-R начинался при 500 мкМ CdCl₂, в то время как при тех же условиях рост линии Cd-Ri ингибировался только на 50 %.

При определении уровня синтеза фитохелатинов установлено, что для обеих устойчивых линий характерно повышенное содержание этих полипептидов в клетках (рис. 3). Клетки линий Cd-Ri и Cd-R накапливали соответственно в два и в пять раз больше фитохелатинов, нежели клетки контрольного каллуса. Однако, несмотря на примерно одинаковую устойчивость к кадмию, линия Cd-Ri накапливала почти в два раза меньше фитохелатинов, чем линия Cd-R (рис. 3).

Результаты электрофоретического анализа белков, способных связывать кадмий, выявили некоторые различия их спектров при сравнении исследуемых линий. В контрольной линии присутствовали три таких белка с молекулярной массой 41, 34 и 19 кД (рис. 4). Обе устойчивые

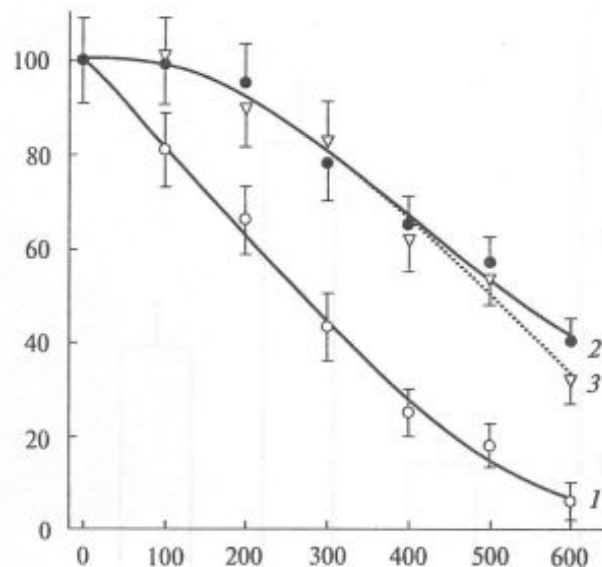


Рис. 1. Характеристика роста контрольной, Cd-R и Cd-Ri линий *N. plumbaginifolia* на среде в присутствии различных концентраций CdCl₂: по вертикали — относительный прирост сырой массы каллуса, %; по горизонтали — [Cd²⁺], мкМ; 1 — контрольная линия; 2 — Cd-R — устойчивая к кадмию линия, полученная в условиях отсутствия ингибирования синтеза фитохелатинов; 3 — Cd-Ri — устойчивая к кадмию линия, полученная при ингибировании синтеза фитохелатинов БСО

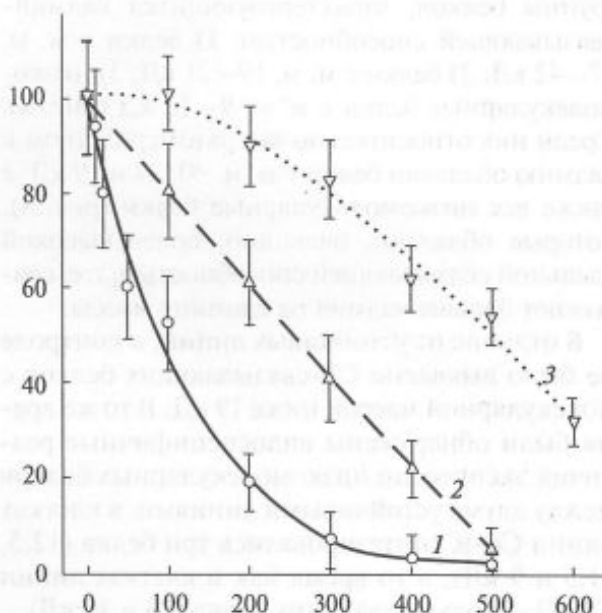


Рис. 2. Характеристика роста контрольной, Cd-R и Cd-Ri линий *N. plumbaginifolia* на среде, содержащей различные концентрации CdCl₂ и 100 мкМ БСО. Обозначения, как на рис. 1

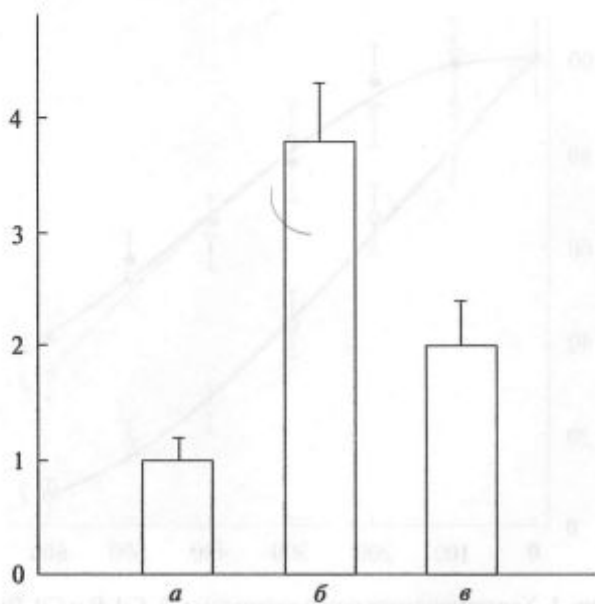


Рис. 3. Относительное содержание фитохелатинов (по вертикали) в контрольной, Cd-R и Cd-Ri линиях *N. plumbaginifolia*: а — контрольная линия; б — Cd-R — устойчивая к кадмию линия, полученная в условиях отсутствия ингибирования синтеза фитохелатинов; в — Cd-Ri — устойчивая к кадмию линия, полученная при ингибировании синтеза фитохелатинов БСО

линии (Cd-R и Cd-Ri) экспрессировали три группы белков, характеризующихся кадмий-связывающей способностью: 1) белки с м. м. 37–42 кД; 2) белки с м. м. 19–21 кД; 3) низкомолекулярные белки с м. м. 9–13 кД (рис. 4). Среди них относительно высоким сродством к кадмию обладали белки с м. м. 40, 37 и 19 кД, а также все низкомолекулярные белки (рис. 4), которые обладают, очевидно, более высокой удельной связывающей способностью, т. е. связывают больше кадмия на единицу массы.

В отличие от устойчивых линий, в контроле не было выявлено Cd-связывающих белков с молекулярной массой ниже 19 кД. В то же время были обнаружены видоспецифичные различия экспрессии низкомолекулярных белков между двумя устойчивыми линиями: в клетках линии Cd-R синтезировались три белка (12,5, 11,5 и 9 кД), в то время как в клетках линии Cd-Ri — только два таких белка (13 и 10 кД).

Обсуждение полученных данных. С целью выяснения, является ли детоксикация кадмия фитохелатинами единственным механизмом повышения устойчивости растений к кадмию,

мы провели селекцию различных каллусных линий *N. plumbaginifolia* как без ингибирования синтеза фитохелатинов, так и в условиях такого ингибирования, используя для этой цели 100 мкМ БСО. Хорошо известно, что указанная концентрация БСО специфически ингибирует фитохелатинсинтазу и при отсутствии в среде кадмия не влияет на относительный прирост сырой массы каллусов [16]. В результате селекции нам удалось получить две практически равные по устойчивости к кадмию линии растений — Cd-R и Cd-Ri (рис. 1). Можно предположить, что основной причиной повышения устойчивости линии Cd-R является увеличение количества продуцируемых фитохелатинов, связывающих ионы Cd^{2+} в комплексы. Об этом свидетельствует тот факт, что линия Cd-R характеризуется повышенным содержанием этих полипептидов в клетках (рис. 3). При добавлении в среду 100 мкМ БСО она проявляет повышенную чувствительность к кадмию (рис. 2). Эти данные согласуются с результатами целого ряда работ по селекции устойчивых к кадмию клеточных культур различных видов растений [1–5].

В то же время показано, что линия Cd-Ri способна расти практически при той же концентрации кадмия в среде и с такой же интенсивностью, как и линия Cd-R (рис. 1). При этом важно учесть, что она содержит сравнительно невысокое количество фитохелатинов (рис. 3), а ее чувствительность к кадмию не изменяется при добавлении в среду бутионинсульфоксимины (рис. 2). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что фитохелатины могут не играть решающей роли в формировании устойчивости линии Cd-Ri к кадмию. Подобное заключение наталкивает на предположение, что в клетках растений способны развиваться альтернативные пути формирования устойчивости к кадмию, и именно они могут определять уровень устойчивости линии Cd-Ri.

Известно, что, кроме фитохелатинов, в детоксикации ионов Cd^{2+} в клетке могут принимать участие органические кислоты [17, 18], полигидроксифенольные вещества [19], металлотионеины или же металлотионеинподобные белки [18–22]. Возможно, именно такие белки играют ключевую роль в формировании высо-

коспецифичной устойчивости к кадмию естественных экотипов растений-металлофитов [23, 24].

Для выявления белков, способных связывать кадмий в клетках устойчивых линий *N. plumbaginifolia*, нами был использован оригинальный подход, заключающийся в инкубировании электрофоретически разделенных белков непосредственно в полиакриламидном геле с избытком кадмия и последующей их окраской дитизоном. Применение такого подхода позволило определить, что контрольная линия, растущая без экспозиции с кадмием, экспрессирует белки с молекулярной массой 41, 34 и 19 кД, способные связывать относительно высокие количества этого металла (рис. 4). Указанные белки экспрессируются конститутивно, и маловероятно, что они могут принимать участие в формировании устойчивости растений к кадмию. В то же время не исключено, что эти белки являются мишенями для ионов Cd^{2+} , т.е. после попадания этого металла в клетку они одними из первых вступают с ним во взаимодействие.

Устойчивые линии значительно отличаются от контрольной по спектру белков, способных связывать кадмий. В то же время набор таких белков у обеих устойчивых линий в значительной степени сходен, несмотря на то, что они были получены при различных селективных условиях. Например, и линия Cd-R, и линия Cd-Ri экспрессируют три белка с повышенным сродством к кадмию (40, 37 и 19 кД), и два белка с несколько меньшим сродством к этому металлу (42 и 21 кД). При этом, судя по интенсивности их окрашивания дитизоном, в обеих устойчивых линиях уровень синтеза всех этих белков был практически одинаковым. Не исключено, что повышение интенсивности синтеза по крайней мере некоторых из перечисленных Cd-связывающих белков играет важную роль в формировании устойчивости каллусных линий *N. plumbaginifolia* к кадмию. Эти данные согласуются с результатами, полученными при изучении Cd-связывающих белков *Phaseolus vulgaris*. В корнях этих растений кадмий также стимулировал экспрессию белка с молекулярной массой 42 кД [25].

Очевидно, наряду с фитохелатинами важную роль в повышении устойчивости каллус-

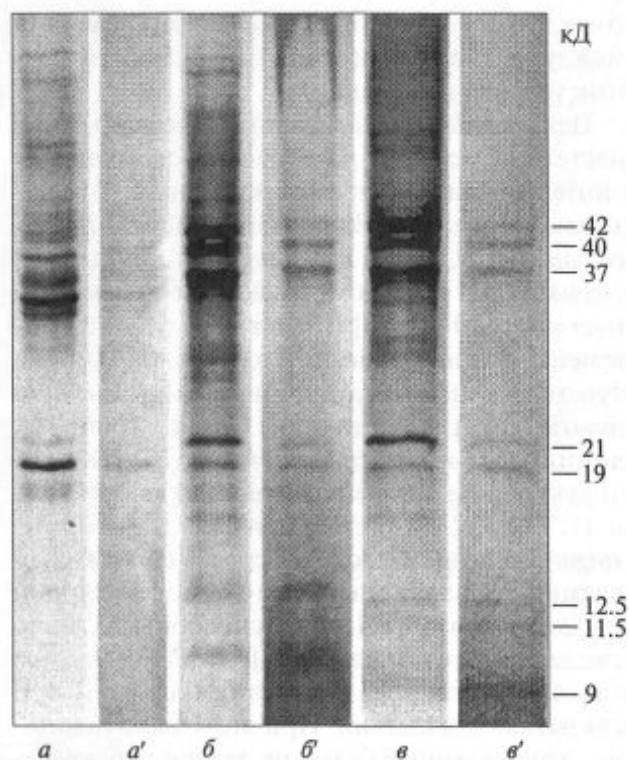


Рис. 4. Сравнительный электрофоретический анализ Cd-связывающих белков из контрольной, Cd-R и Cd-Ri линий *N. plumbaginifolia*: а и а' — контрольная линия; б и б' — Cd-R — устойчивая к кадмию линия, полученная в условиях отсутствия ингибирования синтеза фитохелатинов; в и в' — Cd-Ri — устойчивая к кадмию линия, полученная при ингибировании синтеза фитохелатинов с помощью БСО; а, б и в — электрофореграммы белков; а', б' и в' — результаты визуализации кадмий-связывающих белков после окрашивания дитизоном

ной культуры *N. plumbaginifolia* к кадмию играют низкомолекулярные белки, также проявляющие высокое сродство к кадмию. Клетки контрольной линии практически не синтезируют таких белков, в то время как в устойчивых линиях они представлены в значительном количестве, что служит косвенным подтверждением участия этих белков в развитии устойчивости *N. plumbaginifolia* к кадмию. Наличие различий в синтезе низкомолекулярных Cd-связывающих белков является важной характеристикой линий Cd-R и Cd-Ri. Линия Cd-R экспрессирует три таких белка с молекулярной массой 12,5; 11,5 и 9 кД, тогда как линия Cd-Ri два белка, но с несколько более высокой массой — 13 и 10 кД. Нельзя исключить

того, что основной причиной такого различия между устойчивыми линиями являются разные условия их селекции.

Целым рядом исследований показано, что в растениях кадмий чаще всего стимулирует синтез именно низкомолекулярных Cd-связывающих белков. Например, в клетках *Brassica capitata*, *N. glauca* и *N. langsdorffii* ионы Cd^{2+} связываются с белком, имеющим молекулярную массу 10 кД [26]. Похожие результаты получены при исследовании влияния кадмия на чувствительные и устойчивые линии *Datura innoxia*. Показано, что ионы Cd^{2+} в устойчивых линиях вызывают транскрипцию мРНК, кодирующей белки с молекулярной массой >10 и 11,3 кД [3]. В листьях, стеблях и корнях *P. vulgaris*, которые растут в среде, содержащей кадмий, обнаружены белки с молекулярной массой 9,2 и 10 кД. Они способны активно связывать этот металл [25]. В *Pisum sativum* кадмий индуцировал синтез белков 6–10 кД, связывающих кадмий. При этом было показано, что указанные белки не давали перекрестной реакции с антителами против металлотронеинов животных [20]. Наличие перечисленных низкомолекулярных Cd-связывающих белков в клетках различных видов устойчивых растений служит косвенным подтверждением необходимости таких белков для формирования устойчивости к кадмию.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в формировании устойчивости каллусных линий *N. plumbaginifolia* к кадмию возможно принимают участие одновременно и фитохелатины, и Cd-связывающие белки. При этом недостаток фитохелатинов в одной из таких линий может быть компенсирован изменениями в синтезе низкомолекулярных белков, способных связывать кадмий, что также подтверждает участие указанных белков в формировании устойчивости *N. plumbaginifolia* к кадмию.

SUMMARY. *Nicotiana plumbaginifolia* callus lines with the equal resistance to cadmium have been produced under different selective conditions — either without inhibition of the phytochelatin synthesis (line Cd-R) or in the presence of the inhibitor butionine sulfoximine (line Cd-Ri). The level of phytochelatin synthesis in the line Cd-R five-fold exceeded the control value and in the line Cd-Ri it was twice as much as in the control. It was shown that in the

control line mainly three cadmium-binding proteins are expressed of the molecular weights 41, 34 and 19 kD. The common feature of the both resistant lines is the expression of the cadmium-binding proteins of 40, 37 and 19 kD. The resistant lines differ with respect to the synthesis of relatively low-molecular cadmium-binding proteins. The proteins of the molecular weights 12,5, 11,5 and 9 kD are expressed in the line Cd-R, while the proteins of 13 and 10 kD are expressed in the line Cd-Ri. It was supposed that both the phytochelatin and the Cd-binding proteins contribute to the resistance of *N. plumbaginifolia* callus lines to cadmium and the lack of the phytochelatin can be equilibrated by the changes in the low-molecular Cd-binding protein synthesis.

РЕЗЮМЕ. Однакові за стійкістю до кадмію калусні лінії *Nicotiana plumbaginifolia* одержані при різних селективних умовах — без пригнічення синтезу фітохелатинів (лінія Cd-R) і при їх пригніченні бутионінсульфоксиміном (лінія Cd-Ri). Рівень синтезу фітохелатинів в лінії Cd-R перевищував контрольні значення приблизно в п'ять разів, в той час як в лінії Cd-Ri — лише в два рази. Показано, що в контрольній лінії експресуються в основному три білки, здатні зв'язувати кадмій — 41, 34 та 19 кД. Загальним для обох стійких ліній є експресія Cd-зв'язувальних білків з молекулярною масою 40, 37 та 19 кД. В той же час стійкі лінії відрізняються за синтезом відносно низкомолекулярних Cd-зв'язувальних білків — лінія Cd-R експресує такі білки з молекулярною масою 12,5; 11,5 та 9 кД, тоді як лінія Cd-Ri — 13 і 10 кД. Зроблено припущення, що в стійкості калусних ліній *N. plumbaginifolia* до кадмію приймають участь одночасно і фітохелатини, і Cd-зв'язувальні білки, при цьому брак фітохелатинів може бути компенсований за рахунок змін в синтезі низкомолекулярних Cd-зв'язувальних білків.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — 84. — P. 439–443.
2. Jackson P.J., Unkefer C.J., Doolen J.A., Watt K., Robinson N.J. Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycine: Its role in cadmium resistant plant cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — 84. — P. 6619–6623.
3. Delhaize E., Jackson P.J., Lujan L.D., Robinson N.J. Poly(γ -glutamylcysteinyl)-glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium. Role in cadmium tolerance // Plant Physiol. — 1989. — 89. — P. 700–706.
4. Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B. D., Chet I., Raskin I. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants // Biotechnology. — 1995. — 13. — P. 468–474.

5. Rauser W.E. Phytochelatins and related peptides // Plant Physiol. — 1995. — 109. — P. 1141—1149.
6. Reese R.N., Wagner G.J. Properties of tobacco (*Nicotiana tabacum*) cadmium-binding peptide(s) // Biochem. J. — 1987. — 241. — P. 641—647.
7. Knecht J.A. de, Koevoets P.L.M., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke // New Phytol. — 1992. — 122. — P. 681—688.
8. Knecht J.A. de, Dilen M. van, Koevoets P.L.M., Schat H., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris* chain length distribution and sulfide incorporation // Plant Physiol. — 1994. — 104. — P. 255—261.
9. Kagi J.H.R., Schaffer A. Biochemistry of metallothionein // Biochemistry. — 1988. — 27. — P. 8509—8515.
10. Steffens J.C. The heavy metal-binding peptides of plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. — 1990. — 41. — P. 553—575.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. — 1962. — 15. — P. 473—497.
12. Сидоров В.А., Пивень Н.Н., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. — Киев : Наук. думка, 1985. — 130 с.
13. Hawkes R., Ninday E., Gordon J. A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies // Anal. Biochem. — 1982. — 119. — P. 313—340.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227. — P. 680—685.
15. Sumi Y., Fukuoka H.R., Murakami T., Suzuki T., Hatakeyama S., Suzuki K.T. Histochemical localization of copper, iron and zink in the larvae of the mayfly *Baetis thermicus* inhabiting a river polluted with heavy metals // Zool. Sci. — 1991. — 8. — P. 287—293.
16. Steffens J.C. The heavy metal-binding peptides of plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. — 1990. — 41. — P. 553—575.
17. Vergnano O.G., Gabbrielli R. The response of plants to heavy metals: organic acid production // Giornale Bot. Ital. — 1987. — 121. — P. 209—212.
18. Krotz R.M., Evangelou B.P., Wagner G.J. Relationships between cadmium, zinc, Cd-peptide and organic acid in tobacco suspension cells // Plant Physiol. — 1989. — 91. — P. 780—787.
19. Neumann D., Zurnieden U., Lichtenberger O., Leopold I. How does *Armeria maritima* tolerate high heavy-metal concentrations // J. Plant Physiol. — 1995. — 146. — P. 704—717.
20. Grunhage L., Weigel H.J., Ilge D., Jager H.J. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from *Pisum sativum* // J. Plant. Physiol. — 1985. — 119. — P. 327—334.
21. Robinson N.J., Jackson P.J. «Metallothionein-like» metal complexes in angiosperms; their structure and function // Physiol. Plant. — 1986. — 67. — P. 499—506.
22. Evans K.M., Gatehouse J.A., Lindsay W.P., Shi J., Tommey N.J.R. Robinson N.J. Expression of pea metallothionein-like gene PsMTA in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for PsMTA function // Plant Mol. Biol. — 1992. — 20. — P. 1019—1028.
23. Woolhouse H.W. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals // Encyclopedia of plant physiology. plant ecology / Eds O. L. Lange et al. — Berlin : Springer, 1983. — P. 245—310.
24. Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Усп. совр. биологии. — 1995. — 115. — С. 259—275.
25. Leita L., Contin M., Maggioni A. Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris* // Plant Sci. — 1991. — 77. — P. 139—147.
26. Wagner G.J., Trotter M.M. Inducible cadmium binding complexes in cabbage and tobacco // Plant Physiol. — 1982. — 69. — P. 804—809.

Поступила 26.06.06

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

- BCO — бутионинсульфоксимин;
 Cd-R — устойчивая к кадмию линия *N. plumbaginifolia*, полученная в условиях отсутствия ингибирования синтеза фитохелатинов;
 Cd-Ri — устойчивая к кадмию линия *N. plumbaginifolia*, полученная в условиях ингибирования синтеза фитохелатинов;
 RMOP — культуральная среда для регенерации растений *N. plumbaginifolia*.