

На правах рукописи



Бемова Виктория Дмитриевна

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ И
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИНТЕЗА ОПИНОВ У
АРАХИСА (*Arachis hypogaea* L.)**

Специальности:

4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений

1.5.7. – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2025

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова
Гаврилова Вера Алексеевна

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет
Матвеева Татьяна Валерьевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, Санкт-Петербургский государственный аграрный университет,
Киру Степан Димитрович

Кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе, ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур»
Ущиповский Игорь Валентинович

Ведущая организация:

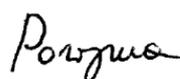
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта» (ВНИИМК) г. Краснодар

Защита диссертации состоится «_» _____ 2025 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: <http://www.vir.nw.ru>

Автореферат разослан «_» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

 Елена Вячеславовна Рогозина

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Арахис обыкновенный (*Arachis hypogaea* L.), или земляной орех, однолетнее травянистое растение из семейства бобовых (Fabaceae).

Россия входит в число крупнейших стран-покупателей арахиса, но промышленные посевы в стране отсутствуют (Туз и др., 2018). Импорт сырого арахиса в Россию за 2024 г. оценивался в 220,45 млн. USD (FAOSTAT, 2024). Основной импорт арахиса осуществляется из Бразилии (доля по стоимости – 62,81%, доля по массе – 63,46%), Аргентины (18,26% стоимости, 17,17% массы), Индии (13,79% стоимости, 14,89% массы), Китая и Никарагуа. Первые отечественные сорта арахиса были созданы в XX столетии во ВНИИ масличных культур в Краснодаре и на Кубанской опытной станции ВИР ('ВНИИМК 344', 'ВНИИМК 433', 'Испанский улучшенный'). На данный момент в Госреестр включены сорта 'Отрадокубанский', созданный сотрудниками ВИР, 'Астраханский 5' и 'Айпиджи Кьюар 14'. Образцы коллекции арахиса успешно репродуцируются в Краснодарском крае и в Астраханской области (Туз и др., 2018). Некоторые зоны юга РФ (Северный Кавказ, Южное Поволжье) соответствует требованиям к возделыванию арахиса (Вахрушева, 1998). Из всего выше сказанного можно сделать вывод, что создание исходного материала и новых отечественных сортов актуально.

Арахис обыкновенный является природно-трансенным растением. Природно-трансенные растения – это растения с последовательностями+ Т-ДНК, называемой клеточной (клТ-ДНК), полученной в ходе эволюции от агробактерий. К началу 2021 года природно-трансенные виды были описаны в 36 родах покрытосеменных растений. В составе клТ-ДНК в основном содержатся гены синтеза опинов. КлТ-ДНК арахиса содержит ген *cus*, кодирующий кукумопин-синтазу, ответственную за синтез кукумопина. Функции клТ-ДНК до сих пор не выяснены, но предполагается, что она может давать растениям, ее содержащим, эволюционное преимущество. Возможно, синтез опинов в корнях арахиса влияет на микробное сообщество в ризосфере и на ризобии в клубеньках, изменяя хозяйственно ценные признаки.

Цель работы:

Охарактеризовать генетическое разнообразие и изменчивость арахиса культурного по важным для селекции биологическим признакам.

Задачи:

1. Эколого-географическое испытание коллекционных образцов арахиса в двух пунктах, различающихся по почвенно-климатическим условиям (полупустынная и степная зоны).

2. Анализ проявления хозяйственно ценных, морфологических признаков и биохимических показателей образцов арахиса в разных почвенно-климатических условиях.

3. Секвенирование генов синтеза опинов в коллекционных образцах арахиса, анализ уровня их экспрессии в разных органах растений и выявление взаимосвязи уровня их экспрессии с проявлением хозяйственно ценных признаков.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на традиционных и современных подходах к биологическим исследованиям, анализе теории и новых разработок, применяемых в современной науке. Используются следующие методы: сравнительно-морфологическое описание растений, молекулярно-генетические методы (ПЦР, ПЦР в реальном времени, секвенирование по Сэнгеру) и аналитические (*in silico* анализ данных и статистический анализ).

Научная новизна: впервые проведено трехлетнее эколого-географическое испытание 63 образцов арахиса коллекции ВИР и выявлены признаки, изменчивость которых определяется генотипом и признаки, в большей степени зависимые от условий среды. Впервые установлено, что во всех исследованных образцах арахиса в геноме А присутствует интактная последовательность гомолога гена кукумопин-синтазы. Продемонстрирована тканеспецифичная экспрессия гена, контролирующего синтез опиона у арахиса, выявлена внутривидовая изменчивость по уровню его экспрессии.

Теоретическая и практическая значимость: В результате проведенного секвенирования гомолога гена, контролирующего синтез кукумопинсинтазы (*cus*) выявлен полиморфизм нуклеотидной последовательности у разных образцов. Варианты аллелей депонированы в базе NCBI. У всех изученных образцов выявлена ненарушенная рамка считывания гена, что дает возможность синтеза полноразмерного белкового продукта.

По итогам трехлетнего полевого изучения выделены образцы с высокой продуктивностью и вызреваемостью в Краснодарском крае и Астраханской области, которые послужат исходным материалом для селекции новых сортов. Созданы и переданы в Государственную комиссию по сортоиспытанию два сорта арахиса 'Виктория' и 'Бемоль'.

Полученные результаты используются в образовательных программах магистратуры кафедры Генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского университета, НТУ "Сириус", а также в курсах образовательных программ ВИР.

Положения, выносимые на защиту:

1. При создании исходного материала для селекции новых сортов арахиса необходимо первоначально вести отбор по массе 1000 семян и бобов, так как изменчивость этих признаков определяется генотипом на 70-75% и менее других признаков зависит от условий внешней среды. На втором этапе

отбора необходимо учитывать вызреваемость и продуктивность отбираемых образцов арахиса.

2. Созданные нами сорта арахиса 'Виктория' и 'Бемоль' пригодны для возделывания на юге РФ южнее 48⁰ северной широты.

3. Гомолог гена, контролирующего синтез кукумопина, экспрессируется в разных органах арахиса и самый высокий уровень экспрессии отмечен в корнях.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием классических и современных методов, подтверждается их воспроизводимостью в ходе эксперимента и статистической обработкой данных. Интерпретация полученных результатов, научные положения и выводы подкреплены иллюстративным материалом и таблицами. Данные диссертационного исследования представлены на 5 международных и Российских конференциях.

Публикации. Результаты исследования опубликованы в 9 статьях в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в международные системы цитирования Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора. Основная часть исследовательской работы выполнена автором самостоятельно. Некоторые работы выполнены в сотрудничестве с другими исследователями, что отражено в совместных публикациях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 181 странице. Состоит из введения, материалов и методов, основной части, содержащей 27 таблиц, 25 иллюстраций, заключения, списка литературы, который включает 158 наименований, из них 132 на иностранном языке, и 13 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе 2 приведен структурированный анализ отечественной и зарубежной научной литературы, посвященный изучению арахиса. Проанализирована система рода *Arachis* L., представлено морфологическое описание и особенности биологии размножения *A. hypogaea*, его использование, возделывание, основные направления селекции, генетика признаков. Подробно описаны растительно-микробные взаимодействия, ризобиальный симбиоз, природно-трансгенные растения и клТ-ДНК арахиса.

3.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал: 63 образца арахиса (*A. hypogaea*) коллекции ВИР, различающиеся по географическому происхождению (США, Узбекистан, Индонезия, Италия, Мексика, Россия, Грузия, Китай, Бразилия, Манчжурия, Трансвааль, Зимбабве, Азербайджан, Аргентина, Сенегал, Индия, Канада, Марокко, Израиль, Румыния, Португалия, Уганда, Танзания, Мали, Эквадор, Камерун, Буркина-Фасо, Мадагаскар, Вьетнам, Турция), 15

из которых выращивали в асептических условиях *in vitro* для использования в молекулярно-генетических исследованиях.

В работе был использован комплекс методов:

1) Выращивание растений в условиях открытого грунта и оценка морфологических и хозяйственно ценных признаков: в двух точках проведения эколого-географического испытания (на Кубанской опытной станции – филиале ВИР (КОС ВИР), которая расположена в Краснодарском крае в зоне степей, почва – чернозем, выращивание без полива; в Прикаспийском аграрном федеральном научном центре Российской академии наук (ПАФНЦ РАН), находящимся в Астраханской области в зоне полупустынь, почвы элювиальные (пойма реки Волга), разной степени засоленности, выращивание при поливе).

2) Культивирование растений арахиса *in vitro*

3) Биохимические методы: газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией, оценка содержания белка по методу Кьельдаля

4) Молекулярно-генетические методы: выделение ДНК, выделение РНК, обратная транскрипция, классическая ПЦР и ПЦР в реальном времени с последующей статистической обработкой результатов с помощью метода 2- $\Delta\Delta CT$, секвенирование по Сэнгеру.

5) Статистические методы: оценки влияния факторов окружающей среды и генотипа образцов на вызреваемость с помощью трехфакторного дисперсионного анализа, однофакторный дисперсионный анализ, ошибка средней, стандартное отклонение (s), коэффициент вариации (Cv) и коэффициент регрессии на условия среды по Эберхарту и Расселу (b_i) (Eberhart, Russell, 1966; Кильчевский, Хотылева, 1989), многофакторный анализ по методу главных компонент. Расчеты проводили в программе Microsoft Office Excel, версия 365:2002 (16.0.12527.20278). Т-критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни, многофакторный анализ по методу главных компонент рассчитывали с помощью программного пакета Statistica 7.0.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка коллекционных образцов арахиса по хозяйственно ценным признакам

Проведена оценка наиболее значимых признаков для селекции на повышение урожайности в южных регионах РФ: продуктивности, вызреваемости, массы 1000 семян и их изменчивости под влиянием внешних условий.

Наибольшая средняя продуктивность отмечена на КОС ВИР в 2019 (44,9 г/растение) и 2021 гг. (41,6 г/растение), что было обусловлено достаточным количеством осадков в июне. Продуктивность в остальных вариантах была достоверно ниже: КОС в 2020 г. (17,8 г/растение), ПАФНЦ в 2021 г. (15,8 г/растение), ПАФНЦ в 2019 г. (22,6 г/растение), ПАФНЦ в 2020 г. (27,5 г/растение). Продуктивность на КОС характеризовалась значительной

вариабельностью, в 2019 г. различия между образцами составили 138,4 г/растение (от 5,6 до 144,0 г/растение), в 2021 – 77,1 г/растение (от 14,6 до 91,7 г/растение). Средняя продуктивность в ПАФНЦ составила 21,9 г/растение в КОС (34,8 г/растение), но различия между ними были недостоверны на фоне значительной межгодовой вариабельности ($p=0,235$).

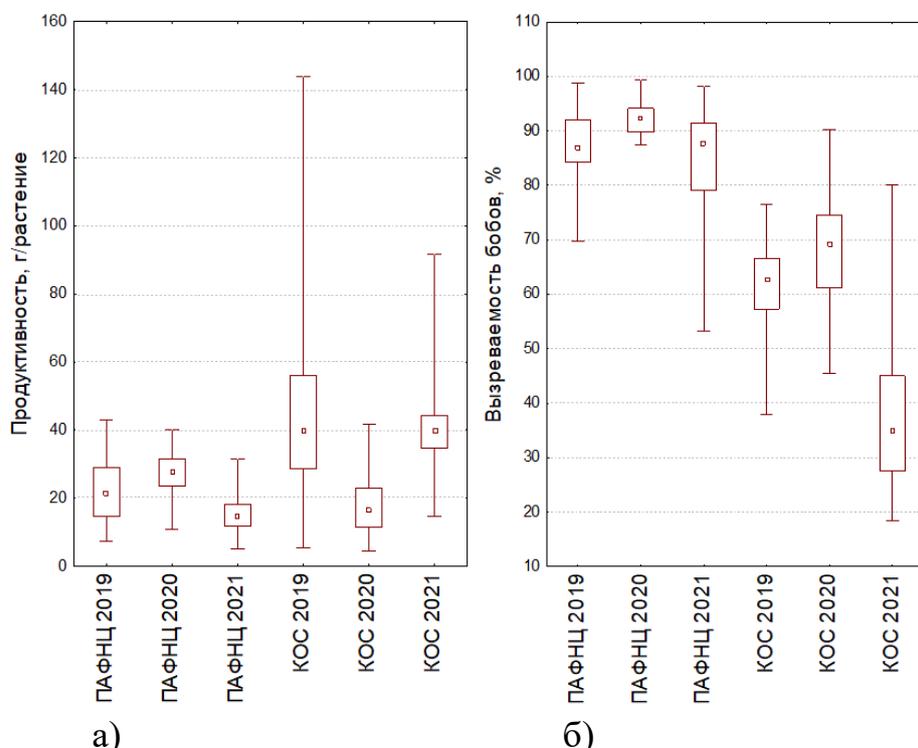


Рисунок 1. Агробиологические показатели образцов арахиса при выращивании в ПАФНЦ и КОС ВИР в 2019–2021 гг.: продуктивность – (а) и (б) – вызреваемость бобов.

Выделены образцы, показавшие высокую вызреваемость в течение трех лет исследований в обоих пунктах проведения опыта, они показаны в таблице 1. Оценка степени вызреваемости важна, так как продолжительность вегетационного периода практически всех образцов длиннее, чем продолжительность периода вегетации в условиях юга РФ.

Таблица 1. Характеристика образцов арахиса, выделившихся по вызреваемости в двух точках испытания (ПАФЦ РАН и КОС ВИР) за три года изучения (2019–2021).

Место репродукции	№ п/п	Номер каталога ВИР	Происхождение	Средняя вызреваемость бобов за 3 года (%)
ПАФНЦ РАН	1	3	США	92,66±3,43
	2	793	Россия	94,56±1,33
КОС ВИР	3	3	США	64,00±10,04
	4	793	Россия	69,55±2,05

Выделены образцы, показавшие высокую продуктивность в каждой из точек в течение трех лет. Вероятно, в связи с различиями в условиях выращивания на ПАФНЦ РАН и КОС ВИР было отобрано малое количество образцов с высокой продуктивностью в обоих пунктах за каждый год (7 – за 2019 г., 5 – за 2020 г. и 10 – за 2021 г.). Однако удалось отобрать образцы с высокой продуктивностью в течение трех лет для каждой из двух точек в отдельности, они показаны в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика образцов арахиса, выделившихся по продуктивности в двух точках испытания (ПАФЦ РАН и КОС ВИР) за три года изучения (2019–2021 гг.)

Место репродукции	№ п/п	Номер каталога ВИР	Происхождение	Средняя продуктивность за 3 года (г/растение)
ПАФНЦ РАН	1	317	Зимбабве	29,63±5,67
	2	868	Уганда	29,36±3,30
КОС ВИР	3	283	Узбекистан	42,73±8,79
	4	1157	Камерун	52,10±9,50

Согласно результатам трехфакторного дисперсионного анализа (Рисунок 2) за три года наибольшее влияние на вызреваемость оказывает место репродукции и, соответственно разные условия выращивания (44%), в значительно меньшей степени на этот признак влияют условия года изучения (4%) и генотип (5%) образцов.

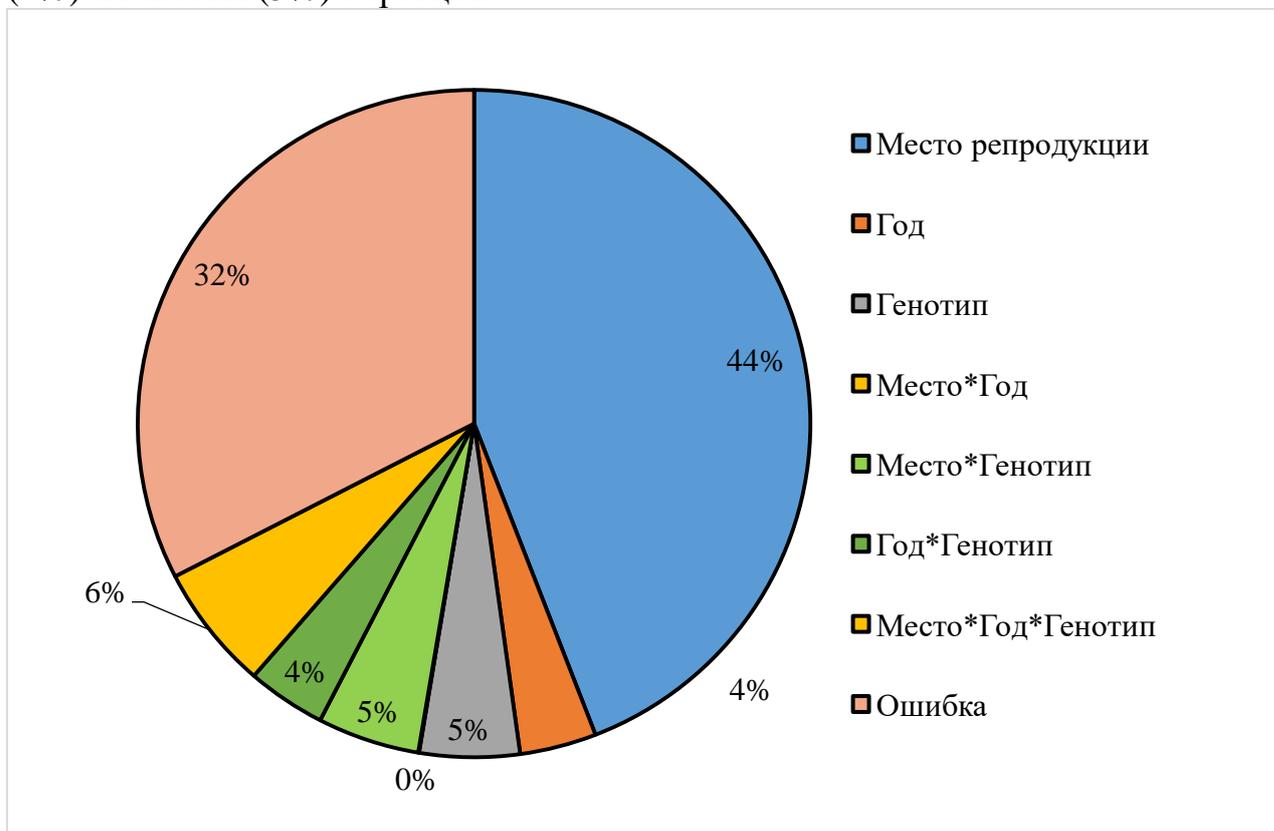


Рисунок 2. Доля влияния факторов на вызреваемость (2019–2021 гг.)

На основе анализа установлено значительное влияние генотипа на массу 1000 семян (рисунок 3). Масса 1000 семян была выше в ПАФНЦ РАН, по сравнению с КОС ВИР, за исключением отдельных образцов. Доля влияния генотипа составила 78%. Следовательно, масса 1000 семян является признаком, по которому можно проводить отбор лучших образцов для дальнейшего использования в селекции.

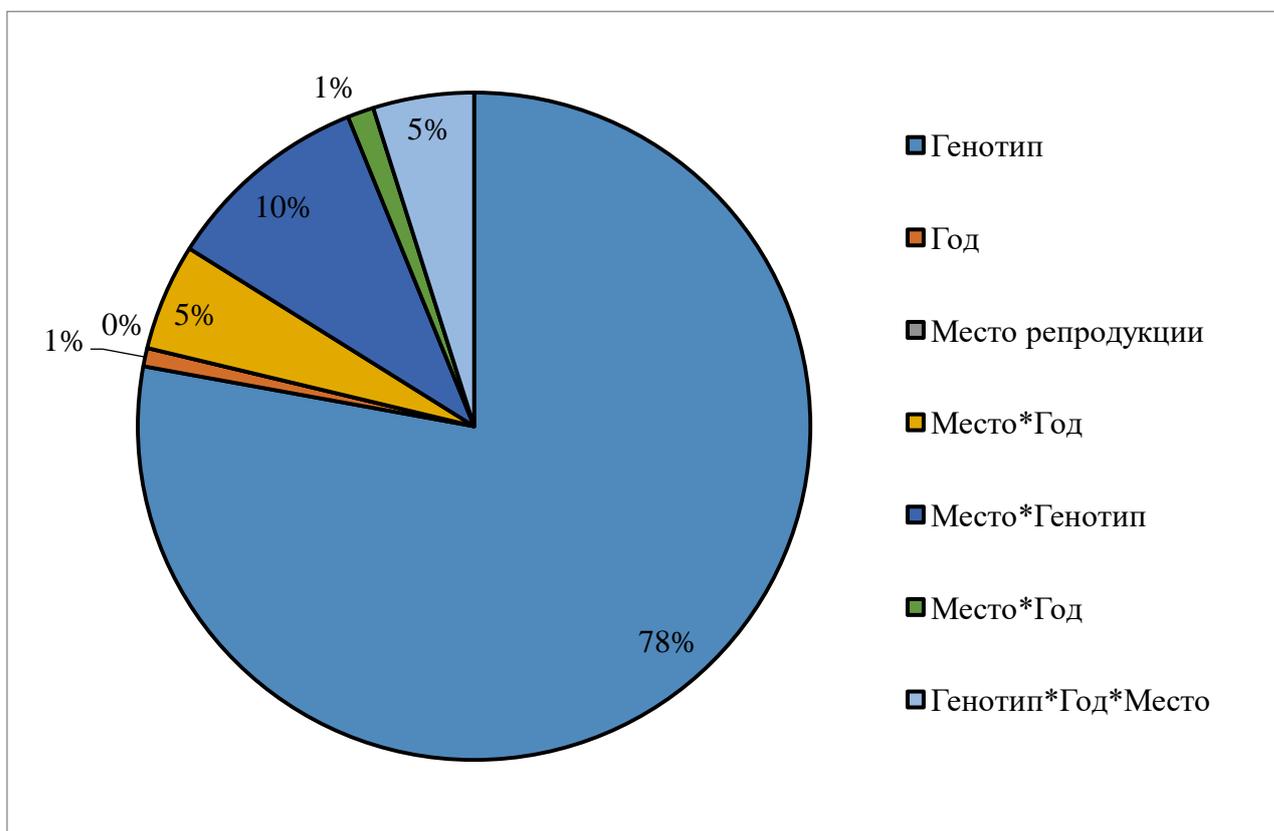


Рисунок 3. Влияние генотипа, года и других факторов на массу 1000 семян образцов арахиса (КОС ВИР, ПАФНЦ РАН, 2019–2021 гг.).

Оценка стабильности образцов в контрастных эколого-географических условиях по Эберхарту и Расселу позволила выявить пластичные и стабильные по продуктивности генотипы. Коэффициент регрессии на условия среды b_i варьировал в выборке 30 образцов от -0,1 до 3,2. К наиболее стабильным могут быть отнесены генотипы: к-178 (США), к-24 (Узбекистан), к-1697 (Вьетнам), к-300 (Трансвааль), к-175 (Бразилия), к-793 (Россия), к-433 (Сенегал), к-179 (США).

Проведен анализ жирно-кислотного состава масла 16 образцов, выращенных в КОС ВИР и ПАФНЦ в 2020 г. Содержание олеиновой кислоты выше у образцов, выращенных на КОС ВИР, а линолевой – на ПАФНЦ РАН. Предположительно повышенный синтез линолевой кислоты связан с более высокими температурами на ПАФНЦ РАН в период образования бобов. Содержание белка в разных образцах сильно варьирует (от 17,1 до 29,1%). Содержание масла у образцов различается в меньшей степени, в среднем около 36%.

В ходе работы отобраны перспективные образцы арахиса для создания сортов: крупно- и мелкосемянных для нужд кондитерской промышленности. Создание сортов проводили путем отбора лучших типичных растений с самыми высокими характеристиками хозяйственно ценных признаков каждого образца и последующим высевом семян, полученных от лучших растений. Далее 2 года проводили их оценку. На основе предыдущих трех лет эколого-географического испытания и данных 2022-2023 гг. путем двухкратного отбора были созданы линии №№ 596/1; 597/2; 2002/4; 2064/5 из образцов кк-596, 597, 2002 и 2064 соответственно. На основе линий № 2002/4 и № 2064/5 были созданы крупносемянные сорта. На сорт 'Виктория' получен патент за номером 13872 от 30 сентября 2024г.

Изучение гомолога гена (*cus*), контролирующего синтез кукумопин-синтазы

Проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей гена *cus* у 13 образцов арахиса. Все последовательности сохранили открытые рамки считывания и их продукты могут иметь биологическую активность, что дает возможность оценивать их экспрессию.

В последовательностях присутствуют однонуклеотидные замены. У образца к-1987 ('Отрадокубанский') в положении 278 нуклеотид С заменен на G, замена синонимичная. В образцах кк-168, 555, 626 и 939 в положении 240 присутствует синонимичная замена нуклеотида G на C. Также в образцах кк-168, 555 и 939 в положении 250 нуклеотид G заменен на A, что приводит к замене аминокислоты глицин на серин. У образца к-168 выявлен высокий уровень экспрессии гена *cus* во всех органах, а у кк-555 и 939 – низкий, что говорит о том, что эта замена не оказывает влияния на работу гена. Из секвенированных нами 15 нуклеотидных последовательностей гена *cus*, семь депонированы в базу данных NCBI: кк-168 (номер в базе – OL840908.1), 416 (OL840909.1), 555 (OL840910.1), 751 (OL840911.1), 939 (OL840912.1), 1157 (OR905615.1), 1905 (OR905616.1).

До недавнего времени клТ-ДНК была описана только у культивируемого арахиса *A. hypogaea*, его предков *A. duranensis* Krapov. & W.C. Greg и *A. ipaensis* Krapov. & W.C. Greg и близкородственных *A. monticola* Krapov. & Rigoni и *A. stenosperma* Krapov. & W.C. Greg. В рамках нашего исследования в соавторстве с О.Богомаз (Bogomaz et al., 2024) с использованием алгоритма BLAST были описаны последовательности клТ-ДНК для 6 образцов *A. hypogaea*, 5 образцов *A. duranensis*, 4 образцов *A. ipaensis*, по 1 образцу каждого из *A. monticola*, *A. stenosperma* и *A. cardenasii* Krapov. et W.C. Gregory. Последовательности, гомологичные гену *cus*, присутствуют во всех этих геномах и расположены на хромосоме 8 в общем сайте интеграции, что указывает на то, что все эти последовательности являются результатом одного акта трансформации. У культурного арахиса из 28 описанных аллелей гена только три содержали мутации, несовместимые с функцией, что говорит в пользу их эволюционного значения.

На филогенетическом дереве (рисунок 4) четко выделяются две крупные клады (А и В), соответствующие изучаемым последовательностям из геномов А и В культивируемого арахиса.

Меньшая дивергенция последовательностей генома А может быть связана с функциональностью генов и стабилизацией отбора в пользу интактных аллелей. В этом случае можно ожидать экспрессии гена. Поэтому мы оценили экспрессию в нескольких линиях арахиса.

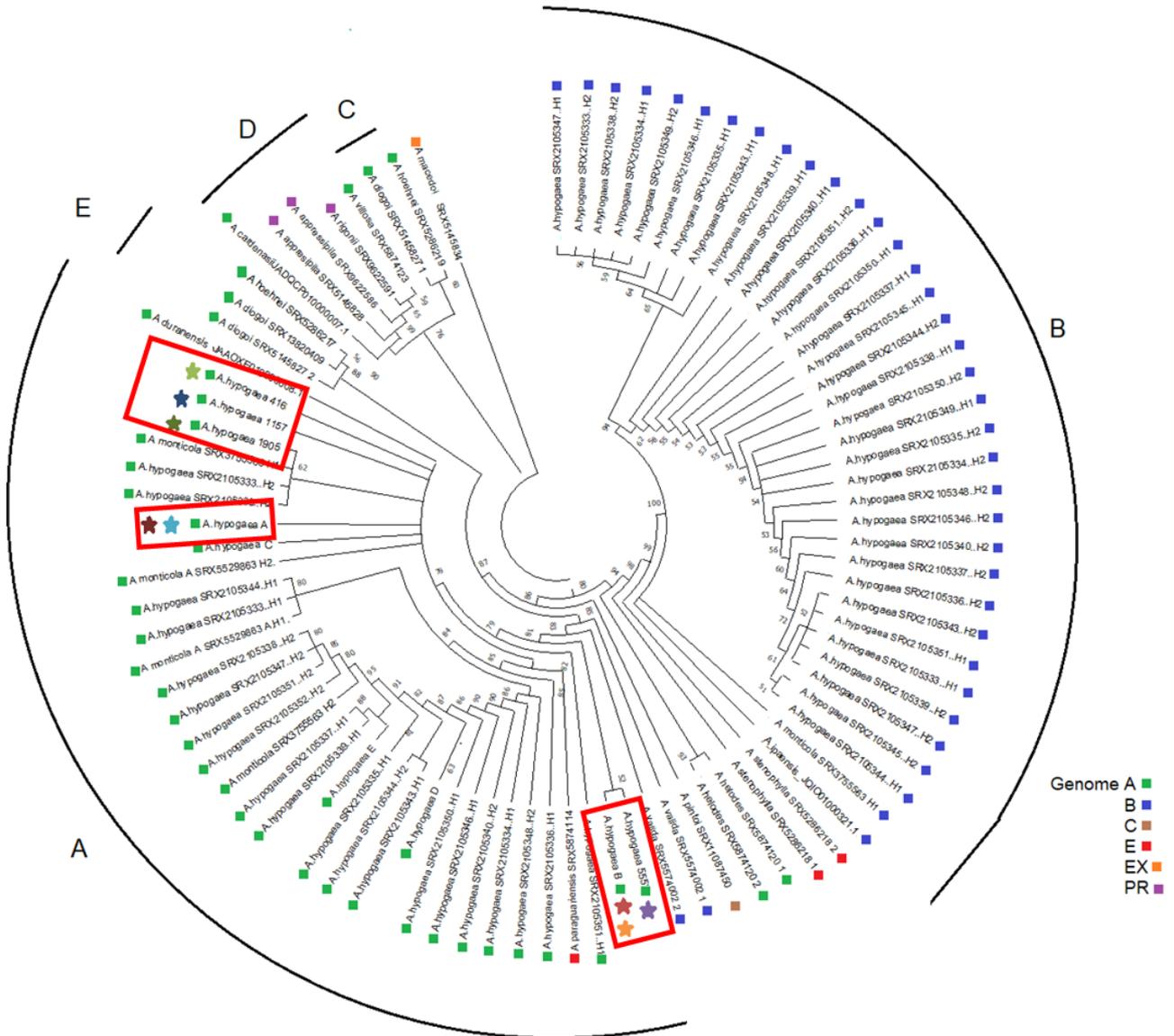


Рисунок 4. Филогенетические взаимоотношения между *cus*-подобными последовательностями разных видов *Arachis*. Клады обозначены сегментами окружности черного цвета (А, В, С, D, Е). Красным выделены образцы из коллекции ВИР, секвенированные нами (Vogomaz et al., 2024).

Исследована экспрессия гомолога гена кукумопин-синтазы (*cus*) в различных органах растений десяти образцов культурного арахиса из коллекции ВИР, имеющих разное географическое происхождение и отличающихся по морфологическим признакам. Оценку проводили по трем

растениям каждого образца, в корнях, листьях и стебле. Результаты представлены на рисунке 5.

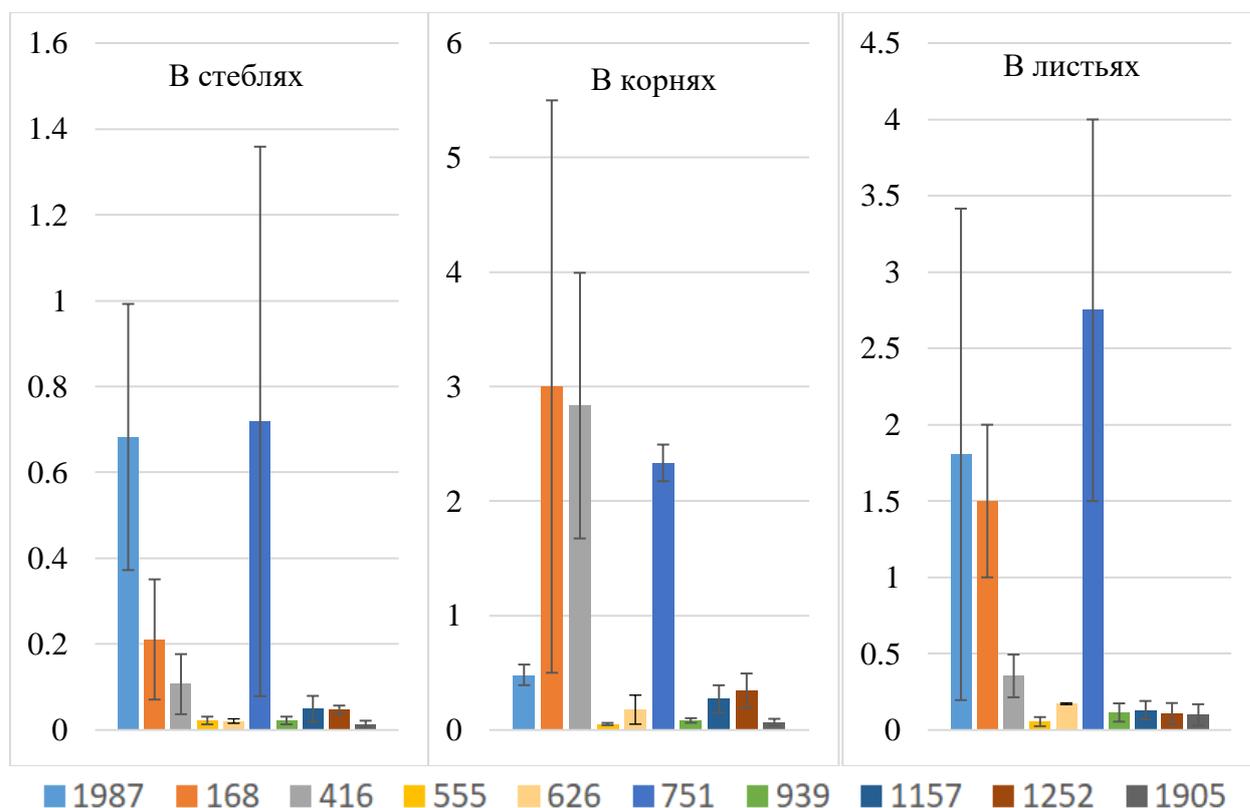


Рисунок 5. Уровень экспрессии гомолога гена кукумопинсинтазы (*cis*) в стебле, листьях и корнях.

Выявлена тканеспецифичная экспрессия гена *cis* в образцах арахиса и обнаружены образцы, контрастные по уровню его экспрессии. Наиболее высокая экспрессия отмечена в корнях, что позволяет предположить, что ген *cis* через синтез опинов может иметь отношение к взаимодействию с клубеньковыми бактериями и влиять на продуктивность арахиса. Высокая экспрессия отмечается в корнях образцов кк-168, 416, 751. У образца к-168 отмечается повышенная экспрессия в корнях и листьях; у образцов к-751 и к-1987 уровень экспрессии в листьях и стебле наиболее высокий. У образцов кк-555, 626, 939, 1157, 1252, 1905 экспрессия гена *cis* незначительная во всех органах.

Исследована экспрессия гена *cis* в корнях двух образцов (к-168 и к-1157) на разных этапах вегетационного периода. Образцы корней для анализа брали через 3 недели после прорастания семян (8 июня), во время цветения (22 июля) и во время образования бобов (13 сентября). Оба образца демонстрируют изменение уровня экспрессии гена *cis* в зависимости от стадии развития растения. Наиболее высокий уровень отмечен во время цветения.

Уровень экспрессии генов сильно варьирует между линиями. Так как последовательности по аминокислотному составу не отличаются, различия следует искать в генетическом контроле других признаков образцов арахиса,

а не в структуре исследованного гена. Кроме того, можно отметить тенденцию к более высокой экспрессии в корнях по сравнению с другими органами растений, что согласуется с литературными данными для других видов. Например, высокая экспрессия генов клТ-ДНК также отмечалась в корнях табака (Naphizova et al., 2023; Otten et al., 2020).

Дальнейшие исследования функционирования природных трансгенных растений с использованием генетического материала, контрастного по экспрессии, позволят приблизиться к пониманию их функции, поскольку известно, что опины могут секретироваться в окружающую среду из растительных клеток.

Анализ взаимосвязи хозяйственно ценных признаков и уровня экспрессии гена *cis*

Проведена оценка изменчивости хозяйственно ценных признаков в зависимости от уровня экспрессии гомолога гена *cis* в разных органах арахиса с использованием U-критерия Манна-Уитни (таблица 3). Этот метод позволяет сравнить выборки данных и определить достоверность их различия. Оценка по уровню экспрессии в стеблях показала, что образцы с высокой экспрессией обладали более высокой продуктивностью за 3 года в ПАФНЦ РАН и менее продолжительным периодом всходы-цветение на КОС ВИР, а содержание линолевой кислоты в масле семян было ниже.

Таблица 3. Результаты оценки изменчивости хозяйственно ценных признаков в зависимости от уровня экспрессии гомолога гена *cis* в корнях.

Признак	Характеристика группы						U-критерий Манна-Уитни	
	Низкая экспрессия			Высокая экспрессия			Z adjusted	p-level
	Valid N	Mean ±Se	Rank Sum	Valid N	Mean ±Se	Rank Sum		
Период всходы-цветение (дни)	6	30,0±0,4	44	4	27,6±0,74	11	2,38	0,02
Масса 1000 бобов (г)	6	1118±83	23	4	1651±142	32	-2,13	0,03
Уровень экспрессии в стеблях	6	0,04±0,01	21	4	1,32±0,55	34	-2,57	0,01
Уровень экспрессии в листьях	6	0,12±0,01	21	4	1,23±0,44	34	-2,57	0,01

Примечание: Valid N – число повторностей варианта эксперимента; Mean ± Se – среднее с доверительным интервалом (± стандартная ошибка) варианта опыта; Z adjusted – эмпирическое значение стандартизированной переменной U-критерия Манна – Уитни; p – уровень значимости. В таблице приведены только варианты экспериментов, достоверно отличающиеся друг от друга.

Оценка по уровню экспрессии в корнях выявила значимые различия в продолжительности периода всходы – цветение на КОС ВИР, при более

высокой экспрессии продолжительность короче, а масса 1000 бобов в среднем выше.

Анализ по уровню экспрессии в листьях не показал значимых совпадений. Так же не было обнаружено какой-либо взаимосвязи экспрессии гена кукумопин-синтазы и морфологических признаков.

Уровень экспрессии в стеблях, листьях и корнях коррелирует между собой – в контрастных по данному признаку образцах более высокая экспрессия наблюдается одновременно во всех органах, так же, как и низкая экспрессия.

Можно предположить, что взаимосвязь между некоторыми хозяйственно ценными признаками и уровнем экспрессии гена *cis* проявилась в связи с определенными климатическими условиями, которые стимулировали работу гена. Самыми явными различиями на КОС ВИР и ПАФНЦ РАН являются условия увлажнения, разница в температуре и свойствах почвы.

Факторный анализ по методу главных компонент был предпринят с использованием значений морфологических и хозяйственно ценных признаков и показателей, характеризующих экспрессию гена синтеза кукумопина, а также с использованием данных биохимического анализа. Результаты факторного анализа образцов для 33 признаков арахиса представлены в таблице 4. Поскольку в молекулярных исследованиях использованы семена образцов, полученные на Кубанской опытной станции, мы сочли возможным объединить в факторном анализе результаты по экспрессии гена *cis* с данными, полученными на КОС.

Таблица 4. Значения факторов по результатам факторного анализа по методу главных компонент для 33 признаков (30 морфологических и хозяйственно ценных и три, характеризующих экспрессию гена *cis*) арахиса.

Название признака	Символ признака	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Варьирование проявления признака
Период всходы – цветение	gm-fr	0,55	-0,11	-0,07	0,23	26-31,5 дней
Вызреваемость	mt%	0,33	0,20	0,14	-0,27	41,4-60,6 (%)
Продуктивность	p	-0,34	-0,06	0,71	0,13	23,0-61,1 (г)
Лужистость	lj	0,27	-0,49	0,47	-0,54	30,4-42,7 (%)
Масса 1000 семян	ms1000	-0,56	0,07	0,54	-0,58	301,0-589,0 (г)
Масса 1000 бобов	mp1000	-0,79	0,30	0,30	0,04	891,0-1903,0 (г)
Величина боба	sp	-0,61	-0,01	0,41	0,09	1,5 -6,0 (см)

Форма боба	fp	0,60	0,02	0,10	0,27	Коконообразная – вальковато-цилиндрическая - вздутая
Число семян	Ns	0,63	0,35	0,47	-0,22	1-5 (шт.)
Наличие перехвата	Phv	0,39	0,33	0,67	-0,28	Невыраженный - слабый – средний - сильный
Форма семени	fs	-0,84	-0,20	0,02	0,34	Округлая - удлиненно-овальная - овальная
Величина семени	ss	-0,52	-0,11	0,11	0,15	0,4-2,0 (см)
Окраска семени	cs	0,16	-0,50	0,17	-0,73	Светло-розовая – розовато-коричневая – буро-красная – черно-фиолетовая
Форма куста	fb	0,22	-0,84	0,38	-0,14	Кустовая – полукустовая - стелющаяся
Степень выраженности стебля	stm	0,06	-0,92	-0,03	-0,10	Слабая – средняя - сильная
Длина междоузлий	intn	-0,18	-0,83	-0,15	-0,10	1,4-8,0 (см)
Степень опушения	pbs	-0,78	0,36	-0,11	0,03	Слабая – средняя - сильная
Антоциановая окраска	cn c	-0,47	-0,19	0,457	-0,41	Отсутствует - слабая – средняя - сильная
Величина листочков	s.lft	-0,11	0,76	0,35	-0,47	3,0-9,0 (см)
Форма листочков	f.lft	-0,34	0,20	0,29	0,68	Обратнойцевидная – эллиптическая – широкоэллиптическая – удлиненно-овальная
Окраска листа	lfc	-0,16	-0,74	0,43	0,03	Светло-зеленая – темно-зеленая
Длина черешка	lpt	0,07	0,71	-0,37	-0,19	2,0-10,0 (см)
Форма прилистника	fbct	-0,53	0,14	-0,56	-0,19	Линейноланцетная - клювовидная
Величина цветка	sfl	0,14	0,13	0,76	0,14	0,5-2,0 (см)

Размер чашечки	fcl	0,13	0,01	0,87	0,31	0,3-1,0 (см)
Опушение чашечки	pbcl	0,50	0,10	-0,28	0,07	Слабое – среднее - сильное
Содержание белка	PR	0,42	0,68	-0,13	-0,47	17,1-28,62 (%)
Содержание масла	O	-0,10	0,64	0,25	-0,62	33,4-41,64 (%)
Содержание олеиновой жирной кислоты	OA	0,18	-0,44	-0,52	-0,36	32,12-42,2 (%)
Содержание линолевой жирной кислоты	LA	0,77	-0,25	0,11	-0,16	28,45-35,2 (%)
Экспрессия гена <i>sis</i> в стебле	ES	-0,34	-0,02	-0,42	-0,50	0,01-2,79
Экспрессия гена <i>sis</i> в корнях	ER	-0,48	-0,32	-0,27	-0,66	0,06-3,14
Экспрессия гена <i>sis</i> в листьях	EL	-0,63	-0,03	-0,01	-0,32	0,06-2,42
Expl.Var		7,12	6,36	5,37	4,40	
Prp.Totl		0,21	0,19	0,16	0,13	

Основную часть дисперсии определяют четыре фактора (21% – F1, 19% – F2, 16% – F3, 13% – F4). С первым фактором связаны важные хозяйственно ценные признаки: масса 1000 бобов (-0,79), величина боба (-0,61), содержание линолевой жирной кислоты (0,77), число семян в бобе (0,63), продолжительность периода всходы – цветение (0,55), а также некоторые морфологические: форма семени (-0,84), степень опушения (-0,78), форма боба (0,60). Вместе с этими признаками в первом факторе максимальную дисперсию демонстрирует признак экспрессии гена *sis* в листьях (-0,63), что свидетельствует о его взаимосвязи с вышеперечисленными показателями.

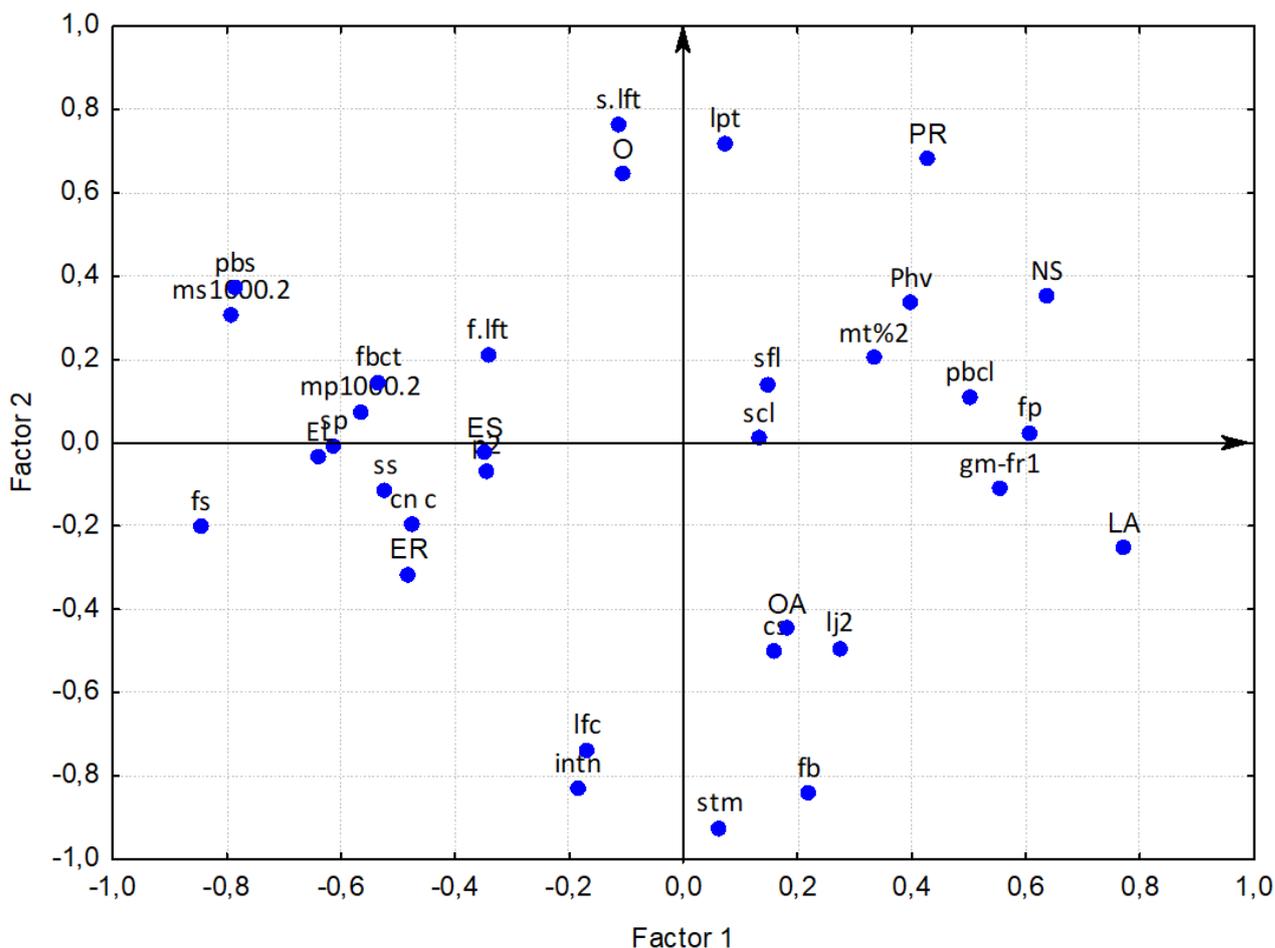


Рисунок 6. Факторные нагрузки для 30 хозяйственно ценных признаков арахиса в КОС ВИР и трех, характеризующих уровень экспрессии гена *cms* в системе координат первого (F1) и второго фактора (F2)

Во втором факторе выделяются признаки габитуса растения: степень выраженности стебля (-0,92), форма куста (-0,84), длина междоузлий (-0,83), окраска листа (-0,74), величина листочков (0,76), длина черешка (0,71) и показатели содержания белка и масла в семенах арахиса. Это может свидетельствовать о том, что растения с более развитым габитусом накапливают больше питательных веществ.

Третий фактор объединяет изменчивость морфологических признаков – форма прилистника (-0,56), размер чашечки (0,87), величина цветка (0,76), наличие перехвата на бобе (0,67), а также несет максимальную дисперсию признаков продуктивности и содержания олеиновой жирной кислоты.

Четвертый фактор содержит как морфологические (окраска семени (-0,73), форма листочков (0,68)), так и важные хозяйственно ценные признаки (содержание масла в семенах (-0,62), масса 1000 семян (-0,58), лужистость (-0,54)) вместе с наибольшей дисперсией экспрессии гена *cms* в корнях (-0,66). Нахождение всех этих признаков в одном факторе однозначно говорит в

пользу их взаимосвязи. Таким образом, результаты факторного анализа показывают взаимосвязь экспрессии гена *cis* и некоторых других проанализированных нами признаков арахиса.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное эколого-географическое изучение 63 образцов арахиса коллекции ВИР. Для исследования отобраны образцы разного происхождения, таким образом, чтобы был охвачен весь ареал вида арахиса культурного (*A. hypogaea*). Впервые проведена оценка стабильности и пластичности 30 образцов арахиса коллекции ВИР, обнаружены перспективные стабильные генотипы, которые можно использовать для дальнейшей селекционной работы.

Путем многоступенчатого отбора выделены селекционные номера арахиса, отвечающие требованиям кондитерской промышленности на основе полной оценки хозяйственно ценных признаков. На их основе созданы и переданы в Государственную комиссию по сортоиспытанию два крупносемянных сорта 'Виктория' и 'Бемоль', превосходящие стандартный сорт 'Отрадокубанский' по продуктивности, массе 1000 бобов и массе 1000 семян. Впервые в России созданы два сорта мелкосемянного арахиса, которые по продуктивности не уступают крупносемянным, а по количеству бобов с растения – превосходят.

Биохимический анализ выявил закономерности в накоплении жирных кислот в зависимости от места репродукции: на ПАФНЦ РАН содержание в семенах линолевой кислоты выше, а олеиновой ниже, на КОС ВИР наоборот.

Впервые показана экспрессия гена кукумопин-синтазы у арахиса. Кроме того, доказано наличие целой рамки считывания гена *cis*, что дает нам возможность оценивать работу гена. Наиболее высокая экспрессия отмечена в корнях, что позволяет предположить, что ген *cis* через синтез опинов может иметь отношение к взаимодействию с клубеньковыми бактериями и влиять на продуктивность арахиса или другие его хозяйственно ценные признаки.

Впервые показана взаимосвязь между высоким уровнем экспрессии гена кукумопин-синтазы и хозяйственно ценными признаками (продуктивность, продолжительность периода всходы-цветение, масса 1000 бобов), которая проявляется в зависимости от условий выращивания растений арахиса. Показан более высокий уровень экспрессии у образцов из умеренного светового пояса.

Полная всесторонняя оценка наиболее значимых характеристик образцов арахиса коллекции ВИР позволила выявить закономерности не только в проявлении хозяйственно ценных признаков в разных условиях, но и в работе генов *cis*, контролирующих синтез кукумопин-синтазы.

ВЫВОДЫ

1. В результате эколого-географического испытания показано, что вызреваемость бобов арахиса в большой степени (63%) определяется условиями внешней среды.

2. Выявлены пластичные образцы с коэффициентом регрессии на условия среды (b_i) менее единицы, показывающие высокую продуктивность и вызреваемость при различных условиях выращивания. Получен исходный материал для селекции новых высокоурожайных сортов арахиса, пригодных для возделывания как в отдельных регионах, так и с широким спектром адаптации в условиях юга РФ.

3. Отбор исходного материала для создания новых сортов арахиса для условий юга РФ необходимо вести по массе 1000 семян, поскольку изменчивость этого признака находится в большей степени (78%) под контролем генотипа. Выявлены образцы с наибольшей массой 1000 семян: кк-173, 720, 747, 1252, 1905, 1987 (стандарт), 2064, 2065, 2066.

4. Созданы сорта крупноплодного арахиса 'Виктория' (номер патента 13872 от 30 сентября 2024г.) и 'Бемоль', которые характеризуются очень крупным размером семян (около 1,5 см в длину) и в течение трех лет исследования, демонстрировали высокие результаты по вызреваемости, продуктивности и массе 1000 семян и 1000 бобов.

5. На основе образцов коллекции ВИР получены высокоурожайные мелкосемянные селекционные номера арахиса для специфических нужд кондитерской промышленности.

6. Впервые проведено секвенирование у 15 образцов культурного арахиса гомолога гена *cis*, кодирующего синтез кукумопин-синтазы. Выявлен полиморфизм нуклеотидной последовательности гена. У всех аллелей выявлена ненарушенная рамка считывания.

7. Впервые показана экспрессия гомологов гена *cis*, выявлена ее тканеспецифичность. Установлен самый высокий уровень экспрессии в корнях.

8. Обнаружена взаимосвязь между уровнем экспрессии гомолога гена *cis* и хозяйственно ценными признаками (продуктивность, продолжительность периода всходы-цветение, масса 1000 бобов).

Рекомендации для селекционной практики при создании сортов арахиса для условий южных регионов Российской Федерации

1. При создании новых крупноплодных сортов первичный отбор среди исходного материала проводить по массе 1000 бобов и семян, затем отбирать более продуктивные с наибольшим процентом вызреваемости бобов
2. При создании мелкоплодных сортов для специфических нужд кондитерской промышленности необходимо вести отбор по наибольшей продуктивности
3. Для селекции сортов арахиса, пригодных для возделывания в разных условиях, использовать селекционный материал с высокой степенью пластичности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Бемова, В.Д.** Взаимосвязь признаков арахиса (*Arachis hypogaea* L.) и уровня экспрессии гена кукумопин-синтазы / **В.Д. Бемова**, В.А. Гаврилова, Е.А. Пороховинова, Т.В. Якушева, Л.П. Подольная // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2025.186(2):1–13.
2. **Бемова, В.Д.** Сорт арахиса «Виктория» / **В.Д. Бемова**, В.А. Гаврилова, Елацков Ю.А., Кишлян Н.В., Якушева Т.В. Пат. RU 13872, Россия. 2024.09.30.
3. **Бемова, В.Д.** Изучение биохимического состава образцов семян арахиса из коллекции ВИР / **В.Д. Бемова**, Т.В. Шеленга, М.Ш. Асфандиярова, Т.В. Якушева, Н.В. Кишлян // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2024. 185(3):94-104. DOI: 10.33901/2227-8834-2024-3-94-104
4. Bogomaz, O.D. Evolutionary Fate of the Opine Synthesis Genes in the *Arachis* L. Genomes / O.D. Bogomaz, **V.D. Bemova**, N.A. Mirgorodskii, T.V. Matveeva // Biology. – 2024. – 13(8). – P. 601. DOI: 10.3390/biology13080601
5. Bogomaz, O.D. Natural GMOs inside the genus *Arachis*. / O.D. Bogomaz, **V.D. Bemova**, T.V. Matveeva // Ecological genetics. – 2023. – 21. – P. 59–60. DOI: 10.17816/ecogen568618.
6. **Бемова, В.Д.** Эколого-географическое изучение образцов арахиса коллекции ВИР. / В.Д. Бемова, М.Ш. Асфандиярова, Т.В. Якушева, В.А. Гаврилова, Н.В. Кишлян // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2023. – 184(3). – С. 79-89. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-79-89
7. **Бемова, В.Д.** Изменчивость продуктивности образцов арахиса (*Arachis hypogaea* L.) при эколого-географическом испытании / В.Д. Бемова, Т.В. Якушева, М.Ш. Асфандиярова, В.А. Гаврилова, Н.В. Кишлян, Л.Ю. Новикова // Экологическая генетика. – 2023. – 22(2). – С. 155-165. DOI: 10.17816/ecogen340801
8. **Bemova, V.D.** Prospects for the use of natural transgenic cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) in breeding / V.D. Bemova, T.V. Matveeva // Ecological Genetics. – 2022. – 20. – P. 35. DOI: 10.17816/ecogen112351

9. Porokhovinova, E.A. Fatty acid composition of oil crops: genetics and genetic engineering / E.A. Porokhovinova, G.V. Khafizova, **V.D. Bemova**, A.G. Doubovskaya, N.V. Kishlyan, L.P. Podolnaya, V.A. Gavrilova, T.V. Matveeva // Genetic resources and crop evolution. – 2022. – 69(6). – P. 2029-2045. DOI: 10.1007/s10722-022-01391-w.
10. **Бемова В.Д.** Способность к каллусообразованию у арахиса культурного (*Arachis hypogaea* L.) / В.Д. Бемова, Л.Г. Макарова, Е.О. Гурина, В. А. Гаврилова, Т.В. Матвеева // Биотехнология и селекция растений. – 2022. – 5(3). – С. 25–32. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-3-04
11. Кишлян, Н.В. Биологические особенности и возделывание арахиса / Н.В. Кишлян, **В.Д. Бемова**, Т.В. Матвеева, В.А. Гаврилова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – 181(1). – С.25–33. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-1-25-33

Список тезисов, опубликованных по теме диссертации:

1. **Бемова В. Д.**, Гаврилова В. А., Кишлян Н. В., Якушева Т. В., Новикова Л. Ю. Методика создания высокоурожайных сортов арахиса (*Arachis hypogaea* L.). Международный Конгресс «VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы». Саратов, 14–19 июня 2024 года / INTERNATIONAL CONGRESS “VIII Congress of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders, dedicated to the 300th anniversary of Russian science and higher education” Saratov, June 14–19, 2024 Издательский дом «Петрополис», Санкт-Петербург, 2024. — 804 с.
2. Matveeva T.V., Zhurbenko P.M., Khafizova G.V., Bogomaz O.D., Sokornova S.V., **Bemova V.D.**, Shaposhnikov A.D.) Natural GMOs as models for studying the role of Agrobacterium genes in plant evolution. Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PLANTGEN 2023): тезисы докладов / Под ред. А.А. Калачева, Т.А. Горшковой, М.Л. Пономаревой; ФИЦ «КазНЦ РАН» // VII Международная научная конференция. 10–15 июля 2023 г., Казань, Россия.
3. **Bemova V.D.**, Matveeva T.V. The homologue of the agrobacterial gene of cucurpentine synthase is expressed in naturally transgenic peanuts. Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology (PLANTGEN 2021) Novosibirsk, 14–18 июня 2021 года.
4. **Бемова В.Д.**, Якушева Т.В., Асфандиярова М.Ш. Эколого-географическое изучение образцов арахиса по хозяйственно ценным признакам. Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции с международным участием молодых учёных и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур», ВНИИМК 2021.
5. **Бемова В.Д.**, Матвеева Т.В. Экспрессия гена кукумопинсинтазы у культурного арахиса (*Arachis hypogaea* L.). ПРОГРАММА и СБОРНИК

ТЕЗИСОВ V Всероссийской школы конференции с международным участием для молодых ученых «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий». – М.: Издательство «Перо», 2021. –С. 50.