

КРЫЛОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ
ДЕТЕРМИНАНТНЫЙ ТИП РОСТА СТЕБЛЯ *VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.
В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ ВЛАЖНОСТИ ВОЗДУХА**

Специальность 1.5.7. – Генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2024

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

**Научный
руководитель:**

Хлесткина Елена Константиновна
доктор биологических наук, профессор РАН, директор
Всероссийского института генетических ресурсов растений
имени Н.И. Вавилова, г. Санкт-Петербург

**Официальные
оппоненты:**

Дорогина Ольга Викторовна
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией интродукции редких и
исчезающих видов растений Федерального
Государственного бюджетного учреждения науки
«Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского
отделения Российской академии наук» (ЦСБС СО РАН),
г. Новосибирск

Брускин Сергей Александрович
кандидат биологических наук, доцент,
заведующий лабораторией функциональной геномики
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук», г. Москва

**Ведущая
организация**

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-
Петербург

Защита состоится « » 2024 года в часов на заседании диссертационного совета
Д 24.1.235.01, созданного на базе ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая
Морская, д. 44, телефон: 8(812) 312-51-61; факс: 8(812) 570-47-70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических
ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: www.vir.nw.ru.

Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Рогозина Елена Вячеславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Вигна *Vigna unguiculata* (L.) Walp. относится к числу важнейших зернобобовых культур. За последние 10 лет площадь под посевами вигны в мире увеличилась в 1,3 раза и в 2022 году составила более 15 млн га, мировое производство – более 9 млн тонн (FAO, 2024). Вигна обладает характеристиками, благодаря которым она может быть включена в разные системы земледелия. Растения успешно возделывают в условиях, которые считаются экстремальными для выращивания других зернобобовых культур: при высоких температурах, при небольшом количестве осадков и на бедных почвах (Бурляева и др., 2021; Boukar et al., 2015; Boukar et al., 2019). Благодаря высокой урожайности и питательной ценности, хорошим вкусовым качествам, а также устойчивости ко многим неблагоприятным абиотическим факторам интерес к вигне в Российской Федерации возрастает. Производители сельскохозяйственной продукции отдают предпочтение сортам с кустовой формой, отличающимся детерминантным типом роста, скороспелостью, продуктивностью и дружным созреванием бобов. Такие сорта устойчивы к полеганию и пригодны к механизированному возделыванию.

Известно, что архитектура надземной части растения в большой степени связана с функционированием клеток апикальной меристемы побега. На переход от вегетативного роста к репродуктивной фазе оказывают влияние экзогенные и эндогенные факторы. Важнейшую роль в данном процессе играет ген *LFY*, экспрессию которого в центре апикальной меристемы подавляет *TFL1* (Benlloch et al., 2006; Moraes et al., 2019; Périlleux et al., 2019). Главной функцией гена *TFL1* является поддержание недетерминированного состояния апикальной меристемы побега, а также подавление перехода меристемы соцветия во флоральную меристему. Это в свою очередь отражается на архитектонике растения. У *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. к группе *TFL1*-подобных генов относятся три гена – *TFL1*, *ATC* и *BFT* (Karlgrén et al., 2011).

Вигна представляет интерес для промышленного возделывания на Дальнем Востоке как культура с отличным экспортным потенциалом. Вместе с тем, наблюдается изменение архитектуры растений этой теплолюбивой засухоустойчивой культуры при испытании сортов в условиях муссонного климата, растения утрачивают свойство компактности и представляют собой лианы с индетерминантным типом роста. В настоящее время только один из сортов вигны Лянчихе селекции ВИР включен в Государственный реестр селекционных достижений, допущен и адаптирован к использованию в муссонном климате юга Приморского края (Бурляева и др., 2019). Однако, генетические особенности, обеспечивающие толерантность сорта Лянчихе к условиям повышенной влажности, неизвестны. Выявление этих особенностей – ключ к разработке подходов целенаправленной селекции вигны с целью расширения ареала ее возделывания за пределы регионов с сухим и жарким климатом. Исследований влияния повышенной влажности воздуха на изменение уровня экспрессии генов у вигны ранее не проводилось. Сравнительный анализ контрастных по типу роста стебля образцов *V. unguiculata* в разных эколого-географических условиях, отличающихся по влажности воздуха, и в контролируемых условиях с различной влажностью воздуха ранее также не осуществлялся.

Цель исследования – выявление молекулярно-генетических механизмов, определяющих сохранение детерминантного типа роста вигны в условиях повышенной влажности воздуха.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить изменчивость морфологических и фенологических признаков у контрастных по типу роста образцов *V. unguiculata* в разных эколого-географических условиях и в контролируемых искусственных условиях с различной влажностью воздуха.
2. Выявить и исследовать структурную организацию *TFL1*-подобных генов у контрастных по типу роста образцов *V. unguiculata*.
3. На основе сравнительного RNA-seq анализа образцов, контрастных по типу роста, идентифицировать дифференциально экспрессирующиеся гены, вовлеченные в генотип-специфический ответ вигны в разных условиях влажности воздуха.

Методология и методы исследования. Проведено сравнительно-морфологическое описание растений в различных эколого-географических условиях. Использованы методы *in silico* и молекулярно-генетического анализов (выделение нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в реальном времени, секвенирование по Сэнгеру). Осуществлен биоинформатический анализ результатов РНК-секвенирования. Варьирование и взаимосвязи признаков проанализированы с помощью базовых и многомерных статистических методов.

Научная новизна. Впервые проведена одновременная комплексная оценка образцов вигны в условиях Астраханской области, Приморского и Краснодарского краев. Показано наличие положительной корреляции длины растения с количеством осадков и со средними показателями относительной влажности воздуха. Отмечено, что реакция генотипов на изменение условий произрастания различна.

Впервые в геноме вигны установлен высококонсервативный гомолог гена *TFL1*, а также идентифицированы гены *ATC* и *BFT*, выполнено секвенирование и охарактеризован полиморфизм нуклеотидных последовательностей аллелей *TFL1*-подобных генов. Информация о генах размещена в международной базе нуклеотидных последовательностей NCBI (PQ296064–PQ296080, PQ358534, PQ450489–PQ450494).

Впервые проведено высокопроизводительное секвенирование РНК образцов с разными типами роста стебля, выращенных в контрастных по влажности воздуха условиях. Информация о секвенировании РНК размещена в международной базе NCBI, Sequence Read Archive (BioProject ID: PRJNA1169611; SAMN44078771–SAMN44078794). Определены генотип-специфичные изменения уровня экспрессии генов при повышенной влажности воздуха. У образцов с индетерминантным типом роста (к-6 и к-642) детектировано снижение уровня экспрессии *Vigun05g252100 (TOE1)*, одного из возможных ингибиторов перехода к цветению. У образца с детерминантным типом роста (к-2056) отмечено снижение экспрессии генов (*JAZ1*, *JAZ6* и *JOX1*, *JOX2*), связанных с метаболизмом и сигналингом жасмоновой кислоты. Эти гены вносят наиболее выраженный вклад в ответ вигны на повышенную влажность воздуха.

Теоретическая и практическая значимость. В результате четырехлетнего полевого изучения получены новые знания о диапазоне изменчивости комплекса морфологических и фенологических признаков, которые могут быть полезны при планировании экспериментов по созданию нового исходного селекционного материала.

Результаты проведенного *in silico* анализа *TFL1*-подобных генов вигны будут полезны при планировании этапов изучения молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе поддержания недетерминированности апикальной меристемы побега, а также в контроле перехода растений к цветению.

Важное теоретическое и практическое значение имеют представленные в работе результаты секвенирования РНК образцов вигны, выращенных в контрастных по влажности воздуха условиях. Полученная в ходе исследования база данных (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024624060 от 11.09.2024) включает список генов, уровень экспрессии которых изменился в условиях избыточного увлажнения, указаны названия генов согласно геномной базе данных Phytozome. База данных предназначена для применения в научных исследованиях с целью изучения молекулярных механизмов адаптации растений к условиям повышенной влажности воздуха.

Полученные результаты используются в образовательных программах магистратуры в Университете «Сириус» и Адыгейском государственном университете, а также в курсах дополнительных образовательных программ ВИР.

Положения, выносимые на защиту:

1. Структурные особенности *TFL1*-подобных генов вигны не связаны с особенностью стабильно сохранять компактную архитектуру растений в разных условиях эколого-географических условиях.
2. Генотип-специфические особенности метаболизма и сигналинга жасмоновой кислоты, выявленные в результате сравнительного транскриптомного анализа вигны, вносят наиболее

выраженный вклад в поддержание компактности растений вигны сорта Лянчixe в условиях повышенной влажности.

Степень достоверности и апробация результатов. Исследование выполнено с использованием классических и современных методик, с применением высокотехнологичного оборудования. Воспроизводимость и статистическая обработка данных подтверждают достоверность полученных результатов. Иллюстративные материалы, таблицы и приложения подкрепляют сделанные выводы. Результаты исследования опубликованы в изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией (ВАК). Результаты диссертационной работы были представлены на конференциях: «125 лет прикладной ботаники в России», Санкт-Петербург, 2019; 11-й Международной школе молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика», SBV-2019, Новосибирск, 2019; 12-й Международной школе молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика», SBV-2020, Ялта и Севастополь, Республика Крым, 2020; Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых ученых, посвященных 130-летию ИФР РАН и 100-летию со дня рождения чл.-корр. РАН Р.Г. Бутенко – «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее», Москва, 2021; Международной конференции «Современные проблемы генетики, радиобиологии, радиоэкологии и эволюции» (GRRE2021), Ереван, Армения, 2021; V Вавиловской международной конференции, Санкт-Петербург, 2022; VII Международной Научной Конференции «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология Растений» PlantGen, Казань, 2023; Международной научной конференции по биологии и биотехнологии растений (ICPBV 2024), Алматы, Казахстан, 2024; «Растения в муссонном климате – X: Растительный генофонд востока Азии и климат», Владивосток, 2024.

Публикации. Результаты исследования опубликованы в шести статьях в журналах, рекомендованных ВАК, и входящих в международные системы цитирования Scopus и Web of Science, и одна статья принята в печать изданием «Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции» на 2024 год. Зарегистрирована полученная в ходе исследования база данных, включающая список генов, уровень экспрессии которых изменился в условиях избыточного увлажнения (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024624060 от 11.09.2024 г.).

Личный вклад автора. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно в лаборатории постгеномных исследований ВИР. Автор лично осуществлял анализ литературных данных по теме работы, проведение лабораторных исследований молекулярными методами, обработку экспериментальных данных, подготовку статей и докладов на конференциях. Планирование экспериментов и обсуждение результатов осуществлялось совместно с научным руководителем. Полевые опыты проводились совместно с сотрудниками отдела генетических ресурсов зернобобовых культур ВИР, а также филиалов Астраханской, Адлерской и Дальневосточной опытных станций ВИР.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 170 страницах. Состоит из введения, основной части, содержащей 14 таблиц и 42 иллюстрации, заключения, списка литературы (включает 170 наименований из них 132 на иностранном языке) и девяти приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены сведения о вигне, о влиянии условий произрастания на рост и развитие растений. Отдельный раздел посвящен данным о влиянии повышенной влажности воздуха на изменчивость морфологических признаков, а также на уровень фитогормонов растений. Описаны гены, участвующие в процессах сигналинга и метаболизма фитогормонов в ответ на избыточное увлажнение. Рассмотрены аспекты генетического контроля детерминантного характера роста зернобобовых культур, отмечены основные гены, контролирующие данный признак. Особое внимание уделено транскриптомному анализу как

одному из современных подходов для поиска ключевых генов, экспрессия которых меняется в ответ на воздействие различных стрессовых факторов.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Материал исследования. Материалом для исследования послужили образцы вигны *V. unguiculata* трех подвидов (*unguiculata* (L.) Walp., *sesquipedalis* (L.) Verdc., *cylindrica* (L.) Verdc.) из коллекции ВИР (таблица 1).

Таблица 1 – Образцы вигны, включенные в изучение

№ п/п	№ по каталогу ВИР	Название образца	Происхождение	Год включения в коллекцию	Подвид	Тип роста стебля
1	к-6	Сорт Clay	США	1921	<i>unguiculata</i>	индетерминантный
2	к-639		Китай	1929	<i>sesquipedalis</i>	индетерминантный*
3	к-640		Китай	1929	<i>sesquipedalis</i>	индетерминантный*
4	к-642		Китай	1929	<i>sesquipedalis</i>	индетерминантный*
5	к-2056	Сорт Лянчхе	Россия, Приморский край	2018	<i>sesquipedalis</i>	детерминантный
6	к-1783		Германия	1985	<i>cylindrica</i>	индетерминантный**

* – в условиях Астраханской опытной станции растения кустовые с вьющейся верхушкой, в условиях Дальневосточной опытной станции – лианы

** – в условиях Астраханской опытной станции растения кустовые, в условиях Дальневосточной опытной станции – кустовые с вьющейся верхушкой

Экспериментальные образцы характеризовались разными типами роста стебля, а также отражали весь спектр изменчивости этого признака в различных климатических условиях. Включенные в изучение образцы были отобраны по результатам многолетнего исследования коллекции вигны на опытных станциях ВИР (Бурляева и др., 2014). Фенотипическая оценка в контролируемых условиях влажности проводилась у образцов к-639, к-640, к-642 и к-2056, в эколого-географическом опыте к ним добавили образцы к-6 и к-1783, затем на основе результатов фенотипического анализа были выбраны образцы для транскриптомного анализа (к-6, к-642, к-1783, к-2056).

Методы исследования. Для исследования изменчивости морфологических признаков образцов экспериментальной выборки в контролируемых искусственных условиях растения выращивали в готовом универсальном питательном грунте (TerraVita, Россия) на световых установках при продолжительности светового дня 12 ч и температуре воздуха 25°C. Все образцы анализировали в двух опытах: в первом опыте влажность воздуха была равной 60%, во втором – 90%. Для проведения эколого-географического изучения образцы вигны высевали в Астраханской области на Астраханской опытной станции – филиале ВИР (далее – АОС), в Приморском крае на Дальневосточной опытной станции – филиале ВИР (далее – ДВОС), а также в Краснодарском крае на Адлерской опытной станции – филиале ВИР (далее – АдОС). Наблюдения проводили в 2019–2022 гг. на АОС и ДВОС, а также в 2020–2022 гг. на АдОС. На опытных станциях образцы выращивали в условиях открытого грунта, посев и описание образцов проводили по общепринятым в ВИР методикам (Бурляева и др., 2016; Вишнякова и др., 2018). Для выявления закономерностей изменчивости и структуры взаимосвязей комплекса изученных признаков образцов вигны в условиях контрастных по влажности воздуха был проведен факторный анализ (по методу главных компонент). Анализ метеорологических данных проводили с использованием материалов сайта <http://pogodaiklimat.ru> (Погода и климат..., 2024), а также архивных данных Всероссийского научно-исследовательского института гидрометеорологической информации – Мирового центра данных (ВНИИГМИ-МЦД) (Специализированные массивы для климатических

исследований, 2024).

Для *in silico* идентификации и анализа генов использовали стандартный алгоритм (поиск последовательностей гомологичных генам арабидопсиса с использованием алгоритма BLASTN в базах данных геномных последовательностей, выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, анализ промоторных областей, аннотация функциональных доменов белков, моделирование третичной структуры и другие).

Геномную ДНК выделяли из листьев проростков с использованием набора «Сорб-ГМО-Б» (Синтол, Москва) с модификациями. Амплификацию геномной ДНК проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 50-100 нг ДНК матрицы, 1х реакционный ПЦР-буфер-Б (67мМ трисHCl, pH 8,8; 2мМ MgCl₂; 18мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20), 1,5 мМ MgCl₂, 0,25 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, по 0,5 мкМ прямого и обратного праймера, 1 ед. Taq-полимеразы (Синтол, Москва). Дизайн праймеров выполняли с использованием он-лайн ресурса IDT PrimerQuest software (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/>). Электрофорез проводили в 1-3% горизонтальных агарозных гелях в буфере TAE. В качестве интеркалирующего красителя использовали бромистый этидий в конечной концентрации 0,01 мкг/мл. Для визуализации полученных результатов использовали геледокументирующую систему BioRad ChemiDoc MP. Выделение амплифицированных фрагментов из 1% агарозного геля проводили с использованием набора реагентов “diaGene” (Диаэм, Москва) согласно инструкции производителя. Секвенирование ДНК выполняли с помощью набора для секвенирования «BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer Series Applied Biosystems™.

По результатам эколого-географического изучения, а также исследования изменчивости комплекса признаков в искусственных условиях контрастных по влажности воздуха были отобраны образцы для сравнительных транскриптомных исследований. Для выделения РНК растения выращивали в контролируемых искусственных условиях в двух идентичных климатических камерах (ООО «Волтех», Волгоград) при 12-часовом световом дне при температуре 25°C, освещенности 3 клк. Растения разделили на две опытные группы, в первом опыте влажность воздуха была равной 60%, во втором – 90%. Таким образом, каждый образец был высажен в контрастных по влажности воздуха условиях. Всего было получено 160 растений (по 40 растений каждого образца в двух экспериментальных условиях). Выделение суммарной РНК проводили с использованием набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) в соответствии с инструкцией производителя с последующей обработкой ДНКазой набором RNase-free DNase set (QIAGEN). По матрице РНК синтезировали одноцепочечную кДНК с использованием набора ОТ М-MuLV-RH (Биолабмикс, Новосибирск) согласно протоколу производителя. Продукт реакции обратной транскрипции напрямую использовали в качестве матрицы для ОТ-ПЦР. Количественную оценку уровней экспрессии генов проводили с помощью метода ПЦР в реальном времени с использованием набора SYNTOL SYBR Green I + ROX (Синтол, Москва).

Секвенирование РНК проводили на приборе Illumina NovaSeq 6000, длина прочтений составляла 100 пн с одной стороны фрагментов. Оценка качества сырых прочтений проводили с помощью программы FASTQC v.0.12.1 (Andrews, 2015), фильтрацию данных с использованием fastp v.0.23.2 (Chen et al., 2018), картирование выполняли на референсную сборку генома *Vigna unguiculata* v1.2 с сервера Phytozome database (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>) с помощью программы STAR v.2.7.10b (Dobin et al., 2013), подсчет числа прочтений, приходящихся на ген, проводили с использованием программы FeatureCounts v.2.0.1 (Liao et al., 2014). Пакет DESeq2 v.1.38.3 со стандартными параметрами в среде R применяли для оценки уровня дифференциальной экспрессии генов (Love et al., 2014). Гены с порогом FDR<0,05 (False Discovery Rate - ожидаемая доля ложных отклонений) и логарифмом изменения экспрессии (logFC)>1 или < -1 были признаны дифференциально экспрессирующимися. Для аннотации генов использовали BioMart tool (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/biomart/martview>). Анализ обогащения терминов генной онтологии (GO SEA) проводили при помощи пакета GSEABase v.1.60.0 (Morgan et al., 2019), а также при помощи AgriGO v.2 (Tian et al., 2017).

Глава 4. Результаты и обсуждение

Влияние условий выращивания на изменчивость морфологических и фенологических признаков *V. unguiculata*. Результаты анализа изменчивости 14 морфологических признаков у изученных образцов в контролируемых искусственных условиях, контрастных по влажности воздуха (60 и 90 %) показали значительное влияние влажности воздуха (рисунок 1) (Крылова и др., 2022).

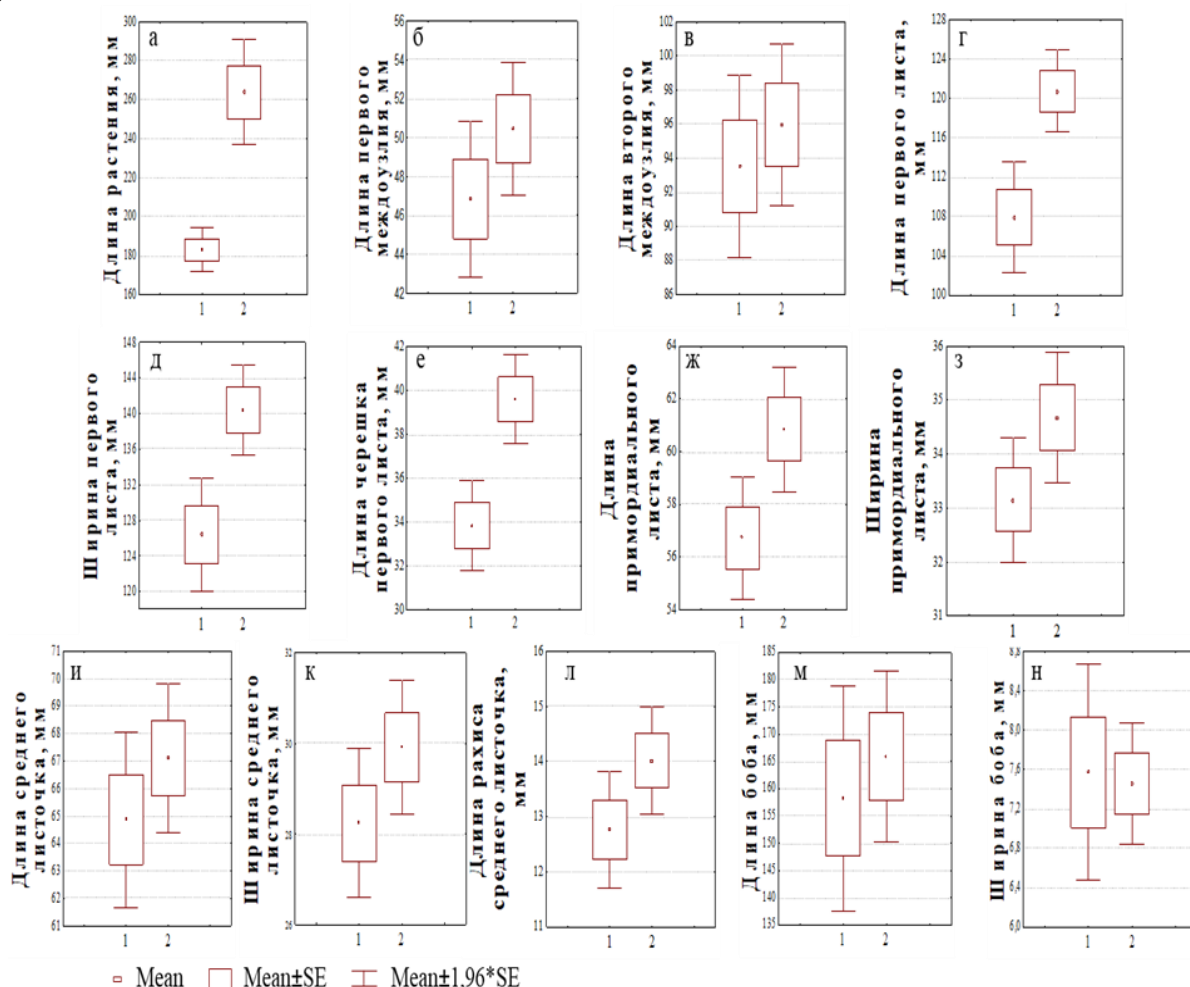


Рисунок 1. Изменчивость морфологических признаков образцов в искусственных условиях при разной влажности воздуха. Цифрами обозначены две группы образцов, выращенных при разных показателях влажности воздуха (1 – при пониженной, 2 – при повышенной влажности). а – длина растения, б – длина первого междоузлия, в – длина второго междоузлия, г – длина первого листа, д – ширина первого листа, е – длина черешка первого листа, ж – длина примордиального листа, з – ширина примордиального листа, и – длина среднего листочка, к – ширина среднего листочка, л – длина рахиса среднего листочка, м – длина боба, н – ширина боба. Mean — средние значения, Mean±SE — среднее+стандартная ошибка среднего, Mean±1,96SE — среднее + интервал 1,96 ошибки среднего (Крылова и др., 2022).

Изменчивость длины первого ($p=0,00$, доля влияния $\eta^2=17\%$) и второго междоузлий ($p=0,00$, $\eta^2=34\%$), длины ($p=0,00$, $\eta^2=14\%$) и ширины ($p=0,00$, $\eta^2=18\%$) среднего листочка ($p=0,00$, $\eta^2=14\%$) и длины его рахиса ($p=0,00$, $\eta^2=19\%$), длины боба ($p=0,00$, $\eta^2=38\%$) зависела от индивидуальных особенностей генотипа. Достоверное влияние генотипа и условий роста оказывалось на следующие признаки: длина растений (генотип $p=0,00$, $\eta^2=39\%$; условия $p=0,00$, $\eta^2=16\%$), степень развития выходящего побега (генотип $p=0,01$, $\eta^2=9\%$; условия $p=0,00$, $\eta^2=25\%$), длина первого листа (генотип $p=0,00$, $\eta^2=15\%$; условия $p=0,00$, $\eta^2=8\%$) и длина его черешка (генотип $p=0,00$, $\eta^2=32\%$; условия $p=0,00$, $\eta^2=11\%$). Изменчивость ширины первого листа ($p=0,00$, $\eta^2=11\%$) и длины примордиального листа ($p=0,01$, $\eta^2=5\%$) определялась условиями. От совместного влияния факторов

(генотип*условия) зависело варьирование длины растения ($F_{(3;101)}=11,4$, $p=0,00$), $\eta^2=12\%$) и длины примордиального листа ($F_{(3;101)}=4,7$, $p=0,00$), $\eta^2=12\%$). Было показано нетождественное действие влажности воздуха на тип роста у разных образцов. В ходе эколого-географического эксперимента выявлено достоверное влияние комплекса факторов (генотип/образец, место репродукции) на изменчивость признаков. Наиболее сильно от места репродукции зависели фенологические признаки (продолжительность периода от посева до всходов ($p=0,00$, $\eta^2=17\%$), от посева до цветения ($p=0,00$, $\eta^2=49\%$) и от посева до налива бобов ($p=0,00$, $\eta^2=53\%$)), длина первого ($p=0,00$, $\eta^2=43\%$) и второго ($p=0,00$, $\eta^2=44\%$) междоузлий. Генотип в большей степени определял размах варьирования числа узлов ($p=0,00$, $\eta^2=36\%$), ветвей ($p=0,00$, $\eta^2=18\%$), цветоносов ($p=0,00$, $\eta^2=10\%$) и бобов ($p=0,00$, $\eta^2=30\%$) на одном растении, толщины стебля ($p=0,00$, $\eta^2=24\%$) и размера боба (длины ($p=0,00$, $\eta^2=70\%$) и ширины ($p=0,00$, $\eta^2=46\%$)). На диапазон изменчивости длины стебля значительно влияло место репродукции ($p=0,00$, $\eta^2=20\%$) и генотип ($p=0,00$, $\eta^2=31\%$), который оказывал более сильное влияние. На варьирование признаков листьев (длина и ширина примордиального листа, длина и ширина среднего и бокового листочков, длина рахиса среднего листочка, длина черешка) влияли все изученные факторы. Реакция генотипов на изменение условий выращивания была различной. У большинства изученных образцов в условиях муссонного климата Приморского края отмечено увеличение длины главного стебля, в то же время у трех сортов изменился тип роста. В нашем эксперименте длина растения положительно коррелировала с количеством осадков и со средними показателями относительной влажности воздуха. Только на сорт 'Лянчихе' избыточная влажность и осадки оказывали минимальное воздействие, растения сохраняли низкорослость, детерминантный тип роста и компактную архитектуру (рисунок 2).

Образец Станция	к-6	к-639	к-640	к-642	к-1783	к-2056
АОС 	121,1±11,3 	86,2±5,9 	99,0±5,0 	104,0±4,2 	72,7±3,8 	29,0±2,5 
АдОС 	155,4±19,4 	147,4±13,5 	175,8±16,7 	144,6±16,5 	116,4±15,4 	59,8±12,7 
ДВОС 	161,3±14,3 	199,0±13,5 	241,0±9,1 	219,0±9,5 	132,2±12,0 	64,8±7,4 

Рисунок 2 – Фотографии образцов в различных эколого-географических условиях. Над фотографиями приведены средние значения длины растения±стандартная ошибка среднего (за все годы изучения), длина линейки – 30 см.

Метод главных компонент выявил четыре фактора, отражающих основную часть дисперсии анализируемых признаков (таблица 2). В первом факторе объединились характеристики листа, во втором – архитектоники и времени развития растения, в третьем – проростка и ювенильной стадии, в четвертом – боба. Эти комплексы признаков (факторы) определяли изменчивость растений вигны в проведенном эколого-географическом опыте. В системе двух первых факторов можно отметить тенденцию к группировке растений, выращенных на ДВОС, в области, характеризующейся более длинным стеблем с большим числом узлов и ветвей, для многих растений были характерны некрупные листочки (рисунок 3А). В пространстве первого и третьего факторов также можно заметить, что образцы репродукции ДВОС располагаются рядом. Растения, выращенные на ДВОС, отличаются по третьему фактору от растений АОС и АДООС (рисунок 3Б) (Крылова и др., 2024). При анализе распределения разных генотипов можно отметить, что растения сорта Лянчихе (к-2056) отличались от других по второму фактору и заняли область на графике, для которой характерен недлинный стебель с небольшим числом узлов и ветвей (рисунок 3В). Растения образца к-1783 разделились на две группы по третьему фактору развития проростка или растения на ранних стадиях онтогенеза (рисунок 3Г). Экземпляры, выращенные на АДООС и АОС, образовали две группы, к одной из которой присоединились растения репродукции ДВОС. Для других образцов такой дифференцировки по признакам не наблюдалось.

Таблица 2 – Факторная структура признаков у образцов вигны, выращенных в полевых условиях на АОС, АДООС и ДВОС в 2019–2022 гг.

Признак	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
Число дней от посева до всходов	-0,15	-0,16	-0,38	0,26
Число дней от посева до цветения	-0,22	0,68	-0,48	0,15
Число дней от посева до налива бобов	-0,23	0,59	-0,56	0,26
Длина растения	-0,10	0,78	0,06	0,24
Толщина стебля	0,36	0,68	0,03	-0,14
Число узлов на главном стебле	-0,03	0,83	0,15	-0,11
Число ветвей первого порядка	0,26	0,64	-0,12	-0,13
Длина первого междоузлия	-0,13	-0,14	0,16	0,45
Длина второго междоузлия	0,22	-0,23	0,65	0,34
Длина примордиального листа	0,06	-0,01	0,70	0,27
Ширина примордиального листа	-0,05	0,11	0,87	-0,06
Длина среднего листочка	0,74	-0,20	-0,02	0,43
Ширина среднего листочка	0,84	0,12	-0,04	-0,16
Длина рахиса среднего листочка	0,59	0,30	0,30	0,07
Длина бокового листочка	0,76	-0,19	0,01	0,43
Ширина бокового листочка	0,89	0,06	0,04	-0,06
Длина черешка	0,67	-0,09	0,13	-0,04
Число цветоносов	0,08	0,30	-0,40	-0,26
Длина цветоноса	0,46	0,02	0,21	-0,34
Число бобов	0,25	-0,02	-0,50	-0,25
Длина боба	0,09	0,07	0,07	0,84
Ширина боба	0,11	0,26	0,08	0,65
Дисперсия, %	19	16	14	11

На основе результатов анализа образцов в контролируемых искусственных условиях с различной влажностью и в эколого-географическом эксперименте для дальнейшего сравнительного транскриптомного анализа в ответ на разные условия влажности были выбраны образцы к-6, к-642, к-1783 и к-2056 (Лянчихе).

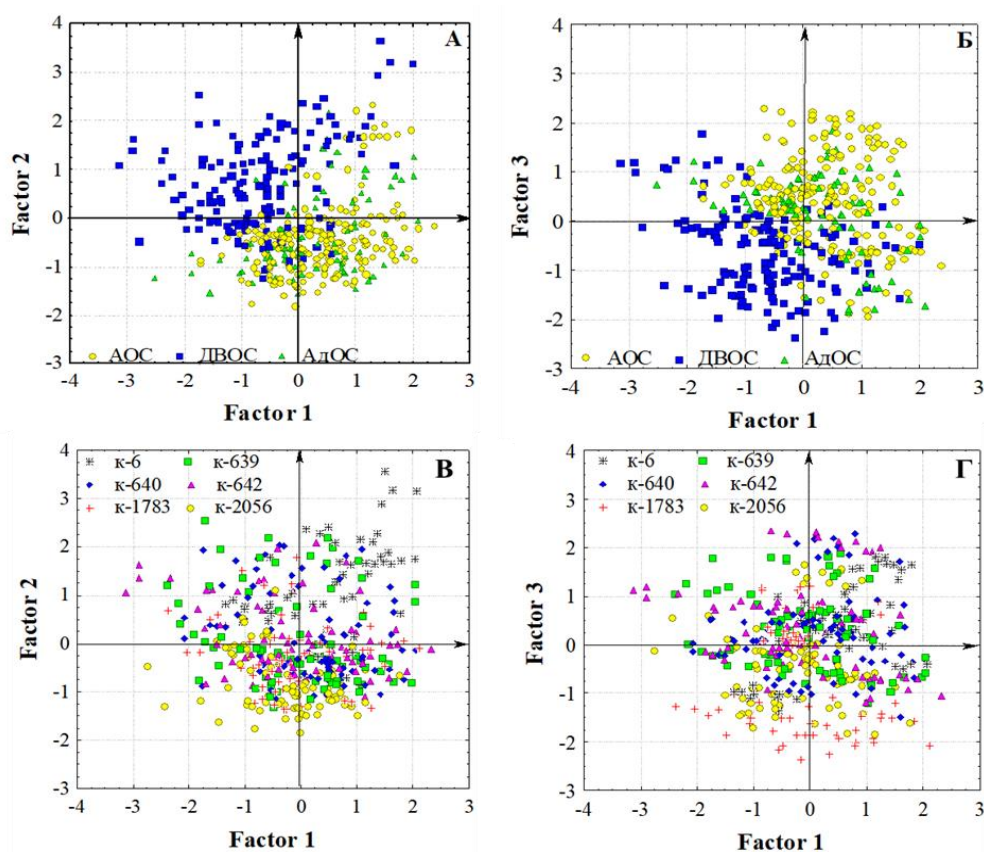


Рисунок 3 – Распределение образцов в пространстве факторов (репродукции АОС, АдОС и ДВОС в 2019–2022 гг.): (А, Б) – распределение образцов по месту репродукции, (В, Г) – распределение изученных генотипов. Factor 1 – первый фактор, отражающий формирование/развитие листа (длина и ширина среднего и бокового листочков, длина черешка и рахиса среднего листочка), Factor 2 – второй фактор, отражающий архитектуру/развитие растения (длина и толщина стебля, число узлов и ветвей первого порядка, а также продолжительность периодов от посева до цветения, от посева до налива бобов), Factor 3 – третий фактор, отражающий развитие проростка или растения на ранних стадиях онтогенеза (длина и ширина примордиального листа, длина второго междоузлия).

Идентификация и исследование структурной организации *TFL1*-подобных генов. В геномах *V. unguiculata*, а также основных представителей трибы Phaseoleae был проведен поиск гомологов гена *TFL1* арабидопсиса. Всего в геномах каянуса *Cajanus cajan* (L.) Millsp., фасоли обыкновенной *Phaseolus vulgaris* L., маша *V. radiata* (L.) R. Wilczek было идентифицировано по 4 последовательности *TFL1*-подобных генов, в геноме адзуки *V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi – 3, а в геноме *Glycine max* (L.) Merr – 8 последовательностей (Krylova et al., 2021). Ранее в геноме *V. unguiculata* был идентифицирован и описан только один гомолог гена *TFL1* – *VuTFL1* (Dhanasekar, Reddy, 2014). Впервые в данной работе в хромосоме 7 был выявлен высококонсервативный гомолог гена *VuTFL1* – *VuTFL1.2*, который, вероятно, является результатом дупликации *TFL1*. Кроме этого, в геноме вигны было идентифицировано по одному гену *ATC* и *BFT*, относящихся к группе *TFL1*-подобных генов (рисунок 4, Krylova et al., 2021). Анализ промоторных областей всех идентифицированных генов вигны показал наличие множества мотивов связывания транскрипционных факторов, а также сайтов активации транскрипции, индуцированных светом и фитогормонами. Был отмечен сходный паттерн расположения цис-регуляторных элементов в промоторах *VuTFL1.1* и *VuTFL1.2*. На основе результатов *in silico* анализа последовательностей этих генов, в том числе цис-регуляторных регионов, можно предположить, что данные гены поддерживаются в функциональном состоянии. Это может быть обусловлено их предполагаемой субфункционализацией (Krylova et al., 2021).

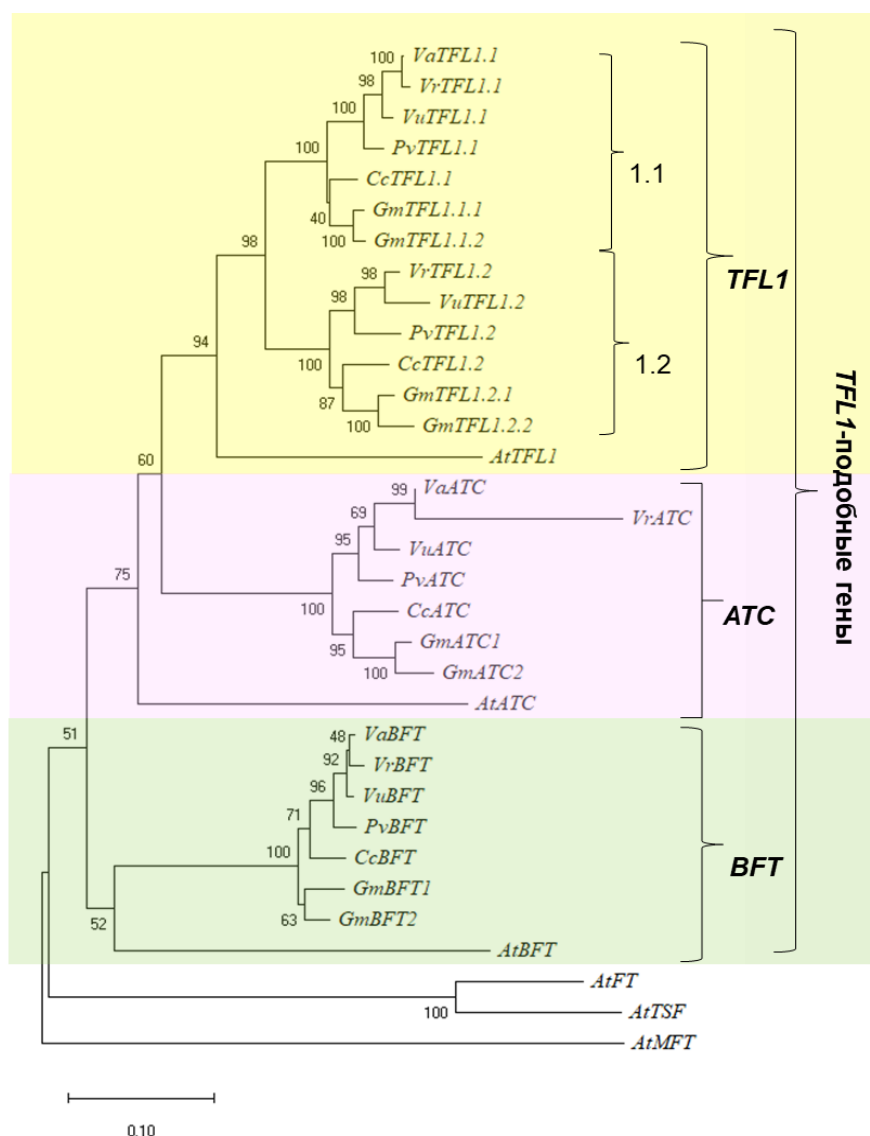


Рисунок 4 – Анализ филогенетического сходства *TFL1*-подобных генов (CDS). Реконструкция филогенетического дерева была сделана в MEGA X с использованием метода Neighbor-Joining с бутстреп-поддержкой 1000. Гены высокоомологичные гену *TFL1* – выделены желтым прямоугольником, гену *ATC* – розовым, гену *BFT* – зеленым (Krylova et al., 2021).

В идентифицированных у *V. unguiculata* в данной работе последовательностях белков-гомологов *TFL1* (Krylova et al., 2021) сохранены все ключевые аминокислоты (Ho and Weigel, 2014; Wickland, Hanzawa, 2015). В составе *VuATC* и *VuBFT* также сохранены все ключевые аминокислоты, необходимые для функционирования белков в качестве репрессоров перехода к цветению. При структурном выравнивании 3D белковых структур *VuTFL1.1* и *VuTFL1.2* была выявлена высокая степень их гомологии. На основании полученных данных *in silico* анализа, можно предположить, что все идентифицированные *TFL1*-подобные белки (*VuTFL1.1*, *VuTFL1.2*, *VuATC*, *VuBFT*) могут обладать функцией блокаторов перехода растений вигны к цветению (Крылова и др., 2020; Крылова, 2020; Krylova et al., 2021).

В ходе данной работы было выполнено секвенирование по Сэнгеру аллелей всех *TFL1*-подобных генов, а также промоторной зоны (примерно 500 пн от старт-кодона) у шести экспериментальных образцов вигны с разным типом роста стебля. Отличий по сравнению с референсными последовательностями в кодирующей части генов обнаружено не было (Крылова, Хлесткина, 2024). Уникальных перестроек, характерных только для сорта Лянчихе (с его наиболее стабильной архитектоникой вне зависимости от погодных и климатических условий), а также только для группы образцов к-639, к-640, к-642 (для которых, напротив,

отмечено значительное варьирование длины стебля при изменении условий репродукции), не идентифицировано. Связи между детектированными перестройками в интронах и в промоторной области генов и фенотипом по типу роста и архитектонике не прослеживается. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эволюционной консервативности группы *TFL1*-подобных генов и вместе с тем в отношении сорта Лянчихе указывают на необходимость поиска иных (нежели *TFL1*-подобные) генов, определяющих свойство этого сорта сохранять детерминантный тип роста в условиях повышенной влажности воздуха.

Сравнительный транскриптомный анализ образцов *V. unguiculata*, контрастных по типу роста и выращиваемых в контролируемых условиях, отличающихся по влажности воздуха. В результате картирования на сборку генома *V. unguiculata* v1.2 секвенированных и отфильтрованных по качеству последовательностей 24 библиотек (4 генотипа × 2 типа условий влажности × 3 повторности) было получено в среднем 37,3 млн (89,3%) высококачественных уникально картированных чтений. После квантификации картированных прочтений и фильтрации низкоэкспрессирующихся генов, на которые по всем образцам попало меньше одного прочтения, общее число генов составило 24370. Анализ методом главных компонент, основанный на экспрессии 7542 генов со статистически значимой экспрессией ($FDR < 0,05$) продемонстрировал высокий уровень статистически значимых различий между исследованными вариантами с долей объясненной дисперсии 60%, при этом 35% различий связано с условиями (влажностью воздуха), а 25% объясняется различиями между генотипами (рисунок 5).

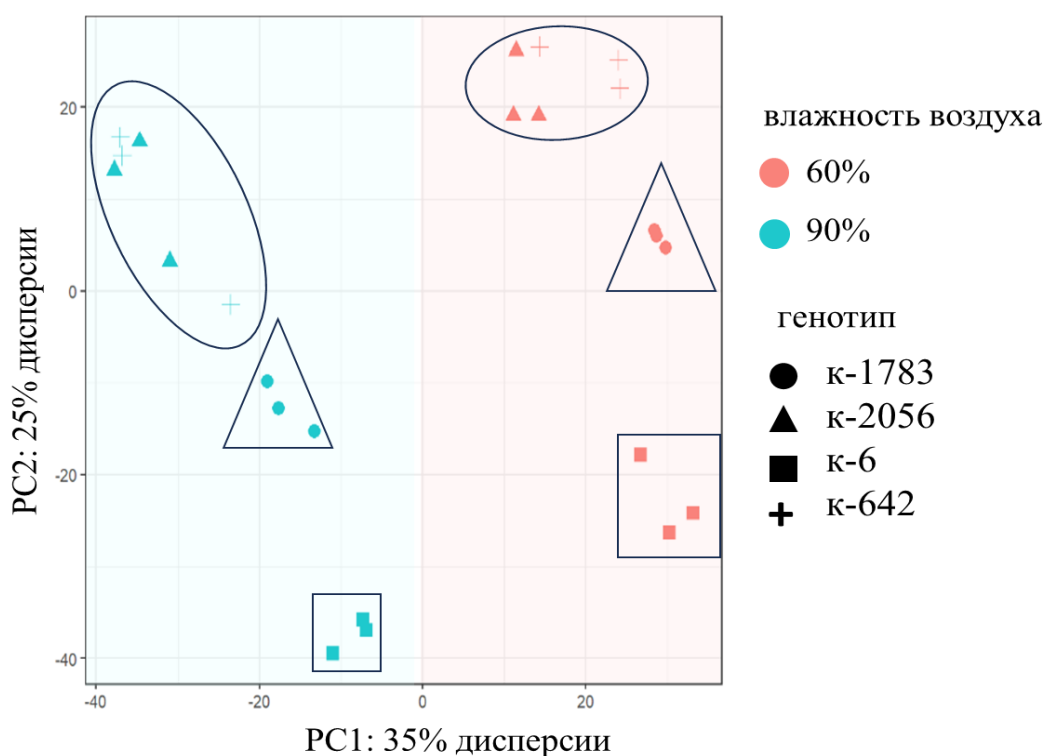


Рисунок 5 – Распределение профилей экспрессии генов у образцов вигны, сформированных в контрастных по влажности воздуха условиях, в координатах 1-й и 2-й главной компонент (PC1 и PC2, соответственно), рассчитанное по методу главных компонент. Анализ основан на показателях уровня экспрессии 7542 генов. Доля объясненной дисперсии – 60%. Розовым цветом – обозначены образцы, выращенные при 60%-ной влажности воздуха, голубым цветом – при 90%-ной влажности воздуха.

Количество дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) между разными экспериментальными и контрольными группами приведено на рисунке 6. По результатам проведенной верификации данных можно отметить высокий уровень корреляции между значениями экспрессии генов, полученными *in silico* и *in vitro*. Выявлено изменение спектра

генов, связанных с ответом на абиотический и биотический стрессоры. В условиях избыточного увлажнения наблюдалось изменение уровня экспрессии многих генов, связанных с процессами биосинтеза, метаболизма и сигналинга фитогормонов. Среди общих для всех образцов генов, экспрессия которых увеличилась, были идентифицированы гены, связанные с биосинтезом, метаболизмом и сигналингом этилена и гиббереллинов. При этом среди генов, активация которых наблюдалась, наибольшее число генов, вовлеченных в гиббереллин-зависимые процессы было идентифицировано у образца к-642 в условиях повышенной влажности воздуха. Общими генами со сниженным уровнем экспрессии были гены, вовлеченные в этилен- и ауксин-зависимые реакции. В условиях повышенной влажности воздуха у растений сорта Лянчхве (к-2056) наблюдалось снижение уровня экспрессии жасмонат-зависимых генов (Krylova et al., 2024). В данной работе только у этого образца было идентифицировано 9 генов в функциональных кластерах GO:2000022 (jasmonic acid mediated signaling pathway) и GO:0071395 (cellular response to jasmonic acid stimulus) (таблица 3).

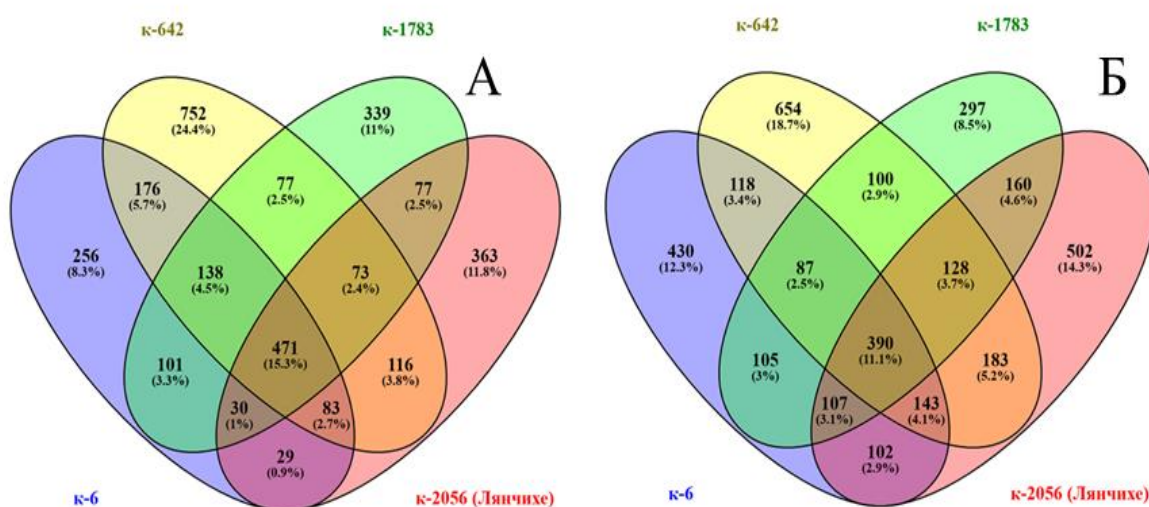


Рисунок 6. Диаграмма Венна, отражающая количество общих и уникальных ДЭГ у проанализированных образцов вигны. Отдельно представлены диаграммы для генов, экспрессия которых повышалась (А) и снижалась (Б).

JAZ-белки (ингибиторы передачи жасмонатного сигнала (jasmonate Zim-domain)) связаны с белками NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA, белок-адаптер) и TOPLESS (TPL; ко-репрессор) и блокируют работу различных транскрипционных факторов (ТФ). Переход растений к цветению находится под контролем множества генов, в том числе *TARGET OF EAT1, 2* (*TOE1* и *TOE2*), связывание продуктов которых с JAZ блокирует переход к цветению путем ингибирования транскрипции *FT* (Zhai et al., 2015). Только у растений образцов к-6 и к-642 в условиях повышенной влажности воздуха было идентифицировано снижение уровня экспрессии *Vigun05g252100* (*TOE1*) (Krylova et al., 2024). Эти два образца характеризуются индетерминантным типом роста, а в условиях муссонного климата наблюдалось значительное удлинение стебля и более поздний переход к цветению.

Снижение уровня экспрессии *Vigun03g399500* (гомолога *AtJAZ1*) было детектировано только у растений к-2056 в условиях избыточного увлажнения (Krylova et al., 2024). Кроме этого, среди уникальных генов со сниженной экспрессией у к-2056 были идентифицированы гены *JOX1* и *JOX2*, кодирующие ферменты, участвующие в метаболизме жасмоновой кислоты (таблица 3; Krylova et al., 2024). Известно, что у мутантов по этим генам отмечался повышенный уровень жасмоновой кислоты и замедленный рост (Caarls et al., 2017), также сообщалось, что при увеличении концентрации жасмоната наблюдалось ингибирование транскрипции ключевых генов, участвующих в процессах биосинтеза гиббереллинов (*GA20ox* и, возможно, *GA13ox*), блокировалось накопление этих веществ и замедлялся рост стебля растений (Heinrich et al., 2013).

Таблица 3 – Гены из функциональных кластеров GO:2000022 и GO:0071395, экспрессия которых снижалась только у растений сорта Лянчихе (к-2056) в условиях повышенной влажности воздуха

N п/п	Ген	GO- термин	log ₂ (FC) (данные RNA-seq)	p-value (данные RNA-seq)	Белок	Гомолог у арабидопсиса
1	<i>Vigun01g228500</i>	2000022 0071395	-3,1	$6,7 \cdot 10^{-16}$	жасмонат индуцированная оксигеназа	<i>AT3G11180 (JOX1),</i> <i>AT5G05600 (JOX2)</i>
2	<i>Vigun02g160700</i>	2000022 0071395	-2,4	$3,4 \cdot 10^{-22}$	JAZ	<i>AT1G74950</i> (JAZ2)
3	<i>Vigun03g399500</i>	2000022 0071395	-1,6	$6,4 \cdot 10^{-4}$	JAZ	<i>AT1G19180 (JAZ1)</i>
4	<i>Vigun06g026800</i>	0071395	-3,4	$1,0 \cdot 10^{-3}$	семейство цитохром P ₄₅₀ , подсемейство CYP2	<i>AT1G13110</i> (CYP71B7)
5	<i>Vigun07g178200</i>	0071395	-2,2	$2,2 \cdot 10^{-5}$	этилен-зависимый ТФ	<i>AT3G23240</i> (ERF1)
6	<i>Vigun08g027900</i>	2000022 0071395	-2,4	$2,4 \cdot 10^{-9}$	ТФ семейства MYB	<i>AT4G37260 (MYB73)</i>
7	<i>Vigun10g080400</i>	2000022, 0071395	-2,6	$2,5 \cdot 10^{-19}$	жасмонат индуцированная оксигеназа	<i>AT3G11180 (JOX1),</i> <i>AT5G05600 (JOX2)</i>
8	<i>Vigun10g161900</i>	2000022 0071395	-2,2	$1,1 \cdot 10^{-10}$	JAZ	<i>AT1G72450</i> (JAZ6)
9	<i>Vigun11g098600</i>	0071395	-1,8	$4,1 \cdot 10^{-4}$	тиоредоксин	<i>AT1G28480 (GRX480)</i>

Полученные в данной работе результаты позволяют предположить, что у растений сорта Лянчихе, в отличие от трех других изученных генотипов, в условиях повышенной влажности воздуха снижается экспрессия генов, участвующих в процессах метаболизма и сигналинга жасмоновой кислоты. Снижение экспрессии JAZ у растений Лянчихе способствует более раннему переходу к цветению по сравнению с другими образцами. В условиях низкой влажности воздуха уровень экспрессии этих генов, напротив, увеличивается, что в свою очередь, активирует экспрессию целого каскада генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная комплексная оценка изменчивости морфологических и фенологических признаков у образцов вигны в различных эколого-географических условиях и в контролируемых искусственных условиях выращивания показала, что при повышенной относительной влажности воздуха и большом количестве осадков происходит значительное увеличение длины главного стебля, заметное изменение архитектоники, у некоторых образцов меняется тип роста главного стебля. Только один сорт Лянчихе имел стабильный тип роста и высоту растения вне зависимости от насыщенности воздуха влагой. Впервые в геноме вигны идентифицирован высококонсервативный гомолог гена *TFL1*, главной функцией которого является поддержание индетерминированности и меристематической активности в зоне апекса на протяжении всего жизненного цикла. Проведен *in silico* анализ нуклеотидных последовательностей и цис-регуляторных элементов *TFL1*-подобных генов, а также аннотация функциональных доменов и предсказание трехмерных структур белков, секвенированы аллели этих генов у исследуемых образцов вигны, однако отличий в структуре *TFL1*-подобных генов сорта Лянчихе, которые объясняли бы сохранение этим сортом своей компактной архитектоники, не выявлено. Для установления метаболических путей, связанных с особенностями архитектоники растений вигны в ответ на изменение условий влажности воздуха, выполнен сравнительный транскриптомный анализ. Его

результаты указывают на кардинальные перестройки паттерна экспрессии генов при повышенной влажности воздуха. Особенности, выявленные в транскриптом сорта Лянчихе, позволяют предположить, что детерминантный тип роста стебля этого образца вигны в условиях повышенной влажности воздуха, вероятно, определяют гены, вовлеченные в метаболизм и сигналинг жасмоновой кислоты.

Выводы

1. На основе комплексной оценки контрастных по типу роста образцов *V. unguiculata* в различных эколого-географических условиях и в контролируемых искусственных условиях с различной влажностью установлено, что только сорт Лянчихе сохранял детерминантный тип роста независимо от условий, тогда как у остальных образцов при повышенной влажности воздуха выявлено значительное увеличение длины стебля.
2. При помощи сравнительного анализа *TFL1*-подобных генов у контрастных по типу роста образцов вигны установлено, что данная группа генов не связана с фенотипическими отличиями, наблюдаемыми между сортом Лянчихе и другими исследуемыми образцами по типу роста стебля.
3. На основе сравнительного RNA-seq анализа образцов вигны, контрастных по типу роста и выращиваемых в контролируемых условиях, отличающихся по насыщенности воздуха влагой, выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены. ДЭГ, связанные с метаболизмом и сигналингом жасмоновой кислоты, вносят наиболее выраженный вклад в поддержание стабильности типа роста у вигны в условиях повышенной влажности.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **Крылова, Е.А.** Детерминантный характер роста зернобобовых культур: роль в доместикации и селекции, генетический контроль / **Е.А. Крылова, Е.К. Хлесткина, М.О. Бурляева, М.А. Вишнякова** // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 1. – С. 43-58. <https://doi.org/10.17816/ecogen16141>
2. **Крылова, Е.А.** Роль ортологов гена *TFL1* в определении архитектоники растений / **Е.А. Крылова** // Генетика. – 2020. – Т. 56. – № 11. – С. 1262-1278. <https://doi.org/10.31857/S0016675820110053>
3. **Krylova, E.** Structural organization of *TFL1*-like genes in representatives of the tribe Phaseoleae DC. / **E. Krylova, K. Strygina, E. Khlestkina** // Biological Communications. – 2021. – Vol. 66. – № 2. – P. 85-108. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2021.201>
4. **Крылова, Е.А.** Влияние влажности воздуха на изменчивость морфологических признаков *Vigna unguiculata* (L.) Walp. в искусственных условиях / **Е.А. Крылова, Е.К. Хлесткина, М.О. Бурляева** // Экологическая генетика. – 2022. – Т. 20. – № 3. – С. 215-229. <https://doi.org/10.17816/ecogen108877>
5. **Крылова, Е.А.** Изменчивость морфологических и фенологических признаков среди контрастных по типу роста образцов *Vigna unguiculata* (L.) Walp. в разных эколого-географических условиях / **Е.А. Крылова, О.А. Чунихина, А.П. Бойко, Е.В. Мирошниченко, Е.К. Хлесткина, М.О. Бурляева** // Биотехнология и селекция растений. – 2024. – Т. 7. – № 2. – С. 16-30. <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2024-2-07>
6. **Крылова, Е.А.** База данных «Транскриптом вигны 1.0» / **Е.А. Крылова, Е.К. Хлесткина, М.О. Бурляева** // Свидетельство о регистрации базы данных № 2024624060 от 11.09.2024 г.
7. **Krylova, E.A.** Contrast relative humidity response of diverse cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) genotypes: deep study using RNAseq approach / **E.A. Krylova, M.O. Burlyayeva, V.E. Tvorogova, E.K. Khlestkina** // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – P. 11056. <https://doi.org/10.3390/ijms252011056>
8. **Крылова, Е.А.** *TFL1*-подобные гены у контрастных по типу роста образцов *Vigna unguiculata* (L.) Walp. / **Е.А. Крылова, Е.К. Хлесткина** // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2024. – Т. 185. – № 4. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2024-4-...-....> (в печати, принята к публикации 15.10.2024)