

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ,  
СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 633.63:575.2

ВАРИАЦИИ В НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ  
ГЕНА *MTP4* У РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

© 2022 г. А. А. Налбандян<sup>1</sup>\*, А. С. Хуссейн<sup>1</sup>, Н. Р. Михеева<sup>1</sup>, Т. С. Руденко<sup>1</sup>, Н. Н. Черкасова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 396030 Россия

\*e-mail: arpnal@rambler.ru

Поступила в редакцию 26.05.2022 г.

После доработки 29.06.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

Цель работы – изучение молекулярных вариаций семи экзонов гена *MTP4* (metal tolerance protein 4) и корреляции между уровнем экспрессии данного гена и устойчивостью/чувствительностью генотипов сахарной свеклы к кадмию. *MTP4* находится на хромосоме 3 и ассоциирован с устойчивостью растений сахарной свеклы к тяжелым металлам. Материалами для исследований служили растения – микроклоны, выращенные в культуре *in vitro* на селективной среде с ионами кадмия в концентрации 6 мМ, в качестве селективного агента использовали ацетат кадмия –  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Для экспериментов в культуре *in vitro* были отобраны устойчивые и чувствительные микроклоны по морфологическим признакам. Для проведения классического варианта ПЦР использованы семь пар праймеров, сконструированных к каждому экзону. В результате получены ДНК-ампликоны длиной ~390, 381, 344, 299, 304, 334 и 337 п.н. С помощью ПЦР в реальном времени с использованием одной пары праймеров оценили относительный уровень экспрессии гена *MTP4* в изучаемых образцах. С использованием биоинформатических инструментов Snap Gene и Geneious Prime для анализа секвенированных последовательностей гена *MTP4* описаны однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs), инсерции и делеции в гене *MTP4*, получены дедуктивные аминокислотные последовательности, кодируемые полиморфными вариантами экзонов. Для экзона-1 показана филогенетическая близость образцов 2 (МС 2113), 6 (ОП 010) и 10 (ОП 15465). Выявлен высокий полиморфизм во всех экзонах, за исключением экзона-6, где идентифицирована одна вставка и три SNPs: Т/С, G/Т и Т/С – в позициях 30, 60 и 96. Все три замены относятся к синонимичным. Четкой корреляции показателей экспрессии между резистентными и чувствительными к ионам кадмия образцами не обнаружено.

**Ключевые слова:** сахарная свекла, тяжелые металлы, ген *MTP4*, SNP

**DOI:** 10.56304/S0234275822040093

Тяжелые металлы представляют собой группу элементов, таких как свинец, кадмий, никель, кобальт, железо, цинк, хром, мышьяк, серебро и другие. Горнометаллургические работы и сельское хозяйство вызвали загрязнение почв тяжелыми металлами, что представляет серьезную угрозу экологическому балансу [1–3]. Накопление тяжелых металлов на пахотных землях вызывает загрязнение почв, что приводит к непригодности для выращивания сельскохозяйственных культур, в том числе сахарной свеклы. В связи с этим невозможно переоценить необходимость сбора научной информации о влиянии различных тяжелых металлов на растения и механизмах их ответа на этот стресс. Большинство минеральных ионов необходимо для метаболических процессов растений. Однако при концентрациях выше пороговых значений они оказывают пагубное действие на культуру. Например, количество обменного кад-

мия ( $\text{Cd}^{2+}$ ) в гумусовом горизонте чернозема колеблется от 50.0 до 67.8%. Это один из наиболее подвижных металлов, то есть большая вероятность интенсивной миграции элемента вниз по профилю [4–7]. Ионы тяжелых металлов, таких как свинец и кадмий, повреждают вакуолярную мембрану корнеплодов сахарной свеклы. Обработка листьев свеклы обыкновенной (*Beta vulgaris* L.) солями кадмия вызывала замедление роста, хлороз листьев, увеличение отношения массы корня к целому растению, снижение дыхания кончиков корней, интенсивности фотосинтеза. По сравнению с контрольными растениями, обработанные солями кадмия, характеризовались сниженным содержанием сухих веществ, меньшей обводненностью побегов, истончением корней [8–11]. Уже сообщалось об изменениях в росте и развитии растений сахарной свеклы, растущих в загрязненной кадмием и никелем почве. Так, одновременная обработка поч-

вы солями кадмия и никеля приводила к резкому снижению как свежей, так и сухой биомассы надземной части растений свеклы, а также их высоты [12, 13]. Показано, что кадмий негативно влияет на белки дегидрины (белки поздней стадии эмбриогенеза, LEA), которые предотвращают коагуляцию молекул и поддерживают целостность клеточной мембраны [14]. У проростков сахарной свеклы, выращенных в питательном растворе с высоким содержанием  $CdCl_2$ , была увеличена скорость транспирации листьев и уменьшена суммарная площадь устьичных отверстий [15]. Помимо всходов, стресс, вызванный кадмием, отрицательно влияет на рост стержневых корней сахарной свеклы. Например, длительное воздействие солей кадмия снижает поглощение сахарозы и уменьшает количество сухой массы стержневых корней, понижает содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы — как в побегах, так и в корнях сахарной свеклы [16]. Снижение активности хелатредуктазы железа (FCR; ferric chelate reductase, EC 1.16.1.7) и экспрессии гена *BvIRT1*, регулируемого ионами железа, свидетельствуют о негативном влиянии кадмия на усвоение железа [13]. Также показано, что в условиях стресса, вызванного кадмием, в корнях сахарной свеклы повышаются уровни Cd/Zn-транспортирующей АТФазы (ген *BvHMA3*) и макрофагального белка (ген *BvNRAMP3*), ассоциированного с естественной резистентностью. Науче с соавт. [13] предположили, что эти гены могут участвовать в механизмах, отвечающих за накопление/поглощение ионов  $Cd^{2+}$ . Неспособность модулировать антиоксидантную защиту для контроля над повышенным содержанием активных форм кислорода (АФК) может быть одной из причин снижения сахаристости в растениях сахарной свеклы, подвергшихся негативному воздействию кадмия.

Механизмы реакции культурной и дикой свеклы на стресс, вызванный тяжелыми металлами, еще предстоит изучить детально. Сообщается лишь о нескольких генах, участвующих в реакции сахарной свеклы на негативное влияние тяжелых металлов. Так, показано, что два гена из семейства *MTP*: *BmMTP10* и *BmMTP11*, — кодирующие толерантные к металлам белки у дикой свеклы (*Beta maritima*), при экспрессии в дрожжевых клетках обеспечивают толерантность к высоким концентрациям марганца. Уровень экспрессии гена *BmMTP10* увеличивался в присутствии избыточного количества марганца, в то время как транскрипция *BmMTP11* не изменялась. Это позволило авторам предположить, что при интоксикации тяжелыми металлами белки *BmMTP10* и *BmMTP11* функционируют независимо. Показано, что негативному влиянию кадмия на сахарную свеклу селективно противодействуют гены *MTP1* и *MTP4* [17, 18]. Сейчас предполагают, что толерантность *Beta vulgaris* L. к металлам обеспечивается экспрессией несколь-

ких генов. На ресурсе NCBI аннотировано девять локусов (*MTP1*, *MTP2*, *MTPC2*, *MTP4(3)*, *MTP4(4)*, *MTPC4*, *MTP10*, *MTP11*, *MTP.B*) в геноме сахарной свеклы, экспрессирующих белки, отвечающие за резистентность растений к фитопатогенному воздействию тяжелых металлов [19–21]. Для создания растений сельскохозяйственных культур с высокой степенью стрессоустойчивости применяют не только методы классической селекции, но также биотехнологические методы молекулярной селекции. Посредством клеточной селекции, методом отбора *in vitro* на селективных средах, отбирают формы растений, наиболее приспособленные к стрессовым факторам [22]. Ионы  $Cd^{2+}$  обладают многообразным отрицательным воздействием на культурные растения. Выбирая стрессовый агент с широким спектром патологического влияния, можно вести отбор генотипов с комплексной стрессоустойчивостью, в частности к осмотическим стрессам, что требует современной селекция сахарной свеклы.

Из всего вышесказанного следует, что необходимы дальнейшие исследования сахарной свеклы для изучения физиологических, клеточных и молекулярных изменений, механизмов реакций растений на стресс, вызванный тяжелыми металлами, чтобы разработать оптимальные подходы в селекции для получения генотипов, устойчивых к стрессу, вызванному тяжелыми металлами.

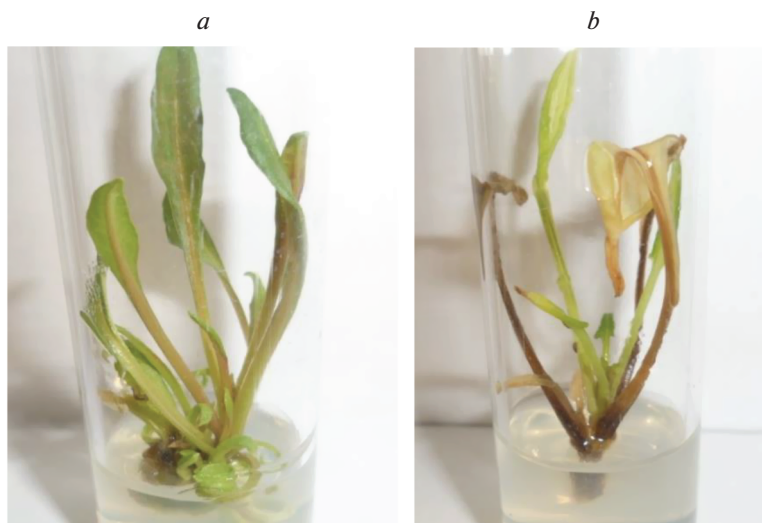
Цель работы заключалась в изучении полиморфизма гена устойчивости к тяжелым металлам, *MTP4*, у растений-регенерантов сахарной свеклы, отобранных в культуре *in vitro* на селективной среде, содержащей ионы кадмия.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### *Растительный материал*

Моделью для изучения гена *MTP4* выбраны растения-регенеранты сахарной свеклы селекционно ценных генотипов: МС-форм (МС 94 Ар, МС 2113, МС ЛБС16, МС 2093 и МС Перла), закрепителя стерильности Оуэн-типа (О-тип ЛБО17) и сростно-плодных опылителей (ОП 15676, ОП 010, ОП 15465 и ОП 14044). Микроклоны растили на селективной питательной среде Гамборга [23] с добавлением ацетата кадмия. Для отбора устойчивых к интоксикации микроклонов сахарной свеклы в условиях *in vitro* использовали  $Cd(CH_3COO)_2$  в концентрации 6 мМ. Полученные в этих селективных условиях микроклоны отличались высокой адаптивной способностью. Доля устойчивых регенерантов составила около 75%.

Генотипы МС 94-Ар, МС 2113, МС ЛБС16, О-тип ЛБО17, ОП 15676 и ОП 010 проявили себя как устойчивые материалы, тогда как генотипы МС 2093, МС Перла, ОП 14044 и ОП 15465 погибли на среде с ионами  $Cd^{2+}$ .



**Рис. 1.** Растения-регенеранты сахарной свеклы (*Beta vulgaris*). *a* – Устойчивый к тяжелым металлам генотип (МС-форма 2113); *b* – чувствительный генотип (ОП 15465).

**Fig. 1.** Regenerant plants of sugar beet (*Beta vulgaris*). *a* – Resistant to heavy metals genotype (MS 2113); *b* – susceptible genotype (Pollinator 15465).

Молекулярно-генетические эксперименты проводили на контрастных материалах (устойчивые/чувствительные), которые отбирали визуально в культуре *in vitro* (рис. 1а, 1б).

#### Выделение и анализ ДНК/РНК

ДНК выделяли из зеленой массы регенерантов с использованием наборов для выделения геномной ДНК (ЗАО “Синтол”, Россия). Качество образцов ДНК оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в буфере TBE (0.89M Tris, 0.89 M борная кислота и 0.02M ЭДТА, pH 8.0). Концентрацию ДНК определяли с использованием набора для анализа ДНК HS QubitR (Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР в классическом формате проводили на приборе Genius (Genius, Великобритания). Для визуализации использовали УФ-транслюминатор Vilber Lourmat (Vilber, Франция). Для определения экспрессии изучаемого гена выделяли РНК реагентом Extract RNA (ЗАО “Евроген”, Россия). Качество оценивали электрофорезом в 3%-ном агарозном геле, дополненном 2.2 M формальдегидом. Концентрацию РНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Обратную транскрипцию проводили с использованием систем M-MuLV (ООО “СибЭнзим”, Россия) и Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия) согласно протоколу производителей.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием SYBR Green I в системе Bio-Rad CFX-96TM (Bio-Rad, США). Рабочую температуру для проведения ПЦР выбирали в соответствии с температурой отжига используемых праймеров.

Протокол классической ПЦР: 94°C в течение 4 мин, далее 35 циклов: 94°C в течение 40 с, 72°C в течение 40 с – и завершающая элонгация при 72°C в течение 4 мин.

Для ПЦР в реальном времени использовали следующие условия: 95°C в течение 5 мин, далее 40 циклов: 20 с при 95°C, 30 с при 59.5°C, 30 с при 72°C – и завершающая элонгация при 72°C в течение 5 мин. Для расчета относительного уровня транскриптов целевого гена использовали программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager™ Software 3.1 (Bio-Rad).

В классическом варианте ПЦР использовали семь пар специфических праймеров на ген *MTP4*, а для ПЦР в реальном времени – одну пара праймеров (табл. 1). Дизайн и конструирование олигонуклеотидов проводили в программе Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Секвенировали полученные ДНК-фрагменты методом Сэнгера на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

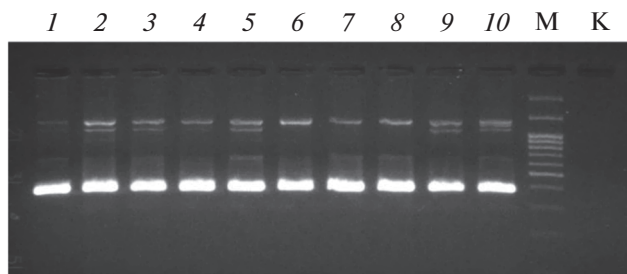
Ген устойчивости к тяжелым металлам *MTP4* содержит семь экзонов. Нами проведено изучение молекулярных вариаций всех семи экзонов гена *MTP4* (секвенирование областей всех экзонов по Сэнгеру). С использованием 7 пар специфических праймеров, разработанных для каждого экзона, проведен классический ПЦР-анализ. В результате в 10 образцах растений-регенерантов сахарной свеклы, из которых шесть были ранее отобраны и идентифицированы как устойчивые

**Таблица 1.** Характеристика использованных праймеров  
**Table 1.** Characteristics of primers used

Праймер	Последовательность (5' → 3') <sup>a</sup>	$T_m$ , <sup>b</sup> °C
F390/R390	F: CGAGTCTATGTAACATAGAGAA R: TACTTGATCCCCCTTATTATAT	50 50
F337.1/R337.1	F: ATTATCAACTGAGGGTCAAAAA R: CGGTAGACTATAAATTGCTTTC	51 51
F334/R334	F: AATTTAATTACTTCTTACACAT R: CCAATTTTATATCTTTAGAAAG	46 45
F304/R304	F: TAAGGCAATATGATGGATTTAC R: CAATCTATACTGACTATGGGTT	51 50
F299/R299	F: CCATCATATTGCCTTATGATCT R: TCTTATCATTTGGTAGCACAAGT	53 54
F344/R344	F: GTGCTACCAATGATAAGAAAA R: CTCTGTTTACTTTCTAGCTTTG	52 50
F381/R381	F: AAAAAACCACAAGCATGGGCA R: GAGGTTGGGCGTGTTCAACT	59 61
RT_147F/R	F: TCTGGTGGGACAAGCAGCTC R: GGCAGCTCGATGTCAACCTCA	60 61

*Примечание:* <sup>a</sup> F – прямой праймер, R – обратный праймер. <sup>b</sup> Температура плавления.  
*Note:* <sup>a</sup> F – forward primer, R – reverse primer. <sup>b</sup> Melting temperature.

генотипы, а четыре – как чувствительные, выявлен ампликон размером ~390 п.н., что соответствует ожидаемым размерам экзона-1 (рис. 2).

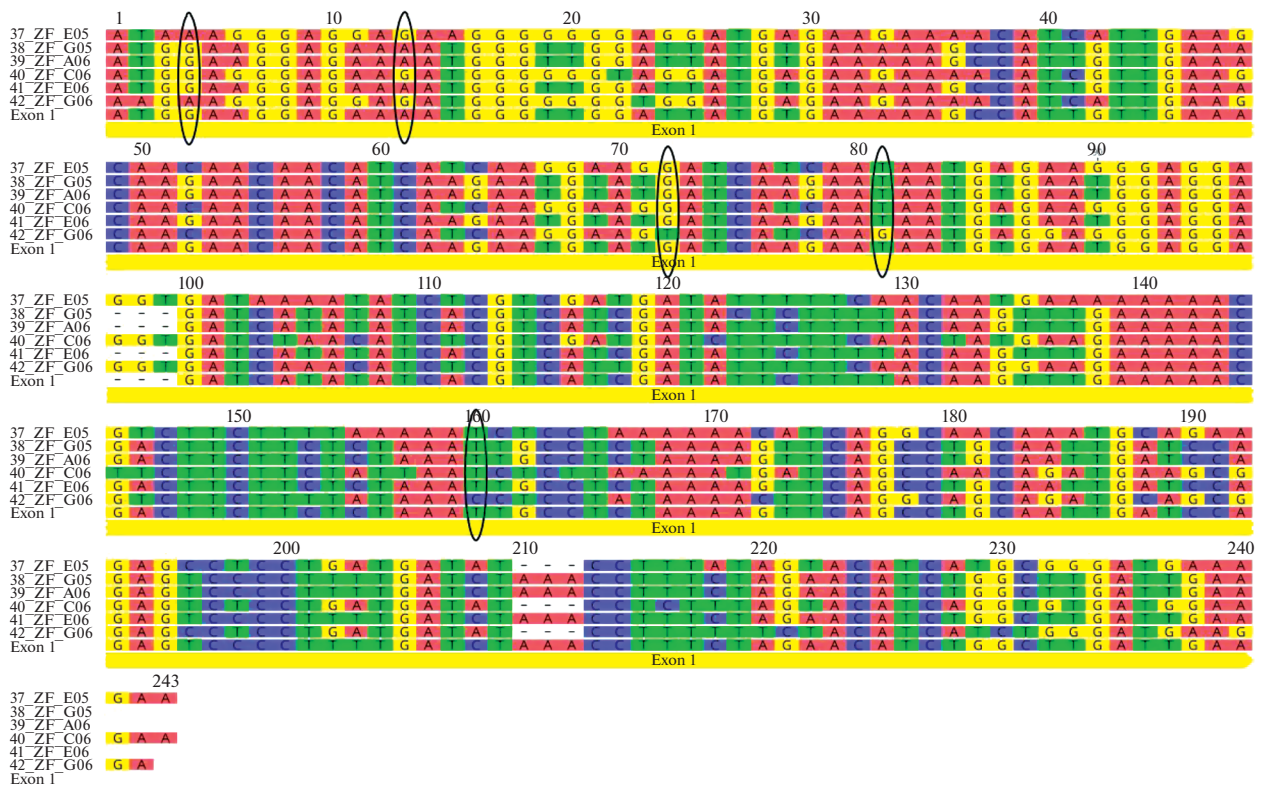


**Рис. 2.** Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймера 390F/R. Дорожки 1–6: МС 94-Ар, МС 2113, МС ЛБС16, О-тип ЛБО17, ОП 15676 и ОП 010 соответственно (устойчивые растения-регенеранты); дорожки 7–10: МС 2093, МС Перла, ОП 14044 и ОП 15465 соответственно (чувствительные растения-регенеранты). М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п.н. (Thermo Fisher Scientific). К – отрицательный контроль (стерильная вода вместо ДНК).

**Fig. 2.** Analysis of DNA-fragments amplified with primer 390F/R. Sample designations: 1–6: MS 94-Ar, MS 2113, MS LBS16, Owen-type LBO17, Pollinator 15676 and Pollinator 010, respectively (resistant regenerated plants); 7–10: MS 2093, MS Perla, Pollinator 14044 and Pollinator 15465, respectively (susceptible regenerated plants). M – GeneRuler™ DNA molecular weight marker, 100–3000 bp (Thermo Fisher Scientific); K – negative control (PCR mixture without DNA).

Все генотипы характеризовались наличием искомого ДНК-фрагмента длиной ~390 п.н. Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), которыми различаются устойчивые и чувствительные генотипы, некоторые из полученных ампликонов были выделены и просеквенированы. Результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей экзона-1 с контрольным образцом (GenBank No. HQ709091.1 NCBI) приведены на рис. 3. Анализ проводили в программе Geneious Prime (<https://www.geneious.com/prime/>).

В результате анализа биоинформатических данных, полученных в программе Geneious Prime, установлен гипотетический вариант трансляции нуклеотидной последовательности экзона-1 с нуклеотидными заменами, вставками и делециями. Установлено, какие SNPs могут быть значимыми (несинонимичными), то есть приводящими к изменению аминокислотной последовательности в кодируемых полипептидах. Например, замена G/A в позиции 11 приводит к замещению аминокислоты глицина (G) на глутаминовую кислоту (E); SNP в позиции 184 (A/G) вызывает замену: аспарагин (N) – изолейцин (I) – аспарагиновая кислота (D); однонуклеотидный полиморфизм в позиции 41 (C/T) замещает лейцин (L) на серин (S); SNP в позиции 90 (G/T) в образце 37 вызывает замену аспарагина (N) на лизин (K), та же замена в той же позиции в генотипе 42 меняет аспарагин (N) на глутаминовую кислоту (E). Замена же G/A в позиции 33 относится к синонимичной и, следова-



**Рис. 3.** Выравнивание последовательностей экзона-1 между устойчивыми образцами: №№ 2, 3, 5, 6 (соответствуют последовательностям 37–40) – и чувствительными: №№ 9, 10 (последовательности 41, 42 соответственно). Exon 1 – аннотированная нуклеотидная последовательность HQ709091.1 (NCBI). Овалами выделены некоторые SNPs.

**Fig. 3.** Fragment of alignment of exon 1 sequences for resistance samples: 2, 3, 5, 6 (sequences 37–40, respectively), and susceptible ones: 9, 10 (41, 42, respectively). Exon 1 is annotated nucleotide sequence HQ709091.1 (NCBI). Some SNPs are marked with ovals.

тельно, не приводит к замене лизина (К) в аминокислотной последовательности экзона-1 (рис. 4).

На приведенном рисунке видны несинонимичные SNPs, которые приводят к замене аминокислоты в кодируемом полипептиде, и синонимичные SNPs, не вызывающие изменений в аминокислотном составе белка, кодируемого геном *MTP4*. На основании результатов биоинформатического анализа полученных последовательностей экзона-1 видно, что генетически близки образцы №№ 2, 6 и 10.

В табл. 2 в качестве примера приведены дедуктивные аминокислотные последовательности экзона-1, полученные при помощи биоинформатической программы Geneious Prime, для образцов сахарной свеклы с разной устойчивостью к металлам.

При сравнении генотипов обнаружен высокий полиморфизм практически во всех экзонах, за исключением экзона-6 (рис. 5). В нем выявлена одна вставка и три SNPs: T/C, G/T и T/C – в позициях 30, 60 и 96 соответственно.

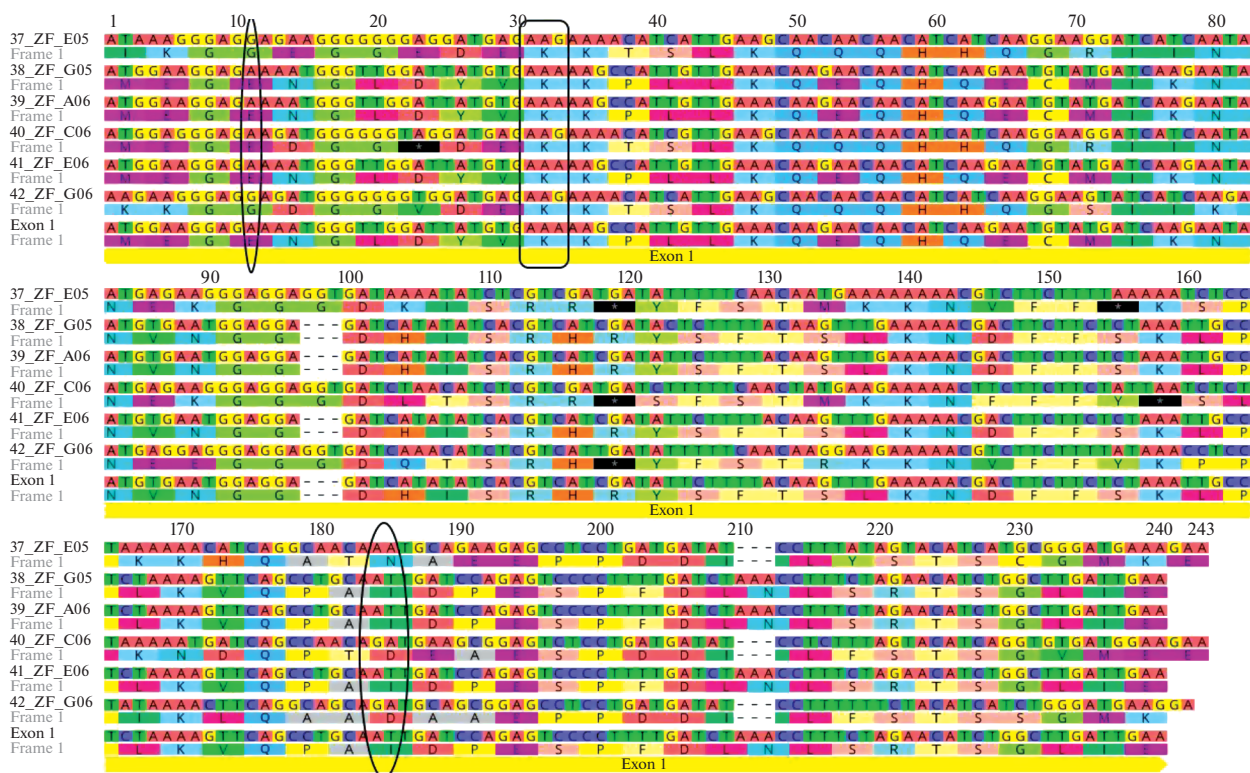
Все три однонуклеотидные замены в экзоне-6 оказались синонимичными (рис. 6).

В табл. 3 в качестве примера приведены аминокислотные последовательности экзона-6 для

образцов сахарной свеклы с разной устойчивостью к металлам.

Далее методом ПЦР в реальном времени с использованием пары праймеров RT\_147F/R оценили уровень экспрессии гена *MTP4*. Какой-либо четкой корреляции показателей экспрессии между резистентными и чувствительными к ионам кадмия образцами не обнаружено (рис. 7). Возможно, это связано с тем, что некоторые белки семейства МТР могут компенсировать отсутствие родственных белков или работают не как самостоятельные единицы, а в кооперации с другими, обеспечивая стабильную устойчивость растения к тяжелым металлам.

С использованием семи пар экзонспецифичных праймеров нами проанализирован полиморфизм всех семи экзонов гена *MTP4* сахарной свеклы. Идентифицированы однонуклеотидные полиморфизмы и получены дедуктивные аминокислотные последовательности, кодируемые полиморфными вариантами экзонов этого гена. Методом ПЦР в реальном времени оценен относительный уровень транскриптов гена *MTP4* в изучаемых образцах.



**Рис. 4.** Дедуктивные аминокислотные последовательности, кодируемые полиморфными вариантами экзона-1 гена *MTP4*. Устойчивые образцы – №№ 2, 3, 5, 6 (37–40 соответственно); чувствительные – №№ 9, 10 (41, 42 соответственно). Exon 1 – аннотированная нуклеотидная последовательность HQ709091.1 (NCBI). Овалами выделены некоторые идентифицированные аминокислотные замены. Прямоугольником выделен фрагмент, где не происходит замены аминокислоты, несмотря на наличие SNP.

**Fig. 4.** Deductive amino acid sequences encoded by polymorphic variants of exon 1 of the *MTP4* gene. Samples 2, 3, 5, 6 (37–40, respectively) are resistant plants; samples 9 and 10 (41 and 42, respectively) are susceptible ones. Exon 1 is annotated nucleotide sequence HQ709091.1 (NCBI). Ovals highlight some amino acid substitutions identified. A fragment of non-substitution amino acid (in the presence of SNP) is marked with a rectangle.

На основании результатов, полученных в ходе проведенного молекулярно-биологического и биоинформатического анализа, можно предположить, что ген *MTP4* не является самостоятельной единицей (моногеном). Анализ экспрессии изучаемого гена не позволил провести четкое ранжирование растений сахарной свеклы на резистентные и вос-

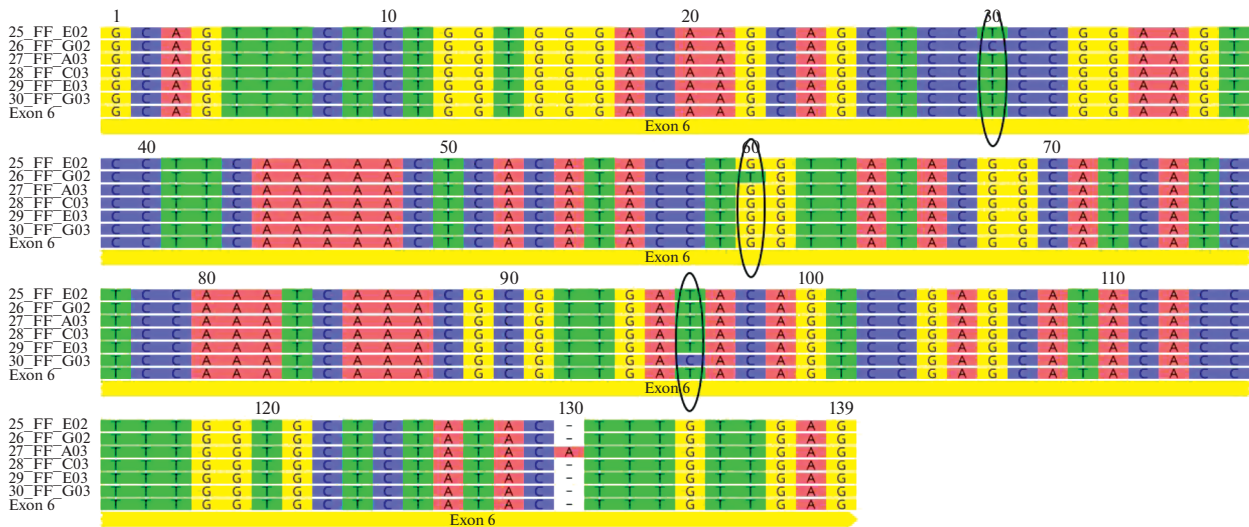
приимчивые генотипы. Следовательно, если кодируемый этим геном белок, МРТ4, и вносит вклад в резистентность растений сахарной свеклы к тяжелым металлам, то, по-видимому, в tandem с другими членами семейства МТР. Вместе с тем, в дальнейшем мы планируем продолжить изучение генетического полиморфизма и экспрессии дру-

**Таблица 2.** Сравнение аминокислотного состава экзона-1 гена *MTP4* в образцах сахарной свеклы с разной устойчивостью к металлам

**Table 2.** Comparison of amino acid composition of exon 1 of *MTP4* gene in sugar beet samples with different metal resistance

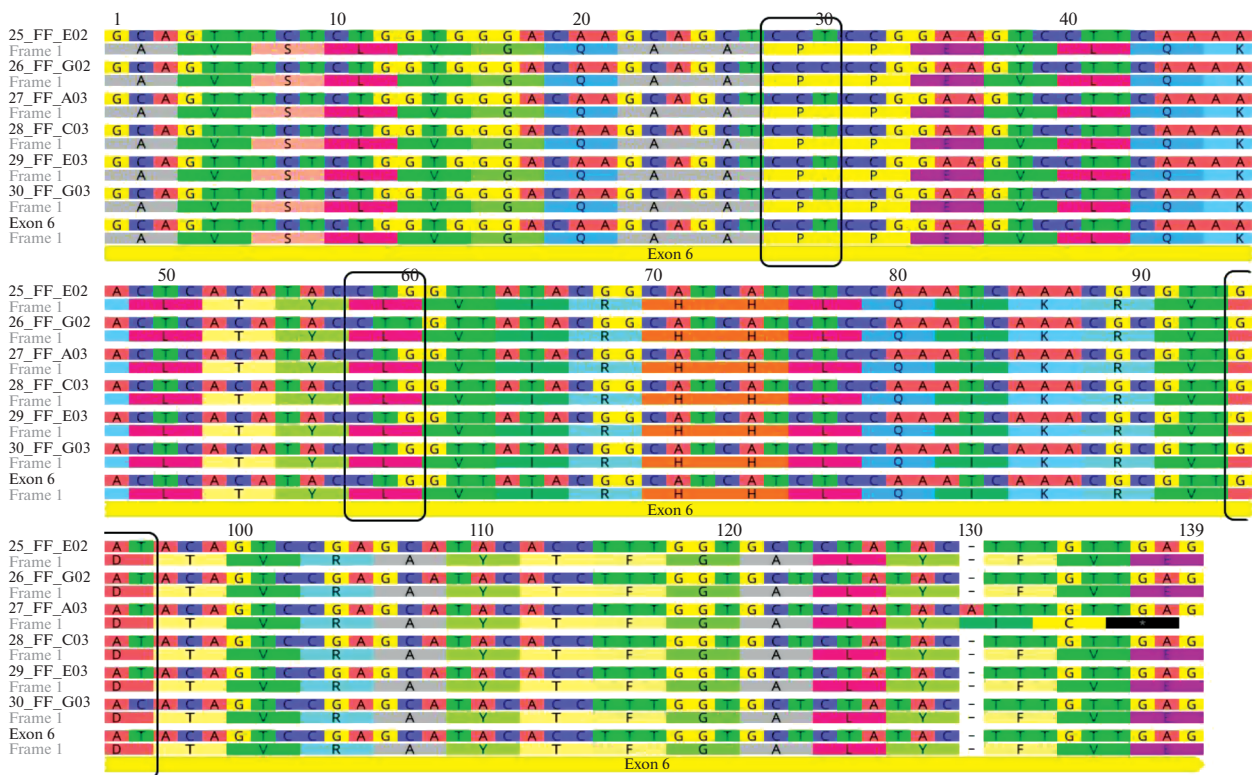
Образец <sup>а</sup>	Генотип	Аминокислотная последовательность (экзон-1)
№ 2 (37)	Устойчивый	IKGGEGGEDEKKTSLKQQQHHQGRINNEKGGGDKISRRYFST MKKNVFFKSPKKHQATNAEPPDDILYSTSCGMKE
№ 9 (41)	Чувствительный	MEGENGLDYVKKPLLKQEQHQECMIKNNVNGGDHISRHRYSFT SLKNDFFSKLPLKVQPAIDPESPFDLNLSRTSGLIE
Exon 1 (HQ709091.1)	Чувствительный	MEGENGLDYVKKPLLKQEQHQECMIKNNVNGGDHISRHRYSFT SLKNDFFSKLPLKVQPAIDPESPFDLNLSRTSGLIE

Примечание: <sup>а</sup>В скобках указан номер последовательности, соответствующий указанному на рис. 3 и 4.  
 Note: <sup>а</sup>The sequence number in parentheses corresponds to that shown in Fig. 3 and 4.



**Рис. 5.** Локализация SNPs в экзоне-6 гена *MTP4*. Устойчивые образцы – №№ 2, 3, 5, 6 (25–28 соответственно), чувствительные – №№ 9 и 10 (29 и 30 соответственно). Exon 6 – аннотированная нуклеотидная последовательность No. HQ709091.1 (NCBI). Овалами выделены SNPs.

**Fig. 5.** Localization of SNPs in exon 6 of the *MTP4* gene. Samples 2, 3, 5, 6 (25–28, respectively) are resistant ones, while samples 9 and 10 (29 and 30, respectively) are susceptible. Exon 6 is annotated nucleotide sequence Acc. No.HQ709091.1 (NCBI). SNPs are marked with ovals.



**Рис. 6.** Дедуктивные аминокислотные последовательности, кодируемые полиморфными вариантами экзона-6 гена *MTP4*. Устойчивые образцы – №№ 2, 3, 5, 6 (25–28 соответственно), чувствительные – №№ 9 и 10 (29 и 30 соответственно). Аминокислотная последовательность Exon 6 кодируется аннотированной нуклеотидной последовательностью No. HQ709091.1 (NCBI). Прямоугольниками выделены фрагменты, где не происходит замены аминокислоты (при наличии SNP).

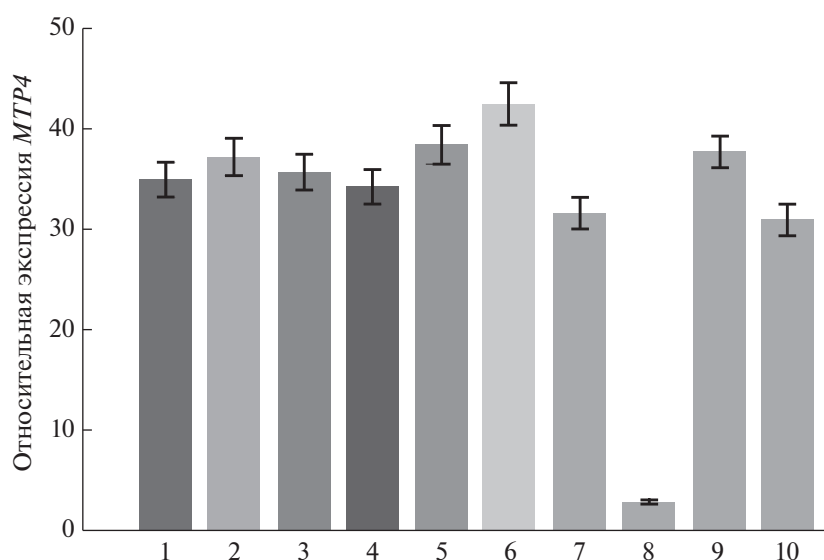
**Fig. 6.** Deducative amino acid sequences encoded by polymorphic variants of exon 6 of the *MTP4* gene. Samples 2, 3, 5, 6 (25–28, respectively) are resistant ones, while samples 9 and 10 (29 and 30, respectively) are susceptible. The amino acid sequence of Exon 6 is encoded by the annotated nucleotide sequence No. HQ709091.1 (NCBI). Rectangles indicate fragments where no amino acid substitution occurs (when SNPs are present).

**Таблица 3.** Сравнение аминокислотного состава экзона-6 гена *MTP4* в образцах сахарной свеклы с разной устойчивостью к металлам**Table 3.** Comparison of amino acid composition of exon 6 of *MTP4* gene in sugar beet samples with different metal resistance

Образец <sup>a</sup>	Генотип	Аминокислотная последовательность (экзон-6) <sup>b</sup>
№ 2 (25)	Устойчивый	AVSLVGQAAPPEVLQKLTYLVRHHLQIKRVDTVRAITFCALYFVE
№ 9 (29)	Чувствительный	AVSLVGQAAPPEVLQKLTYLVRHHLQIKRVDTVRAITFCALYFVE
Exon 6 (HQ709091.1)	Чувствительный	AVSLVGQAAPPEVLQKLTYLVRHHLQIKRVDTVRAITFCALYFVE

*Примечание:* <sup>a</sup> В скобках указан номер последовательности, соответствующий указанному на рис. 5 и 6. <sup>b</sup> Жирным шрифтом выделены аминокислоты, кодируемые SNPs с синонимичными заменами.

*Note:* <sup>a</sup> The sequence number in parentheses corresponds to that shown in Fig. 5 и 6. <sup>b</sup> The amino acids encoded by SNPs with synonymous substitutions are shown in bold.



**Рис. 7.** Экспрессия гена *MTP4* образцов сахарной свеклы с разной устойчивостью к тяжелым металлам. Образцы 1–6 – устойчивые генотипы, 7–10 – чувствительные генотипы.

**Fig. 7.** *MTP4* gene expression of sugar beet samples with different resistance to heavy metals. Samples 1–6 are resistant genotype, samples 7–10 are susceptible.

гих членов этого семейства генов, в частности *MTP1* и *MTP2*, для оценки их вклада в формирование устойчивости растений сахарной свеклы к тяжелым металлам.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yolcu S., Alavilli H., Ganesh P., Asif M., Kumar M., Song K. An insight into the abiotic stress responses of cultivated beets (*Beta vulgaris* L.). *Plants*, 2022, 11(1), 12. <https://doi.org/10.3390/plants11010012>
2. Carrillo-Chavez A., Salas-Megchun E., Levresse G., Munoz-Torres C., Perez-Arvizu O., Gerke T. Geochemistry and mineralogy of mine-waste material from a “skarn-type” deposit in central Mexico: modeling geochemical controls of metals in the surface environment. *J. Geochem. Explor.*, 2014, 144, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.03.017>
3. Capdevila M., Bofill R., Palacios O., Atrian S. State-of-art of metallothioneins at the beginning of the 21<sup>st</sup> century. *Coord. Chem. Rev.*, 2012, 256, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.006>
4. Протасова Н.А., Горбунова Н.С. Формы соединений цинка, никеля, свинца и кадмия в обыкновенных черноземах Каменной степи при длительном применении удобрений и фосфогипса. *Агрехимия*, 2010, 5, 90–99.
5. Viehweger K. How plants cope with heavy metals. *Bot. Stud.*, 2014, 55, 35. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
6. Khan M., Castro-Guerrero N., Mendoza-Cozatl D. Moving toward a precise nutrition: preferential loading of seeds with essential nutrients over nonessential toxic elements. *Plant Sci.*, 2014, 5, 51. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00051>
7. Yazici M.A., Asif M., Tutus Y., Ortas I., Ozturk L., Lambers H., Cakmak I. Reduced root mycorrhizal colonization as affected by phosphorus fertilization is responsible for high cadmium accumulation in wheat. *Plant Soil*, 2021, 468, 19–35. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05041-5>
8. Gallego S., Pena L., Barcia R., Azpilicueta C., Iannone M., Rosales E., Zawoznik M., Groppa M., Benavides M. Un-



- ravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Bot.*, 2012, 83, 33–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>
9. Larbi A., Morales F., Abadía A., Gogorcena Y., Lucena J., Abadía J. Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. *Funct. Plant Biol.*, 2002, 29, 1453–1464.  
<https://doi.org/10.1071/FP02090>
  10. Pal R., Rai J. Phytochelatin: Peptides involved in heavy metal detoxification. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 160, 945–963.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8565-4>
  11. Li W., Pang S., Lu Z., Jin B. Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants. *Plants*, 2020, 9(11), 1515.  
<https://doi.org/10.3390/plants9111515>
  12. Papazoglou E.G., Fernando A.L. Preliminary studies on the growth, tolerance and phytoremediation ability of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) grown on heavy metal contaminated soil. *Ind. Crop. Prod.*, 2017, 107, 463–471.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.051>
  13. Haque M., Tasnim J., El-Shehawi A., Rahman M., Parvez M., Ahmed B., Kabir A. The Cd-induced morphological and photosynthetic disruption is related to the reduced Fe status and increased oxidative injuries in sugar beet AFM. *Plant Physiol. Biochem.*, 2021, 166, 448–458.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.020>
  14. Du J., Wang L., Zhang X. Heterologous expression of two *Physcomitrella patens* group 3 late embryogenesis abundant protein (LEA3) genes confers salinity tolerance in *Arabidopsis*. *J. Plant Biol.*, 2016, 59, 182–193.  
<https://doi.org/10.1007/s12374-016-0565-7>
  15. Greger M., Johansson M. Cadmium effects on leaf transpiration of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.*, 1992, 86, 465–473.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb01345.x>
  16. Greger M., Bertell G. Effect of Ca<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on the carbohydrate metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris*). *J. Exp. Bot.*, 1992, 43, 167–173.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/43.2.167>
  17. Erbasol I., Bozdog O., Koc A., Pedas P., Karakaya H. Characterization of two genes encoding metal tolerance proteins from *Beta vulgaris* subspecies *maritima* that confers manganese tolerance in yeast. *BioMetals*, 2013, 26(5), 795–804.  
<https://doi.org/10.1007/s10534-013-9658-7>
  18. Migocka M., Kosieradzka A., Papierniak A., Maciaszczyk-Dziubinska E., Posyniak E., Garbiec A., Filleur S. Two metal-tolerance proteins, MTP1 and MTP4, are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells. *J. Exp. Bot.*, 2015, 66(3), 1001–1015.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru459>
  19. Delhaize E., Gruber D., Pittman K, White G., Leung H., Miao Y., Jiang L., Ryan R., Richardson E. A role for the *AtMTP11* gene of *Arabidopsis* in manganese transport and tolerance. *Plant J.*, 2007, 51(2), 198–210.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03138.x>
  20. Ricachenevsky F., Menguer P., Sperotto R., Williams L., Fett J. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. *Front. Plant Sci.*, 2013, 4, 144.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00144>
  21. Gustin J.L., Zanis M.J., Salt D.E. Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC Evol. Biol.*, 2011, 11, 76.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-76>
  22. Raia M., Kaliaa R., Singha R., Gangolaa M., Dhawana A. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.*, 2011, 71, 89–98.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.021>
  23. Gamborg O., Constabel F., Shyluk I. Organogenesis in callus from shoot apical of *Pisum sativum* L. *Physiol. Plant.*, 1974, 30, 125–128.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1974.tb05003.x>

## Variations in the Nucleotide Sequence of *MTP4* in Sugar Beet Regenerated Plants

A. A. Nalbandyan<sup>a, #</sup>, A. S. Hussein<sup>a</sup>, N. R. Mikheeva<sup>a</sup>, T. S. Rudenko<sup>a</sup>, and N. N. Cherkasova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar,  
 Voronezh oblast, Ramonskii region, VNIISS settl., 396030 Russia

<sup>#</sup>e-mail: arpnal@rambler.ru

**Abstract**—The molecular variations of seven exons of the metal tolerance protein 4 (*MTP4*) gene and the correlation between this gene expression level and the resistance/susceptibility of sugar beet genotypes to cadmium have been studied. *MTP4* is located on chromosome 3 and is associated with the resistance of sugar beet plants to heavy metals. Plant microclones grown *in vitro* on a selective medium with cadmium ions at a concentration of 6 mM were objects of the study, and cadmium acetate Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> served as a selective agent. Resistant and susceptible microclones were selected by morphological traits in *in vitro* culture. For a classical PCR variant, seven exon-specific primer pairs were used; as a result, DNA amplicons sized ~390, 381, 344, 299, 304, 334 and 337 bp were obtained. The relative expression level in the analyzed samples was assessed using real-time PCR and one of the primer pairs. Using the Snap Gene and Geneious Prime bioinformatic tools, single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions and deletions in the *MTP4* gene were determined, and deductive amino acid sequences encoded by the polymorphic exons of the gene under study were obtained. Using exon 1, the phylogenetic proximity of samples 2 (MC 2113), 6 (ОП 010) and 10 (ОП 15465) was shown. A high polymorphism level was demonstrated in all exons except exon 6 where only one insertion and three synonymous SNPs (T/C; G/T; T/C at positions 30, 60 and 96, respectively) were found. A clear correlation between the expression level of the *MTP4* gene exons and the plant resistance to cadmium was not observed.

**Keywords:** sugar beet, heavy metals, *MTP4* gene, SNP