

ГЕНЕТИКА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

Научная статья
УДК 633.112.6:575.827.5
DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-139-151



Аллельные различия ключевых генов биосинтеза беталаинов у контрастных по окраске корнеплода образцов свеклы столовой коллекции ВИР

А. С. Михайлова¹, Д. В. Соколова¹, Н. А. Швачко¹, В. С. Попов¹, Е. К. Хлесткина^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-технологический университет «Сирiuс», Центр генетики и наук о жизни, Краснодарский край, Россия

Автор, ответственный за переписку: Диана Викторовна Соколова, dianasokol@bk.ru

Актуальность. Свекла столовая (*Beta vulgaris* L.) – основной источник важнейшего натурального красителя бетанина. Ряд предприятий вынуждены импортировать зарубежные красители ввиду недостаточных запасов отечественного растительного сырья. В связи с этим особую актуальность приобретает создание сортов с повышенным содержанием беталаиновых пигментов.

Материалы и методы. Проведен скрининг аллельных различий ключевых генов биосинтеза беталаинов у контрастных по окраске корнеплода образцов свеклы столовой из коллекции ВИР по методу Сэнгера.

Результаты и обсуждение. Нами впервые была выявлена нонсенс-мутация в гене *CYP76AD1* у образца сорта 'Сердолик' с желтой окраской мякоти корнеплода, приводящая к усечению функционального домена P450, а также ряд миссенс-мутаций у образца 'Аваланч' в первом экзоне гена *BvDODA1*, вероятно, ассоциированных с проявлением неокрашенного фенотипа. В ходе анализа *in silico*, на основании последовательности аннотированного ранее в хромосоме 9 гена *CYP76AD5*, вблизи него идентифицированы еще две tandemно дублированные высокоомологичные копии *CYP76AD5.1* и *CYP76AD5.3*, которые, по предварительной оценке, вместе с геном *CYP76AD6* являются наиболее подходящими генами-мишенями для нокаута.

Заключение. Используя сформированную ранее группу высокобетаниновых образцов свеклы столовой и выявленные нами закономерности, возможно выбрать наиболее подходящие образцы для дальнейшего редактирования. Кроме того, обнаруженные в настоящем исследовании аллельные различия ключевых генов биосинтеза беталаинов будут полезны при конструировании молекулярных маркеров для ускоренного отбора форм свеклы столовой с заданными свойствами.

Ключевые слова: *Beta vulgaris* L., гены семейства цитохром P450, *BvDODA1*, *BvMYB1*, бетацианины, бетаксантины, окраска мякоти корнеплода

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 21-66-00012 «Создание с использованием генетических технологий и изучение новых линий растений, адаптированных к меняющимся условиям окружающей среды, обладающих повышенной продуктивностью и диетической ценностью». Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Михайлова А.С., Соколова Д.В., Швачко Н.А., Попов В.С., Хлесткина Е.К. Аллельные различия ключевых генов биосинтеза беталаинов у контрастных по окраске корнеплода образцов свеклы столовой коллекции ВИР. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2024;185(1):139-151. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-139-151

GENETICS OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-139-151

Allelic differences in the key genes of betalain biosynthesis in table beet accessions with contrasting root color from the VIR collection

Aleksandra S. Mikhailova¹, Diana V. Sokolova¹, Natalia A. Shvachko¹, Vitaliy S. Popov¹, Elena K. Khlestkina^{1,2}¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia² Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, Krasnodar Territory, Russia**Corresponding author:** Diana V. Sokolova, dianasokol@bk.ru

Background. Table beet (*Beta vulgaris* L.) contains a great amount of naturally red-colored betanins. A number of enterprises are forced to import foreign dyes because the reserves of domestic plant raw materials are insufficient. With this in view, the development of cultivars with high betalain pigment content is now required.

Materials and methods. Allelic differences were screened in the key genes of the betalain biosynthesis pathway among table beet accessions with various root color from the VIR collection using the Sanger DNA sequencing method.

Results and discussion. For the first time we identified a nonsense mutation in the *CYP76AD1* gene in cv. 'Serdolik' with yellow flesh; it led to the truncation of the functional P450 domain. We suggested that the detected polymorphism correlated with phenotypic switching because the well-known role of *CYP76AD1* was essential for the red betalain accumulation. Moreover, a number of missense mutations in cv. 'Avalanche' in the first exon of the *BvDODA1* gene were found. These mutations were probably associated with the expression of the uncolored phenotype. An *in silico* analysis revealed highly homologous copies of *CYP76AD5*, located tandemly on chromosome 9. Attention should be paid to these copies, together with the *CYP76AD6* gene, as they seem the most preferable targets for a knockout to increase the red pigment content.

Conclusion. It is possible to identify the best table beet accessions for further genome editing among a previously selected high-betanin group. In addition, this study revealed the allelic differences in the key genes of the betalain biosynthesis pathway. These results will be useful for the development of DNA molecular markers to facilitate the selection of table beet forms with required properties.

Keywords: *Beta vulgaris* L., genes of the cytochrome P450 family, *BvDODA1*, *BvMYB1*, betacyanins, betaxanthins, root flesh color

Acknowledgments: this research was supported by the Russian Science Foundation under Project No. 21-66-00012 "The development with genetic technologies and the study of new plant lines adapted to changing environmental conditions, with increased productivity and dietary value".

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Mikhailova A.S., Sokolova D.V., Shvachko N.A., Popov V.S., Khlestkina E.K. Allelic differences in the key genes of betalain biosynthesis in table beet accessions with contrasting root color from the VIR collection. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(1):139-151. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-139-151

Введение

Беталаины – природные пигменты растительного происхождения, которым в последние десятилетия уделяется пристальное внимание, что вызвано не только ориентацией рынка на использование натуральных пищевых красителей, но и широким спектром их биологической активности (Stintzing, Carle, 2007). Положительное влияние беталаинов на здоровье человека подтверждено результатами исследований: отмечены выраженные противовоспалительные, антиканцерогенные и антиоксидантные свойства (Tesoriere et al., 2004; Ninfali et al., 2017; Gopalan, Jadhav, 2021; Bastos, Schliemann, 2022).

Наряду с антоцианами, каротиноидами и хлорофиллом, беталаины составляют обширную группу растительных пигментов (Yudina et al., 2021). Большинство представителей порядка Гвоздичноцветные (Caryophyllales) содержат азотсодержащие производные индолина и дигидропиридина – красно-фиолетовые бетацианины и желто-оранжевые бетаксантины.

Как известно, тирозин является предшественником в биосинтезе беталаиновых пигментов (Strack et al., 2003; Khan et al., 2015). Гены *CYP76AD1*, *CYP76AD5*, *CYP76AD6* семейства цитохром P450 кодируют ферменты, осуществляющие гидроксилирование тирозина с образованием 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (L-ДОФА). Кроме того, продукт гена *CYP76AD1* вовлечен в циклизацию L-ДОФА до 5,6-дигидроксииндолин-2-карбоновой кислоты (цикло-ДОФА) у свеклы с красной окраской корнеплода.

BvDODA1 осуществляет превращение L-ДОФА в беталамовую кислоту – предшественник в биосинтезе бетаксантинов и бетацианинов (Brockington et al., 2015). Регуляторный ген семейства *R2R3-Myb* – *BvMYB1* – является позитивным регулятором биосинтеза беталаинов, активируя транскрипцию *CYP76AD1* и *BvDODA1* путем связывания непосредственно с их промоторной последовательностью (рис. 1) (Hatlestad et al., 2015).

Свекла столовая (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *conditiva* Alef.) признана рекордсменом по содержанию беталаинов. На основе имеющихся в коллекции ВИР образцов свеклы столовой, контрастных по признаку окраски мякоти, была сформирована репрезентативная выборка, в рамках которой проведен биохимический анализ по определению концентрации беталаинов в кожуре и мякоти в динамике в течение периода вегетации (Sokolova et al., 2022). Выявлено преобладание бетацианинов у желтоокрашенных, в то время как у образцов с белой окраской корнеплода пигменты не обнаружены. Скрининг аллельных различий ключевых генов биосинтеза беталаинов у образцов рассматриваемой выборки позволит выбрать гены, играющие ключевую роль в проявлении различий на уровне фенотипа. Дальнейшее маркирование этих генов для ускорения маркер-ориентированной селекции или использование их в качестве мишеней для редактирования позволит ускорить процесс выведения сортов и гибридов свеклы с заданным содержанием беталаинов для удовлетворения запросов пищевой промышленности.

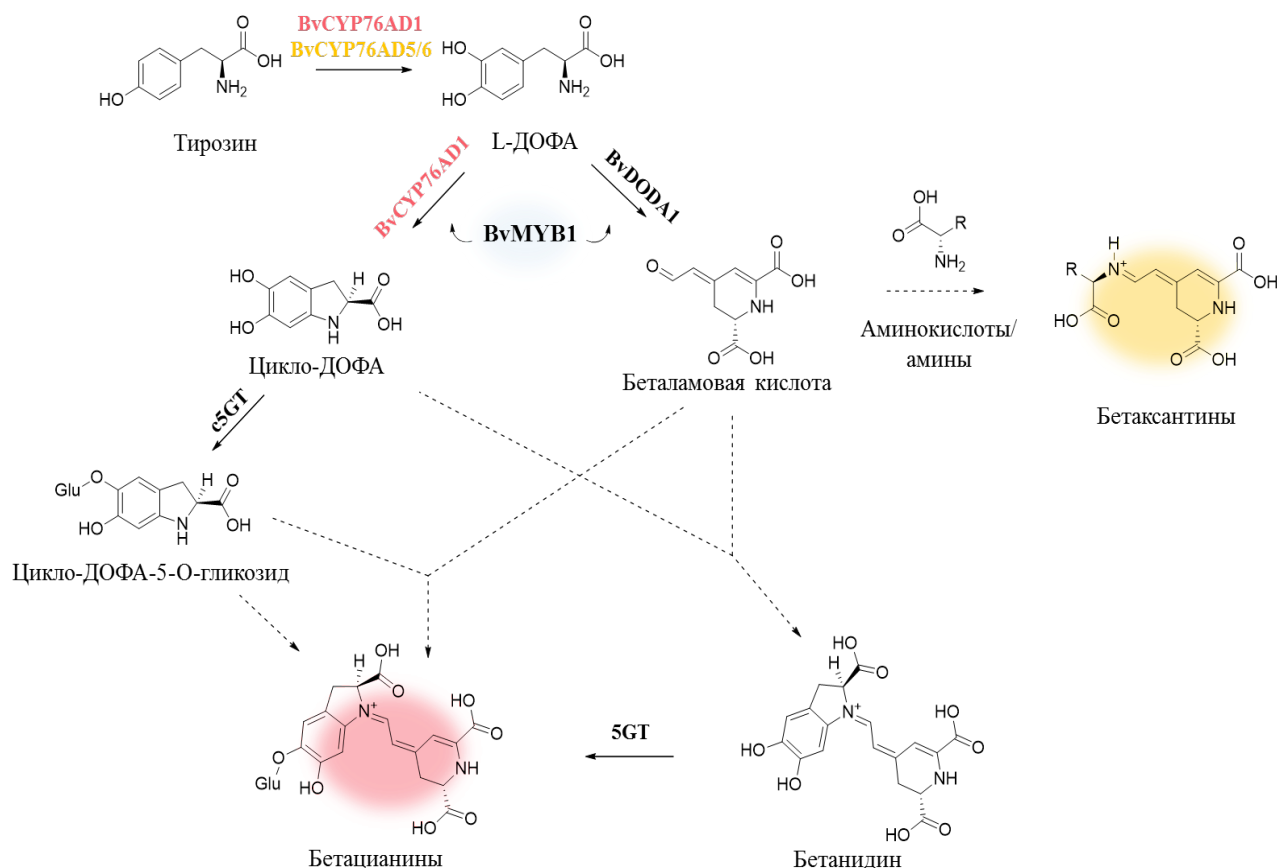


Рис. 1. Схема биосинтеза беталаиновых пигментов столовой свеклы, модифицированная версия (Hatlestad et al., 2015)

Fig. 1. Betalain biosynthesis scheme in table beet, modified version (Hatlestad et al., 2015)

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили четыре образца свеклы столовой с контрастной окраской корнеплодов из коллекции ВИР (табл. 1).

мощью инструмента OligoAnalyzer Tool, доступного на онлайн-платформе Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcal%2Fanalyze>). Амплификацию геномной ДНК проводили в термоциклерах T-100 (Biorad) и SimpliAmp Plus

Таблица 1. Характеристика образцов свеклы столовой из коллекции ВИР

Table 1. Characteristics of table beet accessions from the VIR collection

Окраска корнеплода / Root color				
Название образца / Name of the accession	‘Бордо односемянная’	‘Кубанская Борщевая’	‘Сердолик’	‘Аваланч’
№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	к-3151	к-1967	к-4017	к-3881
Происхождение / Origin	Россия	Россия	Россия	Нидерланды
Содержание бетацианина, мг/100 г* / Betacyanin content, mg/100 g	807,9	213,5	11,1	Не выявлено
Содержание бетаксантина, мг/100 г* / Betaxanthin content, mg/100 g	188,6	51,7	31,6	Не выявлено
Генотип** / Genotype	R-Y-BL-	R-Y-blbl	rrY-blbl	R-yyBL-
Окраска кожицы корнеплода / Root skin color	Темно-бордовая	Красная	Желто- оранжевая	Белая
Окраска мякоти / Root flesh color	Темно-бордовая	Пятнисто- красная	Пятнисто-желтая	Белая
Окраска гипокотыля / Hypocotyl color	Темно-бордовая	Красная	Зелено-желтая	Красная

Примечание: * – на сырую массу; ** – указано аллельное состояние генов, при котором проявляется подобный фенотип

Note: * – fresh weight; ** – the allelic state of genes at which such phenotype as indicated appears

Из свежих листьев образцов свеклы столовой в рамках сформированной выборки выделена тотальная геномная ДНК с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Концентрацию и качество ДНК оценивали с помощью электрофоретического анализа в 1-процентном агарозном геле и спектрофотометрического определения соотношения оптических плотностей при 230, 260 и 280 нм (A260/280 и A260/230).

В геноме сахарной свеклы с помощью поиска по гомологии на основании ранее аннотированных генов в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) был осуществлен поиск ключевых генов биосинтеза беталаинов: *BvMYB1* (GenBank: JF432080), *CYP76AD1* (GenBank: HQ656023), *CYP76AD5* (GenBank: KM592961), *CYP76AD6* (GenBank: KT962274), *BvDODA1* (GenBank: HQ656027). Для выявленных в ходе анализа *in silico* ключевых генов сконструированы аллель-специфичные праймеры для ресеквенирования аллелей генов биосинтеза беталаинов у образцов, контрастных по признаку окраски корнеплода (Supplementary Materials, Suppl. 1)¹.

Аллель-специфичные праймеры были сконструированы с учетом выравнивания целевых нуклеотидных последовательностей на геном и проанализированы с по-

(Thermo Fisher). ПЦР-смесь общим объемом 20 мкл содержала: 70 нг ДНК-матрицы, по 1 нг каждого из праймеров, 5U Taq ДНК-полимеразу и 1x реакционный буфер (67 mM TrisHCl, pH 8.8, 10 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂, 0.01% Твин-20). Амплифицированные ПЦР-фрагменты элюированы с помощью набора *diaGene* для элюции фирмы «ДИА-М» согласно инструкции производителя. Очищенную ДНК-матрицу в количестве 30–50 нг использовали для секвенирующей реакции, которая протекала в 10 мкл смеси по протоколу, соответствующему рекомендации производителя (BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer, Thermo FS).

Ресеквенирование участков (промоторные последовательности и аллели 1-го экзона) ключевых генов биосинтеза беталаинов у образцов свеклы, контрастных по содержанию беталаинов, проведено с помощью генетического анализатора ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, Япония) по методу Сэнгера. Обработка полученных секвенограмм, в том числе оценка качества данных и выравнивание на референсный геном, осуществлялась с использованием программного обеспечения Unipro UGENE (<http://ugene.net/ru/>) и MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>). В качестве референсного генома выступала последовательность сахарной свеклы *B. vulgaris* subsp. *vulgaris*, доступная в базе данных Phytozome 13 (Phytozome genome ID: 548; https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Bvulgaris_EL10_1_0).

¹ Приложение 1 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 1. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

Для множественного выравнивания как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей применяли алгоритм MUSCLE, доступный в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/align>), а также программу MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Полученные файлы формата clustal_num визуализировали в SnapGene Viewer 6.0.7 (<https://www.snapgene.com/>). Аннотацию консервативных доменов проводили в базах Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) и GenomeNet (<https://www.genome.jp/tools/motif/>). Процент идентичности нуклеотидных аминокислотных последовательностей рассчитан с помощью сервера UVA FASTA (lalign) (https://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=lalign&pgm=lal). Открытую рамку считывания предсказывали с помощью сервиса NCBI Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Предсказание третичной структуры белка осуществляли с помощью сервера SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) (Waterhouse et al., 2018). В качестве шаблона был использован белок 6KKS, размещенный в репозитории базы SWISS-MODEL Template Library (SMTL ID: 6KKS) (<https://swissmodel.expasy.org/templates/6kks.1>). Последовательность шаблона 6KKS соответствует фактору транскрипции WER (WEREWOLF) у *Arabidopsis thaliana*, который относится к семейству R2R3-MYB и кодируется геном *AtMYB66* (семейство R2R3-Myb; GenBank: AT5G14750), специфически взаимодействующим с большой бороздкой ДНК (Wang et al., 2019).

Результаты

В геноме сахарной свеклы *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* (2n = 18) с помощью поиска по гомологии на основании ранее аннотированной последовательности гена *CYP76AD5*, размещенной в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), с помощью алгоритма BLASTN найдены высокоомологичные копии (E-value = 0), расположенные tandemно в хромосоме 9 (Phytozome: EL10Ac9g22160, EL10Ac9g22161, EL10Ac9g22162). В рамках данной работы для удобства обсуждения мы обозначаем эти гены по порядку их расположения в хромосоме: *CYP76AD5.1* (EL10Ac9g22160), *CYP76AD5.2* (EL10Ac9g22161) и *CYP76AD5.3* (EL10Ac9g22162). Расстояние от *CYP76AD5.2* до *CYP76AD5.1* и *CYP76AD5.3* составляет 8319 пн и 10 956 пн соответственно. Важно отметить, что в качестве исходных данных для поиска высокоомологичных копий послужила последовательность гена *CYP76AD5.2*, аннотированная в NCBI под номером KM592961. В той же хромосоме обнаружен ген *CYP76AD6* (Phytozome: EL10Ac9g22144) на расстоянии около 196 тысяч пар нуклеотидов (тпн) от кластера генов *CYP76AD5.1-5.3*. Остальные гены: *CYP76AD1* (GenBank: HQ656023; Phytozome: EL10Ac2g04268), *BvDODA1* (GenBank: HQ656027; Phytozome: EL10Ac2g04269) и *BvMYB1* (GenBank: JF432080; Phytozome: EL10Ac2g04153) – локализованы в хромосоме 2. Расстояние между генами *CYP76AD1* и *BvDODA1* составляет около 44 тпн; левее на хромосоме, на расстоянии около 1500 тпн от *CYP76AD1*, располагается ген *BvMYB1*.

Различия по сравнению с референсной последовательностью в промоторной области и первом экзоне выявлены у всех исследуемых образцов в случае структурных генов, однако отличие кодирующей последовательности регуляторного гена *BvMYB1* обнаружено только у образца с неоднородной светлоокрашенной мякотью 'Кубанская Борщевая' (к-1967, Россия) (Supplementary

Materials, Suppl. 2)². В ходе ресеквенирования в промоторной и кодирующей последовательностях гена *CYP76AD1* у исследуемых образцов обнаружены отличия от референсной последовательности (Supplementary Materials, Suppl. 3)³. Однонуклеотидные замены у образцов к-3151, к-1967 и к-3881, выявленные в области первого экзона, являются синонимичными, тогда как вставка цитозина в положении 240 пн от сайта начала транскрипции у образца к-4017 с желто-пятнистой окраской мякоти корнеплода приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона UAA. Как следствие, кодируемый функциональный домен семейства цитохром P450 (Pfam: PF00067) усечен, что, вероятнее всего, приводит к утрате функции гена *CYP76AD1* у образца свеклы столовой с желто-пятнистой окраской мякоти и зеленым гипокотилем (рис. 2).

В ходе анализа *in silico* в геноме сахарной свеклы на основании аннотированного ранее гена *CYP76AD5* было идентифицировано три гомологичные последовательности в базе данных Phytozome. Идентичность нуклеотидных последовательностей генов *CYP76AD5.1* (EL10Ac9g22160) и *CYP76AD5.2* (EL10Ac9g22161) составляет 96,7%, аминокислотных последовательностей белковых продуктов этих генов – 99,0%, тогда как нуклеотидная последовательность третьей копии *CYP76AD5.3* (EL10Ac9g22162) в среднем в сравнении с предыдущими составила 75,4%. Учитывая высокую степень гомологии данных последовательностей, к каждой копии были сконструированы аллель-специфичные праймеры с дальнейшим ресеквенированием соответствующих аллелей у образцов исследуемой выборки.

По результатам ресеквенирования промоторная область гена *CYP76AD5.1* отличается более выраженным полиморфизмом в сравнении с кодирующей (Supplementary Materials, Suppl. 4)⁴. Интересно отметить, что паттерн распределения инделей в промоторной области в большей степени схож между последовательностями образцов с белой и пятнисто-желтой окраской мякоти корнеплода и между последовательностями образцов с пятнисто-красной и темно-бордовой окраской. У продуктов гена *CYP76AD5.1* образцов к-1967, к-3881 и к-4017 обнаружена аминокислотная замена остатка треонина в положении 27 на аланин (Thr27Ala); в положении 272 – вставка треонина в сравнении с референсной последовательностью (рис. 3).

Аллели гена *CYP76AD5.2* у контрастных по окраске форм отличаются от референсной последовательности, однако идентичны между собой (Supplementary Materials, Suppl. 5)⁵. Обнаруженные нуклеотидные замены в обла-

² Приложение 2 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 2. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

³ Приложение 3 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 3. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

⁴ Приложение 4 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 4. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

⁵ Приложение 5 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 5. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

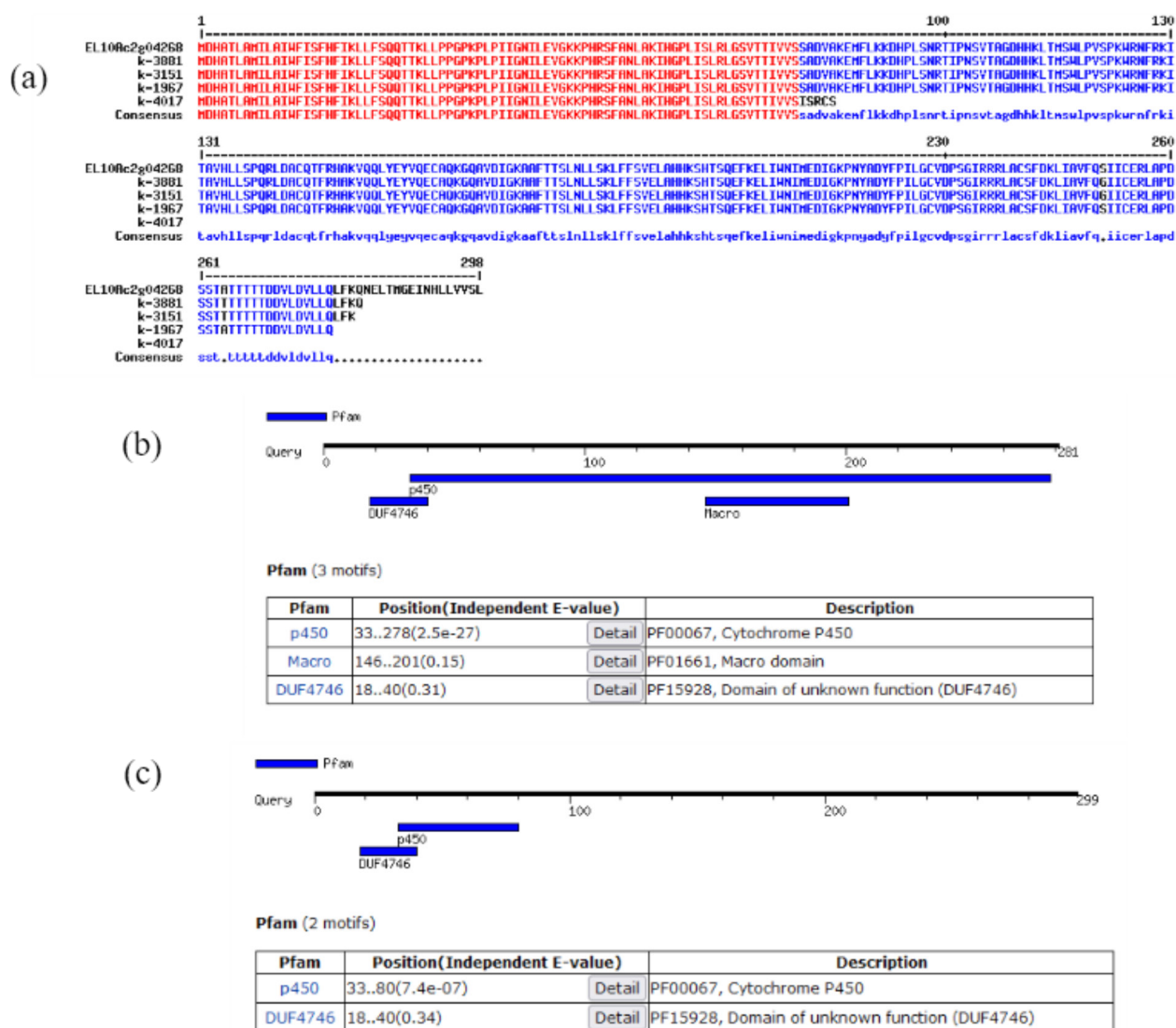


Рис. 2. Анализ аминокислотной последовательности, кодируемой первым экзоном гена *CYP76AD1*: (a) множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, кодируемых первым экзоном гена *CYP76AD1*, выполненное с помощью программы MultAlin; (b, c) функциональный домен семейства цитохром P450 (Pfam: PF00067), кодируемый первым экзоном гена *CYP76AD1* у (b) образцов к-3881, к-3151, к-1967 и (c) образца к-4017 с пятнисто-желтой окраской мякоти корнеплода

Fig. 2. Analysis of the amino acid sequence encoded by the first exon of *CYP76AD1*: (a) multiple alignment of the translated amino acid sequences of *CYP76AD1* performed with the MultAlin software; (b, c) the functional domain of the cytochrome P450 family (Pfam: PF00067) encoded by the first exon of the *CYP76AD1* gene in accessions (b) k-3881, k-3151, k-1967, and (c) k-4017 with spotted yellow color of the root flesh

сти первого экзона *CYP76AD5.2* являются синонимичными, за исключением трехнуклеотидной вставки САА, приводящей к появлению треонина в положении 272, аналогично *CYP76AD5.1* (рис. 3). Выявленные замены, вероятно, не влияют на функциональность белков *CYP76AD5.1* и *CYP76AD5.2*, поскольку размер и положение консервативного домена семейства P450, кодируемого в первом экзоне соответствующими генами, постоянны у всех образцов.

Однонуклеотидные замены в последовательности первого экзона гена *CYP76AD5.3* синонимичны, за исключением замен, приводящих к изменению в продукте гена аминокислотных остатков в положениях 243 и 261: полярного остатка треонина на неполярный аланин

(Thr243Ala) и полярного, положительно заряженного остатка аргинина на неполярный лейцин (Arg261Leu) в области домена семейства P450 (см. рис. 3 и Supplementary Materials, Suppl. 6)⁶. Изменение полярности аминокислотных остатков может нарушать исходную третичную укладку белка, что в свою очередь влияет на активность фермента.

С помощью программы NCBI Open Reading Frame Finder, предсказывающей расположение открытой рамки счи-

⁶ Приложение 6 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 6. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

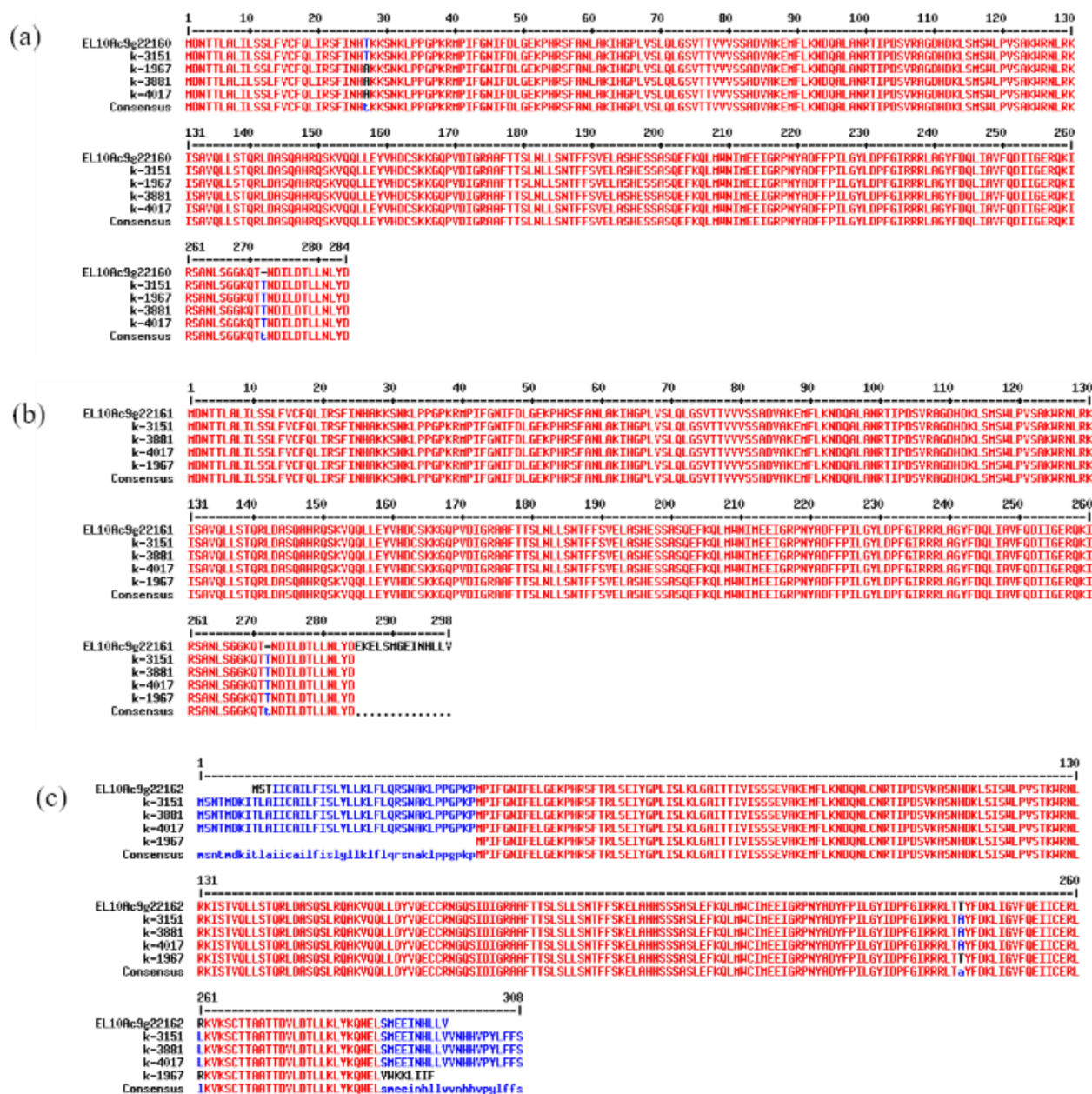


Рис. 3. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, кодируемых первым экзоном генов: (a) *CYP76AD5.1* (EL10Ac9g22160), (b) *CYP76AD5.2* (EL10Ac9g22161), (c) *CYP76AD5.3* (EL10Ac9g22162), выполненное с помощью программы MultAlin

Fig. 3. Multiple alignment of the translated amino acid sequences encoded by the first exon of: (a) *CYP76AD5.1* (EL10Ac9g22160), (b) *CYP76AD5.2* (EL10Ac9g22161), and (c) *CYP76AD5.3* (EL10Ac9g22162), performed using the MultAlin software

тивания на ресеквенированных последовательностях, удалось идентифицировать сайт начала транскрипции и определить длину аминокислотной последовательности CYP76AD5.3, которая у образца к-1967 с пятнисто-красной окраской мякоти корнеплода составила 254 аминокислотных остатка в сравнении с 308 у остальных. Согласно проведенному анализу в базе данных Pfam, консервативный домен семейства P450 (Pfam: PF00067) аннотируется в транслированной аминокислотной последовательности CYP76AD5.3 этого образца. Однако однозначные выводы о влиянии смещения рамки считывания на функциональность гена CYP76AD5.3 у образца к-1967, с учетом имеющихся данных, сделать невозможно.

При ресеквенировании аллелей гена CYP76AD6 у образцов свеклы столовой выявлены синонимичные и несинонимичные замены. У всех исследуемых образцов у продукта гена в положениях 150 и 161 остатки треонина и аспарагиновой кислоты меняются на аланин и валин соответственно (Supplementary Materials, Suppl. 7)⁷. Кроме того, у образцов к-3151, к-3881 и к-4017 наблюдается замена лизина на глутаминовую кислоту (Lys164Glu). Тем не менее размер и положение консервативного домена семейства цитохром P450 (Pfam: PF00067), согласно аннотации в базе данных Pfam, совпадают у белковых продуктов этого гена среди всех исследуемых образцов. В рамках рассмотрения мутаций, выявленных в промоторной области и первом экзоне, не обнаружено их негативного влияния на функцию CYP76AD6.

У образца к-3881 с белой окраской мякоти корнеплода в положении 205 пн от сайта начала транскрипции ATG детектирована делеция аденина, являющаяся причиной сдвига рамки считывания и появлению ряда несинонимичных замен в конце первого экзона (Supplementary Materials, Suppl. 8)⁸. У образцов к-4017, к-3881 и к-3151 в первом экзоне гена *BvDODA1* обнаружена несинонимичная замена цитозина на аденин, приводящая к замене у его продукта остатка треонина на аспарагин (Thr10Asn). Благодаря анализу аминокислотной последовательности, кодируемой первым экзоном гена *BvDODA1*, у образца с белой окраской мякоти, в базе данных Pfam было определено, что функциональный домен LigB (Pfam: PF02900), кодирующий каталитическую субъединицу В диоксигеназы, усечен с 66 до 52 аминокислотных остатков в сравнении с другими образцами (рис. 4).

В промоторной области гена *BvDODA1*, включающей 945 пн до сайта старта транскрипции, идентифицированы единичные однонуклеотидные замены, не выделяющие генотип образца с белой окраской мякоти корнеплода от остальных. Поскольку транскрипционный фактор *BvMYB1* связывается непосредственно с промоторным районом гена *BvDODA1*, отсутствие «уникальных» инделей в этой области может указывать на наличие сайта узнавания транскрипционного фактора. Вместе с этим данные о последовательностях двух других экзонов отсутствуют, и лишь косвенно можно заключить о вероятной утрате функциональности гена *BvDODA1* вследствие мутаций в первом экзоне, приводящих к отсутствию пигментов в мякоти корнеплода.

⁷ Приложение 7 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 7. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

⁸ Приложение 8 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 8. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

Регуляторный ген семейства *R2R3-Myb*, *BvMYB1* является позитивным регулятором биосинтеза беталаинов, активируя транскрипцию *CYP76AD1* и *BvDODA1* посредством связывания непосредственно с их промоторной последовательностью (Hatlestad et al., 2015).

Нуклеотидные последовательности ресеквенированных аллелей гена *BvMYB1* у образцов исследуемой выборки не отличаются от референсной, за исключением образца с пятнисто-красной окраской мякоти, где обнаружено несколько несинонимичных замен (Supplementary Materials, Suppl. 9)⁹. Среди них идентифицированы замены, приводящие к заменам в белке: лизина на глутаминовую кислоту (Lys25Glu), тирозина на лейцин (Tyr95Leu), треонина на изолейцин (Thr96Ile), валина на лейцин (Val102Leu), изолейцина на тирозин (Ile103Tyr), триптофана на аргинин (Trp104Arg), а также вставки из аминокислотных остатков: тирозина (Tyr-97), аланина (Ala-98), изолейцина (Ile-99), аргинина (Arg-100), лейцина (Leu-101) (рис. 5).

Повторы R2 и R3 специфического ДНК-связывающего домена R2R3-Myb имеют очень сходную структуру с мотивом «спираль – поворот – спираль», включая три «α-спирали» и два «поворота» между ними, хотя идентичность их последовательностей в tandemных повторях составляет всего 31%, при этом третьи спирали в обоих повторях напрямую распознают специфическую последовательность оснований – РуAACG/TG (Oda et al., 1997). Мотивы «спираль 1» и «спираль 2» домена R2 необходимы для специфического связывания с последовательностью ДНК, в то время как третья спираль важна для его распознавания (Saikumar et al., 1990).

Для моделирования 3D-структуры белков использовали шаблон 6kks, размещенный в репозитории SWISS-MODEL (SMTL ID: 6kks). Выявленные аминокислотные замены меняют пространственную организацию белка у образца к-1967 в области фрагмента «поворот» между первой и второй «спиралями» в консервативном мотиве домена R3, что, вероятно, может повлиять на эффективность распознавания и связывания с целевой последовательностью ДНК (см. рис. 5).

BvMYB1 исключается из списка потенциальных генов-мишеней для нокаута с целью увеличения накопления бетацианинов, поскольку кодируемый им транскрипционный фактор усиливает транскрипцию генов *CYP76AD1* и *BvDODA1*, связываясь с промоторным районом этих структурных генов. Участие генов *CYP76AD1* и *BvDODA1* в процессе биосинтеза пигментов красного оттенка также необходимо, поскольку они кодируют ферменты, осуществляющие превращение ДОФА в цикло-ДОФА и беталамовую кислоту – предшественников красных бетацианинов (Hatlestad et al., 2012; Brockington et al., 2015). В связи с этим в качестве генов-мишеней для нокаута могут рассматриваться *CYP76AD5.1*, *CYP76AD5.2*, *CYP76AD5.3* и *CYP76AD6*.

Обсуждение

Пионерские работы по выявлению в геноме сахарной свеклы локусов, ассоциированных с признаком окраски корнеплода, листьев и гипокотыля, датируются первой половиной прошлого века. Путем генетического анализа выделены два локуса R (red) и Y (yellow) (Kajanus, 1917;

⁹ Приложение 9 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 9. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-1-139-151>.

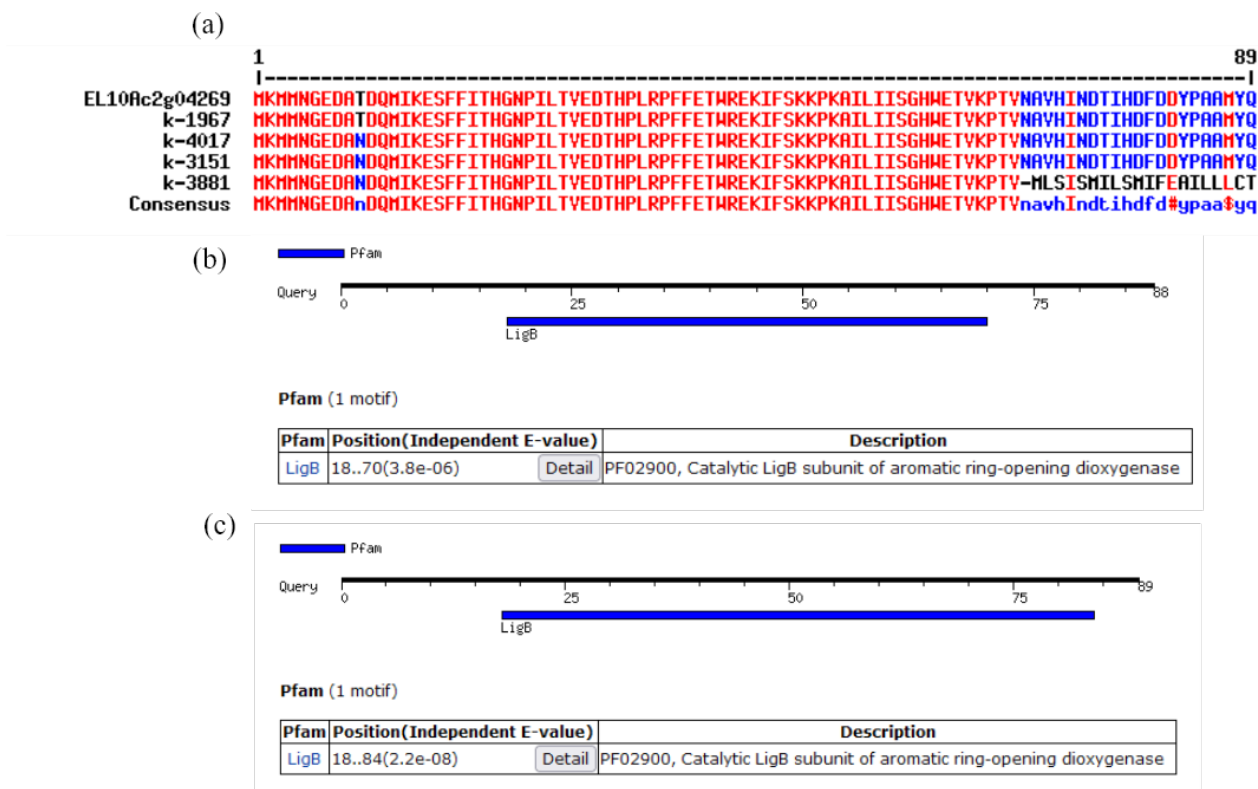


Рис. 4. Анализ аминокислотной последовательности, кодируемой первым экзоном гена *BvDODA1*:

(a) – множественное выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей, кодируемых первым экзоном гена *BvDODA1*, выполненное с помощью программы MultAlin; (b, c) – функциональный домен LigB (Pfam: PF02900) у (b) образца к-3881 с белой окраской мякоти корнеплода; (c) образцов к-4017, к-3151, к-1967

Fig. 4. Analysis of the amino acid sequence encoded by the first exon of the *BvDODA1* gene:

(a) multiple alignment of the translated amino acid sequences performed using the MultAlin software; (b) the functional domain of the LigB family (Pfam: PF02900) encoded by the first exon of the *BvDODA1* gene in accession k-3881 with white color of the root flesh; (c) in accessions k-4017, k-3151, and k-1967

Keller, 1936). Позднее было показано, что гены в двух сцепленных локусах *R* и *Y* ответственны за накопление беталаинов у свеклы столовой и определяют признак окраски корнеплода (красный, желтый или белый). В этих локусах выявлены и картированы гены *CYP76AD1* и *BvMYB1* соответственно (Hatlestad et al., 2012; Hatlestad et al., 2015). Наличие или отсутствие пигментации мякоти корнеплода (красная или белая окраска) определяется аллельным состоянием генов в *Y*-локусе. Фенотип свеклы столовой с красной окраской мякоти проявляется в присутствии доминантных аллелей генов как в локусе *R*, так и в локусе *Y*. В случае желтой окраски имеются идентичные рецессивные аллели *r* в соответствующих хромосомных локусах, тогда как генотип свеклы с белой окраской мякоти соответствует *R*-уу или *rr*уу в сочетании с красной окраской гипокотилеа либо желто-зеленой соответственно. Выявлен ген «пятнистости» *bl*, различные аллельные состояния которого ассоциируются с равномерностью распределения пигмента в корнеплоде – рецессивные гомозиготные по этому гену формы имеют характерные кольца белого цвета вследствие нарушения процесса биосинтеза беталаинов (Watson, Goldman 1997; Goldman, Austin 2000). В рамках исследуемой выборки данный фенотип наблюдается у образцов 'Сердолик' и 'Кубанская Борщевая' (см. табл. 1).

Ряд исследователей выделяют именно *CYP76AD1* как основной ген-кандидат, ответственный за формирование признака красной окраски корнеплода (Hatlestad

et al., 2012; Polturak et al., 2015; Sunnadeniya et al., 2016). Присутствие *CYP76AD1* приводило к окрашиванию цветков табака в красный цвет, тогда как вследствие накопления транскриптов только одного *CYP76AD6* фенотип характеризовался желтой окраской. Совместное влияние продуктов данных генов проявлялось в окрашивании цветков табака в желто-красный цвет (Polturak et al., 2017). В дополнение к этому при коэкспрессии *CYP76AD6* и *BvDODA1* в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* культуральная среда окрашивалась в желтый цвет, *CYP76AD1*, *CYP76AD6* и *BvDODA1* – в красный, а *CYP76AD1* и *BvDODA1* – в более темный, красно-фиолетовый (Sunnadeniya et al., 2016).

У образца с желтой окраской мякоти корнеплода к-4017 была детектирована нонсенс-мутация в гене *CYP76AD1*. Учитывая результаты проведенных ранее исследований, мы предполагаем, что проявление подобного фенотипа связано с утратой функции *CYP76AD1* и участием только двух белковых продуктов генов *CYP76AD6* и *BvDODA1* в процессе биосинтеза беталаиновых пигментов. Таким образом, в генотипе образцов к-3151, к-1967 и к-3881 присутствует доминантная аллель *R*, в то время как у образца к-4017 наблюдается гомозиготное рецессивное состояние *rr* (см. табл. 1).

У образца свеклы столовой с белой окраской мякоти корнеплода и красным гипокотилем, с учетом рассмотренных промоторных последовательностей и области первого экзона, мутаций, влияющих на подавление функции

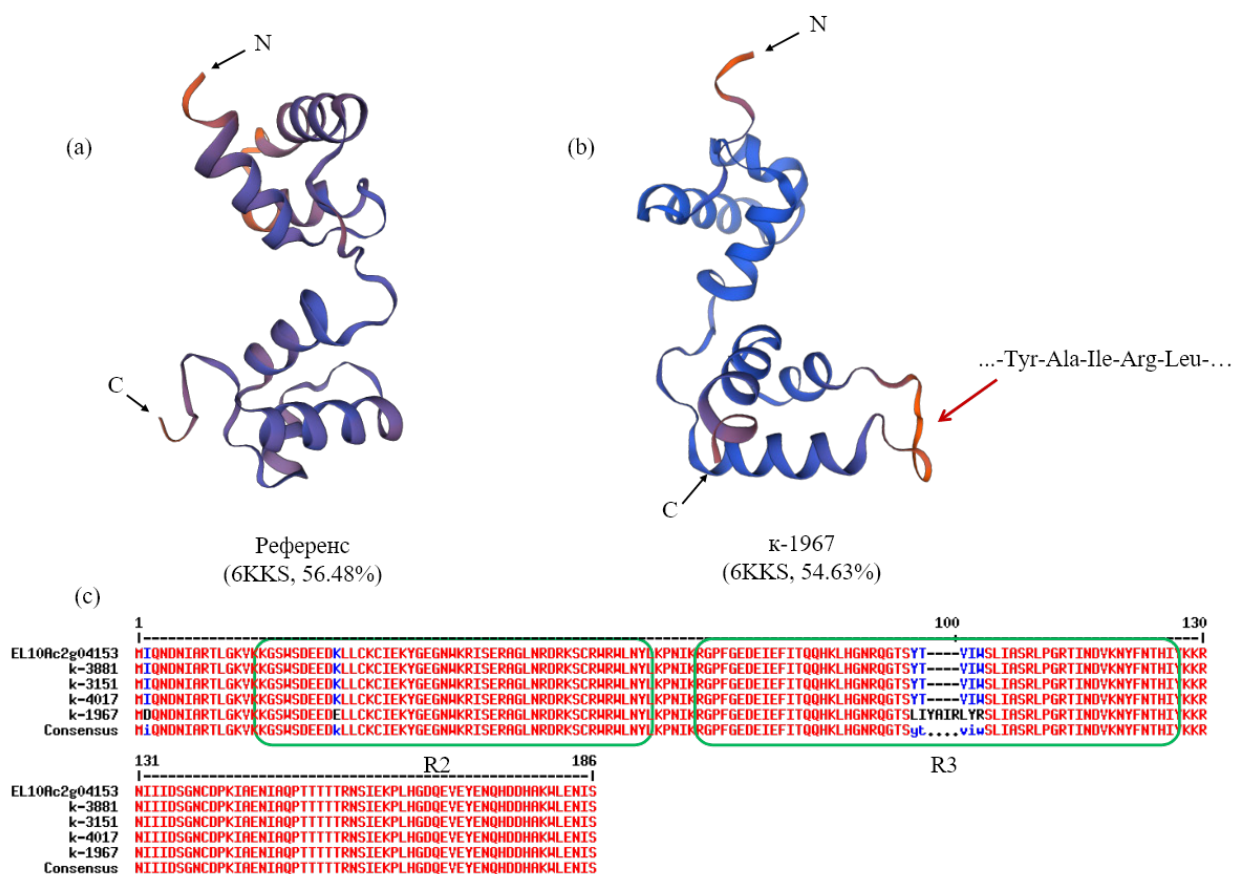


Рис. 5. Белки семейства R2R3-MYB: (a, b) предсказанные 3D-структуры структуры белков семейства R2R3-MYB, соответствующие (a) референсу и (b) образцу к-1967 с красно-пятнистой окраской мякоти корнеплода (в скобках указан процент идентичности аминокислотных последовательностей между модельным белком шаблона 6KKS и исследуемым); (c) множественное выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей *BvMYB1* (Phytozome: EL10Ac2g04153), выполненное с помощью программы MultAlin. Рамкой зеленого цвета выделены консервативные функциональные домены R2 и R3

Fig. 5. Proteins of the R2R3-MYB family: (a, b) predicted 3D structures of the R2R3-MYB family proteins corresponding to (a) the reference and (b) accession k-1967 with spotted red color of the root flesh (parenthesized is the identity percentage between the model 6KKS and the studied sequences); (c) multiple alignment of the translated amino acid sequences of *BvMYB1* (Phytozome: EL10Ac2g04153) performed using the MultAlin software. The green frame highlights the conservative functional R2 and R3 domains

генов семейства цитохром P450 *CYP76AD1* и *CYP76AD6*, не выявлено. Однако в последовательности первого экзона гена *BvDODA1* обнаружен ряд миссенс-мутаций, вследствие которых выявляемый функциональный домен LigB укорачивается. Ранее сообщалось, что при коэкспрессии генов свеклы *CYP76AD1* и *CYP76AD6*, последовательности которых были ресеквенированы и клонированы в вектор для сверхэкспрессии под контроль индуцируемых галактозой промоторов с дальнейшей его трансформацией в клетки *Saccharomyces cerevisiae*, без вовлечения гена диоксигеназы *BvDODA1*, культуральная среда с клетками дрожжей оставалась бесцветной (Polturak et al., 2015). В связи с этим мы предполагаем, что неокрашенный фенотип у к-3881 наблюдается вследствие нарушения функции *BvDODA1*.

Интерес представляют и другие гены семейства цитохром P450, поскольку путем вариации активности генов α-клады (*CYP76AD1*) и β-клады (*CYP76AD5*, *CYP76AD6*) возможно контролировать проявление желтого или красного оттенка растительных тканей (Polturak et al.,

2017). Деление генов семейства цитохром P450 на α- и β-кладу сопряжено с расхождением функций генов в процессе биосинтеза беталаиновых пигментов: продукты α-клады участвуют в двух последовательных превращениях тирозина до цикло-ДОФА, тогда как β-клады – только в гидроксировании тирозина (Sunnadeniya et al., 2016).

При одновременной экспрессии *CYP76AD5*, а именно *CYP76AD5.2* и *BvDODA1*, ткани проростков арабидопсиса окрашивались в желтый цвет благодаря накоплению бетаксантинов, тогда как красных бетацианинов обнаружено не было (Sunnadeniya et al., 2016). Таким образом, *CYP76AD5.2*, а также найденные гомологичные копии *CYP76AD5.1* и *CYP76AD5.3* стоит рассматривать как гены-мишени для редактирования с целью уменьшения накопления бетаксантинов.

Благодаря широкому генетическому разнообразию образцов свеклы столовой, представленных в коллекции ВИР, имеется уникальная возможность вести отбор наиболее перспективных для селекции форм. К настоящему

моменту сформирован набор образцов свеклы столовой с повышенным содержанием бетанина, которая представляет наибольший интерес в качестве объекта для геномного редактирования (Sokolova, Solovieva, 2019; Sokolova, 2022). Согласно проведенному ранее биохимическому анализу, в корнеплоде свеклы столовой, несмотря на преобладающее содержание красных бетацианинов, присутствуют и бетаксантины (Sokolova et al., 2022). К примеру, рассматриваемый в данной работе образец сорта 'Бордо Односемянная' (к-3151, Россия) с темно-бордовой окраской мякоти включен в эту группу и, аналогично другим образцам с подобными характеристиками, у него зафиксированы желтые бетаксантины. Мутаций, негативно влияющих на функции ключевых генов биосинтеза беталаиновых пигментов, в генотипе образца к-3151 обнаружено не было. Как выяснилось в результате сравнения полученных аллельных различий с имеющимися литературными данными, за накопление желтых бетаксантинов ответственны гены семейства цитохром P450 β -клады, *CYP76AD5* и *CYP76AD6* (Polturak et al., 2015; Polturak et al., 2017; Sunnadeniya et al., 2016). Поскольку продукт гена *CYP76AD1* участвует в двух последовательных этапах превращения тирозина в цикло-ДОФА, тогда как *CYP76AD5* и *CYP76AD6* кодируют ферменты, осуществляющие только гидроксирование тирозина, нокаут генов *CYP76AD5.1*, *CYP76AD5.2*, *CYP76AD5.3* либо *CYP76AD6*, вероятно, не повлияет на процесс превращения метаболитов в общей схеме биосинтеза красных бетацианинов, однако может уменьшить накопление желтых бетаксантинов в мякоти корнеплода свеклы столовой (Grützner et al., 2021). В свою очередь потеря функции гена *CYP76AD1* повлечет обрыв цепи превращений по пути циклизации L-ДОФА, что приведет к полному отсутствию красных бетацианинов и позволит получить формы свеклы столовой с желтой окраской мякоти корнеплода.

Заключение

В данном исследовании проведен скрининг аллельных различий по ключевым генам биосинтеза беталаинов у форм свеклы столовой с контрастной окраской мякоти корнеплода. Он позволил не только уточнить роль ключевых генов в процессе биосинтеза беталаиновых пигментов, но и выбрать наиболее подходящие гены-мишени для геномного редактирования. Впервые выявлена консенс-мутация в гене *CYP76AD1* у образца с желтой окраской мякоти корнеплода, а также ряд миссенс-мутаций в гене *BvDODA1*, вероятно, приводящих к неокрашенному фенотипу. С целью получения форм с более темной окраской мякоти корнеплода методами геномного редактирования мы предлагаем рассматривать гены *CYP76AD6*, *CYP76AD5.2* (а также обнаруженные нами в ходе анализа *in silico* высокоомологичные копии *CYP76AD5.1* и *CYP76AD5.3*) как потенциальную мишень/мишени для нокаута у образцов с красной или темно-бордовой окраской мякоти корнеплода. Результаты данного исследования также могут быть полезны в маркер-ориентированной селекции при отборе генотипов с заданными характеристиками. Созданные сорта в перспективе будут иметь важное стратегическое значение для успешной реализации программы импортозамещения, а также являться основой для формирования надежной отечественной сырьевой базы в пищевой, фармацевтической и косметической отраслях промышленности.

References / Литература

- Bastos E.L., Schliemann W. Betalains as antioxidants. In: H.M. Ekiert, K.G. Ramawat, J. Arora (eds). *Plant Antioxidants and Health. Reference Series in Phytochemistry*. Cham: Springer; 2022. p.51-93. DOI: 10.1007/978-3-030-78160-6_9
- Brockington S.F., Yang Y., Gandia-Herrero F., Covshoff S., Hibberd J.M., Sage R.F. et al. Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*. 2015;207(4):1170-1180. DOI: 10.1111/nph.13441
- GenomeNet. MOTIF Search: [website]. Available from: <https://www.genome.jp/tools/motif/> [accessed Oct. 19, 2023].
- Goldman I.L., Austin D. Linkage among the *R*, *Y* and *BI* loci in table beet. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000;100(3-4):337-343. DOI: 10.1007/s001220050044
- Gopalan M., Jadhav A.S. Protective effect beetroot *Beta vulgaris* extract against H₂O₂ Induced Oxidative stress in U87MG glioma cells. *South Asian Journal of Experimental Biology*. 2021;11(3):266-274. DOI: 10.38150/sajeb.11(3).p266-274
- Grützner R., Schubert R., Horn C., Yang C., Vogt T., Marillonnet S. Engineering betalain biosynthesis in tomato for high level betanin production in fruits. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:682443. DOI: 10.3389/fpls.2021.682443
- Hatlestad G.J., Akhavan N.A., Sunnadeniya R.M., Elam L., Cargile S., Hembd A. et al. The beet *Y* locus encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway. *Nature Genetics*. 2015;47(1):92-96. DOI: 10.1038/ng.3163
- Hatlestad G.J., Sunnadeniya R.M., Akhavan N.A., Gonzalez A., Goldman I.L., McGrath J.M. et al. The beet *R* locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nature Genetics*. 2012;44(7):816-820. DOI: 10.1038/ng.2297
- Integrated DNA Technologies: [website]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Fanalyze> [accessed Oct. 19, 2023].
- Kajanus B. Über die Farbenavriation der Beta-Rüben. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*. 1917;5(4): 357-372. [in German]
- Keller W. Inheritance of some major color types in beets. *Journal of Agricultural Research*. 1936;52(1):27-35.
- Khan M.I., Giridhar P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*. 2015;117:267-295. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.06.008
- MEGA Software. Molecular Evolutionary Genetics Analysis: [website]. Available from: <https://www.megasoftware.net/> [accessed Oct. 19, 2023].
- MultAlin. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering: [website]. Available from: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> [accessed Oct. 19, 2023].
- NCBI. National Center for Biotechnology Information: [website]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [accessed Oct. 19, 2023].
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Open Reading Frame Finder: [website]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> [accessed Oct. 19, 2023].
- Ninfali P., Antonini E., Frati A., Scarpa E.S. C-glycosyl flavonoids from *Beta vulgaris* Cicla and betalains from *Beta vulgaris* rubra: antioxidant, anticancer and antiinflammatory activities – A review. *Phytotherapy Research*. 2017;31(6):871-884. DOI: 10.1002/ptr.5819
- Oda M., Furukawa K., Ogata K., Sarai A., Ishii S., Nishimura Y. et al. Identification of indispensable resi-

- dues for specific DNA-binding in the imperfect tandem repeats of c-Myb R2R3. *Protein Engineering, Design and Selection*. 1997;10(12):1407-1414. DOI: 10.1093/protein/10.12.1407
- Pfam. The Protein Family Database: [website]. Available from: <http://pfam.xfam.org/> [accessed Oct. 19, 2023].
- Phytozome 13. The Plant Genomics Resource: [website]. Available from: https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Bvulgaris_EL10_1_0 [accessed Oct. 19, 2023].
- Polturak G., Breitel D., Grossman N., Sarrion-Perdigones A., Weithorn E., Pliner M. et al. Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. *New Phytologist*. 2015;210(1):269-283. DOI: 10.1111/nph.13796
- Polturak G., Grossman N., Vela-Corcia D., Dong Y., Nudel A., Pliner M. et al. Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(34):9062-9067. DOI: 10.1073/pnas.1707176114
- Saikumar P., Murali R., Reddy E.P. Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(21):8452-8456. DOI: 10.1073/pnas.87.21.8452
- SnapGene. SnapGene Viewer: [website]. Available from: <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer> [accessed Oct. 19, 2023].
- Sokolova D.V. Genetic diversity of the table beet (*Beta L.*) collection at VIR as a potential source for breeding (a review). *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(4):239-50. [in Russian] (Соколова Д.В. Генетическое разнообразие коллекции столовой свеклы ВИР (*Beta L.*) как потенциал для селекции (обзор). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(4):239-250). DOI: 10.30901/2227-8834-2022-4-239-250
- Sokolova D.V., Shvachko N.A., Mikhailova A.S., Popov V.S. Betalain content and morphological characteristics of table beet accessions: their interplay with abiotic factors. *Agronomy*. 2022;12(5):1033. DOI: 10.3390/agronomy12051033
- Sokolova D.V., Solovieva A.E. Promising initial material for breeding of beet varieties with a high content of betalain. *Agrarian Russia*. 2019;(8):26-32. [in Russian] (Соколова Д.В., Соловьева А.Е. Перспективный исходный материал для селекции сортов свеклы с высоким содержанием бетанина. *Аграрная Россия*. 2019;(8):26-32). DOI: 10.30906/1999-5636-2019-8-26-32
- Stintzing F.C., Carle R. Betalains – emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science and Technology*. 2007;18(10):514-525. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.04.012
- Strack D., Vogt T., Schliemann W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*. 2003;62(3):247-269. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00564-2
- Sunnadeniya R., Bean A., Brown M., Akhavan N., Hatlestad G., Gonzalez A. et al. Tyrosine hydroxylation in betalain pigment biosynthesis is performed by cytochrome P450 enzymes in beets (*Beta vulgaris*). *PLoS One*. 2016;11(2):e0149417. DOI: 10.1371/journal.pone.0149417
- SWISS-MODEL Interactive Workspace: [website]. Available from: <https://swissmodel.expasy.org/interactive> [accessed Oct. 19, 2023].
- SWISS-MODEL Template Library (SMTL): [website]. Available from: <https://swissmodel.expasy.org/templates/6kks.1> [accessed Oct. 19, 2023].
- Tesoriere L., Allegra M., Butera D., Livrea M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;80(4):941-945. DOI: 10.1093/ajcn/80.4.941
- Unipro UGENE. Unipro UGENE 49.1: [сайт]. URL: <https://ugene.net/ru/> [дата обращения: 19.10.2023].
- UniProt. Align: [website]. Available from: <https://www.uniprot.org/align> [accessed Oct. 19, 2023].
- UVA FASTA Server. Local DNA alignments (lalign): [website]. Available from: https://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=lalign&pgm=lal [accessed Oct. 19, 2023].
- Wang B., Luo Q., Li Y., Yin L., Zhou N., Li X. et al. Structural insights into target DNA recognition by R2R3-MYB transcription factors. *Nucleic Acids Research*. 2019;48(1):460-471. DOI: 10.1093/nar/gkz1081
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(1):296-303. DOI: 10.1093/nar/gky427
- Watson J.F., Goldman I.L. Inheritance of a gene conditioning blotchy root color in table beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Heredity*. 1997; 88(6):540-543. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a023154
- Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):178-189. [in Russian] (Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):178-189). DOI: 10.18699/VJ21.022

Информация об авторах

Александра Сергеевна Михайлова, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, a.mikhailova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4565-1539>

Диана Викторовна Соколова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, dianasokol@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9967-7454>

Наталья Альбертовна Швачко, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, n.shvachko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

Виталий Сергеевич Попов, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, popovitaly@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3274-7662>

Елена Константиновна Хлесткина, доктор биологических наук, профессор РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, руководитель направления «Биология и биотехнология растений», Научно-технологический университет «Сириус», Центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Information about the authors

Aleksandra S. Mikhailova, Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, a.mikhailova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4565-1539>

Diana V. Sokolova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, dianasokol@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9967-7454>

Natalia A. Shvachko, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, n.shvachko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

Vitaliy S. Popov, Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, popovitaly@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3274-7662>

Elena K. Khlestkina, Dr. Sci. (Biology), Professor of the RAS, Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, Plant Biology and Biotechnology Research Manager, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiyskiy Ave., Sirius Settlement, Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 20.10.2023; одобрена после рецензирования 29.12.2023; принята к публикации 04.03.2024.
The article was submitted on 20.10.2023; approved after reviewing on 29.12.2023; accepted for publication on 04.03.2024.