

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА»

На правах рукописи

МИХАЙЛОВА АЛЕКСАНДРА СЕРГЕЕВНА

**Структурно-функциональная организация регуляторных генов
из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* биосинтеза фенольных
пигментов у хлопчатника *Gossypium hirsutum* L.**

Специальность 1.5.7. – Генетика

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

член-корреспондент РАН,

Хлесткина Елена Константиновна

Санкт-Петербург – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Эволюция и классификация рода <i>Gossypium</i>	12
1.2. Флавоноидные соединения.....	14
1.2.1. Биосинтез флавоноидных соединений.....	17
1.3. Роль транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов у растений.....	18
1.3.1. Регуляция биосинтеза флавоноидных соединений MBW-комплексом.....	21
1.4. Хлопчатник с природноокрашенным волокном.....	22
1.4.1. Стадии развития волокна хлопчатника и накопление пигментов.....	22
1.4.2. Регуляция биосинтеза пигментов в волокне хлопчатника бурых оттенков.....	24
1.4.2.1. Гены-кандидаты, вовлечённые в формирование признака бурой окраски волокна хлопчатника.....	25
1.4.2.2. Структура проантоцианидинов как основных метаболитов бурого волокна хлопчатника.....	27
1.4.3. Гены-кандидаты, вовлечённые в формирование признака зелёной окраски волокна хлопчатника.....	29
1.4.3.1. Метаболиты, обуславливающие проявление зелёных оттенков хлопкового волокна.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
2.1. Идентификация дуплицированных копий генов из семейств <i>R2R3-MYB</i> , <i>bHLH-MYC</i> и <i>WD40</i>	32
2.1.1. Анализ генов <i>MBW</i>	32
2.1.2. Анализ аминокислотных последовательностей ТФ MBW-комплекса.....	32
2.2. Растительный материал.....	33
2.3. Выделение ДНК.....	34
2.4. Конструирование праймеров и амплификация генов.....	35
2.5. Электрофоретический анализ.....	35
2.6. Элюция ДНК из агарозного геля и секвенирование.....	36
2.7. Подготовка растительного материала для выделения РНК.....	36
2.7.1. Выделение РНК и синтез кДНК.....	37
2.7.2. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и обработка данных.....	37
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	40
3.1. Идентификация и структурная организация дуплицированных копий регуляторных генов в геномах диплоидного и аллотетраплоидного видов хлопчатника.....	40
3.1.1. <i>R2R3-MYB</i>	40
3.1.2. <i>bHLH-MYC</i>	41

3.1.3. WD40.....	42
3.2. Структурная организация генов MBW.....	43
3.3. Анализ промоторных последовательностей.....	45
3.4. Филогенетический анализ последовательностей генов из семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40.....	46
3.5. Предсказание 3D-структур белков R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40.....	48
3.6. Секвенирование аллелей генов из семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC.....	53
3.7. Сравнительный <i>in silico</i> анализ исходной формы ТФ GhMYB10-A и формы, содержащей выявленные миссенс-мутации.....	57
3.8. Оценка относительного уровня транскрипции ключевых структурных и регуляторных генов биосинтеза пигментов в природноокрашенном волокне.....	61
3.8.1. Подбор оптимальной комбинации референсных генов домашнего хозяйства.....	61
3.8.2. Относительный уровень транскрипции ключевых генов.....	62
3.10. Анализ взаимодействия GhMYB10-A с другими ТФ комплекса MBW.....	64
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	67
4.1. Анализ структурной организации генов R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40.....	67
4.2. Эволюционные особенности формирования дуплицированных копий генов семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40.....	68
4.3. Анализ аллельных различий регуляторных генов из семейств R2R3-MYB и bHLH-MYC. .78	
4.4. <i>In silico</i> анализ влияния миссенс-мутаций в кодирующей последовательности гена GhMYB10-A.....	84
4.4.1. Связь гена GhMYB10-A с изменчивостью по окраске волокна у природноокрашенного хлопчатника.....	89
4.5. Экспрессия структурных и регуляторных генов биосинтеза проантоцианидинов в буром волокне хлопчатника.....	90
4.6. Экспрессия ключевых генов фенилпропаноидного и флавоноидного путей при формировании зелёной и буро-зелёной окраски волокна хлопчатника.....	91
4.7. GhMYB10-A как компонент MBW-комплекса: регуляция биосинтеза флавоноидов и пигментации волокна хлопчатника.....	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	95
ВЫВОДЫ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4CL – 4-кумарат:КоА лигаза

ВКС – вторичная клеточная стенка

ДПО – дней после опыления

ДЭГи – дифференциально экспрессируемые гены

ПА – проантоцианидины

ПКС – первичная клеточная стенка

пн – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР – количественная ПЦР с обратной транскрипцией

ТФ – транскрипционный фактор

АКТВ – бета-актин

ANR – антоцианидинредуктаза

ANS – антоцианидинсинтаза

bHLH (basic HELIX-LOOP-HELIX) – базовый структурный мотив у белков суперсемейства димеризующихся факторов транскрипции

C4H – циннамат-4-гидроксилаза

CHI – халконфлаванонизомераза

CHS – халконсинтаза

DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза

EGL3 (ENHANCER OF GLABRA 3) – энхансер GLABRA 3

F3H – флаванон-3-гидроксилаза

F3'H – флаваниод-3'-гидроксилаза

Gh – *Gossypium hirsutum*

GL1 – (GLABROUS1) ТФ семейства MYB

MBW – MYB-bHLH-WD40 регуляторный комплекс

MSI3 – MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 3.

MYB (Myeloblastosis) – транскрипционный фактор семейства MYB

MYC (Myelocytomatosis) – транскрипционный фактор семейства MYC

PAL – фенилаланинаммиаклиаза

PCBER – редуктаза бензилового эфира фенилкумаровой кислоты

LAR – лейкоантоцианидинредуктаза

HD (H - histidine, D - aspartate) – консервативный ДНК-связывающий домен

HIS3.3 – гистон H3.3

HTH (helix-turn-helix) – структурный мотив в белках

R – повторяющиеся мотивы в белке MYB

TT2/TT8 (TRANSPARENT TESTA) – транскрипционный фактор TT2/TT8

TTG1/TTG3 (TRANSPARENT TESTA GLABRA) – транскрипционный фактор TTG1/TTG3

UBQ7/UBQ11 – убиквитин 7/11

UBQLN1 – убиквелин-1

WD40 (WD40-repeat protein) – белки с повторяющимися мотивами из 40–60 аминокислот и заканчивающиеся дипептидом триптофан-аспартат (W-D)

WER (WEREWOLF) – ТФ семейства MYB

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Хлопчатник (род *Gossypium* L., семейство Malvaceae) является важнейшей сельскохозяйственной культурой. Хлопковое сырье активно используется в медицинской, текстильной, пищевой, фармакологической и других отраслях промышленности (Gong et al., 2018).

Долгое время селекция хлопчатника велась с целью получения сортов с белым волокном для упрощения процесса окрашивания в необходимые оттенки. С 1870-1880-х годов происходит массовое вытеснение природных красителей искусственными в связи с понижением себестоимости производства тканей и расширением палитры доступных цветов (Худаярова, Асадова, Самиева, 2021). Однако активное использование отбеливателей наряду с искусственными красителями оказывает негативное влияние на окружающую среду и вызывает проявление аллергических реакций (Weber, Wolfe, 1987). Кроме того, дополнительная обработка волокон отбеливающими агентами снижает качество текстильных материалов. В связи с этим в настоящее время активно развивается область селекции, направленная на создание сортов хлопчатника с природноокрашенным волокном (Hua et al., 2007).

Натуральную окраску хлопкового волокна в природе обеспечивают фенольные соединения. Накопление в вакуолях окисленной формы проантоцианидинов (ПА), также известных как конденсированные танины, приводит к проявлению оттенков коричневого цвета волокна (Feng et al., 2013; Gong et al., 2014). Производные кофейной кислоты, экстрагированные из суберинового слоя, окрашивают волокно в зелёный цвет (Ma et al., 2016; Ryser, Holloway, 1985; Schmutz, Jenny, Ryser, 1994). Для направленной селекции сортов хлопчатника с природноокрашенным волокном актуальным направлением является разработка ДНК-маркеров к генам, отвечающим за изменчивость по окраске.

В геноме хлопчатника полностью идентифицированы известные структурные гены, вовлеченные в биосинтез флавоноидов, однако регуляторные гены изучены недостаточно (Xiao et al., 2007; Fan et al., 2012; Feng et al., 2013; Li et al., 2013; Malik et al., 2015; Liu et al., 2018).

Экспрессию структурных генов биосинтеза флавоноидов регулирует комплекс транскрипционных факторов (ТФ), относящихся к семействам: R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40. Среди регуляторных генов в настоящий момент описаны два из семейства R2R3-MYB (ортологи гена *AtTT2* *A. thaliana*), один из bHLH-MYC (ортолог гена *AtTT8* *A. thaliana*) и два из WD40 (ортологи гена *AtTTG1* арабидопсиса) (Humphries et al., 2005; Lu, Roldan, Dixon, 2017; Yan et al., 2018). Однако в полной мере семейства ТФ R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40 у хлопчатника не охарактеризованы. Согласно литературным данным, у других покрытосеменных растений гены,

кодирующие данные ТФ, представлены множественными копиями (Duan et al., 2022; Huang et al., 2022; Li et al., 2025; Liu et al., 2024; Lloyd et al., 2017; Pu et al., 2020; Wang et al., 2019; Wu et al., 2025; Xiao et al., 2023; Yan et al., 2023; Yang et al., 2024, 2025; Yuan et al., 2021; Zhu et al., 2020, 2021, 2025). Таким образом, в геноме аллотетраплоидного хлопчатника, помимо паралогичных копий, могут присутствовать и гомеологичные.

Цель и задачи исследования

В связи с этим **цель работы** заключалась в выявлении регуляторных генов, участвующих в биосинтезе фенольных пигментов (проантоцианидинов) и отвечающих за изменчивость по окраске волокна, у хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. коллекции ВИР и установление особенностей их организации и эволюции.

Для достижения цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. В базе данных геномных последовательностей с помощью поиска по гомологии идентифицировать полноразмерные последовательности гомеологичных и паралогичных копий регуляторных генов *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* биосинтеза проантоцианидинов хлопчатника и провести сравнительный анализ структурно-функциональной организации дуплицированных генов.
2. Выявить особенности эволюции гомеологичных и паралогичных копий генов *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* у аллотетраплоидных и диплоидных видов хлопчатника на основе анализа несинонимичных и синонимичных замен и применения метода «молекулярных часов».
3. На основе секвенирования и последующего *in silico* анализа нуклеотидных последовательностей (включая молекулярное 3D-моделирование) охарактеризовать аллельные отличия генов биосинтеза проантоцианидинов (из числа *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC*) среди образцов хлопчатника *G. hirsutum*, контрастных по признаку окраски волокна.
4. С помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени охарактеризовать паттерны транскрипции наиболее значимых с практической точки зрения генов, выбранных (на основе сопоставления литературных и полученных в работе данных) из числа структурных и регуляторных генов биосинтеза пигментов флавоноидного и фенилпропаноидного путей у образцов хлопчатника, контрастных по окраске волокна.

Научная новизна

В ходе выполнения исследования впервые проведён детальный анализ структурно-функциональной организации генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* у основного культивируемого в настоящее время хлопчатника вида *G. hirsutum* с различной окраской волокна. У четырёх видов хлопчатника, *Gossypium arboreum* L., *Gossypium raimondii* L., *Gossypium barbadense* L. и *G. hirsutum*, выявлены особенности эволюции идентифицированных полноразмерных последовательностей гомеологичных и паралогичных копий регуляторных

генов биосинтеза проантоцианидинов. Впервые оценен относительный уровень транскрипции ключевых структурных (*GhANR*, *GhDFR*, *Gh4CL*) и регуляторных (*GhMYB1R1*, *GhMYB10-A*) генов биосинтеза фенольных пигментов на поздних стадиях развития волокна у образцов хлопчатника с контрастной окраской: бурой, зелёной, буро-зелёной и контрольной белой. Показано, что период с 31 по 41 день после опыления (ДПО) характеризуется не только завершением основной фазы биосинтеза целлюлозы, но и повышенным относительным уровнем транскрипции генов флавоноидного и фенилпропаноидного путей. Впервые продемонстрирована одновременная экспрессия ключевых регуляторных генов обоих путей у образца с буро-зелёной окраской волокна, что может указывать на совместное накопление пигментов, обуславливающих данную окраску. Таким образом, данная работа помогает лучше понять молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе формирования признака окрашенного волокна хлопчатника.

Теоретическая и практическая значимость работы

Среди регуляторных генов биосинтеза ПА из числа *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* выявлен ген-кандидат *GhMYB10-A*, связанный с изменчивостью по признаку окраски волокна хлопчатника. Секвенированные последовательности регуляторных генов семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* у исследуемых образцов впервые депонированы в базу данных GenBank (NCBI) под номерами: PZ542165-PZ542188, PZ555351-PZ555357, PZ561958-PZ561964, PZ562709-PZ562715, PZ562720-PZ562726, PZ564210-PZ564221, PZ564430-PZ564436. Методами молекулярного моделирования удалось косвенно подтвердить роль *GhMYB10-A* в формировании признака окраски волокна, а именно: светло-бурый генотип связан с наличием двух миссенс-мутаций, приводящих к заменам Лиз26Тре и Трп37Арг в кодируемом белковом продукте, последняя из которых является критичной и изменяет потенциальные сайты связывания ТФ *GhMYB10-A* с целевой последовательностью ДНК. Участие ТФ *GhMYB10-A* в составе регуляторного комплекса MBW (включающего ТФ *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*) в качестве позитивного регулятора поздних этапов флавоноидного пути подтверждено с помощью *in silico* предсказания белок-белковых взаимодействий и функциональной аннотации в базе Gene Ontology. Таким образом, данные результаты помогают лучше понять механизмы, лежащие в основе формирования признака бурого оттенка волокна хлопчатника. Кроме того, на основании выявленного аллельного разнообразия, связанного с проявлением различной окраски волокна, возможно конструировать удобные для скрининга селекционного материала ДНК-маркеры для направленного отбора образцов с заданными характеристиками. Это может стать важным вектором в формировании новейшего направления – маркер-ориентированной селекции, позволяющей значительно сократить экономические и временные ресурсы, а также оценить различия на уровне генотипа, что значительно расширит разнообразие создаваемых сортов хлопчатника с

природноокрашенным волокном для производства и использования хлопкового сырья по ресурсо- и природосберегающим технологиям.

Методология и методы исследования

В качестве материала для исследования использовали образцы хлопчатника вида *G. hirsutum* из коллекции ВИР, контрастные по окраске волокна и гипокотилия. Для изучения структурно-функциональной организации регуляторных генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* у диплоидных и аллотетраплоидных видов хлопчатника применяли комплекс биоинформатических и молекулярно-генетических методов анализа для выбранных генов-кандидатов (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, количественная ОТ-ПЦР в реальном времени). Обработку, визуализацию и статистический анализ данных ОТ-ПЦР в реальном времени выполняли с помощью сторонних библиотек в Python v3.12.3: Pandas v2.2.3, NumPy v2.1.3, Matplotlib v3.10.1, Seaborn v0.13.2, а также стандартной pathlib. Предсказание третичной структуры белка, кодируемого выявленным геном-кандидатом *GhMYB10-A*, анализ влияния аминокислотных замен, поиск потенциальных сайтов связывания, молекулярный докинг и анализ белок-белковых взаимодействий провели с помощью доступных онлайн-инструментов и баз данных (SWISS-MODEL, Phyre2, Missense3D, 3DLigandSite, HEX v8.0.0, STRING v12.0).

Положения, выносимые на защиту:

1. Все паралогичные дубликации регуляторных генов *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* биосинтеза проантоцианидинов хлопчатника произошли до дивергенции диплоидных видов от общего предка рода *Gossypium*.
2. Изменчивость по окраске волокна у образцов хлопчатника с бурой (проантоцианидиновой) окраской волокна связана с аллельными отличиями гена *GhMYB10-A*.
3. Поздний период развития волокна хлопчатника сопровождается дифференциальной экспрессией ключевых регуляторных генов *GhMYB1R1* и *GhMYB10-A* биосинтеза фенольных пигментов у природноокрашенных образцов по сравнению с беловолокнистыми, что указывает на активацию флавоноидного и фенилпропаноидного путей на данной стадии и определяет проявление буро-зеленой окраски волокна.

Степень достоверности и апробация результатов

Исследование выполнено с применением современных методов анализа на высокотехнологичном оборудовании. Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью в ходе эксперимента и статистической обработкой данных. Интерпретация данных, научные положения и сформулированные выводы подкреплены иллюстративным материалом, таблицами и рисунками.

Результаты диссертационного исследования были представлены на 10 российских и

международных конференциях: «125 лет прикладной ботаники в России» (2019, Санкт-Петербург, Россия), The 11th International Young Scientists School «Systems Biology and Bioinformatics» (2019, Новосибирск, Россия), The 12th International Young Scientists School «Systems Biology and Bioinformatics» (2020, Республика Крым, Россия), Пятый Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего – наука молодых» (2020, Москва, Россия), V International conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”, dedicated to N.W. Timofeev-Ressovsky (2021, Нор-Амберд, Армения), The 6th International Scientific Conference "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology" (2021, Новосибирск, Россия), XI International Symposium: Phenolic compounds: Fundamental and Applied Aspects (2022, Москва, Россия), Форум молодых ученых СНГ «Наука без границ» (2022, Нижний Новгород, Россия), VII Всероссийский молодежный форум «Наука будущего – наука молодых» (2022, Новосибирск, Россия), VI Международная научная конференция "Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы" (2025, Минск, Беларусь).

Результаты диссертационного исследования опубликованы в пяти статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и индексируемых в международной системе цитирования Scopus:

1. Mikhailova A. S. The genes determining synthesis of pigments in cotton / A. S. Mikhailova, K. V. Strygina, E. K. Khlestkina // Biological Communications. — 2019. — Vol. 64 — № 2. — P. 133–145. — <https://doi.org/10.21638/spbu03.2019.205>.
2. Mikhailova A. S. *In silico* analysis of the regulatory gene families for proanthocyanidins biosynthesis in the genus *Gossypium* L. / A. S. Mikhailova, K. V. Strygina, E. K. Khlestkina // Turkish Journal of Agriculture and Forestry. — 2022. — Vol. 46 — № 5. — P. 743–761. — <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3039>.
3. Mikhailova A. S. Candidate genes for brown fiber in cotton revealed among the *R2R3-MYB* and *bHLH-MYC* gene families / A. S. Mikhailova, N. A. Shvachko, L. P. Podolnaya, N. B. Brutch, E. K. Khlestkina // Journal of Natural Fibers. — 2024. — Vol. 21 — № 1. — Art. 2399930. — <https://doi.org/10.1080/15440478.2024.2399930>.
4. Mikhailova A. S. Expression of phenylpropanoid and flavonoid pathway genes in naturally colored cotton during late fiber development / A. S. Mikhailova, L. P. Podolnaya, E. K. Khlestkina // Plant Research — 2026 — Vol. 1 — 100005, ISSN 3117-5821 — <https://doi.org/10.1016/j.plares.2026.100005>.
5. Михайлова А. С. Особенности организации дублицированных копий ортологов генов *AtTT2* и *AtTT8* арабидопсиса в геноме аллотетраплоидного хлопчатника // А. С. Михайлова, Е. К. Хлесткина. Биотехнология и селекция растений. — 2026. — Т. 9. — № 3. — <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2026-3-o1> (принята в печать на 2026 год).

Научные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, отмечены дипломами I, II и III степеней (Приложение 24):

1. Диплом III степени за отлично представленный доклад на стендовой сессии в рамках 12-й Международной школы молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика», SBB-2020 // Республика Крым, Ялта и Севастополь, 14–20 сентября 2020
2. Диплом I степени за доклад на стендовой сессии в рамках XI Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН // Москва, 11–15 апреля 2022
3. Диплом победителя конкурса научно-исследовательских работ студентов и аспирантов российских вузов в секции агро-, био- и продовольственные технологии (II место) // Новосибирск, 23–26 августа 2022
4. Диплом за лучший доклад на VII Всероссийском молодежном форуме «Наука будущего – наука молодых» // Новосибирск, 23–26 августа 2022

Экспериментальные данные и теоретические выводы диссертационного исследования использовались в лекционных курсах образовательной программы магистратуры по направлению 06.04.01 Биология Научно-технологического университета «Сириус» (Приложение 25).

Личный вклад соискателя

Научные результаты, выявленные в ходе выполнения диссертационного исследования, получены автором самостоятельно, включая обзор и анализ литературы. Автор лично осуществлял проведение лабораторных исследований молекулярными методами, модификацию протоколов согласно текущим задачам и объекту исследования, анализ и обработку полученных экспериментальных данных, подготовку материалов для публикаций и тезисов конференций. Планирование и обсуждение результатов экспериментов проводилось совместно с научным руководителем. Подбор модельных образцов хлопчатника из коллекции ВИР для сравнительных исследований выполнен совместно с к.б.н., ведущим научным сотрудником и куратором коллекции хлопчатника, Л.П. Подольной. Автор осуществлял выращивание растений хлопчатника в климатических камерах и проводил фиксацию растительного материала при поддержке сотрудников лаборатории постгеномных исследований.

Структура и объём диссертации

Текст диссертационной работы изложен на 161 странице, содержит 1 таблицу, 32 рисунка и 25 приложений. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы (включает 286 источников).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эволюция и классификация рода *Gossypium*

Хлопчатник – древнейшее культурное растение. Считается, что хлопковое волокно использовалось первобытными людьми еще во времена позднего палеолита (40-10 тыс. лет до н.э.), а первые попытки доместикации возникли одновременно с зарождением земледелия в эпоху неолита (8-4 тыс. лет до н.э.) (Мауер Ф.М. Происхождение и систематика хлопчатника, 1954. С. 17). Исходные формы хлопчатника представляли собой многолетние древовидные растения. Под давлением естественного отбора в результате аридизации ряда тропических зон, а также искусственного отбора в ходе приспособления человеком растений к новым условиям при освоении им более северных районов с умеренным климатом, происходило постепенное сокращение жизненного цикла и появление устойчивых скороспелых форм. Превращение исходных древовидных форм хлопчатника в более мелкие кустарники однолетнего типа значительно расширило ареалы возделывания культурных видов, а также повлекло за собой резкое увеличение продуктивности растений (Симонгулян, Мухамедханов, Шифрин, 1987).

Одним из первых был описан травянистый вид *Gossypium herbaceum* L. (Мауер Ф.М. Происхождение и систематика хлопчатника, 1954. С. 19). Позднее стали появляться описания других видов: индийского хлопчатника *G. arboreum* и бразильского *Gossypium brasiliense* (Macfad.) J.Hern. В 1623 году К.Боген обобщил все имеющиеся сведения о видах хлопчатника и предложил обобщающее название «*Gossypium*» (транскрипция К. Богена) (Там же, с. 19). В работах Линнея, который опирался на существующие источники, а затем самостоятельно изучал растения по гербарным образцам и в живом виде, можно найти описание пяти видов: *G. herbaceum*, *G. arboreum*, *G. hirsutum*, *G. barbadense* и *Gossypium religiosum* L. (Там же, с. 20).

Хлопчатник *Gossypium* L. (семейство мальвовые, *Malvaceae* Juss.) принадлежит к небольшой таксономической трибе *Gossypieae*, которая включает всего восемь родов: *Lebronnecia* Fosberg (Маркизские острова) *Cephalohipiscus* Ulbr. (Новая Гвинея, Соломоновы острова), *Gossypioides* Skovst. ex J.B.Hutch. (Восточная Африка, Мадагаскар), *Kokia* Lewton (Гавайи), *Cienfuegosia* Cav. (Центральная и Южная Америка), *Hampea* Schltdl. (Мексика, Центральная Америка), *Thepparatia* Phuph. (Индонезия), *Thespesia* Sol. ex Corrêa (Австралия) и *Gossypium* (Старый и Новый Свет) (Fryxell, 1968; Fryxell, 1979). Из всех вышеперечисленных род *Gossypium* считается наиболее многочисленным и широко распространенным и включает 45 диплоидных, 5 аллотетраплоидных вида (Fryxell et al., 1992; Wendel, Cronn, 2003; Ulloa et al., 2007). Данные виды разделены на 9 геномных групп от А до G и K (Wendel, Cronn, 2003). Процессы полиплоидизации способствуют расширению видового разнообразия растений и играют важную роль в эволюции генома растений (Otto, Whitton, 2000; Rutland, Hall, McElroy, 2021). Геномы всех современных покрытосеменных растений сформировались в результате

одного либо нескольких раундов полиполидизации, в то время как среди представителей голосемянных полиплоидов насчитывается не более 5 % (Leitch, Leitch, 2008; Wendel, 2015). Полногеномные дубликации (автополиплоидизация) или объединение различных наборов хромосом путем гибридизации (аллополиплоидизация) приводит к появлению копий паралогичных и гомеологичных генов (Sonnhammer, Koonin, 2002). При этом судьба вновь возникших копий генов различна. Дублицированные копии полиплоидов могут разделять между собой функцию исходного гена (субфункционализация); один из паралогов приобретает новую функцию, а другой сохраняет исходную (неофункционализация); одна из копий подвергается псевдогенизации в результате накопления мутаций, превращаясь в псевдоген (Force et al., 1999; Magadum et al., 2013). Распределение функций между вновь возникшими дублицированными генами способствует успешной адаптации к изменяющимся условиям среды и приобретению пластичности генома у многих видов растений (Leitch, Leitch, 2008; Renny-Byfield, Wendel, 2014). Более того, за счет событий полиплоидизации формируются и закрепляются важные хозяйственно ценные признаки, что играет неоценимую роль при одомашнивании сельскохозяйственных культур (Hancock, 2005).

Диплоидные виды рода *Gossypium* формировались в течение 10 млн с образованием трех клад: Афро-Азиатской (А-, В-, F- и E-геномные виды), клады Нового Света (D-геном) и Австралийской клады (С-, G-, К-геномы) (рисунок 1) (Wendel, Cronn, 2003).

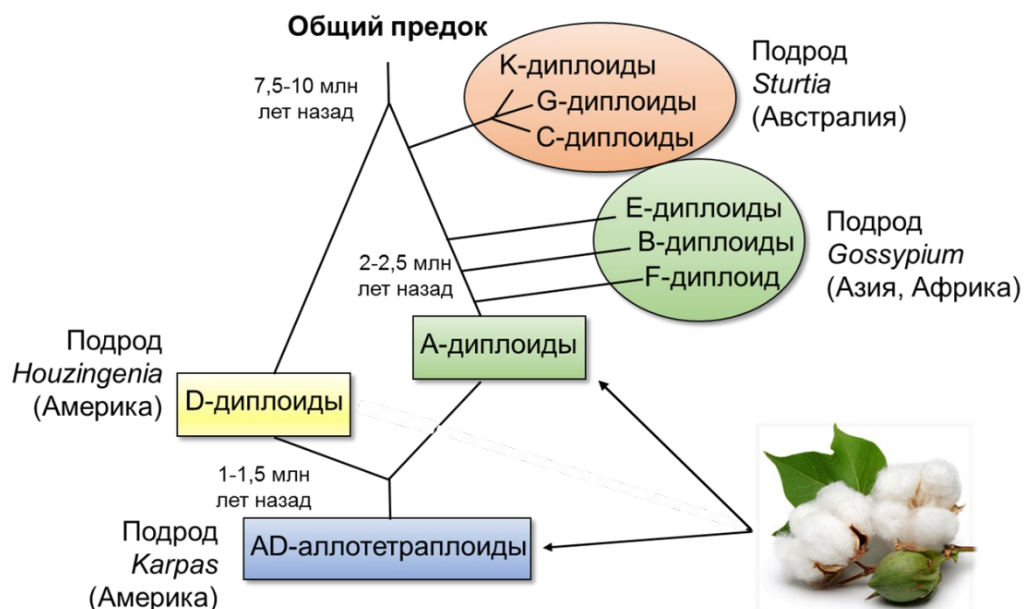


Рисунок 1 — Происхождение рода *Gossypium*: Новый Свет (D), Афро-Азия (А, В, Е, F) и Австралия (С, G, К) (ориг.)

Аллополиплоидные виды возникли в течение последних 1–1,5 миллионов лет в результате транскеанского переселения А-геномного диплоида в Новый Свет с его последующей

гибридизацией с местным D-геномным диплоидом (Wendel, Albert, 1992; Adams et al., 2003). После полиплоидизации аллополиплоидные виды разделились на пять клад, две из которых содержат *G. hirsutum* и *G. barbadense* (Wendel, Cronn, 2003).

К культивируемым относят четыре вида: два в Африке (А-геномные диплоидные виды *G. arboreum* и *G. herbaceum*), другие два возникли на территории Нового Света (AD-геномные тетраплоидные виды *G. hirsutum* и *G. barbadense*), среди которых наиболее распространенным и коммерчески важными являются виды *G. hirsutum* и *G. barbadense* (Hutchinson, 1951; Fryxell, 1979; Abdurakhmonov, 2010; Campbell et al., 2010).

Все виды рода *Gossypium*, включая дикие и культивируемые, в соматических клетках содержат диплоидный набор хромосом $2n = 26$.

В 1922 году А.Г.Николаевой были проведены важные цитологические исследования по подсчету хромосом у различных форм хлопчатника, опираясь на которые Г.С.Зайцеву, основоположнику советского хлопководства, удалось разграничить культурные виды на старосветские и новосветские, а также разработать первую классификацию рода *Gossypium* (Мауер Ф.М. Происхождение и систематика хлопчатника, 1954. С. 31). Согласно результатам работ советских ученых, диплоидное число хромосом у хлопчатников Нового Света (*G. hirsutum*, *G. barbadense*) составляет $2n = 52$, а Старого Света - $2n = 26$ (*G. arboreum*, *G. herbaceum*).

Виды доноры А- и D-геномов коммерчески важных аллотетраплоидных форм, *G. hirsutum* и *G. barbadense*, первоначально развивались изолированно друг от друга в разных полушариях и дивергировали в течение миллионов лет. Таким образом, в геноме аллополиплоидных видов хлопчатника копии большинства генов дублированы, однако в среднем расхождение последовательностей между копиями составляет около 3–4 % (Senchina, 2003).

Особенности организации генома хлопчатника отражаются на подходах к генетическому анализу в области частной генетики этой культуры, в том числе при изучении системы генов биосинтеза пигментов флавоноидной природы, знания о которых открывают перспективу ускоренной селекции хлопчатника с природноокрашенным волокном.

1.2. Флавоноидные соединения

Флавоноиды представляют собой один из основных классов вторичных метаболитов растений и грибов. Название произошло от латинского слова *flavus*, что означает желтый и характеризует их цвет в природе. Они играют важную роль в защите растений от абиотического и биотического стресса, а также составляют большую группу растительных пигментов (Salunkhe et al., 1983; Delph, Lively, 1989; Havsteen 2002; Karak, 2019).

Отмечена роль флавоноидов в защите растений от таких абиотических факторов, как засуха, ультрафиолетовое излучение, температурный стресс, повышение концентрации тяжелых металлов в почве (Buer, Imin, Djordjevic, 2010), а также их участие в метаболизме и защите от

вирусных или бактериальных инфекций, от окислительного стресса благодаря антиоксидантной активности (Gould, Lister, 2005).

По своей химической природе флавоноиды являются производными бензо-γ-пирона (хромон) и имеют общую структурную формулу C₆-C₃-C₆ (рисунок 2) (Kumar, Pandey, 2013).

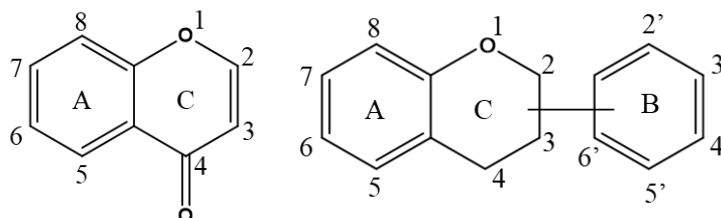


Рисунок 2 — Структура бензо-γ-пирона (слева); на общей структурной формуле флавоноидов (справа) схематично изображено возможное присоединение кольца В по 2, 3 или 4 положению гетероцикла С (ориг.)

Химическая структура всех флавоноидов содержит 15 атомов углерода, образующих 2 ароматических кольца А и В, соединённых шестичленным гетероциклом С (рисунок 2). При связывании ароматического кольца В с хромоном по 2, 3 или 4 положению образуются флавоноиды, изофлавоноиды и неофлавоноиды (рисунок 3).

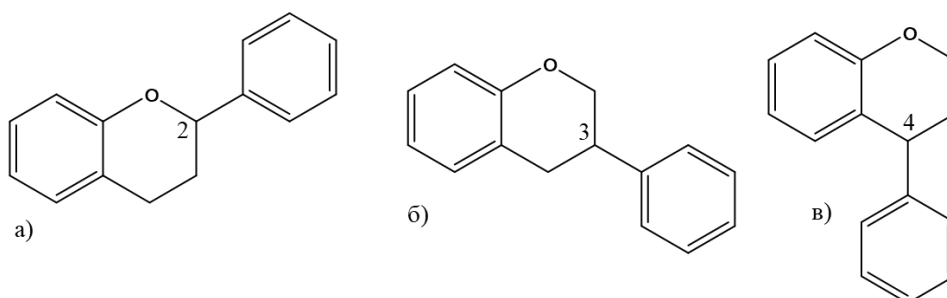


Рисунок 3 – Классы флавоноидов в зависимости от положения арильного радикала:

а) флавоноиды, б) изофлавоноиды, в) неофлавоноиды (ориг.)

Фенилаланин и малонил-кофермент-А с участием активированных коферментом-А коричных кислот являются прекурсорами в биосинтезе флавоноидных соединений. Все структурные производные флавоноидов получены из флавонов (рисунок 4), которые обычно находятся в клеточном соке молодых тканей высших растений (Winkel-Shirley, 2001).

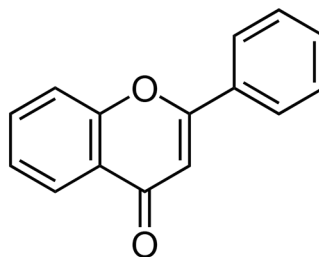


Рисунок 4 – Структура флавонола, являющегося исходным соединением в биосинтезе флавоноидов (ориг.)

Флавоноиды классифицируют на 6 групп: флавоны, флавонолы, флаваноны, катехины, антоцианы и изофлавоны (рисунок 5). Все классы проявляют цитотоксическую активность с различным механизмом действия.

Производные, имеющие γ-бензопириновый фрагмент, биологически активны и проявляют антибактериальные, противовирусные, противоопухолевые, антиоксидантные, противогрибковые свойства, а также способствуют понижению сахара и холестерина в крови (Benavente-García et al., 1997). Флавоноиды, аналоги хромонов, являются полигидроксилированными соединениями и способны селективно связывать свободные радикалы. Кверцетин (3,3',4',5' и 7-пентагидроксифлавоны) и производные ему флавоноиды ингибируют рост опухолевых клеток (Jeong et al., 2009).

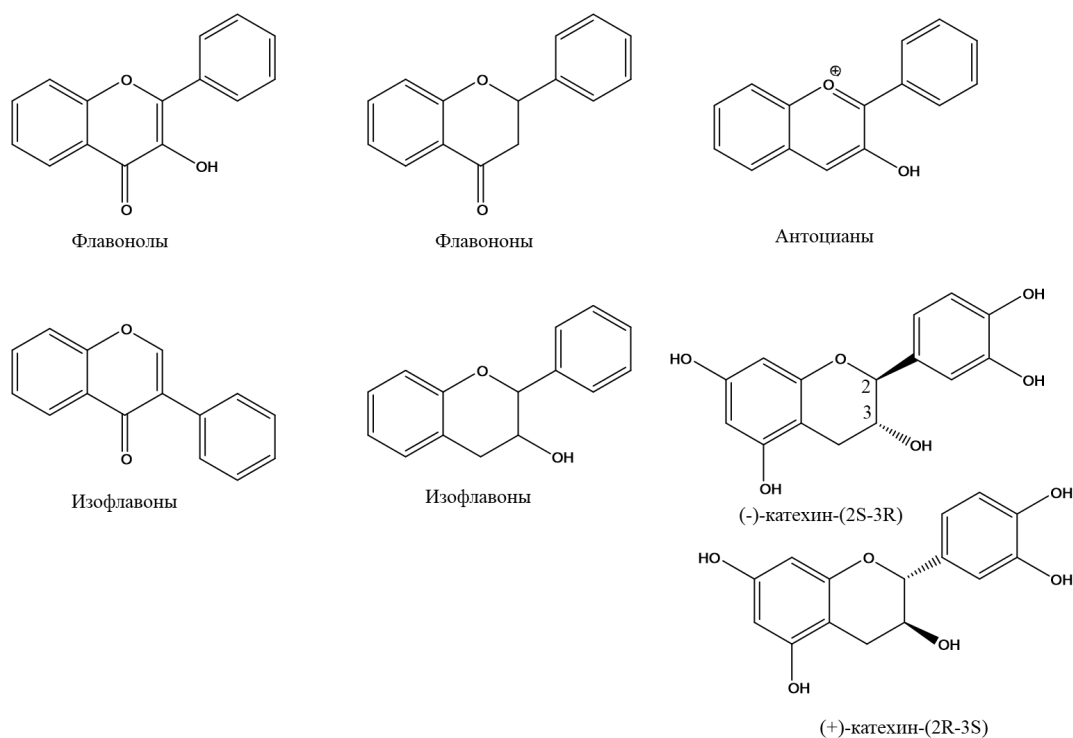


Рисунок 5 – Классификация флавоноидов (ориг.)

1.2.1. Биосинтез флавоноидных соединений

Биосинтез пигментов волокна хлопчатника берет свое начало из общего фенилпропаноидного пути (Peng et al., 2012; Li et al., 2013) (рисунок 6).

углерода – к дигидромирицетину. Постепенное восстановление кето-группы в 4-положении С-кольца дигидрокверцетина и дигидромирицетина последовательно дигидрофлавонол-4-редуктазой (DFR) и лейкоантоцианидинредуктазой (LAR) приводит к формированию стереоизомеров 2R,3S-флаван-3-ола – катехина ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$) из лейкоцианидина и галлокатехина ($R_1, R_2 = \text{OH}$) из лейкодельфинидина. В то время как при действии антоцианидинсинтазы (ANS) и антоцианидинредуктазы (ANR) из дигидрокверцетина и дигидромирицетина образуются 2R,3R-флаван-3-олы – из лейкоцианидина через цианидин эпикатехин ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$) и из лейкодельфинидина через дельфинидин эпигаллокатехин ($R_1, R_2 = \text{OH}$) (Bogs, 2005; Peng et al., 2012; Tan et al., 2013; Malik et al., 2015). Реакция конденсации мономерных единицы флаван-3-олов лежит в основе процесса полимеризации, в ходе которого накапливаются ПА (Nechepurenko et al., 2009; Feng et al., 2014; Xiao et al., 2014).

Превращения в данном биохимическом пути осуществляются ферментами, которые кодируются так называемыми структурными генами биосинтеза флавоноидов, активность которых в свою очередь зависит от регуляторных генов. Понимание общих закономерностей эволюции регуляторных комплексов у растений облегчает решение задач частной генетики.

1.3. Роль транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов у растений

Регуляция многих биологических процессов происходит у растений на уровне транскрипции. У них, как и у животных, в основе онтогенеза лежит способность клеток к дифференциальной экспрессии генов (Scott, 2000; Benfey, Weigel, 2001). В ответ на биотические и абиотические факторы окружающей среды изменяется уровень экспрессии генов, что является основной причиной изменений на фенотипическом уровне и составляет основу эволюции (Doebley, Lukens, 1998; Carroll, 2000; Tautz, 2000). В частности, морфологические изменения, зафиксированные при доместикации и селекции растений сельскохозяйственных культур, связаны с мутациями в генах, кодирующие факторы транскрипции, изменениями экспрессии этих генов либо других типов регуляторных белков (Peng et al., 1999; Doebley et al., 1997; Wang et al., 1999b; Frary et al., 2000). Например, у арабидопсиса факторы транскрипции семейства MYB WEREWOLF (WER) и GLABROUS1 (GL1) выполняют особую роль в развитии растений за счет различий в характере экспрессии генов, кодирующих данные белковые факторы (Lee, Schiefelbein, 2001).

Белки, принимающие участие в процессе транскрипции у эукариот, делят на группы, в зависимости от выполняемых функций: (1) общие факторы транскрипции (базальные) – задействованы в основном аппарате транскрипции, составляют основу преинициаторного комплекса (Cramer et al., 2001; Veenstra, Wolffe, 2001); (2) белки – коактиваторы, способствуют достижению необходимого уровня экспрессии генов путем связывания с базальным комплексом транскрипции или с ген-специфическим факторами транскрипции (Hampsey, Reinberg, 1999;

Malik, Roeder, 2000); (3) ген-специфичные регуляторные белки (активаторы и репрессоры) (Luscombe et al., 2000); (4) белки, осуществляющие ремоделирование хроматина (корегуляторные) – ковалентно модифицируют гистоны, осуществляют АТФ-зависимую реорганизацию хроматина (Agaloti et al., 2000). В отличие от белков базального аппарата транскрипции, которые в целом высококонсервативны, корегуляторы и факторы транскрипции в большей степени дивергируют в ходе эволюции у эукариот (Lee, Young, 2000; Lemon, Tjian, 2000). В частности, ТФ R2R3-MYB и bHLH-MYC являются ген-специфичными регуляторными белками, обеспечивая тканеспецифичную экспрессию в тканях растений (Koes, Verweij, Quattrocchio, 2005). Они связываются с регуляторными элементами в промоторной области структурных генов биосинтеза флавоноидных пигментов (Katiyar et al., 2012).

ТФ имеют специфические ДНК-связывающие домены, способные взаимодействовать с цепью ДНК. В зависимости от структуры ДНК-связывающего мотива, ТФ, в зависимости от структурного мотива, классифицируют как: гомеодомены (HD), спираль-петля-спираль (HTH), С-концевой эффекторный домен, лейциновая молния, цинковые пальцы и другие (Itzkovitz, Plusty, Alon, 2006). Наибольший вклад в процесс образования видов с новыми фенотипическими характеристиками вносят изменения в последовательности *цис*-регуляторных элементов, нежели мутации в кодирующих последовательностях генов (Wilson, Maxson, Sarich, 1974; Doebley, Lukens, 1998). Более того, однонуклеотидные замены в промоторных последовательностях могут влиять на способность связывания ТФ с целевыми сайтами, приводя либо к увеличению сродства, либо к потере взаимодействий (Ропомаренко, 2001).

Согласно положениям нейтральной теории молекулярной эволюции, сформулированной в 1968 году Мотоо Кимуры, эволюционные изменения большинства белков не влияют на морфологические признаки организмов, а также не носят адаптивный характер. В продолжении выводов М.Кимуры позднее было показано, что в случае нейтральной эволюции отношение несинонимичных замен к синонимичным заменам, Ka/Ks , будет равно единице. Из 3595 рассмотренных групп белков только для 17 отношение $Ka/Ks > 1$, т.е. наблюдались признаки положительного отбора (Endo, Ikeo, Gojobori, 1996). Данные выводы подтверждают гипотезу о том, что развитие новых морфологических признаков, имеющих адаптивный характер, не связано с изменениями в функции белков, следовательно, проявляемые ими функции также сохраняются неизменными в течение длительного периода времени. В пользу большей консервативности кодирующих последовательностей, указывает ряд следующих исследований. Обнаружено комплементарное дополнение гомологом гена *cdc2* кукурузы мутанта *cdc28* у дрожжей *Saccharomyces* (Colasanti, Tyers, Sundaresan, 1991). Белок DEF львиного зева полностью восстанавливает фенотип мутанта *ap3-1* и частично *ap3-3* у арабидопсиса (Irish, Yamamoto, 1995).

Изменение пространственно-временных паттернов экспрессии генов признано движущей силой эволюции видов (Raff, 1996). Мутации в последовательностях промоторов или энхансеров приводят к изменению паттернов экспрессии генов, что в свою очередь способствует появлению видов с неописанными ранее фенотипическими признаками, которые закрепляются в ходе естественного отбора (Doebley, Lukens, 1998; Rodríguez-Mega et al., 2015). Например, повышение уровня экспрессии гена, кодирующего S-линалоолсинтазу (*Lis*) у *Clarkia breweri* (A.Gray) Greene приводило к появлению сладкого запаха цветов за счет накопления белка *Lis*, катализирующего образование ациклического монотерпена – основного компонента эфирных масел растений (Dudareva et al., 1996).

Кроме того, мутации в нетранслируемых областях (5'-UTR, 3'-UTR) могут изменять тканеспецифичный характер экспрессии генов, что в свою очередь влечет фенотипические проявления. Например, вставка дублированной копии метаболического фермента в 5'-нетранслируемую область (5'-UTR) гомеобокс-содержащего гена *LeT6* у томата вызывала его сверхэкспрессию, что отражалось на превращении одноперистых сложных листьев в перистосложные с тремя либо четырьмя листовыми пластинками (Chen et al., 1997).

Как было указано выше, ТФ участвуют в инициации и регуляции транскрипции генов. В основном ТФ контролируют транскрипционную активность генов, связываясь с короткими специфическими участками ДНК, называемыми *цис*-регуляторными элементами, располагающимися до 5'- и после 3'-нетранслируемых областей, а также в интронах и нетранскрибируемых областях. Кроме промоторной последовательности гена, *цис*-регуляторные участки генов могут находиться на значительном удалении от сайта начала транскрипции и являться энхансерами в случае связывания с ними активаторов транскрипции и сайленсерами в случае репрессоров (Rebeiz, Tsiantis, 2017).

В свою очередь энхансеры и промоторы содержат определенные мотивы, на которых происходит сборка комплекса регуляторных факторов и активация транскрипции при воздействии внешних раздражителей в виде биотических (патогены), абиотических (тепловой шок, холод, окисление и др.) и метаболических факторов (фитогормоны, сахара). Например, транскрипция генов, имеющих в промоторной области светочувствительные элементы: G-бокс (CACGTG), I-бокс (GATAAAGR), H-бокс (ACCTA(A/C)C(A/C)) – активируется в ответ на воздействие света (Giliano et al., 1988; Gilmartin, 1990; Chattopadhyay, 1998); последовательности в виде С-повторов (CCGAC) и G-бокс (CACGTG) определяют ответ на воздействие низких температур (Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 1994; Dolferus et al., 1994).

Важно отметить, что промоторные области регуляторных генов биосинтеза флавоноидных соединений семейства MBW содержат многочисленные сайты, чувствительные к сигналам из внешней среды. Фитогормоны (ауксин, абсцизовая кислота (АВА), этилен, жасмонат

(JA), гиббереллин (GA)) и некоторые ТФ, типа MADS-box, играют ключевую роль в регуляции биосинтеза антоцианов (Jaakola, 2013). В ходе окислительно-восстановительного процесса с участием аскорбата и белка NAC происходит активация транскрипции генов *PAP1* (*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1*, семейство *R2R3-MYB*), *GL3* (*GLABRA3*) и *EGL3* (*ENHANCER OF GLABRA3*, семейство *bHLH-MYC*) при УФ-воздействии (Morishita et al., 2009; Page et al., 2012). В свою очередь, ТФ PAP1 (также известный как MYB75) специфично связывается с консенсусной последовательностью ANCNNCC длиной 7 пн, локализованной в промотроне области структурных генов-мишеней *CHS*, *F3H*, *DFR*, *ANS*, *3GT* биосинтеза антоцианов (Guo et al., 2023). ТФ GL3 и EGL3 связываются с промотором генов-мишеней, содержащих E-box-подобные мотивы, последовательность которых содержит 6 пн (5'-CANNTG-3') (Li et al., 2006).

1.3.1. Регуляция биосинтеза флавоноидных соединений MBW-комплексом

Разнообразие флавоноидов образуется в результате фенилпропаноидного и флавоноидного путей биосинтеза, которые контролируют две группы генов (Cheynier et al., 2013). Структурные гены кодируют ферменты биосинтеза, а регуляторные гены – ТФ, контролирующие экспрессию структурных генов (Saito et al., 2013; Zhang et al., 2019). ТФ связываются с *cis*-активными элементами в промотроне области гена-мишени (Katiyar et al., 2012).

Экспрессия структурных генов биосинтеза флавоноидов контролируется ТФ семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*, которые вместе образуют регуляторный комплекс MBW (Koes, Verweij, Quattrocchio, 2005; Li, 2014). Важно отметить, что у однодольных растений регуляция биосинтеза флавоноидных соединений контролируется комплексом MBW на всех этапах биосинтеза, тогда как у двудольных комплекс факторов контролирует только поздние гены, а ранние регулируются факторами семейства *R2R3-MYB* (Gonzalez et al., 2008; Petroni, Tonelli, 2011; Zhang et al., 2019).

Наряду с конститутивной экспрессией, различные факторы окружающей среды, такие как УФ-излучение, засуха, экстремальные температуры, недостаток азота, включая эндогенные факторы (фитогормоны жасмонат, цитокины, абсцисовая кислота) также вызывают накопление в тканях флавоноидных пигментов посредством активации комплекса ТФ MBW (Christie, Alfenito, Walbot, 1994, Lea et al., 2007).

Согласно литературным данным, у покрытосеменных растений гены, кодирующие данные ТФ (*R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*), представлены множественными копиями (Duan et al., 2022; Huang et al., 2022; Li et al., 2025; Liu et al., 2024; Lloyd et al., 2017; Pu et al., 2020; Wang et al., 2019; Wu et al., 2025; Xiao et al., 2023; Yan et al., 2023; Yang et al., 2024, 2025; Yuan et al., 2021; Zhu et al., 2020, 2021, 2025). Наиболее многочисленное семейство *R2R3-MYB*, включая факторы *bHLH* и *WD40*, вовлечены в регуляцию биосинтеза большинства вторичных

метаболитов, в частности и флавоноидных пигментов (Nesi et al., 2000, 2001; Dubos et al., 2010; Xu, Dubos, Lepiniec, 2015). Оно делится на 3 группы: R1R2R3-MYB, R2R3-MYB и R1-MYB, в зависимости от количества мотивов в ДНК связывающем домене (Dubos et al., 2010). Важно отметить, что повторы R2 и R3 специфического ДНК-связывающего домена R2R3-MYB имеют очень сходную структуру с мотивом «спираль-петля-спираль», хотя идентичность их последовательностей в tandemных повторах составляет всего 31%, при этом третьи спирали в обоих повторах напрямую распознают специфическую последовательность оснований - РуААСG/TG (Oda et al., 1997). Мотив «спираль 1» и «спираль 2» домена R2 необходимы для специфического связывания с последовательностью ДНК, в то время как третья спираль важна для его распознавания. Незаменимыми аминокислотными остатками (а.о.) при формирования гидрофобного ядра R2 домена в первой спирали являются Вал103 и Вал107. Эти остатки не взаимодействуют напрямую с ДНК, но способствуют правильной пространственной организации как мотива «спираль 1», так и полного структурного элемента с тремя спиралями, соответствующему домену R2 (Oda et al., 1997).

1.4. Хлопчатник с природноокрашенным волокном

Долгое время селекция хлопчатника была ориентирована преимущественно на получение сортов с белым волокном, поскольку оно служило универсальной и наиболее удобной основой для последующего промышленного окрашивания. Тем не менее, такое сырье требует предварительного отбеливания для удаления примесей воска и природных пигментов, придающих желтоватый или сероватый оттенки, и улучшения качества окрашивания. Активное применение отбеливающих агентов и синтетических красителей не только усложняет производственный процесс, но и оказывать все более негативное влияние на окружающую среду и становится причиной возникновения аллергических реакций у конечных потребителей (Hua et al., 2007). Кроме того, дополнительная обработка хлопковых волокон снижает качество готовых текстильных материалов. В связи с этим в последнее время интенсифицировались исследования, направленные на изучение природы пигментов хлопкового волокна. В частности, развивается область селекции, связанная с созданием сортов хлопчатника с природноокрашенным волокном.

В природе натуральную окраску хлопкового волокна обеспечивают фенольные соединения. Накопление в вакуолях окисленной формы проантоцианидинов (ПА), также известных как конденсированные танины, приводит к проявлению оттенков бурого цвета (Feng et al., 2013; Gong et al., 2014). Производные кофейной кислоты, обнаруженные в субериновом слое, окрашивают волокно в зелёный цвет (Ma et al., 2016; Ryser, Holloway, 1985; Schmutz, Jenny, Ryser, 1994).

1.4.1. Стадии развития волокна хлопчатника и накопление пигментов

Выделяют пять стадий развития волокна: инициация (0–3 ДПО), элонгация или

удлинение волокна (3–16 ДПО), транзиция – переход от элонгации к формированию вторичной клеточной стенки (ВКС) (16-20 ДПО), синтез ВКС (20-40 ДПО) и созревание (40-50 ДПО). Процесс транзиции характеризуется началом синтеза целлюлозы, изменениями в ориентации микротрубочек и микрофибрилл целлюлозы, а также замедлением синтеза полисахаридов первичной клеточной стенки (ПКС) (Haigler et al., 2012). В этот период формируется слой клеточной стенки, аналогичный слою S1 в древесных волокнах (Seagull, 1993). Максимальные значения удельной разрывной нагрузки и прочности достигаются к 21 ДПО. В последующий период удельная разрывная нагрузка отдельных волокон продолжает возрастать за счёт увеличения их массы, тогда как относительная прочность стабилизируется (Hsieh, 1996). Таким образом, ключевые прочностные характеристики хлопкового волокна достигают максимума к началу стадии формирования ВКС. В этот же период активно экспрессируются регуляторные гены, активируются фитогормональные сигналы и накапливаются вторичные метаболиты. В частности, транскрипцию около 1000 генов, вовлеченных в процесс формирования клеточной стенки регулируют такие ТФ, как NAC-доменные белки, представители семейства MYB, Hot216 и KIP-белки (Li et al., 2020).

К 20 ДПО в бурых волокнах среди дифференциально экспрессируемых генов с повышенной экспрессией преобладают гены, вовлечённые в биосинтез вторичных метаболитов, окислительные процессы и функционирование трансмембранных транспортёров (Hinchliffe et al., 2024). К этому моменту завершается формирование ПКС, содержащей ~30% целлюлозы, ассоциированной с ксилоглюканом и пектином (Haigler et al., 2012; Meinert, Delmer, 1977; Tokumoto et al., 2002). Начиная с 20 ДПО, в стадии синтеза ВКС активно экспрессируются гены семейства целлюлозсинтазы (CESAs), и к 30 ДПО в волокнах накапливается ~75% от конечного содержания целлюлозы (Pear et al., 1996; Kim et al., 2001). До завершения созревания и гибели клеток содержание целлюлозы продолжает увеличиваться, утолщая ВКС, и к 50 ДПО достигает 98% (Kim, Triplett, 2001).

При сравнении двух изогенных линий хлопчатника с белым и бурым волокном максимальное количество метаболитов в буром волокне зафиксировано на 12 и 40 ДПО, а минимальное – на 24 ДПО. На стадии элонгации (к 8 ДПО) отмечена наиболее высокая экспрессия генов вторичного метаболизма. Среди идентифицированных метаболитов преобладали фенилпропаноиды, органические кислоты и сахара (Hinchliffe et al., 2024). Учитывая, что окрашенное волокно уступает белому по прочности и длине, можно предположить, что биосинтез целлюлозы и пигментов конкурирует за общие субстраты на ранних и поздних стадиях развития волокна (Dutt et al., 2004; Feng et al., 2011; Hua et al., 2007).

Формирование ПКС, переход к синтезу ВКС и достижение максимальной длины волокна к 25 ДПО тесно связаны с ключевыми физиологическими этапами развития. На 25 ДПО

наблюдается транскрипционная активация генов, кодирующих специфические целлюлозсинтазы, хитиназы и другие белки, ассоциированные с синтезом ВКС (Novav et al., 2008). Качество волокна в значительной степени определяется в период формирования ВКС (с 16 по 40 ДПО) (Al-Ghazi et al., 2009). В развивающемся волокне бурых оттенков ПА накапливаются в вакуолях клетки; по мере созревания волокон и перехода к 40 ДПО тонопласт клетки разрушается, и ПА окисляются, связываясь с полисахаридами ВКС и локализуясь преимущественно по периферии ВКС до завершения созревания (Liu et al., 2025). Однако большинство исследований сосредоточено на периоде от 0 до 20 ДПО, тогда как интервал 20-40 ДПО, вероятно, представляет не меньший интерес для изучения механизмов накопления пигментов.

1.4.2. Регуляция биосинтеза пигментов в волокне хлопчатника бурых оттенков

Механизмы регуляции биосинтеза антоцианов и ПА подробно описаны у модельного объекта *Arabidopsis thaliana* L. (Walker et al., 1999). У *A. thaliana* накопление ПА транскрипционно активируется комбинаторным действием белков семейства R2R3-MYB (TT2), bHLH (TT8) и WD40 (TTG1) (Walker et al. 1999; Nesi et al., 2000, 2001; Baudry et al., 2004; Gonzalez et al., 2008). Факторы R2R3-MYB в большинстве случаев обеспечивают специфичность связывания с ДНК, тогда как bHLH-MYC и WD40 опосредуют реакцию на внешние стимулы (Stracke, Werber, Weisshaar, 2001; Stracke et al., 2007).

ТФ комплекса MBW участвуют в регуляции ряда других процессов, обеспечивающих жизнедеятельность высших растений. Например, ТФ GL3 и EGL3 (семейство bHLH-MYC), помимо контроля биосинтеза антоцианов, вовлечены в регуляцию развития трихом и корневых волосков и взаимодействуют с различными MYB-факторами, тогда как TTG1 выполняет преимущественно роль стабилизатора MBW-комплекса (Xu et al., 2015, Qi et al., 2011, Stracke et al., 2007).

У хлопчатника транскрипция гена *GhbHLH130D*, кодирующего ТФ семейства bHLH-MYC, активируется R2R3-MYB-факторами с последующим формированием регуляторного комплекса MBW (R2R3-MYB/bHLH-MYC/WD40), который контролирует экспрессию структурных генов биосинтеза ПА (Baudry, Caboche, Lepiniec, 2006; Baudry et al., 2004) (рисунок 7). Аналогичное взаимодействие было продемонстрировано для белковых продуктов ортологичных генов *GhTT2-3A* (ортолог *AtTT2 A. thaliana*; также известный как *GhMYB36*, в настоящем исследовании обозначен как *GhTT2-A1*) и *GhbHLH130D* (ортолог *AtTT8 A. thaliana*) у хлопчатника. Установлено, что ТФ, кодируемый геном *GhTT2-3A*, активирует экспрессию *GhbHLH130D*, при этом уровень накопления транскриптов у образцов хлопчатника с бурой окраской волокна превышает этот же показатель у беловолокнистых форм (Yan et al., 2018).

Кроме генов, кодирующих ТФ семейств R2R3-MYB и bHLH-MYC, у хлопчатника сообщалось и о генах семейства *WD40*. В геноме *G.hirsutum* идентифицированы гены *GhTTG1* и *GhTTG3*, ортологи гена *AtTTG1* *A. thaliana*, белковые продукты которых вовлечены в процесс инициации развития волокна у хлопчатника и трихом у арабидопсиса (Humphries et al., 2005).

Многие структурные гены, вовлеченные в биосинтез флавоноидных пигментов, у хлопчатника охарактеризованы (Fan et al., 2012; Feng et al., 2013; Li et al., 2013; Malik et al., 2015; Liu et al., 2018; Mikhailova et al., 2019). Комплекс ТФ трех семейств MYB-bHLH-WD40 (MBW) регулирует экспрессию генов, участвующих в биосинтезе метаболитов флавоноидного и фенилпропаноидного путей (Xu et al., 2015). Сравнительный метаболомный и транскриптомный анализ продемонстрировали в развивающемся и зрелом буре волокне присутствие антоцианов, проантоцианидинов и флаван-3-олов (Ran et al., 2025).

Считается, что в формирование признака бурой окраски волокна вносят вклад 6 локусов *Lc1-Lc6* (Kohel, 1985), а проявление признака определяется комплементарным взаимодействием

неаллельных генов в *Lc1* и *Lc2*. При скрещивании образцов с тёмно-бурым и белым цветом волокна все гибриды в F1 имеют светло-бурый оттенок волокна, в F2 наблюдается расщепление 9:7 (окрашенное волокно:белое) (Ware, 1932; Wen et al., 2018). При выделении растений с окрашенным волокном наблюдается расщепление 3:24:9:28 (тёмно-бурый:светло-бурый:кремовый:белый). Лocus *Lc1* был картирован на хромосоме A07, *Lc2* - на A06 (Wang, 2014). В локусе *Lc1* найден ген *GhTT2-A1* (Hinchliffe et al., 2016).

Полногеномный анализ ассоциаций выявил два локуса количественных признаков на хромосоме A07, qBF-A07-1 (Gh_A07G2341–TT2, известный как *GhTT2-A3* и *GhTT2-A1*) и qBF-A07-2 (Gh_A07G0100–TTG1), определяющих оттенок бурого волокна в хлопчатнике *G. hirsutum* (Wen et al., 2018). В другой работе признак бурой пигментации объясняется инверсией в 1,4 Мб выше гена *GhTT2-A3*, которая приводила к его повышенной экспрессии (Hinchliffe et al., 2016). Позднее проявление ржаво-бурый фенотип связывали с отсутствием вставки Ту-3 подобного LTR-ретротранспозона в области до 7,5 т.пн от сайт-старт-сайта начала транскрипции гена *GhTT2-A3*: наличие ретротранспозона подавляет экспрессию гена и связано с отсутствием пигментации волокна (Pinnika et al., 2025).

Ген *Re*, кодирующий ТФ MYB113 семейства R2R3-MYB и известный как *GhPAP1D*, одновременно с *GhTT2-A3* активирует метаболические пути биосинтеза антоцианов и проантоцианидинов, которые, накапливаясь в волокне хлопчатника, окрашивают его в оттенки бурого цвета (Wang et al., 2022). Однако позже отмечена конкурентная регуляция между *Re* и комплексом MBW, включающим *GhTT2-A3*: при низком уровне экспрессии *Re* и *GhTT2-A3* наблюдается минимальное накопление пигментов; при более высоком: если содержание антоцианов превышает содержание ПА – волокна приобретают ржаво-бурый оттенок, в обратном случае – темно-коричневый (Li et al., 2024).

Пурпурно-красный цвет волокна, при созревании переходящий в красно-бурый, удалось достичь при одновременной экспрессии генов *Lc* (*Leaf color*; ген семейства bHLH-MYC) и *GhPAP1D* (Fan et al., 2016; Ludwig, Wessler, 1990; Ran et al., 2025). Трансгенные растения хлопчатника с розовой окраской волокна получены введением конструкции, содержащей последовательности генов *CYP76AD1*, *DODA* и *GT* свеклы столовой (*Beta vulgaris* L.), экспрессирующиеся под контролем конститутивного промотора 35S CaMV (вируса мозаики цветной капусты), в геном сорта Zhongmian49 с высокими показателями оценки качества волокна (Ge et al., 2023; Li et al., 2023).

Таким образом, механизмы формирования натуральной окраски волокна хлопчатника достаточно нетривиальны и требуют детального изучения, несмотря на большое количество существующих публикаций.

1.4.2.2. Структура проантоцианидинов как основных метаболитов бурого волокна хлопчатника

Химическая структура ПА достаточно нетривиальна — на ее расшифровку потребовалось несколько десятилетий (Gu et al., 2003). С помощью таких современных физико-химических методов анализа, как: масс-спектрометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), метод кругового дихроизма (КД) — удалось определить молекулярный вес ПА, его структуру и химические свойства (Gu et al., 2003; Ferreira, Slade, Marais, 2005).

Химическая структура флаван-3-олов представлена дифенилпропановым остовом $C_6C_3C_6$ и включает 2 ароматических кольца, обозначаемых А и В, связанных трикарбоновым фрагментом, образующим гетероцикл С. При этом гетероциклическое бензопирановое кольцо С, конденсированное с кольцом А, имеет фенильный заместитель в виде кольца В (Ribéreau-Gayon, 1972) (рисунок 2). Структурное разнообразие (стереохимия ассиметричного (хирального) атома углерода и паттерн гидроксирования кольца В) варьируется в зависимости от природы флаван-3-олов как составляющих мономерных единиц и концевых групп, положения и стереохимии межфлавановой связи между мономерными единицами, а также степени полимеризации. Кроме того, возможны последующие модификации ПА путем О-метилирования, О-ацилирования, С- и О-гликозирования, ведущие к дериватизации структуры ПА (Bruyne, 1999).

Наиболее часто структура ПА включает 2,3-транс-(+)-катехин и 2,3-цис-(-)-эпикатехин, которые имеют противоположную конфигурацию хирального атома углерода в третьем положении кольца С (C3) (см. рисунок 5). В (+)-катехине (2R, 3S) и (-)-эпикатехине (2R, 3R), конфигурация атома углерода в С кольце во втором положении (C2) всегда R, однако у некоторых представителей семейств однодольных и двудольных, таких как *Rhus*, *Uncaria*, *Polygonum*, *Rapheolepsis* и *Schinopsis* (Geiss et al., 1996), в структуре обнаружены флаван-3-олы с конфигурацией S при C2, что усложняет структуру ПА (в случае S конфигурации C2 в кольце С в название флаван-3-олов добавляется префикс энантио - *ent*-флаван-3-ол) (Geiss et al., 1996; Santos-Buelga, Francia-Aricha, Escribano-Bailón, 1995; Ferreira, 1996).

В ПА мономерные единицы, присоединяясь посредством C4 атома, образуют связи с C6 или C8 атомами углерода, в зависимости от этого выделяют α - или β -тип межфлавановой связи. Олигомеры, состоящие из флаван-3-олов, соединенных связями $C4 \rightarrow C8$ или $C4 \rightarrow C6$, относят к В-типу ПА (Xie, Dixon, 2005). Структуры А-типа ПА характеризуются одновременным формированием простых эфирных связей между $C2\beta \rightarrow O \rightarrow C5$ или $C2\beta \rightarrow O \rightarrow C7$ и $C4 \rightarrow C8$ или $C4 \rightarrow C6$ атомами углерода (Gu et al., 2003).

Однако с открытием новых типов структур ПА появилась более удобная современная номенклатура ПА. Согласно ей, элементарные звенья олигомеров обозначаются названием соответствующих флаван-3-оловых мономеров (Hemingway, 1982). Местоположение и направление межфлавановой связи указывается в скобках стрелкой ($\rightarrow$), а конфигурация обозначается как α или β . Например, димер процианидина В1 назван эпикатехин- ($4\beta \rightarrow 8$)-катехином, димер А1 назван эпикатехин- ($4\beta \rightarrow 8, 2\beta \rightarrow 7$)-катехином, а тример С1 как [эпикатехин - ($4\beta; \rightarrow 8$)] 2-эпикатехин.

Структуру ПА также усложняют высокие показатели степени полимеризации, все составляющие мономерные единицы распределяются и связываются случайно в общую структуру (Cheynier, 2005).

Присутствие ПА в волокне хлопчатника бурого цвета было подтверждено с помощью качественной цветной реакции с 4-диметиламиноциннамальдегидом (DMACA) — реагентом, широко применяемым для детекции ПА в растительных тканях и окрашивающих их в характерный синий цвет (Harland, 1932; Xiao et al., 2007). Сравнительная обработка волокон белого и коричневого хлопчатника реагентом DMACA продемонстрировала, что коричневые волокна приобретают темно-синюю окраску, тогда как зрелые белые волокна остаются неокрашенными (Li et al., 2013). По мере увеличения числа ДПО, волокно хлопчатника более интенсивно окрашивается в синий цвет, что связано с постепенным накоплением ПА в ходе развития волокна (Feng et al., 2014).

Структуру мономерных звеньев ПА в волокнах хлопчатника бурого цвета установили с помощью методов: времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) (Nechepurenko et al., 2009; Wang et al., 2016). Результаты исследований показали, что инициаторное (первое) звено полимерной цепи включает галлокатехина, а все последующие звенья несут по три гидроксильные группы в В-кольце (Bogs, 2005; Xiao et al., 2008; Ershik, Buzuk, 2009; Feng et al., 2014; Xiao et al., 2014). Структура ПА в волокнах белого и бурого цвета существенно различается: в неокрашенном волокне содержание продельфинидина (PD) и процианидина (PC) примерно одинаково и структура ПА модифицирована галлоильной группой (остаток галловой, 3,4,5-тригидроксibenзойной кислоты), тогда как в буром преобладает продельфинидин (90 % PD и 10 % PC) (Xiao et al., 2008; Feng et al., 2014; Xiao et al., 2014).

1.4.3. Гены-кандидаты, вовлечённые в формирование признака зелёной окраски волокна хлопчатника

Предыдущие исследования показали, что пигменты зелёного хлопкового волокна включают в основном гидроксикоричную кислоту и ее производные, которые синтезируются в растениях в ходе фенилпропаноидного пути. В этом пути *4CL* является ключевым геном, кодирующим фермент 4-кумарат:КоА лигаза – лигазу кофермента А, которая катализирует превращение гидроксикоричных кислот в соответствующие тиоэфиры КоА и их производные (Feng et al., 2017).

По результатам транскриптомного анализа у образцов хлопчатника с зелёной окраской волокна более высокой экспрессией выделялись гены, кодирующие вторичные метаболиты флавоноидного и фенилпропаноидного путей, среди которых в качестве генов-кандидатов 2 гомеологичных гена, кодирующих фермент 4-кумарат:КоА лигаза (Sun et al., 2019).

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что в зелёноволокнистом хлопчатнике присутствуют как вторичные метаболиты флавоноидного пути, так и метаболиты биосинтеза кутина, суберина и воска, содержание которых существенно выше, чем в беловолокнистом. В связи с этим установлено, что за пигментацию зелёного волокна отвечают коричные кислоты и их производные в сочетании с бесцветными флавоноидами (рисунок 8) (Sun et al., 2019).

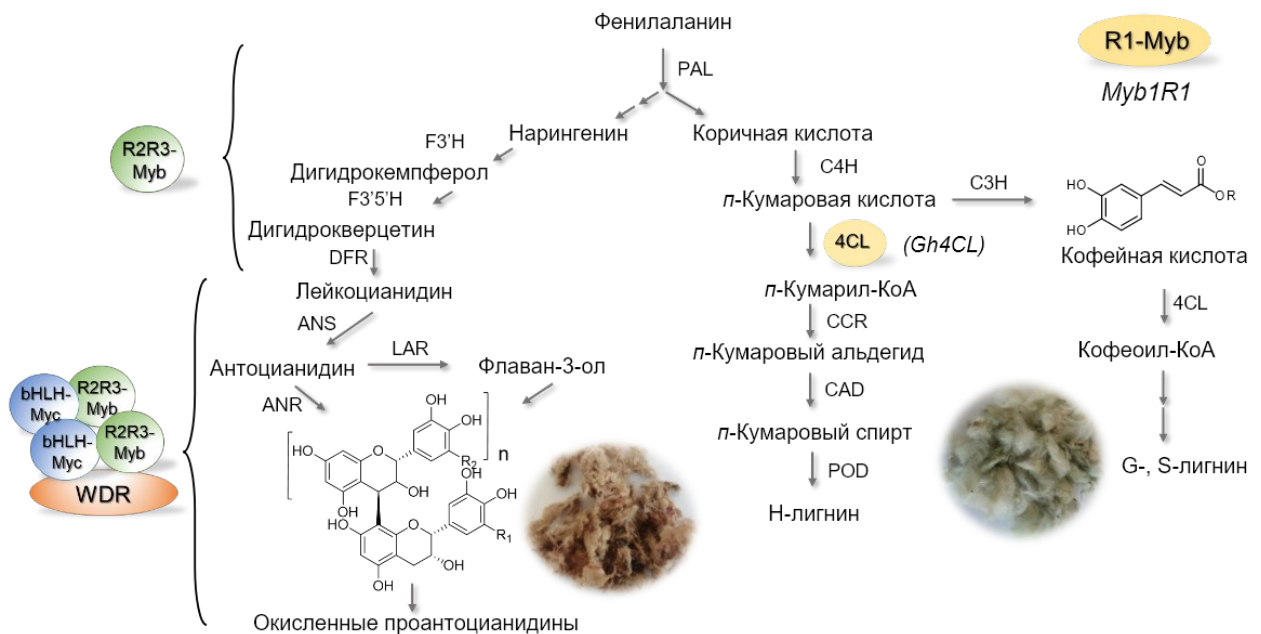


Рисунок 8 – Обобщенная схема биосинтеза флавоноидных и фенилпропаноидных пигментов в буром и зелёном волокне хлопчатника (по Petroni, Tonelli, 2011).

В более позднем исследовании был проведен транскриптомный и метаболомный анализ зелёного волокна хлопчатника в разных условиях – при инсоляции и в её отсутствии (Tang et al.,

2021). В контрольной группе коробочки хлопчатника не были защищены от инсоляции, а в экспериментальной волокно формировалось в коробочках, накрытых специальными затемняющими зип-пакетами и имело более светлый оттенок. Материал двух групп был зафиксирован на 15 день после опыления. Среди ДЭГов выделились факторы транскрипции семейства MYB. Из числа дифференциально накапливающихся метаболитов к 45 ДПО идентифицировали 20% метаболитов фенилпропаноидного пути от общего числа.

Известно, что биосинтез вторичных метаболитов фенилпропаноидного пути (таких как шикимовая кислота, являющаяся прекурсором в биосинтезе фенилаланина, флавоноиды, фенилпропаноиды и лигнин) тесно связан с факторами транскрипции MYB. В свою очередь, вторичные метаболиты являются субстратами для синтеза многих природных пигментов, тогда как факторы транскрипции MYB регулируют проявление окраски цветов и плодов у растений.

С помощью данных транскриптомного и метаболомного анализа удалось установить взаимосвязь накопления флавоноидных метаболитов с активностью генов семейства *MYB1-R1* в волокне хлопчатника зеленого цвета. Таким образом, было выделено два регуляторных гена-кандидата *GhMYB1R1* в субгеномах At и Dt, транскрипционная активность которых значительно уменьшалась в отсутствии инсоляции (Tang et al., 2021).

1.4.3.1. Метаболиты, обуславливающие проявление зелёных оттенков хлопкового волокна

В 1993 году научной группой под руководством Schmutz и коллег в ходе биохимического анализа волокон зелёного цвета из суберинового слоя удалось экстрагировать ω -гидроксидокозановую кислоту и докозановую кислоты, вовлеченные в биосинтез лигнина – важного структурного компонента клеточной стенки и межклеточного пространства (Schmutz et al., 1993; Fan et al., 2009). Это стало первым шагом в исследовании природы зелёной окраски хлопкового волокна. Позднее с помощью современных физико-химических методов анализа среди пигментов зелёного волокна выделили: два типа коричной кислоты (феруловую и кофейную) и производные коричной кислоты (кофеил-хинная кислота, кониферилальдегид, 5-гидроксикониферилальдегид, синапальдегид) – прекурсоры биосинтеза лигнина и лигнана (Sun et al., 2019).

В ходе сравнительного метаболомного анализа было продемонстрировано, что содержание вторичных метаболитов, а также промежуточных продуктов биосинтеза кутина, суберина и воска в зелёноволокнистом хлопчатнике существенно выше, чем в беловолокнистом (Sun et al., 2019). Кроме того, с помощью протеомного анализа идентифицирован ключевой фермент биосинтеза лигнана – редуктаза бензилового эфира фенилкумаровой кислоты (PCBER) в период развития волокна с 15 по 27 день после опыления (ДПО), с превалирующим количеством лигнанов в зелёном волокне в сравнении с белым и бурым (Li et al., 2018).

Как один из ключевых ферментов биосинтеза лигнанов по результатам сравнительного протеомного анализа образцов хлопчатника контрастной окраски волокна, был выделен PCBER, содержание которого в зелёном волокне превышало концентрацию в буром. Помимо метаболитов фенилпропаноидного пути выделены компоненты флавоноидного: флавоны, флавонолы, флаван-3-олы и антоцианы (Sun et al., 2019). Однако качественная реакция с пара-(диметиламино)коричным альдегидом не выявила наличие проантоцианидинов – основного пигмента буроокрашенных форм, в волокне зелёного цвета (Li et al., 2018; Li, 2020). Более того, на различную природу пигментов указывает ряд других физико-химических исследований. Волокна зелёного цвета, в отличие от волокон бурых оттенков, наиболее чувствительны к воздействию таких внешних факторов, как УФ-излучение, щелочи, окислительные или восстанавливающие агенты (Hinchliffe et al., 2015; Ma et al., 2016). Например, обработка растворами 6M HCl или 95% этанола приводит к обесцвечиванию зелёного волокна вследствие нестабильности структуры пигментов. Подобный эффект не характерен для волокон бурых оттенков (Li, 2020).

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что в волокне хлопчатника зеленой окраски присутствуют как вторичные метаболиты флавоноидного и фенилпропаноидного путей, так и метаболиты биосинтеза кутина, суберина и воска, содержание которых существенно выше, чем у беловолокнистых форм (Sun et al., 2019; Tang et al., 2021; Xie et al., 2025).

Таким образом, регуляторные гены биосинтеза флавоноидных соединений представляют особый интерес для выявления потенциальных аллельных различий, связанных с изменениями по окраске волокна. Однако ТФ семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40, регулирующие биосинтез фенольных пигментов, в полной мере у хлопчатника не охарактеризованы. Детальный *in silico* анализ позволит идентифицировать все полноразмерные паралогичные и гомеологичные копии регуляторных генов, кодирующие эти ТФ, в геноме аллотетраплоидного хлопчатника вида *G. hirsutum*, проанализировать их структурно-функциональную организацию и особенности эволюционного развития. Оценка транскрипционной активности ключевых структурных и регуляторных генов, вовлечённых в биосинтез флавоноидных и фенилпропаноидных пигментов на стадии визуального проявления пигментации у образцов хлопчатника с контрастной окраской волокна, позволит дополнить имеющуюся информацию о механизмах накопления пигментов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Идентификация дублицированных копий генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*

Поиск паралогичных и гомеологичных копий генов *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*, формирующих вместе регуляторный комплекс *MBW*, основывался на гомологии известных последовательностей, размещенных в базе данных CottonFGD: *GrTT2* (CottonFGD: Gorai.001G020600), *GrMYB10* (Gorai.010G087200), *GhTT8* (также известный как *GhbHLH130D*; Gh_D11G1273), *GhTTG1* (AF530907) и *GhTTG3* (AF530911). Идентификация дублицированных копий генов в геномах диплоидных *G. raimondii* (D₅) и *G. arboreum* (A₂) и аллотетраплоидных *G. hirsutum* ((AD)₁), *G. barbadence* ((AD)₂) видов хлопчатника был осуществлен посредством применения алгоритма BLASTN в базе данных Cotton Functional Genomics Database (CottonFGD, <https://cottonfgd.org/>), CottonGene Database (<https://www.cottongen.org/>) и GenBank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Yu et al., 2014; Zhu et al., 2017). Предсказание расположения цис-регуляторных элементов на промоторной последовательности рассматриваемых генов проводилось на основании данных в базе New PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) (Higo et al., 1999).

2.1.1. Анализ генов *MBW*

Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей применяли алгоритм ClustalW (Kumar et al., 2018). Кластерный анализ проводили с помощью встроенного в программное обеспечение MEGA-X алгоритма Neighbor-Joining с бутстреп-поддержкой 1000 (Felsenstein, 1985; Ferreira González, 1987; Saitou, Nei, 1987; Kumar et al., 2018). Нуклеотидные последовательности генов, размещенные в базе данных GenBank (NCBI): *R2R3-MYB* – *A.thaliana AtPAP1* (GenBank: AT1G56650), *AtPAP2* (AT1G66390), *AtMYB113* (AT1G66370), *AtMYB114* (AT1G66380), *AtMYB115* (аутгруппа; AT5G40360), *bHLH-MYC* – *AtTT8* (AJ277509), *AtGL3* (AT5G41315), *AtEGL3* (AT1G63650), *AtMYC2* (аутгруппа; AT1G32640) и *WD40* – *AtTTG1* (AT5G24520), *AtMSI3* (аутгруппа; AT4G35050) – были использованы для построения филогенетических деревьев.

В программе MEGA-X рассчитано число несинонимичных замен на несинонимичные сайты (*Ka*), синонимичных замен на синонимичные сайты (*Ks*), соотношение *Ka/Ks* и времена дивергенции, установленные методом «молекулярных часов». Для калибровки временной шкалы приняли время дивергенции семейств *Malvaceae* Juss. и *Brassicaceae* Burnett (68–96 млн лет назад, на основании Abdurakhmonov et al, 2010).

2.1.2. Анализ аминокислотных последовательностей ТФ *MBW*-комплекса

Для выравнивания аминокислотных последовательностей применили алгоритм MultAlin (Corpet, 1988; Kumar et al., 2018). Аннотацию консервативных доменов осуществили, используя

данные в базе Protein family database (Pfam, <http://pfam.xfam.org/>). Процент идентификации белковых последовательностей рассчитан с помощью сервера LALIGN (https://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=lalign&pgm=lal)

Используя алгоритм BLASTp, путем поиска гомологичных последовательностей, доступного в NCBI, подобрали подходящие шаблоны в базе PDB на основании следующих аминокислотных последовательностей: AtTT2 (PDB: 6KKS), AtTT8 (4RS9, 5GNJ) и AtTTG1 (2HES), которые в дальнейшем использовали для моделирования 3D-структур белков семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*. Предсказание третичной структуры белковых продуктов осуществляли с помощью сервера SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) (Waterhouse et al., 2018). Сервер PDBeFold (<https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) использовали для множественного выравнивания аминокислотных последовательностей и сравнения полученных 3D-структур белков.

Для предсказания аминокислотных остатков, обеспечивающих связывание белка с последовательностью ДНК, использовали инструмент 3DLigandSite (<https://www.wass-michaelislab.org/3dlig/index.html>); Missense3D (<http://missense3d.bc.ic.ac.uk/~missense3d/>) – предсказывает изменения во вторичной структуре белка, вызванные аминокислотной заменой. 3D-структуру белков моделировали с помощью веб-сервера Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>), доступный в рамках этого сервера инструмент Phyre2 Investigator использовали для оценки влияния замен определенных аминокислотных остатков на функции белка, а также поиска на поверхности белка потенциального «кармана связывания» с последовательностью ДНК. Анализ взаимодействия между структурой белка и ДНК-последовательностью осуществляли методом молекулярного моделирования с помощью программного обеспечения HEX Protein Docking 8.0.0 (<http://hex.loria.fr/>). Результаты молекулярного моделирования визуализировали в PyMOL (<https://pymol.org/2/>).

2.2. Растительный материал

В коллекции ВИР представлено порядка 1,5 % образцов с природноокрашенным волокном (из общего числа 6500). В качестве объекта исследования было использовано 11 образцов хлопчатника вида *G. hirsutum*, контрастных по фенотипическим признакам и происхождению, из коллекции ВИР (таблица 1). Изученные образцы хлопчатника включали контрастные по окраске формы с волокном тёмно-бурого, светло-бурого, буро-зелёного, зелёного и контрольным белым. Одним из образцов был сорт «Браун», который является первым зарегистрированным в России сортом хлопчатника с природноокрашенным волокном (патент на селекционное достижение № 10638; Туз и др., 2023). Получен методом индивидуального отбора из гибридной комбинации Генетик 34 (Туркмения, позднеспелый, коричневое волокно) и С2 8101-73 (к-8112, Албания, скороспелый, белое волокно).

Таблица 1. Список образцов хлопчатника (*G. hirsutum*), включенных в исследование

№ п/п	№ по каталогу ВИР	Название образца	Происхождение	Год включения в коллекцию	Окраска гипокотилия	Окраска волокна
1	к-7544	См-Sp 6189	Мадагаскар	1986	Зелёная	Темно-бурая
2	к-7544	См-Sp 6189	Мадагаскар	1986	Красная	Темно-бурая
3	к-8147	8/4	Россия	2022	Зелёная	Темно-бурая
4	к-8161*	37/4	Россия	2026	Зелёная	Темно-бурая
5	к-4305	S-4050	Узбекистан	1956	Зелёная	Светло-бурая
6	к-8138	Браун	Россия	2020	Зелёная	Светло-бурая
7	к-3488	S-4017	Узбекистан	1947	Зелёная	Светло-бурая
8	к-7314*	Poral 1-2	Куба	1984	Зелёная	Светло-бурая
9	к-8129	Red Stem	США	2021	Красная	Белая
10	к-8020	AC-4	Россия	2001	Зелёная	Белая
11	к-7843*	M1, round leaf	Туркменистан	1992	Зелёная	Белая
12	к-467*	American cotton	Узбекистан	1925	Зелёная	Белая

*образцы, у которых секвенировали часть кодирующей последовательности (фрагменты первого и второго экзонов) выявленного гена-кандидата *GhMYB10-A*

Все образцы имеют типичное для вида морфологическое строение: ветвистый стебель с преобладающим симподиальным типом ветвления, покрыт легким опушением и высотой от 0,8 до 1,2 метра; листья 3-5 лопастные, венчик состоит из 5 лепестков светло-желтого цвета, которые к 1-2 ДПО постепенно приобретают розовую окраску. Цветок окружен тремя крупными зубчатыми прицветниками, чашечка сростнолистная пятилопастная. Семена покрыты слабым опушением, при этом волокно длинное, прочное и относительно легко отделяется от семян, что соответствует типичным характеристика вида *G. hirsutum*.

Некоторые образцы отличаются по морфологическим признакам: к-7843 (M1, round leaf) с цельнокрайней листовой пластиной; образец к-8129 имеет антоциановую пигментацию вегетативных органов (красноватый стебель) и лепестков венчика (розоватая окраска). Для образца к-7544 с темно-бурой окраской волокна представлено две линии с зеленой и антоциановой пигментацией гипокотилия.

2.3. Выделение ДНК

Для выделения тотальной геномной ДНК из 10-12 дневных гипокотилей проростков хлопчатника использовали набор DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) в соответствии с протоколом,

рекомендованным производителем. Целостность ДНК оценивали методом электрофоретического анализа в 1% агарозном геле. Дополнительную оценку качества и измерение концентрации определяли спектрофотометрически с оценкой соотношений оптических плотностей при 230, 260 и 280 нм ($A_{260}/280$ в интервале 1,8-1,9 и $A_{260}/230$ - 2,0-2,2). Полученные образцы ДНК хранили при -20°C .

2.4. Конструирование праймеров и амплификация генов

Дизайн праймеров, специфичных к целевым фрагментам полноразмерных генов интереса, осуществляли с помощью онлайн-ресурса IDT PrimerQuest software (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/>) и программы Oligo Primer Analysis Software v.7 (<https://www.oligo.net/>). Учитывая высокую степень гомологии как паралогичных копий генов в каждом из субгеномов, так и гомеологичных между собой, особое внимание было уделено специфичности каждой пары праймеров к конкретной последовательности ДНК. Все паралогичные и гомеологичные копии предварительно выравнивали с помощью наиболее быстрого и точного алгоритма множественного выравнивания MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), доступного в программе MEGA X, для поиска полиморфных участков (Edgar RC, 2004; Kumar et al., 2018). Последовательности праймеров, использованных в работе, перечислены в Приложении 1. Амплификацию геномной ДНК проводили в термоциклерах T-100 (Biorad) и SimpliAmp Plus (Thermo Fisher). ПЦР-смесь, общим объемом 20 мкл, содержала: 70-100 нг ДНК-матрицы, по 1 нг каждого из праймеров, 1 ед. 5U Taq ДНК-полимеразы и 1x реакционный ПЦР-буфер Б (67 mM TrisHCl, pH 8,8, 10 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂, 0,01% Твин-20; Синтол).

Для получения ПЦР-продуктов длиной до 1500 п.о. использовали следующую программу амплификации: предварительная денатурация – 110 секунд при 95°C , денатурация – 30 секунд при 95°C , отжиг – 30 секунд при $50-60^{\circ}\text{C}$, элонгация – 1 минута при 72°C , финальная элонгация – 5 минут при 72°C (30 циклов).

Для амплификации длинных фрагментов геномной ДНК использовали коммерчески доступный набор БиоМастер LR HS-ПЦР (2x), реакционная смесь которого включала комбинацию из двух высокоочищенных ДНК-полимераз: высокопроцессивной рекомбинантной HS-Taq и Pfu с корректирующей активностью («БиоЛабМикс»). Концентрация компонентов реакционной смеси и программа амплификации соответствовали рекомендациям производителя.

2.5. Электрофоретический анализ

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 2% агарозном геле, погруженном в 1x буфер ТАЕ (2М Трис-(гидроксиметил) аминотан, 50мМ ЭДТА, 1М уксусная кислота, pH 8,4; «Евроген») с добавлением бромистого этидия в качестве интеркалирующего красителя. В карманы геля наносили реакционную смесь с добавлением

буфера «БиК» (10 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ ЭДТА, 12,5% глицерина, 0,008% бромфенолового синего, 0,008% ксиленцианола; «БиоЛабМикс»). Для оценки подвижности фрагментов ДНК в агарозном геле использовали маркёры 50, 100, 250 пн и Sky-High («БиоЛабМикс»). ДНК-фрагменты на геле визуализировали при воздействии ультрафиолетового излучения с помощью гель-документирующей системы Molecular Imager Gel Doc™ XR System («Bio-Rad»).

2.6. Элюция ДНК из агарозного геля и секвенирование

Аmplифицированные фрагменты элюировали из 1% агарозного геля с помощью набора реагентов «diaGene», согласно инструкции производителя («Диа-М», Россия). Очищенную ДНК-матрицу в количестве 50-70 нг использовали для секвенирующей реакции, которая протекала в 15 мкл смеси с добавлением 10 пмоль праймера, 1,5 мкл 5X Big Dye v 3.1 и 3 мкл 5x секвенирующего буфера (BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer, «Thermo FS») при следующих условиях: предварительная денатурация – 5 минут при 95°C, денатурация – 40 секунд при 95°C, отжиг – 30 секунд при 55°C, элонгация – 4 минуты при 60°C; число циклов – 25. Очистку продуктов секвенирующей реакции от компонентов ПЦР-смеси проводили методом переосаждения из этилового спирта: к 15 мкл реакционной смеси для снижения растворимости ДНК добавляли 6 мкл ацетата аммония, 15 мкл бидистиллированной воды и 90 мкл 96% этилового спирта. Процесс осаждения проводили 15 минут при комнатной температуре. Фрагменты ДНК концентрировали с помощью центрифугирования в течение 15 минут при 12 000 об/мин. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали при комнатной температуре, растворяли в 10 мкл высоко деионизированного формамида Hi-Di (Thermo FS) и наносили в лунку планшета. Разделение ДНК-фрагментов по размерам проводили методом капиллярного электрофореза с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Thermo Scientific). Обработку полученных секвенограмм, в том числе оценку качества данных и выравнивание на референсный геном, проводили с использованием программного обеспечения Ugene (<http://ugene.net/ru/>) и MEGA-X.

2.7. Подготовка растительного материала для выделения РНК

Образцы хлопчатника вида *G. hirsutum* из коллекции ВИР включали контрастные по окраске волокна формы: тёмно-бурый, бурый, зелёный, буро-зелёный и контрольный белый (таблица 1; рисунок 9; Приложение 2). Сорт «Браун» является первым зарегистрированным в России сортом хлопчатника с природноокрашенным волокном (патент на селекционное достижение № 10638; Tuz et al., 2023).

Растения выращивали в климатических камерах Weiss Technik Fitotron® Standard Growth Room (Германия) при температуре +25°C и фотопериоде 16/8 часов (свет/темнота). Коробочки хлопчатника фиксировали в жидком азоте на 31 – 41-й ДПО с промежутком в два дня с тремя биологическими повторностями на каждую временную точку. Всего было собрано 57 коробочек хлопчатника.

				
Тёмно-бурый (к-8147)	Светло-бурый (к-8138)	Зелёный (к-8158)	Буро-зелёный (к-8146)	Белый (к-8020)

Рисунок 9 – Образцы хлопчатника с контрастной окраской волокна, использованные для выделения РНК (ориг.)

Растительный материал хранили в морозильной камере при -81°C до момента выделения тотальной РНК. Из волокна каждой коробочки выделяли тотальную РНК в двух технических повторностях на образец.

2.7.1. Выделение РНК и синтез кДНК

Для оценки относительного уровня экспрессии целевых генов в волокне хлопчатника контрастных оттенков выделяли тотальную РНК с использованием коммерческого набора Plant Total RNA Isolation Kit Plus (Foregene, Китай). Ткани гомогенизировали на микрошаровой мельнице Powteq GT300 (Китай). Для удаления геномной ДНК супернатант после лизиса пропускали через колонки DNA-Cleaning Column (Foregene). Для дополнительной очистки и концентрирования РНК, а также удаления ингибиторов, мешающих реакциям обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) и ПЦР в реальном времени, использовали набор GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Thermo Scientific, Литва) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество тотальной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, США). Содержание РНК на образец в среднем составило около 350–400 нг/мкл. Значения соотношений $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ находились в диапазоне 1,9–2,2, что свидетельствует о высокой чистоте препаратов.

Синтез первой цепи кДНК проводили на матрице РНК с использованием набора M-MuLV-RN (BiolabMix, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Продукт реакции использовали напрямую для количественной ПЦР с обратной транскрипцией.

2.7.2. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и обработка данных

Количественную ОТ-ПЦР для определения относительных уровней экспрессии целевых генов относительно уровня экспрессии референсных генов проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Праймеры для количественной ПЦР разрабатывали с помощью онлайн-инструмента IDT PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/>). Список последовательностей праймеров доступен в Приложении 1.

Количественную ОТ-ПЦР проводили на матрице кДНК с использованием набора

реагентов в присутствии красителя SYBR Green I и пассивного референсного красителя ROX (Синтол, Россия) на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США), считывающего сигнал флуоресценции в реальном времени. Образец хлопчатника с белым волокном использовали в качестве контроля (фонового уровня экспрессии целевых генов). Эффективность реакции для всех праймеров составила 95–105 %, что соответствует требованиям надёжности количественного анализа.

Качество амплификации контролировали по кривым плавления, подтверждающим специфичность продукта реакции. В качестве генов эндогенного контроля выбраны *UBQ7*, *UBQLN1* и *HIS3.3*, которые показали наибольшую стабильность экспрессии при анализе с помощью программы qBase+ v3.14 (Hellemans et al., 2007).

Обработку и визуализацию данных выполняли с помощью Python v3.12.3 с использованием сторонних библиотек Pandas v2.2.3, NumPy v2.1.3, Matplotlib v3.10.1, Seaborn v0.13.12 и pathlib (в составе стандартной библиотеки Python). Относительный уровень транскрипции генов рассчитывали по методу $2^{-(ddCt)}$, нормализуя транскрипцию целевых генов относительно среднего геометрического значения показателей кратности изменения относительного уровня транскрипции генов (Fold Change, FC) по трём референсным генам *UBQ7*, *HIS3.3* и *UBQLN1* (Livak, Schmittgen, 2001).

Оценка статистической значимости выявленных различий для двух групп сравнения проводилась с помощью Т-теста (t-критерий Стьюдента); для трёх и более групп сравнения – однофакторным дисперсионным ANOVA тестом и пост-хок тестом Тьюки при выявлении значимых различий ANOVA в случае подчинения значений FC нормальному закону распределения и гомогенности дисперсий внутри сравниваемых групп (Student, 1908; Tukey, 1949; Girden, 1992). При несоблюдении одного из условий по нормальности распределения и/или гомогенности дисперсий применяли непараметрический U-тест Манна-Уитни для двух групп сравнения; в случае трёх и более групп – непараметрический тест Краскела-Уоллиса и апостериорный тест Данна при выявлении значимых различий в тесте Краскела-Уоллиса (Kruskal, Wallis, 1952; Dunn, 1964; Holm, 1979). Для контроля уровня ошибок первого рода при множественных сравнениях тест Данна использовали с поправкой Холма.

Для оценки подчинения значений FC закону нормального распределения и проверке нулевой гипотезы о гомогенности дисперсий использовали тесты Шапиро-Уилка и Левена (Levene, Howard, 1960; Shapiro, Wilk, 1965). Группе сравнения соответствовала временная точка ДПО для каждого из образцов; порог статистической значимости определён при $p < 0,05$. Предсказание белок-белковых взаимодействий и функциональную аннотацию в базе Gene Ontology (GO) проводили с использованием STRING (версия 12.0; Szklarczyk et al., 2023).

Таким образом, выбранный комплекс методических подходов, наряду с проведенной

статистической обработкой данных, обеспечивает высокую воспроизводимость, достоверность и объективность полученных результатов и позволяет в полной мере решить поставленные в данном исследовании задачи.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Идентификация и структурная организация дуплицированных копий регуляторных генов в геномах диплоидного и аллотетраплоидного видов хлопчатника

Бурые оттенки хлопкового волокна наблюдают благодаря накоплению ПА в вакуолях клетки в ходе биосинтеза флавоноидов (Harland, 1932; Xiao et al., 2007; Li et al., 2013; Feng et al., 2014). Структурные гены биосинтеза флавоноидов находятся под контролем транскрипционных факторов семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40, которые вместе образуют регуляторный комплекс MBW (Koes et al., 2005; Li, 2014). В рамках данного исследования проведен детальный *in silico* анализ регуляторных генов семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40, участвующих в биосинтезе флавоноидных пигментов у всех секвенированных диплоидных и аллотетраплоидных видов хлопчатника *G. hirsutum* ($2n = 4x = 52$, геном (AD)₁), *G. barbadense* ($2n = 4x = 52$, геном (AD)₂), *G. raimondii* ($2n = 2x = 26$, геном D₅) и *G. arboreum* ($2n = 2x = 26$, геном A₂) (Приложение 3).

К настоящему времени были описаны два гена из 24 R2R3-MYB (*GhTT2-A1*, также известный как *GhMYB36*, и *GhMYB10*), один из 12 bHLH-MYC (*GhTT8-D1*, известный как *GhbHLH130D*) и два из 11 WD40 (*GhTTG1* и *GhTTG3*), вовлеченные в процесс накопления ПА (Humphries et al., 2005; Lu et al., 2017; Yan et al., 2018). Сообщалось, что еще два гена из 11 WD40, *GhTTG2* и *GhTTG4*, составляют отдельную группу и имеют больший уровень гомологии в сравнении с геном *ATAN11-A* (ANTHOCYANIN 11-A) *A. thaliana*, кодирующим соответствующий белок LWD1, который контролирует продолжительность циркадного периода и фотопериодическое цветение; GenBank: AT1G12910) (Humphries et al., 2005).

3.1.1. R2R3-MYB

С помощью поиска по гомологии (BLASTN) на основании аннотированного ранее гена у *A. thaliana* *AtTT2* (TAIR: AT5G35550) и двух генов семейства R2R3-MYB хлопчатника вида *G. hirsutum* (*GhTT2-A1* (CottonFGD: Gohir.A07G020200), описанного ранее как *GhMYB36* и *GhTT2-3A*; и *GhMYB10* (Ghir_A06G007950)), вовлеченных в биосинтез ПА, в базе данных CottonGene идентифицировано по восемь высокогомологичных копий генов из семейства R2R3-MYB в субгеномах At и Dt *G. hirsutum* и *G. barbadense*, а также по четыре в геномах диплоидных видов *G. arboreum* и *G. raimondii* (Lu et al., 2017). Показатели качества сборок референсных геномов *Gossypium*, использованные для идентификации гомологичных последовательностей, представлены в Приложении 4.

Три пары паралогичных копий *GhTT2* тандемно располагаются в хромосомах A07 и D07 в аллотетраплоидных видах *G. hirsutum*, *G. barbadense* и диплоидном *G. arboreum*. Гены *GrTT2* в D-геноме *G. raimondii* локализованы в хромосоме D01. Идентифицированные паралогичные гены *GhTT2* гены у *G. hirsutum* пронумерованы в порядке их тандемного расположения на хромосомах

A07 и D07: *GhTT2-A1*, *GhTT2-A2*, *GhTT2-A3*, *GhTT2-D1*, *GhTT2-D2*, *GhTT2-D3*, *GhMYB10-A* и *GhMYB10-D*, согласно правилам присвоения генных символов у аллополиплоидов (<https://graingenes.org/GG3/wgc>).

Единичная копия гена *MYB10* детектирована в каждом из геномов А и D всех проанализированных видов. *GhMYB10* локализуется в хромосоме A06, однако в D-геноме *G. raimondii* *GhMYB10* занимает локус в хромосоме D10. Все найденные копии генов перечислены в Приложении 3.

Дополнительно был осуществлен поиск по аминокислотной последовательности белка AtTT2 (*A. thaliana*) в референсном геноме *G. hirsutum* v3.1 (Phytozome genome ID: 578) с использованием алгоритма BLASTp в базе данных Phytozome. Аналогично результатам, полученным при поиске по нуклеотидным последовательностям (BLASTn), идентифицированы высокоомологичные копии (E-value порядка $3,06 \times 10^{-44}$), локализованные в хромосомах A06, A07, D06 и D07. Кроме того, была обнаружена дополнительная копия гена в хромосоме D03 (Gohir.D03G020000) белковый продукт которой, согласно аннотации в базе данных PANTHER, классифицируется как ANTHOCYANIN REGULATORY C1 PROTEIN-LIKE (PTHR47999:SF70) и предположительно вовлечен в регуляцию биосинтеза антоцианов. Поскольку пигментация волокна хлопчатника обусловлена накоплением ПА, а не антоцианов, данный локус исключили из дальнейшего анализа. Для наиболее высокоомологичных последовательностей, локализованных в хромосомах A07, A06, D06 и D07, согласно аннотации в базе данных PANTHER, достоверно идентифицирован консервативный R2R3-MYB ДНК-связывающий домен (PTHR10641:SF459; MYB-LIKE DNA-BINDING PROTEIN MYB // TRANSCRIPTION FACTOR TT2). Для остальных последовательностей значения E-value был порядка $1,06 \times 10^{-38}$ и постепенно возрастали, что свидетельствует о снижении гомологии.

Относительно аминокислотной последовательности AtTT2 выполнено множественное выравнивание с идентифицированными в субгеномах At и Dt хлопчатника *G. hirsutum* последовательностями GhTT2 и GhMYB10 (Приложение 5).

3.1.2. *bHLH-MYC*

С помощью поиска по гомологии на основании аннотированного ранее гена *AtTT8* (AT4G09820) у *A. thaliana* и *GhTT8* у *G. hirsutum* (Gh_D11G1273), для которого отмечен высокий относительный уровень транскрипции в буром волокне хлопчатника, идентифицировано по четыре копии генов из семейства *bHLH-MYC* в субгеномах At и Dt *G. hirsutum* и *G. barbadense*, а также по две в геномах диплоидных видов *G. arboreum* и *G. raimondii* (Yan et al., 2018). У аллотетраплоидных видов *G. hirsutum* и *G. barbadense* выявлено по две пары гомеологичных генов на хромосомах A11 и D11, A08 и D08 соответственно. В D-геноме *G. raimondii* идентифицированные гены локализованы в хромосомах D07 и D04.

Идентифицированные гены у *G. hirsutum* обозначены как *GhTT8-A1*, *GhTT8-A2*, *GhTT8-D1* и *GhTT8-D2* в соответствии с правилами присвоения генных символов у аллополиплоидов.

Ген *AtTT8* (*TRANSPARENT TESTA 8*) *A. thaliana* кодирует ТФ bHLH типа MYC (bHLH-MYC), вовлеченный в флавоноидный путь биосинтеза пигментов (Nesi et al., 2000).

Дополнительно был осуществлен поиск по гомологии (BLASTp) на основании аминокислотной последовательности белка *AtTT8* (*A. thaliana*) в референсном геноме *G. hirsutum* v3.1 в базе данных Phytozome. Аналогично результатам, полученным при поиске по нуклеотидным последовательностям (BLASTn), были идентифицированы четыре высокогомологичные копии (E-value в диапазоне от 7,80e-139 до 4,27e-87), локализованные в хромосомах A11, A08, D11 и D08. Согласно функциональной аннотации в базе данных PANTHER, все четыре последовательности аннотируются как TRANSCRIPTION FACTOR TT8 (PTHR46266:SF4). В тех же хромосомах (A11, D11 и D08) обнаружены дополнительные копии с несколько меньшей степенью гомологии (E-value ~ 2,55e-58), однако их функциональная аннотация отличалась: Gohir.A11G088700 и Gohir.D11G093000 классифицированы как TRANSCRIPTION FACTOR MYC1 (PTHR46266:SF1), а Gohir.D08G201300 –TRANSCRIPTION FACTOR GLABRA 3, GL3 (PTHR46266:SF3). Последний ген является ортологом *AtGL3* (*A. thaliana*) и вовлечен в инициацию развития трихом (Xie et al., 2024). В связи с этим для дальнейшего анализа в качестве источников генов-кандидатов отобрали четыре наиболее высокогомологичные копии в хромосомах A11, A08, D11 и D08, аннотированные как TRANSCRIPTION FACTOR TT8.

Относительно аминокислотной последовательности *AtTT8* выполнено множественное выравнивание с идентифицированными в субгеномах *At* и *Dt* хлопчатника *G. hirsutum* последовательностями *GhTT8* (Приложение 6).

3.1.3. *WD40*

На основании аннотированного ранее гена *AtTTG1* (AT5G24520) и генов-ортологов у *G. hirsutum* *GhTTG1* (GenBank: AF530907) и *GhTTG3* (AF530911) в базе данных CottonFGD найдено четыре высокогомологичные копии в субгеномах *At* и *Dt* у *G. hirsutum*, три у *G. barbadense* и по два у *G. arboreum* и *G. raimondii* (Humphries et al., 2005). Идентифицированные гены у *G. hirsutum* обозначены как *GhTTG1-A*, *GhTTG1-D*, *GhTTG3-A* и *GhTTG3-D*, согласно правилам присвоения генных символов у аллополиплоидов.

У *G. hirsutum* дуплицированные копии генов *TTG1* (*GhTTG-A1* и *GhTTG-D1*) и *GhTTG3* (*GhTTG-A3* и *GhTTG-D3*) локализованы в хромосомах A08/D08 и A05/D04 соответственно. *G. barbadense* имеет две гомеологичные копии *GbTTG-A1* и *GbTTG-D1* в хромосоме 08 субгеномов *At* и *Dt* и одну *GbTTG-A3* в субгеноме *At*. Гены *GaTTG-A1* и *GaTTG-A3* обнаружены в хромосомах

A08 и A04 у *G. arboretum*. У *G. raimondii* два гомеологичных гена *GrTTG-D1* и *GrTTG-D3* локализованы в хромосомах D04 и D12 соответственно (Приложение 3).

Дополнительно был осуществлен поиск по гомологии (BLASTp) на основании аминокислотной последовательности AtTT8 в геноме *G. hirsutum* в базе данных Phytozome относительно референсного генома *G. hirsutum* v3.1. Аналогично поиску по нуклеотидным последовательностям (BLASTN), идентифицировано три высокогомлогичные копии в хромосомах A08 (Gohir.A08G104600.p), D08 (ohir.D08G116300.p), D04 (Gohir.D04G000300.p), которые, согласно базе данных PANTHER, аннотируются как PTHR19919:SF10 – PROTEIN TRANSPARENT TESTA GLABRA 1. Кроме этого, выделено еще несколько высокогомлогичных последовательностей с E-value порядка $1,04e-157$ – $7,49e-155$: в хромосомах A10 (Gohir.A10G126550.p), D10 (Gohir.D10G140100.p), A03 (Gohir.A03G095400.p) и D02 (Gohir.D02G113700.p), однако, согласно базе данных PANTHER, они аннотируются как PTHR19919:SF0 – DDB1- AND CUL4-ASSOCIATED FACTOR 7. В связи с этим для дальнейшего анализа использовали четыре наиболее высокогомлогичные копии в хромосомах A05, A08, D04 и D08.

Относительно аминокислотной последовательности AtTTG1 выполнено множественное выравнивание с идентифицированными в субгеномах At и Dt хлопчатника *G. hirsutum* последовательностями GhTTG1 и GhTTG3 (Приложение 7).

3.2. Структурная организация генов MBW

R2R3-MYB. Установлено, что все идентифицированные копии генов MYB имеют консервативные мотивы R2 и R3 (Pfamseq: PF00249) и содержат 3 экзона (рисунок 10; Приложение 8). В Приложении 8 обозначены (звездами) консервативные аминокислотные остатки в составе доменов R2/R3-MYB в соответствии с (Bedon, Grima-Pettenati, Mackay, 2007).

bHLH-MYC. Все идентифицированные копии генов TT8 хлопчатника содержат 8 экзонов (рисунок 10). При множественном выравнивании аминокислотных последовательностей генов AtTT8 и соответствующих ортологов в геном хлопчатника обнаружены два консервативных ДНК-связывающих домена: спираль-петля-спираль (HLH; Pfamseq: PF00010) и N-терминальный регион семейств транскрипционных факторов MYB и MYC (bHLH-MYC_N, Pfamseq: PF14215). Данные консервативные мотивы аннотированы во всех обнаруженных копиях генов в геноме вида *G. hirsutum* согласно базе данных Pfam. Консервативные аминокислотные остатки обозначены в соответствии с опубликованными ранее данными (Atchley, Terhalle, Dress, 1999; Heim, 2003; Toledo-Ortiz, Huq, Quail, 2003) (Приложение 9). Консервативные аминокислоты: R13, E14, F20, I21, R24, V27, P28, L39, T42, Y45, V46, L49, R50, R52, V53, L56 (обозначены *); АК, связывающиеся с нуклеотидными основаниями (○: H5, E9, R13) и с цепью ДНК (▪: R10, R12).

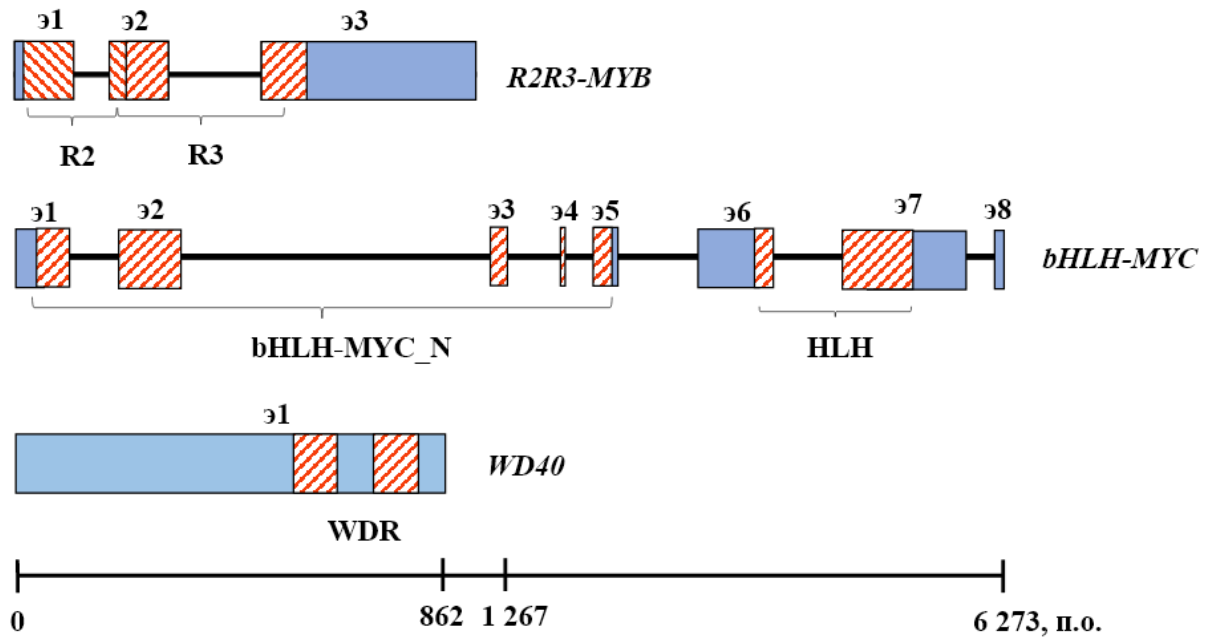


Рисунок 10 – Экзон-интронная структура регуляторных генов *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* с локализацией функциональных доменов (экзоны выделены прямоугольником, интроны черной линией, функциональные домены в экзонах обозначены штриховкой) и указанием длины нуклеотидной последовательности в парах азотистых оснований нуклеотидов (п.о.) (ориг.)

Остаток аргинина (R13) не только участвует в формировании белковой глобулы, но и связывается с нуклеотидными основаниями. Замена аргинина на серин в положении 13 (R13 → S13) последовательности гена *GhTT8-A2*, вероятно, ведет к утрате третичной структуры, а значит и функций белка. Замена валина на изолейцин и аргинина на лизин в положениях 52 и 53 (V52 → I52, R53 → K53) у всех идентифицированных копий *GhTT8* в хлопчатнике в сравнении с *AtTT8* не приводит к утрате функций (ранее было продемонстрировано для *GhTT8* (также известного как *GhbHLH130D*) генов хлопчатника (Yan et al., 2018).

WD40. Каждый WD-повтор состоит примерно из 40 а.о., начинается с глицина и заканчивается дипептидом триптофан-аспарагиновая кислота (WD). В процессе укладки полипептидной цепи каждый мотив формирует отдельный β -лист (лопасть), который организуются в характерную структуру β -пропеллера. Для белков WD40 хлопчатника и *A.thaliana* типична организация β -пропеллера из семи лопастей. Два консервативных домена WD40 (Pfamseq: PF00400), располагаются на единственном экзоне у всех детектированных генов WD40 в геноме *G. hirsutum* (рисунок 10, Приложение 7). Несинонимичных аминокислотных замен не было обнаружено.

3.3. Анализ промоторных последовательностей

В рамках данного исследования рассмотрены *цис*-регуляторные ДНК-элементы генов *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC*, располагающиеся в регионе от -1000 до +1 нуклеотидов в соответствии со старт-кодом ATG (рисунок 11; Приложения 10-12). Среди рассматриваемых генов *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* найдены строго консервативные последовательности, такие как СААТ-бокс и GATA-бокс, а также группа коровых промоторов ТАТА-бокс. Выравнивание промоторных последовательностей генов *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* представлено в Приложениях 13-15.

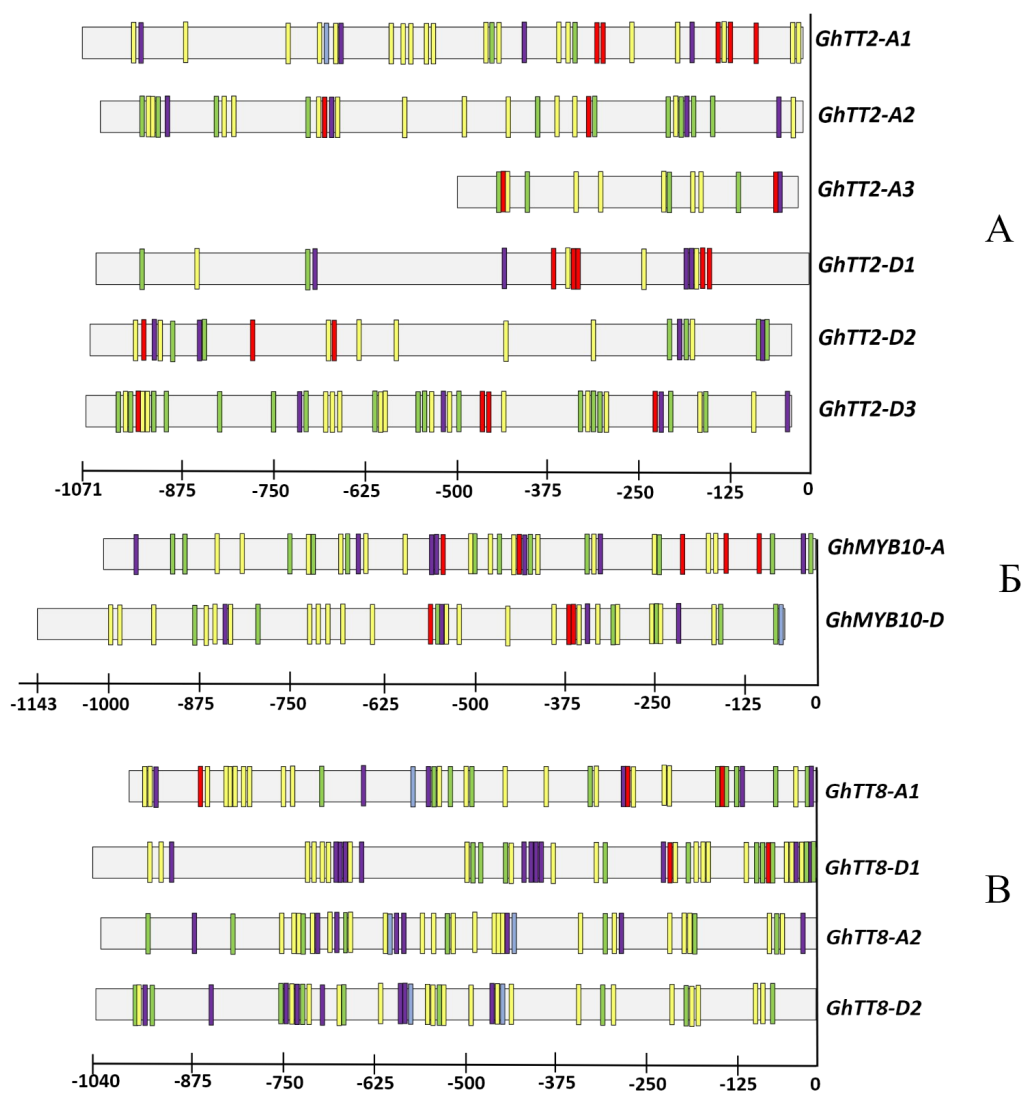


Рисунок 11 – Паттерн распределения *цис*-регуляторных элементов в промоторной последовательности (~1140 пн от старт-кодона) идентифицированных генов в субгеномах At и Dt: А – гены *GhTT2*, Б – гены *GhMYB10*, В – гены *GhTT8*. Зелёный – гормон-чувствительный сайт (жасмонат, ауксин); желтый – светочувствительный; красный – мотив связывания MYC-факторов; фиолетовый – мотив связывания MYB-факторов; голубой – элемент, чувствительный к воздействию низких температур.

Промоторные области исследуемых генов содержат множественные сайты узнавания транскрипционных факторов семейства MYB, а также светочувствительные мотивы до сайта начала трансляции у генов MYB. Сайты узнавания факторов bHLH-MYC найдены на промоторном регионе всех идентифицированных генов TT2 и обнаружены единожды у гена TT8 (рисунок 11, А-В). Более того, найдены мотивы GT1 и GATA, широко известные как *cis*-регуляторные элементы многих светочувствительных генов. В дополнение, консервативные светочувствительные мотивы, такие как *Inr*-элементы, Т-бокс и I-бокс, обнаружены не только у генов R2R3-MYB, но также у bHLH-MYC (рисунок 11, В).

Помимо светочувствительных сайтов, в промоторных регионах исследуемых генов присутствуют гормон-чувствительные мотивы. Регуляторная область гена *GhTT2-A1* в позиции -295 пн до старт-кодона содержит мотив LTRECOREATCOR15, с которым связываются транскрипционные факторы при активации транскрипцию мРНК в условиях пониженных температурах или засухе.

3.4. Филогенетический анализ последовательностей генов из семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40

Рассчитано число несинонимичных замен на несинонимичные сайты (K_a), синонимичных замен на синонимичные сайты (K_s) и соотношение K_a/K_s для генов семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40. Полученные значения содержатся в Приложении 16. Значения K_a и K_s у генов R2R3-MYB находятся в диапазоне 0,129–0,375 и 0,497–0,975, у bHLH-MYC – 0,127–0,157 и 0,174–0,203 и у WD40 – 0,037–0,052 и 0,360–0,446 соответственно. Соотношение K_a/K_s составляет 0,413 у R2R3-MYB, 0,674 у bHLH-MYC и 0,104 в случае генов WD40.

С помощью программного обеспечения MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) версия 10.0.5 проведен анализ филогенетического родства и рассчитаны времена дупликации паралогичных копий (млн лет назад). Для калибровки временной шкалы принят период времени дивергенции мальвовых и крестоцветных – 68–96 млн лет назад.

R2R3-MYB. Анализ филогенетического сходства между 24 идентифицированными R2R3-MYB генами *Gossypium* и 5 R2R3-MYB у *A. thaliana*, вовлеченных в биосинтез проантоцианидинов (*AtMYB113* (GenBank: AT1G66370), *AtMYB114* (AT1G66380), *AtPAP1* (AT1G56650), *AtPAP2* (AT1G66390), *AtTT2* (AJ299452)) был проведен на основании полноразмерных нуклеотидных последовательностей кодирующей области с использованием алгоритма Neighbor-Joining. Ген *AtMYB115* (AT5G40360), вовлеченный в путь биосинтеза бензоилоксиглюкозинолата и омега-7 мононенасыщенных жирных кислот, принят за аутгруппу (рисунок 12-А). Степень гомологии генов TT2 хлопчатника с генами R2R3-MYB *A. thaliana* составляет в среднем 87 %. Последовательности генов *AtMYB114*, *AtPAP2*, *AtPAP1* и *AtMYB113* формируют независимую парафилетическую группу. Гены MYB10 кластеризуются в отдельную общую группу.

Дупликация генов *TT2* хлопчатника происходила дважды: 29,98 млн лет назад и около 27,46 млн лет назад (рисунок 12-А). Гены *MYB10* составляют отдельную изолированную группу, которая отделилась от генов *TT2* хлопчатника около 82,00 млн лет назад. Дивергенция доноров А- и D-геномов от общего диплоидного предка рода *Gossypium*, в соответствии с данными филогенетическим деревом, происходила в период с 5,16 по 3,28 млн лет назад.

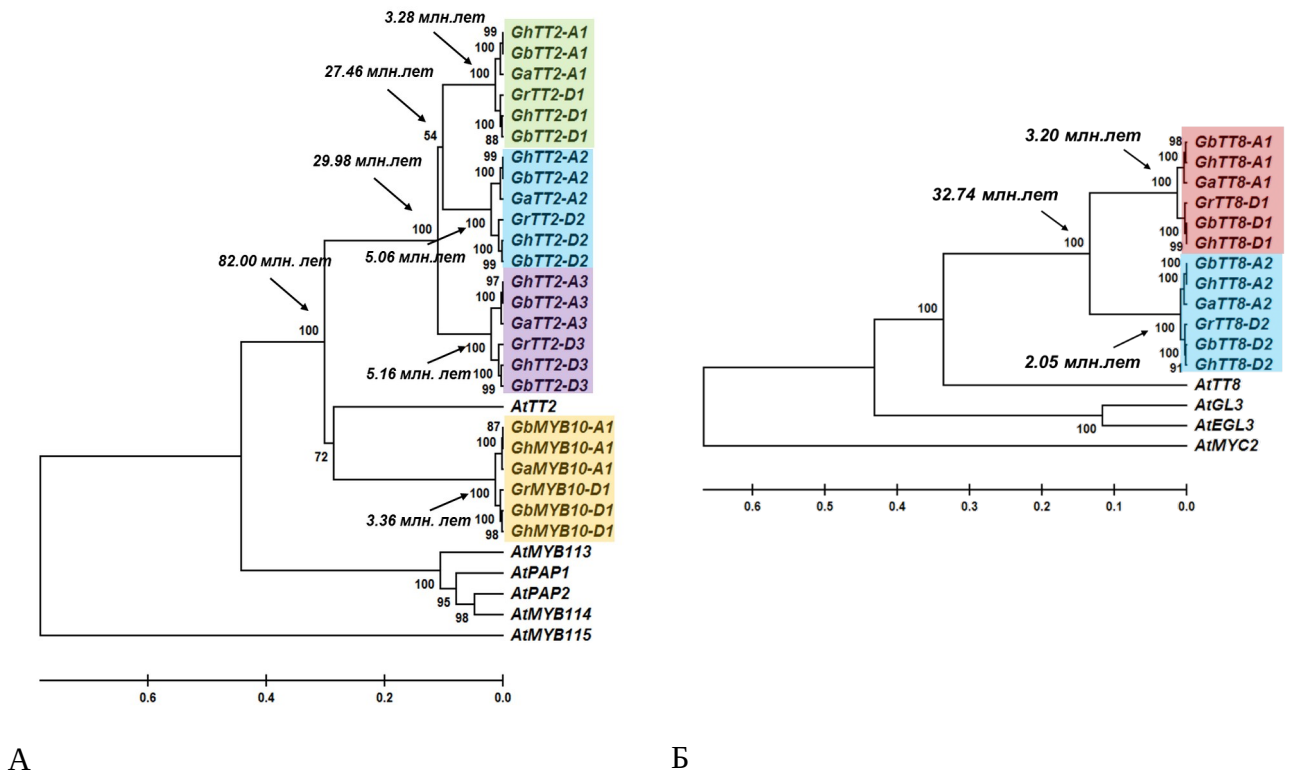


Рисунок 12 – Анализ филогенетического сходства, рассчитанного с помощью алгоритма Neighbor-Joining: А – генов из семейства *R2R3-MYB*; в качестве аутгруппы приняли последовательность гена *AtMYB115* (AT5G40360), вовлеченного в путь биосинтеза бензоилоксиглюкозинолата и омега-7 мононенасыщенных жирных кислот (Zhang et al., 2015); Б – генов из семейства *bHLH-MYC*; в качестве аутгруппы с целью укоренения дерева приняли последовательность гена *AtMYC2* (AT1G32640) (ориг.).

***bHLH-MYC*.** Среди генов *bHLH* у видов хлопчатника, геномы которых к настоящему времени секвенированы, было проанализировано 12 идентифицированных ранее в рамках данного исследования, 4 гена *A. thaliana* (*AtTT8* (GenBank: AT4G09820), *AtGL3* (AT5G41315), *AtEGL3* (AT1G63650) и *AtMYC2* (AT1G32640)). Согласно данным филогенетического анализа, ген *AtTT8* наиболее эволюционно близок к генам *TT8* рода *Gossypium* и составляет с ними единую кладу (рисунок 12-Б). Дупликация генов *TT8* хлопчатника фиксируется около 32,70 млн с

образованием двух клад. Дивергенция гомеологичных генов в субгеномах At и Dt произошла в интервале около 3,20-2,05 млн лет назад.

WD40. Проведен филогенетический анализ между 11 генами *WD40* рода *Gossypium*, генами *AtTTG1* (GenBank: AT5G24520) и *AtMSI3* (AT4G35050) *A.thaliana*. Гены *TTG1* и *TTG3* хлопчатника эволюционно близки к последовательности гена *AtTTG1* (рисунок 13). Гомологичные гены *TTG1* и *TTG3* образовали субклады около 45,19 млн лет. Дивергенция А- и D-геномных видов датируется более поздним периодом – 3,92-2,34 млн лет назад.

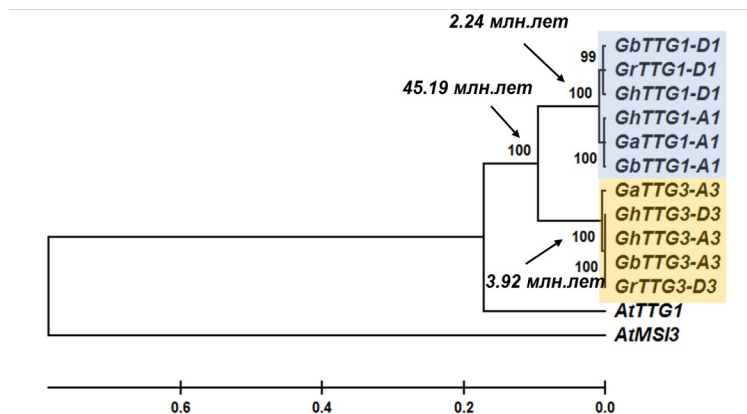


Рисунок 13 – Анализ филогенетического сходства генов из семейства *WD40*, алгоритм Neighbor-Joining. Стрелками указаны времена дивергенции. В качестве аутгруппы приняли последовательность гена *AtMSI3* (AF016848), кодирующего белок из семейства MSI (Multicopy Suppressor of IRA), содержащий WD40-повторы. В мультикопийном состоянии *AtMSI3* является супрессором мутации в гене *IRA1* (ингибитор сигнального пути RAS) и участвует в контроле роста клеток (Ach, Taranto, Gruissem, 1997) (ориг.).

3.5. Предсказание 3D-структур белков R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40

Третичные структуры белков предсказаны для всех кодирующих их идентифицированных последовательностей генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* вида *G. hirsutum*, формирующих вместе регуляторный комплекс *MBW* (рисунки 14–16).

R2R3-MYB. Шаблон 6KKS, размещенный в базе данных PDB, использован для предсказания 3D-моделей белков семейства R2R3-MYB в геноме *G. hirsutum* (Wang et.al., 2020). Белковый продукт соответствующего шаблона кодируется геном *AtMYB66* у *A. thaliana* (семейство *R2R3-MYB*; GenBank: AT5G14750) и вовлечен в регуляцию процесса формирования корневых волосков (Lee, Schiefelbein, 1999).

Использованный шаблон покрывает R2- и R3-MYB кодирующий регион длиной 100 а.о. и достигает идентичности около 60 % со всеми последовательностями рассматриваемых генов (рисунок 14; Приложение 17). Показатель среднеквадратичного отклонения атомных позиций

(RMSD) между 3D-структурами AtTT2 и шаблона 6KKS составляет 0,06 Å; усредненное значение RMSD между всеми исследуемыми последовательностями около 0,08 Å, что указывает на их высокую гомологию. Самый высокий показатель идентичности зафиксирован между гомеологичными копиями (более чем 96 %), а также между всеми обнаруженными копиями с последовательностью гена AtTT2 (более 80 %). Уровень идентичности между аминокислотными последовательностями белковых продуктов GhTT2 и GhMYB10 достигает в среднем 86,5 % (Приложение 18).

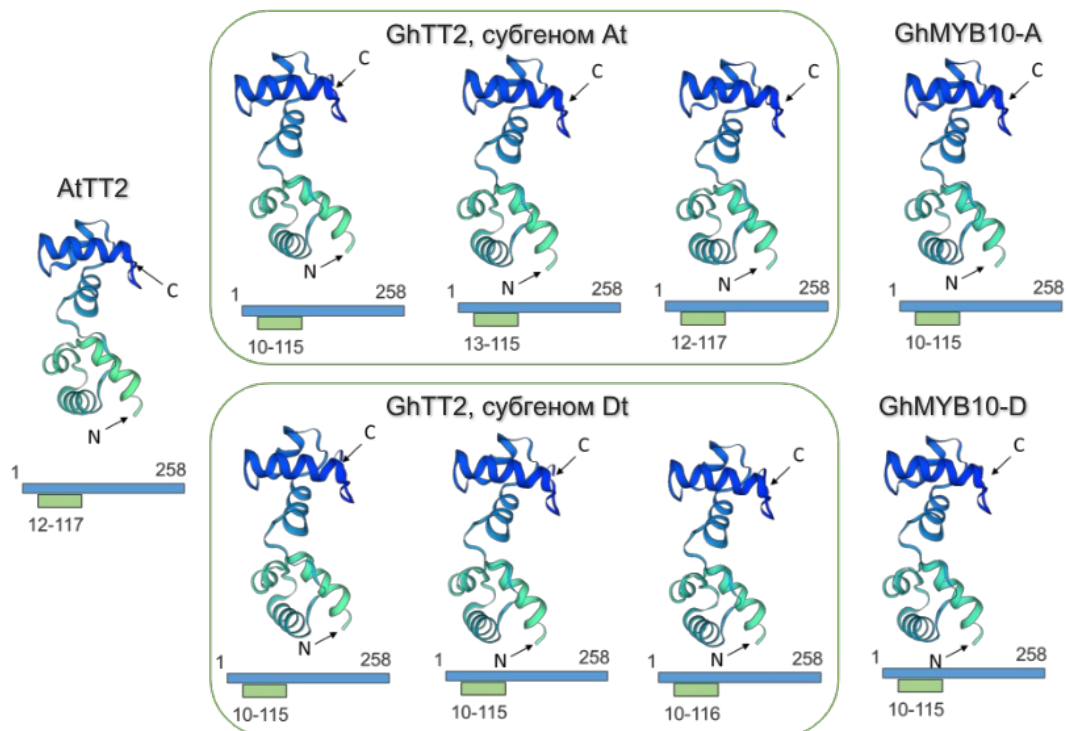


Рисунок 14 – Предсказанные 3D-модели белков AtTT2 (*A. thaliana*), GhTT2 и GhMYB10 (*G. hirsutum*) в субгеномах At и Dt. Представленные структуры соответствуют белковым продуктам идентифицированных генов из семейства *R2R3-MYB*: *GhTT2-A1*, *GhTT2-A2*, *GhTT2-A3*, *GhMYB10-A*; *GhTT2-D1* *GhTT2-D2* *GhTT2-D3*, *GhMYB10-D* (слева-направо). Голубая линия указывает на длину аминокислотной последовательности, зелёная – покрытие участка шаблоном. Стрелками обозначены С- и N-концы полипептидной цепи (ориг.)

bHLH-MYC. У *A.thaliana* ТФ MYC2, MYC3 и MYC4 относятся к семейству bHLH и выполняют важную роль медиаторов в сигнальных реакциях с участием жасмонатов – группы фитогормонов (Zhang et al., 2015; Lian et al., 2017). У всех идентифицированных регуляторных генов в геноме *G. hirsutum* выявлены консервативные участки, кодирующие функциональные домены MYC2 и MYC3. Таким образом для предсказания третичной структуры аминокислотной последовательности белковых продуктов генов из семейства *bHLH-MYC* выбраны шаблоны 4RS9 (относится к суперсемейству bHLH-MYC_N, транскрипционный фактор MYC3, AT5G46760) и

5GNJ (суперсемейство HLH, транскрипционный фактор MYC2, AT1G32640) (Zhang et al., 2015; Lian et al., 2017).

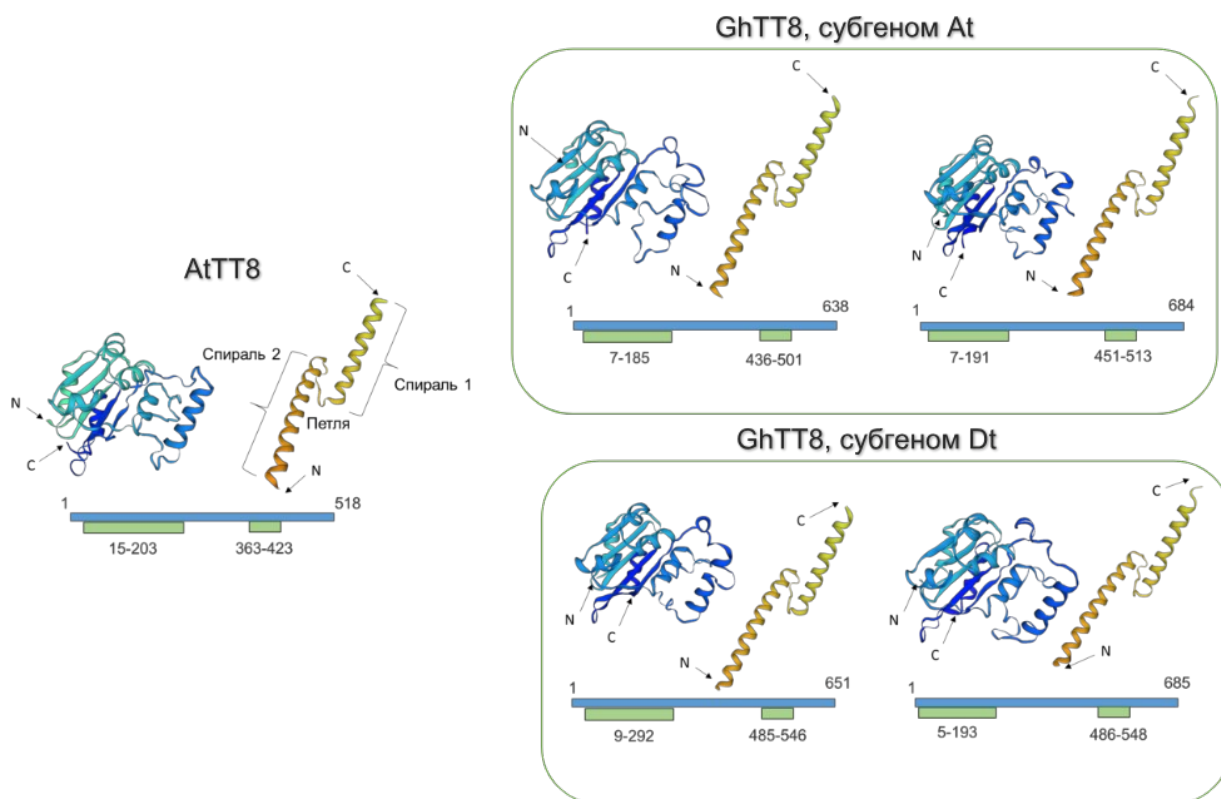


Рисунок 15 – Предсказанные 3D-модели белков AtTT8 (*A. thaliana*) и GhTT8 (*G. hirsutum*) в субгеномах At и Dt. Представленные структуры соответствуют белковым продуктам идентифицированных генов из семейства *bHLH-MYC*: *GhTT8-A1*, *GhTT8-A2*; *GhTT2-D1* *GhTT2-D2* (слева-направо). Голубая линия указывает на длину аминокислотной последовательности, зелёная – покрытие участка шаблоном. Стрелками обозначены C- и N-концы полипептидной цепи (ориг.)

Последовательность шаблона 5GNJ полностью покрывает кодирующую область MYC2 домена и идентична на 50 % со всеми обнаруженными копиями генов *bHLH-MYC* у *G. hirsutum* (Приложение 17). Согласно 3D-моделям, предсказанная конформация белка MYC2, как и ожидалось, образует третичную структуру спираль-петля-спираль (рисунок 15). Идентичность 3D-структур белка MYC3 и рассматриваемых копий гена *GhTT8* в геноме *G. hirsutum* находится в интервале 30–40 % с шаблоном 4RS9. Процент идентичности между аминокислотными последовательностями AtTT8 и GhTT8 достигает в среднем 63,9 % (Приложение 18).

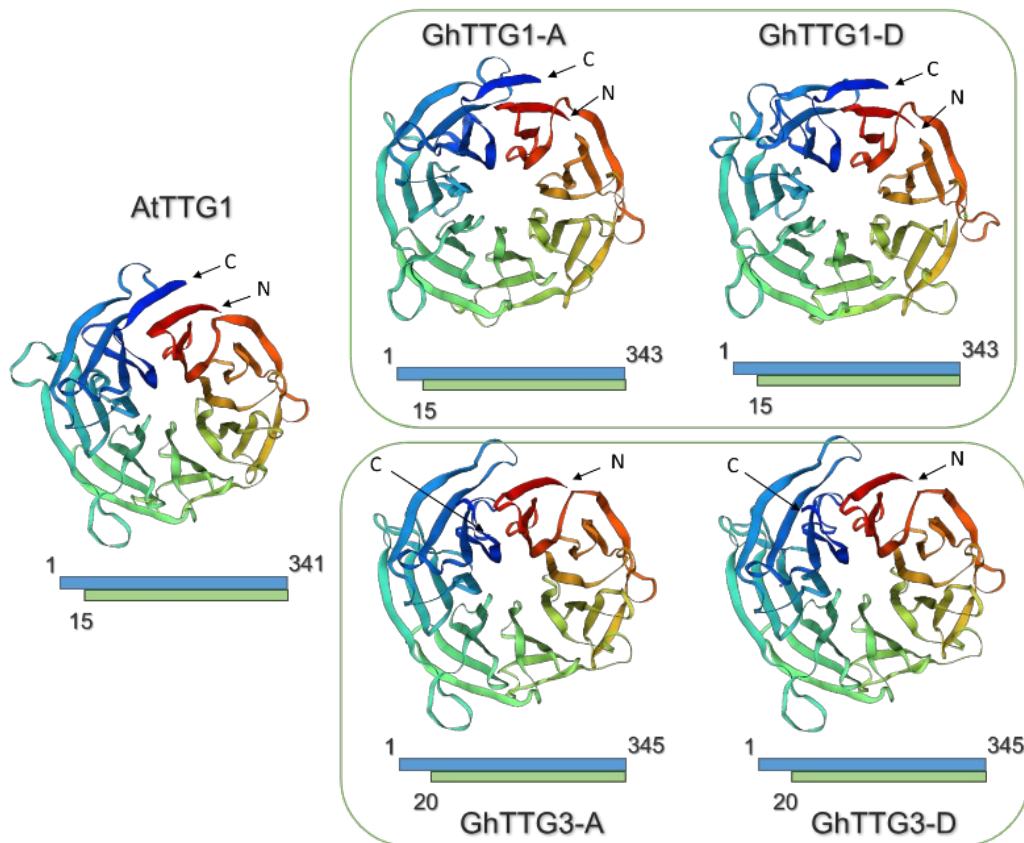


Рисунок 16 – Предсказанные 3D-модели белков AtTTG1 (*A. thaliana*), GhTTG1 и GhTTG3 (*G. hirsutum*) в субгеномах At и Dt. Представленные структуры соответствуют белковым продуктам идентифицированных генов из семейства *WD40*. Голубая линия указывает на длину аминокислотной последовательности, зелёная – покрытие участка шаблоном. Стрелками обозначены C- и N-концы полипептидной цепи (ориг.)

WD40. Используя алгоритм BLASTp, доступный в NCBI, из базы данных PDB для предсказания третичной структуры белковых продуктов генов *WD40* был выбран шаблон 2HES, составляющий наибольшую степень гомологии с заданной аминокислотной последовательностью (Liu et al., 2018). Он соответствует структуре белка Cia1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, который в свою очередь вовлечен в процесс сборки (CIA) цитозольных железо-серных белков (Fe/S) в эукариотах (Srinivasan et al., 2007). Шаблон покрывает всю кодирующую область регуляторных генов, за исключением первых 15 а.о. с C-конца (рисунок 16; Приложение 17). 3D-структура кристаллического белка Cia1 представляет β -пропеллер с семью WD40-повторами в виде лопастей. Белковые продукты генов *AtTTG1* и идентифицированных копий гена *GhTTG1* обладают характерными для семейства повторяющимися мотивами. Процент идентичности аминокислотных последовательностей между *AtTTG1* и *GhTTG1*/*GhTTG3* составляет в среднем 90,9 %, между *GhTTG1* и *GhTTG3* – более, чем 93 % (Приложение 18).

3.6. Секвенирование аллелей генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC*

***R2R3-MYB*.** Для секвенирования аллелей генов *R2R3-MYB* у образцов хлопчатника, контрастных по окраске волокна и гипокотыля, сконструированы праймеры, специфичные к кодирующей и промоторным областям идентифицированных ранее в базе данных копий генов. В анализ включены три пары паралогичных копий *TT2*, tandemно располагающихся в хромосомах A07 и D07 (*GhTT2-A1*, *GhTT2-A2*, *GhTT2-A3*, *GhTT2-D1*, *GhTT2-D2*, *GhTT2-D3*), а также гены *GhMYB10-A1* и *GhMYB10-D1*, локализованные на 6 хромосоме (рисунки 17–18). В качестве референса при анализе секвенограмм использовали идентифицированные ранее гены в базе данных CottonFGD, список и идентификационные номера которых перечислены в Приложении 3.

В промоторной и кодирующей последовательностях паралогичных генов *GhTT2* в субгеноме At найдены многочисленные индели длиной от 1 до 32 пн, а также однонуклеотидные замены (рисунок 17).

При секвенировании нуклеотидной последовательности гомеологичной копии *GhTT2-D1* у образцов к-8020, к-8129 и к-3488 не выявлено отличий от референсной последовательности (рисунок 18). Во втором интроне гена *GhTT2-D2* у образца с темно-бурой окраской волокна, к-7544, белой к-8020 и двух со светло-бурой, к-3488 и к-4305, в положениях 434 пн, 450 пн и 453 пн детектированы замены $A \rightarrow G$, $A \rightarrow C$ и $T \rightarrow C$, соответственно, а также делеция TC в положении 436 пн до старт-кодона ATG. Для остальных изучаемых образцов отличий от референсной последовательности не выявлено. Секвенированная последовательность промоторной и кодирующей областей гомеологичной копии регуляторного гена *GhMYB10-D* в субгеноме Dt, а также третьей паралогичной копии *GhTT2-D3* полностью соответствовала референсу у всех изучаемых образцов.

***bHLH-MYC*.** Секвенированы промоторные последовательности генов *bHLH-MYC*: *GhTT8-A1*, *GhTT8-A2*, *GhTT8-D1* и *GhTT8-D2* (рисунок 19). У образцов хлопчатника с темно-бурой окраской волокна (к-8147, к-7544 и к-8129) последовательности гомеологичных и гомологичных копий гена *GhTT8-A1/A2/D1/D2*, а также *GhTT8-A1* у всех исследуемых образцов соответствовали референсу (рисунок 19). В промоторной последовательности генов *GhTT8-D1* и *GhTT8-D2* найдены отличия только для образца со светло-бурым волокном к-4305 и белым к-8020 соответственно. Для образцов к-3488 и к-8129, а также у темно-бурых генотипов не выявлено отличий в промоторных последовательностях генов *GhTT8-D1* и *GhTT8-D2* соответственно.

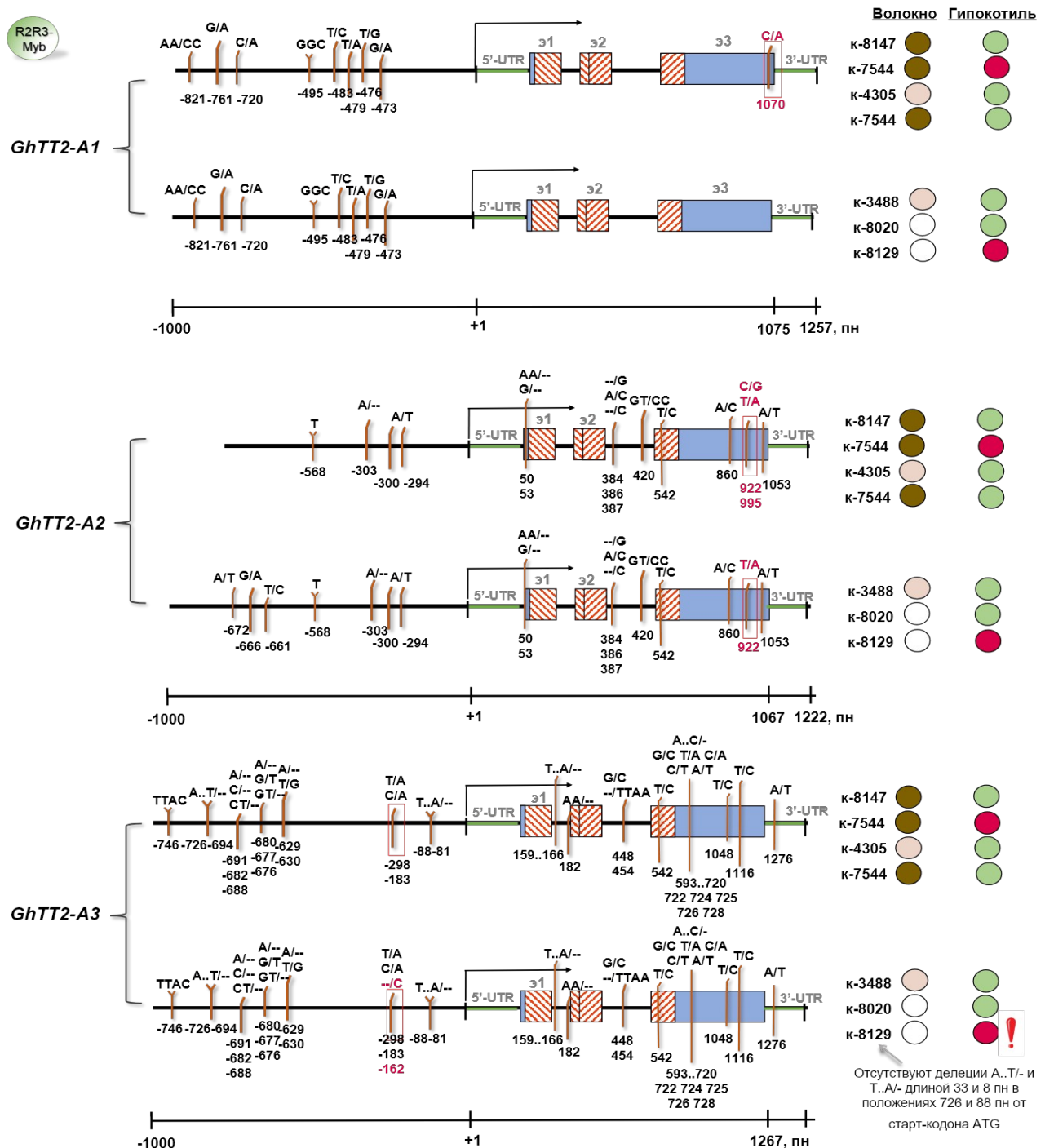


Рисунок 17 – Отличия от референсной последовательности, выявленные при секвенировании гомеологичных копий гена *GhTT2* в субгеноме *At* (*GhTT2-A1/2/3*); синими прямоугольниками обозначены экзоны, функциональные домены R2 и R3 в экзонах – красной штриховкой; э – экзоны, пн – пары азотистых оснований нуклеотидов, UTR (untranslated region) – нетранслируемые области. Делеции T..A*, отмеченные в позициях - 726 и -88 пн до старт-кодона в *GhTT2-A3* имеют следующие последовательности: TTTTGAAATTAAAATAATTATATTTATAATAA и TATATATATA длиной 32 пн и 10 пн соответственно. Более подробная информация о делеции A..C* в положении 593 пн указана в Приложении 19 (ориг.)

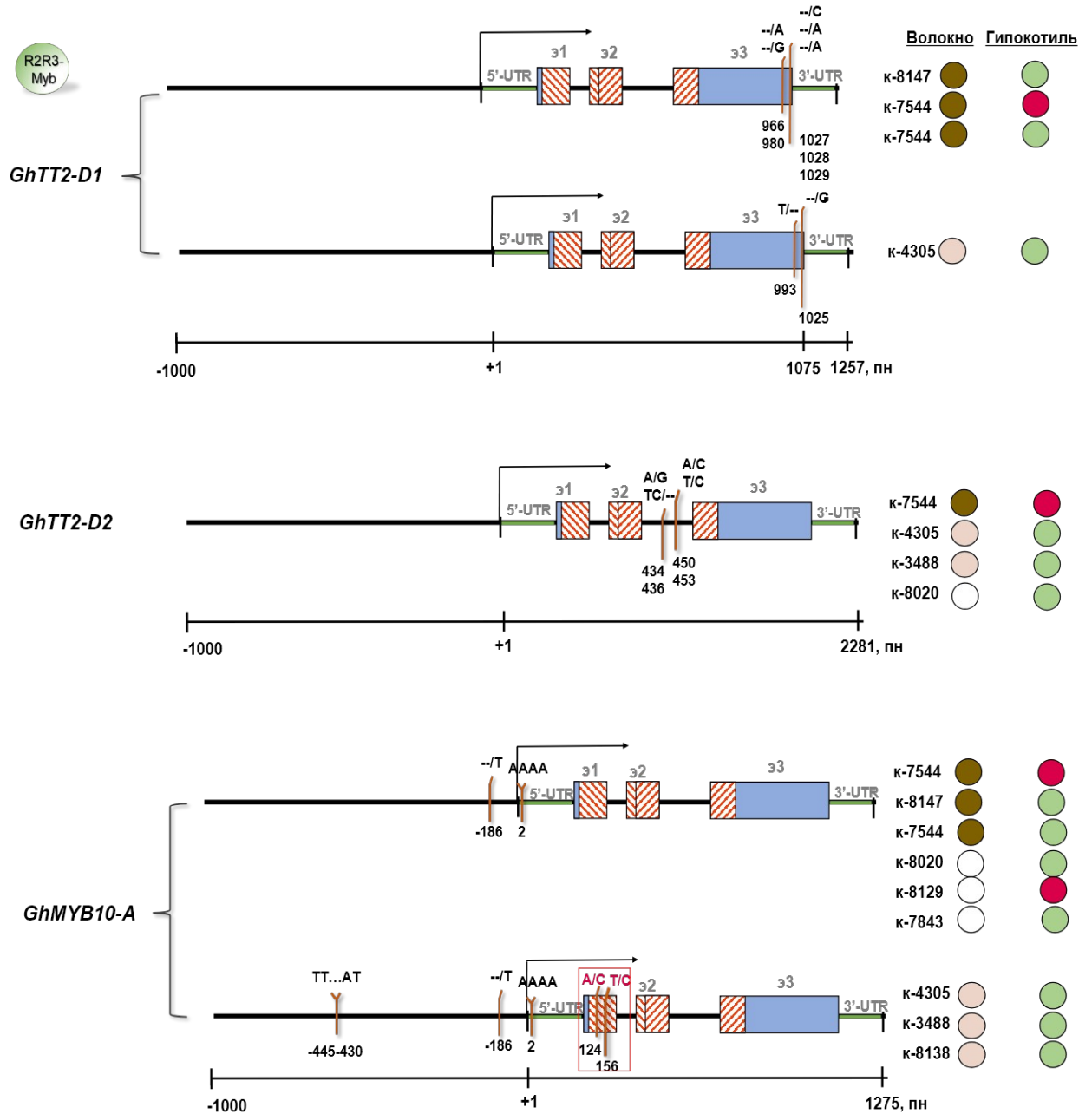


Рисунок 18 – Отличия от референсной последовательности, выявленные при секвенировании гомеологичных копий регуляторных генов *GhTT2* (*GhTT2-D1/2*) и *GhMYB10-A*. Синими прямоугольниками обозначены экзоны, функциональные домены R2 и R3 в экзонах – красной штриховкой; э – экзоны, п.о. – пары азотистых оснований нуклеотидов, UTR (untranslated region) – нетранслируемые области. Инсерция ТТ...АТ* в промоторной области гена *GhMYB10-A* в положении -445 пн до старт-кодона АТГ соответствует последовательности: ТТАТАТТААТТАТТТГТСАТГТТАТГАТАААСТАТТТТААТАСАТАААТ длиной 51 пн (ориг.)

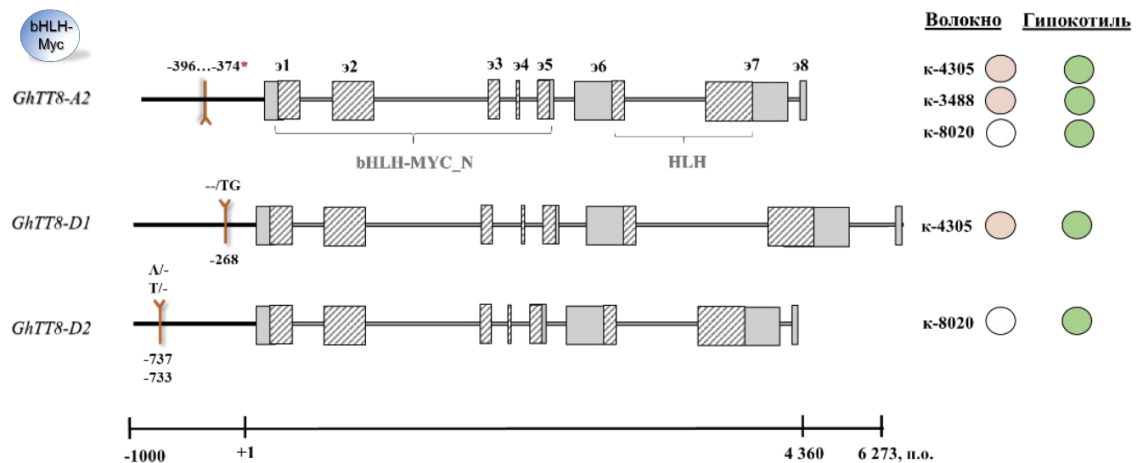


Рисунок 19 – Отличия от референсной последовательности, выявленные при секвенировании промоторной области регуляторных генов *GhTT8-A2*, *GhTT8-D1*, *GhTT8-D2*; прямоугольниками обозначены экзоны и функциональных домены bHLH и HLH; э – экзоны, п.о. – пары азотистых оснований нуклеотидов, UTR (untranslated region) – нетранслируемые области. Инсерция ТТ..АТ* в промоторной области гена *GhTT8-A2* в положении -396 пн до старт-кодона АТГ соответствует последовательности: АТСГААСТГТСТГГТАГАССС длиной 21 пн

Однако характерной вставкой в промоторе гена *GhMYB10-A* отличались образцы со светло-бурым волокном (рисунок 18). У образцов к-4305, к-3488 и к-8138, имеющих светло-бурую окраску волокна, наблюдалась инсерция длиной 46 нуклеотидов в промоторной области гена *GhMYB10-A* (Приложение 20). Образцы к-8147 и к-7544 с темно-бурой окраской волокна и беловолокнистый стандарт к-8020 не имели отличий от референса выше 187 пн от старт-кодона АТГ, за исключением общей у всех образцов инсерций Т в положении 186 пн от старт-кодона и АААА в начале 5'-UTR (нетранслируемой) области. С другой стороны, данное отличие в геномных последовательностях исследуемых образцов и референса можно рассматривать как делецию у беловолокнистых форм. Кроме того, в области первого экзона, кодирующего консервативный функциональный домен R2, у образцов хлопчатника со светло-бурой окраской волокна (к-4305, к-8138, к-3488, к-7314) обнаружены несинонимичные замены А → С и Т → С в положениях 124 и 156 пн, приводящие к миссенс-мутациям Лиз26Тре и Трп37Арг в кодируемом белковом продукте *GhMYB10-A* (Приложения 21, 22). Кодированная последовательность гена *GhMYB10-A* у остальных образцов соответствовала референсу. Секвенированные последовательности депонированы в международную базу данных GenBank (NCBI) под номерами: PZ542165-PZ542188, PZ555351-PZ555357, PZ561958-PZ561964, PZ562709-PZ562715, PZ562720-PZ562726, PZ564210-PZ564221, PZ564430-PZ564436.

Таким образом, среди всех рассмотренных регуляторных генов, *GhMYB10-A* – основной ген-кандидат, который контролирует изменение окраски волокна хлопчатника.

3.7. Сравнительный *in silico* анализ исходной формы ТФ GhMYB10-A и формы, содержащей выявленные миссенс-мутации

С помощью сервера Phyre2 оценили вероятность влияния миссенс-мутаций на функции белка при сравнении двух аминокислотных последовательностей исходного белка GhMYB10-A и его альтернативного варианта с заменами Лиз26Тре и Трп37Арг (Рисунки 20–23).

Гистограмма *Sequence profile* отображает степень консервативности аминокислотного остатка в конкретном положении первичной структуры белка: переход от синих и коротких столбцов к более удлинённым и красным коррелирует с возрастанием степени консервативности аминокислоты.

Гистограмма *Mutations* позволяет оценить эффект влияния выбора того или иного аминокислотного остатка в конкретном положении на функции целого белкового продукта: синие и короткие столбцы указывают на аминокислоты, которые сохраняют функции белка, тогда как высокие и красные столбцы, напротив, символизируют о высокой вероятности изменений в функционировании белкового продукта при выборе данной аминокислоты.

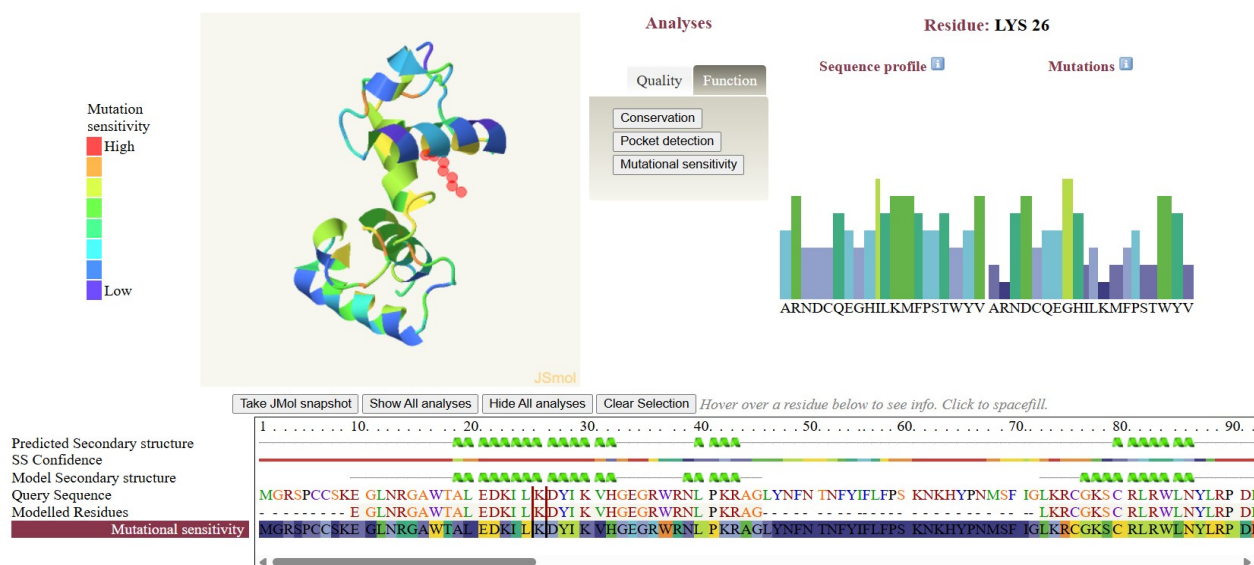


Рисунок 20 – Анализ первичной структуры исходной формы белка GhMYB10-A с сохранением лизина в положении 26 аминокислотной последовательности с помощью инструмента Phyre2. Аминокислоты представлены однобуквенным обозначением в соответствии с международным стандартом IUPAC-IUB (скриншот процесса анализа)

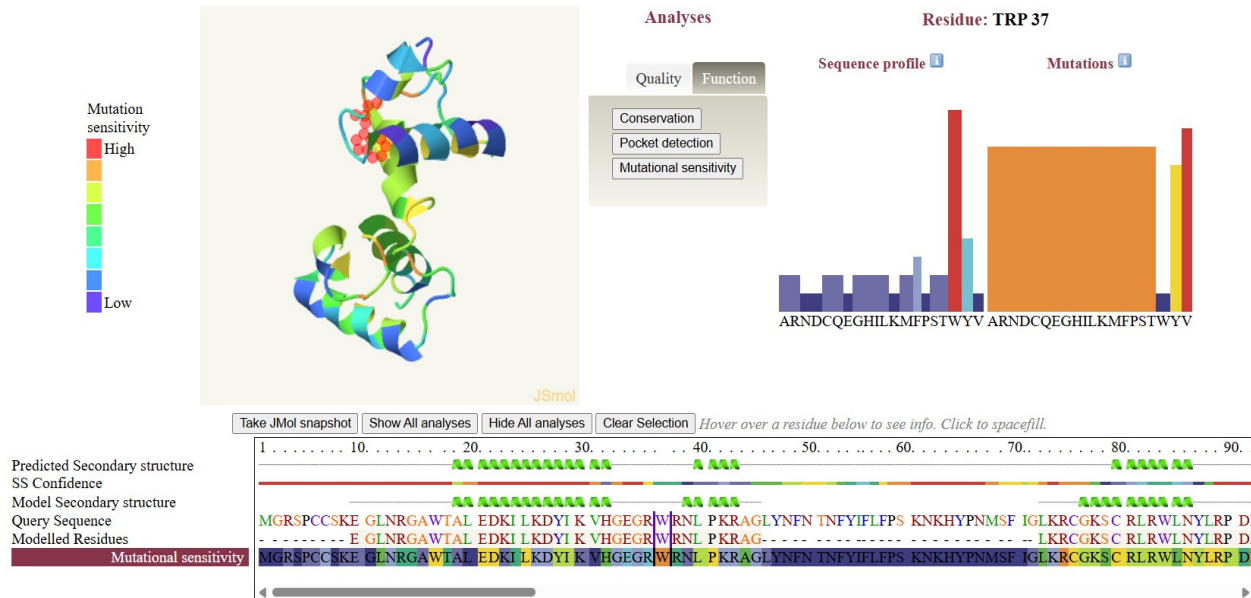


Рисунок 21 – Анализ первичной структуры исходной формы белка GhMYB10-A с сохранением триптофана в положении 37 аминокислотной последовательности с помощью инструмента Phyre2. Аминокислоты представлены однобуквенным обозначением в соответствии с международным стандартом IUPAC-IUB (скриншот процесса анализа)



Рисунок 22 – Анализ первичной структуры альтернативной формы белка GhMYB10-A с заменой лизина на треонин в положении 26 аминокислотной последовательности с помощью инструмента Phyre2. Аминокислоты представлены однобуквенным обозначением в соответствии с международным стандартом IUPAC-IUB (скриншот процесса анализа)

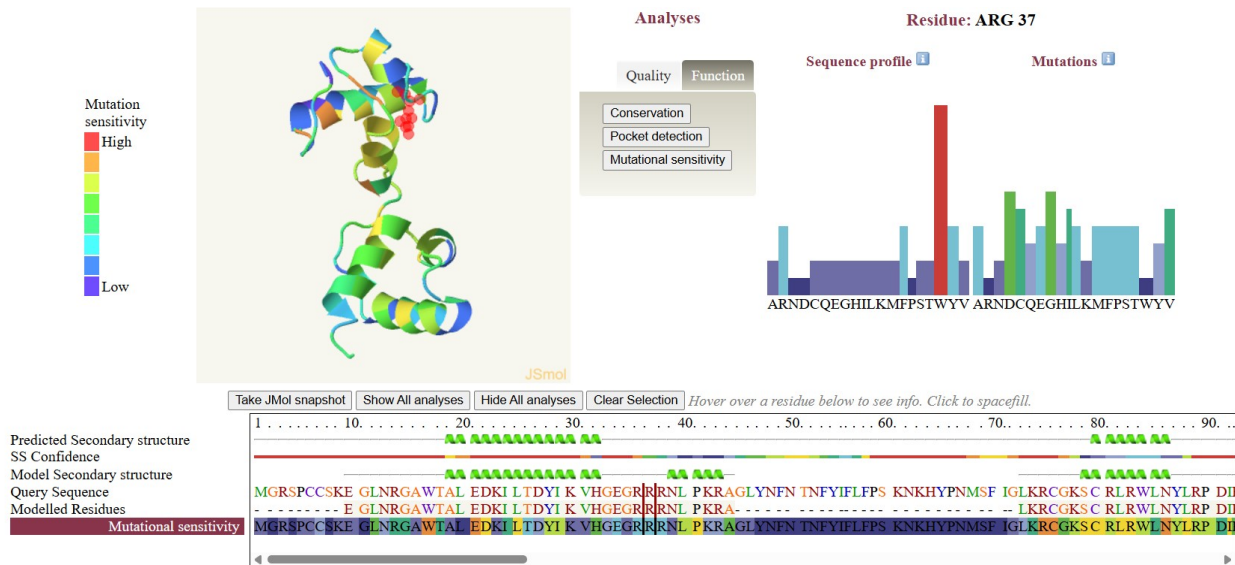


Рисунок 23 – Анализ первичной структуры альтернативной формы белка GhMYB10-A с заменой триптофана на аргинин в положении 37 аминокислотной последовательности с помощью инструмента Phyre2. Аминокислоты представлены однобуквенным обозначением в соответствии с международным стандартом IUPAC-IUB (скриншот процесса анализа)

С помощью сервера Missense3D оценили влияние замены триптофана на аргинин в домене MYB на третичную структуру обеих форм белка GhMYB10-A (рисунок 24).

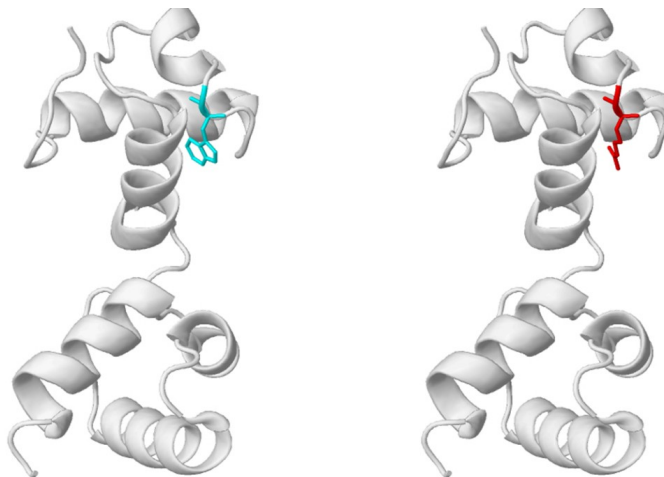


Рисунок 24 – Предсказанные 3D-структуры исходной формы белка (слева) с выделением остаток триптофана в положении 37 и альтернативной (справа) с выделением аргинина в положении 37. Предсказаны с помощью инструмента Missense3D (ориг.)

Кроме того, для исходной и альтернативной форм GhMYB10-A предсказаны потенциальные сайты связывания с последовательностью ДНК с использованием инструмента 3DLigandSite (рисунок 25).

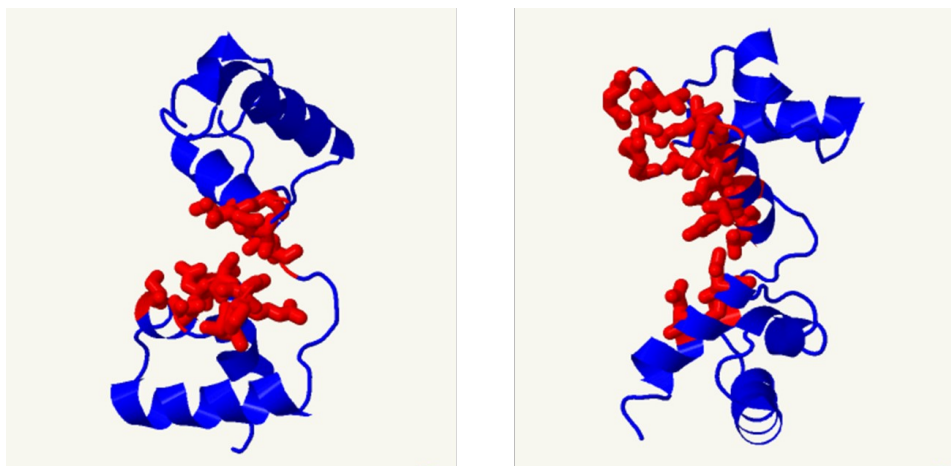


Рисунок 25 – Потенциальные сайты связывания (аминокислотные остатки, выделены красным) исходной (слева) и альтернативной (справа) форм белка с последовательностью ДНК. Структуры предсказаны с помощью инструмента 3DligandSite (ориг.)

Дополнительно с помощью программного обеспечения HEX Protein Docking 8.0.0 методом молекулярного моделирования проанализировали особенности взаимодействия между двумя вариантами белка GhMYB10-A и ДНК-последовательностью. Результаты молекулярного докинга визуализировали в PyMOL (рисунок 26).

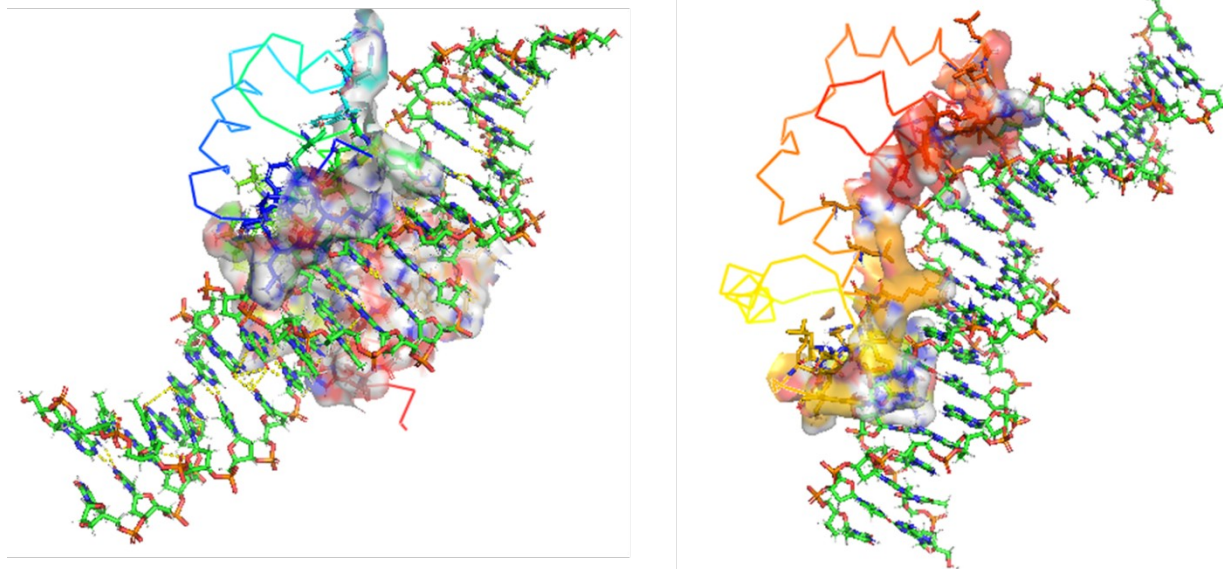


Рисунок 26 – Визуализация результатов молекулярного докинга в PyMOL: цепь ДНК, исходная (слева) и альтернативная (справа) формы белка. Аминокислотные остатки, задействованные в связывании с целевой нуклеотидной последовательностью, выделены в виде поверхности, построенной с учетом Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов; цвета соответствуют типам атомов белка: белый – водород, красный – кислород, оранжевый – сера, серый – углерод (ориг.)

Результаты предсказания потенциальных сайтов связывания визуализированы в РуМOL (рисунок 27).

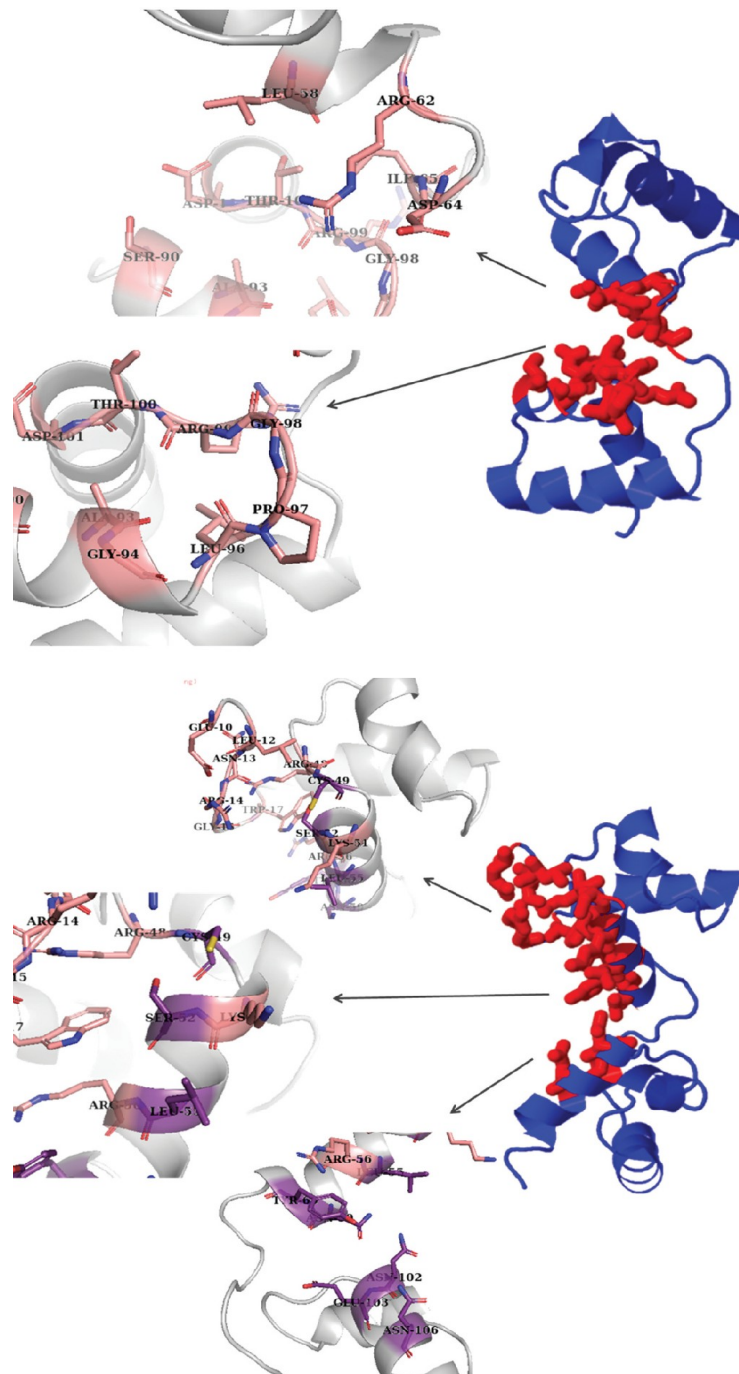


Рисунок 27 – Потенциальные сайты связывания (аминокислотные остатки, выделены красным) исходной (сверху) и альтернативной (снизу) форм белка с последовательностью ДНК целевых генов. Структуры предсказаны с помощью инструмента 3DligandSite и визуализированы в РуМOL (ориг.)

В случае исходной формы белка определены сайты: Лей85, Арг89, Асп91, Иле92, Сер117, Ала120, Гли121, Лей123, Про124, Гли125, Арг126, Тре127, Асп128; альтернативной: Гли10, Лей12, Асн13, Арг14, Гли15, Трп17, Арг48, Цис49, Лиз51, Сер52, Лей55, Арг56, Асн59, Тир60,

Асн102, Гли103, Асн106 (нумерация соответствует полной аминокислотной последовательности белка GhMYB10-A).

Результаты предсказания потенциальных сайтов связывания ТФ GhMYB10-A с целевой последовательностью ДНК, полученные двумя подходами коррелируют между собой. Таким образом, замена высоко консервативного остатка триптофана в положении 37, предположительно, снижает ДНК-связывающую активность альтернативной формы GhMYB10-A, что выражается в проявлении светло-бурой окраски волокна.

3.8. Оценка относительного уровня транскрипции ключевых структурных и регуляторных генов биосинтеза пигментов в природноокрашенном волокне

3.8.1. Подбор оптимальной комбинации референсных генов домашнего хозяйства.

Поиску оптимальной комбинации генов эндогенного контроля для нормализации относительного уровня транскрипции целевых генов было уделено особое внимание, поскольку нормализация на группу генов дает более точные и надежные результаты по сравнению с использованием единичного референсного гена (Vandesompele et al., 2002).

Для подбора стабильно экспрессируемых генов домашнего хозяйства и определения минимального числа генов для нормализации использовали алгоритм geNorm в программе qBase+ (Hellemans et al., 2007; Vandesompele et al., 2002). Значение М алгоритма geNorm ранжирует потенциальные референсные гены на основе их среднего попарного изменения относительного уровня транскрипции по сравнению с каждым геном из рассматриваемой группы. В качестве порогового М-значения рекомендуется 1,0, при этом: показатели $M < 0,5$ – указывают на высокую стабильность экспрессии, $0,5 \leq M < 1,0$ – умеренную, $M \geq 1,0$ – характеризуют гены с наименьшей стабильностью (Vandesompele et al., 2002).

Изначально рассматривали выборку из шести генов-кандидатов – *TBL6*, *ACTB*, *UBQ11*, *UBQ7*, *HIS3.3* и *UBQLN1*, ранее рекомендованных в литературных источниках как наиболее стабильно экспрессируемых в волокне хлопчатника (Artico et al., 2010; Clark et al., 2025; Smitha et al., 2019). Согласно полученным данным, гены разделились на две группы, в зависимости от значения М: *UBQ11*, *UBQ7*, *HIS3.3*, *UBQLN1* $< 1,0$ и *TBL6*, *ACTB* $> 1,0$ (рисунок 28).

Оптимальное количество референсных генов было оценено с использованием метрики geNorm V (V-значение, Pairwise Variation), отображающей результаты попарного сравнения групп с различным числом референсных генов: чем ниже значение метрики geNorm V, тем меньше генов требуется для надёжной нормализации (рисунок 29). Наименьшее значение V в данном случае представлено для группы из трех генов.

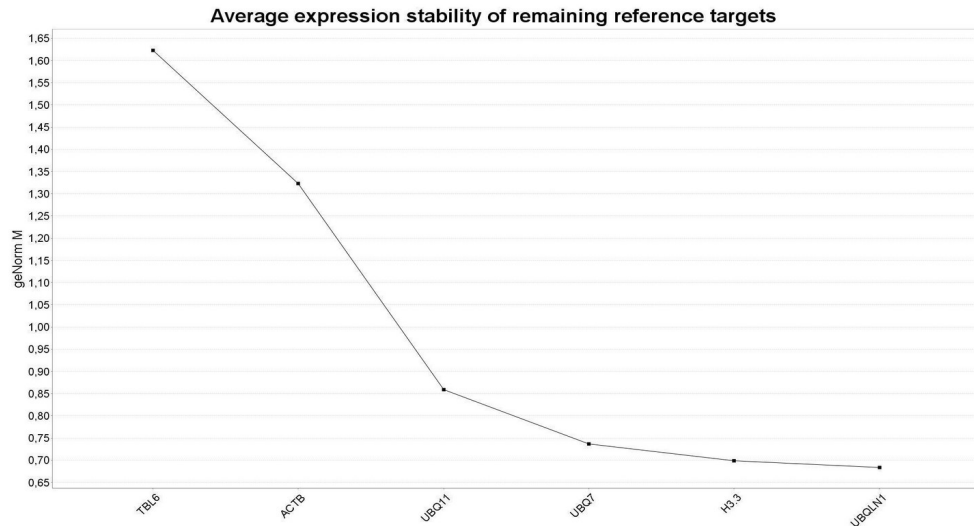


Рисунок 28 – Стабильность экспрессии референсных генов по метрике geNorm (М-значение) (ориг.)

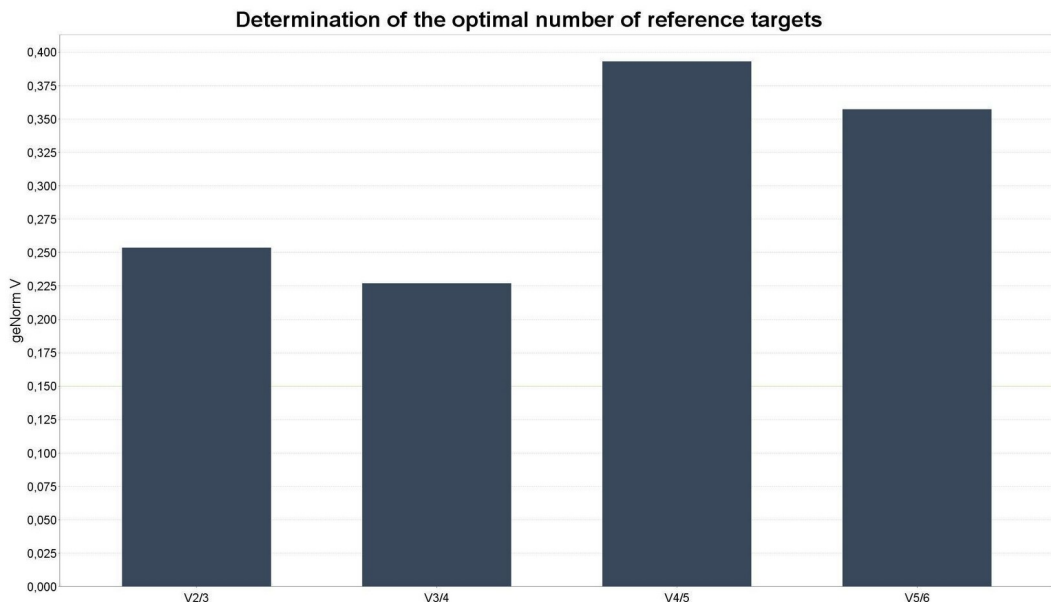


Рисунок 29 – Попарное сравнение групп с различным количеством референсных генов для нормализации целевых генов в зависимости от значения метрики geNorm (V-значение) (ориг.)

Таким образом, в результате сравнения значений М и V в качестве потенциальных референсных генов выделились три гена, *UBQ7*, *HIS3.3* и *UBQLN1*, с наименьшими значениями М < 0,75 и V ~ 0,225, средние геометрические значения показателей FC которых использовали для нормализации относительного уровня транскрипции целевых генов.

3.8.2. Относительный уровень транскрипции ключевых генов.

Для оценки относительного уровня транскрипции ключевых структурных (*GhDFR*, *GhANR*, *Gh4CL*) и регуляторных (*GhMYB10*, *GhMYB1R1*) генов флавоноидного и фенилпропаноидного путей изолировали тотальную РНК из волокна хлопчатника у образцов с контрастной окраской

волокна: темно-бурой (к-8147), светло-бурой (к-8138), буро-зеленой (к-8146), зеленой (к-8158). В качестве контрольного использовали образец с белым волокном (к-8020) (рисунок 30).

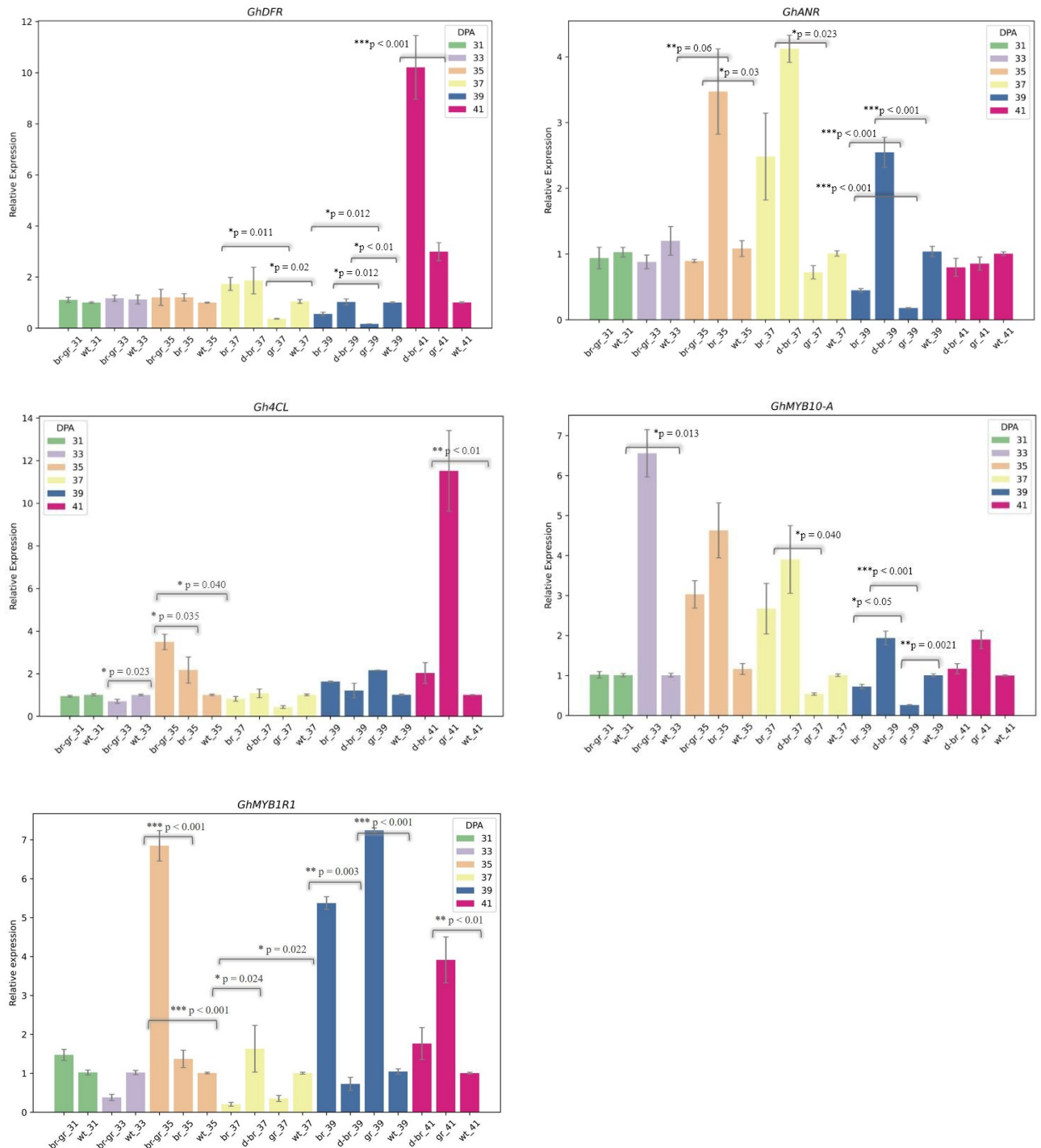


Рисунок 30 – Относительный уровень транскрипции ключевых генов биосинтеза флавоноидных пигментов в волокне хлопчатника с 31 по 41 ДПО (DPA, days post-anthesis): *GhDFR* (Phytozome: Gohir.A05G192500), *GhANR* (Gohir.A05G167300), *Gh4CL* (Gohir.A10G049500), *GhMYB10* (Gohir.A06G075700), *GhMYB1R1* (Gohir.A12G215300). Данные представлены для каждого гена отдельно в зависимости от типа волокна: br-gr – буро-зелёное волокно, br – светло-бурое, d-br – тёмно-бурое, gr – зелёное, wt – белое. Планки погрешности

соответствуют стандартной ошибке среднего (SEM) по трем биологическим повторностям (ориг.)

Структурные гены. Гены биосинтеза проантоцианидинов – *GhDFR* (ранний этап) и *GhANR* (поздний этап) – демонстрировали повышенную экспрессию у образцов с бурой и зелёной окраской. Относительный уровень транскрипции *GhDFR* резко возрастал у образца с тёмно-бурой окраской волокна к 41 ДПО и оставался низким у остальных генотипов. У генотипа со светло-бурым волокном активность *GhANR* возрастала к 35 ДПО, у тёмно-бурого – к 37 ДПО. У зелёноволокнистых образцов экспрессия гена *Gh4CL* достигала максимума к 41 ДПО; у буро-зелёных – к 35 ДПО, тогда как у других форм активность гена оставалась низкой.

Регуляторные гены. Синтез вторичных метаболитов фенилпропаноидного пути тесно связан с факторами транскрипции MYB. Регуляторный ген *GhMYB10* из А-генома активно экспрессировался у образцов с буро-зелёным волокном на 33 ДПО, светло-бурым – к 35 ДПО, у тёмно-бурого – к 37 ДПО.. Ранее удалось установить взаимосвязь между накоплением флавоноидных метаболитов и активностью генов семейства MYB: выделено два регуляторных гена-кандидата *GhMYB1R1* в субгеномах At и Dt (Tang et al., 2021). Наибольшее количество мРНК *GhMYB1R1* было зафиксировано у буро-зелёного и зелёного образцов к 35 и 39 ДПО соответственно, а также у светло-бурого к 39 ДПО.

Достоверность выявленных различий относительных уровней транскрипции в каждой из групп сравнения (за группу сравнения брали одну временную точку, ДПО) оценивали с помощью статистических методов (см. 2.7.2; Приложение 23).

3.10. Анализ взаимодействия GhMYB10-А с другими ТФ комплекса MBW

Для предсказания функциональных белков, взаимодействующих с белковым продуктом гена *GhMYB10-А*, провели *in silico* анализ белок-белковых взаимодействий (PPI) с использованием базы данных STRING v.12.0 (<https://string-db.org/>). Предсказанная сеть белок-белковых взаимодействий выявила ряд ключевых кандидатов из семейств bHLH-MYC и WD40 – основные компоненты MBW-комплекса (рисунок 31). Экспериментально подтверждено взаимодействие GhMYB10-А (черные линии) с двумя ТФ семейства bHLH-MYC, bHLH130D (Phytozome: Gohir.D11G127600) и bHLH064D (Gohir.D08G203900), а также с рядом ТФ семейства WD40: LOC107901465 (Gohir.D06G035600), LOC107945759 (Gohir.D08G116300), LOC107962430 (Gohir.A06G035000), LOC107948000 (Gohir.A08G104600) и LOC107904228 (Gohir.D04G000300).

Множественные линии желтого цвета указывают на подробно описанную связь между белком интереса GhMYB10 и рядом идентифицированных белков; линии розового цвета подтверждают прямо пропорциональное изменение уровня мРНК генов, кодирующих соответствующие белковые продукты, в различных тканях или условиях.

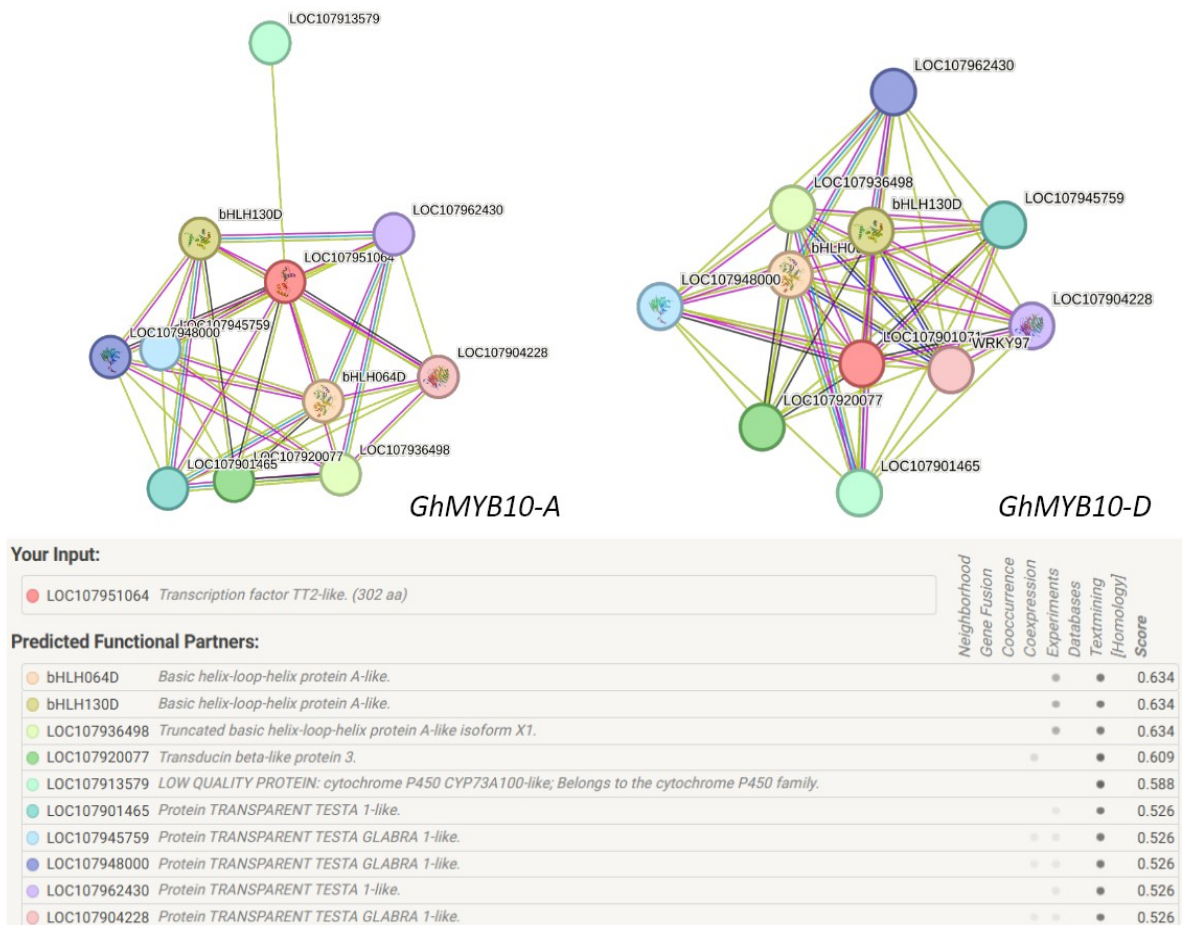


Рисунок 31 – Предсказание белок-белковых взаимодействий GhMYB10 с компонентами MBW-комплекса в А- и D-геномах хлопчатника (анализ выполнен с помощью STRING v.12.0). Цвета линий характеризуют различные типы белок-белковых взаимодействий: зеленый (близость расположения генов), розовый (экспериментально подтвержденное взаимодействие), черный (коэкспрессия), голубой (базы данных метаболических путей, например KEGG), желтый (анализ литературы) (ориг.)

Для GhMYB10-A и идентифицированной группы взаимодействующих с ним белков комплекса MBW, включающей ТФ семейств bHLH (в том числе MYC-подобные) и белки WD40, провели анализ обогащения по биологическим процессам (рисунок 32).

Цвет окружностей отражает уровень статистической значимости FDR (False Discovery Rate) – поправку при множественном тестировании. Светло-зеленый цвет соответствует самому высокому уровню статистической значимости ($FDR = 1,0e-19$), темно-синий – пороговой значимости ($FDR = 1,0e-03$). Общепринятый порог достоверности $FDR < 0,05$; все представленные на графике процессы удовлетворяют этому критерию. Размер окружностей пропорционален количеству генов (Gene count), ассоциированных с данным биологическим процессом в исследуемой выборке.

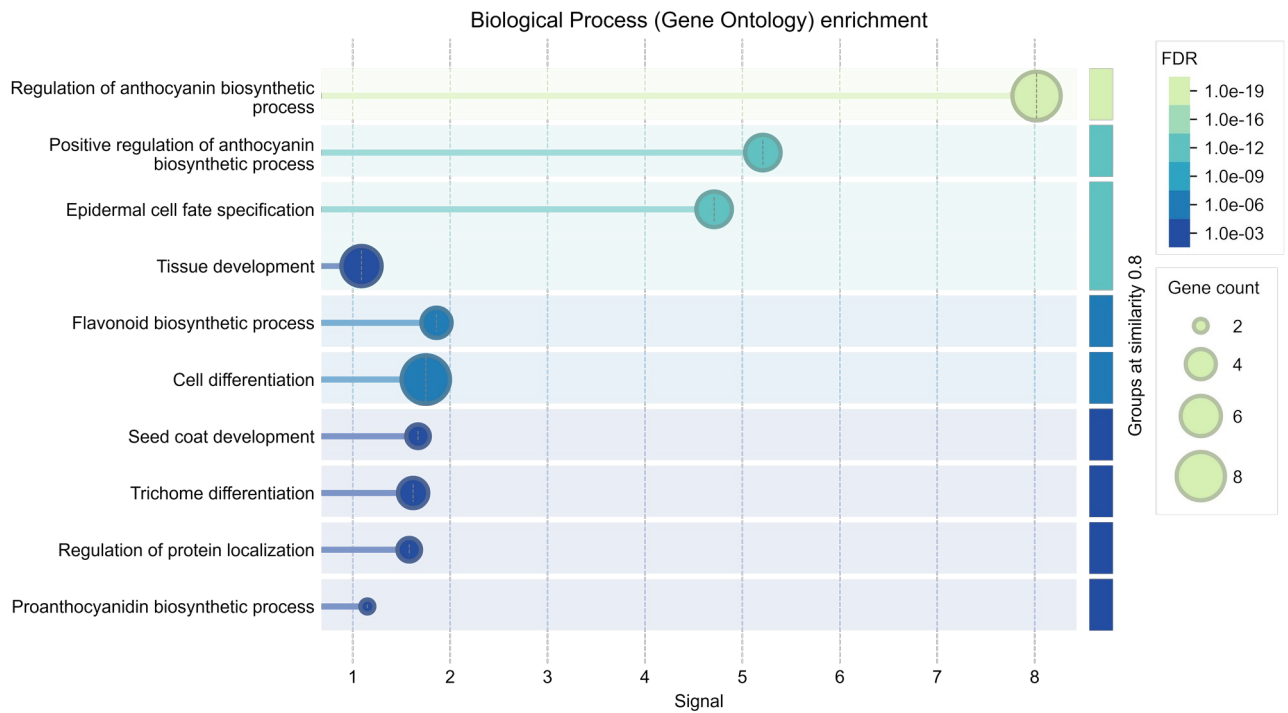


Рисунок 32 – Обогащение по биологическим процессам (Gene Ontology) для ТФ GhMYB10-A и взаимодействующих с ним ТФ семейства bHLH-MYC и белками WD40 (ориг.)

Горизонтальная ось (Signal) отражает показатель «степени обогащения» (enrichment score), которая количественно характеризует избыточную представленность генов, ассоциированных с данным GO-термином, в анализируемой выборке. Согласно функциональной аннотации, GhMYB10-A и идентифицированные взаимодействующие с ним белки являются положительными регуляторами биосинтеза антоцианов, а также участвуют в спецификации эпидермальных клеток, дающих начало замыкающим клеткам и трихомам.

Таким образом, достоверность взаимодействий GhMYB10-A с компонентами комплекса MBW подтверждается множественными выявленными связями, включая данные из курируемых баз метаболических путей, экспериментальными данными, коэкспрессией и имеющейся информацией в литературных источниках.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Анализ структурной организации генов *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*

***R2R3-MYB*.** Все идентифицированные гены *R2R3-MYB* у хлопчатника *G. hirsutum* содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие ДНК-связывающие мотивы R2- и R3-MYB, длиной 44–47 аминокислот. Кроме того, среди всех рассматриваемых копий генов *R2R3-MYB* не наблюдается несинонимичных замен или делеций в критически важных участках доменов. Предсказанные 3D-модели функционально значимых консервативных регионов имеют сходную конформацию и характерные структурные мотивы «спираль-петля-спираль».

***bHLH-MYC*.** Функциональные домены генов *bHLH* содержат около 175 и 53 а.о. Однако в N-концевой области *bHLH*-домена белка GhTT8-A2 выявлена замена аргинина на серин в положении 13. Поскольку остаток аргинина не только участвует в формировании белковой глобулы, но и связывается с нуклеотидными основаниями ДНК, подобная замена, вероятно, может дестабилизировать третичную структуру и снизить функциональную активность белка. Несмотря на это, предсказанные 3D-модели всех копий GhTT8 демонстрируют высокую степень гомологии по отношению к референсной структуре AtTT8 (рисунок 15). Кроме того, во всех идентифицированных копиях GhTT8 зафиксированы замены Val52Изо и Arg53Лиз по сравнению с AtTT8. Как было показано ранее, для GhTT8 (также известного как GhbHLH130D) у хлопчатника, данные замены не приводят к утрате функций (Yan et al., 2018). Для экспериментального подтверждения влияния выявленных замен на функциональную активность соответствующих белковых продуктов необходимы дальнейшие исследования с применением молекулярно-генетических методов анализа.

***WD40*.** В ходе множественного выравнивания последовательностей копий генов, выделено четыре, не содержащих несинонимичных замен. Предсказанные трехмерные модели белков семейства WD40 демонстрируют характерную для семейства структурную организацию из повторяющихся мотивов (рисунок 16).

Как известно, регуляторный комплекс MBW контролирует ряд важных этапов онтогенеза и адаптивные реакции высших растений (Appelhaagen et al., 2011; Gonzalez et al., 2009; Johnson, Kolevski, Smyth, 2002; Wang et al., 2004). Имеются многочисленные примеры сохранения функций дублированных копий генов биосинтеза флавоноидов у высших растений (Strygina, Khlestkina, 2019a, 2019b; Strygina, Kochetov, Khlestkina, 2019; Vikhorev, Strygina, Khlestkina, 2019). Для генов, возникших в результате дупликации, стоит рассматривать не только субфункционализацию, но и неофункционализацию, при которой одна из копий приобретает новую биологическую роль. Это может проявляться, в частности, в тканеспецифичной активации биосинтеза ПА: разные дублированные копии могут регулировать накопление пигментов не

только в клетчатке, но и в других тканях. Тем не менее, для установления точной функциональной дифференциации выявленных генов необходима дальнейшая экспериментальная валидация.

4.2. Эволюционные особенности формирования дублицированных копий генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*

Согласно литературным данным, в течение 5–10 млн лет род *Gossypium* разделился на три основные клады: Афро-Азиатскую, кладу Нового Света и Австралийскую, что привело к образованию восьми диплоидных групп с геномами A-G и K (Strygina, Khlestkina, Podolnaya, 2020). Образование аллотетраплоидных видов с AD-геномом в результате межвидовой гибридизации произошло приблизительно 1,5 млн лет назад (Hu et al., 2019).

Для выяснения степени эволюционного сходства между изучаемыми генами хлопчатника, был проведен кластерный анализ всех идентифицированных копий генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* у видов с доступными в базе данных CottonFGD референсными геномами (диплоидные формы: *G. raimondii* (D₅) и *G. arboreum* (A₂); аллотетраплоидные: *G. hirsutum* (AD)₁, *G. barbadense* (AD)₂). Согласно филогенетическому анализу, все основные события дубликации рассматриваемых генов произошли в геноме общего диплоидного предка рода *Gossypium* (рисунки 12–13). В проанализированных геномах не выявлено событий недавних дубликаций, произошедших после полиплоидизации.

В зависимости от механизма возникновения, дубликации подразделяются на тандемные, сегментные, полногеномные, диспергированные и транспозон-опосредованные. Тандемные дубликации приводят к формированию кластеров гомологичных генов в пределах одного локуса хромосомы (Ramsey, Schemske, 1998; Vondrak et al., 2019). Сегментные дубликации затрагивают протяженные участки генома (обычно более 1 кб) с высокой степенью гомологии и могут располагаться как на одной хромосоме, так и находиться на значительном расстоянии друг от друга, в том числе в другой хромосоме (Macas et al., 2015; Bolsheva et al., 2019). Диспергированные копии часто возникают в результате ретротранспозирования (обратной транскрипции кДНК на матрице мРНК и интеграции ретрогенов в геном с помощью обратной транскриптазы) или транспозон-опосредованной трансдубликации, что нередко сопровождается образованием псевдогенов (Hurles, 2004; Freeling et al., 2008).

В настоящей работе для установления характера селективного давления на дублицированные гены было вычислено соотношение Ka/Ks . Все полученные значения соотношения Ka/Ks удовлетворяют условию $Ka/Ks < 1$, что указывает на доминирование «очищающего отбора» в эволюции данных семейств (Hu, Banzhaf, 2008). Значения $Ka/Ks > 1$ характеризуют «положительный отбор», при котором накапливаются полезные мутации и далее закрепляются популяцией для адаптации, $Ka/Ks = 1$ – нейтральная эволюция (мутации

накапливаются случайно). Средние значения отношения Ka/Ks составили 0,413 для генов *R2R3-MYB*, 0,674 для *bHLH-MYC* и 0,104 в случае генов *WD40* (Приложение 16) (Mikhailova et al., 2022). Рассмотрим подробнее особенности эволюции регуляторных генов перечисленных семейств и проанализируем полученные нами результаты с типом и силой селективного давления на данные гены у других видов покрытосеменных растений.

R2R3-MYB. Семейство ТФ R2R3-MYB – одно из наиболее многочисленных у растений. Ключевым механизмом увеличения числа копий генов данного семейства является сегментные и тандемные дупликации. Количество генов *R2R3-MYB* существенно варьирует у разных видов: у *A. thaliana* их около 126, у сои (*Glycine max* (L.) Merr) – 244, у кукурузы (*Zea mays* L.) – 157, у сахарного тростника (*Saccharum spontaneum* L.) – 202, у хлопчатника (*G. hirsutum*) – 406, у оливы (*Olea europaea* L.) – 212, у груши среденезиатской (*Pyrus bretschneideri* Rehder) – 105, у яблони (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) – 219 и другие (Cao et al., 2016; Duan et al., 2022; Feller et al., 2011; Hajiebrahimi et al., 2017; He et al., 2016; Lai et al., 2013; Liu et al., 2019; Luo et al., 2025; Pu et al., 2020; Wang et al., 2015, 2019; Wu et al., 2025; Yang et al., 2025; Yanhui et al., 2006; Yuan et al., 2021; Zhu et al., 2020, 2021, 2025). Для подавляющего большинства генов *R2R3-MYB* характерен очищающий отбор ($Ka/Ks < 1$), что отражает критическую важность сохранения структуры MYB-домена для корректного функционирования белка. Например, у *Brassica napus* L. более 98% из 249 идентифицированных генов *R2R3-MYB* находятся под действием очищающего отбора (Hajiebrahimi et al., 2017). У пекана обыкновенного (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K.Koch) все 52 дуплицированные пары демонстрируют $Ka/Ks < 1$; при этом распределение значений Ks в промежутке 0,3–0,7 (около 55% пар) характеризует недавно произошедшие дупликации, не сопровождаемые положительным отбором, тогда как пары с $Ks = 1,3–4,8$ относятся к более давним дупликациям (Zhu et al., 2020). Достаточно сильное давление очищающего отбора также наблюдали у моркови дикой (*Daucus carota* L.): все паралогичные пары из 146 генов *R2R3-MYB* имеют Ka/Ks в интервале 0,1–0,4 (Duan et al., 2022); у китайской капусты (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) дивергенция дуплицированных пар связана с трипликацией генома, произошедшей около 5–9 млн лет назад, вследствие чего все 185 пар находятся под строгим очищающим отбором (Wang et al., 2015). Исключительно очищающий отбор зафиксирован для всех паралогичных и ортологичных пар (внутривидовые и межвидовые соответственно; 34 пары, возникшие в ходе сегментной дупликации) у гиностеммы пятилистной (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino), софоры японской (*Styphnolobium japonicum* (L.) Schott), оливы европейской и сои (Pu et al., 2020; Huang et al., 2022; Wu et al., 2025; Zhu et al., 2025). Примечательно, что у сои гены с MYB-доменом демонстрируют особенно сильное очищающее давление (среднее $Ka/Ks = 0,1567$); гены *R2R3-MYB* высокгомологичны и претерпели дупликации достаточно давно в ходе полиплоидизации ~13 млн лет назад (Pu et al., 2020).

Однако в ряде случаев фиксируются признаки ослабления очищающего отбора или локального положительного отбора ($Ka/Ks > 1$ в отдельных кодонах). Как правило, менее консервативным оказывается R3-мотив, тогда как R2-домен сохраняет высокую степень структурной консервативности. Ослабление селективных ограничений характерно для видов, в геномах которых недавно произошли дупликационные события. Например, у груши среднеазиатской, несмотря на доминирование очищающего отбора для большинства дублицированных пар, в R3-мотиве выявлены участки в домене с ослабленным давлением отбора (Cao et al., 2016). Кроме того, для трех пар генов *PbMYB6/PbMYB11*, *PbMYB22/PbMYB131* и *PbMYB23/PbMYB87* значения Ka/Ks составили 0,82, 0,90 и 0,95 соответственно. Такие показатели, близкие к единице, свидетельствуют об ослаблении очищающего отбора, что создает условия для субфункционализации или неофункционализации дублицированных копий.

Признаки положительного отбора для генов *R2R3-MYB* были также обнаружены у ортологичных пар у *B. napus* и *Brassica rapa* L.: 7% пар демонстрировали $Ka/Ks > 1$. Авторы связывают это с недавними событиями дупликации либо с адаптацией в ходе искусственного отбора (Hajiebrahimi et al., 2017).

Интересный пример связи между характером отбора, действующим на гены *MYB*, и их тканеспецифичной экспрессией описан у сахарного тростника (Yuan et al., 2021). Гены, доминантно экспрессируемые в стебле, демонстрируют более высокое медианное значение $Ka/Ks = 0,482$ и примерно в два раза чаще подвергаются действию положительного отбора по сравнению с генами, транскрипционно активными в листьях. Вероятно, такая закономерность обусловлена ключевой ролью стебля как основного запасающего органа, где содержание сахарозы достигает 26%, что требует специфической регуляторной настройки метаболических путей.

У шести видов семейства *Rosaceae* идентифицировано порядка 838 генов *R2R3-MYB* (Liu et al., 2019). Из них 105 у земляники, 219 у яблони, 121 у персика, 173 у груши обыкновенной (*Pyrus communis* L.), 121 у розы китайской (*Rosa chinensis* Jacq.) и 99 у малины черной (*Rubus occidentalis* L.). Подавляющее большинство дублицированных пар (95,5 %) находится под действием очищающего отбора. Около 4,4 % пар эволюционируют под влиянием положительного отбора, что способствует закреплению адаптивных аминокислотных замен. Для нескольких пар генов (0,1 %) зарегистрированы значения $Ka/Ks = 1$, указывающие на нейтральный характер отбора. В таких случаях накопление случайных нуклеотидных замен может свидетельствовать о снижении функциональных ограничений, что в перспективе способно привести к псевдогенизации. Примечательно, что у малины черной выявлена достаточно высокая доля пар с $Ka/Ks > 1$ (30,4 %), при этом медианное значение Ka/Ks также выше, чем у всех рассмотренных видов и составляет 0,8. У груши обыкновенной медианные, средние и

квартильные значения Ka/Ks также выше, чем у яблони, что свидетельствует об ослаблении селективного давления. При этом у яблони почти все пары (99,9 %) соответствуют значениям $Ka/Ks < 1$. Авторы связывают наблюдаемые различия с особенностями domestикации и интенсивной селекцией малины черной, направленной на улучшение качества плодов и устойчивости к болезням. Это привело к ускоренной эволюции вовлеченных в формирование данных признаков некоторых *MYB*-генов, тогда как зафиксированный у яблони строгий очищающий отбор отражает высокую степень функциональной консервативности после недавних дупликаций. Таким образом, данные результаты демонстрируют, как искусственный отбор может влиять на эволюционную динамику у ключевых регуляторных генов.

У четырех видов хлопчатника рода *Gossypium* выявлено 1228 генов семейства *R2R3-MYB*: 406 у *G. hirsutum*, 393 у *G. barbadense*, 216 у *G. raimondii* и 213 у *G. arboreum* (Wang et al., 2019). Большинство ортологичных пар генов между аллотетраплоидными субгеномами (*At* и *Dt*) и диплоидными видами (*A₂* и *D₅*) характеризуются значениями $Ka/Ks < 1$, однако отдельные полноразмерные копии демонстрируют признаки положительного отбора с $Ka/Ks > 1$. Авторы предполагают, что быстрая эволюция данных генов сыграла ключевую роль в адаптации новообразованных аллотетраплоидных видов. Важно отметить асимметричный характер эволюции генов семейства *R2R3-MYB* у хлопчатника, при которой субгеном *At* эволюционирует быстрее и подвергается более ослабленному очищающему отбору по сравнению с субгеномом *Dt*. Это согласуется с ранее описанной асимметрией на уровне всего генома, охватывающей 21 618 ортологичных генов (Zhang et al., 2015). Вероятно, данное расхождение вносит вклад в формирование различий в свойствах волокна у двух активно культивируемых аллотетраплоидных видов: *G. hirsutum* (высокая урожайность, умеренное качество) и *G. barbadense* (более низкая урожайность, превосходная длина/прочность/тонкость). В субгеномах *At* и *Dt* присутствуют дифференциально эволюционировавшие аллели генов *R2R3-MYB*, которые напрямую связаны с этими агрономически важными признаками волокна. Таким образом, семейство *R2R3-MYB* отражает общую эволюционную закономерность у аллотетраплоидных видов *Gossypium*: после полиплоидизации субгеномы не функционируют симметрично, при этом субгеном *At* демонстрирует большую динамичность и характеризуются большей эволюционной пластичностью.

В настоящей работе гены субклад *MYB10* и *TT2-A/D* дивергировали достаточно давно, около 82 млн лет назад (рисунок 12-А). При этом значения Ks для генов *MYB10* и *TT2-A/D* находятся в диапазоне 0,919–0,975 и 0,497–0,561 соответственно. Более низкие значения Ks у генов *TT2-A/D* указывает на то, что их дупликация генов в субгеномах *At* и *Dt* произошла позднее по сравнению с генами *MYB10*. Действительно, образование паралогичных копий генов *TT2* датируется периодом 29,98–27,46 млн лет назад. Аналогичные результаты распределения Ks

описаны для дублицированных генов *R2R3-MYB* пекана обыкновенного: значения Ks в диапазоне 0,3–0,7 соответствуют относительно недавним дупликациям (55% событий), тогда как пары с $Ks = 1,3–4,8$ относятся к давним событиям дупликаций (Zhu et al., 2020). У китайской капусты Ks для 185 дублицированных пар варьирует от 0,16 до 3,85, что отражает многоэтапный процесс дупликаций в геноме *Brassica* (Wang et al., 2015).

Таким образом, среднее значение Ka/Ks для генов *R2R3-MYB* хлопчатника составляет 0,413, что сопоставимо с показателями для сахарного тростника ($Ka/Ks = 0,482$ в стебле, $Ka/Ks = 0,455$ в листьях) и паслёна колючего, у которого шесть пар характеризуются умеренным очищающим отбором ($Ka/Ks = 0,3–0,5$) (Yuan et al., 2021; Yang et al., 2025).

В то же время, у сои, дикой моркови и у 16 пар генов паслёна колючего наблюдается более сильное давление очищающего отбора: среднее $Ka/Ks = 0,1567$ для сои, $Ka/Ks = 0,1–0,4$ для моркови дикой и $Ka/Ks < 0,3$ для нескольких пар *S. rostratum* (Pu et al., 2020; Duan et al., 2022; Yang et al., 2025). У диплоидного хлопчатника *G. raimondii* из 35 дублицированных пар 27 находятся под действием выраженного очищающего отбора ($Ka/Ks < 0,5$), тогда как для остальных характерно ослабление селективных ограничений ($Ka/Ks = 0,5–1$) (He et al., 2016). У аллотетраплоидного *G. hirsutum* подавляющее большинство из 445 гомеологичных пар семейства *R2R3-MYB* также эволюционирует под контролем очищающего отбора (Zhu, Bao, 2021). Таким образом, результаты настоящего исследования согласуются с ранее опубликованными данными по хлопчатнику и указывают на умеренное селективное давление, действующее на данное семейство у *Gossypium*.

У рассмотренных видов растений основным механизмом расширения семейства *R2R3-MYB* выступают сегментные дупликации (включая события полногеномной дупликации). Тандемные дупликации встречаются значительно реже и, как правило, вносят меньший вклад в общее число копий. Например, у аллотетраплоидного хлопчатника *G. hirsutum* коллинеарный анализ показал, что 83,5 % всех *MYB*-генов (включая *R2R3-MYB*) возникли в результате сегментных или полногеномных дупликаций, тогда как на долю тандемных дупликаций пришлось лишь 1,2 % (Zhu, Bao, 2021). У диплоидного вида хлопчатника *G. raimondii* выявлено 27 пар сегментных и 16 пар тандемных дупликаций. Несмотря на численное преобладание сегментных дупликаций, доля тандемных (около 37%) у данного вида существенно выше, чем у аллотетраплоидного хлопчатника (He et al., 2016). Это может свидетельствовать о более активной роли тандемных дупликаций в дивергенции диплоидных линий *Gossypium* до их гибридизации.

В нашей работе установлено, что идентифицированные паралогичные копии гена *GhTT2* в субгеномах At и Dt сформировались еще в геномах диплоидных предков рода *Gossypium*. В обоих субгеномах они локализованы на одной хромосоме, ориентированы по прямой цепи референсного генома в направлении 5' → 3' и находятся в непосредственной близости друг друга.

Так, в хромосоме A07 расстояние между первой и второй копиями составляет 32 177 пн, между второй и третьей - 32 735 пн: *GhTT2-A1* (A07:2295951..2297207 (+), длина 1257 пн), *GhTT2-A2* (A07:2262708..2263774 (+), длина 1067 пн) *GhTT2-A3* (A07:2229772..2231039 (+), длина 1268 пн). Аналогичная организация характерна для субгенома Dt (хромосома D07): расстояния между копиями составляют 23 619 пн и 12 953 пн соответственно: *GhTT2-D1* (D07:2167857..2169086 (+), длина 1230 пн), *GhTT2-D2* (D07:2142958..2144238 (+), длина 1281 пн) *GhTT2-D3* (D07:2130005..2131304 (+), длина 1300 пн). Таким образом, идентифицированные гомеологичные копии, возникшие независимо друг от друга в субгеномах At и Dt родительских форм, вероятно, можно отнести к тандемно расположенным паралогичным копиям.

Обобщая все вышесказанное, можно заключить, что для всех рассмотренных видов покрытосеменных растений, от диплоидных до полиплоидных форм, основной эволюционной силой, действующей на дублицированные гены *R2R3-MYB*, выступает очищающий отбор. Это подтверждает критическую важность консервативности MYB-домена для специфического связывания ТФ с промоторной последовательностью ДНК, а также подчеркивает высокую консервативность семейства *R2R3-MYB* у покрытосеменных. Случаи положительного отбора ($Ka/Ks > 1$) достаточно редки и, как правило, связаны с недавними событиями дупликации, направленным отбором по хозяйственно ценным признакам или адаптацией к изменяющимся условиям внешней среды, что позволяет рассматривать их как эпизодические явления. У тетраплоидных видов (рапс, хлопчатник) подавляющее большинство дублицированных копий также остается под контролем очищающего отбора, что способствует субфункционализации или поддержанию функциональной избыточности, тогда как неофункционализация наблюдается значительно реже.

***bHLH-MYC*.** Гены семейства *bHLH-MYC*, аналогично представителям *R2R3-MYB*, представлены множественными копиями в геномах покрытосеменных растений и характеризуются высокой консервативностью доменной структуры при значительной вариабельности числа копий генов между видами. Так, количество генов *bHLH-MYC* варьирует: в геноме ореха грецкого (*Juglans regia* L.) выделено 102 гена семейства *bHLH-MYC*, у горчицы сарептской (*Brassica juncea* (L.) Czern) – 154, софоры желтеющей (*Sophora flavescens* Ait.) – 167, розы каштановой (*Rosa roxburghii* Tratt.) – 89, камфорного дерева (*Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl) – 150, элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim.) – 193, томата (*Solanum lycopersicum* L.) – 177, картофеля (*Solanum tuberosum* L.) – 134, моркови дикой – 170 и тд (Feller et al., 2011; Gong et al., 2023; Hao et al., 2021; Li et al., 2012, 2025, 2026; Liang et al., 2023; Liu et al., 2024, 2025; Niu et al., 2017; Shi et al., 2025; Wang et al., 2024, 2025; Xiao et al., 2023; Yu et al., 2025; Zhang et al., 2025; Zhao et al., 2021; Zhou et al., 2025; Zumajo-Cardona et al., 2023). Расширение семейства происходит в основном за счет сегментных дупликаций

(включая события полногеномной дупликации) и tandemных; вклад ретропозиции и транспозон-опосредованного переноса, как правило, менее значителен. Ключевым механизмом сохранения функциональной целостности полноразмерных последовательностей дублицированных копий выступает очищающий отбор с соотношением $Ka/Ks < 1$; в отдельных случаях для некоторых пар генов фиксируют признаки положительного отбора, что может указывать на неофункционализацию.

У рододендрона Симса (*Rhododendron simsii* Planch.) идентифицировано 42 гена *RsbHLH*, возникших в результате диспергированных дупликаций, и 57 генов – в ходе сегментных/полногеномных событий (Wang et al., 2025). Для 28 пар сегментно дублицированных генов (из общего числа генов, возникших в ходе полногеномной дупликации) значения $Ka/Ks < 1$, что указывает на доминирование очищающего отбора. Диапазон значений синонимичных значений Ks составляет 0,718 - 3,683, что соответствует расчетному времени дивергенции от ~58 до ~302 млн лет назад. Полученные данные свидетельствуют о том, что основные сегментные дуплкации произошли в геноме общего предка до расхождения родов *Rhododendron* и *Vaccinium* (~ 55,93 млн лет назад) (Yang et al., 2020).

У *Pueraria lobata* var. *thomsonii* DC. выделено 219 генов семейства bHLH-MYC, которые подразделяются на 13 подсемейств (Xiao et al., 2023). Анализ селективного давления для ортологичных пар между *P. thomsonii* и *A. thaliana* (153 пары), а также между *P. thomsonii* и *G. max* (584 пары) показал, что все значения $Ka/Ks < 1$, что свидетельствует о высокой консервативности данного семейства.

В геноме горчицы сарептской идентифицировано 45 ТФ bHLH-MYC, контролирующих развитие трихом (Li et al., 2025). При этом для ортологичных пар с *B. rapa* и *A. thaliana* также зафиксированы значения $Ka/Ks < 1$. Аналогичная тенденция наблюдается у шести видов женьшеня рода *Panax* (*Daucus carota*, *Eleutherococcus senticosus*, *Panax notoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax quinquefolius* и *Panax ginseng*), в геномах которых суммарно идентифицировано 1 254 гена *bHLH-MYC*, разделенных на 17 подсемейств (Yu et al., 2025). Средние значения Ka/Ks для ортологичных пар между этими видами варьирует от 0,26 до 0,58, Для ортологичных пар между *Brachypodium distachyon* и другими злаковыми культурами, включая рис, кукурузу и сорго, средние значения Ka/Ks определены как 0,41, 0,41 и 0,32 соответственно; при этом 19 генов генов возникли в результате tandemных дупликаций, а 75 – в ходе сегментных, со средним значением $Ka/Ks = 0,46$ (Niu et al., 2017).

У цедры китайской (*Toona sinensis* (A. Juss.) M. Roem.; вид листопадных деревьев семейства *Meliaceae*) в геноме идентифицировано 18 генов *TsMYC*, распределенных по шести подсемействам и возникших в ходе полногеномных и сегментных дупликаций (Zhou et al., 2025). Для всех проанализированных пар генов диапазон значений Ka/Ks составил 0,149-0,428, что

указывает на действие выраженного очищающего отбора. Гены *NcbHLH* у кувшинки окрашенной (*Nymphaea colorata*), представителя базальных покрытосеменных, отделившейся ~200 млн лет назад, также эволюционируют под контролем очищающего отбора (Liu et al., 2025). Аналогичные значения Ka/Ks для сегментных и tandemных дупликаций зафиксированы у ореха грецкого (0,138–0,679), софоры желтеющей (0,105–0,883) и томата (0,049–0,520) (Zhao et al., 2021; Liu et al., 2024; Shi et al., 2025).

Зафиксированы отдельные случаи ослабления очищающего отбора на гены семейства *bHLH-MYC*. Так, одна пара ортологичных генов *bHLH* между *E. senticosus* и *P. notoginseng*, шесть пар между *P. notoginseng* и *P. vietnamensis*, девять между *P. vietnamensis* и *P. quinquefolius* и двадцать одна между *P. quinquefolius* и *P. ginseng* характеризовались значениями $Ka/Ks > 1$ (Yu et al., 2025). Авторы предполагают, что это свидетельствует о неофункционализации, способствующей видоспецифической адаптации дивергировавших видов к изменяющимся условиям окружающей среды. Признаки положительного отбора выявлены для одной из пар сегментных дупликаций *PebHLH133-PebHLH42* у *Passiflora edulis* Sims (Liang et al., 2023). Кроме того, положительный отбор зафиксирован для восьми генов *CcbHLH*, ортологичных генам *C. camphora* и *Cinnamotum kanehirae*, что характерно при адаптивной эволюции после видообразования с последующим закреплением возникших аминокислотных замен (Gong et al., 2023).

В настоящей работе установлено, что паралогичные копии генов *bHLH-MYC* в субгеномах At и Dt диплоидных видов сформировались относительно недавно, около 3,20 млн лет назад, до образования аллотетраплоидной формы. Недавние события дупликации отражаются в низких значениях Ks (0,174–0,203), что соотносится с данными для недавно произошедших дупликаций генов *R2R3-MYB* у пекана обыкновенного ($Ks = 0,3–0,7$) (Zhu et al., 2020). Для сравнения, высокие значения $Ks = 0,718–3,683$, зафиксированные для дуплицированных генов *bHLH-MYC* у рододендрона, соответствуют расчетному времени дивергенции от ~58 до ~302 млн лет назад (Yang et al., 2020).

Полученное в данной работе среднее значение Ka/Ks для генов *bHLH-MYC* хлопчатника составляет 0,674, что указывает на менее строгий очищающий отбор по сравнению с шестью видами женьшеня рода *Panax* ($Ka/Ks = 0,26–0,58$), цедрелой китайской ($Ka/Ks = 0,149–0,428$), томата ($Ka/Ks = 0,266$), ореха грецкого ($Ka/Ks = 0,138–0,679$). Более высокое среднее отношение Ka/Ks , зафиксированное для генов *bHLH-MYC*, по сравнению с генами *R2R3-MYB*, частично обусловлено недавними событиями дупликации копий *TT8* (3,20–2,05 млн лет назад) в сравнении с *TT2* и *MYB10* (5,16–3,28 млн лет назад): в недавно образованных дуплицированных копиях накопление синонимичных замен (Ks) еще не достигло равновесия, что может искусственно завышать отношение Ka/Ks (рисунок 12).

Для большинства рассмотренных видов основным механизмом расширения семейства *bHLH-MYC* выступают сегментные дубликации, зачастую являющиеся следствием древних событий полногеномной дубликации. В отдельных случаях (например, у *Sophora flavescens*) значительный вклад вносят диспергированные и транспозон-ориентированные дубликации. Тандемные дубликации, хотя и присутствуют у большинства видов, играют второстепенную роль. Поскольку в нашей работе гомологичные гены *TT8* у всех четырех исследованных видов хлопчатника локализованы на разных хромосомах, вероятно, их образование связано с сегментными либо полногеномными дубликациями.

Для рассмотренного разнообразия видов растений от базальных покрытосеменных до окультуренных форм, прошедших длительный искусственный отбор, очищающий отбор остается доминирующим типом селективного давления на гены *bHLH-MYC*, что подчеркивает высокую функциональную консервативность ТФ этого семейства. Редкие события положительного отбора связаны с процессами адаптивной эволюции при дивергенции близкородственных видов либо с закреплением функционально значимых замен в недавно дублицированных копиях.

WD40. Полногеномные исследования последних лет выявили множественные копии регуляторных генов семейства *WD40* у широкого спектра покрытосеменных растений, включая томат, рододендрон индийский (*Rhododendron simsii* Planch.), тыкву гигантскую (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.), спартину чередующуюся (*Spartina alterniflora* Loisel.), сахарную свеклу, инжир дикий (*Ficus carica* L.), полынь однолетнюю (*Artemisia annua* L.), донник белый (*Melilotus albus* Medik.), хлопчатник, арабидопсис и другие (Reddy et al., 2008; Salih et al., 2018; Fan et al., 2022; Yan et al., 2023; Wang et al., 2023; Chen et al., 2023; Wu et al., 2023; Yang et al., 2024; Jiang et al., 2025; Zhang et al., 2025).

Например, в геноме томата идентифицировано 207 генов *SIWD40*, среди которых 6 пар тандемных и 24 пары сегментных дубликаций со значениями *Ka/Ks* в диапазоне 0,11–0,72 и 0,04–0,31 соответственно (Yan et al., 2023). Более низкие значения *Ka/Ks* для сегментных дубликаций свидетельствуют о более строгом очищающем отборе по сравнению с тандемными копиями. Аналогичная закономерность была обнаружена для спартин чередующейся: 605 событий сегментных дубликаций, затрагивающих 490 генов, характеризуются средним *Ka/Ks* = 0,27, тогда как 10 пар тандемных дубликаций (20 генов) демонстрируют среднее *Ka/Ks* = 0,39 (Yang et al., 2024). Это подтверждает общую тенденцию: тандемные дубликации эволюционируют с ослабленными селективными ограничениями, что создает предпосылки для субфункционализации. При сравнении ортологов *WD40* томата с другими паслёновыми культурами, были получены следующие средние значения *Ka/Ks*: с *A. thaliana* - 0,073, с перцем стручковым (*Capsicum annuum* L.) – 0,191, с картофелем – 0,172, табаком обыкновенным (*Nicotiana tabacum* L.) – 0,177, баклажаном (*Solanum melongena* L.) – 0,187 (Yan et al., 2023).

В геноме *C. maxima* идентифицирован 231 ген семейства *CmWD40*, включая 33 пары сегментных и 5 tandemных дупликаций. Для всех проанализированных пар значение Ka/Ks составило < 1 (Chen et al., 2023). У рододендрона Симса идентифицировано 258 генов *RsWD40*, среди которых встречаются tandemные дупликации, сегментные, полногеномные, транспозон-опосредованные и диспергированные. Подавляющее большинство дублицированных пар эволюционируют под контролем очищающего отбора; исключение составляет пара *RsWD40-246/RsWD40-254*, образованная посредством транспозон-опосредованной дупликации и демонстрирующая $Ka/Ks < 1$, что может указывать на неофункционализацию или адаптивную эволюцию (Wang et al., 2023). У тетраплоидного хлопчатника вида *G. hirsutum* выявлено 579 генов *WD40*, почти вдвое больше, чем у диплоидных предков (*G. arboreum* – 318, *G. raimondii* – 313), что отражает эффект аллополиплоидизации. Аналогично другим культурам, подавляющее большинство дублицированных копий у хлопчатника находится под действием очищающего отбора (Salih et al., 2018).

В данной работе характер селективного давления на гены семейства *WD40* оценивали по соотношению Ka/Ks , значения которого варьировали в пределах 0,095–0,117. Эти данные согласуются с результатами проведенных ранее исследований: у томата (0,13–0,43), спартина (0,27–0,39), инжира (0,08–0,71) (Fan et al., 2022; Yan et al., 2023; Yang et al., 2024). Дополнительно, средние значения $Ka/Ks < 0,191$, рассчитанные для ортологичных пар генов между томатом и *A. thaliana*, перцем стручковым, картофелем, табаком обыкновенным, баклажаном, подтверждают высокую эволюционную консервативность данного семейства (Yan et al., 2023). У большинства проанализированных видов (томат, спартина, тыква, инжир, донник, хлопчатник) основным механизмом расширения семейства *WD40* выступают сегментные дупликации. При этом гены, возникшие в результате более редких tandemных дупликаций, демонстрируют более высокие значения Ka/Ks ($\sim 0,4$) по сравнению с сегментными ($\sim 0,2$), что указывает на ослабление селективных ограничений и создает условия для субфункционализации (Yan et al., 2023; Yang et al., 2024). Таким образом, для рассматриваемых генов *WD40* в данной работе, идентифицированных в разных хромосомах и характеризующимися значениями $Ka/Ks < 0,117$, наиболее вероятным механизмом образования является сегментная или полногеномная дупликация.

Низкие значения соотношения Ka/Ks , полученные для ТФ семейства *WD40*, отражают его структурную роль в составе MBW-комплекса. Белки с *WD40*-доменами формируют консервативную структуру β -пропеллера, которая служит “подложкой” для взаимодействия с остальными компонентами MBW-комплекса (Humphries et al., 2005; Xu et al., 2015; Mishra et al., 2012). Нарушение этой структуры критично для стабильности комплекса, что объясняет преобладание очищающего отбора. Несмотря на сильное давление очищающего отбора, гены

семейства *WD40* вовлечены в разнообразные процессы: ответ на солевой стресс (донник, спартина, свекла столовая), развития плодов (тыква, инжир, томат), развитие волокна хлопчатника и трихом арабидопсиса, а также регуляцию биосинтеза флавоноидных пигментов. Функциональная консервативность кодирующей последовательности у этих генов сочетается с тканеспецифичной экспрессией: высокогомологичные копии *WD40* могут демонстрировать различные паттерны экспрессии, что представляет собой форму субфункционализации на регуляторном уровне. Такой механизм позволяет сохранять структурную целостность белка при одновременной адаптации к изменениям условий среды.

Несмотря на консервативность рассмотренных регуляторных генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*, недавно было продемонстрировано, что регуляторные гены биосинтеза флавоноидных соединений эволюционируют с большей скоростью, чем структурные гены-мишени. Интересно отметить, что гены поздних этапов, кодирующие ферменты, являющиеся прямыми прекурсорами антоцианов и флавонолов (*ANS*, *UFGT*), демонстрируют более высокую степень вариабельности и характеризуются повышенными значениями соотношения *Ka/Ks*, нежели гены ранних этапов (*CHS*, *F3'H*, *F3H*) (Wheeler et al., 2022). Согласно полученным нами данным, гены, относящиеся к семейству *WD40*, в большей степени поддерживаются стабилизирующим отбором, чем соответствующие гены семейств *bHLH-MYC* и *R2R3-MYB*. Эта закономерность согласуется с литературными данными, полученными для широкого спектра покрытосеменных растений: от базальных (кувшинки) и модельных видов (*A. thaliana*) до злаков (*B. distachyon*), плодовых (яблоня, груша, малина, грецкий орех инжир и другие), лекарственных (женьшень, софора) до декоративных и древесных (роза, камфорное дерево).

Таким образом, учитывая высокую структурную консервативность и доминирующий очищающий отбор, действующий на гены *WD40*, их полиморфизм вносит минимальный вклад в разнообразие. В связи с этим для поиска аллельных различий, связанных с отличиями по окраске волокна, наиболее перспективным представляется дальнейший анализ генов семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC*, обладающих наибольшей эволюционной пластичностью.

4.3. Анализ аллельных различий регуляторных генов из семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC*

При анализе секвенограмм в качестве референса использовали последовательности беловолокнистого хлопчатника из базы данных CottonFGD (<https://cottonfgd.org/>). Кроме образцов с контрастной окраской волокна, рассматривали образцы с различной окраской гипокотыля для оценки функциональной специализации дуплицированных копий, исключаемых из списка кандидатов по признаку окраски волокна. Секвенирована промоторная (в промежутке от -1000 до +1 пн от старт-кодона) и кодирующая последовательность восьми генов семейства *R2R3-MYB*, а также промоторная область четырёх генов семейства *bHLH-MYC*.

R2R3-MYB. В ходе анализа секвенограмм выявлена несинонимичная замена С → А в позиции 1070 пн в конце третьего экзона гена *GhTT2-A1* у образцов с тёмно-бурой окраской волокна (к-8147 и к-7544) и у образца со светло-бурой окраской (к-4305) (Mikhailova et al., 2024). Данная замена не затрагивает консервативный R3-мотив MYB-домена и приводит к аминокислотной замене пролина на треонин в аминокислотной последовательности белка. Ранее в последовательности гена *OsC1*, кодирующего ТФ семейства R2R3-MYB, у риса посевного *Oryza sativa* L. в области третьего экзона обнаружен однонуклеотидный полиморфизм С → А в положении 918 пн, приводящий к замене пролина на глутамин в белковом продукте (Saitoh et al., 2004). Ген *OsC1* является ортологом гена *C1* (семейство R2R3-MYB) кукурузы *Zea mays* L. и участвует в активации транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов (Martin, Paz-Ares, 1997). Данный аллельный вариант гена *OsC1* сохранял функциональность и ассоциировался с антоциановой пигментацией верхушки цветочной чешуи в месте сужения у риса. Учитывая высокую степень гомологии генов *MBW* (см. раздел 4.2), можно предположить, что выявленная миссенс-мутация в последовательности третьего экзона *GhTT2-A1* у природноокрашенных образцов хлопчатника не оказывает существенного влияния на регуляторную активность кодируемого белка.

В кодирующей последовательности гена *GhTT2-A2* обнаружен ряд несинонимичных замен: А → С в позиции 860 пн и А → Т в позиции 1053 пн, приводящих к аминокислотным заменам Лиз210Асн и Асн275Тир у образцов к-8147, к-7544, к-4305, к-3488 и к-8020. В последовательности первого экзона *GhTT2-A2* обнаружены делеции в положениях 50 и 53 пн, суммарно затрагивающие три нуклеотида (АА и G), что приводит к элиминации глутаминовой кислоты в положении 10 а.о. (аминокислотных остатков) в белке, однако это не вызывает сдвиг рамки считывания при трансляции. Уникальный однонуклеотидный полиморфизм С → G в положении 922 пн от сайта начала транскрипции у образцов к-8147, к-7544 и к-4305 вызывает замену кодона GCA на GGA и, соответственно, аланина на глицин в белковом продукте. Замена Т → С в положении 542 пн последовательности третьего экзона *GhTT2-A2*, кодирующего домен R3, является синонимичной.

В промоторной области гена *GhTT2-A3* (от -746 до -81 пн относительно старт-кодона) выявлен ряд однонуклеотидных замен, а также инделей длиной до 8 пн. Паттерн полиморфизма промоторной последовательности оказался идентичным у большинства образцов, за исключением светло-бурого к-3488 и двух с белой окраской волокна, к-8020 и к-8129, у которых в позиции -162 пн обнаружена вставка цитозина (рисунок 17). Кроме того, у образца к-8129 (белое волокно, окрашенный гипокотиль) отсутствовали делеции длиной 33 и 8 пн, локализованные в позициях -726 и -88 пн соответственно. В кодирующей и 3'-нетранслируемой

областях паттерн полиморфизма у всех образцов соответствовал референсной последовательности, за исключением синонимичной замены T → C в положении 542 пн третьего экзона (участок, кодирующий R3-домен). Однако в том же экзоне присутствует делеция длиной 127 пн, приводящая к сдвигу рамки считывания и формированию преждевременного стоп-кодона TGA. В результате происходит укорочение белкового продукта с 294 до 157 а.о.. Стоит отметить, что и аллельный вариант референса *GhTT2-A3* также имеет преждевременный стоп-кодон (TAG), что указывает на вероятную псевдогенизацию данной копии. Образование преждевременных терминирующих кодонов и значительное усечение/увеличение длины полипептидной цепи, как правило, сопровождается частичной или полной утратой функциональной активности белка (Léon-Kloosterziel et al., 1996; Nesi et al., 2000; Baudry et al., 2006). Таким образом, выявленная делеция в третьем экзоне, по-видимому, свидетельствует о функциональной инактивации или значительном снижении транскрипционной активности паралогичной копии гена *GhTT2-A3*. Поскольку данный аллельный вариант, наряду со сходным паттерном промоторной и кодирующей последовательностей, зафиксирован у всех исследуемых образцов независимо от фенотипа, он не связан с вариабельностью окраски волокна в изучаемой выборке.

Как было показано ранее в классической работе С. Стивенса, все изученные дикие виды хлопчатника рода *Gossypium* (включая представителей геномных групп A-G), характеризуются наличием пигментированного волокна: бурой окраской люмена (внутренняя полость волокна) и/или зеленым оттенком клеточной стенки (Stephens et al., 1977). Современные исследования подтверждают консервативность метаболических путей биосинтеза ПА у диких таксонов (Sun et al., 2022). Это свидетельствует о том, что окрашенное волокно является предковым признаком для рода *Gossypium*, тогда как беловолокнистые формы закрепились в ходе доместикации под действием направленного искусственного отбора. Как было описано выше (см раздел 4.2), дупликация изучаемых регуляторных генов *GhTT2* и *GhTT8* в субгеномах At и Dt произошла до образования аллотетраплоидной формы. Обнаруженный усеченный аллельный вариант третьей паралогичной копии гена *GhTT2-A3*, содержащий преждевременный стоп-кодон, с высокой долей вероятности представляет пример псевдогенизации – процесса, типичного в случае избыточного количества копий генов и ведущего к утрате функций вследствие накопления инактивирующих мутаций (Lynch, Conery, 2000). Средний период формирования псевдогенов из числа дублированных генов для растений составляет порядка 3–7 млн лет (Lynch, Conery, 2000). В связи с этим псевдогенизация *GhTT2-A3*, вероятно, произошла у диплоидного донора A-генома еще до аллополиплоидизации.

В последовательности *GhTT2-D1* не найдено значимых однонуклеотидных полиморфизмов, за исключением ряда вставок в конце третьего экзона: A (966 пн), G (980 пн), C

(1027 пн), A (1028 пн) и A (1029 пн), для которых также не обнаружено взаимосвязи с окраской волокна и гипокотилия (рисунок 18).

Выявленный нуклеотидный полиморфизм в последовательности гена *GhTT2-D2* не затрагивал кодирующие регионы; в последовательностях *GhTT2-D3* и *GhMYB10-D* отличий от референсной последовательности среди всех рассматриваемых образцов не найдено. По результатам секвенирования аллелей идентифицированных регуляторных генов у образцов хлопчатника, контрастных по признаку окраски волокна и гипокотилия, копии гена *GhTT2* в субгеномах At и Dt, а также *GhMYB10-D*, вероятно, не связаны с изменчивостью по окраске волокна. В результате секвенирования паралогичных копий гена *GhTT2* в A- и D-геномах не обнаружена взаимосвязь окраски волокна с выявленным полиморфизмом (рисунки 15–19).

Проанализируем подробнее характер обнаруженного полиморфизма для гомеологичных генов *R2R3-MYB* в субгеномах At и Dt с эволюционной точки зрения.

Выявленный полиморфизм в последовательности гена *GhTT2-A1*, для которого подтверждено участие в биосинтезе ПА, в основном затрагивает промоторные последовательности генов, реже – интроны и кодирующие области. Это согласуется с общепринятой гипотезой о повышенной вариабельности регуляторных регионов, содержащих сайты связывания ТФ (Doebley, Lukens, 1998; Mitsis et al., 2020; Wheeler et al., 2022).

Обнаруженный полиморфизм в последовательности регуляторных генов семейства *R2R3-MYB* демонстрирует асимметрию между субгеномами: гомеологи субгенома At характеризуются большим числом замен в нуклеотидной последовательности (как в промоторной, так и в экзон-интронных регионах) по сравнению с референсной последовательностью, чем гомеологи субгенома Dt. Данная закономерность, вероятно, отражает разное селективное давление отбора на субгеномы в процессе направленной селекции по определенным хозяйственно ценным признакам. Поскольку A-геном, унаследованный от афро-азиатских видов (близких к *G. arboreum* и *G. herbaceum*), детерминирует развитие волокна и урожайность, в ходе доместикации именно он подвергался интенсивному направленному отбору, в том числе по признакам, связанным с качеством волокна и его пигментацией. В свою очередь, субгеном Dt, происходящий от американских видов (близких к *G. raimondii*), в большей степени ассоциирован с адаптивными признаками (устойчивость к засухе, вредителям и другим абиотическим стрессовым факторам) и в меньшей был подвергнут отбору по признакам волокна, сохранив более консервативный эволюционный паттерн с меньшим количеством фиксированных замен (Shim et al., 2018). Поскольку в качестве референса использовали сборку генома культивируемого беловолокнистого сорта ТМ-1 (Texas Marker-1), гомеологи субгенома At продемонстрировали большую дивергенцию относительно референсных последовательностей, тогда как гомеологи субгенома Dt оказались более консервативными (Михайлова и др., 2026). Аналогичное влияние

направленного отбора на скорость накопления замен в последовательности регуляторных генов семейства *R2R3-MYB* наблюдали ранее у малины черной (Liu et al., 2019). Кроме того, для генов семейства *R2R3-MYB* у хлопчатника характерна асимметричная эволюция, при которой субгеном *At* эволюционирует быстрее и подвергается менее строгому очищающему отбору по сравнению с субгеномом *Dt* (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2019).

На текущий момент большинство идентифицированных регуляторных генов-кандидатов, связанных с вариабельностью по признаку окраски волокна, локализованы в субгеноме *At G. hirsutum*. Так, локус *Lc1* был картирован на хромосоме A07, *Lc2* — на A06 (Wang et al., 2014). В пределах локуса *Lc1* идентифицирован ген *GhTT2-A1* (Hinchliffe et al., 2016). С помощью QTL-анализа также выявлен локус *qBF-A07-2*, содержащий ген семейства *WD40 Gh_A07G0100 (TTG1)* и вовлеченный в биосинтез ПА (Wen et al., 2018). Такая локализация может отражать как исторически более высокую пластичность регуляторных регионов субгенома *At*, так и асимметричное селективное давление в ходе доместикиции. Тем не менее, вклад гомеологов субгенома *Dt* нельзя исключать: некоторые из них могут сохранять транскрипционную активность в других тканях или участвовать в компенсаторной регуляции при инактивации копий в субгеноме *At*.

Тканеспецифичная экспрессия гомеологов структурных генов также демонстрирует асимметрию между субгеномами. Например, согласно исследованию Flagel (Flagel et al., 2008), у аллополиплоидных видов хлопчатника рода *Gossypium* около 24 % генов с асимметричной экспрессией гомеологов (неравным вкладом двух гомеологичных копий в общий транскриптом) приобрели этот паттерн непосредственно в момент гибридизации диплоидных видов, тогда как остальные 76 % различий сформировались в ходе более долгосрочного периода эволюции после события полиплоидизации посредством неофункционализации, субфункционализации или псевдогенизации (Flagel et al., 2008). При этом именно событие аллополиплоидизации способствовало ускорению дивергенции паттернов экспрессии гомеологичных копий. Важно отметить, что эти данные получены на уровне всего транскриптома; для структурных и регуляторных генов флавоноидного пути биосинтеза распределение транскрипционной активности между гомеологами может различаться, что подтверждают исследования по тканеспецифичной экспрессии (Strygina et al., 2017; Strygina et al., 2019; Adams et al., 2003; Wang et al., 2023; Zheng et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Другой пример связан с тканеспецифичной специализацией гомеологов структурного гена *GhDFR*. У аллотетраплоидного хлопчатника вида *G. hirsutum* идентифицированы четыре копии данного гена: *GhDFR1* (хромосома A05), *GhDFR2* (D05), *GhDFR3* (A06), *GhDFR4* (D06). При этом гомеолог *GhDFR1* экспрессируется преимущественно в волокне, тогда как *GhDFR3* - в лепестках (Zheng et al., 2023). Это указывает на то, что дублицированные копии даже в рамках

одного субгенома могут приобретать субфункционализацию, проявляя транскрипционную активность в разных типах тканей.

Органоспецифичный характер смещения относительного уровня экспрессии гомеологов характерен и для многих других генов хлопчатника. Например, ген *adhA* (*alcohol dehydrogenase* (ADH)) в субгеноме Dt *G. hirsutum* экспрессировался исключительно в лепестках и тычинках (100 % транскриптов), тогда как в пестиках максимальное число транскриптов было зарегистрировано для гомеолога в субгеноме At. Содержание мРНК гена *adhD* (*alcohol dehydrogenase D*) превышала 80 % в листьях, корнях, стебле, лепестках и плодолистиках, тогда как в тычинках преобладали транскрипты субгенома At. Данный паттерн является классическим примером реципрокного органоспецифичного сайленсинга (подавление экспрессии), лежащего в основе субфункционализации гомеологичных генов после гибридизации диплоидных предков (Adams et al., 2003).

Интересно отметить, что в синтетическом аллополиплоиде наблюдаются схожие паттерны экспрессии (в том числе реципрокный сайленсинг *adhA*). Это указывает на то, что изменения в экспрессии гомеологов возникают практически сразу после аллополиплоидизации, без необходимости длительной эволюционной дивергенции. Поскольку подобные перестройки происходят на ранних этапах, они, вероятно, реализуются за счет эпигенетических механизмов (ДНК-метилирование, модификации гистонов, ремоделирование хроматина), а не являются следствием накопления мутаций в нуклеотидных последовательностях. Такая “быстрая субфункционализация” позволяет сохранить обе копии дублированных генов и способствует повышению адаптационного потенциала полиплоидных видов.

На модели синтетического аллополиплоида, полученного гибридизацией *A. thaliana* ($2n = 10$) и *Arabidopsis arenosa* L. ($2n = 32$), зафиксирован сайленсинг нескольких локусов родительских субгеномов. Так, подавлению экспрессии подверглись гены *K7* (характеризуется высокой копийностью у *A. arenosa* и низкой у *A. thaliana*) и *L6* (неаннотированный ген, локализован вблизи гена *ALCOHOL DEHYDROGENASE* на хромосоме 1; метилирован у *A. arenosa* и гипометилирован у *A. thaliana*), происходящие из субгенома *A. arenosa*. Одновременно подавлена экспрессия гена *K9* (*RAP2.1*, семейство *APETALA2*), унаследованный от *A. thaliana*, в регуляторной области которого выявлен повторяющийся элемент. Сайленсинг *K9* зафиксирован в аллотетраплоиде именно для аллеля *A. thaliana*, несмотря на его стабильную транскрипцию в родительском геноме *A. thaliana* (Comai et al., 2000). Эти данные демонстрируют, что подавление экспрессии в аллополиплоиде новит двунаправленный характер: в разных локусах подавляются гены как материнского, так и отцовского субгеномов, что исключает одностороннее доминирование одного из родительских геномов. В целом, исследования новообразованных геномов аллополиплоидов *Gossypium* и других синтетических модельных объектов

демонстрируют их высокую пластичность и динамичность. Они представляют собой не просто удвоенные диплоиды, а уникальные образованные организмы с высоким эволюционным и адаптивным потенциалом (Wendel 2000; Liu, Wendel, 2002).

bHLH-MYC. Не найдено взаимосвязи окраски волокна и гипокотилия с выявленным полиморфизмом в последовательности промоторных областей генов *TT8*: *GhTT8-A2*, *GhTT8-D1*, *GhTT8-D2* (рисунок 19). Для первой копии гена *GhTT8-A1* в субгеноме *At* отличий от референсной последовательности (база данных CottonFGD) у всех проанализируемых генотипов не выявлено.

Однако у образцов со светло-бурой окраской волокна (к-4305, к-3488 и к-8129) в промоторной области гена *GhMYB10-A* обнаружена вставка длиной 46 пн, а также две несинонимичные замены ($A \rightarrow C$ и $T \rightarrow C$) в первом экзоне кодирующем консервативный функциональный R2-мотив MYB-домена. Эти данные позволяют рассматривать *GhMYB10-A* в качестве наиболее перспективный ген-кандидат, который контролирует изменение окраски в изучаемой выборке.

Анализ нуклеотидной последовательности 46 пн вставки в промоторе *GhMYB10-A* у образцов к-4305, к-3488 и к-8129 с использованием базы данных PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) выявил наличие светочувствительных *цис*-регуляторных элементов, потенциально участвующих в активации транскрипции регуляторных генов семейства *R2R3-MYB* (рисунок 11; Приложение 20).

Выявленные в кодирующей последовательности гена *GhMYB10-A* несинонимичными замены приводят к миссенс-мутациям: Лиз26Тре и Тре37Арг в аминокислотной последовательности белка. Рассмотрим далее подробнее потенциальное влияние данных замен на структуру кодируемого ТФ и его способность к связыванию с целевой последовательностью ДНК.

4.4. *In silico* анализ влияния миссенс-мутаций в кодирующей последовательности гена *GhMYB10-A*

Как было описано выше, в последовательности первого экзона гена *GhMYB10-A*, кодирующей функциональный консервативный R2-мотив ДНК-связывающего домена, обнаружены несинонимичные замены $A \rightarrow C$ и $T \rightarrow C$. Данные замены приводят к миссенс-мутациям и, соответственно, к замене аминокислотных остатков Лиз26Тре и Тре37Арг в белковом продукте (рисунок 18; Приложения 21, 22).

Поскольку однонуклеотидный полиморфизм в последовательности регуляторных генов, в частности, в областях, кодирующих консервативный функциональный домен, нередко ассоциируется с частичной или полной утратой функции кодируемого белкового продукта,

рассмотрим далее подробнее потенциальное влияние выявленных замен на свойства белка GhMYB10-A (Saikumar, Murali, Reddy, 1990; Appelhagen et al., 2011).

В ДНК-связывающемся MYB-домене триптофановые остатки, расположенные на расстоянии 18–19 аминокислотных остатков друг от друга, формируют гидрофобный каркас, стабилизирующий структурный элемент «спираль-петля-спираль», и характеризуются высокой эволюционной консервативностью (Приложение 8) (Kanei-Ishii et al., 1990). Ранее экспериментально определено, что замена остатков триптофана на неполярные аминокислоты (лейцин и аланин) не нарушает ДНК-связывающую активность белка, тогда как замена на полярный положительно заряженный аргинин приводит к утрате этой способности. Это дополнительно подтверждает критическую роль гидрофобных взаимодействий в поддержании структурной целостности домена и функциональности содержащего его ТФ (Saikumar, Murali, Reddy, 1990).

Важно отметить, что замена Лиз26Тре локализована в первой α -спирали (спираль 1) домена R2, Трп37Арг – во второй (спираль 2). Две первые α -спирали в R2 и R3 доменах выполняют преимущественно структурную функцию: первая α -спираль стабилизирует гидрофобное (триптофановое) ядро; вторая α -спираль вместе с первой формирует каркас, обеспечивающий оптимальный угол наклона для правильного позиционирования третьей α -спирали относительно большой бороздки ДНК. Третья α -спираль выполняет ключевую роль в обеспечении специфичности связывания, поскольку размещается непосредственно в большой бороздке ДНК; аминокислотные радикалы посредством водородных и Ван-дер-Ваальсовых связей взаимодействуют с азотистыми основаниями ДНК (Saikumar et al., 1990). Несмотря на то, что в каждом из доменов R2 и R3 есть третья α -спираль, для прочного и специфичного связывания ТФ семейства R2R3-MYB необходимо одновременное взаимодействие третьих α -спиралей обоих доменов с ДНК: они «обхватывают» двойную спираль ДНК с противоположных сторон. Кроме того, вследствие замены одного из высококонсервативных остатков триптофана, нарушается гидрофобный каркас, способствующий поддержке структурного элемента «спираль-петля-спираль» (Kanei-Ishii et al., 1990; Saikumar et al., 1990). Таким образом, выявленные замены Лиз26Тре и Трп37Арг, вероятно, дестабилизируют конформацию домена R2, что снижает способность ТФ специфично связываться с целевыми промоторными областями генов-мишеней.

Для проверки данной гипотезы использовали несколько подходов.

В первую очередь оценили функциональную значимость аминокислотных замен с помощью сервера для предсказания третичной структуры и эффекта мутаций Phyre2. В качестве референса рассматривали исходную форму белка GhMYB10-A (Лиз26, Трп37), сравниваемая альтернативная содержала замены Лиз26Тре Трп37Арг.

В положении 26 замена полярного положительно заряженного остатка лизина на полярный незаряженный треонин интерпретируется как функционально нейтральная согласно гистограммам консервативности (*Sequence profile*) и эффекта мутаций (*Mutations*) (рисунок 22). Аналогично, гипотетические замены остатка лизина на положительно заряженный аргинин (R) или на неполярные метионин (M) и валин (V) также классифицируются как нейтральные.

В положении 37, согласно гистограмме *Sequence profile* (на рисунках 21, 23), высококонсервативным является именно остаток триптофана (W), что отражено высоким столбцом тёмно-красного цвета, тогда как остальные аминокислотные остатки менее консервативны (отображены короткими синими столбцами). На гистограмме *Mutations* все перечисленные аминокислотные остатки, включая аргинин, но за исключением триптофана (короткий столбец тёмно-синего оттенка), отображены высокими столбцами красно-оранжевого цвета, что указывает на высокую вероятность нарушения функции белка (рисунок 21).

При моделировании альтернативной формы белка с заменой Трп37Арг анализ консервативности аминокислотного остатка подтверждает, что позиция 37 остается строго консервативной по триптофану, где он отображается высоким красным столбцом (рисунок 23, гистограмма *Sequence profile*); то же подтверждает и гистограмма *Mutations* (рисунки 21, 23).

Таким образом, *in silico* анализ указывает на то, что остаток триптофана в положении 37 является наиболее предпочтительным – его замена на любой другой аминокислотный остаток с высокой долей вероятности приведет к снижению или утрате функциональной активности белка GhMYB10-A. В то же время замена Лиз26Тре, вероятно, является функционально нейтральной, однако может нарушать пространственную укладку первой α -спирали в R2-домене (рисунки 20, 22).

С использованием сервера Missense3D было показано, что замена триптофана на аргинин в домene MYB не приводит к изменениям в предсказанной третичной структуре белка – для исходной и альтернативной форм структуры идентичны (рисунок 24). Однако, согласно анализу с помощью 3DLigandSite, потенциальные сайты связывания с последовательностью ДНК для обеих форм различаются (рисунок 25).

Дополнительно методом молекулярного моделирования проанализировали особенности взаимодействия исходной и альтернативной форм белка GhMYB10-A с целевой ДНК-последовательностью. Результаты молекулярного докинга визуализировали в PyMOL (рисунок 26).

Таким образом, результаты молекулярного моделирования, направленного на поиск наиболее энергетически оптимальных конформаций при образовании комплекса белок-ДНК, согласуются с результатами предсказания сайтов связывания инструментом 3DLigandSite: в обоих случаях потенциальные сайты связывания белков с последовательностью ДНК у

рассматриваемых форм белка различаются. Это свидетельствует о том, что замены Лиз26Тре и Трп37Арг могут снижать сродство ТФ к промоторным элементам целевых генов.

Из литературы известно несколько примеров, когда однонуклеотидные замены в консервативной кодирующей последовательности регуляторных и структурных генов были связаны с фенотипическими проявлениями или приводили к утрате функции белка.

Так, *tt2*-мутанты *A. thaliana* (ген *AtTT2*, семейство *R2R3-MYB*; ортолог *GhTT2-A1* хлопчатника) характеризуются желтой окраской семенной кожуры вследствие полной утраты способности активировать экспрессию структурных генов *DFR*, *LDOX* (*ANS*), *BAN* и *TT12* поздних этапов биосинтеза проантоцианидинов (Nesi et al., 2001). Фенотип *tt2* проявляли мутанты, несущие аллель *tt2-1* с делецией и хромосомными перестройками (Koornneef, 1981, 1990). В аллели *tt2-2* мутагенез посредством гамма-излучения индуцировал трансверсию А→Т в положении 525 пн от старт-кодона АТГ в области третьего экзона; данная замена находилась за пределами участка, кодирующего R3-домен, однако привела к нонсенс-мутации вследствие появления преждевременного стоп-кодона (Léon-Kloosterziel et al., 1996). Аллель *tt2-3* была ассоциирована с делецией длиной 45 пн, затрагивающей второй интрон и начало третьего экзона, кодирующего R3-домен (Nesi et al., 2001). Транзиция G→А в положении 269 пн от старт-кодона в аллеле *tt2-4* локализована в области последовательности, кодирующей консервативный функциональный домен R2; данная замена вызвала миссенс-мутацию, приводящую к замене аминокислотного остатка глицина на аргинин в позиции 66 кодируемого белкового продукта (Nesi et al., 2001).

Различные аллельные варианты гена *OsC1* (*R2R3-MYB*) также ассоциированы с различным проявлением окраски цветочной чешуи у риса. Так, точечная мутация С → G в положении 122 пн (замена пролина на аргинин в домене R2) вызывала частичную утрату функции кодируемого белка, что проявлялось к уменьшению интенсивности окраски верхушки цветочной чешуи в месте сужения у риса. Замена серина на фенилаланин в домене R3 влияния на пигментацию не оказывала (Saitoh et al., 2004). Напротив, делеции длиной 2 пн и 10 пн в последовательности, кодирующей R3-домен, приводили к сдвигу рамки считывания и полной утрате пигментации.

Известны примеры взаимосвязи полиморфизма нуклеотидной последовательности регуляторных генов с изменениями на уровне фенотипа и для генов семейства *bHLH-MYC*. Вследствие точечной мутации G → А нарушается сплайсинг последнего интрона, что приводит к транскрипции удлинённой мРНК и увеличению длины белкового продукта на 28 аминокислотных остатков и сопровождается полной утратой функциональной активности (Nesi et al., 2000; Baudry et al., 2006).

Вставка одного нуклеотида в гене *HvMYC2* (семейство *bHLH-MYC*), кодирующим компонент MBW-комплекса и экспрессирующийся исключительно в клетках алейронового слоя ячменя, приводит к сдвигу рамки считывания и потере функции этого белка. Фенотипически это проявляется отсутствием окраски алейронового слоя (Strygina, Börner, Khlestkina, 2017).

Точечная мутация в конце шестого экзона гена *TT8* у *A.thaliana* связана со снижением пигментации стручков (лат. *silicula*): наблюдается уменьшение транскриптов гена *DFR* и изменение экспрессии *C4H*, что в совокупности обуславливает пониженное накопление ПА и антоцианов (Nesi et al., 2000).

Точечные мутации в кодирующих последовательностях структурных генов биосинтеза флавоноидов также связаны с фенотипическими изменениями. Так, миссенс-мутация в последовательности гена *ANS* у лука репчатого (*Allium cepa* L.) обуславливает изменение окраски чушуй луковиц с красной на желтую (Kim et. al., 2005). Данная замена (Гли229Арг) затрагивает аминокислотный остаток, расположенный вблизи высококонсервативного каталитического центра, координирующего ион железа (II) (Fe^{2+}). Более стерически объёмный положительно заряженный аргинин в данной позиции нарушает пространственную укладку белка в области связывания иона металла, что препятствует правильной координации иона железа остатками Гис232, Асп234 и Гис288. В результате фермент теряет каталитическую активность у образцов с желтой окраской чешуи луковицы лука репчатого.

У *A. thaliana* в гене *LDOX* (GenBank: AT4G22880), кодирующим фермент лейкоантоцианидиндиоксигеназа (*ANS*), в мутантной линии *tt17* выявили точечную мутацию, приводящую к замене консервативного остатка цистеина на тирозин вблизи активного центра фермента. В отличие от семян дикого типа, семена мутантной линии *tt17* характеризовались более светлой окраской за счет уменьшения содержания ПА во внутреннем слое семенной кожуры (Appelhaugen et al., 2011). Важно отметить, что транскрипция гена *LDOX* регулируется за счет связывания регуляторного комплекса MBW, включающего факторы bHLH (EGL3 и TT8), с его промоторной областью (Gonzalez et al., 2008; Appelhaugen et al., 2011).

Таким образом, две выявленные миссенс-мутации в первом экзоне гена *GhMYB10-A*, приводящие к замене аминокислот (Лиз26Тре и Трп37Арг) в белковом продукте, вероятно, нарушают гидрофобный каркас R2-домена у альтернативной формы GhMYB10-A. Это может дестабилизировать структурный мотив «спираль-петля-спираль» и, как следствие, приводить к потенциальному снижению ДНК-связывающей активности этого ТФ у образцов со светло-бурой окраской волокна.

4.4.1. Связь гена *GhMYB10-A* с изменчивостью по окраске волокна у природноокрашенного хлопчатника

Ранее связь гена *GhMYB10-A* с изменчивостью по окраске волокна описывали в статье (Lu et al., 2017), где *GhMYB36* идентифицирован как *GhTT2-A1* (CottonGene: Gohir.A07G020200; ортолог гена *AtTT2 A. thaliana*), а *GhMYB10* — *GhMYB10-A* (Ghir_A06G007950) (Nesi et al., 2001). Именно совместное влияние этих двух ТФ способствовало накоплению ПА при гетерологичной экспрессии в тканях корневых волосков люцерны (*Medicago truncatula*) и их окрашиванию (Lu et al., 2017). При этом обнаружен аддитивный эффект при совместном участии белков, кодируемых *GhTT2-A1* и *GhMYB10-A*, в комплексе с белковыми продуктами генов *MtTT8 (bHLH-MYC)* и *MtWD40 (WD40)* люцерны в процесс активации транскрипции структурных генов *ANR* и *LAR* (кодируют ферменты, катализирующие ключевые реакции биосинтеза ПА). Такой регуляторный комплекс активировал транскрипцию структурных генов *GhANR* и *GhLAR* (предшественников биосинтеза ПА) на 30% эффективнее, чем при отсутствии одного из MYB-компонентов (Lu et al., 2017).

Как упомянуто выше, в формирование признака бурой окраски волокна хлопчатника вносят вклад 6 локусов *Lc1-Lc6*, а проявление признака контролируется двумя парами комплементарных генов в локусах *Lc1* и *Lc2* (Endrizzi, Kohel, 1966; Kohel, 1985). Локус *Lc1* (*GhTT2-3A*, *GhTT2-A1*) кодирует ТФ семейства R2R3-MYB, регулирующие биосинтез ПА, и локализован в теломерной области хромосомы A07 (Hinchliffe et al., 2016; Wen et al., 2018; Yan et al., 2018); локус *Lc2* картирован на хромосоме A06 (Wang et al., 2014). В локусе *Lc1* найден ген *GhTT2-A1* (Hinchliffe et al., 2016).

Гены, располагающиеся в локусах *Lc2-Lc6* пока не описаны (либо не аннотированы в соответствии с такой номенклатурой), однако, согласно результатам *in silico* анализа, среди всех идентифицированных генов, продукты которых потенциально вовлечены в формирование признака окраски волокна, в хромосоме A06 найден только ген *GhMYB10-A* (Приложение 3). Связь этого гена с накоплением ПА у арабидопсиса и люцерны продемонстрирована ранее (Nesi et al., 2001; Lu et al., 2017). Образцы со светло-бурой окраской волокна несут миссенс-мутации в этом гене, приводящие к заменам Лиз26Тре и Трп37Арг, в то время как буроволокнистые и белые формы полиморфизмом не отличаются.

Принимая во внимание результаты анализа влияния миссенс-мутаций на функции белка *GhMYB10-A*, у образцов со светло-бурой окраской волокна наблюдается изменение сайтов связывания с целевой последовательностью ДНК, в связи с этим, вероятно, не обеспечивается эффективная регуляция транскрипции структурных генов (раздел 4.4).

Анализируя всё вышесказанное, у светло-бурых форм, вероятно, нарушена функция ТФ *GhMYB10-A* в связи с двумя обнаруженными заменами аминокислотных остатков Лиз26Тре и

Трп37Арг в первой и второй α -спирали соответственно. Согласно опубликованному ранее предположению о комплементарном вкладе двух генов в локусах *Lc1* и *Lc2* в формирование признака бурой окраски волокна (Kohel, 1985; Hinchliffe et al., 2016), светло-бурый фенотип может быть обусловлен вкладом одного из локусов, *Lc1* (хромосома A07), тогда как вероятный ген-кандидат *GhMYB10-A* в локусе *Lc2* (хромосома A06) вследствие двух выявленных миссенс-мутаций кодирует не функциональную форму ТФ с нарушенной третичной организацией. Поскольку участие *GhMYB10-A* в составе регуляторного комплекса MBW в биосинтезе ПА подтверждено экспериментально в ряде исследований, мы оценили относительный уровень экспрессии этого гена.

4.5. Экспрессия структурных и регуляторных генов биосинтеза проантоцианидинов в буром волокне хлопчатника

Ранние работы по изучению функции гена антоцианидинредуктазы (*GhANR*) выявили его участие как прекурсора в биосинтезе ПА - пигментов, окрашивающих стебли, корни и листья, а также накапливающихся в развивающемся волокне хлопчатника (Zhu et al., 2015). В ходе последовательного действия ферментов антоцианидинсинтазы (*GhANS*) и антоцианидинредуктазы 2R,3S,4S-лейкоцианидин восстанавливается до 2R,3R-*цис*-флаван-3-олов, в частности до (-)-эпикатехина — одного из мономерных звеньев олигомеров ПА (Saito et al., 1999; Xie et al., 2003). Лейкоантоцианидин редуктаза (*GhLAR*) катализирует восстановление 2R,3S,4S-лейкоцианидина до 2R,3S-*транс*-флаван-3-олов, включая (+)-катехин — второй основной мономер ПА (Liu et al., 2016; Tanner, Kristiansen, 1993). Повышенный уровень экспрессии *GhANR* отмечен на 35 ДПО у генотипа со светло-бурой окраской волокна и на 37 ДПО у тёмно-бурого (рисунок 30).

Помимо поздних генов *GhANR* и *GhLAR*, в биосинтезе антоцианов и ПА участвуют ранние структурные гены: *GhCHS*, *GhC4H*, *GhF3H*, *GhF3'H*, *GhF3'5'H* и *GhDFR* (Feng et al., 2013; Gao et al., 2019; Zheng et al., 2023). Ген *GhDFR* играет ключевую роль в биосинтезе антоцианов, флавонов и ряда других флавоноидов фенилпропаноидного пути, катализируя превращение дигидрофлавонолов до лейкоантоцианидинов (Katsu et al., 2017; H. Wang et al., 2013; Zheng et al., 2023). Среди четырёх гомологов *GhDFR* у хлопчатника – *GhDFR1* (Phytozome: Gohir.A05G192500), *GhDFR2* (Gohir.D05G195700), *GhDFR3* (Gohir.A06G008700) и *GhDFR4* (Gohir.D06G004300) – копия в хромосоме A05 экспрессируется преимущественно в волокне, тогда как *GhDFR3* – в лепестках (Zheng et al., 2023). Подавление экспрессии именно *GhDFR1* приводило к снижению содержания антоцианов и ПА и, как следствие, к осветлению волокон на стадии созревания (Wang et al., 2016; Zheng et al., 2023).

В связи с этим в настоящем исследовании сконструированы праймеры, специфичные к *GhDFR1* (хромосома A05), как к основному гену-кандидату. Экспрессию *GhDFR1* у образцов с

буро-зелёной окраской волокна оценивали в период визуального проявления пигментации - с 31 по 35 ДПО; у светло-бурого – с 35 по 39 ДПО; у тёмно-бурого – с 37 по 41 ДПО (рисунок 30). Относительный уровень транскрипции *GhDFR1* резко возрастал у образца с тёмно-бурым волокном к 41 ДПО и оставался низким у остальных генотипов.

Бурый фенотип определяется шестью локусами – *Lc1-Lc6*, при этом его проявление контролируется двумя парами комплементарных генов в *Lc1* (*GhTT2-A1*) и *Lc2* (*GhMYB10-A*) (Endrizzi, Kohel, 1966; Kohel, 1985; Wang et al., 2014; Hinchliffe et al., 2016; Wen et al., 2018; Yan et al., 2018). Ранее связь гена *GhMYB10-A* с вариабельностью бурой окраски была показана в работе Lu и соавт. (Nesi et al., 2001; Lu et al., 2017). Совместное действие ТФ *GhMYB10-A* и *GhTT2-A1* в составе комплекса MBW активировало транскрипцию структурных генов *GhANR* и *GhLAR*, что способствовало накоплению ПА и окрашиванию тканей корневых волосков люцерны (Lu et al., 2017).

Поскольку участие *GhMYB10-A* в составе регуляторного комплекса MBW в биосинтезе ПА подтверждено экспериментально в ряде исследований, мы оценили относительный уровень экспрессии этого гена. Относительный уровень транскрипции *GhMYB10-A* (в субгеноме At) достигал пика у буро-зелёного образца к 33 ДПО, светло-бурого к 35 ДПО и у тёмно-бурого - к 37 ДПО. Повышенный относительный уровень транскрипции *GhMYB10-A* во всех окрашенных образцах, за исключением образца с белым волокном, указывает на вероятную вовлечённость соответствующего ТФ в регуляцию биосинтеза ПА и других пигментов волокна хлопчатника. Статистически значимое повышение относительных уровней транскрипции ключевых структурных генов *GhDFR* и *GhANR* в образцах с бурой окраской волокна свидетельствует об активном накоплении ПА на поздних стадиях развития волокна.

4.6. Экспрессия ключевых генов фенилпропаноидного и флавоноидного путей при формировании зелёной и буро-зелёной окраски волокна хлопчатника

Предыдущие исследования показали, что пигменты зелёного хлопкового волокна включают в основном гидроксикоричными кислотами и их производными, которые синтезируются в растениях в ходе фенилпропаноидного пути. В этом пути ключевую роль играет ген *Gh4CL* (4-кумарат:КоА-лигаза), кодирующий фермент 4-кумарат:КоА-лигазу, катализирующий превращение гидроксикоричных кислот в соответствующие тиоэфиры кофермента А и их производные (Feng et al., 2017; Sun et al., 2019). Из четырех гомологичных копий гена *Gh4CL* фенилпропаноидного пути – *Gh4CL1-Gh4CL4* – только одна, *Gh4CL2*, ассоциирована с проявлением признака зелёной окраски волокна (Feng et al., 2017).

Позднее две гомеологичные копии *Gh4CL2* в субгеномах At и Dt (*Gh_A10G0456*, *Gh_D10G0473*) выделились в ходе сравнительного транскриптомного анализа у зелёного образца на 24 ДПО (Sun et al., 2019). Нами была оценена экспрессия идентифицированного гена-

кандидата *Gh4CL2* в субгеномах At и Dt (в тексте обозначен как *Gh4CL*) в фазу визуального проявления пигментации. У зелёноволокнистых образцов транскрипция гена *Gh4CL* возрастала, начиная с 37 ДПО, достигая максимума к 41 ДПО; у буро-зелёных – с 35 ДПО, тогда как у других форм активность гена оставалась низкой (Mikhailova et al., 2026).

Известно, что биосинтез вторичных метаболитов фенилпропаноидного пути, таких как флавоноиды, лигнин и производные гидроксикоричных кислот, тесно связан с транскрипционными факторами (ТФ) MYB. В свою очередь вторичные метаболиты фенилпропаноидного пути служат субстратами для синтеза многих природных пигментов, а ТФ MYB регулируют окраску цветов и плодов у растений. С помощью корреляционного анализа данных транскриптомики и метаболомики удалось установить взаимосвязь между накоплением флавоноидных метаболитов и активностью генов семейства MYB (Tang et al., 2021). Таким образом, выделено два регуляторных гена-кандидата в субгеномах At и Dt, транскрипционная активность которых значительно уменьшалась в отсутствии инсоляции. Транскрипционный фактор GhMYB1R1, кодируемый двумя гомеологичными копиями в субгеномах At и Dt (Phytozome: Gohir.A12G215300, Gohir.D12G217900), содержит светочувствительные элементы в промоторной области и вовлечен в процесс накопления пигментов, обуславливающих зеленые оттенки волокна хлопчатника (Tang et al., 2021). Относительный уровень транскрипции гена *GhMYB1R1-AD* (в субгеномах At и Dt) был выше у образцов с буро-зелёной, зелёной и светло-бурой окраской волокна: у буро-зеленого и зелёноволокнистого образцов экспрессия резко возрастала к 35 и 39 ДПО; у светло-бурого максимум отмечался на 39 ДПО (рисунок 30). Кроме того, у буро-зелёного образца наблюдалось наибольшее содержание мРНК гена *GhMYB10-A*. Высокий относительный уровень транскрипции регуляторных генов *GhMYB10-A* и *GhMYB1R1* в субгеномах At и Dt у образца с буро-зелёной окраской волокна на 33 и 35 ДПО, соответственно, указывает на вероятное одновременное накопление пигментов, определяющих как зеленые, так и бурые оттенки волокна хлопчатника.

В одном из недавних исследований у зелёноволокнистых образцов хлопчатника к 15–20 ДПО отмечено повышенное накопление мРНК ключевых генов биосинтеза флавоноидов и жасмонатов: *GhLOX*, *GhJMT*, *GhANS*, *GhC4H*, *GhF3H*, а также *GhDFR* (Xie et al., 2025). По предположению авторов, метилжасмонат (MeJA) активирует ТФ семейства MYB, которые, в свою очередь, усиливают экспрессию генов флавоноидного пути. В данной работе повышенное содержание мРНК ключевых генов биосинтеза ПА, *GhDFR*, *GhANR* и *GhMYB10-A* на поздних стадиях развития волокна не выявлено.

Ранее в период визуального изменения оттенка волокна от неокрашенного к зелёному (в интервале 30–35 ДПО) метаболомный анализ выявил преобладание различных классов липидов, тогда как у неокрашенных образцов метаболомный профиль оказался значительно менее

разнообразным (Li et al., 2024). Кроме того, сравнительный метаболомный анализ на 40 ДПО у зелёного волокна хлопчатника выявил накопление неокрашенных метаболитов флавоноидного и фенилпропаноидного путей – в частности, антоцианов, флавонолов и флаванолов, что сопровождалось повышенной транскрипционной активностью ключевых генов биосинтеза флавоноидов: *GhCHS*, *GhF3H*, *GhF3'H*, *GhFLS*, *GhLAR* (Sun et al., 2019). Среди дифференциально накапливающихся метаболитов к 45 ДПО было идентифицировано, что 20% из них относятся к фенилпропаноидному пути (Tang et al., 2021).

В данной работе, в результате анализа транскрипционной активности генов биосинтеза флавоноидных пигментов в период визуального проявления пигментации, у зелёноволкнистых форм доминировала транскрипция *Gh4CL* и *GhMYB1R1*, что указывает на активацию ранних этапов фенилпропаноидного метаболизма. Буро-зелёный генотип характеризовался одновременной транскрипционной активностью обоих регуляторных генов, что может отражать совместное накопление пигментов, обуславливающих данную окраску.

4.7. GhMYB10-A как компонент MBW-комплекса: регуляция биосинтеза флавоноидов и пигментации волокна хлопчатника

ТФ GhMYB10-A взаимодействует с двумя ТФ семейства bHLH-MYC — bHLH130D и bHLH064D (рисунок 31). У *A. thaliana* транскрипция гена *bHLH130D* (ортолог *AtTT8*) активируется фактором TT2 (R2R3-MYB), с дальнейшим объединением в комплекс с WD40-белком (TTG1). Этот регуляторный комплекс связывается с промотором гена *BANYULS* (*BAN*), кодирующего фермент антоцианидинредуктаза (ANR) и являющегося ортологом гена *GhANR* хлопчатника, и активирует его экспрессию, что способствует накоплению ПА в оболочках семян арабидопсиса (Baudry et al., 2004, 2006). Аналогичное взаимодействие обнаружено у хлопчатника: белковые продукты генов *GhTT2-3A* (*GhTT2-A1*, ортолог *AtTT2*) и *GhbHLH130D* (bHLH130D; ортолог *AtTT8*) формируют функциональный комплекс. При этом GhTT2-3A активирует экспрессию *GhbHLH130D*, и уровень транскриптов у образцов с бурой окраской волокна значительно превышает этот уровень у беловолокнистых форм (Yan et al., 2018).

Кроме того, на диаграмме взаимодействий показано участие GhMYB10-A в связывании с рядом белков семейства WD40, что подтверждено экспериментально (рисунок 31). В частности, выявлены гомологи *TTG1* в хромосомах A06 (LOC107901465 и LOC107945759) и D08 (LOC107962430 и LOC107948000) геномов хлопчатника вида *G. hirsutum*. Один из генов *WD40* в хромосоме D04 (LOC107904228) ранее был идентифицирован как функциональный ортолог *AtTTG1* (GenBank: AF530908) и показан его вклад в развитие волокна хлопчатника, а также накопление антоцианов и ПА (Baudry et al., 2004; Humphries et al., 2005). Таким образом, ТФ GhMYB10-A, объединяясь в MBW-комплекс с факторами bHLH и WD40, регулируют биосинтез пигментов флавоноидного пути.

Более того, GhMYB10-A и идентифицированные взаимодействующие с ним ТФ не только активируют биосинтез антоцианов, но и участвуют в спецификации эпидермальных клеток, из которых развиваются трихомы и замыкающие клетки (рисунок 32). Как известно, волокна хлопчатника представляют собой одиночные удлинённые клетки наружного эпидермиса семязачатков, развитие которых сходно с формированием трихом у арабидопсиса (Bui et al., 2020). Участие компонентов MBW-комплекса в регуляции как биосинтеза флавоноидных пигментов, так и инициации трихом у арабидопсиса и волокон у хлопчатника неоднократно подтверждено (Bui et al., 2020; Johnson et al., 2002; J. Li et al., 2021; Payne et al., 2000; Walker et al., 1999; L. Wang et al., 2021; Xu et al., 2015). Следовательно, полученные нами данные согласуются с существующими представлениями о двойной функции этого регуляторного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании описанных ранее генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* у *A. thaliana*, в данной работе идентифицированы дуплицированные копии соответствующих генов в геноме хлопчатника вида *G. hirsutum*. По результатам филогенетического анализа установлено, что паралогичные копии разошлись достаточно давно в геноме общего диплоидного предка – до образования аллотетраплоидной формы. У вида *G. hirsutum* дивергенции в большей степени подверглись промоторные последовательности всех идентифицированных регуляторных генов, в то время как кодирующие области генов находились под давлением отбора. В рамках данной работы по результатам секвенирования аллелей полноразмерных регуляторных генов семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC*, только для гена *GhMYB10-A* обнаружили взаимосвязь окраски волокна с выявленным полиморфизмом. Учитывая неоднозначный характер формирования признака бурой окраски волокна, невозможно выделить единственный определяющий его механизм. Однако впервые детектированная и охарактеризованная в данной работе связь аллельных различий гена *GhMYB10-A* в хромосоме A06 со светло-бурой окраской волокна, важна для понимания этого механизма и может служить основой для будущих исследований.

В настоящем исследовании впервые оценена экспрессия ключевых структурных (*GhDFR*, *GhANR*, *Gh4CL*) и регуляторных (*GhMYB1R1*, *GhMYB10-A*) генов биосинтеза пигментов на поздних стадиях развития волокна с 30 по 41 ДПО у образцов хлопчатника с контрастной окраской - белой, оттенков бурого, буро-зелёной и зелёной. У генотипов с бурым волокном наблюдалась повышенная экспрессия гена *GhMYB10-A* и структурных генов флавоноидного пути - *GhDFR* и *GhANR*, что согласуется с накоплением проантоцианидинов. У зелёновокнистых форм доминировала экспрессия *Gh4CL* и *GhMYB1R1*, указывая на активацию ранних этапов фенилпропаноидного метаболизма. Впервые продемонстрировано, что образец с буро-зелёной окраской волокна характеризуется одновременным повышенным уровнем мРНК обоих регуляторных генов, наряду со структурным *GhANR*, что может отражать совместное накопление пигментов, обуславливающих данную окраску.

Таким образом, данная работа помогает лучше понять молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе формирования признака окрашенного волокна хлопчатника, а также установить связь между относительными уровнями транскрипции ключевых генов флавоноидного и фенилпропаноидного путей биосинтеза и накоплением пигментов в волокне хлопчатника на поздних стадиях развития ВКС. Помимо фундаментальной, результаты данного исследования несут и практическую значимость: выявленные аллельные различия, связанные со светло-бурым фенотипом, являются основой для дальнейшей разработки удобных для скрининга

селекционного материала диагностических ДНК-маркеров с целью получения сортов хлопчатника с природноокрашенным волокном.

ВЫВОДЫ

1. На основе сравнения структурно-функциональной организации идентифицированных путем *in silico* анализа полноразмерных паралогичных и гомеологичных копий регуляторных генов биосинтеза флавоноидов семейств *R2R3-MYB* (24 гена), *bHLH-MYC* (12 генов) и *WD40* (11 генов) в геномах аллотетраплоидных и диплоидных видов хлопчатника, предположили, что все копии функционально значимы, за исключением *GhTT2-A3* (выявлен преждевременный стоп-кодон).
2. Гены семейства *WD40* демонстрируют повышенную эволюционную консервативность по сравнению с *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC*, что отражает их фундаментальную роль в стабилизации регуляторного комплекса; более вариабельные компоненты комплекса – семейства *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* – были определены как источники генов-кандидатов, детерминирующих изменчивость по окраске волокна и гипокотыля.
3. У образцов хлопчатника с контрастной окраской волокна функционально значимые отличия аллелей были выявлены только для гена *GhMYB10-A*, который, согласно функциональной аннотации в базе Gene Ontology, относится к классу ТФ, регулирующих поздние этапы биосинтеза метаболитов флавоноидного пути. Вследствие двух миссенс-мутаций в первом экзоне, приводящих к замене аминокислот в белковом продукте (Лиз26Тре и Трп37Арг) предположили:
 - нарушение у альтернативной формы *GhMYB10-A* гидрофобного каркаса R2-домена;
 - дестабилизацию структурного мотива «спираль-петля-спираль»;
 - потенциальное снижение ДНК-связывающей активности этого ТФ у образцов со светло-бурой окраской волокна
4. За счет выявленной дифференциальной экспрессии регуляторных генов *GhMYB1R1* и *GhMYB10-A* в поздний период развития волокна (31–40 ДПО) у природноокрашенных образцов по сравнению с беловолокнистыми формами, установлена их ключевая роль в формировании изменчивости по признаку окраски волокна хлопчатника.
5. На основе установленной совместной экспрессии ключевых структурных (*GhANR*, *Gh4CL*) и регуляторных (*GhMYB10-A*, *GhMYB1R1*) генов у образца с буро-зелёной окраской волокна, показана одновременная активация флавоноидного и фенилпропаноидного путей, что обуславливает совместное накопление пигментов и проявление данной окраски волокна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мауер, Ф. М. Хлопчатник : в 4 т. / Ф. М. Мауер ; под ред. А. М. Мальцева ; Акад. наук УзССР, Ин-ты: сельского хозяйства, ботаники, почвоведения. — Ташкент : Изд-во АН УзССР, 1954. — Т. 1 : Происхождение и систематика хлопчатника. — 384 с.
2. Михайлова А. С. Особенности организации дублированных копий ортологов генов *AtTT2* и *AtTT8* арабидопсиса в геноме аллотетраплоидного хлопчатника // А. С. Михайлова, Е. К. Хлесткина. Биотехнология и селекция растений. — 2026. — Т. 9. — № 3. — <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2026-3-01>
3. Симонгулян, Н. Г. Генетика, селекция и семеноводство хлопчатника / Н. Г. Симонгулян, С. Мухамедханов, А. Шифрин. — Ташкент : Мехнат, 1987. — 319 с.
4. Туз, К. З. ‘Браун’ – первый российский сорт хлопчатника с природноокрашенным волокном / К. З. Туз, М. Ш. Асфандиярова, Л. П. Подольная // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2023. – Т. 184. – № 1. – С. 154–162. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-1-154-162>
5. Худаярова, Ф. О. История натуральных красителей и использование их в окрашивании природных волокон / Ф. О. Худаярова, С. С. Асадова, Ш. Х. Самиева // Молодые ученые — развитию национальной технологической инициативы. – 2021. – Т. 1. – С. 407–411.
6. Abdurakhmonov, I. Y. Duplication, divergence and persistence in the Phytochrome photoreceptor gene family of cottons (*Gossypium* spp.) / I. Y. Abdurakhmonov, Z. T. Buriev, C. J. Logan-Young, A. Abdukarimov, A. E. Pepper // BMC Plant Biology. – 2010. – Vol. 10. – № 1. – P. 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-119>
7. Ach, R. A. A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals / R. A. Ach, P. Taranto, W. Gruissem // The Plant Cell. – 1997. – Vol. 9. – № 9. – P. 1595–1606. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.9.1595>
8. Adams, K. L. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing / K. L. Adams, R. Cronn, R. Percifield, J. F. Wendel // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – Vol. 100. – № 8. – P. 4649–4654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630618100>
9. Agaloti, T. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- β promoter / T. Agaloti, S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis, D. Thanos // Cell. – 2000. – Vol. 103. – P. 667–678. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00169-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00169-0)
10. Al-Ghazi, Y. Transcript profiling during fiber development identifies pathways in secondary metabolism and cell wall structure that may contribute to cotton fiber quality / Y. Al-Ghazi, S. Bourot, T. Arioli, E. S. Dennis, D. J. Llewellyn // Plant Cell Physiol. – 2009. – Vol. 50. – № 7. – P.

- 1364–1381. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp084>
11. Appelhagen, I. Leucoanthocyanidin Dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*: Characterization of mutant alleles and regulation by MYB–BHLH–TTG1 transcription factor complexes / I. Appelhagen, O. Jahns, L. Bartelniewoehner, M. Sagasser, B. Weisshaar, R. Stracke // *Gene*. – 2011. – Vol. 484. – № 1–2. – P. 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.05.031>
 12. Appelhagen, I. TRANSPARENT TESTA1 interacts with R2R3-MYB factors and affects early and late steps of flavonoid biosynthesis in the endothelium of *Arabidopsis thaliana* seeds / I. Appelhagen, G.-H. Lu, G. Huep, E. Schmelzer, B. Weisshaar, M. Sagasser // *The Plant Journal*. – 2011. – Vol. 67. – № 3. – P. 406–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04603.x>
 13. Artico, S. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data / S. Artico, S. M. Nardeli, O. Brilhante, M. F. Grossi-de-Sa, M. Alves-Ferreira // *BMC Plant Biol.* – 2010. – Vol. 10. – № 1. – P. 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-49>
 14. Atchley, W. R. Positional Dependence, Cliques, and Predictive Motifs in the bHLH Protein Domain / W. R. Atchley, W. Terhalle, A. Dress // *Journal of Molecular Evolution*. – 1999. – Vol. 48. – № 5. – P. 501–516. <https://doi.org/10.1007/PL00006494>
 15. Baudry, A. TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana* / A. Baudry, M. Caboche, L. Lepiniec // *The Plant Journal*. – 2006. – Vol. 46. – № 5. – P. 768–779. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02733.x>
 16. Baudry, A. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* / A. Baudry, M. A. Heim, B. Dubreucq, M. Caboche, B. Weisshaar, L. Lepiniec // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 39. – № 3. – P. 366–380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x>
 17. Bedon, F. Conifer R2R3-MYB transcription factors: sequence analyses and gene expression in wood-forming tissues of white spruce (*Picea glauca*) / F. Bedon, J. Grima-Pettenati, J. Mackay // *BMC Plant Biology*. – 2007. – Vol. 7. – № 1. – P. 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-17>
 18. Benavente-García, O. Uses and Properties of Citrus Flavonoids / O. Benavente-García, J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuño, J. A. Del Río // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1997. – Vol. 45. – № 12. – P. 4505–4515. <https://doi.org/10.1021/jf970373s>
 19. Benfey, P. N. Transcriptional networks controlling plant development / P. N. Benfey, D. Weigel // *Plant Physiology*. – 2001. – Vol. 125. – № 1. – P. 109–111. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.109>
 20. Bogs, J. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase in developing grape berries and grapevine leaves / J. Bogs // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 139. – № 2. – P. 652–663.

<https://doi.org/10.1104/pp.105.064238>

21. Bolsheva, N. L. Characterization of repeated DNA sequences in genomes of blue-flowered flax / N. L. Bolsheva, N. V. Melnikova, I. V. Kirov, A. A. Dmitriev, G. S. Krasnov, A. V. Amosova, T. E. Samatadze, O. Y. Yurkevich, S. A. Zoshchuk, A. V. Kudryavtseva, O. V. Muravenko // *BMC Evolutionary Biology*. – 2019. – Vol. 19. – № Suppl. 1. – P. 49. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1375-6>
22. De Bruyne, T. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities / T. De Bruyne, L. Pieters, H. Deelstra, A. Vlietinck // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 1999. – Vol. 27. – № 4. – P. 445–459. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(98\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(98)00116-7)
23. Buer, C. S. Flavonoids: New Roles for Old Molecules / C. S. Buer, N. Imin, M. A. Djordjevic // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2010. – Vol. 52. – № 1. – P. 98–111. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00905.x>
24. Bui, A. P. N. Similarities between initiation mechanism between cotton fiber and *Arabidopsis* trichome: prospects in improving cotton fiber yield / A. P. N. Bui, B.-N. Ong, T.-A. N. Huu, H.-D. Tran // *Annual Research and Review in Biology*. – 2020. – Vol. 34. – № 1. – P. 1–9. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v34i130144>
25. Campbell, B. T. Status of the Global Germplasm Resources / B. T. Campbell, S. Saha, R. Percy, J. Frelichowski, J. N. Jenkins, W. Park, C. D. Mayee, V. Gotmare, D. Dessauw, M. Giband, X. Du, Y. Jia, G. Constable, S. Dillon, I. Y. Abdurakhmonov, A. Abdukarimov, S. M. Rizaeva, A. Abdullaev, P. A. V. Barroso, J. G. Pádua, L. V. Hoffmann, L. Podolnaya // *Crop Science*. – 2010. – Vol. 50. – P. 1161–1179. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.09.0551>
26. Carroll, S. B. Endless forms: The evolution of gene regulation and morphological diversity / S. B. Carroll // *Cell*. – 2000. – Vol. 101. – № 6. – P. 577–580. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80868-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80868-5)
27. Chattopadhyay, S. *Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression / S. Chattopadhyay, L. H. Ang, P. Puente, X. W. Deng, N. Wei // *Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10. – P. 673–683.
28. Chen, C. Genome-Wide Identification of WD40 Proteins in *Cucurbita maxima* Reveals Its Potential Functions in Fruit Development / C. Chen, Y. Yang, L. Pan, W. Xia, L. Xu, B. Hua, Z. Zhang, M. Miao // *Genes*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – Article 220. <https://doi.org/10.3390/genes14010220>
29. Chen, J. J. A gene fusion at a homeobox locus: alterations in leaf shape and implications for morphological evolution / J. J. Chen, B. J. Janssen, A. Williams, N. Sinha // *The Plant Cell*. – 1997. – Vol. 9. – № 8. – P. 1289–1304. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.8.1289>
30. Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought / V. Cheynier // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2005. – Vol. 81. – № 1. – P. 223S–229S.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>.

31. Cheynier, V. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology / V. Cheynier, G. Comte, K. M. Davies, V. Lattanzio, S. Martens // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2013. – Vol. 72. – P. 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
32. Christie, P. J. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings / P. J. Christie, M. R. Alfenito, V. Walbot // *Planta*. – 1994. – Vol. 194. – № 4. – P. 541–549. <https://doi.org/10.1007/BF00714468>
33. Clark, M. K. Selection of stable reference genes for accurate reverse-transcription quantitative PCR in cotton-herbivore studies using virus-induced gene silencing / M. K. Clark, S. T. Behmer, G. A. Sword // *Sci. Rep.* – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 24482. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-08940-0>
34. Colasanti, J. Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34cdc2 homologue from *Zea mays* / J. Colasanti, M. Tyers, V. Sundaresan // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 88. – № 8. – P. 3377–3381. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.8.3377>
35. Comai, L. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids / L. Comai, A. P. Tyagi, K. Winter, R. Holmes-Davis, S. H. Reynolds, Y. Stevens, B. Byers // *The Plant Cell*. – 2000. – Vol. 12. – № 9. – P. 1551–1567. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.9.1551>
36. Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering / F. Corpet // *Nucleic Acids Research*. – 1988. – Vol. 16. – № 22. – P. 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
37. Cramer, P. Coordination between transcription and pre-mRNA processing / P. Cramer, A. Srebrow, S. Kadener, S. Werbach, M. de la Mata, G. Melen, G. Nogués, A. R. Kornblihtt // *FEBS Letters*. – 2001. – Vol. 498. – № 2-3. – P. 179–182. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02485-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02485-1)
38. Debeaujon, I. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development / I. Debeaujon // *The Plant Cell*. – 2003. – Vol. 15. – № 11. – P. 2514–2531. <https://doi.org/10.1105/tpc.014043>
39. Delph, L. F. The evolution of floral color change: pollinator attraction versus physiological constraints in *Fuchsia excorticata* / L. F. Delph, C. M. Lively // *Evolution*. – 1989. – Vol. 43. – P. 1252–1262.
40. Doebley, J. The evolution of apical dominance in maize / J. Doebley, A. Stec, L. Hubbard // *Nature*. – 1997. – Vol. 386. – № 6624. – P. 485–488. <https://doi.org/10.1038/386485a0>
41. Doebley, J. Transcriptional regulators and the evolution of plant form / J. Doebley, L. Lukens // *The Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10. – № 7. – P. 1075–1082. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.7.1075>

42. Dolferus, R. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis* Adh gene / R. Dolferus, M. Jacobs, W. J. Peacock, E. S. Dennis // *Plant Physiology*. – 1994. – Vol. 105. – № 4. – P. 1075–1087. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1075>.
43. Du, X. Resequencing of 243 diploid cotton accessions based on an updated A genome identifies the genetic basis of key agronomic traits / X. Du, G. Huang, S. He, Z. Yang, G. Sun, X. Ma, N. Li, X. Zhang, J. Sun, M. Liu, Y. Jia, Z. Pan, W. Gong, Z. Liu, H. Zhu, L. Ma, F. Liu, D. Yang, F. Wang, W. Fan, Q. Gong, Z. Peng, L. Wang, X. Wang, S. Xu, H. Shang, C. Lu, H. Zheng, S. Huang, T. Lin, Y. Zhu, F. Li // *Nature Genetics*. – 2018. – Vol. 50. – № 6. – P. 796–802. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0116-x>
44. Dubos, C. MYB transcription factors in *Arabidopsis* / C. Dubos, R. Stracke, E. Grotewold, B. Weisshaar, C. Martin // *Trends in Plant Science*. – 2010. – Vol. 15. – № 10. – P. 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
45. Dudareva, N. Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of *S-linalool synthase* gene expression in the *C. breweri* flower / N. Dudareva, L. Cseke, V. M. Blanc, E. Pichersky // *The Plant Cell*. – 1996. – Vol. 8. – № 7. – P. 1137–1148. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.7.1137>
46. Dunn, O. J. Multiple comparisons using rank sums / O. J. Dunn // *Technometrics*. – 1964. – Vol. 6. – № 2. – P. 241–252.
47. Dutt, Y. Breeding for high yield and fibre quality in coloured cotton / Y. Dutt, X. D. Wang, Y. G. Zhu, Y. Y. Li // *Plant Breed.* – 2004. – Vol. 123. – № 2. – P. 145–151. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00938.x>
48. Edgar, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity / R. C. Edgar // *BMC Bioinformatics*. – 2004. – Vol. 5. – P. 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
49. Endo, T. Large-scale search for genes on which positive selection may operate / T. Endo, K. Ikeo, T. Gojobori // *Molecular Biology and Evolution*. – 1996. – Vol. 13. – № 5. – P. 685–690. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025629>
50. Endrizzi, J. E. Use of telosomes in mapping three chromosomes in cotton / J. E. Endrizzi, R. J. Kohel // *Genetics*. – 1966. – Vol. 54. – № 2. – P. 535–550. <https://doi.org/10.1093/genetics/54.2.535>
51. Fan, X. Anthocyanin accumulation enhanced in *Lc*-transgenic cotton under light and increased resistance to bollworm / X. Fan, B. Fan, Y. Wang, W. Yang // *Plant Biotechnology Reports*. – 2016. – Vol. 10. – № 1. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11816-015-0382-3>
52. Fan, Z. Genome-Wide Analysis of Anthocyanin Biosynthesis Regulatory WD40 Gene *FcTTG1* and Related Family in *Ficus carica* L. / Z. Fan, Y. Zhai, Y. Wang, L. Zhang, M. Song, M. A. Flaishman, H. Ma // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Vol. 13. – Article 948084. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.948084>

53. Felsenstein, J. Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap / J. Felsenstein // *Evolution*. – 1985. – Vol. 39. – № 4. – P. 783. <https://doi.org/10.2307/2408678>
54. Feng, H. Molecular analysis of proanthocyanidins related to pigmentation in brown cotton fibre (*Gossypium hirsutum* L.) / H. Feng, Y. Li, S. Wang, L. Zhang, Y. Liu, F. Xue, Y. Sun, Y. Wang, J. Sun // *Journal of Experimental Botany*. – 2014. – Vol. 65. – № 20. – P. 5759–5769. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru286>
55. Feng, H. Genetic effects and heterosis of the fibre colour and quality of brown cotton (*Gossypium hirsutum*) / H. Feng, J. Sun, J. Wang, Y. Jia, X. Zhang, B. Pang, J. Sun, X. Du // *Plant Breeding*. – 2011. – Vol. 130. – № 4. – P. 450–456. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2010.01842.x>
56. Feng, H. Analysis of Flavonoids And The Flavonoid Structural Genes In Brown Fiber Of Upland Cotton / H. Feng, X. Tian, Y. Liu, Y. Li, X. Zhang, B. J. Jones, Y. Sun, J. Sun // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 3. – Article e58820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058820>
57. Feng, H. Molecular analysis of caffeoyl residues related to pigmentation in green cotton fibers / H. Feng, Y. Yang, S. Sun, Y. Li, L. Zhang, J. Tian, Q. Zhu, Z. Feng, H. Zhu, J. Sun // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – Vol. 68. – № 16. – P. 4559–4569. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx281>
58. Ferreira, D. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles / D. Ferreira, R. Bekker // *Natural Product Reports*. – 1996. – Vol. 13. – P. 411–433. <https://doi.org/10.1039/NP9961300411>
59. Ferreira, D. Flavans and proanthocyanidins / D. Ferreira, D. Slade, J. P. J. Marais // *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* / Ed. by Ø. M. Andersen, K. R. Markham. – Boca Raton : CRC Press, 2006. – P. 553–616
60. Ferreira González, L. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / L. Ferreira González // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – Vol. 4. – № 4. – P. 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
61. Flagel, L. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution / L. Flagel, J. Udall, D. Nettleton, J. Wendel // *BMC Biology*. – 2008. – Vol. 6. – Article 16. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-16>
62. Force, A. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations / A. Force, M. Lynch, F. B. Pickett, A. Amores, Y. L. Yan, J. Postlethwait // *Genetics*. – 1999. – Vol. 151. – № 4. – P. 1531–1545. <https://doi.org/10.1093/genetics/151.4.1531>
63. Frary, A. fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size / A. Frary, T. C. Nesbitt, S. Grandillo, E. van der Knaap, B. Cong, J. Liu, J. Meller, R. Elber, K. B. Alpert, S. D. Tanksley // *Science*. – 2000. – Vol. 289. – № 5476. – P. 85–88. <https://doi.org/10.1126/science.289.5476.85>
64. Freeling, M. Many or most genes in *Arabidopsis* transposed after the origin of the order Brassicales /

- M. Freeling, E. Lyons, B. Pedersen, M. Alam, R. Ming, D. Lisch // *Genome Research*. – 2008. – Vol. 18. – P. 1924–1937.
65. Fryxell, P. A. The rediscovery of *Anotea flavida* (DC.) Ulbr. (*Malvaceae*) / P. A. Fryxell // *Brittonia*. – 1968. – Vol. 20. – P. 334–335. <https://doi.org/10.2307/2805690>
66. Fryxell, P. A. The natural history of the cotton tribe (*Malvaceae*, tribe *Gossypieae*) / P. A. Fryxell. – College Station and London, 1979.
67. Fryxell, P. A. A Revision of *Gossypium* Sect. *Grandicalyx* (*Malvaceae*), including the description of six new species / P. A. Fryxell, L. A. Craven, J. McD. Stewart // *Systematic Botany*. – 1992. – Vol. 17. – № 1. – P. 91–114. <https://doi.org/10.2307/2419068>
68. Gao, J. Functional analysis of *GhCHS*, *GhANR* and *GhLAR* in colored fiber formation of *Gossypium hirsutum* L. / J. Gao, L. Shen, J. Yuan, H. Zheng, Q. Su, W. Yang, L. Zhang, V. E. Nnaemeka, J. Sun, L. Ke, Y. Sun // *BMC Plant Biology*. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – Article 455. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2065-7>
69. Ge, X. Development of an eco-friendly pink cotton germplasm by engineering betalain biosynthesis pathway / X. Ge, P. Wang, Y. Wang, X. Wei, Y. Chen, F. Li // *Plant Biotechnology Journal*. – 2023. – Vol. 21. – № 4. – P. 674–676. <https://doi.org/10.1111/pbi.13987>
70. Geiss, F. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark / F. Geiss, M. Heinrich, D. Hunkler, H. Rimpler // *Phytochemistry*. – 1995. – Vol. 39. – № 3. – P. 635–643. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00934-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00934-1)
71. Gilmartin, P. M. Spacing between GT-1 binding sites within a light-responsive element is critical for transcriptional activity / P. M. Gilmartin, N. H. Chua // *The Plant Cell*. – 1990. – Vol. 2. – № 5. – P. 447–455. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.5.447>
72. Girden, E. R. ANOVA: Repeated measures / E. R. Girden. – Sage, 1992.
73. Giuliano, G. An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene / G. Giuliano, E. Pichersky, V. S. Malik, M. P. Timko, P. A. Scolnik, A. R. Cashmore // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1988. – Vol. 85. – № 19. – P. 7089–7093. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.19.7089>
74. Gong, W. Color Cotton and Its Utilization in China / W. Gong, X. Du, Y. Jia, Z. Pan // *Cotton Fiber: Physics, Chemistry and Biology*. – Cham: Springer International Publishing, 2018. – P. 117–132. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00871-0_6
75. Gong, W. Comparison of the transcriptome between two cotton lines of different fiber color and quality / W. Gong, S. He, J. Tian, J. Sun, Z. Pan, Y. Jia, G. Sun, X. Du // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 11. – Article e112966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112966>
76. Gonzalez, A. TTG1 complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation / A. Gonzalez, J. Mendenhall, Y. Huo, A. Lloyd // *Developmental Biology*. – 2009. – Vol. 325. – № 2. –

- P. 412–421. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.005>
77. Gonzalez, A. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/MYB transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings / A. Gonzalez, M. Zhao, J. M. Leavitt, A. M. Lloyd // *The Plant Journal*. – 2008. – Vol. 53. – № 5. – P. 814–827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03373.x>
 78. Gould, K. Flavonoid functions in plants / K. Gould, C. Lister // *Flavonoids*. – CRC Press, 2005. – P. 397–441. <https://doi.org/10.1201/9781420039443.ch8>
 79. Gu, L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation / L. Gu, M. A. Kelm, J. F. Hammerstone, G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, R. L. Prior // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – Vol. 51. – № 25. – P. 7513–7521. <https://doi.org/10.1021/jf034815d>
 80. Guo, Y. Genome-Wide identification of *PAP1* direct targets in regulating seed anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* / Y. Guo, D. Li, T. Liu, Y. Li, J. Liu, M. He, X. Cui, Z. Liu, M. Chen // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 22. – Article 16049. <https://doi.org/10.3390/ijms242216049>
 81. Haigler, C. H. Cotton fiber: a powerful single-cell model for cell wall and cellulose research / C. H. Haigler, L. Betancur, M. R. Stiff, J. R. Tuttle // *Frontiers in Plant Science*. – 2012. – Vol. 3. – Article 104. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00104>
 82. Hampsey, M. RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes / M. Hampsey, D. Reinberg // *Current Opinion in Genetics and Development*. – 1999. – Vol. 9. – № 2. – P. 132–139. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)80020-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80020-3)
 83. Hancock, J. F. Contributions of Domesticated Plant Studies to our Understanding of Plant Evolution / J. F. Hancock // *Annals of Botany*. – 2005. – Vol. 96. – № 6. – P. 953–963. <https://doi.org/10.1093/aob/mci259>
 84. Harland, S. C. The genetics of cotton / S. C. Harland // *Journal of Genetics*. – 1932. – Vol. 25. – № 3. – P. 261–270. <https://doi.org/10.1007/BF02984590>
 85. Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids / B. H. Havsteen // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2002. – Vol. 96. – № 2-3. – P. 67–202. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(02\)00298-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(02)00298-x)
 86. Heim, M. A. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity / M. A. Heim // *Molecular Biology and Evolution*. – 2003. – Vol. 20. – № 5. – P. 735–747. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg088>
 87. Hellemans, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data / J. Hellemans, G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, J. Vandesompele // *Genome Biology*. – 2007. – Vol. 8. – № 2. – Article R19.

<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>

88. Hemingway, R. W. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins / R. W. Hemingway, L. Y. Foo, L. J. Porter // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. – 1982. – P. 1209–1216. <https://doi.org/10.1039/P19820001209>
89. Holm, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure / S. Holm // *Scandinavian Journal of Statistics*. – 1979. – Vol. 6. – P. 65–70.
90. Higo, K. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 / K. Higo, Y. Ugawa, M. Iwamoto, T. Korenaga // *Nucleic Acids Research*. – 1999. – Vol. 27. – № 1. – P. 297–300. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.297>
91. Hinchliffe, D. J. The *GhTT2_A07* gene is linked to the brown colour and natural flame retardancy phenotypes of *Lc1* cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibres / D. J. Hinchliffe, B. D. Condon, G. Thyssen, M. Naoumkina, C. A. Madison, M. Reynolds, C. D. Delhom, D. D. Fang, P. Li, J. McCarty // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – Vol. 67. – № 18. – P. 5461–5471. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw312>
92. Hinchliffe, D. J. Multi-omics analysis of pigmentation related to proanthocyanidin biosynthesis in brown cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / D. J. Hinchliffe, M. Naoumkina, G. N. Thyssen, S. Nam, S. Chang, J. C. McCarty, J. N. Jenkins // *Frontiers in Plant Science*. – 2024. – Vol. 15. – Article 1372232. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1372232>
93. Hovav, R. A majority of cotton genes are expressed in single-celled fiber / R. Hovav, J. A. Udall, E. Hovav, R. Rapp, L. Flagel, J. F. Wendel // *Planta*. – 2008. – Vol. 227. – № 2. – P. 319–329. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0619-7>
94. Hsieh, Y.-L. The Fine Structure of Developing Cotton Fibers / Y.-L. Hsieh // *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences*. – 1996. – Vol. 2. – P. 1294–1296.
95. Hu, T. Nonsynonymous to synonymous substitution ratio ka/ks : measurement for rate of evolution in evolutionary computation / T. Hu, W. Banzhaf // *Lecture Notes in Computer Science*. – 2008. – Vol. 5199. – P. 448–457. https://doi.org/10.1007/978-3-540-87700-4_45
96. Hu, Y. *Gossypium barbadense* and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton / Y. Hu, J. Chen, L. Fang, Z. Zhang, W. Ma, Y. Niu, L. Ju, J. Deng, T. Zhao, J. Lian, K. Baruch, D. Fang, X. Liu, Y. L. Ruan, M. U. Rahman, J. Han, K. Wang, Q. Wang, H. Wu, G. Mei, Y. Zang, Z. Han, C. Xu, W. Shen, D. Yang, Z. Si, F. Dai, L. Zou, F. Huang, Y. Bai, Y. Zhang, A. Brodt, H. Ben-Hamo, X. Zhu, B. Zhou, X. Guan, S. Zhu, X. Chen, T. Zhang // *Nature Genetics*. – 2019. – Vol. 51. – № 4. – P. 739–748. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0371-5>
97. Hua, S. Characterization of pigmentation and cellulose synthesis in colored cotton fibers / S. Hua, X. Wang, S. Yuan, M. Shao, X. Zhao, S. Zhu, L. Jiang // *Crop Science*. – 2007. – Vol. 47. – № 4. –

P. 1540.

98. Huang, D. Genome-Wide Identification of R2R3-MYB Transcription Factors: Discovery of a “Dual-Function” Regulator of Gypenoside and Flavonol Biosynthesis in *Gynostemma pentaphyllum* / D. Huang, R. Ming, S. Xu, S. Yao, L. Li, R. Huang, Y. Tan // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Vol. 12. – Article 796248. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.796248>
99. Humphries, J. A. Two WD-repeat genes from cotton are functional homologues of the *Arabidopsis thaliana* *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* gene / J. A. Humphries, A. R. Walker, J. N. Timmis, S. J. Orford // *Plant Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 57. – № 1. – P. 67–81. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-6768-1>
100. Hutchinson, J. B. Intra-specific differentiation in *Gossypium hirsutum* / J. B. Hutchinson // *Heredity*. – 1951. – Vol. 5. – P. 161–193.
101. Hurles, M. Gene duplication: the genomic trade in spare parts / M. Hurles // *PLoS Biology*. – 2004. – Vol. 2. – Article e206.
102. Irish, V. F. Conservation of floral homeotic gene function between *Arabidopsis* and *antirrhinum* / V. F. Irish, Y. T. Yamamoto // *The Plant Cell*. – 1995. – Vol. 7. – № 10. – P. 1635–1644. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.10.1635>
103. Itzkovitz, S. Coding limits on the number of transcription factors / S. Itzkovitz, T. Tlusty, U. Alon // *BMC Genomics*. – 2006. – Vol. 7. – № 1. – Article 239. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-239>
104. Jaakola, L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits / L. Jaakola // *Trends in Plant Science*. – 2013. – Vol. 18. – № 9. – P. 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.003>
105. Jakobsson, M. A unique recent origin of the allotetraploid species *Arabidopsis suecica*: Evidence from nuclear DNA markers / M. Jakobsson, J. Hagenblad, S. Tavaré, T. Säll, C. Halldén, C. Lind-Halldén, M. Nordborg // *Molecular Biology and Evolution*. – 2006. – Vol. 23. – № 6. – P. 1217–1231. <https://doi.org/10.1093/molbev/msk006>
106. Jeong, J.-H. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression / J.-H. Jeong, J. Y. An, Y. T. Kwon, J. G. Rhee, Y. J. Lee // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2009. – Vol. 106. – № 1. – P. 73–82. <https://doi.org/10.1002/jcb.21977>
107. Jiang, R. Genome-wide identification of the WD40 protein family and functional characterization of AaTTG1 in *Artemisia annua* / R. Jiang, W. Chen, Q. Li, J. Guo, Z. Lv, W. Chen // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2025. – Vol. 289. – Article 138834. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138834>
108. Johnson, C. S. *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY Transcription Factor / C. S. Johnson, B. Klevski, D. R. Smyth

- // The Plant Cell. – 2002. – Vol. 14. – № 6. – P. 1359–1375. <https://doi.org/10.1105/tpc.001404>
109. Kanei-Ishii, C. The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the MYB protooncogene product / C. Kanei-Ishii, A. Sarai, T. Sawazaki, H. Nakagoshi, D. N. He, K. Ogata, Y. Nishimura, S. Ishii // Journal of Biological Chemistry. – 1990. – Vol. 265. – № 32. – P. 19990–19995. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)45472-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)45472-X)
 110. Katiyar, A. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis / A. Katiyar, S. Smita, S. Lenka, R. Rajwanshi, V. Chinnusamy, K. Bansal // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13. – № 1. – Article 544. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-544>
 111. Katsu, K. A new buckwheat *dihydroflavonol 4-reductase* (DFR), with a unique substrate binding structure, has altered substrate specificity / K. Katsu, R. Suzuki, W. Tsuchiya, N. Inagaki, T. Yamazaki, T. Hisano, Y. Yasui, T. Komori, M. Koshio, S. Kubota, A. R. Walker, K. Furukawa, K. Matsui // BMC Plant Biology. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – Article 239. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1200-6>
 112. Karak, P. Biological Activities of Flavonoids: An Overview / P. Karak // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2019. – Vol. 10. – № 4. – P. 1567–1574. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1567-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74)
 113. Kim, H. J. Cotton fiber growth *in planta* and *in vitro*. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis / H. J. Kim, B. A. Triplett // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 127. – № 4. – P. 1361–1366. <https://doi.org/10.1104/pp.010724>
 114. Kim, S. The L locus, one of complementary genes required for anthocyanin production in onions (*Allium cepa*), encodes anthocyanidin synthase / S. Kim, R. Jones, K. S. Yoo, L. M. Pike // Theoretical and Applied Genetics. – 2005. – Vol. 111. – P. 120–127. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2000-1>
 115. Kloeckener-Gruissem, B. Transposon-induced promoter scrambling: a mechanism for the evolution of new alleles / B. Kloeckener-Gruissem, M. Freeling // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1995. – Vol. 92. – № 6. – P. 1836–1840. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.1836>
 116. Koes, R. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways / R. Koes, W. Verweij, F. Quattrocchio // Trends in Plant Science. – 2005. – Vol. 10. – № 5. – P. 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.03.002>
 117. Kohel, R. J. Genetic Analysis of Fiber Color Variants in Cotton / R. J. Kohel // Crop Science. – 1985. – Vol. 25. – № 5. – P. 793–797. <https://doi.org/10.2135/cropsci1985.0011183X0025000500017x>
 118. Koornneef, M. The complex syndrome of *ttg* mutans / M. Koornneef // Arabidopsis Information

- Service. – 1981. – Vol. 18. – P. 45–51.
119. Koornneef, M. Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis* / M. Koornneef // *Arabidopsis Information Service*. – 1990. – Vol. 27. – P. 1–4.
 120. Kruskal, W. H. Use of ranks in one-criterion variance analysis / W. H. Kruskal, A. Wallis // *Journal of the American Statistical Association*. – 1952. – Vol. 47. – P. 583–621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>
 121. Kumar, S. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview / S. Kumar, A. K. Pandey // *The Scientific World Journal*. – 2013. – Vol. 2013. – Article 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
 122. Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35. – № 6. – P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 123. Lam, E. A metal-dependent DNA-binding protein interacts with a constitutive element of a light-responsive promoter / E. Lam, Y. Kano-Murakami, P. M. Gilmartin, B. Niner, N.-H. Chua // *The Plant Cell*. – 1990. – Vol. 2. – P. 857–866. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.9.857>
 124. Lea, U. S. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway / U. S. Lea, R. Slimestad, P. Smedvig, C. Lillo // *Planta*. – 2007. – Vol. 225. – № 5. – P. 1245–1253. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0414-x>
 125. Lee, M. M. WEREWOLF, a MYB-Related Protein in *Arabidopsis*, Is a Position-Dependent Regulator of Epidermal Cell Patterning / M. M. Lee, J. Schiefelbein // *Cell*. – 1999. – Vol. 99. – № 5. – P. 473–483. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81536-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81536-6)
 126. Lee, T. I. Transcription of eukaryotic protein-coding genes / T. I. Lee, R. A. Young // *Annual Review of Genetics*. – 2000. – Vol. 34. – P. 77–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.77>
 127. Léon-Kloosterziel, K. M. *Arabidopsis* mutants with a reduced seed dormancy / K. M. Léon-Kloosterziel, G. A. van de Bunt, J. A. Zeevaart, M. Koornneef // *Plant Physiology*. – 1996. – Vol. 110. – № 1. – P. 233–240. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.233>
 128. Leitch, A. R. Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants / A. R. Leitch, I. J. Leitch // *Science*. – 2008. – Vol. 320. – № 5875. – P. 481–483. <https://doi.org/10.1126/science.1153585>
 129. Lemon, B. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control / B. Lemon, R. Tjian // *Genes and Development*. – 2000. – Vol. 14. – № 20. – P. 2551–2569. <https://doi.org/10.1101/gad.831000>
 130. Levene, H. Robust tests for equality of variances / H. Levene // *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling* / Ingram Olkin, Harold Hotelling, et al. (eds.). –

- Stanford University Press, 1960. – P. 278–292.
131. Li, J. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of bHLH-MYC Family Genes from Mustard That May Be Important in Trichome Formation / J. Li, G. Li, C. Zhu, S. Wang, S. Zhang, F. Li, H. Zhang, R. Sun, L. Yuan, G. Chen, X. Tang, C. Wang, S. Zhang // *Plants*. – 2025. – Vol. 14. – № 2. – Article 268. <https://doi.org/10.3390/plants14020268>
 132. Li, S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis / S. Li // *Plant Signaling and Behavior*. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – Article e27522. <https://doi.org/10.4161/psb.27522>
 133. Li, X. ‘Pink cotton candy’—a new dye-free cotton / X. Li, M. Mitchell, V. Rolland, S. Allen, C. MacMillan, F. Pettolino // *Plant Biotechnology Journal*. – 2023. – Vol. 21. – № 4. – P. 677–679. <https://doi.org/10.1111/pbi.13990>
 134. Li, X. A large insertion in bHLH transcription factor BrTT8 resulting in yellow seed coat in *Brassica rapa* / X. Li, L. Chen, M. Hong, Y. Zhang, F. Zu, J. Wen, B. Yi, C. Ma, J. Shen, J. Tu, T. Fu // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 9. – Article e44145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044145>
 135. Li, X. Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis* / X. Li, X. Duan, H. Jiang, Y. Sun, Y. Tang, Z. Yuan, J. Guo, W. Liang, L. Chen, J. Yin, H. Ma, J. Wang, D. Zhang // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – № 4. – P. 1167–1184. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080580>
 136. Li, Y. TRANSPARENT TESTA 16 collaborates with the MYB-bHLH-WD40 transcriptional complex to produce brown fiber cotton / Y. Li, T. Yao, C. Fu, N. Wang, Z. Xu, N. Yang, X. Zhang, T. Wen, Z. Lin // *Plant Physiology*. – 2024. – Vol. 196. – № 4. – P. 2669–2684. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad530>
 137. Li, Y.-J. A comparative proteomic analysis provides insights into pigment biosynthesis in brown color fiber / Y.-J. Li, X.-Y. Zhang, F.-X. Wang, C.-L. Yang, F. Liu, G.-X. Xia, J. Sun // *Journal of Proteomics*. – 2013. – Vol. 78. – P. 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.10.005>
 138. Li, T. Comparative lipidomics analysis provides new insights into the metabolic basis of color formation in green cotton fiber / T. Li, C. Zheng, J. Wu, W. Xu, T. Yan, J. Liu, L. Zhang, Z. Tang, Y. Fan, H. Guo, F. Zeng // *Plants*. – 2024. – Vol. 13. – № 21. – Article 3063. <https://doi.org/10.3390/plants13213063>
 139. Li, Y. J. New clues concerning pigment biosynthesis in green colored fiber provided by proteomics-based analysis / Y. J. Li, S. C. Sun, X. Y. Zhang, et al. // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2018. – Vol. 17. – P. 46–53. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61692-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61692-7)
 140. Lian, T. Crystal Structure of Tetrameric *Arabidopsis* MYC2 Reveals the Mechanism of Enhanced Interaction with DNA / T. Lian, Y. Xu, L. Li, X.-D. Su // *Cell Reports*. – 2017. – Vol. 19. – № 7. – P. 1334–1342. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.057>

141. Liang, J. Genome-wide identification and expression analysis of the bHLH gene family in passion fruit (*Passiflora edulis*) and its response to abiotic stress / J. Liang, Y. Fang, C. An, Y. Yao, X. Wang, W. Zhang, R. Liu, L. Wang, M. Aslam, Y. Cheng, Y. Qin, P. Zheng // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – Vol. 225. – P. 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.076>
142. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25. – № 4. – P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.126>
143. Ling, F. Plant special cell — cotton fiber / F. Ling, W.-R. Hu, Y. Yang, B. Li // Botany / Ed. by J. Mworio. – 2012. – P. 211–226.
144. Liu, B. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution / B. Liu, J. F. Wendel // Current Genomics. – 2002. – Vol. 3. – P. 489–505.
145. Liu, C. A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins / C. Liu, X. Wang, V. Shulaev, R. A. Dixon // Nature Plants. – 2016. – Vol. 2. – № 12. – Article 16182. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.182>
146. Liu, H.-F. Flavonoid biosynthesis controls fiber color in naturally colored cotton / H.-F. Liu, C. Luo, W. Song, H. Shen, G. Li, Z.-G. He, W. G. Chen, Y. Y. Cao, F. Huang, S. W. Tang, P. Hong, E. F. Zhao, J. Zhu, D. He, S. Wang, G. Y. Huo, H. Liu // PeerJ. – 2018. – Vol. 6. – Article e4537. <https://doi.org/10.7717/peerj.4537>
147. Liu, B. H. Targeting cancer addiction for SALL4 by shifting its transcriptome with a pharmacologic peptide / B. H. Liu, C. Jobichen, C. S. B. Chia, T. H. M. Chan, J. P. Tang, T. X. Y. Chung, J. Li, A. Poulsen, A. W. Hung, X. Koh-Stenta, Y. S. Tan, C. S. Verma, H. K. Tan, C. S. Wu, F. Li, J. Hill, J. Joy, H. Yang, L. Chai, J. Sivaraman, D. G. Tenen // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Vol. 115. – № 30. – P. E7119–E7128. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801253115>
148. Liu, Z. Cotton metabolism regulatory network: unraveling key genes and pathways in fiber development and growth regulation / Z. Liu, L. Fan, S. Shu, G. Qanmber, E. Chen, J. Huang, F. Li, Z. Yang // Plant Communications. – 2025. – Vol. 6. – № 3. – Article 101221. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.101221>
149. Lloyd, A. Advances in the MYB–bHLH–WD Repeat (MBW) Pigment Regulatory Model: Addition of a WRKY Factor and Co-option of an Anthocyanin MYB for Betalain Regulation / A. Lloyd, A. Brockman, L. Aguirre, A. Campbell, A. Bean, A. Cantero, A. Gonzalez // Plant and Cell Physiology. – 2017. – Vol. 58. – № 9. – P. 1431–1441. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx075>
150. Lynch, M. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes / M. Lynch, J. S. Conery // Science. – 2000. – Vol. 290. – № 5494. – P. 1151–1155.

- <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1151>
151. Lu, N. Characterization of two TT2-type MYB transcription factors regulating proanthocyanidin biosynthesis in tetraploid cotton, *Gossypium hirsutum* / N. Lu, M. Roldan, R. A. Dixon // *Planta*. – 2017. – Vol. 246. – № 2. – P. 323–335. [https://doi.org/10.1534/g3.117.300108](https://doi.org/10.1007/s00425-017-2682-Lu, Q. Transcriptome Analysis Suggests That Chromosome Introgression Fragments from Sea Island Cotton (<i>Gossypium barbadense</i>) Increase Fiber Strength in Upland Cotton (<i>Gossypium hirsutum</i>) / Q. Lu, Y. Shi, X. Xiao, P. Li, J. Gong, W. Gong, A. Liu, H. Shang, J. Li, Q. Ge, W. Song, S. Li, Z. Zhang, M. H. O. Rashid, R. Peng, Y. Yuan, J. Huang // <i>G3: Genes|Genomes|Genetics</i>. – 2017. – Vol. 7. – № 10. – P. 3469–3479. <a href=)
 152. Ludwig, S. R. Maize R gene family: tissue-specific helix-loop-helix proteins / S. R. Ludwig, S. R. Wessler // *Cell*. – 1990. – Vol. 62. – № 5. – P. 849–851. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90259-h](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90259-h)
 153. Luscombe, N. M. An overview of the structures of protein-DNA complexes / N. M. Luscombe, S. E. Austin, H. M. Berman, J. M. Thornton // *Genome Biology*. – 2000. – Vol. 1. – № 1. – P. 1.1–1.10. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-1-reviews001>
 154. Ma, M. Structure of pigment compositions and radical scavenging activity of naturally green-colored cotton fiber / M. Ma, M. Hussain, H. Memon, W. Zhou // *Cellulose*. – 2016. – Vol. 23. – № 1. – P. 955–963. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0830-9>
 155. Macas, J. In Depth Characterization of Repetitive DNA in 23 Plant Genomes Reveals Sources of Genome Size Variation in the Legume Tribe Fabae / J. Macas, P. Novák, J. Pellicer, J. Čížková, A. Koblížková, P. Neumann et al. // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – № 11. – P. e0143424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143424>
 156. Magadum, S. Gene duplication as a major force in evolution / S. Magadum, U. Banerjee, P. Murugan, D. Gangapur, R. Ravikesavan // *Journal of Genetics*. – 2013. – Vol. 92. – № 1. – P. 155–161. <https://doi.org/10.1007/s12041-013-0212-8>
 157. Malik, S. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells / S. Malik, R. G. Roeder // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2000. – Vol. 25. – № 6. – P. 277–283. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01596-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01596-6)
 158. Malik, W. Transcriptome analysis of pigment related genes in colored cotton / W. Malik, A. A. Khan, H. M. N. Cheema, U. Aslam, M. Z. Iqbal, A. Qayyum, A. Yasmeen, N. Bibi // *Int. J. Agric. Biol.* – 2015. – Vol. 17. – № 1. – P. 205–210.
 159. Martin, C. MYB transcription factors in plants / C. Martin, J. Paz-Ares // *Trends Genet.* – 1997. – Vol. 13. – № 2. – P. 67–73. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(96\)10049-4](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(96)10049-4)
 160. Meinert, M. C. Changes in biochemical composition of the cell wall of the cotton fiber during development / M. C. Meinert, D. P. Delmer // *Plant Physiol.* – 1977. – Vol. 59. – № 6. – P. 1088–

1097. <https://doi.org/10.1104/pp.59.6.1088>
161. Mikhailova A. S. The genes determining synthesis of pigments in cotton / A. S. Mikhailova, K. V. Strygina, E. K. Khlestkina // *Biological Communications*. — 2019. — Vol. 64, № 2. — P. 133–145. — DOI: 10.21638/spbu03.2019.205.
 162. Mikhailova A. S. *In silico analysis* of the regulatory gene families for proanthocyanidins biosynthesis in the genus *Gossypium* L. / A. S. Mikhailova, K. V. Strygina, E. K. Khlestkina // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. — 2022. — Vol. 46, № 5. — P. 743–761. — DOI: 10.55730/1300-011X.3039.
 163. Mikhailova A. S. Candidate genes for brown fiber in cotton revealed among the *R2R3-MYB* and *bHLH-MYC* gene families / A. S. Mikhailova, N. A. Shvachko, L. P. Podolnaya, N. B. Brutch, E. K. Khlestkina // *Journal of Natural Fibers*. — 2024. — Vol. 21, № 1. — Art. 2399930. — DOI: 10.1080/15440478.2024.2399930.
 164. Mikhailova A.S. Expression of phenylpropanoid and flavonoid pathway genes in naturally colored cotton during late fiber development / Mikhailova A.S., Podolnaya L.P., Khlestkina E.K. // *Plant Research* — 2026 — Vol. 1 — 100005, ISSN 3117-5821 — DOI: 10.1016/j.plares.2026.100005.
 165. Mishra, A. K. Structure and regulatory networks of WD40 protein in plants / A. K. Mishra, S. Puranik, M. Prasad // *J. Plant Biochem. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 21. – № Suppl 1. – P. 32–39. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0134-1>
 166. Mitsis, T. Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review) / T. Mitsis, A. Efthimiadou, F. Bacopoulou, D. Vlachakis, G. Chrousos, E. Eliopoulos // *World Academy of Sciences Journal*. – 2020. – Vol. 2. – № 1. – P. 3–8. <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.32>
 167. Morishita, T. *Arabidopsis* NAC Transcription Factor, ANAC078, Regulates Flavonoid Biosynthesis under High-light / T. Morishita, Y. Kojima, T. Maruta, A. Nishizawa-Yokoi, Y. Yabuta, S. Shigeoka // *Plant and Cell Physiology*. – 2009. – Vol. 50. – № 12. – P. 2210–2222. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp159>
 168. Nechepurenko, I. V. Structure of oligomeric proanthocyanidins from *Hedysarum theinum* roots studied by thiolysis and MALDI-TOF MS / I. V. Nechepurenko, N. I. Komarova, Yu. V. Gerasimova, V. V. Koval', M. P. Polovinka, D. V. Korchagina, N. F. Salakhutdinov // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2009. – Vol. 45. – № 1. – P. 32–39. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9216-2>
 169. Nesi, N. The TT8 Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of *DFR* and *BAN* Genes in *Arabidopsis* Siliques / N. Nesi, I. Debeaujon, C. Jond, G. Pelletier, M. Caboche, L. Lepiniec // *The Plant Cell*. – 2000. – Vol. 12. – № 10. – P. 1863–1878. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.10.1863>

170. Nesi, N. The *Arabidopsis* TT2 Gene Encodes an R2R3 MYB Domain Protein That Acts as a Key Determinant for Proanthocyanidin Accumulation in Developing Seed / N. Nesi, C. Jond, I. Debeaujon, M. Caboche, L. Lepiniec // *The Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13. – № 9. – P. 2099–2114. <https://doi.org/10.1105/tpc.01009>
171. Ni, Z. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids / Z. Ni, E.D. Kim, M. Ha, E. Lackey, J. Liu, Y. Zhang, Q. Sun, Z. J. Chen // *Nature*. – 2009. – Vol. 457. – P. 327–331.
172. Oda, M. Identification of indispensable residues for specific DNA-binding in the imperfect tandem repeats of c-MYB R2R3 / M. Oda, K. Furukawa, K. Ogata, A. Sarai, S. Ishii, Y. Nishimura, H. Nakamura // *Protein Engineering Design and Selection*. – 1997. – Vol. 10. – № 12. – P. 1407–1414. <https://doi.org/10.1093/protein/10.12.140>
173. Otto, S. P. Polyploid Incidence and Evolution / S. P. Otto, J. Whitton // *Annual Review of Genetics*. – 2000. – Vol. 34. – № 1. – P. 401–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>
174. Page, M. The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis / M. Page, N. Sultana, K. Paszkiewicz, H. Florance, N. Smirnoff // *Plant, Cell and Environment*. – 2012. – Vol. 35. – № 2. – P. 388–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02369.x>
175. Paterson, A. H. Repeated polyploidization of *Gossypium* genomes and the evolution of spinnable cotton fibres / A. H. Paterson, J. F. Wendel, H. Gundlach, H. Guo, J. Jenkins, D. Jin, D. Llewellyn, K. C. Showmaker, S. Shu, J. Udall, M. J. Yoo, R. Byers, W. Chen, A. Doron-Faigenboim, M. V. Duke, L. Gong, J. Grimwood, C. Grover, K. Grupp, G. Hu, T. H. Lee, J. Li, L. Lin, T. Liu, B. S. Marler, J. T. Page, A. W. Roberts, E. Romanel, W. S. Sanders, E. Szadkowski, X. Tan, H. Tang, C. Xu, J. Wang, Z. Wang, D. Zhang, L. Zhang, H. Ashrafi, F. Bedon, J. E. Bowers, C. L. Brubaker, P. W. Chee, S. Das, A. R. Gingle, C. H. Haigler, D. Harker, L. V. Hoffmann, R. Hovav, D. C. Jones, C. Lemke, S. Mansoor, M. ur Rahman, L. N. Rainville, A. Rambani, U. K. Reddy, J. K. Rong, Y. Saranga, B. E. Scheffler, J. A. Scheffler, D. M. Stelly, B. A. Triplett, A. Van Deynze, M. F. Vaslin, V. N. Waghmare, S. A. Walford, R. J. Wright, E. A. Zaki, T. Zhang, E. S. Dennis, K. F. Mayer, D. G. Peterson, D. S. Rokhsar, X. Wang, J. Schmutz // *Nature*. – 2012. – Vol. 492. – № 7429. – P. 423–427. <https://doi.org/10.1038/nature11798>
176. Payne, C. T. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1 / C. T. Payne, F. Zhang, A. M. Lloyd // *Genetics*. – 2000. – Vol. 156. – № 3. – P. 1349–1362. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.3.1349>
177. Pear, J. R. Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase / J. R. Pear, Y. Kawagoe, W. E. Schreckengost, D. P. Delmer, D. M. Stalker // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. –

1996. – Vol. 93. – № 22. – P. 12637–12642. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12637>
178. Peng, J. ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators / J. Peng, D. E. Richards, N. M. Hartley, G. P. Murphy, K. M. Devos, J. E. Flintham, J. Beales, L. J. Fish, A. J. Worland, F. Pelica, D. Sudhakar, P. Christou, J. W. Snape, M. D. Gale, N. P. Harberd // *Nature*. – 1999. – Vol. 401. – № 6755. – P. 711–714. <https://doi.org/10.1038/44358>
179. Peng, Q.-Z. An integrated approach to demonstrating the ANR pathway of proanthocyanidin biosynthesis in plants / Q.-Z. Peng, Y. Zhu, Z. Liu, C. Du, K. G. Li, D. Y. Xie // *Planta*. – 2012. – Vol. 236. – № 3. – P. 901–918. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1670-6>
180. Petroni, K. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs / K. Petroni, C. Tonelli // *Plant Science*. – 2011. – Vol. 181. – № 3. – P. 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.009>
181. Pinnika, G. The brown fiber phenotype in cotton line SA-40 is linked to a missing Ty3-like retrotransposon upstream of the *GhTT2_A07* / G. Pinnika, G. N. Thyssen, C. A. Madison, P. Li, D. D. Fang, M. Naoumkina, D. J. Hinchliffe // *Frontiers in Plant Science*. – 2025. – Vol. 16. – Article 1668965. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1668965>
182. Ponomarenko, J. V. ACTIVITY: a database on DNA/RNA sites activity adapted to apply sequence-activity relationships from one system to another / J. V. Ponomarenko // *Nucleic Acids Research*. – 2001. – Vol. 29. – № 1. – P. 284–287. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.284>
183. Qi, T. The Jasmonate-ZIM-Domain Proteins Interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB Complexes to Regulate Jasmonate-Mediated Anthocyanin Accumulation and Trichome Initiation in *Arabidopsis thaliana* / T. Qi, S. Song, Q. Ren, D. Wu, H. Huang, Y. Chen, M. Fan, W. Peng, C. Ren, D. Xie // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 5. – P. 1795–1814. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083261>
184. Raff, R. A. *The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form* / R. A. Raff. – Chicago : University of Chicago Press, 1996. – 520 p.
185. Ramsey, J. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants / J. Ramsey, D. W. Schemske // *Annual Review of Ecology and Systematics*. – 1998. – Vol. 29. – P. 467–501.
186. Ran, L. Specific expression of a fusion gene *Lc-GhPAP1D* results in colored cotton fibers with increased flavonoid and lignin synthesis, but impaired elongation and secondary cell wall deposition / L. Ran, Y. Li, L. Chen, T. Mo, N. Liu, S. Xu, Y. Su, C. Wang, A. Liang, J. Zeng, W. Yu, J. Kong, Y. Xiao // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2025.02.044>
187. Rebeiz, M. Enhancer evolution and the origins of morphological novelty / M. Rebeiz, M. Tsiantis // *Current Opinion in Genetics and Development*. – 2017. – Vol. 45. – P. 115–123.

- <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.04.006>
188. Renny-Byfield, S. Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants / S. Renny-Byfield, J. F. Wendel // *American Journal of Botany*. – 2014. – Vol. 101. – № 10. – P. 1711–1725. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400119>
 189. Ribereau-Gayon, P. *Plant phenolics* / P. Ribereau-Gayon. – USA: Oliver and Boyd, 1972. – 254 p.
 190. Rodríguez-Mega, E. Role of transcriptional regulation in the evolution of plant phenotype: A dynamic systems approach / E. Rodríguez-Mega, A. Piñeyro-Nelson, C. Gutierrez, B. García-Ponce, M. D. L. P. Sánchez, E. Zluhan-Martínez, A. Garay-Arroyo // *Developmental Dynamics*. – 2015. – Vol. 244. – № 9. – P. 1074–1095. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24268>
 191. Rutland, C. A. The Impact of Polyploidization on the Evolution of Weed Species: Historical Understanding and Current Limitations / C. A. Rutland, N. D. Hall, J. S. McElroy // *Frontiers in Agronomy*. – 2021. – Vol. 3. – P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.626454>
 192. Ryser, U. Ultrastructure and chemistry of soluble and polymeric lipids in cell walls from seed coats and fibres of *Gossypium* species / U. Ryser, P. J. Holloway // *Planta*. – 1985. – Vol. 163. – № 2. – P. 151–163. <https://doi.org/10.1007/BF00393501>
 193. Saikumar, P. Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in MYB-DNA interactions / P. Saikumar, R. Murali, E. P. Reddy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1990. – Vol. 87. – № 21. – P. 8452–8456. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8452>
 194. Saito, K. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens* / K. Saito, M. Kobayashi, Z. Gong, Y. Tanaka, M. Yamazaki // *The Plant Journal*. – 1999. – Vol. 17. – № 2. – P. 181–189. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00365.x>
 195. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – Vol. 4. – № 4. – P. 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
 196. Salih, H. Genome-wide characterization, identification, and expression analysis of the WD40 protein family in cotton / H. Salih, W. Gong, M. Mkulama, X. Du // *Genome*. – 2018. – Vol. 61. – № 7. – P. 539–547. <https://doi.org/10.1139/gen-2017-0237>
 197. Salunkhe, D. K. Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes / D. K. Salunkhe, S. J. Jadhav, S. S. Kadam, J. K. Chavan // *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 1983. – Vol. 17. – № 3. – P. 277–305. <https://doi.org/10.1080/10408398209527350>
 198. Saitoh, K. Allelic diversification at the C (OsC1) locus of wild and cultivated rice: nucleotide changes associated with phenotypes / K. Saitoh, K. Onishi, I. Mikami, K. Thidar, Y. Sano // *Genetics*. – 2004. – Vol. 168. – № 2. – P. 997–1007. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.018390>

199. Santos-Buelga, C. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties / C. Santos-Buelga, E. M. Francia-Aricha, M. T. Escribano-Bailón // Food Chemistry. – 1995. – Vol. 53. – № 2. – P. 197–201. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)90788-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)90788-9).
200. Schmutz, A. Caffeic acid and glycerol are constituents of the suberin layers in green cotton fibres / A. Schmutz, T. Jenny, N. Amrhein, U. Ryser // Planta. – 1993. – Vol. 189. – № 3. – P. 453–460. <https://doi.org/10.1007/BF00194445>
201. Schmutz, A. A caffeoyl-fatty acid-glycerol ester from wax associated with green cotton fibre suberin / A. Schmutz, T. Jenny, U. Ryser // Phytochemistry. – 1994. – Vol. 36. – № 6. – P. 1343–1346. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89721-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89721-6)
202. Scott, M. P. Development: The natural history of genes / M. P. Scott // Cell. – 2000. – Vol. 100. – № 1. – P. 27–40.
203. Seagull, R. W. Cytoskeletal involvement in cotton fiber growth and development / R. W. Seagull // Micron. – 1993. – Vol. 24. – № 6. – P. 643–660. [https://doi.org/10.1016/0968-4328\(93\)90042-Y](https://doi.org/10.1016/0968-4328(93)90042-Y)
204. Senchina, D. S. Rate Variation Among Nuclear Genes and the Age of Polyploidy in *Gossypium* / D. S. Senchina // Molecular Biology and Evolution. – 2003. – Vol. 20. – № 4. – P. 633–643. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg065>
205. Shapiro, S. S. An analysis of variance test for normality (complete samples) / S. S. Shapiro, M. B. Wilk // Biometrika. – 1965. – Vol. 52. – № 3–4. – P. 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
206. Shim, J. Natural variation in wild *Gossypium* species as a tool to broaden the genetic base of cultivated cotton / J. Shim, P. K. Mangat, R. B. Angeles-Shim // Journal of Plant Sciences and Current Research. – 2018. – Vol. 2. – Article 005.
207. Smitha, P. K. Genome wide search to identify reference genes candidates for gene expression analysis in *Gossypium hirsutum* / P. K. Smitha, K. Vishnupriyan, A. S. Kar, M. Anil Kumar, C. Bathula, K. N. Chandrashekara, S. K. Dhar, M. Das // BMC Plant Biology. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – Article 405. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1988-3>
208. Sonnhammer, E. L. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes / E. L. Sonnhammer, E. V. Koonin // Trends in Genetics. – 2002. – Vol. 18. – № 12. – P. 619–620. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02793-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02793-2)
209. Srinivasan, V. Structure of the Yeast WD40 Domain Protein Cia1, a Component Acting Late in Iron-Sulfur Protein Biogenesis / V. Srinivasan, D. J. A. Netz, H. Webert, J. Mascarenhas, A. J. Pierik, H. Michel, R. Lill // Structure. – 2007. – Vol. 15. – № 10. – P. 1246–1257. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.08.009>
210. Stracke, R. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls

- flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling / R. Stracke, H. Ishihara, G. Huep, A. Barsch, F. Mehrstens, K. Niehaus, B. Weisshaar // *The Plant Journal*. – 2007. – Vol. 50. – № 4. – P. 660–677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03078.x>
211. Stracke, R. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana* / R. Stracke, M. Werber, B. Weisshaar // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2001. – Vol. 4. – № 5. – P. 447–456. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00199-0)
 212. Stephens, S. G. Seed fibre colour in gossypium and its possible significance in the evolution of domesticated cottons / S. G. Stephens // *Journal of Genetics*. – 1977. – Vol. 63. – P. 63–78. <https://doi.org/10.1007/BF02984277>
 213. Strygina, K. V. Genetic control of anthocyanin pigmentation of potato tissues / K. V. Strygina, A. V. Kochetov, E. K. Khlestkina // *BMC Genetics*. – 2019. – Vol. 20. – № Suppl. 1. – Article 27. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0728-x>
 214. Strygina, K. Cotton genome evolution and features of its structural and functional organization / K. Strygina, E. Khlestkina, L. Podolnaya // *Biological Communications*. – 2020. – Vol. 65. – № 1. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2020.102>
 215. Strygina, K. V. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone / K. V. Strygina, A. Börner, E. K. Khlestkina // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol. 17. – № Suppl. 1. – Article 184. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1122-3>
 216. Strygina, K. V. MYC-like transcriptional factors in wheat: structural and functional organization of the subfamily I members / K. V. Strygina, E. K. Khlestkina // *BMC Plant Biology*. – 2019. – Vol. 19. – № Suppl. 1. – Article 50. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1639-8>
 217. Strygina, K. V. Structural and functional divergence of the *Mpc1* genes in wheat and barley / K. V. Strygina, E. K. Khlestkina // *BMC Evolutionary Biology*. – 2019. – Vol. 19. – № Suppl. 1. – Article 45. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1378-3>
 218. Student. The probable error of a mean / Student // *Biometrika*. – 1908. – P. 1–25.
 219. Sun, S. Transcriptome sequencing and metabolome analysis reveal genes involved in pigmentation of green-colored cotton fibers / S. Sun, X. Xiong, Q. Zhu, Y. Li, J. Sun // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 19. – Article 4838. <https://doi.org/10.3390/ijms20194838>
 220. Sun, Y. Biochemical and Expression Analyses Revealed the Involvement of Proanthocyanidins and/or Their Derivatives in Fiber Pigmentation of *Gossypium stocksii* / Y. Sun, D. Zhang, H. Zheng, Y. Wu, J. Mei, L. Ke, D. Yu, Y. Sun // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 2. – Article 1008. <https://doi.org/10.3390/ijms23021008>
 221. Szklarczyk, D. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and

- functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest / D. Szklarczyk, R. Kirsch, M. Koutrouli, K. Nastou, F. Mehryary, R. Hachilif, A. L. Gable, T. Fang, N. T. Doncheva, S. Pyysalo, P. Bork, L. J. Jensen, C. von Mering // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51. – № D1. – P. D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
222. Tan, J. The flavonoid pathway regulates the petal colors of cotton flower / J. Tan, M. Wang, L. Tu, Y. Nie, Y. Lin, X. Zhang // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 8. – Article e72364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072364>
223. Tang, Z. Quantitative metabolome and transcriptome analysis reveals complex regulatory pathway underlying photoinduced fiber color formation in cotton / Z. Tang, Y. Fan, L. Zhang, C. Zheng, A. Chen, Y. Sun, H. Guo, J. Wu, T. Li, Y. Fan, X. Lian, H. Guo, X. Ma, H. Chen, F. Zeng // *Gene*. – 2021. – Vol. 767. – Article 145180. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145180>
224. Tanner, G. J. Synthesis of 3,4-cis-[³H]leucocyanidin and enzymatic reduction to catechin / G. J. Tanner, K. N. Kristiansen // *Analytical Biochemistry*. – 1993. – Vol. 209. – № 2. – P. 274–277. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1119>
225. Tautz, D. Evolution of transcriptional regulation / D. Tautz // *Current Opinion in Genetics and Development*. – 2000. – Vol. 10. – № 5. – P. 575–579. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00130-1](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00130-1)
226. Tokumoto, H. Changes in the sugar composition and molecular mass distribution of matrix polysaccharides during cotton fiber development / H. Tokumoto, K. Wakabayashi, S. Kamisaka, T. Hoson // *Plant and Cell Physiology*. – 2002. – Vol. 43. – № 4. – P. 411–418. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf048>
227. Toledo-Ortiz, G. The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family / G. Toledo-Ortiz, E. Huq, P. H. Quail // *The Plant Cell*. – 2003. – Vol. 15. – № 8. – P. 1749–1770. <https://doi.org/10.1105/tpc.013839>
228. Tukey, J. Comparing individual means in the Analysis of Variance / J. Tukey // *Biometrics*. – 1949. – Vol. 5. – № 2. – P. 99–114. <https://doi.org/10.2307/3001913>
229. Tuz, R. K. ‘Braun’: the first Russian cotton cultivar with naturally colored fiber / R. K. Tuz, M. S. Asfandiirava, L. P. Podolnaya // *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. – 2023. – Vol. 184. – № 1. – P. 154–162. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-1-154-162>
230. Ulloa, M. Cotton / M. Ulloa, C. Brubaker, P. Chee // *Genome mapping and molecular breeding*. Vol. 6: Technical crops / Ed. by C. Kole. – Heidelberg, Berlin, New York, Tokyo: Springer, 2007. – P. 1–49.
231. Vandesompele, J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes / J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman // *Genome Biology*. – 2002. – Vol. 3. – № 7. – Article

- research0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
232. Veenstra, G. J. C. Gene-selective developmental roles of general transcription factors / G. J. C. Veenstra, A. P. Wolffe // Trends in Biochemical Sciences. – 2001. – Vol. 26. – № 11. – P. 665–671. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01970-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01970-3)
 233. Vikhorev, A. V. Duplicated *flavonoid 3'-hydroxylase* and *flavonoid 3',5'-hydroxylase* genes in barley genome / A. V. Vikhorev, K. V. Strygina, E. K. Khlestkina // PeerJ. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – Article e6266. <https://doi.org/10.7717/peerj.6266>
 234. Vondrak, T. Characterization of repeat arrays in ultra-long nanopore reads reveals frequent origin of satellite DNA from retrotransposon-derived tandem repeats / T. Vondrak, L. Ávila Robledillo, P. Novák, A. Koblížková, P. Neumann, J. Macas // The Plant Journal. – 2020. – Vol. 101. – № 2. – P. 484–500. <https://doi.org/10.1111/tpj.14546>
 235. Walker, A. R. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 Locus, Which Regulates Trichome Differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis*, Encodes a WD40 Repeat Protein / A. R. Walker, P. A. Davison, A. C. Bolognesi-Winfield, C. M. James, N. Srinivasan, T. L. Blundell, J. J. Esch, M. D. Marks, J. C. Gray // The Plant Cell. – 1999. – Vol. 11. – № 7. – P. 1337. <https://doi.org/10.2307/3870753>
 236. Wang, B. Structural insights into target DNA recognition by R2R3-MYB transcription factors / B. Wang, Q. Luo, Y. Li, L. Yin, N. Zhou, X. Li, J. Gan, A. Dong // Nucleic Acids Research. – 2020. – Vol. 48. – № 1. – P. 460–471. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1081>
 237. Wang, C. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of the WD40 transcription factor family and candidate gene screening for anthocyanin biosynthesis in *Rhododendron simsii* / C. Wang, Y. Tang, Y. Li, C. Hu, J. Li, A. Lyu // BMC Genomics. – 2023. – Vol. 24. – № 1. – Article 488. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09604-x>
 238. Wang, L. Genetic mapping of fiber color genes on two brown cotton cultivars in Xinjiang / L. Wang, H. Liu, X. Li, X. Xiao, X. Ai, C. Luo, L. Zhu, X. Li // SpringerPlus. – 2014. – Vol. 3. – № 1. – Article 480. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-480>
 239. Wang, L. Functional characterization of a dihydroflavanol 4-reductase from the fiber of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) / L. Wang, Y. Zhu, P. Wang, Q. Fan, Y. Wu, Q.-Z. Peng, G.-X. Xia, J.-H. Wu // Molecules. – 2016. – Vol. 21. – № 2. – Article 32. <https://doi.org/10.3390/molecules21020032>
 240. Wang, M. Reference genome sequences of two cultivated allotetraploid cottons, *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* / M. Wang, L. Tu, D. Yuan, D. Zhu, C. Shen, J. Li, F. Liu, L. Pei, P. Wang, G. Zhao, Z. Ye, H. Huang, F. Yan, Y. Ma, L. Zhang, M. Liu, J. You, Y. Yang, Z. Liu, F. Huang, B. Li, P. Qiu, Q. Zhang, L. Zhu, S. Jin, X. Yang, L. Min, G. Li, L. L. Chen, H. Zheng, K. Lindsey, Z. Lin, J. A. Udall, X. Zhang // Nature Genetics. – 2019. – Vol. 51. – № 2. –

- P. 224–229. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0282-x>
241. Wang, H. Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses / H. Wang, W. Fan, H. Li, J. Yang, J. Huang, P. Zhang // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 11. – Article e78484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078484>
 242. Wang, N. A Comparative Genome-Wide Analysis of the R2R3-MYB Gene Family Among Four *Gossypium* Species and Their Sequence Variation and Association With Fiber Quality Traits in an Interspecific *G. hirsutum* × *G. barbadense* Population / N. Wang, Q. Ma, J. Ma, W. Pei, G. Liu, Y. Cui, M. Wu, X. Zang, J. Zhang, S. Yu, L. Ma, J. Yu // Frontiers in Genetics. – 2019. – Vol. 10. – Article 741. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00741>
 243. Wang, N. Re enhances anthocyanin and proanthocyanidin accumulation to produce red foliated cotton and brown fiber / N. Wang, B. Zhang, T. Yao, C. Shen, T. Wen, R. Zhang, Y. Li, Y. Le, Z. Li, X. Zhang, Z. Lin // Plant Physiology. – 2022. – Vol. 189. – № 3. – P. 1466–1481. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac118>
 244. Wang, R.-L. The limits of selection during maize domestication / R.-L. Wang, A. Stec, J. Hey, L. Lukens, J. Doebley // Nature. – 1999. – Vol. 398. – № 6724. – P. 236–239. <https://doi.org/10.1038/18435>
 245. Wang, S. Control of Plant Trichome Development by a Cotton Fiber MYB Gene / S. Wang, J.-W. Wang, N. Yu, C.-H. Li, B. Luo, J.-Y. Gou, L. J. Wang, X.-Y. Chen // The Plant Cell. – 2004. – Vol. 16. – № 9. – P. 2323–2334. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024844>
 246. Wang, Z. Transcriptome and proteome profiling revealed the key genes and pathways involved in the fiber quality formation in brown cotton / Z. Wang, A. Rehman, Y. Jia, P. Dai, S. He, X. Wang, H. Li, L. Wang, A. Qayyum, Z. Peng, X. Du // Gene. – 2023. – Vol. 868. – Article 147374. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147374>
 247. Ware, J. O. Inheritance of lint colors in upland cotton / J. O. Ware // Agronomy Journal. – 1932. – Vol. 24. – № 7. – P. 550–562. <https://doi.org/10.2134/agronj1932.00021962002400070008x>
 248. Waterhouse, A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46. – № W1. – P. W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
 249. Weber, E. J. Kinetic studies of the reduction of aromatic AZO compounds in anaerobic sediment/water systems / E. J. Weber, N. Lee Wolfe // Environmental Toxicology and Chemistry. – 1987. – Vol. 6. – № 12. – P. 911–919. <https://doi.org/10.1002/etc.5620061202>
 250. Wen, T. Linkage and association mapping reveals the genetic basis of brown fibre (*Gossypium hirsutum*) / T. Wen, M. Wu, C. Shen, B. Gao, D. Zhu, X. Zhang, C. You, Z. Lin // Plant

- Biotechnology Journal. – 2018. – Vol. 16. – № 9. – P. 1654–1666.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12902>
251. Wendel, J. F. Polyploidy and the evolutionary history of cotton / J. F. Wendel, R. C. Cronn // Advances in Agronomy. – 2003. – Vol. 78. – P. 139–186.
 252. Wendel, J. F. Genome evolution in polyploids / J. F. Wendel // Plant Molecular Biology. – 2000. – Vol. 42. – № 1. – P. 225–249.
 253. Wendel, J. F. The wondrous cycles of polyploidy in plants / J. F. Wendel // American Journal of Botany. – 2015. – Vol. 102. – № 11. – P. 1753–1756. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500320>
 254. Wheeler, L. C. Transcription Factors Evolve Faster Than Their Structural Gene Targets in the Flavonoid Pigment Pathway / L. C. Wheeler, J. F. Walker, J. Ng, R. Deanna, A. Dunbar-Wallis, A. Backes, P. H. Pezzi, M. V. Palchetti, H. M. Robertson, A. Monaghan, L. B. de Freitas, G. E. Barboza, E. Moyroud, S. D. Smith // Molecular Biology and Evolution. – 2022. – Vol. 39. – № 3. – P. 1–33. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac044>
 255. Wilson, A. C. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization / A. C. Wilson, L. R. Maxson, V. M. Sarich // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1974. – Vol. 71. – № 7. – P. 2843–2847. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.7.2843>
 256. Winkel-Shirley, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology / B. Winkel-Shirley // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 126. – № 2. – P. 485–493. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.485>
 257. Wu, Z. Genome-wide analysis of WD40 protein family and functional characterization of BvWD40-82 in sugar beet / Z. Wu, T. Zhang, J. Li, S. Chen, I. R. Grin, D. O. Zharkov, B. Yu, H. Li // Frontiers in Plant Science. – 2023. – Vol. 14. – Article 1185440. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1185440>
 258. Xi Wang, B. Genome-wide identification of bHLH transcription factors and functional analysis in salt gland development of the recretahalophyte sea lavender (*Limonium bicolor*) / B. Xi Wang, B. Wang, F. Yuan // Horticulture Research. – 2024. – Vol. 11. – № 4. – Article uhae036. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae036>
 259. Xiao Liang, D. Genome-wide identification of the bHLH transcription factor family and analysis of bHLH genes related to puerarin biosynthesis in *Pueraria lobata* var. *thomsonii* (Benth.) / D. Xiao Liang, D. Huang, Z. Wu, X. Shang, S. Cao, W. Zeng, L. Lu, P. Shi, H. Yan // Plant Gene. – 2023. – Vol. 33. – Article 100390. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2022.100390>
 260. Xiao, Y.-H. Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fibers / Y.-H. Xiao, Z.-S. Zhang, M.-H. Yin, M. Luo, X.-B. Li, L. Hou, Y. Pei // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2007. – Vol. 358. – № 1. – P. 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.084>

261. Xiao, Y.-H. Transcriptional Analysis of the relationship of proanthocyanidins biosynthesis to the brown pigmentation in cotton fiber / Y.-H. Xiao, M. Luo, Z.-S. Zhang, M.-H. Yin, J. Dong // *Cotton Science*. – 2008. – Vol. 20. – № 2.1. – P. 47. <https://doi.org/10.11963/Supp47>
262. Xiao, Y.-H. Transcriptome and biochemical analyses revealed a detailed proanthocyanidin biosynthesis pathway in brown cotton fiber / Y.-H. Xiao, Q. Yan, H. Ding, M. Luo, L. Hou, M. Zhang, D. Yao, H.-S. Liu, X. Li, J. Zhao, Y. Pei // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – Article e86344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086344>
263. Xie, D.-Y. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis / D.-Y. Xie, S. B. Sharma, N. L. Paiva, D. Ferreira, R. A. Dixon // *Science*. – 2003. – Vol. 299. – № 5605. – P. 396–399. <https://doi.org/10.1126/science.1078540>
264. Xie, D.-Y. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? / D.-Y. Xie, R. A. Dixon // *Phytochemistry*. – 2005. – Vol. 66. – № 18. – P. 2127–2144. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.008>.
265. Xie, S. Combined analysis of transcriptomes and metabolomes reveals that MeJA-mediated flavonoid biosynthesis is crucial for pigment deposition in naturally colored green cotton fibers / S. Xie, K. Chen, R. Tang, X. Li, Y. Wei, Y. Cheng, S. Tang, W. Chen, Q. Xie, Z. Meng, A. Ismayil, X. Jin, F. Wang, H. Liu, H. Li // *Genes*. – 2025. – Vol. 16. – № 5. – Article 599. <https://doi.org/10.3390/genes16050599>
266. Xie, W. GLABRA3-mediated trichome branching requires transcriptional repression of MICROTUBULE-DESTABILIZING PROTEIN25 / W. Xie, Y. Zhao, X. Deng, R. Chen, Z. Qiang, P. García-Caparrós, T. Mao, T. Qin // *Plant Physiology*. – 2024. – Vol. 197. – № 1. – Article kiae563. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae563>
267. Xu, W. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes / W. Xu, C. Dubos, L. Lepiniec // *Trends in Plant Science*. – 2015. – Vol. 20. – № 3. – P. 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.001>
268. Yamaguchi-Shinozaki, K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress / K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki // *The Plant Cell*. – 1994. – Vol. 6. – № 2. – P. 251–264. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.2.251>
269. Yanhui, C. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family / C. Yanhui, Y. Xiaoyuan, H. Kun, L. Meihua, L. Jigang, G. Zhaofeng, L. Zhiqiang, Z. Yunfei, W. Xiaoxiao, Q. Xiaoming, S. Yunping, L. Zhang, D. Xiaohui, L. Jingchu, D. Xing-Wang, C. Zhangliang, G. Hongya, Q. Li-Jia // *Plant Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 60. – № 1. – P. 107–124. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2910-y>
270. Yang, F. The Regulatory Role of R2R3-MYB Family Genes in Trichome Formation in *Solanum*

- aculeatissimum / F. Yang, Y. Yang, W. Li, Q. Cai, M. Miao, Z. Sun, L. Li // *Agronomy*. – 2025. – Vol. 15. – № 11. – Article 2637. <https://doi.org/10.3390/agronomy15112637>
271. Yan, Q. Up-regulation of *GhTT2-3A* in cotton fibres during secondary wall thickening results in brown fibres with improved quality / Q. Yan, Y. Wang, Q. Li, Z. Zhang, H. Ding, Y. Zhang, H. Liu, M. Luo, D. Liu, W. Song, H. Liu, D. Yao, X. Ouyang, Y. Li, X. Li, Y. Pei, Y. Xiao // *Plant Biotechnology Journal*. – 2018. – Vol. 16. – № 10. – P. 1735–1747. <https://doi.org/10.1111/pbi.12910>
272. Yang, F. S. Chromosome-level genome assembly of a parent species of widely cultivated azaleas / F. S. Yang, S. Nie, H. Liu, T. L. Shi, X. C. Tian, S. S. Zhou, Y. T. Bao, K. H. Jia, J. F. Guo, W. Zhao, N. An, R. G. Zhang, Q. Z. Yun, X. Z. Wang, C. Mannapperuma, I. Porth, Y. A. El-Kassaby, N. R. Street, X. R. Wang, Y. Van de Peer, J. F. Mao // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – Article 5269. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18771-4>
273. Yang, M. Comprehensive analysis of the *Spartina alterniflora* WD40 gene family reveals the regulatory role of *SaTTG1* in plant development / M. Yang, S. Chen, J. Geng, S. Gao, S. Chen, H. Li // *Frontiers in Plant Science*. – 2024. – Vol. 15. – Article 1390461. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1390461>
274. Yu, J. CottonGen: a genomics, genetics and breeding database for cotton research / J. Yu, S. Jung, C.-H. Cheng, S. P. Ficklin, T. Lee, P. Zheng, D. Jones, R. G. Percy, D. Main // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – № D1. – P. D1229–D1236. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1064>
275. Yu, X. Comparative genomic analysis of bHLH genes across multiple species uncovers a novel gene regulating ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* / X. Yu, M. Liu, J. Yu, et al. // *BMC Plant Biology*. – 2026. – Vol. 26. – Article 190. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-07891-y>
276. Zhao, W. Genome-Wide Identification and Characterization of bHLH Transcription Factors Related to Anthocyanin Biosynthesis in Red Walnut (*Juglans regia* L.) / W. Zhao, Y. Liu, L. Li, H. Meng, Y. Yang, Z. Dong, L. Wang, G. Wu // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – Vol. 12. – Article 632509. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.632509>
277. Zhang, B. Evolutionary comparison of competitive protein-complex formation of MYB, bHLH, and WDR proteins in plants / B. Zhang, D. Chopra, A. Schrader, M. Hülskamp // *Journal of Experimental Botany*. – 2019. – Vol. 70. – № 12. – P. 3197–3209. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz155>
278. Zhang, F. Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling / F. Zhang, J. Yao, J. Ke, L. Zhang, V. Q. Lam, X.-F. Xin, X. E. Zhou, J. Chen, J. Brunzelle, P. R. Griffin, M. Zhou, H. E. Xu, K. Melcher, S. Y. He // *Nature*. – 2015. – Vol. 525. – № 7568. – P. 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature14661>
279. Zhang, H. Tissue-specific expression of *StMYB3* gene involves regulating potato tuber skin and

- vascular bundle anthocyanin biosynthesis / H. Zhang, L. Yu, Y. Zhao, et al. // *Potato Research*. – 2023. – Vol. 66. – P. 159–178. <https://doi.org/10.1007/s11540-022-09577-6>
280. Zhang, T. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement / T. Zhang, Y. Hu, W. Jiang, L. Fang, X. Guan, J. Chen, J. Zhang, C. A. Saski, B. E. Scheffler, D. M. Stelly, A. M. Hulse-Kemp, Q. Wan, B. Liu, C. Liu, S. Wang, M. Pan, Y. Wang, D. Wang, W. Ye, L. Chang, W. Zhang, Q. Song, R. C. Kirkbride, X. Chen, E. Dennis, D. J. Llewellyn, D. G. Peterson, P. Thaxton, D. C. Jones, Q. Wang, X. Xu, H. Zhang, H. Wu, L. Zhou, G. Mei, S. Chen, Y. Tian, D. Xiang, X. Li, J. Ding, Q. Zuo, L. Tao, Y. Liu, J. Li, Y. Lin, Y. Hui, Z. Cao, C. Cai, X. Zhu, Z. Jiang, B. Zhou, W. Guo, R. Li, Z. J. Chen // *Nature Biotechnology*. – 2015. – Vol. 33. – № 5. – P. 531–537. <https://doi.org/10.1038/nbt.3207>
281. Zheng, H. Cloning and functional analysis of *GhGHDFR1*, a key gene of flavonoid synthesis pathway in naturally colored cotton / H. Zheng, J. Jiao, Q. Niu, N. Zhu, Y. Huang, L. Ke, S. Tang, H. Liu, Y. Sun // *Molecular Biology Reports*. – 2023. – Vol. 50. – № 6. – P. 4865–4873. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08420-6>
282. Zhi-yong, Ni. Isolation and expression analysis of two genes encoding Cinnamate 4-Hydroxylase from cotton (*Gossypium hirsutum*) / Ni Zhi-yong, Li Bo, M. Peter Neumann, Lü Meng, Fan Ling // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2014. – Vol. 13. – № 10. – P. 2102–2112. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60643-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60643-7)
283. Zhou, G. Genome-Wide Identification and Expression Profiling of MYC Transcription Factor Family in *Toona sinensis* Under Abiotic and Hormonal Stresses / G. Zhou, S. Zeng, X. Cui, Y. Liao, W. Zhang, F. Xu, D. Jiang // *Forests*. – 2025. – Vol. 16. – № 12. – Article 1756. <https://doi.org/10.3390/f16121756>
284. Zhu, Y. Genome-Wide Mining of MYB Transcription Factors in the Anthocyanin Biosynthesis Pathway of *Gossypium hirsutum* / Y. Zhu, Y. Bao // *Biochemical Genetics*. – 2021. – Vol. 59. – № 3. – P. 678–696. <https://doi.org/10.1007/s10528-021-10027-0>
285. Zhu, T. CottonFGD: an integrated functional genomics database for cotton / T. Zhu, C. Liang, Z. Meng, G. Sun, Z. Meng, S. Guo, R. Zhang // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – Article 101. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1039-x>
286. Zhu, Y. Functional characterization of an anthocyanidin reductase gene from the fibers of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) / Y. Zhu, H. Wang, Q. Peng, Y. Tang, G. Xia, J. Wu, D.-Y. Xie // *Planta*. – 2015. – Vol. 241. – № 5. – P. 1075–1089. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2238-4>

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 – Список ПЦР-праймеров, использованных в данной работе

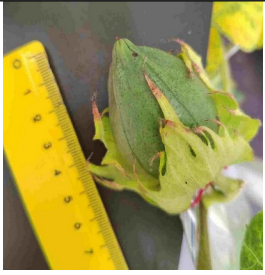
Ген	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')	Цель
<i>GhTT2-A1</i> (<i>Gohir.A07G020200</i>)	CGATTCGACAATTAGTACGG	CTCAGCAGCCTAGTATTTGTC	Секвенирование
	AAGGTAGAACAAGATTCTGCG	GGTTGAACTTTTCGAGGGTT	Секвенирование
	GACAAATACTAGGCTGCTGAG	CGATGAGTTGCAGGTGGTT	Секвенирование
	AACCCCTCGAAAAGTTCAACC	AGTGGCACCATTGTCATCA	Секвенирование
	AACCACCTGCAACTCATCG	CTACAACATGGACAGTAACATG	Секвенирование
<i>GhTT2-D1</i> (<i>Gohir.D07G019900</i>)	CTGATAGTTAGTGTGCGAAAATCG	CGGCAGCCTAGTATTTGTC	Секвенирование
	ATTCCTTCCACTTTCTCGG	CCTAGACTCGGTTGGTATC	Секвенирование
	GACAAATACTAGGCTGCCG	GATCTCGAAGCTCAACAAAT	Секвенирование
	GATACCAACCGAGTCTAGG	AGTGGCACCATTGTCATCA	Секвенирование
	ATTTGTTGAGCTTCGAGATC	GTCTCTCTCATTGGTACATTCC	Секвенирование
<i>GhTT2-A2</i> (<i>Gohir.A07G020000</i>)	ATGTTACGTTGCGTTGCGG	CATCGCTGTGAACCTCATTAG	Секвенирование
	ACAAGGGCTTAATTGCATTTTC	CTAAGTCCTTCTTTGGAGCAG	Секвенирование
	CTAATGAGGTTACAGCGATG	GGACGAGGATATTTAATGGATGC	Секвенирование
	CTGCTCCAAAGAAGGACTTAG	GTGGCTTTAGTCTGAATAGCTG	Секвенирование
	GCATCCATTAAATATCCTCGTCC	GTGTCATTAAGGTAAGGGTACG	Секвенирование
	CAGCTATTCAGACTAAAGCCAC	CGCAATGATAAAGTCTAGCGATAC	Секвенирование
<i>GhTT2-D2</i> (<i>Gohir.D07G019800</i>)	AAACAATTAAGCCCCTGCT	ACATGAACTCTTCCCCTACT	Секвенирование
	CTAATGAGGTTACAGCGATG	CGCTGATCTTTTCGATGATTC	Секвенирование
	AGTATGGGGAAGAGTTCATGT	TCACCACCCATTTCTTGA	Секвенирование
	AGCCACCTACAAGTCAAGG	GCAGCCAATGAATAATAAATTCGC	Секвенирование
	TCAAGAAATGGGTGGTGA	TAGGCTTCGACAAAATGGTAG	Секвенирование
	GCGAATTTATTATTCAATTGGCTGC	CAACTCGGGTCGAATTTAACA	Секвенирование
<i>GhTT2-A3</i> (<i>Gohir.A07G019900</i>)	GTTGGAAGACATAAAGTTGAACC	CTCCTCCCCATATCTCTCA	Секвенирование
	CTGTGCAACATATCATACACCT	TAGATTTGCTTGGAGGAGTTCC	Секвенирование
	TGAGAGATATGGGGAGGAG	GGACCTAGTGGCTTTAGT	Секвенирование

	GGAACTCCTCCAAGCAAATCTA	GATACACATGACACATCAATGG	Секвенирование
<i>GhTT2-D3</i> (<i>Gohir.D07G019700</i>)	GAATAAGAGCCACTCAATGC	TGGACTCCTCCCATATCG	Секвенирование
	CATGCACACAGAAAGACTATG	GGACCTAGTGGCTTTAGT	Секвенирование
	GGAACTCCTCCAAGCAAATCTA	GATTAACCATACTCGTTGATGAG	Секвенирование
	ACTAAAGCCACTAGGTCC	TGGATAAATGTCGGCTCCG	Секвенирование
<i>GhMYB10-A1</i> (<i>Ghir_A06G007950</i>)	TTGCGATTGATTAACGGTCAAC	CGAACAACAAGGACTCCT	Секвенирование
	GTTGCACCTATGTTATGTCAGAG	TATTTCAATTGTCTGTTCGCCC	Секвенирование
	AGGAGTCCTTGTTGTTCTG	ACCACTACCATTACCATTAGC	Секвенирование
	GGGCGAACAGACAATGAAATA	AAGCCACACTTTGGTGAG	Секвенирование
	GCTAATGGTAATGGTAGTGGT	TATTGTCCAAGTTGATGCGGAAG	Секвенирование
<i>GhMYB10-D1</i> (<i>Ghir_D06G008190</i>)	AACAAATTGACCACCAGTCTCC	AGAACAACAAGGACTCCT	Секвенирование
	AAACCTCTCCCATTTGCTATA	TCCTGGAAGCCTCCCA	Секвенирование
	AGGAGTCCTTGTTGTTCT	CCACTACCATTACCATTGGT	Секвенирование
	TGGGAGGCTTCCAGGA	CCGCACTTTGGTGAC	Секвенирование
<i>GhTT8-A1</i> (<i>GH_A11G1273</i>)	CTTTATTAGGCGTTGTAATCTGCTTC	GAGCAACAGGTGAAAGATCAGAC	Секвенирование
	CTGAGATGAGAGCTTAACGCCG	TAGTGAAGAAACAGAAAGCAGCAG	Секвенирование
<i>GhTT8-A2</i> (<i>GH_A08G2121</i>)	GTAAAGTGACCAAAACGTAAACTTAC	TCTGACAGGCAAAGTCCG	Секвенирование
<i>GhTT8-D1</i> (<i>GH_D11G1302</i>)	GACATATTCCAAGCGATGGTTTC	CCCATACTTTCTAACGAGACAG	Секвенирование
	GAAGGGGAATGTGAGCTTTTG	GGTCTACCAGACAGTTTCGATG	Секвенирование
<i>GhTT8-D2</i> (<i>GH_D08G2138</i>)	CTATCCATAAAAGTGAATGTGCCA	TCTGACAGGCAAAGTCCGAA	Секвенирование
<i>GhMYB1R1</i> (<i>Gohir.A12G215300</i> , <i>Gohir.D12G217900</i>)	GTCGCTGCTCGCATTGC	GCATGGATTGGACTCCCCTTG	Количественная ПЦР
	AGGAAAAAAGGTGTTCCTGGACTG	GTGTGTCACCCGATTCATCTGCTA	Количественная ПЦР
<i>GhANR</i>	GCCAGCCAGCTCGTAGGAAC	TCACTTGAGCAGCCCCTTAGAC	Количественная ПЦР
	CTTTGCTTCTGAAGATCCAGAGAATGACATG	ATTTCCAAGCTGCCTTTTCAGCC	Количественная ПЦР
	AGAATGACATGATCAAACCAGC	TGTCTTCCATGTTGCGACAC	Количественная ПЦР
	GACTCAAGGAGTGGTGAACG	CTGAAGATCCAGAGAATGACATG	Количественная ПЦР
<i>GhMYB10-D</i> (<i>Ghir_D06G008190</i>)	CACAAACTCTTGGGAAACAGATGGTCT	GGAACTACCACTACCATTACCATTAGCAT	Количественная ПЦР
<i>GhMYB10-A</i> (<i>Ghir_A06G007950</i>)	ATACCAATGGTAATGGTAGTGGTAGTTCC	CGAGGAACTACCACTACCATTACCATTGG	Количественная ПЦР
	ATGGGAAGGAGTCCTTGTTGTTCTAAG	ACTGGAGATTGGAAGCCGCA	Количественная ПЦР

	ATGGGAAGGAGTCCTTGTTGTTTCG	GGAAGCTGGAGATTGGAAGCCACA	Количественная ПЦР
<i>GhDFR</i>	TGCCAACTGATAATCAAATGAAAGACATGAAAC	GTTTTTGATCTTCTTCTCATTAGAAAGAGGA AGC	Количественная ПЦР
	GAGTCCGAGGACCCTGAGAATGAA	TGGAGACAAAATACATCCAACCAGTCAT	Количественная ПЦР
<i>Gh4CL</i>	CCCCAAGCTGAAGTGCAACAAC	TCCCTGATGGTGCCTTTGGAATG	Количественная ПЦР
	TTCGAGGAGATCAGATCATGAAAGGATAC	TGATTTTCAGGGTGAGCAATGAGC	Количественная ПЦР
<i>GhACT-B</i>	GGAAGCTGGAATGGTGAAGGCTGG	AGCTCATTTGTAGAATGTATGATGCCAGATC	Количественная ПЦР
<i>GhUBQLN-1</i>	CAACGCTCCATCTTGTCTT	TGATCGTCTTTCCCGTAAGC	Количественная ПЦР
<i>GhUBQ7</i>	TATCAGACGCCCCACTTCATC	TATGCCCAAGGACATCCAGTT	Количественная ПЦР
<i>GhHIS3.3</i>	CTACCACTACCATCATGGC	GAAGCTGCAGAGGCATACC	Количественная ПЦР
<i>GhUBQ-11</i>	CTGAATCTTCGCTTTCACGTTATC	GGGATGCAAATCTTCGTGAAAAC	Количественная ПЦР
<i>GhTBL6</i>	GGTTGCCATTGTGCAAGGA	CCGTAGGTGAGCGTTAATCAGA	Количественная ПЦР

*CottonFGD Database (<https://cottonfgd.net/>)

Приложение 2 – Образцы хлопчатника с контрастной окраской волокна, поддерживаемые в контролируемых условиях климатической камеры.

	Высота растения, см	Средний размер коробочки, см	Окраска волокна
Тёмно-бурый (к-8147)			
Светло-бурый (к-8138)			
Зелёный (к-8158)			
Буро-зелёный (к-8146)			
Белый (к-8020)			

Приложение 3 – Паралогичные и гомеологичные копии генов *GhTT2*, *GhMYB10* (семейство *R2R3-MYB*), *GhTT8* (семейство *bHLH-MYC*), *GhTTG1*, *GhTTG3* (семейство *WD40*), найденные в базе данных CottonFGD среди диплоидных и аллотетраплоидных видов хлопчатника.

Ген	Вид	Хромосома	Ген	Кодирующая последовательность в базе данных CottonFGD*	Геном в базе данных CottonFGD
R2R3-MYB					
TT2-1	<i>Gossypium hirsutum</i> (AD ₁)	7A	<i>GhTT2-A1</i>	Gohir.A07G020200	Gh-JGI-A07
		7D	<i>GhTT2-D1</i>	Gohir.D07G019900	Gh-JGI-D07
	<i>Gossypium barbadense</i> (AD ₂)	7A	<i>GbTT2-A1</i>	GB_A07G0201	Gb-ZJU-A07
		7D	<i>GbTT2-D1</i>	GB_D07G0208	Gb-ZJU-D07
	<i>Gossypium arboreum</i> (A ₂)	7A	<i>GaTT2-A1</i>	Ga07G0216	Ga-CRI-Chr07
	<i>Gossypium raimondii</i> (D ₅)	1D	<i>GrTT2-D1</i>	Gorai.001G020600	Gr-JGI-Chr01
TT2-2	<i>G. hirsutum</i>	7A	<i>GhTT2-A2</i>	Gohir.A07G020000	Gh-JGI-A08
		7D	<i>GhTT2-D2</i>	Gohir.D07G019800	Gh-JGI-D08
	<i>G. barbadense</i>	7A	<i>GbTT2-A2</i>	GB_A07G0199	Gb-ZJU-A07
		7D	<i>GbTT2-D2</i>	GB_D07G0207	Gb-ZJU-D07
	<i>G. arboreum</i>	7A	<i>GaTT2-A2</i>	Ga07G0215	Ga-CRI-Chr07
	<i>G. raimondii</i>	1D	<i>GrTT2-D2</i>	Gorai.001G020500	Gr-JGI-Chr01
TT2-3	<i>G. hirsutum</i>	7A	<i>GhTT2-A3</i>	Gohir.A07G019900	Gh-JGI-A07
		7D	<i>GhTT2-D3</i>	Gohir.D07G019700	Gh-JGI-D07
	<i>G. barbadense</i>	7A	<i>GbTT2-A3</i>	GB_A07G0198	Gb-ZJU-A07
		7D	<i>GbTT2-A3</i>	GB_D07G0206	Gb-ZJU-D07
	<i>G. arboreum</i>	7A	<i>GbTT2-A3</i>	Ga07G0214	Ga-CRI-Chr07
	<i>G. raimondii</i>	1D	<i>GbTT2-D3</i>	Gorai.001G020400	Gr-JGI-Chr01
MYB10	<i>G. hirsutum</i>	6A	<i>GhMYB10-A1</i>	Ghir_A06G007950	Ghir-HAU-A06
		6D	<i>GhMYB10-D1</i>	Ghir_D06G008190	Ghir-HAU-D06
	<i>G. barbadense</i>	6A	<i>GbMYB10-A1</i>	Gbar_A06G007930	Gbar-HAU-A06
		6D	<i>GbMYB10-D1</i>	Gbar_D06G008240	Gbar-HAU-D06
	<i>G. arboreum</i>	6A	<i>GaMYB10-A1</i>	Ga06G0803	Ga-CRI-Chr06
	<i>G. raimondii</i>	10D	<i>GrMYB10-D1</i>	Gorai.010G087200	Gr-JGI-Chr10
bHLH-MYC					
TT8-1	<i>G. hirsutum</i>	11A	<i>GhTT8-A1</i>	GH_A11G1273	Gh-HAU-A11
		11D	<i>GhTT8-D1</i>	GH_D11G1302	Gh-HAU-D11

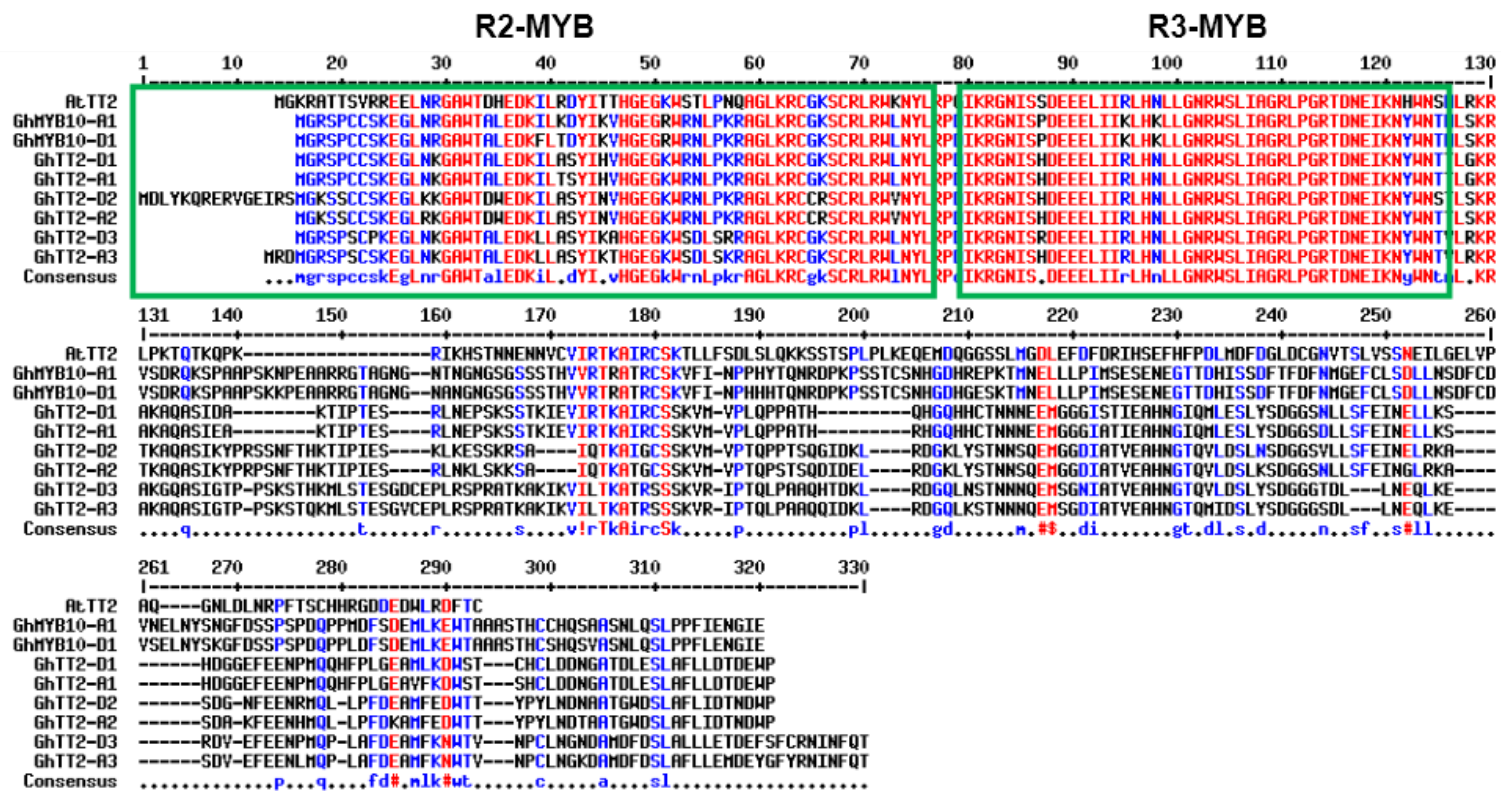
Ген	Вид	Хромосома	Ген	Кодирующая последовательность в базе данных CottonFGD*	Геном в базе данных CottonFGD
	<i>G. barbadense</i>	11A	<i>GbTT8-A1</i>	GB_A11G1279	Gb-ZJU-A11
		11D	<i>GbTT8-D1</i>	GB_D11G1316	Gb-ZJU-D11
	<i>G. arboreum</i>	11A	<i>GaTT8-A1</i>	Ga11G2761	Ga-CRI-Chr11
	<i>G. raimondii</i>	7D	<i>GrTT8-D1</i>	Gorai.007G136400	Gr-JGI-Chr07
TT8-2	<i>G. hirsutum</i>	8A	<i>GhTT8-A2</i>	GH_A08G2121	Gh-HAU-A08
		8D	<i>GhTT8-D2</i>	GH_D08G2138	Gh-HAU-D08
	<i>G. barbadense</i>	8A	<i>GbTT8-A2</i>	GB_A08G2229	Gb-ZJU-A08
		8D	<i>GbTT8-D2</i>	GB_D08G2219	Gb-ZJU-D08
	<i>G. arboreum</i>	8A	<i>GaTT8-A2</i>	Ga08G2187	Ga-CRI-Chr08
	<i>G. raimondii</i>	4D	<i>GrTT8-D2</i>	Gorai.004G215900	Gr-JGI-Chr04
WD40					
TTG1	<i>G. hirsutum</i>	8A	<i>GhTTG1-A</i>	Gh_A08G0926	Gh-JGI-A08
		8D	<i>GhTTG1-D</i>	Gh_D08G1130	Gh-JGI-D08
	<i>G. barbadense</i>	8A	<i>GbTTG1-A</i>	Gbar_A08G012290	Gbar-HAU-A08
		8D	<i>GbTTG1-D</i>	Gbar_D08G011870	Gbar-HAU-D08
	<i>G. arboreum</i>	8A	<i>GaTTG1-A</i>	Ga08G1234	Ga-CRI-Chr08
	<i>G. raimondii</i>	4D	<i>GrTTG1-D</i>	Gorai.004G125200	Gr-JGI-Chr04
TTG3	<i>G. hirsutum</i>	5A	<i>GhTTG3-A</i>	Gohir.A05G415900	Gh-JGI-A05
		4D	<i>GhTTG3-D</i>	Gohir.D04G000300	Gh-JGI-D04
	<i>G. barbadense</i>	5A	<i>GbTTG3-A</i>	Gbar_A05G041970	Gbar-HAU-A05
		-	-	-	-
	<i>G. arboreum</i>	4A	<i>GaTTG3-A</i>	Ga04G2136	Ga-CRI-Chr04
	<i>G. raimondii</i>	12D	<i>GrTTG3-D</i>	Gorai.012G001200	Gr-JGI-Chr12

Приложение 4 – Показатели качества сборок референсных геномов *Gossypium*, использованных для идентификации гомологичных последовательностей

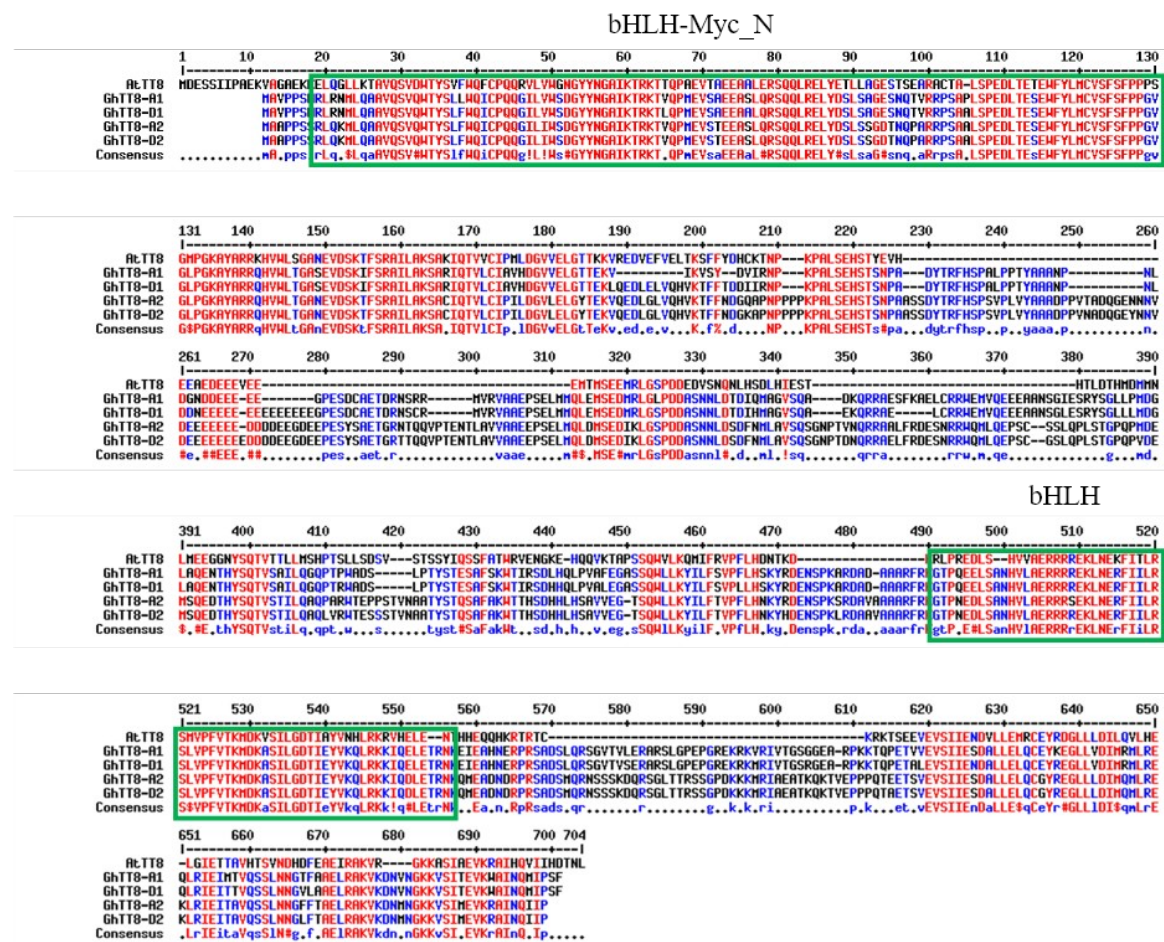
Название сборки (линия хлопчатника)	Размер генома, Мб	Скаффолды N50, Мб (L50)	Контиги, N50, Мб (L50)	Число аннотированных генов	Дата	Ссылка
Gh-UTX-JGI_v1.1 ('TM-1')	2 342,90	90,41 (5 355)	2,26 (13 583)	66 577	2017-09-04	Phytozome genome ID: 458
Gh-HAU_v1.1 ('TM-1')	2 347,02	97,7 (3 032)	1,89 (4 746)	70 199	2018-10-30	Wang et al., 2018
Gb-ZJU_v1.1_a1 ('H7124')	2 224,98	23,44 (29 751)	77,66 (-)	75 071	2019-03-14	Hu et al., 2019
Gbar-HAU_v2_a1 ('3-79')	2 266,66	92,88 (3 032)	2,15 (4 930)	71 297	2018-10-30	Wang et al., 2018
Ga-CRI_v1 ('SXY1')	1 710,00	-	1,10 (8 223)	40 960	2019-02-17	Du et al., 2018
Gr-JGI_v2 ('D5-4 ')	761,40	62,2 (1 033)	0,14 (1 811)	37 505	2013-02-18	Paterson et al., 2012

Примечание: метрики качества были взяты из базы данных CottonGen (<https://www.cottongen.org/tools/jbrowse>) и оригинальных публикаций. Показатели N50 и L50 характеризуют качество сборки с точки зрения ее непрерывности, где N50 – размер самого длинного прочтения, начиная с которого суммарная длина всех более длинных фрагментов составляет не менее половины всего генома, а L50 – количество последовательностей (контигов или скаффолдов), покрывающих 50 % генома.

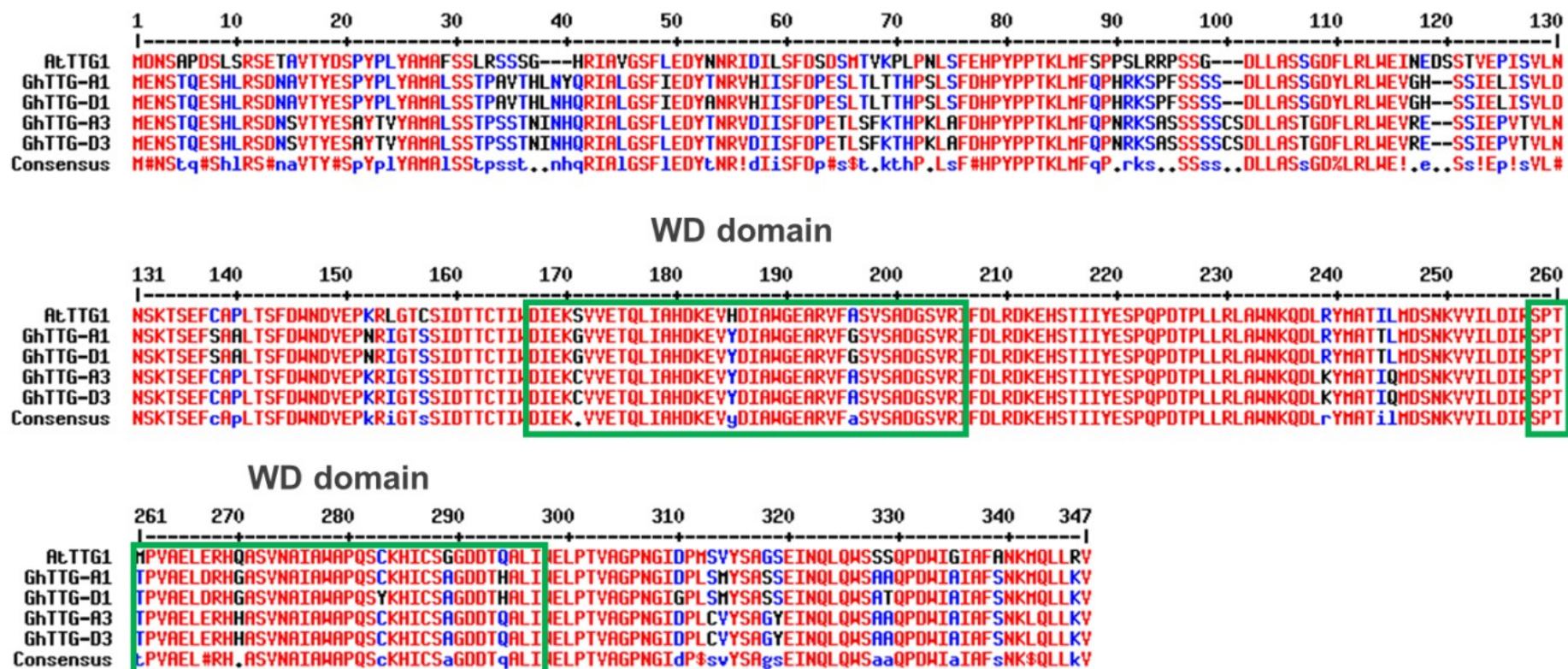
Приложение 5 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей AtTT2, GhTT2 и GhMYB10 в субгеномах At и Dt хлопчатника *G. hirsutum*, идентифицированных в базе данных CottonFGD. Степень идентичности обозначена цветами: от наиболее консервативных областей (красный) до менее (синий, черный). Рамкой зелёного цвета выделена область функциональных консервативных доменов R2- и R3-MYB (Pfam: PF00249), обеспечивающих связывание с цепью ДНК.



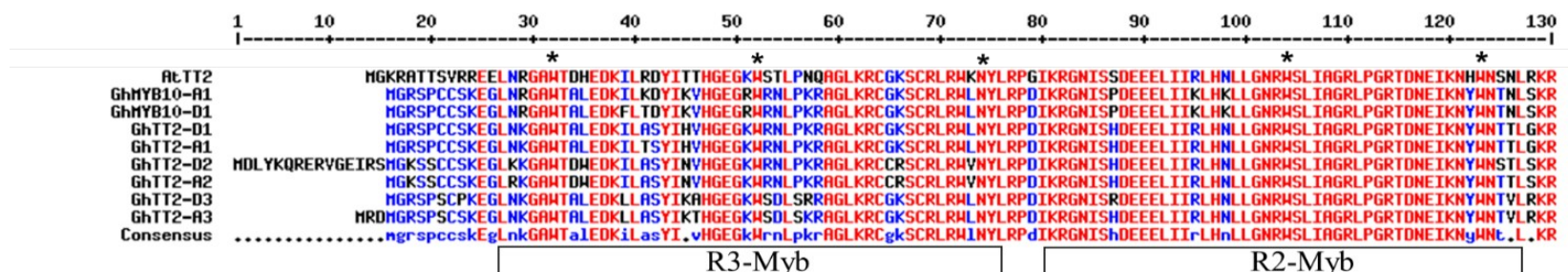
Приложение 6 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей AtTT8 и GhTT8 в субгеномах At и Dt хлопчатника *G. hirsutum*, идентифицированных в базе данных CottonFGD. Степень идентичности обозначена цветами: от наиболее консервативных областей (красный) до менее (синий, черный). Рамкой зелёного цвета выделена область функциональных консервативных ДНК-связывающих доменов bHLH-MYC-N-terminal (Pfam: PF14215) и bHLH (Pfam: PF22754).



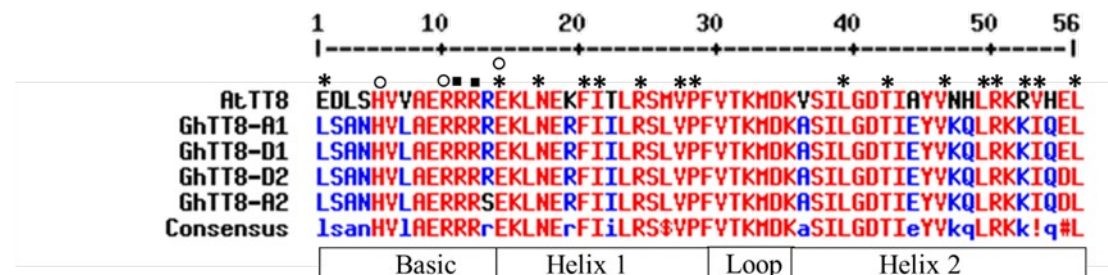
Приложение 7 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей AtTTG1 и GhTTG1 в субгенах At и Dt хлопчатника *G. hirsutum*, идентифицированных в базе данных CottonFGD. Степень идентичности обозначена цветами: от наиболее консервативных областей (красный) до менее (синий, черный). Рамкой зелёного цвета выделена область функциональных консервативных доменов WD40 (Pfam: PF00400).



Приложение 8 – Множественное выравнивание области функциональных доменов R2- и R3-MYB AtTT2 и GhTT2; условными обозначениями отмечены консервативные остатки триптофана (W19, W39, W59, W91, W110)



Приложение 9 – Множественное выравнивание области функционального домена bHLH у AtTT8 и GhTT8; условными обозначениями отмечены важные аминокислотные остатки (R13, E14, F20, I21, R24, V27, P28, L39, T42, Y45, V46, L49, R50, R52, V53 и L56); круг и квадрат – аминокислоты, связывающиеся с нуклеотидными основаниями (H5, E9, R13) и с последовательностью ДНК (R10, R12) соответственно.



Приложение 10 – Предполагаемые *цис*-регуляторные ДНК-элементы, идентифицированные в промоторной области (1000 пн от стар-кодона) гомеологичных генов *GhTT2* в субгеномах At и Dt хлопчатника вида *G. hirsutum*. Предсказание промоторов выполнено с помощью базы данных PLACE; + и - обозначены кодирующая и не кодирующая цепь соответственно.

Мотив	Ген	Положение	Последовательность	Идентификационный номер*
AGMOTIFNTMYB2	<i>GhTT2-A1</i>	37(+)	AGATCCAA	S000444
	<i>GhTT2-D1</i>	24(+)		
MYB1AT	<i>GhTT2-A1</i>	55(-) 617(+) 861(+)	WAACCA (W=A/T)	S000408
	<i>GhTT2-A3</i>	439(-)		
	<i>GhTT2-D1</i>	592(+) 844(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	471(-) 978(-)		
GATABOX	<i>GhTT2-A1</i>	665(-)	GATA	S000039
	<i>GhTT2-A2</i>	2(+) 69(-) 104(+) 227(+) 317(+) 620(+) 768(+) 785(-) 799(+) 843(+)		
	<i>GhTT2-A3</i>	42(+) 91(-) 332(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	40(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	116(+) 136(-) 778(+) 796(-) 809(+) 925(-) 937(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	30(-) 44(-) 88(+) 98(+) 187(-) 247(-) 271(+) 464(-) 499(+) 675(-) 690(+) 807(+) 863(+)		
INRNTPSADB	<i>GhTT2-A1</i>	69(-) 138(-) 464(+) 514(-) 747(+) 983(-)	YTCANTYY	S000395
	<i>GhTT2-A3</i>	72(-) 283(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	127(-)		
	<i>GhTT2-D2</i>	95(+) 415(+) 629(-) 673(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	317(+) 339(+) 400(+) 635(+)		
RHERPATEXPA7	<i>GhTT2-A1</i>	108(-) 473(-)	KCACGW (K=G/T, W=T/A)	S000512
	<i>GhTT2-D1</i>	95(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	62(-)		
DRECRTCOREAT	<i>GhTT2-A1</i>	294(+)	ACCGAC (R=G/A)	S000418
LTRECOREATCOR15	<i>GhTT2-A1</i>	295(+)	CCGAC	S000153
SORLIP1AT	<i>GhTT2-A1</i>	677(+)	GCCAC	S000482
	<i>GhTT2-D1</i>	652(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	16(+) 582(+)		
SORLIP2AT	<i>GhTT2-A1</i>	529(-)	TGGGCY	S000483
	<i>GhTT2-D2</i>	31(-) 636(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	349(+) 350(-) 541(-)		
S2FSORPL21	<i>GhTT2-A1</i>	777(-)	ATGGTA	S000166
	<i>GhTT2-D1</i>	755(+)		

MYBATRD22	<i>GhTT2-A1</i>	860(+)	CTAACCA	S000175
	<i>GhTT2-D1</i>	843(+)		
SORLREP3AT	<i>GhTT2-A1</i>	867(+) 878(-)	TGTATATAT	S000488
	<i>GhTT2-A3</i>	359(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	858(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	892(+)		
	<i>GhTT2-A1</i>	984(+)		
SORLIP5AT	<i>GhTT2-A1</i>	984(+)	GAGTGAG	S000486
NTBBF1ARROLB	<i>GhTT2-A1</i>	536(-)	ACTTTA	S000273
	<i>GhTT2-A3</i>	286(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	19(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	697(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	293(+) 449(-)		
MYCATRD22	<i>GhTT2-A1</i>	658(-) 887(+)	CACATG	S000174
	<i>GhTT2-D1</i>	634(-) 873(+)		
MYCATERD1	<i>GhTT2-A1</i>	658(+) 887(-)	CATGTG	S000413
	<i>GhTT2-D1</i>	634(+) 873(-)		
MYBCORE	<i>GhTT2-A1</i>	361(+)	CNGTTR	S000176
	<i>GhTT2-A2</i>	116(-)		
	<i>GhTT2-D1</i>	305(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	40(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	757(-)		
CAATBOX1	<i>GhTT2-A1</i>	4(+) 71(-) 145(-) 177(-) 189(+) 264(+) 340(+) 516(-) 580(-) 639(+) 741(+) 797(-) 846(+)	CAAT	S000028
	<i>GhTT2-A2</i>	27(-) 75(-) 112 (+) 199(-) 282(+) 311(+) 313(-) 373(+) 436(+) 498(-) 557(+) 562(+) 583(-) 645(+) 647(-) 702(-) 860(+)		
	<i>GhTT2-A3</i>	226(+) 344(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	129(-) 177(+) 216(+) 253(+) 328(+) 478(+) 551(-) 742(+) 772(-) 830(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	28(-) 64(+) 87(-) 125(+) 129(+) 291(+) 323(+) 325(-) 385(+) 406(+) 526(-) 584(+) 613(-) 631(-) 675(-) 703(-) 719(-) 870(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	22(+) 33(+) 82(+) 108(-) 112(+) 505(-) 707(+) 773(+) 875(+)		
CCAATBOX1	<i>GhTT2-A1</i>	177(-) 845(+)	CCAAT	S000030
	<i>GhTT2-A2</i>	313(-) 556(+)		
	<i>GhTT2-A3</i>	226(+) 344(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	829(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	28(-) 325(-) 405(+) 583(+)		
MYBST1	<i>GhTT2-A2</i>	316 (+) 798(+)	GGATA	S000180
	<i>GhTT2-D2</i>	136(-) 808(+) 936(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	270(+)		
IBOXCORE	<i>GhTT2-A1</i>	664(-)	GATAA	S000199
	<i>GhTT2-A2</i>	2(+) 799(+)		

	<i>GhTT2-A3</i>	332(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	809(+) 924(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	29(-) 43(-) 88(+) 98(+) 674(-) 690(+) 863(+)		
PRECONSCRHSP70A	<i>GhTT2-A1</i>	295(+)	NGATT	S000506
	<i>GhTT2-A2</i>	188(+) 838(+)		
	<i>GhTT2-A3</i>	330(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	848(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	861(+)		
MYCCONSUSAT	<i>GhTT2-A1</i>	658(-) 658(+) 679(-) 679(+) 828(-) 828(+) 887(-) 887(+)	CANNTG (N=A/T/G/C)	S000407
	<i>GhTT2-A2</i>	311(+) 311(-) 645(+) 645(-)		
	<i>GhTT2-A3</i>	63(+) 63(-) 464(-) 464(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	634(-) 634(+) 654(-) 654(+) 873(-) 873(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	40(-) 40(+) 231(-) 231(+) 323(-) 323(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	76(-) 76(+) 555(-) 555(+) 584(-) 584(+) 760(-) 760(+)		
TATABOX2	<i>GhTT2-A1</i>	967(+)	TATAAAT	S000109
	<i>GhTT2-A2</i>	438(-) 441(+) 697(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	953(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	200(+)		
POLASIG3	<i>GhTT2-A1</i>	257(+) 743(-) 818(-) 897(+)	AATAAT	S000088
	<i>GhTT2-A2</i>	448(-) 683(-) 686(-) 689(-) 692(-) 862(-)		
	<i>GhTT2-A3</i>	229(-)		
	<i>GhTT2-D1</i>	246(+) 718(-) 798(-) 883(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	405(+) 469(-) 476(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	151(+) 222(-) 230(-) 258(+) 663(-)		
POLASIG1	<i>GhTT2-A1</i>	312(-)	AATAAA	S000080
	<i>GhTT2-A2</i>	389(-) 428(+) 461(+) 563(+) 680(-) 746(+) 812(+)		
	<i>GhTT2-A3</i>	198(-)		
	<i>GhTT2-D1</i>	231(+) 748(-)		
	<i>GhTT2-D2</i>	411(-) 421(-) 437(-) 466(-) 473(-) 822(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	160(-) 204(+) 235(+) 261(+) 482(-) 715(-)		
TATABOX3	<i>GhTT2-A1</i>	314(+) 315(-) 893(+) 894(-)	TATTAAT	S000110
	<i>GhTT2-A2</i>	475(+) 476(-)		
	<i>GhTT2-D1</i>	879(+) 880(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	775(-)		
ANAERO2CONSENSUS	<i>GhTT2-A1</i>	555(-)	AGCAGC	S000478
ANAERO1CONSENSUS	<i>GhTT2-A2</i>	589(-)	AAACAAA	S000477
	<i>GhTT2-D1</i>	454(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	215(-) 984(+)		

	<i>GhTT2-D3</i>	393(+)		
GT1CONSENSUS	<i>GhTT2-A1</i>	67(+) 133(+) 250(-) 343(-) 389(+) 409(-) 410(-) 416(-) 445(+) 446(+) 453(+) 454(+) 512(+) 775(-) 990(+)	GRWAAW	S000198
	<i>GhTT2-A2</i>	2(+) 43(-) 205(-) 275(+) 358(-) 403(+) 404(+) 509(+) 599(+) 630(+) 654(+)		
	<i>GhTT2-A3</i>	148(-) 221(-)		
	<i>GhTT2-D1</i>	53(+) 331(-) 378(+) 398(-) 404(-) 482(+) 584(-) 706(-) 751(-) 825(-)		
	<i>GhTT2-D2</i>	55(-) 278(-) 338(-) 371(-) 398(+) 455(-) 494(-) 537(+) 923(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	28(-) 42(-) 88(+) 98(+) 342(-) 458(-) 673(-) 690(+) 718(-)		
ACGTABOX	<i>GhTT2-A2</i>	740(-) 740(+)	TACGTA	S000130
	<i>GhTT2-D3</i>	658(-) 658(+)		
TATABOX5	<i>GhTT2-A1</i>	353(-) 819(+)	TTATTT	S000203
	<i>GhTT2-A2</i>	745(-) 811(-)		
	<i>GhTT2-A3</i>	199(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	230(-) 342(-) 799(+)		
	<i>GhTT2-D2</i>	470(+) 821(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	150(-) 203(-) 223(+) 231(+) 716(+)		
ATHB6COREAT	<i>GhTT2-A2</i>	860(+)	CAATTATTA	S000399
	<i>GhTT2-D2</i>	870(+)		
MYB1LEPR	<i>GhTT2-A2</i>	872(+) 896(+)	GTTAGTT	S000443
	<i>GhTT2-D2</i>	882(+) 906(+)		
WBOXPCWRKY1	<i>GhTT2-A2</i>	877(+)	TTTGACY	S000310
	<i>GhTT2-D2</i>	887(+)		
WBOXATNPR1	<i>GhTT2-A1</i>	291(+)	TTGAC	S000390
	<i>GhTT2-A2</i>	878(+)		
	<i>GhTT2-D1</i>	727(-)		
	<i>GhTT2-D2</i>	888(+)		
	<i>GhTT2-D3</i>	768(-)		
MYBCOREATCYCB1	<i>GhTT2-A2</i>	934(+)	AACGG	S000502
	<i>GhTT2-D2</i>	944(+)		
BOXCPSAS1	<i>GhTT2-A2</i>	989(-)	CTCCAC	S000226
	<i>GhTT2-D2</i>	999(-)		
TATABOX4	<i>GhTT2-A3</i>	84(+)	TATATAA	S000111
TATABOXOSPAL	<i>GhTT2-A3</i>	104(-) 212(+)	TATTTAA	S000400
	<i>GhTT2-D1</i>	228(-)		
	<i>GhTT2-D3</i>	224(+)		
TBOXATGAPB	<i>GhTT2-D1</i>	105(-)	ACTTTG	S000383
	<i>GhTT2-D3</i>	386(+) 490(-)		
GAGAGMGSA1	<i>GhTT2-D1</i>	978(+) 980(+) 982(+) 984(+) 986(+) 988(+)	GAGAGAGAGAGA GAGAGA	S000405

MYB2CONSENSUSAT	<i>GhTT2-D2</i>	40(-)	YAACKG (Y=C/T, K=G/T)	S000409
MYBPZM	<i>GhTT2-D2</i>	139(+)	CCWACC (W=A/T)	S000179
AMYBOX2	<i>GhTT2-D3</i>	268(-)	TATCCAT	S000021
GCCCORE	<i>GhTT2-D3</i>	376(+)	GCCGCC	S000430
AMYBOX1	<i>GhTT2-D3</i>	552(+) 757(+)	TAACARA	S000020
HDZIP2ATATHB2	<i>GhTT2-D3</i>	692(-)	TAATMATTA (M=C/A)	S000373

*согласно базе данных PLACE (https://togodb.biosciencedbc.jp/togodb/view/place_main#ja)

Приложение 11 – Предполагаемые *цис*-регуляторные ДНК-элементы, идентифицированные в промоторной области (1000 пн от стар-кодона) гомеологичных генов *GhMYB10* в субгеномах At и Dt хлопчатника вида *G. hirsutum*. Предсказание промоторов выполнено с помощью базы данных PLACE; + и - обозначены кодирующая и не кодирующая цепь соответственно.

Мотив	Ген	Положение	Последовательность	Идентификационный номер*
MYB1AT	<i>GhMYB10-A</i>	665(+)	WAACCA (W=A/T)	S000408
	<i>GhMYB10-D</i>	799(+)		
GATABOX	<i>GhMYB10-A</i>	84(-) 251(+) 253(-) 327(+) 503(-) 538(-) 560(-) 611(+) 997(-)	GATA	S000039
	<i>GhMYB10-D</i>	455(-) 704(-) 755(+)		
INRNTPSADB	<i>GhMYB10-D</i>	0(-) 141(-) 268(-) 282(-) 293(-) 430(+) 644(-)	YTCANTYY	S000395
RHERPATEXPA7	<i>GhMYB10-A</i>	778(+) 923 (-)	KCACGW	S000512
	<i>GhMYB10-D</i>	126(+) 420(+) 898(+) 979(-)		
LTRECOREATCOR15	<i>GhMYB10-D</i>	1000(+)	CCGAC	S000153
SORLIP1AT	<i>GhMYB10-A</i>	855(-)	GCCAC	S000482
	<i>GhMYB10-D</i>	72(-) 79(+) 619(+)		
SORLIP2AT	<i>GhMYB10-A</i>	857(-)	TGGGCY	S000483
NTBBF1ARROLB	<i>GhMYB10-A</i>	115(-) 275(+) 674(-) 746(+)	ACTTTA	S000273
	<i>GhMYB10-D</i>	866(+)		
MYCATRD22	<i>GhMYB10-A</i>	870(+)	CACATG	S000174
	<i>GhMYB10-D</i>	625(+)		
MYCATERD1	<i>GhMYB10-A</i>	870(-)	CATGTG	S000413
	<i>GhMYB10-D</i>	625(-)		
MYBCORE	<i>GhMYB10-A</i>	366(-) 421(+) 986(-)	CNGTTR	S000176
	<i>GhMYB10-D</i>	114(-) 115(+)		
MYBCOREATCYCB1	<i>GhMYB10-A</i>	30(-) 367(+) 421(-) 987(+)	AACGG	S000502
	<i>GhMYB10-D</i>	115(+)		
CAATBOX1	<i>GhMYB10-A</i>	67(-) 226(+) 317(+) 413(-) 740(-) 794(+) 805(-) 948(+)	CAAT	S000028
	<i>GhMYB10-D</i>	143(-) 184(+) 252(+) 261(+) 270(-) 295(-) 368(-) 394(-) 536(+) 860(-) 1004(+)		
CCAATBOX1	<i>GhMYB10-A</i>	412(+) 805(-)	CCAAT	S000030
MYBST1	<i>GhMYB10-A</i>	560(-)	GGATA	S000180
	<i>GhMYB10-D</i>	455(-) 704(-)		
IBOXCORE	<i>GhMYB10-A</i>	327(+) 559(-) 611(+)	GATAA	S000199
	<i>GhMYB10-D</i>	703(-) 755(+)		

Мотив	Ген	Положение	Последовательность	Идентификационный номер*
PRECONSCRHSP70A	<i>GhMYB10-A</i>	287(-)	NGATT	S000506
MYCCONSUSAT	<i>GhMYB10-A</i>	447(-) 447(+) 541(-) 541(+) 870(-) 870(+) 894(-) 894(+)	CANNTG	S000407
	<i>GhMYB10-D</i>	421(+) 421(-) 625(-) 625(+)		
TATABOX2	<i>GhMYB10-A</i>	583(-) 630(+) 964(+)	TATAAAT	S000109
	<i>GhMYB10-D</i>	774(+)		
POLASIG3	<i>GhMYB10-A</i>	238(+) 593(-) 652(-)	AATAAT	S000088
	<i>GhMYB10-D</i>	738(-)		
POLASIG1	<i>GhMYB10-A</i>	113(+) 217(+) 634(+) 672(+) 735(+) 829(+)	AATAAA	S000080
	<i>GhMYB10-D</i>	778(+) 805(+) 885(+) 949(+)		
TATABOX3	<i>GhMYB10-A</i>	558(+) 834(-)	TATTAAT	S000110
	<i>GhMYB10-D</i>	733(+) 954(-)		
GT1CONSENSUS	<i>GhMYB10-A</i>	125(-) 327(+) 397(+) 398(+) 406(-) 507(-) 611(+) 642(-) 754(-)	GRWAAW	S000198
	<i>GhMYB10-D</i>	5(+) 131(-) 158(+) 330(+) 331(+) 427(-) 473(+) 584(+) 585(-) 755(+) 874(-)		
TATABOX5	<i>GhMYB10-A</i>	112(-) 216(-) 237(-) 594(+) 633(-) 734(-) 828(-) 1002(-)	TTATTT	S000203
	<i>GhMYB10-D</i>	739(+) 777(-) 804(-) 948(-)		
TATABOX4	<i>GhMYB10-D</i>	323(-)	TATATAA	S000111
WBOXPCWRKY1	<i>GhMYB10-A</i>	142(+)	TTTGACY	S000310
WBOXATNPR1	<i>GhMYB10-A</i>	68(+) 143(+)	TTGAC	S000390
	<i>GhMYB10-D</i>	259(-) 605(+)		
TATABOXOSPAL	<i>GhMYB10-A</i>	658(+)	TATTTAA	S000400
	<i>GhMYB10-D</i>	495(-) 818(+)		
TBOXATGAPB	<i>GhMYB10-A</i>	140(+)	ACTTTG	S000383
	<i>GhMYB10-D</i>	692(-)		
MYB2CONSENSUSAT	<i>GhMYB10-A</i>	421(-) 986(+)	YAACKG	S000409
	<i>GhMYB10-D</i>	114(+)		
HDZIP2ATATHB2	<i>GhMYB10-A</i>	1005(+)	TAATMATTA	S000373
IBOX	<i>GhMYB10-A</i>	558(-)	GATAAG	S000124
	<i>GhMYB10-D</i>	702(-)		
IBOXCORE	<i>GhMYB10-D</i>	703(-) 755(+)	GATAA	S000199
T/GBOXATPIN2	<i>GhMYB10-A</i>	922(+)	AACGTG	S000458
	<i>GhMYB10-D</i>	127(-) 229(-) 978(+)		
ACGTTBOX	<i>GhMYB10-D</i>	169(+) 169(-)	AACGTT	S000132

*согласно базе данных PLACE (https://togodb.biosciencedbc.jp/togodb/view/place_main#ja)

Приложение 12 – Предполагаемые *цис*-регуляторные ДНК-элементы, располагающиеся в промоторной области (1000 пн от старт-кодона) идентифицированных гомеологичных генов *GhTT8* в субгеномах At и Dt хлопчатника вида *G. hirsutum*. Предсказание промоторов выполнено с помощью базы данных PLACE; + и - обозначены кодирующая и некодирующая цепь соответственно.

Мотив	Ген	Положение	Последовательность	Идентификационный номер*
TATAPVTRNALE U	<i>GhTT8-A2</i>	615(+)	TTTATATA	S000340
	<i>GhTT8-D1</i>	624(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	679(+)		
PALBOXAPC	<i>GhTT8-A2</i>	254(-)	CCGTCC	S000137
	<i>GhTT8-D1</i>	258(-)		
MYB1AT	<i>GhTT8-A1</i>	47(-)	WAACCA (TGGGCTGCTTGTT GTGT; W=A/T)	S000408
	<i>GhTT8-A2</i>	295(-) 556(+) 969(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	109(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	299(-) 562(+)		
MYB2AT	<i>GhTT8-A2</i>	400(-)	TAACTG	S000177
	<i>GhTT8-D2</i>	403(-)		
MYB2CONSENSU SAT	<i>GhTT8-A2</i>	400(-)	YAACKG (Y=C/T, K=G/T)	S000409
	<i>GhTT8-D1</i>	343(+) 603(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	403(-)		
GATABOX	<i>GhTT8-A1</i>	497(-) 509(-) 718(-) 888(-) 890(+) 896(+) 953(-) 988(-)	GATA	S000039
	<i>GhTT8-D1</i>	506(-) 518(-) 727(-) 893(+) 895(-) 901(+) 985(-) 994(-)		
	<i>GhTT8-A2</i>	76(+) 266(-) 323(+) 462(-) 694(-) 822(+) 936(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	28(+) 94(+) 255(-) 270(-) 327(+) 465(-) 695(-) 823(+) 939(-)		
INRNTPSADB	<i>GhTT8-A1</i>	175(+) 207(+) 230(+) 236(+) 277(-) 970(+)	YTCANTYY (TATACTTGCTGCTA ATACTTATTAT)	S000395
	<i>GhTT8-A2</i>	274(-) 504(+) 723(+) 768(+)		
	<i>GhTT8-D1</i>	281(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	278(-) 504(+) 724(+) 769(+)		
RHERPATEXPA7	<i>GhTT8-A1</i>	410(+)	KCACGW (K=G/T, W=T/A)	S000512
	<i>GhTT8-D1</i>	414(+)		

Мотив	Ген	Положение	Последовательность	Идентификационный номер*
DRERTCOREAT	<i>GhTT8-A1</i>	476(+)	ACCGAC	S000418
	<i>GhTT8-A2</i>	384(+) 543(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	387(+) 550(+)		
LTRECOREATCO R15	<i>GhTT8-A1</i>	477 (+)	CCGAC	S000153
	<i>GhTT8-A2</i>	385(+) 544(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	388(+) 551(+)		
SORLIP1AT	<i>GhTT8-A1</i>	677(+)	GCCAC	S000482
	<i>GhTT8-A2</i>	429(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	432(+)		
SORLIP2AT	<i>GhTT8-A2</i>	529(-)	TGGGCY	S000483
	<i>GhTT8-D1</i>	53(+)		
SORLREP3AT	<i>GhTT8-A1</i>	618(-)	TGTATATAT	S000488
	<i>GhTT8-D1</i>	627(-)		
NTBBF1ARROLB	<i>GhTT8-A1</i>	565(-)	ACTTTA	S000273
	<i>GhTT8-A2</i>	190(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	36(-) 574(-)		
MYBCORE	<i>GhTT8-A1</i>	753(+)	CNGTTR	S000176
	<i>GhTT8-D1</i>	343(-) 603(-) 760(+)		
	<i>GhTT8-A2</i>	124(-) 400(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	61(-) 142(-) 403(+)		
CAATBOX1	<i>GhTT8-A1</i>	383(+) 503(+) 582(+)	CAAT	S000028
	<i>GhTT8-A2</i>	6(-) 38(-) 43(-) 117(+) 132(+) 164(-) 291(-) 725(+)		
	<i>GhTT8-D1</i>	21(-) 46(-) 71(+) 203(+) 338(-) 387(+) 403(+) 512(+) 556(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	25(-) 57(-) 136(+) 295(+) 726(+)		
CCAATBOX1	<i>GhTT8-A1</i>	382(+) 502(+)	CCAAT	S000030
	<i>GhTT8-A2</i>	131(+)		
	<i>GhTT8-D1</i>	386(+) 511(+)		
MYBST1	<i>GhTT8-A1</i>	497(-) 953(-) 988(-)	GGATA	S000180
	<i>GhTT8-A2</i>	266(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	958(-) 994(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	255(-) 270(-)		
IBOXCORE	<i>GhTT8-A2</i>	461(-)	GATAA	S000199
	<i>GhTT8-D2</i>	254(-) 464(-)		
PRECONSCRHSP7	<i>GhTT8-A1</i>	43(+)	NGATT	S000506 (S=G/C;

Мотив	Ген	Положение	Последовательность	Идентификационный номер*
0A				Y=C/T; R=A/G; DE H=T/C/A; D=A/T/G)
	<i>GhTT8-A2</i>	353(+) 385(+)		
	<i>GhTT8-D1</i>	105(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	357(+) 388(+) 551(+)		
MYCCONSENSUS AT	<i>GhTT8-A1</i>	146(-) 146(+) 750(-) 750(+) 880(-) 880(+)	CANNTG (N=A/T/G/C)	S000407
	<i>GhTT8-D1</i>	757(-) 757(+) 885(-) 885(+)		
POLASIG3	<i>GhTT8-A1</i>	384(+) 504(+)	AATAAT	S000088
	<i>GhTT8-A2</i>	3(-) 168(-) 171(-) 288(-) 657(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	388(+) 513(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	22(-) 187(-) 236(+) 248(+) 292(-) 348(+)		
POLASIG1	<i>GhTT8-A1</i>	185(-) 216(-) 246(-)	AATAAA	S000080
	<i>GhTT8-A2</i>	95(+) 142(+) 456(+) 497(+) 672(-) 744(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	113(+) 160(+) 345(-) 745(-) 964(-)		
TATABOX3	<i>GhTT8-A1</i>	316(+) 983(-)	TATTAAT	S000110
	<i>GhTT8-D1</i>	989(-)		
ANAERO2CONSENSUS	<i>GhTT8-A1</i>	923(-)	AGCAGC	S000478
ANAERO1CONSENSUS	<i>GhTT8-A1</i>	21(-) 690(+)	AAACAAA	S000477
	<i>GhTT8-A2</i>	961(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	699(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	261(+) 491(+) 646(-) 755(+)		
GT1CONSENSUS	<i>GhTT8-A1</i>	86(+) 210(-) 233(-) 269(+) 490(-) 551(+) 763(-) 810(-) 816(-) 856(+) 875(-) 962(-)	GRWAAW	S000198
	<i>GhTT8-A2</i>	247(-) 344(-) 460(-) 566(-) 653(-) 660(-) 813(-) 892(-) 906(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	273(+) 279(+) 367(-) 499(-) 560(-) 770(-) 816(-) 822(-) 862(+) 880(-) 966(-) 967(-) 979(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	48(+) 253(-) 463(-) 512(-) 572(-) 657(-) 663(-) 814(-) 895(-) 909(-)		
TATABOX5	<i>GhTT8-A1</i>	217(+) 247(+) 632(+)	TTATTT	S000203
	<i>GhTT8-A2</i>	141(-) 172(+) 255(-) 496(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	641(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	159(-) 188(+) 212(-) 965(+)		
WBBOXPCWRKY	<i>GhTT8-A2</i>	551(-)	TTTGACY	S000310

Мотив	Ген	Положение	Последовательность	Идентификационный номер*
1				
	<i>GhTT8-D1</i>	12(+) 493(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	557(-)		
WBOXATNPR1	<i>GhTT8-A1</i>	348(+) 978(+)	TTGAC	S000390
	<i>GhTT8-A2</i>	271(-) 552(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	13(+) 339(+) 352(-) 401(-) 494(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	558(-)		
MYBCOREATCYC B1	<i>GhTT8-A1</i>	368(-)	AACGG	S000502
	<i>GhTT8-A2</i>	738(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	344(+) 372(-) 604(+)		
TATABOX4	<i>GhTT8-A1</i>	616(-) 946(+)	TATATAA	S000111
	<i>GhTT8-A2</i>	376(+) 679(-)		
	<i>GhTT8-D1</i>	625(-) 951(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	680(-)		
TATABOXOSPAL	<i>GhTT8-A2</i>	139(-)	TATTTAA	S000400
	<i>GhTT8-D2</i>	157(-) 210(-)		
TBOXATGAPB	<i>GhTT8-A1</i>	705(-)	ACTTTG	S000383
	<i>GhTT8-A2</i>	273(-) 845(+)		
	<i>GhTT8-D1</i>	714(-)		
	<i>GhTT8-D2</i>	846(+)		
MYB2CONSENSU SAT	<i>GhTT8-A2</i>	400(-)	YAACKG	S000409
	<i>GhTT8-D1</i>	343(+) 603(+)		
	<i>GhTT8-D2</i>	403(-)		
MYBPZM	<i>GhTT8-A1</i>	101(-)	CCWACC	S000179
AMYBOX2	<i>GhTT8-D2</i>	270(+)	TATCCAT	S000021
GCCCORE	<i>GhTT8-A1</i>	298(+)	GCCGCC	S000430
AMYBOX1	<i>GhTT8-A1</i>	628(-)	TAACARA	S000020
	<i>GhTT8-D1</i>	637(+)		

*согласно базе данных PLACE (https://togodb.biosciencedbc.jp/togodb/view/place_main#ja)

Приложение 13 – Множественное выравнивание промоторных последовательностей *GhTT2* в субгеномах At и Dt хлопчатника *G. hirsutum* (~1000 пн до старт-кодона ATG), выполненное с помощью MultAlin.

Figure 1 displays a multiple sequence alignment of the 5' region of the 18S rRNA gene from various species. The alignment is shown in a windowed format, with the first 1000 nucleotides displayed. The species are grouped into three main clusters: Eukaryotes (top), Bacteria (middle), and Archaea (bottom). The alignment is shown in a windowed format, with the first 1000 nucleotides displayed. The consensus sequence is shown at the bottom of each window.

Species included:

- Eukaryotes:** GhTT2-A1, GhTT2-D1, GhTT2-O3, GhTT2-A2, GhTT2-D2, GhTT2-A3, GhTT2-A4, GhTT2-D4, GhTT2-O4, GhTT2-A5, GhTT2-D5, GhTT2-O5, GhTT2-A6, GhTT2-D6, GhTT2-O6, GhTT2-A7, GhTT2-D7, GhTT2-O7, GhTT2-A8, GhTT2-D8, GhTT2-O8, GhTT2-A9, GhTT2-D9, GhTT2-O9, GhTT2-A10, GhTT2-D10, GhTT2-O10, GhTT2-A11, GhTT2-D11, GhTT2-O11, GhTT2-A12, GhTT2-D12, GhTT2-O12, GhTT2-A13, GhTT2-D13, GhTT2-O13, GhTT2-A14, GhTT2-D14, GhTT2-O14, GhTT2-A15, GhTT2-D15, GhTT2-O15, GhTT2-A16, GhTT2-D16, GhTT2-O16, GhTT2-A17, GhTT2-D17, GhTT2-O17, GhTT2-A18, GhTT2-D18, GhTT2-O18, GhTT2-A19, GhTT2-D19, GhTT2-O19, GhTT2-A20, GhTT2-D20, GhTT2-O20, GhTT2-A21, GhTT2-D21, GhTT2-O21, GhTT2-A22, GhTT2-D22, GhTT2-O22, GhTT2-A23, GhTT2-D23, GhTT2-O23, GhTT2-A24, GhTT2-D24, GhTT2-O24, GhTT2-A25, GhTT2-D25, GhTT2-O25, GhTT2-A26, GhTT2-D26, GhTT2-O26, GhTT2-A27, GhTT2-D27, GhTT2-O27, GhTT2-A28, GhTT2-D28, GhTT2-O28, GhTT2-A29, GhTT2-D29, GhTT2-O29, GhTT2-A30, GhTT2-D30, GhTT2-O30, GhTT2-A31, GhTT2-D31, GhTT2-O31, GhTT2-A32, GhTT2-D32, GhTT2-O32, GhTT2-A33, GhTT2-D33, GhTT2-O33, GhTT2-A34, GhTT2-D34, GhTT2-O34, GhTT2-A35, GhTT2-D35, GhTT2-O35, GhTT2-A36, GhTT2-D36, GhTT2-O36, GhTT2-A37, GhTT2-D37, GhTT2-O37, GhTT2-A38, GhTT2-D38, GhTT2-O38, GhTT2-A39, GhTT2-D39, GhTT2-O39, GhTT2-A40, GhTT2-D40, GhTT2-O40, GhTT2-A41, GhTT2-D41, GhTT2-O41, GhTT2-A42, GhTT2-D42, GhTT2-O42, GhTT2-A43, GhTT2-D43, GhTT2-O43, GhTT2-A44, GhTT2-D44, GhTT2-O44, GhTT2-A45, GhTT2-D45, GhTT2-O45, GhTT2-A46, GhTT2-D46, GhTT2-O46, GhTT2-A47, GhTT2-D47, GhTT2-O47, GhTT2-A48, GhTT2-D48, GhTT2-O48, GhTT2-A49, GhTT2-D49, GhTT2-O49, GhTT2-A50, GhTT2-D50, GhTT2-O50, GhTT2-A51, GhTT2-D51, GhTT2-O51, GhTT2-A52, GhTT2-D52, GhTT2-O52, GhTT2-A53, GhTT2-D53, GhTT2-O53, GhTT2-A54, GhTT2-D54, GhTT2-O54, GhTT2-A55, GhTT2-D55, GhTT2-O55, GhTT2-A56, GhTT2-D56, GhTT2-O56, GhTT2-A57, GhTT2-D57, GhTT2-O57, GhTT2-A58, GhTT2-D58, GhTT2-O58, GhTT2-A59, GhTT2-D59, GhTT2-O59, GhTT2-A60, GhTT2-D60, GhTT2-O60, GhTT2-A61, GhTT2-D61, GhTT2-O61, GhTT2-A62, GhTT2-D62, GhTT2-O62, GhTT2-A63, GhTT2-D63, GhTT2-O63, GhTT2-A64, GhTT2-D64, GhTT2-O64, GhTT2-A65, GhTT2-D65, GhTT2-O65, GhTT2-A66, GhTT2-D66, GhTT2-O66, GhTT2-A67, GhTT2-D67, GhTT2-O67, GhTT2-A68, GhTT2-D68, GhTT2-O68, GhTT2-A69, GhTT2-D69, GhTT2-O69, GhTT2-A70, GhTT2-D70, GhTT2-O70, GhTT2-A71, GhTT2-D71, GhTT2-O71, GhTT2-A72, GhTT2-D72, GhTT2-O72, GhTT2-A73, GhTT2-D73, GhTT2-O73, GhTT2-A74, GhTT2-D74, GhTT2-O74, GhTT2-A75, GhTT2-D75, GhTT2-O75, GhTT2-A76, GhTT2-D76, GhTT2-O76, GhTT2-A77, GhTT2-D77, GhTT2-O77, GhTT2-A78, GhTT2-D78, GhTT2-O78, GhTT2-A79, GhTT2-D79, GhTT2-O79, GhTT2-A80, GhTT2-D80, GhTT2-O80, GhTT2-A81, GhTT2-D81, GhTT2-O81, GhTT2-A82, GhTT2-D82, GhTT2-O82, GhTT2-A83, GhTT2-D83, GhTT2-O83, GhTT2-A84, GhTT2-D84, GhTT2-O84, GhTT2-A85, GhTT2-D85, GhTT2-O85, GhTT2-A86, GhTT2-D86, GhTT2-O86, GhTT2-A87, GhTT2-D87, GhTT2-O87, GhTT2-A88, GhTT2-D88, GhTT2-O88, GhTT2-A89, GhTT2-D89, GhTT2-O89, GhTT2-A90, GhTT2-D90, GhTT2-O90, GhTT2-A91, GhTT2-D91, GhTT2-O91, GhTT2-A92, GhTT2-D92, GhTT2-O92, GhTT2-A93, GhTT2-D93, GhTT2-O93, GhTT2-A94, GhTT2-D94, GhTT2-O94, GhTT2-A95, GhTT2-D95, GhTT2-O95, GhTT2-A96, GhTT2-D96, GhTT2-O96, GhTT2-A97, GhTT2-D97, GhTT2-O97, GhTT2-A98, GhTT2-D98, GhTT2-O98, GhTT2-A99, GhTT2-D99, GhTT2-O99, GhTT2-A100, GhTT2-D100, GhTT2-O100, GhTT2-A101, GhTT2-D101, GhTT2-O101, GhTT2-A102, GhTT2-D102, GhTT2-O102, GhTT2-A103, GhTT2-D103, GhTT2-O103, GhTT2-A104, GhTT2-D104, GhTT2-O104, GhTT2-A105, GhTT2-D105, GhTT2-O105, GhTT2-A106, GhTT2-D106, GhTT2-O106, GhTT2-A107, GhTT2-D107, GhTT2-O107, GhTT2-A108, GhTT2-D108, GhTT2-O108, GhTT2-A109, GhTT2-D109, GhTT2-O109, GhTT2-A110, GhTT2-D110, GhTT2-O110, GhTT2-A111, GhTT2-D111, GhTT2-O111, GhTT2-A112, GhTT2-D112, GhTT2-O112, GhTT2-A113, GhTT2-D113, GhTT2-O113, GhTT2-A114, GhTT2-D114, GhTT2-O114, GhTT2-A115, GhTT2-D115, GhTT2-O115, GhTT2-A116, GhTT2-D116, GhTT2-O116, GhTT2-A117, GhTT2-D117, GhTT2-O117, GhTT2-A118, GhTT2-D118, GhTT2-O118, GhTT2-A119, GhTT2-D119, GhTT2-O119, GhTT2-A120, GhTT2-D120, GhTT2-O120, GhTT2-A121, GhTT2-D121, GhTT2-O121, GhTT2-A122, GhTT2-D122, GhTT2-O122, GhTT2-A123, GhTT2-D123, GhTT2-O123, GhTT2-A124, GhTT2-D124, GhTT2-O124, GhTT2-A125, GhTT2-D125, GhTT2-O125, GhTT2-A126, GhTT2-D126, GhTT2-O126, GhTT2-A127, GhTT2-D127, GhTT2-O127, GhTT2-A128, GhTT2-D128, GhTT2-O128, GhTT2-A129, GhTT2-D129, GhTT2-O129, GhTT2-A130, GhTT2-D130, GhTT2-O130, GhTT2-A131, GhTT2-D131, GhTT2-O131, GhTT2-A132, GhTT2-D132, GhTT2-O132, GhTT2-A133, GhTT2-D133, GhTT2-O133, GhTT2-A134, GhTT2-D134, GhTT2-O134, GhTT2-A135, GhTT2-D135, GhTT2-O135, GhTT2-A136, GhTT2-D136, GhTT2-O136, GhTT2-A137, GhTT2-D137, GhTT2-O137, GhTT2-A138, GhTT2-D138, GhTT2-O138, GhTT2-A139, GhTT2-D139, GhTT2-O139, GhTT2-A140, GhTT2-D140, GhTT2-O140, GhTT2-A141, GhTT2-D141, GhTT2-O141, GhTT2-A142, GhTT2-D142, GhTT2-O142, GhTT2-A143, GhTT2-D143, GhTT2-O143, GhTT2-A144, GhTT2-D144, GhTT2-O144, GhTT2-A145, GhTT2-D145, GhTT2-O145, GhTT2-A146, GhTT2-D146, GhTT2-O146, GhTT2-A147, GhTT2-D147, GhTT2-O147, GhTT2-A148, GhTT2-D148, GhTT2-O148, GhTT2-A149, GhTT2-D149, GhTT2-O149, GhTT2-A150, GhTT2-D150, GhTT2-O150, GhTT2-A151, GhTT2-D151, GhTT2-O151, GhTT2-A152, GhTT2-D152, GhTT2-O152, GhTT2-A153, GhTT2-D153, GhTT2-O153, GhTT2-A154, GhTT2-D154, GhTT2-O154, GhTT2-A155, GhTT2-D155, GhTT2-O155, GhTT2-A156, GhTT2-D156, GhTT2-O156, GhTT2-A157, GhTT2-D157, GhTT2-O157, GhTT2-A158, GhTT2-D158, GhTT2-O158, GhTT2-A159, GhTT2-D159, GhTT2-O159, GhTT2-A160, GhTT2-D160, GhTT2-O160, GhTT2-A161, GhTT2-D161, GhTT2-O161, GhTT2-A162, GhTT2-D162, GhTT2-O162, GhTT2-A163, GhTT2-D163, GhTT2-O163, GhTT2-A164, GhTT2-D164, GhTT2-O164, GhTT2-A165, GhTT2-D165, GhTT2-O165, GhTT2-A166, GhTT2-D166, GhTT2-O166, GhTT2-A167, GhTT2-D167, GhTT2-O167, GhTT2-A168, GhTT2-D168, GhTT2-O168, GhTT2-A169, GhTT2-D169, GhTT2-O169, GhTT2-A170, GhTT2-D170, GhTT2-O170, GhTT2-A171, GhTT2-D171, GhTT2-O171, GhTT2-A172, GhTT2-D172, GhTT2-O172, GhTT2-A173, GhTT2-D173, GhTT2-O173, GhTT2-A174, Gh

Приложение 14 – Множественное выравнивание промоторных последовательностей *GhMYB10* в субгеномах At и Dt хлопчатника *G. hirsutum* (~1000 пн до старт-кодона ATG), выполненное с помощью MultAlin.

	1	200
GhMYB10-R1	AAATGAAAAAAGATTTTAAACAGTTTGTATATAGATGACGCCATCTATACCTTTGCTTATG	CGTCCACCATATT--CGGCACCCCTAATACCGTTTAGAT--CATTCGAACTACGACCCCAACAAATTGACACCAAGTCTCCTATCATCTC-CGATG---TATTCGTCTAAAAAATAAGTT
GhMYB10-D1	AAATGAAAAAAGATTTTAAACAGTTTGTATATAGATGACGCCATCTATACCTTTGCTTATG	CGTCCACCATATT--CGGCACCCCTAATACCGTTTAGAT--CATTCGAACTACGACCCCAACAAATTGACACCAAGTCTCCTATCATCTC-CGATG---TATTCGTCTAAAAAATAAGTT
Consensus	cGgCaCaCCaCaTa..CgaCaaCccTAAATacCGaTTTaaat..CagTcaAaccACGaacaCCaaaaAAATTGACaCaagTcTcaaAaaATCaTa..CGaTG....TATcaaTaCAAAAAAaAaGTT	
	201	400
GhMYB10-R1	GATTTTTCARAAAT---TAACACTTTGACCT---GAGCAGGCTTTATAC-----TCACATAAAATTTCTTTAATAGACTCGTCCCTTACT-TGTTGCATCCCAATAAATGCATCATCGACAATATA-----GGTGAGATATCTGTGGACCTCTCTACA-----ACCTTTAACCCT---CTTCAAA	
GhMYB10-D1	AGGGGCTCAAACTCAAAACCCATACACGTTGAGGGTATTTTTCATATTATGTCATTAAGAAATTAAGAAATAGAAATGAGTTTGAATTAAGAAATGAGTTTGAAGGGTTTATATAGGAAAAAATATGTTGTTGGGGTGTAACTTTGGATTTGTATAGTTGAGGGAAAGTTACTATTGCCCTGAATA	
Consensus	aAgggcTCARAAaT...aAACaCaTAcAcCT...GaGcAggcTTTaTAC.....TCaaATAAaTaTTcaaaaAATAGAaacGagccccaAcT,aaaaGaATcaacaaagAAAgGcaaacATaGaaAAaAATA.....GGGaaGaaAcCTgTGGAcTcTaaTaca.....AAgTTAacaT...CcTgaAaA	
	401	600
GhMYB10-R1	AGACTCCCATTCATCGC-TAATCTCAATAGCTCGATAAA-----CCTTCACCACATA---CAAGAAACCAAGAACTGACTCAGCGGATCCCTTGCTCAGACCTCTAGATGGAAAAACCTTTCCCAATCTGTCCGTTAATGGCTACTGAATA-CGAACAGATGTATACA-----CATTCATATAGCATCCACCC	
GhMYB10-D1	CGCATCTTATAGGGCAGCTGTTTTCATTTCTCTCAAAAATAGCATATCCCATAAATATTAAGAAAGAAAAAACACCTATTTAGTTAAATATTAAGAAATTAAGCATATTTCAATTAATTTACTCTCAATTACATTCCTCAAGGCAACTATGTTGCACCTATGTTATGTCAGAGGAAATCTTATATTTTTACTTGGAC	
Consensus	aGaaTCccATacagCaC,TaaTcTCAaTaagCTCgaAaA.....CaTacaCCaCaAa...aAaAaAaAaAaAaCaacCaTaaacaGaTaaacaTgaAaAaAcCaccAgATggaAaAaAcTaccCcaATcacaccTcAaAGGCACTaaTa..CaaaaaaGaTaTgaCA.....aATccATaTagcAaCcacaC	
	601	800
GhMYB10-R1	ATTTTTGATCAAAACCCAT-----CCGTATCATACCTCCTTTATAAAATCCCATTCACCCCTATCATAT-GCTTCTTTTACTATCCTTTTAATTTCAAGTTTAAATTTATATTATTTTGTGATGTTATGATAAACTATTTTATACATATAAATAAATTTTACCTTATATTATTACACTAATAC	
GhMYB10-D1	ATTTTTAGCCACTCATGAGCTATTTTGAAGAAATGATGAAAGCTTTTAAATTTATTTTGTACTTGCTTTTCAAGGTTTACTATCCTTTTAATTTTAAAGTTTAAATTTATATTATTTTGTGATGTTATGATAAACTATTTTATACATATAAATAAATTTTAC-----ACACTAaAAC	
Consensus	AaTTTTgAgCaAacCaCAT.....CaaaATcRaTaaaacCTTTaTaAAaTccaaTTcaaaCcTaTCaTaT,aCaagTTTTACTTATCCTTTTAATTTCAAGTTTAAATTTATATTATTTTGTGATGTTATGATAAACTATTTTATACATATAAATAAATTTTAC.....ACACTAaAAC	
	801	1000
GhMYB10-R1	CAATTAAGTTATATATTTAAAAAATAAGAGAGAGAACTAGATGGGGGATTTTATAAATAAATTTGTCACCTTAGAATTACCTTACACACTGATTTGGCTACGATCCCATTTCCCAATATATTGATTGGTACTAAATACTARTAC-AAATAAATTATACGAATTTGAAGACGTGGCCCCCTTCCTCA	
GhMYB10-D1	CAATTAAGCTATATATTTAAAAA---GAAGAGAGAGCA-----GATTTTATAAATAAATTTGTCACCTTAGAATTACCTTACACACTGATTTGCACTACGATCCCATTTCCCAATATATTGAT-GGATGTTAAATACTARTACTAATAAATTATACG-----	
Consensus	CAATTAAGcTATATATTTAAAAA.....GAAGAGAGAGaCa.....GATTTTATAAATAAATTTGTCACCTTAGAATTACCTTACACACTGATTTGCaTCACGAATCCATTTCCCAATATATTgAT,GGTaCTAAATACTARTAC,AAATAAATTATACG.....	
	1001	1143
GhMYB10-R1	CATGTACAGCAAAACCTCTCCATTTGCTATATTTTTTTGTACATTAAACGTGACCAAGTCGTGAGCCCCACAACTCGAAGCCAGCTATAAATTATCTCCCGAACACAGGAGGATCGAATTAATCATTARCC	
GhMYB10-D1	TTTTTTGTACATTAAACGTGACCAAGTCGTGAGCCCCGACAACTCGAAGAC	
Consensus	TTTTTTGTACATTAAACGTGACCAAGTCGTGAGCCCCaACAACTacGAAGAc.....	

Приложение 15 – Множественное выравнивание промоторных последовательностей *GhTT8* в субгеномах At и Dt хлопчатника *G. hirsutum* (~1000 пн до старт-кодона ATG), выполненное с помощью MultAlin.

[illegible]

Приложение 16 – Значения Ka , Ks и Ka/Ks для идентифицированных генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* в геномах диплоидных (*G. raimondii* (*Gr*), *G. arboreum* (*Ga*)) и аллотетраплоидных (*G. hirsutum* (*Gh*), *G. barbadense* (*Gb*)) видов хлопчатника

R2R3-MYB	Ka	Ks	Ka/Ks	bHLH-MYC	Ka	Ks	Ka/Ks	WD40	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>GhTT2-A1</i>	0,129	0,501	0,258	<i>GaTT8-A1</i>	0,127	0,201	0,634	<i>GrTTG1-D</i>	0,040	0,363	0,110
<i>GhTT2-D1</i>	0,213	0,513	0,415	<i>GaTT8-A2</i>	0,131	0,192	0,683	<i>GrTTG3-D</i>	0,043	0,433	0,099
<i>GhTT2-A2</i>	0,233	0,546	0,427	<i>GbTT8-D1</i>	0,129	0,202	0,639	<i>GhTTG1-D</i>	0,040	0,360	0,111
<i>GhTT2-D2</i>	0,228	0,547	0,416	<i>GbTT8-A1</i>	0,157	0,198	0,792	<i>GhTTG3-D</i>	0,043	0,433	0,099
<i>GhTT2-A3</i>	0,244	0,548	0,445	<i>GbTT8-A2</i>	0,130	0,195	0,670	<i>GhTTG1-A</i>	0,037	0,386	0,096
<i>GhTT2-D3</i>	0,248	0,547	0,453	<i>GbTT8-D2</i>	0,131	0,201	0,651	<i>GhTTG3-A</i>	0,043	0,433	0,099
<i>GrTT2-D1</i>	0,215	0,497	0,433	<i>GhTT8-D1</i>	0,129	0,202	0,640	<i>GbTTG1-D</i>	0,042	0,360	0,117
<i>GrTT2-D2</i>	0,231	0,513	0,451	<i>GhTT8-A1</i>	0,129	0,174	0,741	<i>GbTTG1-A</i>	0,037	0,386	0,095
<i>GrTT2-D3</i>	0,247	0,520	0,475	<i>GhTT8-A2</i>	0,131	0,194	0,674	<i>GbTTG3-A</i>	0,043	0,433	0,099
<i>GaTT2-A1</i>	0,211	0,498	0,423	<i>GhTT8-D2</i>	0,130	0,203	0,641	<i>GaTTG1-A</i>	0,037	0,385	0,097
<i>GaTT2-A2</i>	0,230	0,534	0,430	<i>GrTT8-D1</i>	0,130	0,198	0,659	<i>GaTTG3-A</i>	0,052	0,446	0,117
<i>GaTT2-A3</i>	0,242	0,543	0,445	<i>GrTT8-D2</i>	0,131	0,196	0,667	Среднее значение	0,042	0,402	0,104
<i>GbTT2-A1</i>	0,211	0,501	0,421	Среднее значение	0,132	0,196	0,674				
<i>GbTT2-D1</i>	0,424	0,500	0,212								
<i>GbTT2-A2</i>	0,427	0,546	0,233								
<i>GbTT2-D2</i>	0,437	0,520	0,228								
<i>GbTT2-A3</i>	0,445	0,548	0,244								
<i>GbTT2-D3</i>	0,442	0,561	0,248								
<i>GbMYB10-A1</i>	0,385	0,975	0,375								
<i>GbMYB10-D1</i>	0,386	0,955	0,369								
<i>GrMYB10-D1</i>	0,408	0,919	0,375								
<i>GhMYB10-A1</i>	0,385	0,975	0,375								
<i>GhMYB10-D1</i>	0,387	0,956	0,370								
<i>GaMYB10-A1</i>	0,384	0,971	0,373								
Среднее значение	0,413	0,635	0,262								

Приложение 17 – Процент идентичности аминокислотных последовательностей TT2, TT8 и TTG1 *A.thaliana* и *G.hirsutum* с выбранным шаблоном из базы данных PDB для предсказания третичных структур. Идентификационные номера шаблонов: 6KKS, 5GNJ и 2HES для белков TT2, TT8 и TTG1 соответственно

Семейство	Белок	Процент идентичности
R2R3-MYB	AtTT2	60,18 %
	GhTT2-A1	61,61 %
	GhTT2-A2	66,02 %
	GhTT2-A3	62,16 %
	GhTT2-D1	61,61 %
	GhTT2-D2	60,71 %
	GhTT2-D3	62,16 %
	GhMYB10-A	62,83 %
	GhMYB10-D	62,50 %
bHLH-MYC	AtTT8	52,46 %
	GhTT8-A1	51,52 %
	GhTT8-D1	52,31 %
	GhTT8-A2	50,00 %
	GhTT8-D2	51,52 %
WD40	AtTTG1	20,57 %
	GhTTG1-A	18,97 %
	GhTTG1-D	19,29 %
	GhTTG3-A	19,57 %
	GhTTG3_D	19,57 %

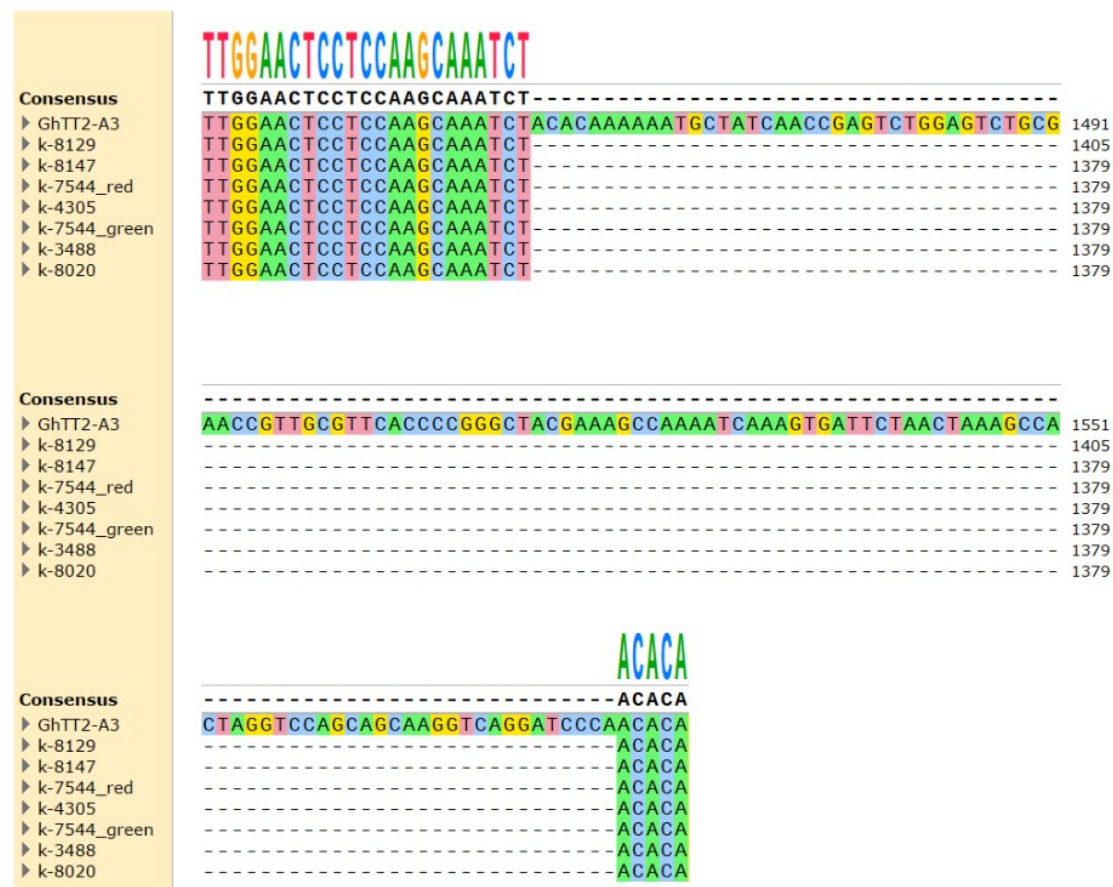
Приложение 18 – Процент идентичности аминокислотных последовательностей белков TT2, TT8 и TTG1 у *A.thaliana* и *G.hirsutum*

	AtTT2	GhTT2-A1	GhTT2-A2	GhTT2-A3	GhTT2-D1	GhTT2-D2	GhTT2-D3	GhMYB10-A	GhMYB10-D
AtTT2	-								
GhTT2-A1	82,5 %	-							
GhTT2-A2	80,6 %	91,3 %	-						
GhTT2-A3	83,5 %	91,3 %	86,4 %	-					
GhTT2-D1	82,5 %	99,0 %	92,2 %	92,2 %	-				
GhTT2-D2	81,6 %	90,3 %	98,1 %	85,4 %	91,3 %	-			
GhTT2-D3	81,6 %	88,3 %	83,5 %	96,1 %	89,3 %	82,5 %	-		
GhMYB10-A	82,5 %	90,3 %	85,4 %	86,4 %	90,3 %	84,5 %	84,5 %	-	
GhMYB10-D	81,6 %	90,3 %	84,5 %	86,4 %	89,3 %	83,5 %	84,5 %	98,1 %	-

	AtTT8	GhTT8-A1	GhTT8-D1	GhTT8-A2	GhTT8-D2
AtTT8	-				
GhTT8-A1	65,0 %	-			
GhTT8-D1	66,4 %	94,8 %	-		
GhTT8-A2	62,2 %	81,2 %	84,6 %	-	
GhTT8-D2	62,3 %	81,3 %	84,9 %	98,5 %	-

	AtTTG1	GhTTG1-A	GhTTG1-D	GhTTG3-A	GhTTG3-D
AtTTG1	-				
GhTTG1-A	91,3 %	-			
GhTTG1-D	90,5 %	99,4 %	-		
GhTTG3-A	90,8 %	94,5 %	93,9 %	-	
GhTTG3-D	90,8 %	94,5 %	93,9 %	54,9 %	-

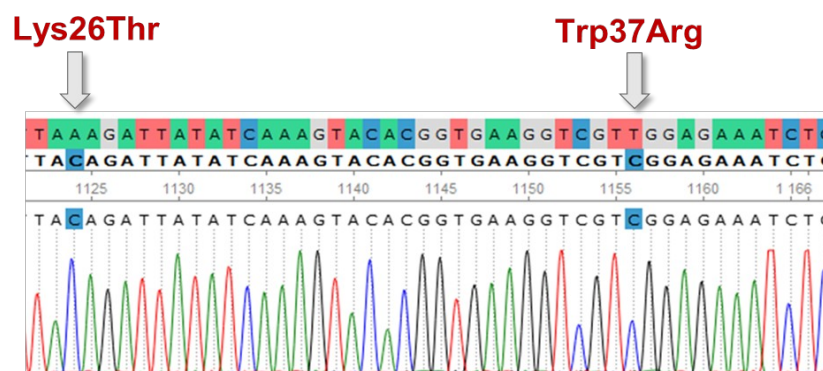
Приложение 19 – Множественное выравнивание секвенированных последовательностей фрагмента третьего экзона *GhTT2-A3*, выполненное с использованием SnapGene. У исследуемых образцов обнаружена делеция длиной 124 пн в позиции 594 пн после старт-кодона ATG (референс *GhTT2-A3* соответствует последовательности под номером Gohir.A07G019900 из базы данных CottonFGD)



Приложение 20 – Множественное выравнивание промоторной области гена *MYB10-A* от -430 до -402 пн относительно старт-кодона у образцов, контрастных по признаку окраски волокна, с использованием программного обеспечения MEGA, алгоритм MUSCLE. *GhMYB10-A* - референсная последовательность (CottonFGD: Ghir_A06G007950) (номера образцов в названии последовательностей соответствуют: MYB10-A_1 – к-7544, MYB10-A_2 – к-4305, MYB10-A_3 – к-3488, MYB10-A_5 – к-8020)

[illegible]

Приложение 21 – Участок секвенограммы гена *GhMYB10-A* (фрагмент области первого экзона), соответствующий последовательности, кодирующей консервативный домен R2, с детектированными однонуклеотидными заменами А→С и Т→С в положениях 124 и 156 пп соответственно, ведущие к замене аминокислотных остатков Луз26Тре и Трп37Арг в ТФ GhMYB10-A у образцов хлопчатника со светло-бурой окраской волокна



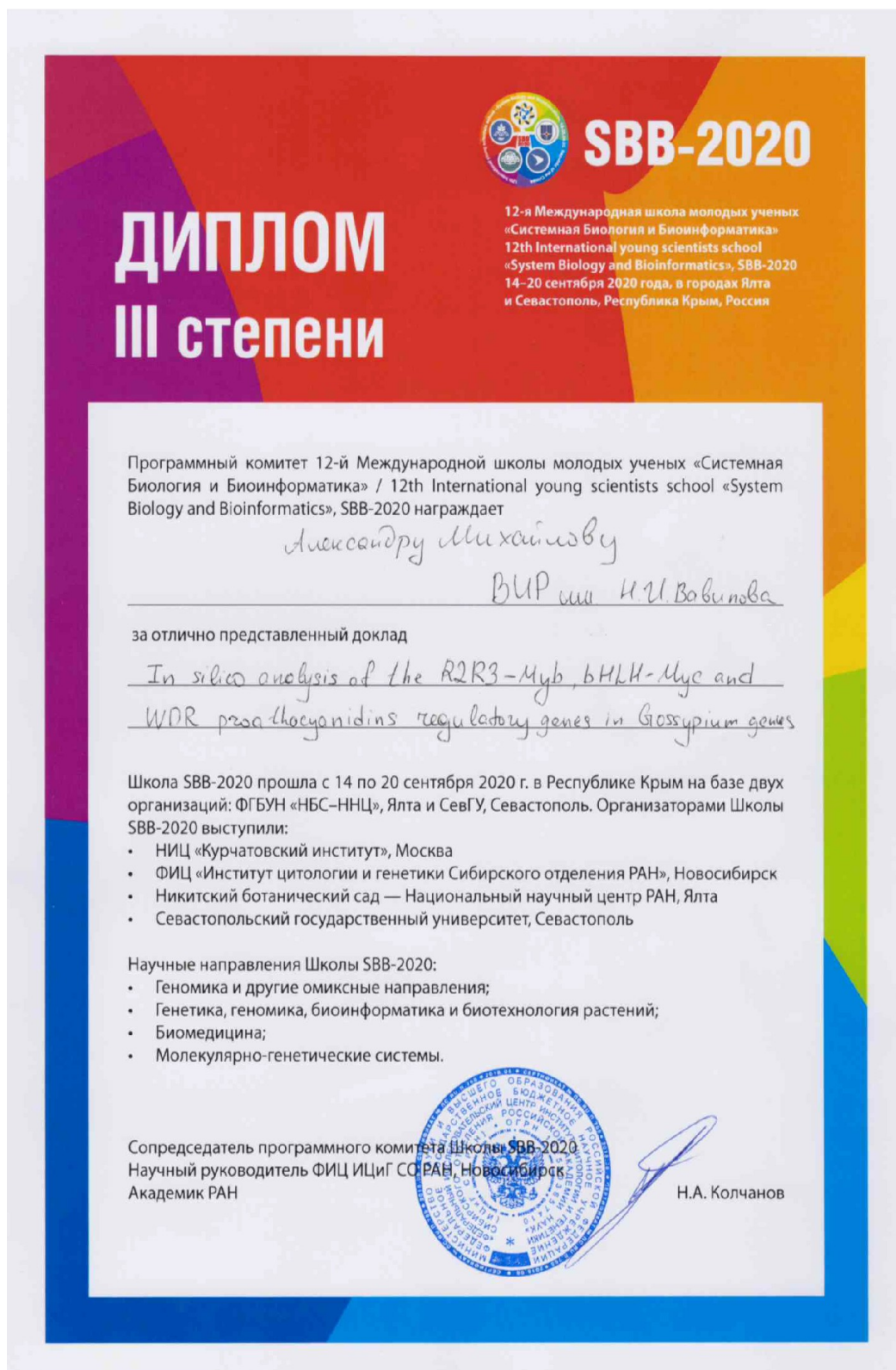
Приложение 22 – Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей исходной (GhMYB10-A_initial) и альтернативной (GhMYB10-A_mutant) формы GhMYB10-A, выполненное с помощью MultAlin

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
GhMYB10-A_initial	MGRSPCCSKEGLNRGAWTALEDKILKDYIKVHGEGR													
GhMYB10-A_mutant	MGRSPCCSKEGLNRGAWTALEDKILTDYIKVHGEGR													
Consensus	MGRSPCCSKEGLNRGAWTALEDKILKDYIKVHGEGR													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
GhMYB10-A_initial	IKNYWNTNLSKRVSDRQKSPAAPSKNPEARRGTAGNGTNGNGSGSSSTHYVTRATRRCISKVFINPPHYTQNRDPPKSSSTCSNHGDHREP KTHNELLPIHSESENEGTTDHISSDFTDFNHGEFCLS													
GhMYB10-A_mutant	IKNYWNTNLSKRVSDRQKSPAAPSKNPEARRGTAGNGTNGNGSGSSSTHYVTRATRRCISKVFINPPHYTQNRDPPKSSSTCSNHGDHREP KTHNELLPIHSESENEGTTDHISSDFTDFNHGEFCLS													
Consensus	IKNYWNTNLSKRVSDRQKSPAAPSKNPEARRGTAGNGTNGNGSGSSSTHYVTRATRRCISKVFINPPHYTQNRDPPKSSSTCSNHGDHREP KTHNELLPIHSESENEGTTDHISSDFTDFNHGEFCLS													
	261	270	280	290	300	310	320	329						
GhMYB10-A_initial	DLLNSDFCDVNELNYSNGFDSSPSDQPPHDFSDMLKENTAAASTHCCHQSAASNLQSLPPFIENGIE													
GhMYB10-A_mutant	DLLNSDFCDVNELNYSNGFDSSPSDQPPHDFSDMLKENTAAASTHCCHQSAASNLQSLPPFIENGIE													
Consensus	DLLNSDFCDVNELNYSNGFDSSPSDQPPHDFSDMLKENTAAASTHCCHQSAASNLQSLPPFIENGIE													

Приложение 23 – Результаты статистического анализа для сравниваемых групп в пределах одной временной точки ДПО; порог статистической значимости определён при $p < 0,05$. Введенные сокращения для обозначения образцов хлопчатника с различной окраской волокна соответствуют оттенкам: d-br – темно-бурый, br – светло-бурый, br-gr – буро-зеленый, gr – зеленый, wt – белый.

Ген	Группа сравнения (ДПО)	Статистический тест		
		t-критерий Стьюдента/ U-тест Манна-Уитни	ANOVA/ Краскела- Уоллиса	Пост-хок тест Тьюки/ тест Данна
<i>GhANR</i>	br-gr – wt (31)	$p > 0,5/ -$	–	–
	br-gr – wt (33)	$p > 0,2/ -$	–	–
	br – br-gr (35)	–	$-/ p = 0,0046$	$-/ p = 0,0062$
	br – wt (35)	–		$-/ p < 0,05$
	d-br, br, gr, wt (37)	–	$-/ p = 0,1387$	–
	br – d-br, br – br-gr, d-br – gr (39)	–	$-/ p < 0,0001$	$-/ p < 0,001$
	gr – wt (41)	–	$p = 0,0036/ -$	$p = 0,0026/ -$
	d-br – wt (41)	–		$p = 0,0158/ -$
<i>GhDFR</i>	br-gr – wt (31)	$p = 0,8628/ -$	–	–
	br-gr – wt (33)	$/ p = 0,4054$	–	–
	br, br-gr, wt (35)	–	$-/ p = 0,7006$	–
	br – gr (37)	–	$-/ p < 0,01$	$-/ p = 0,011$
	br – wt (37)	–		$-/ p < 0,05$
	d-br – gr (39)	–	$-/ p = 0,0046$	$-/ p < 0,05$
	gr – wt (39)	–		$-/ p < 0,01$
	d-br – gr (41)	–	$-/ p < 0,001$	$-/ p < 0,001$
<i>Gh4CL</i>	br-gr – wt (31)	$-/ p = 0,1454$	–	–
	br-gr – wt (33)	$p < 0,05 /$	–	–
	br – br-gr (35)	–	$p = 0,0141/ -$	$p = 0,0349/ -$
	br-gr – wt (35)	–		$p = 0,0404/ -$
	d-br, br, gr, wt (37)	–	$-/ p = 0,0752$	–
	d-br, br, gr, wt (39)	–	$-/ p = 0,5056$	–
	gr – wt (41)	–	$p = 0,0148/ -$	$p = 0,007/ -$
<i>GhMYB1R1</i>	br-gr – wt (31)	$p = 0,9792/ -$	–	–
	br-gr – wt (33)	$p < 0,05/ -$	–	–
	br-gr – br (35)	–	$p < 0,0001/ -$	$p < 0,0001/ -$
	br-gr – wt (35)	–		$p < 0,0001/ -$
	d-br – br, br – wt (37)	–	$-/ p = 0,0033$	$-/ p < 0,05$
	d-br – br (39)	–	$p < 0,0036/ -$	$p = 0,0026/ -$
	d-br, gr, wt (41)	–	$-/ p = 0,1106$	–
<i>GhMYB10-A</i>	br-gr – wt (31)	$p > 0,6/ -$	–	–
	br-gr – wt (33)	$-/ p < 0,001$	–	–
	br, br-gr, wt (35)	–	$p = 0,1081/ -$	–
	d-br – gr (37)	–	$-/ p = 0,0257$	$-/ p = 0,042$
	d-br – br, d-br – gr, gr – wt (39)	–	$p < 0,0001/ -$	$p < 0,0001/ -$
	br – gr (39)	–		$p < 0,0007/ -$
	br-gr, gr, wt (41)	–	$-/ p = 0,0935$	–

Приложение 24 – Дипломы, которыми отмечены результаты научной работы в рамках выполнения диссертационного исследования.







**SCIENCE
OF THE
FUTURE**

НОВОСИБИРСК
23-26 АВГУСТА
2022



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ
И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

ВТОРОЕ МЕСТО

ПОБЕДИТЕЛЬ КОНКУРСА НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ
СТУДЕНТОВ И АСПИРАНТОВ РОССИЙСКИХ ВУЗОВ

Михайлова Александра Сергеевна

СЕКЦИЯ | АГРО-, БИО- И ПРОДОВОЛЬСТВЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

VII ВСЕРОССИЙСКИЙ МОЛОДЁЖНЫЙ ФОРУМ
НАУКА БУДУЩЕГО - НАУКА МОЛОДЫХ

ДМИТРИЙ ИВАНОВ
ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ
И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

"НАУКА БУДУЩЕГО – НАУКА МОЛОДЫХ"

VII Всероссийский молодежный научный форум
23 – 26 августа 2022, Новосибирск

Секция "Агро-, био- и продовольственные технологии"

ДИПЛОМ ЗА ЛУЧШИЙ ДОКЛАД

Михайлова Александра Сергеевна

Санкт-Петербургский государственный университет

*In-silico анализ регуляторных генов R2R3-Myb, bHLH-Myc и WDR
контролирующих окраску волокна хлопчатника*

Руководитель секции,
профессор, академик РАН

А.П. Глинушкин

Приложение 25 – Справка о внедрении результатов



АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»

Олимпийский пр-кт, д. 1, пгт Сириус,
федеральная территория «Сириус»,
Краснодарский край, 354340
ОГРН 1192375046930, ИНН 2367010021

Тел./факс: (800) 100 41 55
e-mail: info@siriusuniversity.ru, сайт: siriusuniversity.ru

15.06.2026 № 4/1048-ГК

На № _____ от _____

В Диссертационный совет
по защите диссертаций на соискание ученой
степени кандидата биологических наук
доктора биологических наук
(24.1.235.01) при ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр
Всероссийский Институт генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

ул. Большая Морская, д.42, 44,
Санкт-Петербург, 190031,

secretary@vir.nw.ru

Справка о внедрении

Настоящим Научно-технологический университет «Сириус» подтверждает научно-практическое использование результатов диссертационной работы Михайловой Александры Сергеевны «Структурно-функциональная организация регуляторных генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* биосинтеза фенольных пигментов у хлопчатника *G. hirsutum* L.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Экспериментальные данные и теоретические выводы работы Михайловой А.С., опубликованные в журналах «Turkish Journal of Agriculture and Forestry» (2022, Vol. 46, № 5. – Р. 743–761) и «Journal of Natural Fibers» (2024, Vol. 21, № 1. – Art. 2399930.), использовались в образовательной программе магистратуры по направлению подготовки 06.04.01 Биология (направленность (профиль) «Генетика и биотехнология растений») в лекционных курсах «Частная генетика однодольных и двудольных растений» в 2025 году и «Генетические основы селекции растений» в 2026 году как пример комплексного исследования структурно-функциональной организации дуплицированных генов в геноме аллотетраплоидных видов растений.

Заместитель директора
по научной деятельности

Г.М. Капитонова

Исп.: Ефремова Ольга Сергеевна
Тел.: +7 (952) 394-98-33
Эл. почта: efremova.os@talantiuspeh.ru