

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

**БИОЛОГИЯ**  
**BIOLOGY**

УДК 582.951.4;575.164;575.222.7;575.852  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-6-721-729>

Поступило в редакцию 04.11.2019  
Received 04.11.2019

**О. Г. Бабак, Н. А. Некрашевич, Т. В. Никитинская, К. К. Яцевич,  
академик А. В. Кильчевский**

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

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ Myb-ФАКТОРОВ  
НА ОСНОВЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ ОВОЩНЫХ ПАСЛЕНОВЫХ  
КУЛЬТУР (ТОМАТ, ПЕРЕЦ, БАКЛАЖАН) ДЛЯ ПОИСКА ДНК-МАРКЕРОВ,  
ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХ ОБРАЗЦЫ ПО НАКОПЛЕНИЮ АНТОЦИАНОВ**

**Аннотация.** Одной из групп вторичных метаболитов, накапливаемых в плодах овощных пасленовых культур, являются антоцианы, выполняющие защитные функции от абиотических и биотических стрессов растений и характеризующиеся высокой ценностью как антиоксиданты для человека. Объектом исследований являлись овощные культуры семейства *Solanaceae* (томат, перец, баклажан) с широким внутривидовым разнообразием по накоплению антоцианов в плодах. Цель исследований – поиск молекулярных маркеров на основе выявленного полиморфизма генов, регулирующих накопление антоцианов в плодах перца и баклажана для повышения эффективности селекции на высокие биохимические и технологические качества. На основе анализа секвенированных последовательностей генов у форм с контрастной антоциановой окраской плодов впервые выявлен аллельный полиморфизм Myb113-like факторов mRNA XM\_016689227 и mRNA NM\_001324618 перца сладкого и myb1 mRNA KF72747 баклажана. Изучены особенности влияния выявленных полиморфизмов на экспрессию м-РНК и формирование функционального белка. Разработаны праймеры для ДНК-типирования выявленных полиморфизмов, изучена их связь с фенотипическим проявлением антоциановой окраски плодов. По результатам оценки предложены оптимальные SCAR- и CAPS-маркеры, позволяющие идентифицировать ряд генетических полиморфизмов изучаемых myb-like факторов, вызывающих нарушение синтеза антоцианов в плодах *Capsicum annuum* и *Solanum melongena*. Образцы *C. annuum* и *S. melongena* с различным сочетанием аллельного полиморфизма отобраны как модельные для дальнейшего изучения генетической регуляции накопления антоцианов в плодах и повышения эффективности создания ценных сортов и гибридов для сельского хозяйства.

**Ключевые слова:** *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Solanum melongena*, регуляция синтеза антоциана, ДНК маркеры

**Для цитирования:** Изучение полиморфизма генов Myb-факторов на основе сравнительной геномики овощных пасленовых культур (томат, перец, баклажан) для поиска ДНК-маркеров, дифференцирующих образцы по накоплению антоцианов / О. Г. Бабак [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 6. – С. 721–729. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-6-721-729>

**Olga G. Babak, Nataliya A. Nekrashevich, Tatiana V. Nikitinskaya, Konstanciya K. Yatsevich,  
Academician Alexander V. Kilchevsky**

*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**STUDY OF THE Myb-FACTOR POLYMORPHISM BASED ON COMPARATIVE GENOMICS OF  
VEGETABLE SOLANACEAE CROPS (TOMATO, PEPPER, EGGPLANT) TO SEARCH FOR DNA  
MARKERS THAT DIFFERENTIATE SAMPLES BY THE ANTHOCYANS ACCUMULATION**

**Abstract.** Anthocyanins are high-value plant antioxidants; they also determine biotic and abiotic stress resistance. The aim of our research was to study the allelic polymorphism of *Anthocyanin 1* orthologs in the vegetable *Solanaceae* crops of *C. annuum* and *S. melongena*. The search revealed the following closest genes in *C. annuum*: Myb113-like1 TF and Myb113-like2 transcription factors and Myb1 in *S. melongena*. Exon amplicons of those genes were obtained and then sequenced in the pepper and eggplant samples with contrasting anthocyanin fruit coloration. Primers to the identified polymorphisms were

developed and their correlation with the anthocyanin accumulation in fruits was studied. A close correlation was found between a minimum accumulation or the complete absence of anthocyanin synthesis in fruits with a single nucleotide deletion (*Myb113-like1*), and in the pepper samples, 2 SNP (*Myb113-like2*) was detected using the CAPS marker Myb 113-Accl. In the eggplant samples, the deletions of 6 and 26 bp were detected using the SCAR marker MybMel and the CAPS marker Mybmel-Pst1. The disturbance of anthocyanin synthesis in pepper forms with 1Indel in *Myb113-like1* TF was determined by a shift in the reading frame and SNPs in *Myb113-like2* TF lead to amino acid substitutions: Lys → Arg and Thr → Lys. In the eggplant, a deletion of 6 bp leads to the loss of ala and arg in the protein; a deletion of 26 bp causes disorder during the mRNA maturation. The developed markers allow identifying the Myb-like TF alleles under study, resulting in anthocyanin synthesis disturbance in fruits. *C. annuum* and *S. melongena* samples with different alleles were selected for a further study and new varieties in agriculture.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Solanum melongena*, regulation of anthocyanin synthesis, DNA markers

**For citation:** Babak O. G., Nekrashevich N. A., Nikitinskaya T. V., Yatsevich K. K., Kilchevsky A. V. Study of the Myb-factor polymorphism based on comparative genomics of vegetable *Solanaceae* crops (tomato, pepper, eggplant) to search for DNA markers that differentiate samples by the anthocyanins accumulation. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 6, pp. 721–729 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-6-721-729>

**Введение.** Антоцианы, являясь одной из форм вторичных метаболитов растений, не только придают определенную окраску плодам и семенам, но и определяют устойчивость к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. В связи с высокой антиоксидантной активностью данных соединений для человека, регуляция их накопления является актуальным вопросом. Принимая во внимание, что структурные гены пути биосинтеза антоцианинов функционируют под контролем регуляторного комплекса, называемого MYB-bHLH-WD40 (MBW) [1], исследование аллельного полиморфизма этих регуляторных генов является важным. Современный сортимент овощных пасленовых культур, прежде всего томата, перца и баклажана, характеризуется наличием форм и различным накоплением антоцианов в плодах. Известно, что ген томата *Antocyanin 1 (Ant1)* кодирует Myb транскрипционный фактор, регулирующий накопление антоцианов в плодах. Нами успешно апробирован CAPS маркер Ant1-NcoI для выявления аллеля *Ant1<sup>C</sup>* [2], определяющего Aft (Anthocyanin fruit tomato) фенотип с характерной окраской вегетативной массы и темно-синей окраской плодов. Данный маркер разработан на основе различия гена *Ant1* по одному нуклеотиду (SNP) у форм с высоким и низким накоплением антоцианов. Относительно перца и баклажана в литературе представлены сведения об основных формах накапливаемых антоцианов, а также зависимости их накопления как от генетических факторов, так и условий окружающей среды. В генетических базах данных представлены последовательности генов ряда Myb-факторов, детерминирующих накопление различных форм антоцианов [3; 4]. В [5; 6] показан различный уровень их экспрессии у форм с накоплением и отсутствием антоцианов в плодах, при этом генетический полиморфизм данных генов не изучен. Учеными Южной Кореи (Jung и др.) установлена регуляция накопления антоцианов в плодах перца геном *Capsicum Antocyanin 2*, кодирующим R2R3 MYB транскрипционный фактор путем создания трансгенных растений табака и арабидопсиса, экспрессирующих ген *CaAn2* и дающих антоциановую окраску тканей трансгенных растений [7].

В связи с вышеизложенным целью наших исследований являлось выявление ДНК-маркеров признака «накопление антоцианов в плодах» у перца и баклажана на основе сравнительного полиморфизма генов-ортологов *Antocyanin 1* томата и изучения их аллельного полиморфизма у форм с различным накоплением антоцианов для повышения эффективности селекционного процесса данных видов. Для этого были поставлены следующие задачи: поиск и сравнительный анализ генетических последовательностей перца и баклажана, близких по нуклеотидному составу гену *Antocyanin 1* томата; изучение генетического полиморфизма последовательностей, отобранных для сравнения генов у форм с различным внутривидовым разнообразием по накоплению антоцианов; изучение связи между выявленными полиморфизмами и фенотипическим проявлением признака «накопление антоцианов в плодах»; поиск ДНК-маркеров, позволяющих дифференцировать образцы по накоплению антоцианов в плодах.

**Материалы и методы исследования.** Объектами исследования служили коллекционные образцы перца из Института генетики и цитологии НАН Беларуси, Белорусской государственной

сельскохозяйственной академии, российского Федерального научного центра овощеводства, а также форм баклажана из Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова. Образцы изучаемых культур характеризовались широким фенотипическим полиморфизмом по признаку «накопление антоцианов в плодах».

Выделение ДНК проводили при помощи Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) из молодых верхушечных листьев растений перца и баклажана согласно протоколу. Количество ДНК в образце определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro (Швеция). ДНК-пробу для каждого сорта выделяли и анализировали в трехкратной повторности.

Нуклеотидные последовательности ортологов гена *Antocyanin 1* у образцов перца и баклажана с контрастной окраской плодов определяли путем секвенирования. Для этого фрагменты амплификации, полученные на геномной ДНК с подобранными нами геноспецифическими праймерами (табл. 1, секвенирование), 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 Big Dye® 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 °С в течение 2 мин и далее проводили капиллярный электрофорез с использованием ДНК-секвенатора ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Таблица 1. Список праймеров, использованных в работе

Table 1. List of primers used in the research

Культура Culture	Ген Gene	Праймер Primer	Последовательность Sequence	Назначение Use
Перец	<i>Myb113-like</i> (XM_016689227 – номер доступа в базе GenBank)	Myb113- 1(1)caps	F: ATGAACAGTACTCCGATTTTGGGA R: GGGTTCAATCCCTGCCTCG	Секвенирование
		Myb113- 1(3)caps	F: ATGCAGATGGTCACTTATGGCT R: ATGAATTTTTGAACCCCTACAGCAA	Секвенирование, CAPS маркер ( <i>AccI</i> )
	<i>Myb113-like</i> (NM_001324618 – номер доступа в базе GenBank)	Myb113- 2(2)caps	F: TCCCTGCTTTGCATAAAAATCTCA R CTTGCCTGTTGCCTAGAAGC	Секвенирование
		Myb113- 2(4)caps	F: GTCACCTATTGCTGGGAGATTGC R AGCAGAAAAGTCATCCCAACCA	Секвенирование
		Myb113- AciI	F: AAAGTACAATACTGCCCTCAAGATCACCG R AGCAGAAAAGTCATCCCAACCA	dCAPS маркер ( <i>AciI</i> )
Баклажан	<i>Myb1</i> (Sme2.5_05099.1 – номер доступа в базе Solgemo- mics)	Mybmel (Ex 1-2)	F: ACGTTCACCAAAGGGTTTGC R: GTGCACCTGTTGCCTAAGAG	Секвенирование, SCAR маркер, CAPS маркер ( <i>PstI</i> )
		Mybmel (Ex 3)	F: ATGATGCCATGCATGCTGAA R: ACACAGGAGA GATGTTGGGT	Секвенирование

Компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, проводили в программе Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems).

На основе выявленного полиморфизма подобрали праймеры (табл. 1, SCAR- и CAPS-маркеры) и на их основе провели ДНК-типирование созданных коллекций сортов. ПЦР-реакцию проводили в Термоциклере Biometra T Professional Basic (Германия). Реакционная ПЦР-смесь объемом 15 мкл содержала 60–100 нг геномной ДНК; 2,5 мМ dNTP Mix (Thermo Scientific); и 1,4 единицы Tornado DNA-полимеразы в инкубационном буфере “F” (Праймтех, Беларусь) и 0,25 пмоль/мл олигонуклеотидных праймеров (Праймтех, Беларусь). Список подобранных и использованных в работе праймеров приведен в табл. 1. Для дизайна праймеров использовали программу Primer-BLAST на сайте Национального центра биотехнологической информации США [8]. Режим ПЦР был следующим: 95 °С – 15 мин, затем следовало 35 циклов, состоящих из инкубаций: 99 °С – 1 с, 55–60 °С – 30 с и 72 °С – 1 мин. Реакцию завершали при 72 °С в течение 7 мин.

Продукты ПЦР реакции 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 качестве

маркера молекулярного веса 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific). Продукты ПЦР с использованием SCAR маркера MybMel разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле с использованием ДНК-секвенатора ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Размер ампликонов определяли с использованием стандарта Liz500. Рестрикцию эндонуклеазами *AccI*, *AciI*, *PstI* проводили согласно инструкции производителя (Thermo Scientific). На основе результатов ДНК-типирования были выбраны оптимальные ДНК-маркеры для выявления полиморфизмов форм без накопления антоциана.

**Результаты и их обсуждение.** Поиск генов-ортологов к томатному аллелю *Ant1* (EF433416) в базе данных GenBank выявил следующие наиболее близкие по нуклеотидному составу последовательности у *Capsicum annuum* – *Myb113-like* транскрипционные факторы (ТФ) mRNA XM\_016689227, mRNA NM\_001324618 (далее *Myb113-like 1* и *Myb113-like 2*) и у *Solanum melongena* – транскрипционный фактор *Myb1* DNA KT27965 (или mRNA KT259043) (далее *Myb1*). Уровень сходства на гомологичных участках составил 80–90 %. На основании данных базы Solgenomics о структуре геномной ДНК *Capsicum annuum* (Pepper1.55ch10) и *Solanum melongena* (Sme2.5\_05099.1) были подобраны праймеры, полностью перекрывающие экзоны указанных выше генов (табл. 1). С их помощью методом ПЦР на геномной ДНК у коллекционных образцов перца и баклажана с контрастной антоциановой окраской плодов были получены ампликоны, которые были секвенированы.

Путем сравнительного анализа полученных последовательностей образцов *C. annuum* с контрастным накоплением антоцианов выявлен следующий полиморфизм: 2 SNP в четвертом экзоне аллеля *Myb113-like 2* у сортов Белоснежка, Тройка и L160-10 (рис. 1, *a*); 4SNP и делеция в одно основание (рис. 1, *c*) в третьем экзоне аллеля *Myb113-like 1* у сортов Белоснежка и L160-10.

При этом однонуклеотидные замены в четвертом экзоне аллеля *Myb113-like 2* приводят к аминокислотным заменам в последовательности белка: лизина на аргинин (положение +1835) и треонина на лизин (положение +1865). На основании выявленной SNP в положении +1865 (C/A) в 4 экзоне аллеля *Myb 113-like 2* был подобран и успешно апробирован dCAPS маркер Myb 113-*AciI*. При использовании данного маркера у форм дикого типа с накоплением антоциана (цитозин (C) в положении +1865) образуются два фрагмента 170 и 28 п. о., а у растений с аденином (A) в положении +1865 ампликон остается неизменным (198 п. о.) (рис. 1, *b*).

Однонуклеотидная делеция в третьем экзоне аллеля *Myb113-like 1* (положение +1218) приводит к сдвигу рамки считывания с появлением стоп-кодона через 14 п. о. от выпадения нуклеотида к синтезу усеченного белка (рис. 1, *d*). К данной мутации нами разработан и успешно апробирован CAPS маркер Myb113-*AccI*. После амплификации с данными праймерами и последующей рестрикции *AccI* у дикого типа образуются фрагменты 589 и 25 п. о., а у мутанта (с делецией тимина) – фрагменты 393, 195 и 25 п. о. (рис. 1, *e*). Результаты типирования коллекционных образцов перца с использованием dCAPS маркера Myb 113-*AciI* и CAPS маркера Myb113-*AccI* приведены в табл. 2. Однонуклеотидная замена G/A (положение +1042) приводит к замене серина на аспарагин в последовательности белка. Три SNP (положения +1277, +1288, +1435) в третьем экзоне *Myb113-like 1* гена у данных сортов уже не влияют на структуру белка, так как располагаются ниже делеции (выпадение тимина), которая приводит к появлению преждевременного стоп-кодона.

В результате сравнения полученных сиквенсов гена *Myb1* у *S. melongena* выявлен следующий полиморфизм. Для сорта Зелененький в конце экзона 1 аллеля *Myb1* характерна делеция в 6 п. о. (рис. 2, *a*), которая приводит к выпадению двух аминокислот в белке. Для сортов баклажана Пеликан и Снежный были выявлены делеция в 26 п. о., охватывающая конец интрона 1 – начало экзона 2 (рис. 2, *a*), и 11 SNP в кодирующих областях изучаемого гена. Мы предположили, что у форм баклажана с делецией в 26 п. о. (охватившей конец интрона 1 – начало экзона 2) в изучаемом гене *Myb1* нарушается созревание мРНК и не образуется функциональный белок. Для проверки данной гипотезы было изучено влияние выявленной делеции в аллеле *Myb1-del26* на сплайсинг мРНК. С этой целью выделили общую РНК из листьев сортов Пеликан (*Myb1-del26*) и Солярис (*Myb1* дикий тип), обработали препараты ДНК-азой и затем синтезировали кДНК. С помощью сконструированных праймеров Mybmel-e1F (TGTACGTCTGTGCGAGTGAG), Mybmel-e3R (TTCTCCTTCAACAGCGTCTGT) к первому и третьему экзонам гена *Myb1*. После прове-



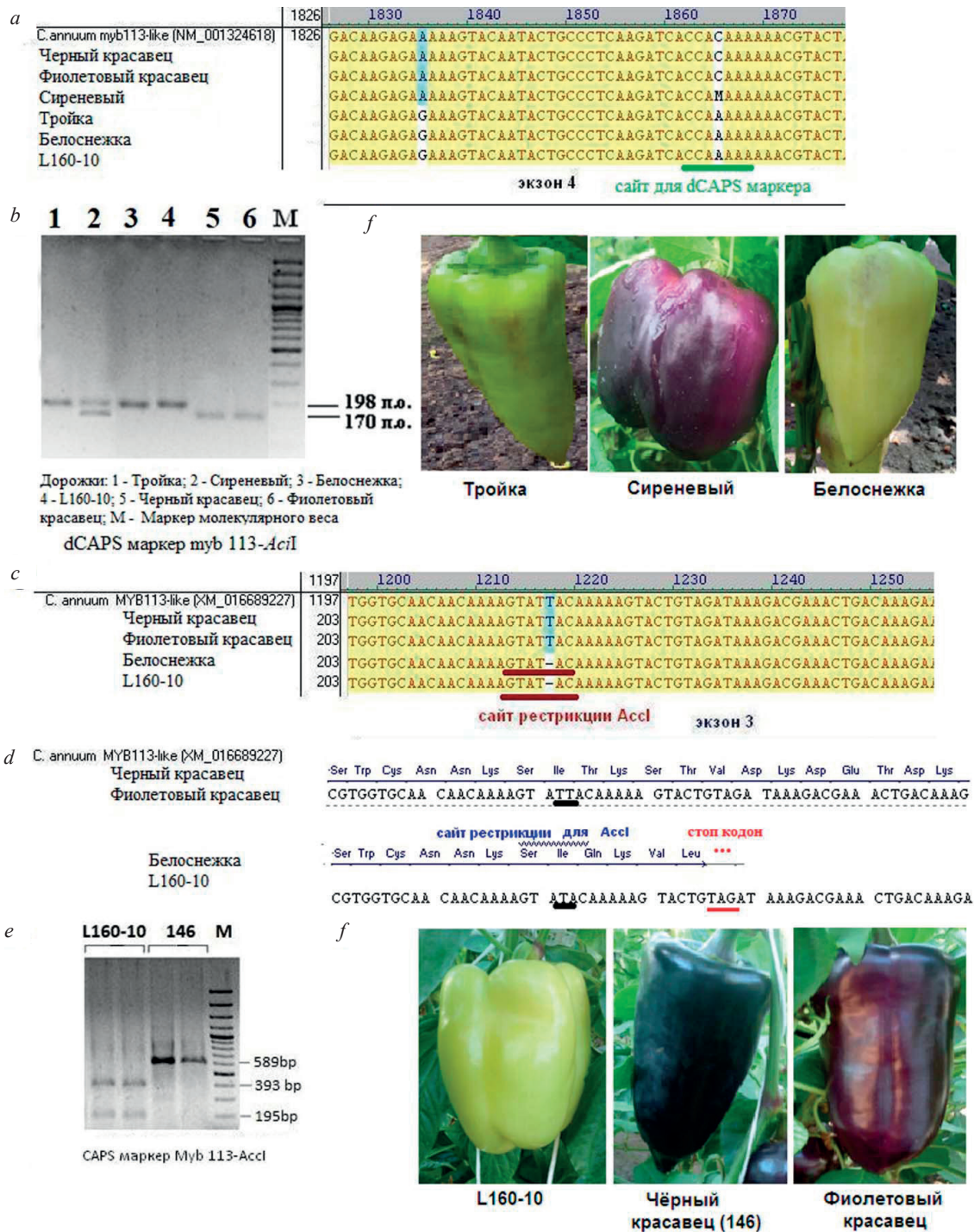


Рис. 1. Полиморфизм генов *Myb113-like Capsicum Annuum* и его фенотипическое проявление: *a* – участок экзона 4 гена *Capsicum annuum Myb113-like 2*, где выявлены SNP (положения +1835 (A/G), +1865 (C/A)); *b* – ДНК-идентификация аллелей *Myb113-like 2* (C/A) с использованием dCAPS маркера *Myb113-AcI* на коллекционных образцах перца; *c* – участок экзона 3 гена *Capsicum annuum Myb113-like 1*, где выявлена однонуклеотидная делеция (T); *d* – рамки считывания в экзоне 3 у аллелей дикого типа и *Myb113-like-delT*; *e* – ДНК-идентификация аллелей с использованием dCAPS маркера *Myb113-AcI* на коллекционных образцах перца; *f* – фенотипическое проявление выявленных полиморфизмов

Fig. 1. *Myb113-like Capsicum Annuum* genes polymorphism and its phenotypic manifestation: *a* – a region of exon 4 of the *Myb113-like 2* gene of *Capsicum annuum* with detected SNPs (positions +1835 (A/G), +1865 (C/A)); *b* – DNA identification of *Myb113-like 2* alleles (C/A) using a dCAPS *Myb113-AcI* marker on collection pepper samples; *c* – a region of exon 3 of the *Myb113-like 1* gene of *Capsicum annuum*, where a single nucleotide deletion (T) was detected; *d* – reading frames in exon 3 in wild-type and *Myb113-like-delT* alleles; *e* – DNA identification of alleles using a dCAPS *Myb113-AcI* marker on collection pepper samples; *f* – phenotypic manifestation of identified polymorphisms

Т а б л и ц а 2. Результаты генотипирования коллекции перца с использованием маркеров dCAPS *Myb113-AciI* и CAPS *Myb113-AccI*

Table 2. Genotyping results of a pepper collection using dCAPS *Myb113-AciI* and CAPS *Myb113-AccI* markers

Наименование сорта Grade name	Окраска плода (техническая спелость) Fetal coloration (technical maturity)	Окраска плода (биологическая спелость) Fetal coloration (biological maturity)	Маркер dCAPS <i>Myb113-AciI</i> Marker dCAPS <i>Myb113-AciI</i>	Маркер CAPS <i>Myb113-AccI</i> Marker CAPS <i>Myb113-AccI</i>
Мулат	Темно-зеленый	Коричневый	AA	ТТ*
Оранжевое наслаждение	Зеленый	Оранжевый	AA	Т-
Игрок	Белый	Красный	СС*	Т-
Л-160-10	Белый	Оранжево-красный	AA	Т-
Л-45-11	Темно-зеленый	Зелено-желтый	СС	ТТ
Л-45-11	Темно-зеленый	Красный	СС	ТТ
Желтоплодный	Белый	Желто-оранжевый	AA	Т-
Златодор	Зеленый	Желтый	AA	Т-
Сиреневый	Сиреневый	Оранжево-желтый	АС	ТТ
Шоколадная красавица	Темно-зеленый	Коричневый	AA	Т-
Фиолетовый красавец	Фиолетовый	Темно-красный	СС	ТТ
Л-24	Белый	Красный	AA	Т-
Оранжевое чудо	Темно-зеленый	Темно-оранжевый	AA	ТТ
ZongKao	Темно-зеленый	Темно-красный	AA	ТТ
Ами	Белый	Красный	AA	Т-
Волат	Светло-зеленый	Красный	AA	Т-
Бонета	Зелено-белый	Красный	AA	ТТ
Ода	Фиолетовый	Красно-коричневый	СС	ТТ
Тройка	Белесый	Красный	AA	ТТ
Отелло	Фиолетовый	Темно-красный	AA	ТТ
Белоснежка	Белый	Красный	AA	Т-
Черный красавец	Темно-фиолетовый	Темно-красный	СС	ТТ

Примечание. \* – генотип, характерный для форм с синтезом антоцианов в тканях растений.

Note. \* – the genotype characteristic of forms with anthocyanin synthesis in plant tissues.

дения ПЦР на матрице кДНК были получены ампликоны у сортов Солярис (588 п. о.) и Пеликан (459 п. о.), выполнен их электрофорез (рис. 2, *c*) и сиквенс. Сравнительный анализ показал, что в отличие от сорта Солярис в зрелой мРНК сорта Пеликан гомозиготного по аллелю *Myb1-del26* полностью отсутствует второй экзон (рис. 2, *c*) и, как следствие, не образуется функциональный белок. Таким образом показано, что делеция в 26 п. о. в гене *Myb1* вызывает выпадение экзона 2 из зрелой мРНК при ее сплайсинге и невозможности синтеза полноценного функционального белка у мутантных форм.

Для ДНК-типирования данных полиморфизмов был разработан SCAR маркер *Mybmel* и CAPS маркер *Mybmel-PstI*. С этой целью были использованы праймеры *Mybmel* (Ex 1-2)F/R (табл. 1), которые подбирались первоначально для амплификации и последующего секвенирования области первого и второго экзонов гена *Myb1*. Аллель с делецией в 26 п. о. легко отличим на агарозном геле после разгонки продуктов амплификации (рис. 2, *d*). Для четкого разделения продуктов с минимальными отличиями в размерах (аллель с делецией в 6 пар оснований) предложили использовать праймер *Mybmel* (Ex 1-2)F с флюоресцирующей меткой и последующим анализом продуктов на генетическом анализаторе (рис. 2, *e*). Данный способ позволил четко выявлять и гетерозиготные формы по данному гену. В случае невозможности использования генетического анализатора, для выявления делеции в 6 п. о. была подобрана рестриктаза *PstI*. После амплификации и последующей рестрикции у дикого типа, а также у форм с делецией в 26 п. о. ампликон не режется (остается 458 и 432 п. о. соответственно), а у вариантов с делецией в 6 п. о. образуются фрагменты 228 и 224 п. о. (рис. 2, *d*). Результаты типирования коллекционных образцов баклажана с использованием SCAR маркера *Mybmel* приведены в табл. 3.

По результатам анализа в изучаемой коллекции выделился образец Грушевидный, который отличался интенсивным фиолетовым окрашиванием вегетативной части растений, характерным

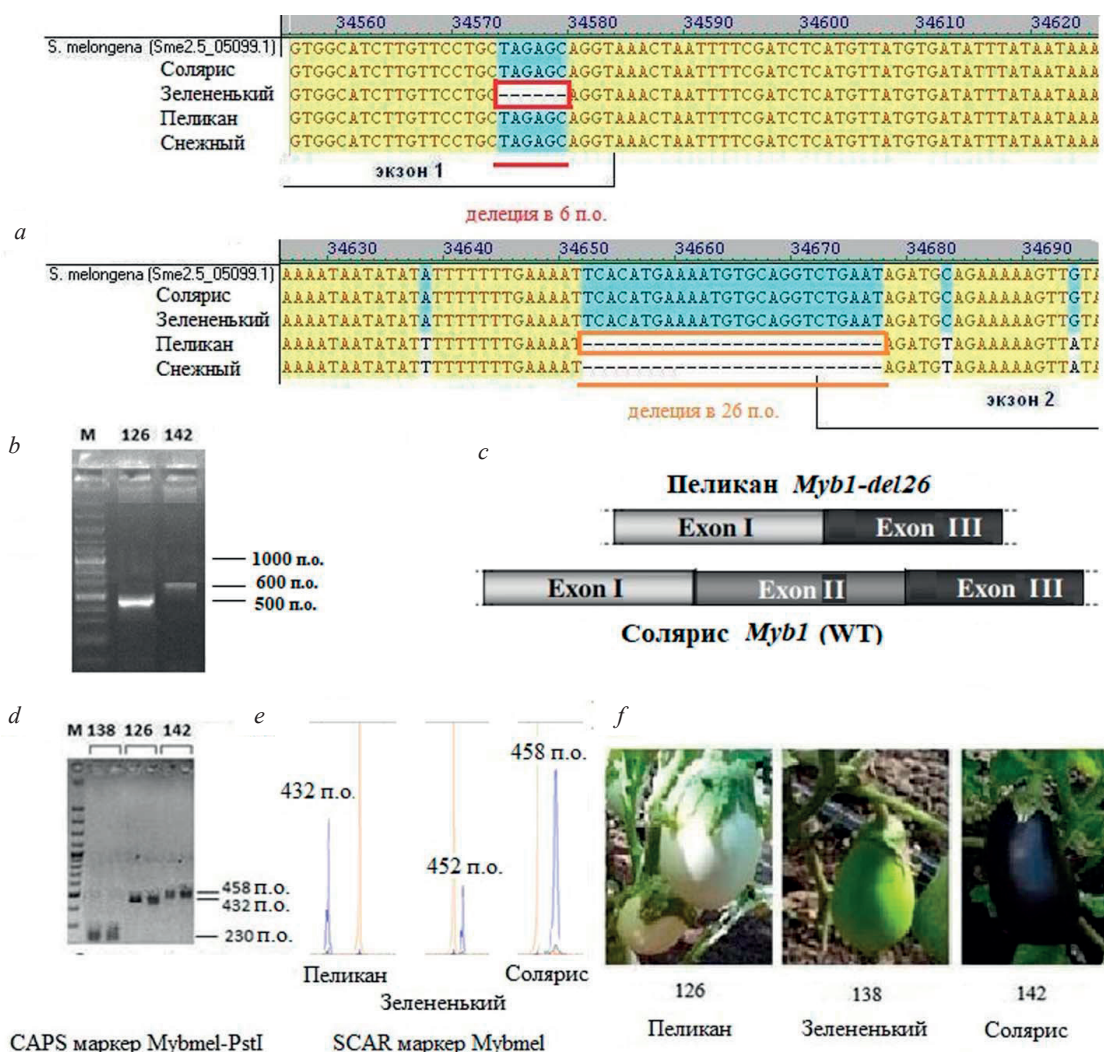


Рис. 2. Полиморфизм гена *Myb1 Solanum Melongena* и его фенотипическое проявление: *a* – участок гена *Myb1 Solanum melongena*, где выявлены делеции у аллелей *Myb1-del6* и *Myb1-del26*; *b* – электрофорез продуктов амплификации с использованием праймеров Mybmel-e1F/Mybmel-e3R на кДНК баклажана в качестве матрицы; *c* – структура зрелой мРНК у баклажана с нормальным аллелем *Myb1* и мутантным *Myb1-del26*; *d, e* – ДНК-идентификация аллелей *Myb1-del6* (фрагменты 228 и 224 п. н.); *Myb1-del26* (фрагмент 432 п. н.) и *Myb1* (продукт 458 п. н.) с использованием CAPS маркера Mybmel-*PstI* (*d*) или SCAR маркера Mybmel (*e*) на коллекционных образцах баклажана; *f* – фенотипическое проявление выявленных полиморфизмов

Fig. 2. *Myb1 Solanum Melongena* gene polymorphism and its phenotypic manifestation: *a* – a region of the *Myb1 Solanum melongena* with detected deletions in *Myb1-del6* and *Myb1-del26* alleles; *b* – electrophoresis of amplification products using Mybmel-e1F/Mybmel-e3R primers on eggplant cDNA as a matrix; *c* – a structure of mature mRNA in eggplant with normal *Myb1* and mutant *Myb1-del26* alleles; *d, e* – DNA identification of *Myb1-del6* (228 bp and 224 bp fragments), *Myb1-del26* (432 bp fragment) and *Myb1* (458 bp product) using the CAPS Mybmel-*PstI* marker (*d*) or the SCAR Mybmel marker (*e*) on collection eggplant samples; *f* – phenotypic manifestation of identified polymorphisms

Т а б л и ц а 3. Результаты генотипирования коллекции баклажана с использованием SCAR маркера Mybmel  
 Table 3. Genotyping results of an eggplant collection using a SCAR Mybmel marker

Наименование сорта Grade name	Окраска плода на стадии техниче- ской спелости Coloring the fetus at the stage of technical ripeness	Размер ПЦР продукта Size PCR product	Аллель Allele
Карлсон	Интенсивно-фиолетовый	458	<i>Myb1</i>
Донецкий урожайный	Зеленый	452	<i>Myb1-del6</i>
Черноморец	Черный	458	<i>Myb1</i>
Пеликан	Белый	432	<i>Myb1-del26</i>
Агат F <sub>1</sub>	Фиолетовый	458	<i>Myb1</i>



Окончание табл. 3

Наименование сорта Grade name	Окраска плода на стадии технической спелости Coloring the fetus at the stage of technical ripeness	Размер ПЦР продукта Size PCR product	Аллель Allele
Черный красавец	Черный	458	<i>Myb1</i>
Грушевидный	Зеленый	458	<i>Myb1</i>
Грибное удовольствие	Черно-фиолетовый	458	<i>Myb1</i>
Sadohara naga nasu	Темно-розовый*	458, 432	<i>Myb1/Myb1-del26</i>
Shina omaru nasu	Темно-фиолетовый	458	<i>Myb1</i>
F1 Король севера × Shina omaru nasu	Чернильный	458	<i>Myb1</i>
Нежнейший	Белый	432	<i>Myb1-del26</i>
Пекинский черный	Темно-фиолетовый	458	<i>Myb1</i>
Wegro prince	Фиолетовый	458	<i>Myb1</i>
Crimson	Фиолетовый	458	<i>Myb1</i>
Белый из Кареджа	Розовый	458, 432	<i>Myb1/Myb1-del26</i>
Фиолетовый длинный	Фиолетовый	458	<i>Myb1</i>
Зелененький	Зеленый	452	<i>Myb1-del6</i>
Снежный	Белый	432	<i>Myb1-del26</i>
Солярис	Фиолетовый	458	<i>Myb1</i>

Примечание. \* – в верхней части плода зелено-белый за счет аллеля *gs*.

Note. \* – the upper part of the fruit is green-white due to the *gs* allele.

для выявленного у него аллеля *Myb1*, при этом окраска плодов в фазе технической спелости была зеленая, хотя ожидаемая окраска – фиолетовая. Возможно, данное фенотипическое проявление вызвано действием других генов, определяющих процесс биосинтеза антоцианов.

**Заключение.** На основе анализа секвенированных последовательностей генов ортологов *Anthocyanin 1* томата (*Ant1*) у форм с широким внутривидовым разнообразием по накоплению антоцианов в плодах впервые выявлен аллельный полиморфизм *Myb113-like* факторов mRNA XM\_016689227 (*Myb113-like1*) и mRNA NM\_001324618 (*Myb113-like2*) перца сладкого и *Myb1* mRNA KF72747 баклажана. Изучены особенности влияния выявленных полиморфизмов на экспрессию м-РНК и формирование функционального белка. Разработаны праймеры для ДНК-типирования выявленных полиморфизмов, изучена их связь с фенотипическим проявлением антоциановой окраски плодов. По результатам оценки разработаны оптимальные SCAR- и CAPS-маркеры, позволяющие идентифицировать ряд генетических полиморфизмов изучаемых *Myb-like* транскрипционных факторов, вызывающих нарушение синтеза антоцианов в плодах *Capsicum annuum* и *Solanum melongena*. Образцы *C. annuum* и *S. melongena* с различным сочетанием аллельного полиморфизма отобраны как модельные для дальнейшего изучения генетической регуляции накопления антоцианов в плодах и повышения эффективности создания ценных сортов и гибридов для сельского хозяйства.

#### Список использованных источников

1. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous Vegetables: a review / Y. Liu [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. – 2018. – Vol. 6, art. 52. – P. 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00052>
2. Molecular Aspects of Anthocyanin fruit Tomato in Relation to high pigment-1 / M. Sapir [et al.] // *Journal of Heredity*. – 2008. – Vol. 99, N 3. – P. 292–303. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm128>
3. GenBank [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. – Date of access: 01.08.2019.
4. Solgenomics [Electronic resource]. – Mode of access: <https://solgenomics.net/>. – Date of access: 01.08.2019.
5. Stommel, J. R. Coordinated regulation of biosynthetic and regulatory genes coincides with anthocyanin accumulation in developing eggplant fruit / J. R. Stommel, J. M. Dumm // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 2015. – Vol. 140, N 2. – P. 129–135. <https://doi.org/10.21273/jashs.140.2.129>
6. Lightbourn, G. J. Epistatic interactions influencing anthocyanin gene expression in *Capsicum annuum* / G. J. Lightbourn, J. R. Stommel, R. J. Griesbach // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 2007. – Vol. 132, N 6. – P. 824–829. <https://doi.org/10.21273/jashs.132.6.824>



7. A non-LTR retrotransposon activates anthocyanin biosynthesis by regulating a MYB transcription factor in *Capsicum annuum* / S. Jung [et al.] // *Plant Science*. – 2019. – Vol. 287. – P. 110181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110181>
8. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye [ et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 13, N 1, art. 134. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

## References

- Liu Y., Tikunov Y., Schouten R. E., Marcelis L., Visser R., Bovy A. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous Vegetables: a review. *Frontiers in Chemistry*, 2018, vol. 6, art. 52, pp. 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00052>
- Sapir M., Oren-Shamir M., Ovadia R., Reuveni M., Evenor D., Tadmor Y., Nahon S., Shlomo H., Chen L., Meir A., Levin I. Molecular Aspects of Anthocyanin fruit Tomato in Relation to high pigment-1. *Journal of Heredity*, 2008, vol. 99, no. 3, pp. 292–303. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm128>
- GenBank*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 1 August 2019).
- Solgenomics*. Available at: <https://solgenomics.net/> (accessed 1 August 2019).
- Stommel J. R., Dumm J. M. Coordinated regulation of biosynthetic and regulatory genes coincides with anthocyanin accumulation in developing eggplant fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2015, vol. 140, no. 2, pp. 129–135. <https://doi.org/10.21273/jashs.140.2.129>
- Lightbourn G. J., Stommel J. R., Griesbach R. J. Epistatic interactions influencing anthocyanin gene expression in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2007, vol. 132, no. 6, pp. 824–829. <https://doi.org/10.21273/jashs.132.6.824>
- Jung S., Venkatesh J., Kang M.-Y., Kwon J.-K., Kang B.-C. A non-LTR retrotransposon activates anthocyanin biosynthesis by regulating a MYB transcription factor in *Capsicum annuum*. *Plant Science*, 2019, vol. 287, pp. 110181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110181>
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 2012, vol. 13, no. 1, art. 134, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

## Информация об авторах

*Бабак Ольга Геннадьевна* – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [babak\\_olga@mail.ru](mailto:babak_olga@mail.ru).

*Некрасевич Наталья Александровна* – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [n.nekrashevich@igc.by](mailto:n.nekrashevich@igc.by).

*Никитинская Татьяна Владимировна* – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [nikitinskaja@yandex.ru](mailto:nikitinskaja@yandex.ru).

*Яцевич Констанция Константиновна* – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [yakon-kon@yandex.ru](mailto:yakon-kon@yandex.ru).

*Кильчевский Александр Владимирович* – академик, д-р биол. наук, профессор, научный руководитель лаборатории. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [kilchev@presidium.bas-net.by](mailto:kilchev@presidium.bas-net.by).

## Information about the authors

*Babak Olga Gennadievna* – Ph. D. (Biology), Assistant professor, Leading researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [babak\\_olga@mail.ru](mailto:babak_olga@mail.ru).

*Nekrashevich Nataliya Alexandrovna* – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [n.nekrashevich@igc.by](mailto:n.nekrashevich@igc.by).

*Nikitinskaya Tatiana Vladimirovna* – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [nikitinskaja@yandex.ru](mailto:nikitinskaja@yandex.ru).

*Yatsevich Konstanciya Konstantinovna* – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [yakon-kon@yandex.ru](mailto:yakon-kon@yandex.ru).

*Kilchevsky Alexander Vladimirovich* – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Scientific leader of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [kilchev@presidium.bas-net.by](mailto:kilchev@presidium.bas-net.by).