

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *Myb114* У КУЛЬТУР ВИДА КАПУСТА ОГОРОДНАЯ (*Brassica oleracea* L.) В СВЯЗИ С РЕГУЛЯЦИЕЙ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ НА ОСНОВЕ СРАВНЕНИЯ С МЫВ-ФАКТОРАМИ ОВОЩНЫХ ПАСЛЕНОВЫХ КУЛЬТУР

© 2023 г. Д. А. Фатеев¹, *, Ф. А. Беренсен¹, А. М. Артемьева¹, О. Г. Бабак²,
К. К. Яцевич², Е. В. Дрозд², А. В. Кильчевский²

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений
им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, 190000 Россия

²Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

*e-mail: fateevdm1@gmail.com

Поступила в редакцию 09.02.2022 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 05.04.2022 г.

С целью изучения механизма регуляции одного из древнейших у растений процессов биосинтеза антоцианов, на основе сравнения генов R2R3-MYB транскрипционных факторов (ТФ) у пасленовых (*S. lycopersicum*: *An1*, *An2*; *S. melongena*: *Myb1*; *C. annuum*: *Myb113-like1* и *Myb113-like2*) и капустных культур выполнен поиск ортологических последовательностей у *Brassica oleracea*. Выявлена наиболее близкая по нуклеотидной структуре к ранее изученным генам у пасленовых последовательность, кодирующая MYB114 ТФ. Подобраны праймеры и выполнен сравнительный анализ последовательностей гена *Myb114* у овощных культур *B. oleracea* (разновидности капуста белокочанная, краснокочанная, листовая, цветная, брокколи, кольраби) с широким внутривидовым разнообразием по накоплению антоцианов в листьях и различных продуктивных органах — кочанах, головках (соцветиях) и стеблеплодах. По результатам выравнивания последовательностей *Myb114* выявлен ряд однонуклеотидных замен, тесно коррелирующих с высоким накоплением антоцианов в листьях *B. oleracea*, включающих 3 SNP в экзонных областях и делецию в первом интроне размером 271 пн. Выявленные SNP ведут к замене двух аминокислот, расположенных в области ДНК-связывающих доменов, что приводит к изменению эффективности связывания данного транскрипционного фактора с промоторами структурных генов биосинтеза и снижению уровня их экспрессии у форм без антоциана в листьях по сравнению с формами с его накоплением в вегетативных частях растений. Предложен молекулярный маркер MYB114.2, который может быть использован для идентификации кочанных и листовых капуст с высоким/низким накоплением антоцианов. По аминокислотной структуре и фенотипическому проявлению (регуляция накопления антоцианов в листьях) *Myb114 B. oleracea* наиболее близок к аллелям *Ant2* томата, *Myb2* баклажана и *Myb113-like2* перца. Установлена высокая степень консерватизма SANT ДНК-связывающих доменов ТФ MYB114 *B. oleracea* и R2R3-MYB транскрипционных факторов овощных пасленовых культур.

Ключевые слова: разновидности капусты *Brassica oleracea*, род *Solanum*, биосинтез антоцианов, R2R3-MYB транскрипционные факторы, домены ТФ, секвенирование, ДНК-маркеры.

DOI: 10.31857/S0016675823010046, **EDN:** CLOYTD

Антоцианы представляют собой водорастворимые пигменты, синтезируемые в ходе фенилпропаноидного пути, участвующего во вторичном метаболизме растений; антоцианы придают растениям яркую окраску, защищают их от биотических и абиотических стрессов [1, 2]. Как составной элемент продуктов питания антоцианы необходимы для повседневного потребления населением, так как они обладают антиоксидантной активностью, бактерицидным действием, улучшают строение волокон и клеток соединительной

ткани, препятствуют повреждению мембран клеток [3, 4].

Механизм биосинтеза и регуляции антоцианов хорошо изучен на модельных растениях, таких как арабидопсис, кукуруза, пшеница, пасленовые [5–7], а также на плодовых яблоне, груше, клубнике и персике [8]. В исследованиях генетических и молекулярных механизмов биосинтеза антоцианов в растениях показано, что данный процесс состоит из трех основных этапов [8].

Первый — метаболизм фенилпропаноидов — предшественников флавоноидов, включая фенилаланинаммиаклиазу (PAL), циннамат-4-гидроксилазу (C4H) и 4-кумарат. Второй, ранний этап включает образование халконсинтазы (CHS), халконизомеразы (CHI), флаванон-3-гидроксилазы (F3H), флаванон-3'-гидроксилазы (F3'H) и флавонолсинтазы (FLS), которые являются предшественниками флавонолов и антоцианов [9]. Третий, поздний этап биосинтеза приводит к синтезу и модификации антоцианов посредством процессинга дигидрофлавонол-4-редуктазы (DFR), антоцианидинсинтазы (ANS), УДФ-глюкозилтрансферазы (UGT) и ацилтрансферазы (AT) [5]. Конкуренция флавонолсинтазы и дигидрофлавонол-4-редуктазы приводит к образованию либо флавонолов, либо антоцианов [2].

Функциональные факторы транскрипции R2R3-MYB (такие как MYB11, MYB12 и MYB111) обычно участвуют в прямой активации генов раннего биосинтеза CHS, CHI, F3H, F3'H и FLS. Поздние гены биосинтеза DFR, ANS, UGTs и ATs активируются тройным комплексом MYB-bHLH-WD40 (MBW), который образован фактором R2R3-MYB, под контролем регуляторного комплекса, называемого MYB-bHLH-WD40 (MBW) [10]. Эти регуляторы или комплексы способны связываться с промоторами генов биосинтеза антоцианов и активировать их экспрессию; регуляторная сеть биосинтеза флавоноидов обычно функционирует как механизм положительной обратной связи с участием и взаимодействием как положительных, так и отрицательных регуляторов, управляя накоплением и восстановлением антоцианина или проантоцианидина [11]. У арабидопсиса в формировании комплекса MBW в основном участвуют следующие позитивные регуляторы: R2R3-MYB AtPAP1, AtPAP2, AtMYB113, AtMYB114 и AtTT2; bHLH AtTT8, AtEGL3 и AtGL3 [10]; комплекс MBW, образованный AtTT2, AtTT8 и AtTTG1, стимулирует выработку проантоцианидина в семенах арабидопсиса [12].

У пасленовых механизм биосинтеза и деградации антоцианов изучен достаточно хорошо. При этом исследований по полиморфизму аллелей, кодирующих транскрипционные факторы, очень мало.

Сравнительный анализ ряда последовательностей генов R2R3-MYB ТФ у пасленовых [13] позволил выявить наиболее близкие к *Ant1 Solanum lycopersicum* по нуклеотидному составу последовательности *Myb113-like1* и *Myb113-like2* у *Capsicum annuum*, а также *Myb1* у *Solanum melongena*. Были установлены SNP данных генов, приводящие к изменению структуры кодируемого белка и нарушению процесса биосинтеза антоцианов в плодах и вегетативных органах. Так, выявлена однонуклеотидная делеция в третьем экзоне фактора *Myb113-*

like1, приводящая к сдвигу рамки считывания с появлением стоп-кодона и синтезу усеченного белка. В гене *Myb1* найдены делеция в 26 пн, вызывающая выпадение экзона 2 из зрелой мРНК при ее сплайсинге и сдвиг рамки считывания с образованием стоп-кодона, как следствие — синтез нефункционального белка, а также делеция размером 6 пн, приводящая к выпадению двух аминокислот в белке (сокращению области первого ДНК-связывающего домена SANT). Наряду с мутациями, вызывающими структурные изменения белков, показана связь с отдельными SNP в гене *Myb113-like2*.

Исследования антоцианов у представителей рода *Brassica* L. в основном были сосредоточены на идентификации компонентов, картировании и оценке уровня экспрессии генов биосинтеза антоцианов. Картирование показало, что антоциановая окраска является доминирующим признаком; однако локусы различаются у видов и разновидностей *Brassica*. У фиолетовой цветной капусты *B. oleracea* L. var. *botrytis* окраска контролируется *BoMYB2* [14]; у краснокочанной капусты *B. oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* — *BoMYB2* или *BoMYBL2.1* [15, 16]; у кольраби *B. oleracea* L. var. *gongylodes* — *BoPAP2* и *BoTT8* [17]; у пурпурной капусты цикайтай *B. rapa* L. ssp. *chinensis* var. *purpurea* — *BrbHLH49*, *BrEGL3.2* и *BrMYBL2.1* [18]; у китайской капусты пак-чой *B. rapa* L. ssp. *chinensis* — *BrMYB73* [19]; у фиолетовой горчицы сарептской *B. juncea* — *BjP11* [18]; у горчицы пурпурной опухолевидной *B. juncea* var. *tumida* Tsen et Lee — *BjTT8* [20, 21].

Цель настоящей работы — изучить полиморфизм гена *Myb114* у разновидностей капусты огородной (*B. oleracea*) с различным накоплением антоцианов в продуктивных органах для расширения понимания теоретической основы регуляции процесса биосинтеза антоцианов у капустных культур, а также для разработки молекулярных маркеров, связанных с нарушением/активацией синтеза антоцианов с целью использования в селекции форм с различным содержанием антоцианов; установить степень консерватизма механизма регуляции биосинтеза антоцианов путем сравнения генетических и белковых последовательностей, структуры ДНК-связывающих доменов у двух отдаленных семейств — пасленовых и капустных для получения нового представления о механизме биосинтеза антоцианов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили образцы *B. oleracea* из коллекции ФГБНУ ФИЦ Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Выборка включала три образца белокочанной капусты: СГВ 0417 F₁ (вр.к-2276, Швейцария), Сахарная гора F₁ (вр.к-

Таблица 1. Праймеры, разработанные для секвенирования гена *Myb114*

Праймер	Нуклеотидная последовательность	<i>t</i> отжига, °C	ПЦР-продукт, пн	Примечание
BrMYB114.1F	TCAAGGGAGACCAAGAACC	53.7	679	Часть экзона 1
BrMYB114.1R	CATCGCCTCAAGAGACTATC	56.0		
BrMYB114.2F	TCACTGCCTATGTCCCTCAC	56.6	995	Часть экзона 1, интрон 1, часть экзона 2
BrMYB114.2R	GCCATCTTAGTCTACAACCTTTCC	57.8		
BrMYB114.3F	AGGTGTAGGAAGAGTTGTAG	51.3	483	Часть экзона 2, интрон 2, часть экзона 3
BrMYB114.3R	TGTTGTTGAGTCCAAGGC	52.1		
BrMYB114.4F	ACATTCTCTTCTACCACACC	52.2	649	Часть экзона 3
BrMYB114.4R	AAACAGACGCTCTCACC	53.1		

2287, Россия), Derbent F₁ (вр.к-2316, Франция), пять образцов краснокочанной капусты: Михневская (к-175, Россия), Реску F₁ (вр.к-198, Швейцария), Pretino F₁ (вр.к-200, Япония), Mohrenkopf (вр.к-201, Турция), Прометей F₁ (вр.к-202, Россия), два образца листовой капусты: Di Wang (вр.к-265, Китай) с антоциановой окраской верхушечных листьев, Verza alta (вр.к-300, Испания) с зелеными листьями, два образца цветной капусты: Барбара F₁ (вр.к-1021, Россия) с белой головкой, Graffiti (к-974, Нидерланды) с ярко-фиолетовой головкой, два образца брокколи: Summer Purple (вр.к-358, Швеция) со светло-фиолетовыми головками и Kuba F₁ (вр.к-364, Франция) с зеленой головкой, два образца кольраби: China KRRN1 (к-286, Нидерланды) с бледно-зеленым стеблеплодом и Szentesi folias kek (к-284, Венгрия) с фиолетовым стеблеплодом. Изучаемые образцы характеризовались широким фенотипическим полиморфизмом по признаку накопления антоцианов в листьях и продуктовых органах.

Биохимический анализ осуществляли в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР. Антоцианы извлечены экстракцией раствором 1%-ной соляной кислоты с последующим спектрофотометрированием при длине волны 510 нм, в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид (453 нм). Для внесения поправки на содержание зеленых пигментов одновременно определяли оптическую плотность полученных экстрактов при 657 нм. Абсорбция была измерена на спектрофотометре Ultrospec II.

Выделение ДНК проводили при помощи набора Сорб-ГМО-Б (Синтол) из молодых листьев растений согласно рекомендациям производителя (для выделения ДНК используются кремниевый сорбент и ионный детергент СТАВ). Количество ДНК в образце определяли на спектрофотометре SmartSpecplus (Bio-Rad). Нуклеотидные последовательности аллелей гена *Myb114* определяли путем секвенирования, выполненного в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. Для этого

фрагменты амплификации, полученные на геномной ДНК с подобранными нами геноспецифическими праймерами (табл. 1), разделяли в 1.0%-ном агарозном геле, затем вырезали и очищали с использованием набора DNA Extraction Kit (Thermo Scientific) согласно методике производителя. Секвенирующие реакции выполняли с применением набора BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно методике производителя. Продукты секвенирующей реакции очищали спиртовым осаждением и растворяли в 20 мкл формамида, денатурировали нагреванием до 95°C в течение 2 мин и далее проводили капиллярный электрофорез с использованием ДНК-секвенатора ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, проводили с использованием программы Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems). На основе выявленного полиморфизма были подобраны праймеры (табл. 2) и на их основе проведено ДНК-типирование коллекции образцов. ПЦР-реакцию проводили в термодиклере Biometra TProfessional Basic (Германия). Реакционная ПЦР-смесь объемом 15 мкл содержала 60–100 нг геномной ДНК; 2.5 mM dNTP Mix (Thermo Scientific); 1.4 единицы Tornado DNA-полимеразы в инкубационном буфере “F” (Праймтех, Беларусь) и 0.25 пмоль/мл олигонуклеотидных праймеров (Евроген, Россия). Праймеры были разработаны с использованием программы DNAMAN (10.0; Lynnon BioSoft) и синтезированы компанией “Евроген” (Россия). Режим ПЦР был следующим: 95°C – 15 мин, затем следовало 35 циклов, состоящих из инкубаций: 99°C – 1 с, 52–58°C – 30 с и 72°C – 1 мин. Реакцию завершали при 72°C в течение 7 мин. Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000 (США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли при использовании в

Таблица 2. Идентичность генов MYB-транскрипционных факторов представителей семейств Solanaceae и *Myb114* Brassicaceae по результатам BLAST-анализа

Ген <i>Myb114</i> [<i>Brassica oleracea</i> (wild cabbage)] – GenBank: XM_013771565		
Описание видовой принадлежности гена	Область перекрытия, %	Идентичность, %
<i>Solanum melongena</i> Myb1, mRNA, complete cds	29	77.66
<i>Solanum melongena</i> cultivar Zi Chang anthocyanin R2R3-MYB transcription factor (MYB2), mRNA, complete cds	29	77.32
PREDICTED: <i>Capsicum annuum</i> transcription factor MYB113-like (LOC107844901), mRNA; <i>Myb113-like1</i>	31	75.57
<i>Capsicum annuum</i> transcription factor MYB113-like (LOC107844888), mRNA; <i>Myb113-like2</i>	30	75.00
<i>Solanum lycopersicum</i> cultivar Ailsa Craig anthocyanin 1 (ANT1), mRNA, complete cds	30	81.35
<i>Solanum lycopersicum</i> cultivar Purple Smudge MYB transcription factor AN2 (An2) gene, partial cds	19	75.59

качестве маркера молекулярной массы 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA4 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis [22], VectorNTI и Unipro UGENE [23]. Для анализа ассоциаций между однонуклеотидными заменами и содержанием антоцианов использовали программное обеспечение TASSEL 5.0 [24] на основе модели GLM.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведена работа по поиску ортологов у капустных культур к генам, кодирующим R2R3-MYB ТФ у пасленовых культур. С помощью программы Blast выполнены поиск и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ранее изученных генов Myb-факторов семейства Solanaceae: *S. lycopersicum* (MYB R2R3 ТФ: *An1*, *An2*), *S. melongena* (MYB R2R3mel ТФ: *Myb1*, *Myb2*), *C. annuum* (MYB R2R3caps ТФ: *Myb113-like1*, *Myb113-like2*) с последовательностями базы данных NCBI у *Brassica*. В результате был найден ген *Myb114* транскрипционного фактора MYB114 (XM_013771565), показывающий максимальную идентичность в области перекрытия у *B. oleracea* (табл. 2).

К данной последовательности были подобраны праймеры, полностью перекрывающие область экзонов 1–3 (табл. 1). С их помощью методом ПЦР на геномной ДНК у коллекционных образцов капусты с контрастной антоциановой окраской (см. раздел “Материалы и методы”) были получены ампликоны, которые затем секвенированы.

В результате сиквенса ампликонов были получены полные последовательности гена *Myb114* у

образцов *B. oleracea*, различающихся окраской продуктовых органов.

Путем выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей образцов *B. oleracea* с контрастным накоплением антоцианов относительно последовательности LOC106333082 выявлены следующие однонуклеотидные замены: SNP в первом экзоне, 2 SNP во втором экзоне и 2 SNP в третьем экзоне аллеля *Myb114* у сортов белокочанной капусты (рис. 1).

Наряду с SNP в экзонных областях выявлено множество однонуклеотидных замен в интронах и делеция размером в 271 пн в первом интроне у образцов белокочанной и зеленой листовой капусты. Образцы листовой капусты имели несколько уникальных однонуклеотидных замен, которые не встречались у кочанной капусты, хотя паттерн остальных однонуклеотидных замен был схож с таковым у кочанных форм. Так, образец листовой декоративной капусты Di Wang, отличающийся накоплением антоцианов в верхушечных листьях, имел нуклеотидную последовательность, схожую с краснокочанными образцами.

Аллели гена *Myb114* у изученных образцов имели разный размер (1502 пн у белокочанной, 1773 пн у краснокочанной) и содержали три экзона. По размерам экзонов аллели были идентичны, но существенно различались по размеру первого интрона.

На рис. 2 представлены результаты электрофоретической разгонки ПЦР-продукта с парой праймеров BrMYB114.2.

Оценка связи проявления признака “накопление антоцианов в продуктовых органах” с выявленными однонуклеотидными заменами аллелей гена *Myb114*, для которого были использованы данные о содержании антоцианов у 10 образцов

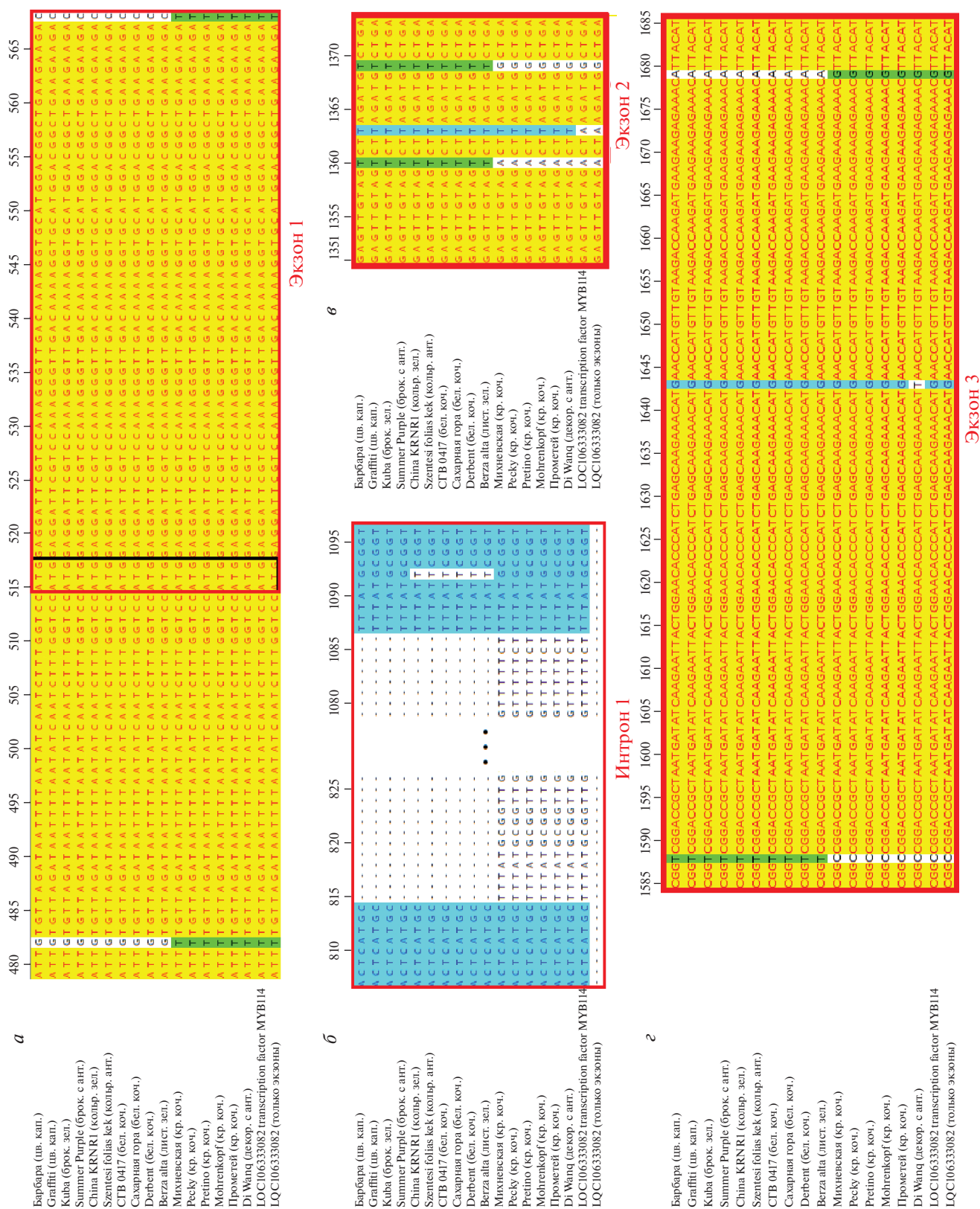


Рис. 1. Полиморфизм аллелей гена *Myb114* *B. oleracea* у форм с различным накоплением антоцианов: *а* — в первом экзоне, *б* — в первом интроне, *в* — во втором экзоне, *г* — в третьем экзоне.

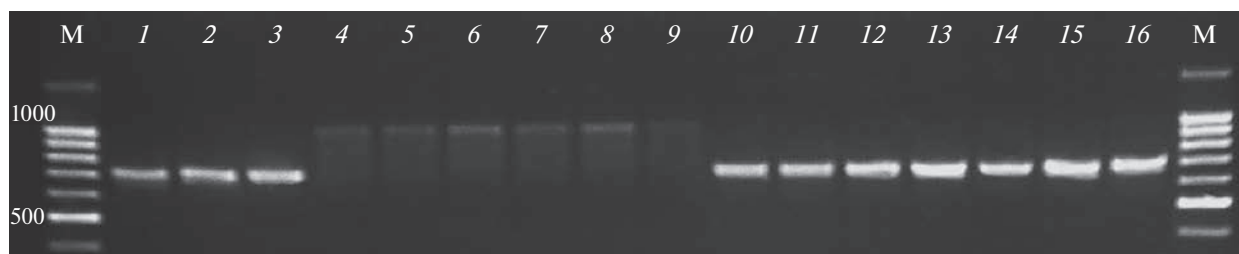


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов *B. oleracea* с праймерами BrMYB1.2. М – маркер молекулярной массы; 1 – СГВ 0417 F₁, 2 – Сахарная гора F₁, 3 – Derbent F₁, 4 – Михневская, 5 – Pecky F₁, 6 – Pretino F₁, 7 – Mohrenkopf, 8 – Прометей F₁, 9 – Di Wang, 10 – Berza alta, 11 – Барбара F₁, 12 – Graffiti, 13 – Summer Purple, 14 – Kuba F₁, 15 – China KRNRI, 16 – Szentesi folias kek.

белокочанной, краснокочанной и листовой капусты (табл. 3), выявила высокую степень сопряженности с пятью однонуклеотидными заменами в первом, втором и третьем экзонах и делецией в первом интроне (P -value 0.0001, R^2 0.65). При этом при оценке изучаемой связи только у образцов листовой и кочанной капусты уровень значимости составил 0.001, а коэффициент детерминации 0.76. При этом SNP T → C (1-й экзон) и C → T (3-й экзон) к аминокислотной замене не ведут.

Выполнен анализ влияния генетических полиморфизмов на структуру и функции синтезируемого белка. На основании полученных нуклеотидных последовательностей с помощью программы UniPro UGENE выполнено выравнивание и сравнение аминокислотных последовательностей изученных образцов и референсных последовательностей (рис. 3). Выявлены аминокислотные замены у белокочанной капусты: R → S в позиции 50, W → C в позиции 53 и V → I в позиции 125.

Таблица 3. Содержание антоцианов в продуктовых органах разновидностей капусты огородной и их связь с выявленными полиморфизмами и делецией гена *Myb114*

Наименование образца	SNP, экзон 1	SNP, экзон 2	SNP, экзон 3			Делеция, интрон 1	Окраска листьев	Антоцианы в прод. органах, мг/100 г сухого вещества
Кочанная, листовая капуста								
СГВ 0417 F ₁	C	T	T	T	A	+	Зеленая	2.16
Сахарная гора F ₁	C	T	T	T	A	+	Зеленая	3.34
Derbent F ₁	C	T	T	T	A	+	Зеленая	4.56
Михневская	T	A	G	C	G	—	Фиолетовая	2096.68
Pecky F ₁	T	A	G	C	G	—	Фиолетовая	3349.65
Pretino F ₁	T	A	G	C	G	—	Фиолетовая	1181.18
Mohrenkopf	T	A	G	C	G	—	Фиолетовая	2586.56
Прометей F ₁	T	A	G	C	G	—	Фиолетовая	1768.34
Di Wang	T	A	G	C	G	—	Фиолетовая	945.73
Berza alta	C	T	T	T	A	+	Зеленая	13.37
Цветная, брокколи, кольраби								
Барбара F ₁	C	T	T	T	A	+	Зеленая	7.08
Graffiti	C	T	T	T	A	+	Зеленая	126.82
Summer Purple	C	T	T	T	A	+	Зеленая	97.55
Kuba F ₁	C	T	T	T	A	+	Зеленая	22.95
China KRNRI	C	T	T	T	A	+	Зеленая	9.35
Szentesi folias kek	C	T	T	T	A	+	Фиолетовая	271.78

На основании аминокислотных последовательностей MYB114 ТФ (CDSXP 013627020.1, CDSXP 013627019.1) выполнен поиск ДНК-связывающих доменов и их сравнение с доменами R2R3-MYB транскрипционных факторов, кодируемых ранее изученными генами пасленовых культур [13, 25]. Дополнительно показана структура доменов *S. melongena* с выявленными ранее нарушениями синтеза антоцианов, а также структуры транскрипционных факторов томата и баклажана группы MYB2 из базы NCBI (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Антоциановая окраска у разновидностей *B. oleracea* обычно связана с активацией генов биосинтеза антоцианов и/или их транскрипционных активаторов. Ранее было обнаружено, что фиолетовый цвет листьев у *B. oleracea* связан с увеличением экспрессии активаторов транскрипции, таких как *BoMYB2* и *BoTT8* (BobHLH) [14–16], а также *BoPAP1* и *BoPAP2* [24, 26].

Настоящее исследование показало, что накопление антоцианов в кочанной и листовой капусте также может регулироваться геном транскрипционного фактора MYB114, который на 75–81% идентичен в области перекрытия генам последовательностей R2R3-MYB ТФ у пасленовых культур [13, 25], что позволяет предположить их сходные функции.

С помощью разработанных праймеров были амплифицированы и секвенированы полные последовательности гена *Myb114* у разновидностей *B. oleracea*, различающихся окраской листьев и продуктивных органов. Был выявлен аллельный полиморфизм генов *Myb114*, который тесно коррелирует с фенотипическим проявлением антоциановой окраски листьев/кочанов (табл. 3). При этом последовательности гена *Myb114* изученных образцов с контрастной окраской других органов (генеративных головок/соцветий цветной капусты и брокколи, а также стеблеплодов кольраби) независимо от наличия или отсутствия антоцианов были идентичны последовательностям капусты белокочанной. По всей вероятности, регуляция биосинтеза антоцианов в соцветиях и стеблеплодах у разновидностей *B. oleracea* контролируется другими генами, в отличие от листьев, что согласуется с другими исследованиями. Только у образца листовой капусты Di Wang (вр. к-265) были идентифицированы SNP в экзонах и инсерции, как у краснокочанной капусты, а также несколько уникальных однонуклеотидных замен, которые не встречались у других образцов. Предположительно, этот образец декоративной капусты представляет собой гибрид листовой и краснокочанной капусты.

Ассоциативный анализ показал наибольшую степень связи пяти SNP в экзонах и делеции в первом интроне у форм (P -value 0.0001, R^2 0.76) с нарушением синтеза антоциана, в результате чего нами предложена пара праймеров (BrMYB114.2) для маркируемой области гена, для разделения листовых и кочанных форм капусты по накоплению антоцианов. Маркер MYB114.2 может быть использован для идентификации кочанных и листовых капуст с высоким/низким накоплением антоцианов.

Согласно выполненному анализу последовательностей ДНК-связывающих доменов в аминокислотной последовательности ранее изученных генов пасленовых показано наличие двух доменов типа SANT в ТФ MYB114 *Brassica oleracea* и R2R3-MYB ТФ овощных пасленовых, что свидетельствует об их одинаковой структуре и позволяет предполагать выполнение одинаковых функций. Идентичность первого домена у *B. oleracea* составляет 42 аминокислоты из 50 с доменами ТФ пасленовых ANT1, MYB113-like2, 41 из 50 с доменом ТФ MYB113-like1 и 40 аминокислот из 50 с ТФ MYB1 (84–80%). В структуре второго домена последовательности ТФ MYB114 (NCBI CDSXP 013627020.1; XM_013771566.1) важным отличием от доменов всех пасленовых культур является его сокращение на семь аминокислот. Идентичность последовательности *B. oleracea* без аминокислотной делеции (XP_013627019.1) транскрипционным факторам пасленовых составляет 32 из 41 аминокислоты с доменом ТФ MYB113-like2 и 31 из 41 аминокислоты с доменами ТФ ANT1, MYB113-like1, MYB1. Наибольшее совпадение выявлено в структуре доменов ТФ MYB114 *B. oleracea* и ТФ MYB113-like2. Несмотря на то что по числу аминокислот оно незначительно, но эти общие аминокислоты, характерные только для двух этих последовательностей, имеют особое расположение: аминокислота аланин (А) в третьем положении первого домена и аминокислота лизин (К) — в конце второго домена. Учитывая, что ранее нами выявлены 2 SNP в структуре 3-го экзона гена *Myb113-like2*, приводящих к отсутствию синтеза антоцианов в листьях перца и в данном исследовании, установлена связь между рядом SNP в структуре гена *Myb114* и нарушением синтеза антоцианов, предполагаем, что по своим функциям эти два гена наиболее близки. Для сравнения с MYB114 ТФ были взяты дополнительно последовательности, кодируемые рядом известных генов R2R3-MYB ТФ базы данных NCBI (RF 7227477.1) *S. melongena* *Myb2* и *SlAn2* (FJ705320.1), *SlAn2-like* (Solyc10g086290), *Myb75* (NM_001279063.2) *S. lycopersicum*, которые оказывают преимущественное влияние на накопление антоцианов в вегетативных органах [27]. Сравнение с этими последовательностями также показывает наличие аминокислоты аланин (А) в тре-

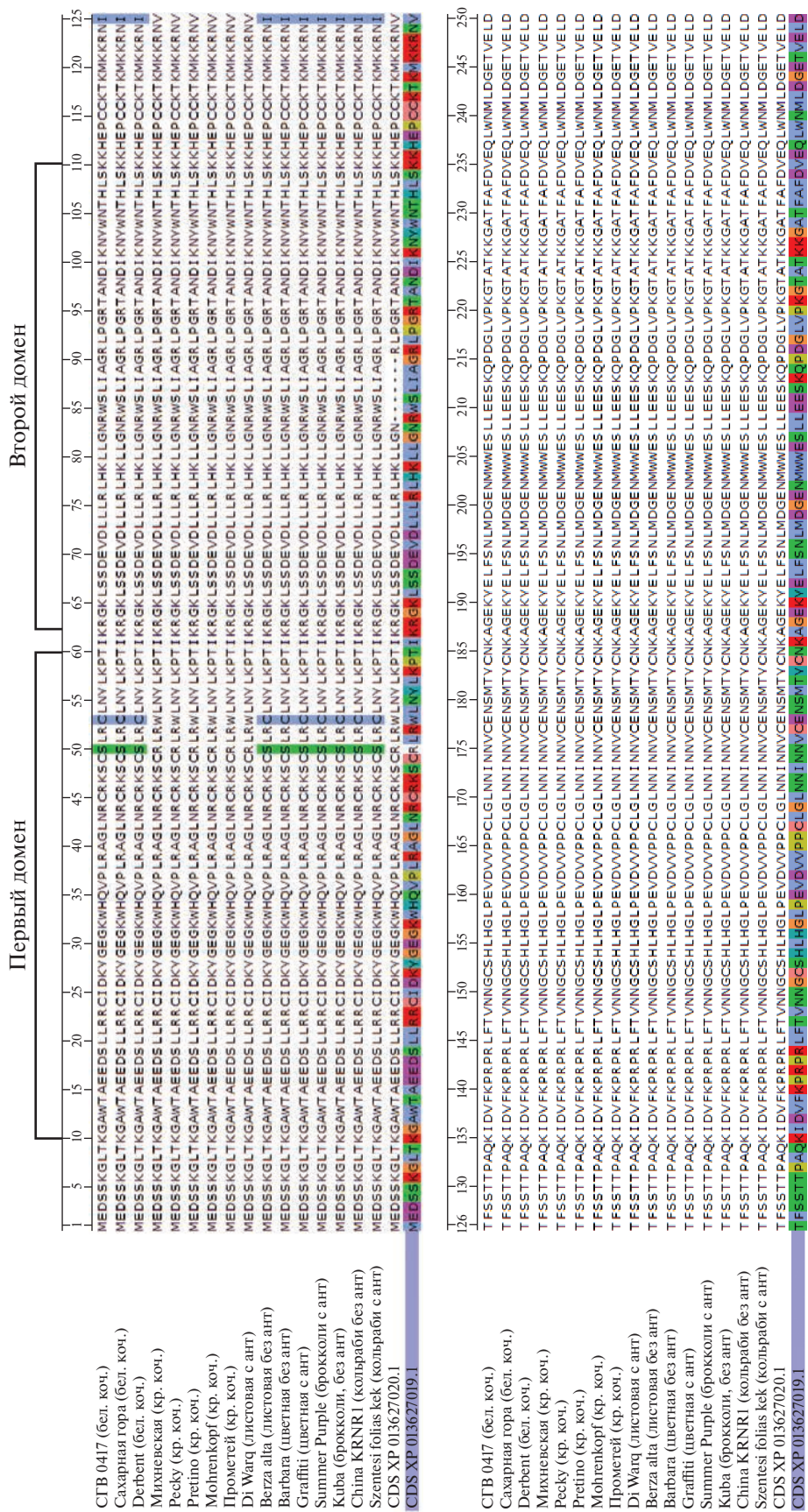


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей изученных образцов *B. oleracea*.

тем положении первого домена и аминокислоты лизин (K) в конце второго домена у группы MYB2 факторов, вместо серина (S) и аргинина (R) у группы MYB1 факторов соответственно, что увеличивает предположение о сходстве функций гена *Myb114* и группы генов MYB2 факторов. Аминокислотная последовательность транскрипционного фактора MYB75, который имеет схожее действие с ТФ ANT1 и AN2, имеет третью аминокислоту серин в начале первого домена, как у группы MYB1 факторов, и аминокислоту лизин в конце второго домена, как у группы MYB2 факторов. Данное сравнение структуры SANT доменов и соответствующих фенотипов растений позволяет предположить, что оба домена действуют комплексно и их структура в начале первого и в конце второго оказывает более сильное влияние на выполняемые в растениях функции.

Сопоставление нуклеотидной и аминокислотной структуры с выделением областей ДНК-связывающих доменов показывает, что выделенные нами SNP в позициях 50 и 53 (рис. 3) приводят к аминокислотным заменам в конце первого домена, что свидетельствует об их наибольшей связи с регуляцией экспрессии структурных генов. Высокая связь с инсерцией в первом интроне размером в 271 пн, которая встречается у образцов кочанной и листовой капусты только у форм без антоциановой окраски, будет изучена далее. Возможно, по аналогии с последовательностями *Myb1-del26 S. melongena* (рис. 4), где крупные делеции в интронной области ведут к нарушению сплайсинга, выпадению второго экзона [13, 25], что, в свою очередь, ведет к нарушению структуры первого домена и полному выпадению второго домена, подобное происходит и с геном у *B. oleracea*. Данное предположение будет проверено путем синтеза РНК изучаемых форм и их секвенирования в дальнейших исследованиях.

Таким образом, в результате сравнения нуклеотидных последовательностей группы MYB транскрипционных факторов овощных пасленовых и капустных культур у капусты огородной *B. oleracea* выявлен ген *Myb114*, наиболее близкий по структуре генам R2R3-MYB ТФ пасленовых. Впервые выявлен аллельный полиморфизм *Myb114* у форм *B. oleracea* с широким внутривидовым разнообразием по накоплению антоцианов в листьях. Изучены особенности влияния выявленных SNP и делеции на структуру ДНК-связывающих доменов, кодируемых транскрипционных факторов, а также их связь с накоплением антоцианов в различных продуктовых органах. Предложен молекулярный маркер MYB114.2, который может быть использован для идентификации кочанных и листовых капуст с высоким/низким накоплением антоцианов. Образцы с различным сочетанием аллельного полиморфизма отобраны как модельные для дальнейшего изучения генетической ре-

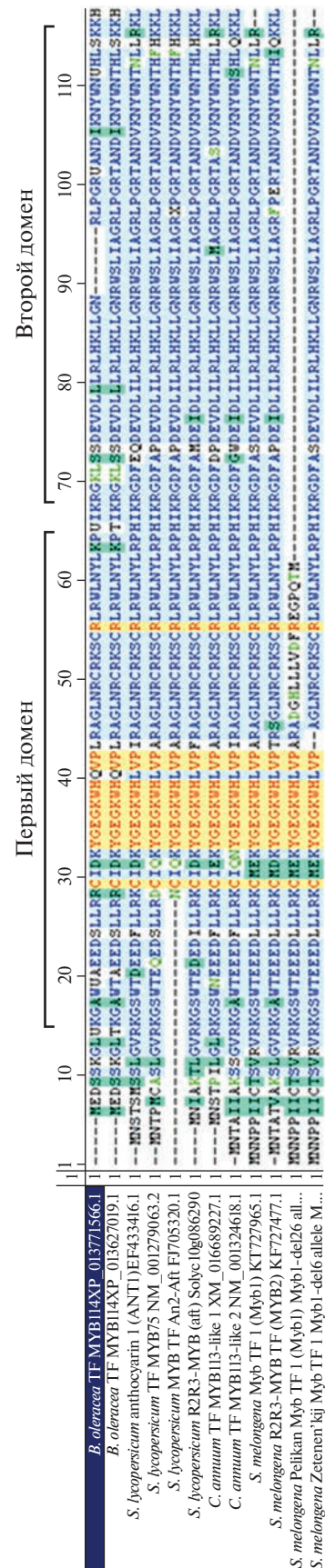


Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей доменов SANT ТФ MYB114 *B. oleracea* и R2R3-MYB ТФ овощных пасленовых культур.

гуляции накопления антоцианов в продуктовых органах и повышения эффективности создания ценных сортов и гибридов для сельского хозяйства.

Работа выполнена при поддержке гранта № 20-516-00017 Бел_а, а также гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б20Р-285 “Изучение генетических механизмов регуляции накопления антоцианов и каротиноидов у овощных пасленовых (Solanaceae) и капустных (Brassicaceae) культур”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhai R., Wang Z., Yang C. et al. PbGA2ox8 induces vascular-related anthocyanin accumulation and contributes to red stripe formation on pear fruit // *Hortic Res.* 2019. № 6. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0220-9>
2. Li H., Li Y., Yu J. et al. MdMYB8 is associated with flavonol biosynthesis via the activation of the MdFLS promoter in the fruits of Malus crabapple // *Hortic Res.* 2020. № 7. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0238-z>
3. Mazewski C., Liang K., Gonzalez de Mejia E. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays // *Food Chem.* 2018. V. 242. P. 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.086>
4. Middleton E.Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer // *Pharmacol. Rev.* 2000. V. 52. P. 673–751.
5. Albert N.W., Davies K.M., Lewis H.D. et al. A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 962–980. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122069>
6. Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю., Гордеева Е.И. Гены биосинтеза флавоноидов пшеницы // *Вавилов. журн. генетики и селекции.* 2017. Т. 18. № 4/1. С. 784–796.
7. Liu Y., Tikunov Y., Schouten R.E. et al. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous Vegetables: a review // *Frontiers in Chemistry.* 2018. V. 6. P. 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00052>
8. Naing A.H., Kim C.K. Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants // *Plant Mol. Biol.* 2018. V. 98. P. 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0771-4>
9. Xie L., Li F., Zhang S. et al. Mining for candidate genes in an introgression line by using RNA Sequencing: The anthocyanin overaccumulation phenotype in Brassica // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 1245. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01245>
10. Guo N., Cheng F., Wu J. et al. Anthocyanin biosynthetic genes in *Brassica rapa* // *BMC Genomics.* 2014. V. 15. P. 71–81. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-426>
11. Petroni K., Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs // *Plant Sci.* 2011. V. 181. P. 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.009>
12. Baudry A., Heim A.M., Dubreucq B. et al. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2004. V. 39(3). P. 366–380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x>
13. Babak O., Nikitinskaya T., Nekrashevich N. et al. Identification of DNA markers of anthocyanin biosynthesis disorders based on the polymorphism of anthocyanin 1 tomato ortholog genes in pepper and eggplant // *Crop. Breed. Genet. Genom.* 2020. V. 2. <https://doi.org/10.20900/cbgg20200011>
14. Chiu L.W., Zhou X., Burke S. et al. The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. P. 1470–1480. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164160>
15. Yuan Y.X., Chiu L.W., Li L. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage // *Planta.* 2009. V. 230. P. 1141–1153. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1013-4>
16. Jin S.W., Rahim M.A., Kim H.T. et al. Molecular analysis of anthocyanin-related genes in ornamental cabbage // *Genome.* 2018. V. 61. P. 111–120. <https://doi.org/10.1139/gen-2017-0098>
17. Rahim M.A., Robin A.H.K., Natarajan S. et al. Identification and characterization of anthocyanin biosynthesis-related genes in Kohlrabi // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2018. V. 184. P. 1120–1141. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2613-2>
18. Zhang X., Zhang K., Wu J. et al. QTL-Seq and sequence assembly rapidly mapped the gene BrMYBL2.1 for the purple trait in *Brassica rapa* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58916-5>
19. Wang J., Su T.B., Yu Y.J. Molecular characterization of BrMYB73: A candidate gene for the purple-leaf trait in *Brassica rapa* // *Int. J. Agric. Biol.* 2019. V. 22. P. 122–130. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1041>
20. Zhao Z., Xiao L., Xing X. et al. Fine mapping the BpP11 gene for purple leaf color in B2 of *Brassica juncea* L. through comparative mapping and whole-genome resequencing // *Euphytica.* 2017. V. 213. P. 80–90. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1868-6>
21. Xie Q., Hu Z., Zhang Y. et al. Accumulation and molecular regulation of anthocyanin in purple tumorous stem mustard (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) // *J. Agric. Food Chem.* 2014. V. 62. P. 7813–7821. <https://doi.org/10.1021/jf501790a>
22. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // *Bioinform-*

- matics. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
23. Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E. et al. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. P. 2633–2635.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
 24. Zhang B., Hu Z., Zhang Y. et al. A putative functional MYB transcription factor induced by low temperature regulates anthocyanin biosynthesis in purple kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor*) // *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31. P. 281–289.
<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1162-3>
 25. Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Никитинская Т.В. и др. Изучение полиморфизма генов Муб-факторов на основе сравнительной геномики овощных пасленовых культур (томат, перец, баклажан) для поиска ДНК-маркеров, дифференцирующих образцы по накоплению антоцианов // Докл. Национ. акад. наук Беларуси. 2019. Т. 63. № 6. С. 721–729.
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-6-721-729>
 26. Zhang Y., Hu Z., Zhu M. et al. Anthocyanin accumulation and molecular analysis of correlated genes in purple kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.) // *J. Agr. Food Chem.* 2015. V. 63. P. 4160–4169.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00473>
 27. Kiferle C., Fantini E., Bassolino L. et al. Tomato R2R3-MYB proteins SLANT1 and SLAN2: same protein activity, different roles // *PLoS One*. 2015. V. 10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136365>

Study of *Myb114* Gene Polymorphism in the Cole Crops (*Brassica oleracea* L.) in Connection with Anthocyanin Biosynthesis Regulation Based on Comparison with the MYB Factors of Vegetable Nightshades (*Solanaceae*)

D. A. Fateev^{a, *}, F. A. Berensen^a, A. M. Artemyeva^a, O. G. Babak^b,
 K. K. Yatskevich^b, E. V. Drozd^b, and A. V. Kilchevsky^b

^aFederal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, 190000 Russia

^bInstitute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus

*e-mail: fateevdm1@gmail.com

In order to study a regulation mechanism for one of the most ancient processes of anthocyanin biosynthesis in plants based on comparison of R2R3-MYB genes in *Solanaceae* (*S. lycopersicum*: *An1*, *An2*; *S. melongena*: *Myb1*; *C. annuum*: *Myb113-like1* и *Myb113-like2*) and *Brassicaceae* crops, a search for orthologous sequences in *Brassica oleracea* was performed. A sequence encoding MYB114 TF was found to be the closest in a nucleotide structure to the previously investigated genes in *Solanaceae*. Primers were selected and a comparative analysis of *Myb114* gene sequences was performed in *B. oleracea* varieties (white cabbage, red cabbage, kale, cauliflower, broccoli, and kohlrabi) with a wide intraspecific diversity by the anthocyanin accumulation in leaves and various food organs: heads, curds and stems. Alignment of *Myb114* sequences revealed a number of gene polymorphisms that closely correlate with high anthocyanin accumulation in *B. oleracea* leaves, including 3 SNPs in exon regions and a 271 bp deletion in the 1st intron. The identified SNPs lead to the replacement of two amino acids located in the region of DNA-binding domains, which leads to a change in the binding efficiency of this transcription factor with the promoters of structural biosynthesis genes and a decrease in their expression level in the forms without anthocyanin accumulation in leaves compared with the forms with their accumulation in vegetative plant parts. A molecular marker MYB114.2 has been proposed that may be used for the identification of headed cabbages and kales with high/low anthocyanin accumulation. By the amino acid structure and phenotypic manifestation (regulation of anthocyanin accumulation in leaves), *Myb114 B. oleracea* is the closest to *Ant2* tomato, *Myb2* eggplant and *Myb113-like2* pepper alleles. A high degree of conservatism of the SANT DNA-binding domains of MYB114 TF of *B. oleracea* and R2R3-MYB TF of nightshades was established.

Keywords: *Brassica oleracea* varieties, anthocyanin biosynthesis, R2R3-MYB transcription factors, TF domains, sequencing, DNA markers.