

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), г. Санкт-Петербург.

Хлесткина Елена Константиновна
Научный доктор биологических наук, профессор РАН, член-руководитель: корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», г. Санкт-Петербург

Долгих Елена Анатольевна
Официальные доктор биологических наук, главный научный сотрудник, оппоненты: заведующая лабораторией сигнальной регуляции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-Петербург

Дмитриев Алексей Александрович
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией сравнительной геномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва

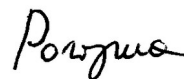
Ведущая Федеральное государственное бюджетное научное организация: учреждение «Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук», Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. на заседании диссертационного совета 24.1.235.01, созданного на базе ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44, телефон: 8(812) 312-51-61; факс: 8(812) 570-47-70.

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

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.
Учёный секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Рогозина Елена Вячеславовна



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Хлопчатник (род *Gossypium* L., семейство Malvaceae) является важнейшей сельскохозяйственной культурой. Хлопковое сырье активно используется в медицинской, текстильной, пищевой, фармакологической и других отраслях промышленности. 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 (Salunkhe et al., 1983). Накопление в вакуолях окисленной формы проантоцианидинов (ПА), также известных как конденсированные танины, приводит к проявлению оттенков коричневого цвета (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 (Bogs, 2005; Debeaujon, 2003; 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* арабидопсиса), один из *bHLH-MYC* (ортолог гена *AtTT8* арабидопсиса) 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 (Lloyd et al., 2017; Wang et al., 2019; Pu et al., 2020; Zhu et al 2025). Таким образом, в геноме аллотетраплоидного хлопчатника помимо паралогичных копий, могут присутствовать и гомеологичные. 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 установлении особенностей их организации и эволюции.

Для достижения цели поставлены 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 дублированных генов.

2. Выявить особенности эволюции гомеологичных и паралогичных копий генов из семейств *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 вида *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 из 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.

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 расширит разнообразие создаваемых сортов хлопчатника с природноокрашенным волокном для производства и использования хлопкового сырья по ресурсо- и природосберегающим технологиям.

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 бурым (проантоцианидиновой) волокном 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 фенилпропаноидного и флавоноидного путей на данной стадии и определяет проявление буро-зелёной 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 данного исследования были представлены на 10 российских и международных конференциях и отмечены дипломами I, II и III степеней: «125 лет прикладной ботаники в России» (2019, Санкт-Петербург, Россия); 11-й Международной школе молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика» SBB-2019 (2019, Новосибирск, Россия); 12-й Международной школе молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика» SBB-2020 (2020, Республика Крым, Россия); V Всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (2020, Москва, Россия); V Международной конференции «Современные проблемы генетики, радиобиологии, радиоэкологии и эволюции», посвященной Н. В. Тимофееву-Ресовскому (2021, Нор-Амберд, Армения); VI Международной Научной Конференции «Генетика,

Геномика, Биоинформатика и Биотехнология Растений» PlantGen (2021, Новосибирск, Россия); XI Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (2022, Москва, Россия); Форуме молодых ученых СНГ «Наука без границ» (2022, Нижний Новгород, Россия); VII Всероссийском молодежном форуме «Наука будущего – наука молодых» (2022, Новосибирск, Россия); VI Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (2025, Минск, Беларусь).

Личный вклад автора. Научные результаты, выявленные в ходе выполнения диссертационного исследования, получены автором самостоятельно в лаборатории постгеномных исследований, 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.

Публикации. По результатам научной работы в рамках диссертационного исследования опубликовано пять статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и индексируемых в международных системах цитирования Scopus и Web of Science.

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В литературном обзоре кратко изложены современные представления об эволюции и систематике рода *Gossypium*. Отдельный раздел посвящен роли транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов у растений, в частности, функции регуляторного комплекса MBW в контроле биосинтеза флавоноидных соединений. Особое внимание уделено этапам развития волокна хлопчатника и механизмам накопления пигментов, а также основным метаболитам, определяющим проявление зеленых и бурых оттенков волокна, и описанию генов, контролирующих формирование признака окрашенного волокна.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Материал исследования. Объектом исследования послужили 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 оттенков 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).

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

№ п/п	№ по каталогу ВИР	Название образца	Происхождение	Год включения в коллекцию	Окраска гипокотыля	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 только часть кодирующей последовательности (первый и второй экзоны) выявленного гена-кандидата *GhMYB10-A*

Методы исследования. 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. Относительный уровень транскрипции генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$, нормализуя транскрипцию целевых генов относительно среднего геометрического значения по трём референсным генам (Livak, Schmittgen, 2001).

Достоверность выявленных различий в относительных уровнях транскрипции подтверждали статистическими тестами (Student, 1908; Tukey, 1949; Girden, 1992; Kruskal, Wallis, 1952; Dunn, 1964; Holm, 1979). Группе сравнения соответствовала временная точка ДПО; порог статистической значимости определён при $p < 0.05$. 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 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>), Missense3D

(<http://missense3d.bc.ic.ac.uk/~missense3d/>), 3DligandSite (<https://www.wass-michaelislab.org/3dlig/index.html>), HEX Protein Docking v8.0.0 (<http://hex.loria.fr/>), PDBeFold (<https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>), PyMOL (<https://pymol.org/2/>), STRING v12.0 (<https://string-db.org/>).

Главы 3, 4. Результаты и обсуждение.

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

***R2R3-MYB*.** С помощью поиска по гомологии (BLASTn) на основании известного гена у *Arabidopsis thaliana* L. *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)), потенциально вовлеченных в биосинтез ПА, в базе данных CottonGene найдено восемь высокоомологичных копий генов из семейства *R2R3-MYB* в субгеномах At и Dt *G. hirsutum* (Lu et al., 2017). Идентифицированные гены обозначены как *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>). Гены семейства *R2R3-MYB* имеют консервативные мотивы R2 и R3 (Pfamseq: PF00249) и содержат три экзона. У всех идентифицированных генов детектированы последовательности, кодирующие консервативные ДНК-связывающие домены R2- и R3-MYB. Кроме того, среди всех рассматриваемых копий *R2R3-MYB* не наблюдается несинонимичных замен или делеций критически важных аминокислотных остатков. Все копии могут быть функционально значимыми, за исключением *GhTT2-A3* (выявлен преждевременный стоп-кодон). Предсказанные 3D-модели функционально значимых консервативных регионов имеют сходную конформацию и характерные мотивы «спираль-петля-спираль». Промоторные последовательности генов из семейств *R2R3-MYB* в интервале 1000 пн от старт-кодона ATG содержат многочисленные *цис*-регуляторные элементы. Среди них найдены строго консервативные последовательности, такие как CAAT-бокс и GATA-бокс, а также группа промоторов TATA-бокс. Обнаружены множественные сайты узнавания ТФ семейства MYB, светочувствительные мотивы, а также сайты узнавания факторов bHLH-MYC.

***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 четыре копии генов из семейства *bHLH-MYC* в субгеномах At и Dt *G. hirsutum* (Yan et al., 2018). Идентифицированные гены обозначены как *GhTT8-A1*, *GhTT8-A2*, *GhTT8-D1* и *GhTT8-D2* в соответствии с правилами присвоения генных символов у аллополиплоидов.

Гены семейства *bHLH-MYC* содержат два консервативных ДНК-связывающих домена: «спираль-петля-спираль» (HLH; Pfamseq: PF00010) и N-терминальный регион семейств ТФ MYB и MYC (bHLH-MYC_N, Pfamseq: PF14215). У всех идентифицированных регуляторных генов семейства *bHLH-MYC* детектированы консервативные участки, кодирующие перечисленные консервативные функциональные домены. Однако в последовательности гена *GhTT8-A2* в N-концевой области HLH домена наблюдается аминокислотная замена аргинина на серин в положении 13. Поскольку остаток аргинина участвует не только в формировании белковой глобулы, но и в связывании с

нуклеотидными основаниями, вероятно, подобная замена ведет к утрате третичной структуры, а значит и функций белка. Все предсказанные 3D-модели GhTT8 демонстрируют высокую степень гомологии по отношению к трехмерной структуре AtTT8. В промоторной области всех идентифицированных генов из семейства *bHLH-MYC* обнаружены мотивы GT1 и GATA, широко известные как *cis*-регуляторные элементы многих светочувствительных генов, а также консервативные светочувствительные мотивы, такие как *Inr*-элементы, Т-бокс и I-бокс.

WD40. На основании ранее описанных генов *GhTTG1* (GenBank: AF530907) и *GhTTG3* (AF530911) у *G. hirsutum*, ортологов гена *AtTTG1* (AT5G24520), в базе данных CottonFGD найдено четыре высокогомологичных копий в субгеномах At и Dt *G. hirsutum* (Humphries et al., 2005). Идентифицированные гены обозначены как *GhTTG1-A*, *GhTTG1-D*, *GhTTG3-A* и *GhTTG3-D*, согласно правилам присвоения генных символов у аллополиплоидов. В ходе множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей копий генов выделено четыре мотива WD-повторов; несинонимичных замен не обнаружено. Предсказанные модели белковых продуктов генов WD40 обладают характерными для семейства повторяющимися мотивами из 40 аминокислот, которые оканчиваются дипептидом триптофан-аспарагиновая кислота (WD). В процессе укладки полипептидной цепи каждый мотив формирует отдельный β -лист (лопасть), каждый из которых затем организуется в характерную структуру в виде β -пропеллера с семью лопастями в случае белков WD40 как у хлопчатника, так и у *A. thaliana*.

Таким образом, у вида *G. hirsutum* дивергенции в большей степени подверглись промоторные последовательности всех идентифицированных регуляторных генов, в то время как кодирующие находились под давлением отбора.

Филогенетический анализ последовательностей генов из семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40. На основании идентифицированных ранее генов *GhTT2-A1*, *GhMYB10*, *GhTT8*, *GhTTG1* и *GhTTG3* у *G. hirsutum* в базе данных CottonGene найдены высокогомологичные копии генов из числа *R2R3-MYB* (16 генов), *bHLH-MYC* (8 генов) и *WD40* (7 генов) в геномах диплоидных (*G. arboreum* и *G. raimondii*) видов и аллотетраплоидного (*G. barbadense*) вида хлопчатника. Для выявленных копий генов с помощью программного обеспечения MEGA-X v.10.0.5 проведен анализ филогенетического сродства на основании полноразмерных нуклеотидных последовательностей кодирующей области с использованием алгоритма Neighbor-Joining и рассчитаны времена дубликации паралогичных копий (млн лет). Для калибровки временной шкалы принят период времени дивергенции мальвовых и крестоцветных 68–96 млн лет.

R2R3-MYB. Анализ филогенетического сходства между 24 идентифицированными генами из семейства *R2R3-MYB* у видов рода *Gossypium* и 5 *R2R3-MYB* у *A. thaliana*, вовлеченных в биосинтез проантоцианидинов (*AtMYB113* (AT1G66370), *AtMYB114* (AT1G66380), *AtPAP1* (AT1G56650), *AtPAP2* (AT1G66390), *AtTT2* (AJ299452)) был проведен на основании полноразмерных нуклеотидных последовательностей кодирующей области с использованием алгоритма Neighbor-Joining. Дубликация генов *TT2* хлопчатника происходила дважды: 29,98 млн лет назад и около 27,46 млн лет назад (рисунок 1). Гены *MYB10* составляют отдельную изолированную группу, которая отделилась от генов *TT2* хлопчатника около 82,00 млн лет назад.



Рисунок 1 – Анализ филогенетического сходства генов из семейства *R2R3-MYB*. Алгоритм Neighbor-Joining.

Дивергенция гомеологичных копий гена *TT2* в субгеномах *At* и *Dt*, в соответствии с результатами филогенетического анализа, происходила в период с 5,16 по 3,28 млн лет назад.

***bHLH-MYC*.** Дупликация генов *TT8* из семейства *bHLH-MYC* хлопчатника произошла около 32,70 млн лет назад с образованием двух клад. У диплоидных и аллотетраплоидных видов хлопчатника проанализировано 12 идентифицированных ранее генов в рамках данного исследования и четыре гена *A. thaliana* (*AtTT8* (AT4G09820), *AtGL3* (AT5G41315), *AtEGL3* (AT1G63650), *AtMYC2* (AT1G32640)). Дивергенция гомеологичных генов *TT8* в субгеномах *At* и *Dt* произошла в интервале около 3,20–2,05 млн лет назад (рисунок 2).

***WD40*.** Филогенетический анализ 11 генов семейства *WD40* у видов рода *Gossypium*, а также генов *AtTTG1* (AT5G24520) и *AtMSI3* (AT4G35050) *A. thaliana* показал, что гены *TTG1* и *TTG3* хлопчатника являются ортологами гена *AtTTG1*, при этом *AtTTG1* выступает в качестве сестринской группы по отношению ко кладе *Gossypium*, а *AtMSI3* использован в качестве аутгруппы для укоренения дерева. Паралогичные гены *TTG1* и *TTG3* дивергировали в результате дупликации гена-предка около 45,19 млн лет назад.

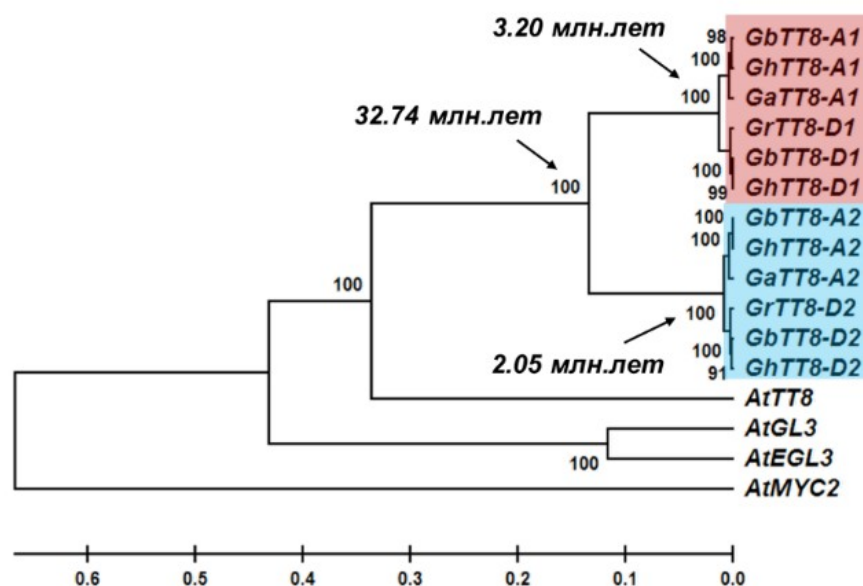


Рисунок 2 – Анализ филогенетического сходства генов из семейства *bHLH-MYC*. Алгоритм Neighbor-Joining.

Дивергенция гомеологичных копий в субгеномах At- и Dt произошла в более поздний период: для генов TTG1 – около 2,24 млн лет назад, для генов TTG3 – около 3,92 млн лет назад.

Согласно филогенетическому анализу, все события дупликации рассматриваемых генов произошли до дивергенции диплоидных видов от общего предка рода *Gossypium*. После полиплоидизации новые дупликации не образовывались. Кроме того, гены, относящиеся к семейству *WD40* ($Ka/Ks = 0,104$), в большей степени поддерживаются стабилизирующим отбором, чем соответствующие гены семейств *bHLH-MYC* ($Ka/Ks = 0,674$) и *R2R3-MYB* ($Ka/Ks = 0,413$). Вследствие ограниченного аллельного разнообразия генов *WD40*, дальнейшие исследования были сосредоточены на более вариабельных компонентах комплекса, а именно семействах *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC*.

Секвенирование аллелей генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC*. Для секвенирования аллелей генов *R2R3-MYB* у образцов хлопчатника, контрастных по окраске волокна (темно-бурые, светло-бурые и контрольный белый) и гипокотилей (зеленый, красный), сконструированы праймеры, специфичные к кодирующим и промоторным областям идентифицированных ранее копий генов в базе данных CottonFGD. В анализ включены три пары паралогичных копий *GhTT2*, tandemно расположенных в хромосомах A07 и D07 (*GhTT2-A1*, *GhTT2-A2*, *GhTT2-A3*, *GhTT2-D1*, *GhTT2-D2*, *GhTT2-D3*), а также гены *GhMYB10-A* и *GhMYB10-D*, локализованные в хромосомах A06 и D06. При секвенировании нуклеотидной последовательности гомеологичных копий гена *GhTT2* в субгеномах At и Dt не обнаружена взаимосвязь окраски волокна с выявленным полиморфизмом; для копии *GhTT2-D1* у образцов с белым (к-8020) и светло-бурым волокном (к-8129, к-3488) не выявлено отличий от референсной последовательности. Последовательность идентифицированных копий генов *GhTT2-D1* и *GhMYB10-D* в субгеноме Dt полностью соответствовала референсу у всех изученных образцов. Не найдено взаимосвязи окраски с выявленным полиморфизмом в промоторных последовательностях генов *GhTT8*: *GhTT8-A2*, *GhTT8-D1*, *GhTT8-D2*. У

образцов хлопчатника со светло-бурой окраской волокна (к-4305 и к-3488) и белой (к-8020) в промоторной последовательности *GhTT8-A2* обнаружена вставка длиной 23 пн в положении -396 пн до начала 5'-UTR области; инсерцией -/TG в промоторной области в позиции -268 пн и делециями A/- и T/- в положениях 737 и 733 пн, отличались образцы к-4305 и к-8020 соответственно. Последовательность генов *GhTT8-A1/A2/D1/D2* остальных изучаемых образцов соответствовала референсу. Однако характерной вставкой в промоторе гена *GhMYB10-A* выделились образцы со светло-бурым волокном (рисунок 3).

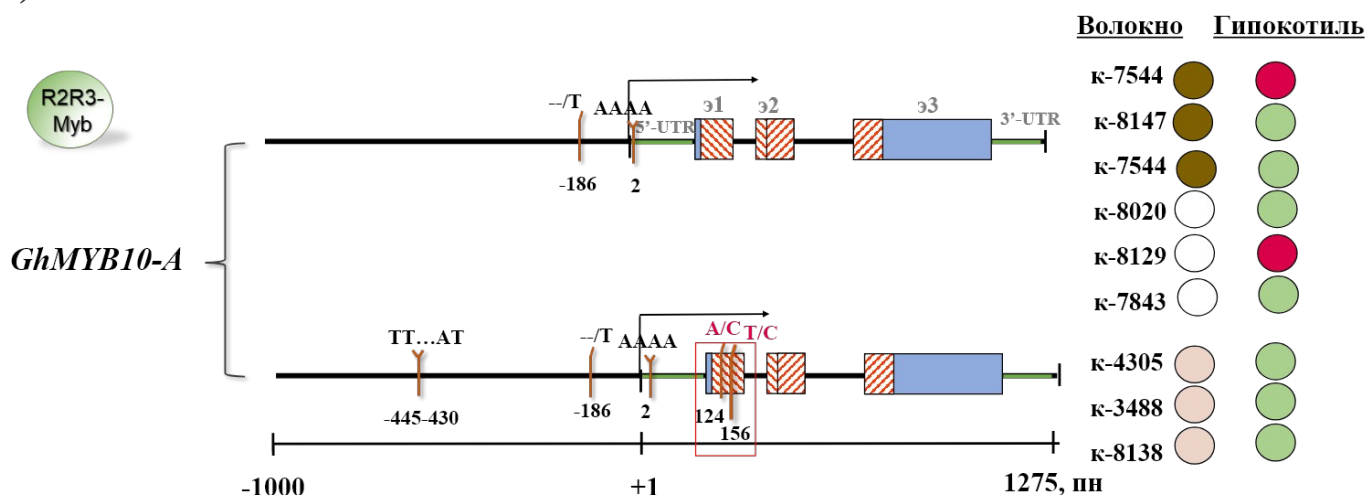


Рисунок 3 – Отличия от референсной последовательности, выявленные при секвенировании регуляторного гена *GhMYB10-A*. Синими прямоугольниками обозначены экзоны, функциональные домены R2 и R3 в экзонах – красной штриховкой; э – экзоны, пн – пары азотистых оснований нуклеотидов, 5'-UTR/3'-UTR (untranslated region) – нетранслируемые области.

Это основной ген-кандидат, связанный с изменениями по окраске волокна. У образцов к-4305, к-3488, к-8128 и к-7314 (разного происхождения), имеющих светло-бурую окраску волокна, наблюдалась инсерция длиной 46 пн в промоторной области, в последовательности которой выявлены светочувствительные мотивы, участвующие в активации транскрипции регуляторных генов семейства *R2R3-MYB*.

Кроме того, в области первого экзона, кодирующего функциональный консервативный домен R2 гена *GhMYB10-A*, у всех образцов со светло-бурой окраской волокна обнаружены однонуклеотидные замены A → C и T → C, которые приводят к миссенс-мутациям и замене аминокислот в соответствующих положениях Лиз26Тре и Трп37Арг. Образцы с темно-бурым волокном (к-7544, к-8147, к-8161), а также неокрашенные образцы, включая к-7843 и к-467 (таблица 1), не отмеченные на рисунке 3, не содержали однонуклеотидных замен в области первого экзона.

Сравнительный *in silico* анализ исходной формы ТФ *GhMYB10-A* и альтернативной, содержащей выявленные миссенс-мутации. Согласно предсказанию сервера Phyre2, замена Лиз26Тре в последовательности исходной формы белка *GhMYB10-A* носит нейтральный характер, тогда как замена высококонсервативного остатка триптофана в положении 37, Трп37Арг, может привести к утрате функций белкового продукта. Остатки триптофана, располагающиеся на расстоянии 18–19 аминокислот друг от друга в ДНК-связывающемся домене MYB, формируют гидрофобный каркас, способствующий поддержке структурного элемента «спираль-петля-спираль» (Kanei-Ishii et al., 1990).

Ранее определено, что замена остатков триптофана на лейцин и аланин (неполярные аминокислоты) не влияла на функцию белка, тогда как замена на аргинин (полярную аминокислоту) приводила к потере ДНК-связывающей активности, что дополнительно подтверждает тезис о важности гидрофобных взаимодействий (Saikumar, Murali, Reddy, 1990).

С помощью инструмента 3DligandSite показаны различия в потенциальных сайтах связывания исходной и альтернативной форм GhMYB10-A с последовательностью ДНК. 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; рисунок 4).

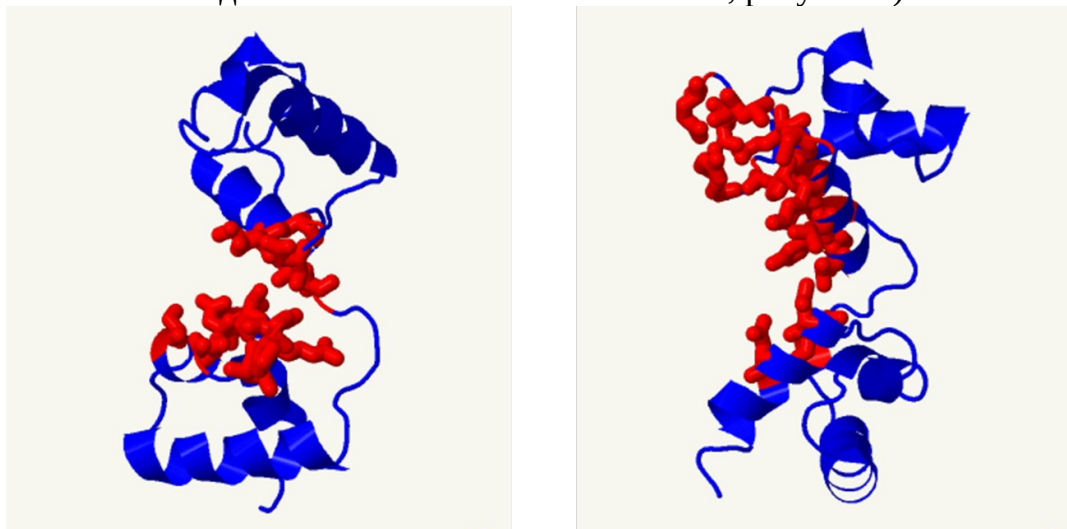


Рисунок 4 – Потенциальные сайты связывания (аминокислотные остатки, выделены красным) исходной (слева) и альтернативной (справа) форм белка GhMYB10-A с последовательностью ДНК целевых генов. Структуры предсказаны с помощью инструмента 3DligandSite и визуализированы в PyMOL.

Результаты молекулярного моделирования с целью поиска наиболее энергетически выгодных состояний при образовании комплекса белок-ДНК для двух форм белка GhMYB10-A и предсказание аминокислотных остатков, которые с большей долей вероятности участвуют во взаимодействии с цепью ДНК, с помощью 3DligandSite, коррелируют между собой (рисунки 4, 5).

В обоих случаях потенциальные сайты связывания белков с последовательностью ДНК у рассматриваемых форм белка различаются.

Важно отметить, что замена Лиз26Тре локализована в первой α -спирали домена R2, Трп37Арг – во второй α -спирали. Две первые α -спирали в R2 и R3 доменах выполняют структурную роль: первая α -спираль стабилизирующая, участвует в формировании гидрофобного (триптофанового) ядра; вторая α -спираль вместе с первой образует опору и создает необходимый угол наклона для правильного позиционирования третьей α -спирали относительно большой бороздки ДНК. Третья α -спираль – самая важная с точки зрения специфичности, 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).

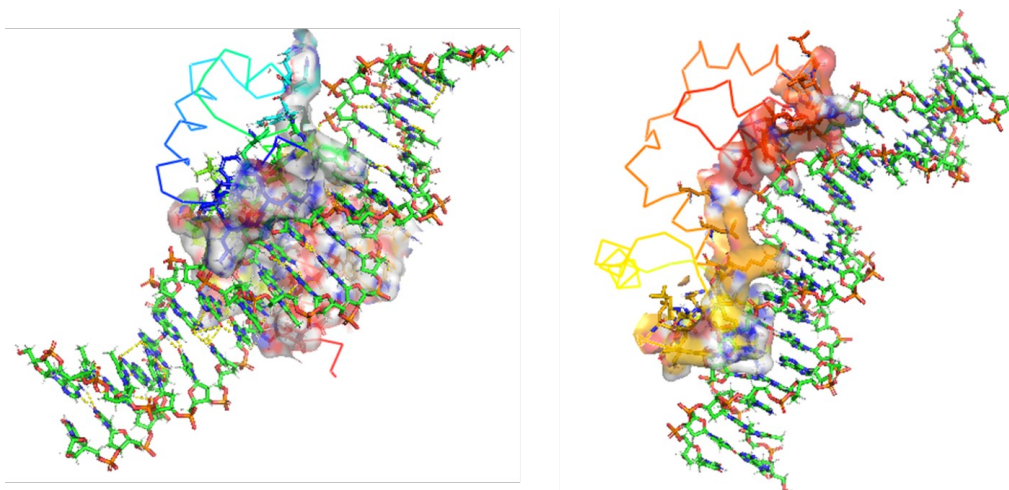


Рисунок 5 – Визуализация результатов молекулярного моделирования с помощью NEH 8.0.0 в PyMOL: цепь ДНК, исходная (слева) и альтернативная (справа) формы белка. Аминокислотные остатки, задействованные в связывании с целевой нуклеотидной последовательностью, выделены в виде поверхности, построенной с учетом Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов; цвета соответствуют типам атомов белка: белый – водород, красный – кислород, оранжевый – сера, серый – углерод.

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, чтобы обе третьи α -спирали одновременно взаимодействовали с ДНК – они “обхватывают” двойную спираль ДНК с двух сторон. В альтернативной форме белка вследствие замены одного из высококонсервативных остатков триптофана гидрофобный каркас, способствующий поддержке структурного элемента «спираль-петля-спираль», не образуется (Kanei-Ishii et al., 1990; Saikumar et al., 1990). Выявленные замены Лиз26Тре и Трп37Арг не позволяют принять α -спиралям домена R2 конформацию, необходимую для специфичного связывания ТФ со спиралью ДНК.

Таким образом, у альтернативной формы GhMYB10-A вследствие замены высококонсервативного остатка триптофана в положении 37 нарушается гидрофобный каркас R2-домена, стабилизирующий структуру «спираль-петля-спираль», что может снижать ДНК-связывающую активность этого ТФ у образцов со светло-бурой окраской волокна.

Анализируя всё вышесказанное можно заключить, что у светло-бурых форм, вероятно, нарушена функция ТФ GhMYB10-A в связи с двумя обнаруженными заменами Лиз26Тре и Трп37Арг в первой и второй α -спиралях 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 нефункциональную форму ТФ с нарушенной третичной организацией.

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.

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

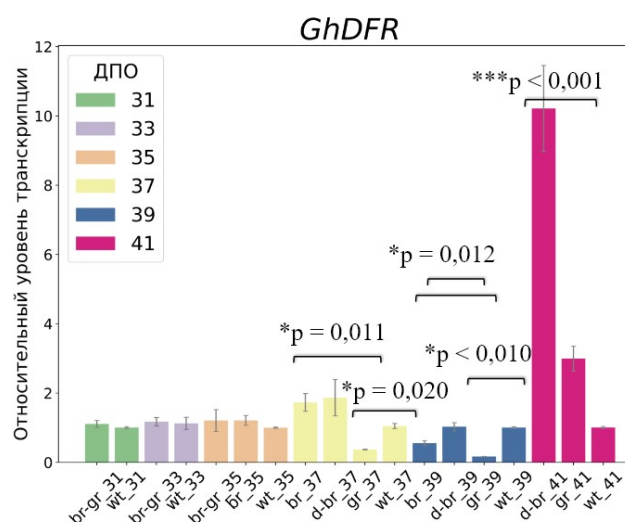
Поздний период формирования вторичной клеточной стенки (ВКС) – с 30 по 45 ДПО – у волокна хлопчатника характеризуется интенсивным накоплением метаболитов флавоноидного и фенилпропаноидного путей у природноокрашенных образцов. Это согласуется с активным синтезом пигментов, определяющих окраску волокна, поскольку к 30 ДПО в нём достигается ~75% от конечного содержания целлюлозы — основного структурного компонента зрелого волокна. В настоящей работе для оценки относительного уровня транскрипции ключевых структурных (*GhDFR*, *GhANR*, *Gh4CL*) и регуляторных (*GhMYB10*, *GhMYB1R1*) генов, участвующих в биосинтезе пигментов, изолировали тотальную РНК из волокна хлопчатника у образцов с контрастной окраской волокна в период проявления пигментации (рисунок 6). В качестве контрольного использовали образец с белым волокном. Гены *GhDFR* (ранний этап) и *GhANR* (поздний этап) биосинтеза проантоцианидинов демонстрировали повышенный уровень транскрипции у образцов с бурой окраской волокна. Относительный уровень транскрипции *GhDFR* резко возрастал у образца с тёмно-бурой окраской волокна к 41 ДПО и оставался низким у остальных образцов. У образца со светло-бурым волокном активность *GhANR* возрастала к 35 ДПО, у тёмно-бурого – к 37 ДПО.

Синтез вторичных метаболитов фенилпропаноидного пути тесно связан с факторами транскрипции MYB. Регуляторный ген *GhMYB10-A* из субгенома At активно транскрибировался у образцов с буро-зелёным волокном на 33 ДПО, светло-бурым – к 35 ДПО, у тёмно-бурого – к 37 ДПО (рисунок 6). Повышенный уровень транскрипции *GhMYB10-A* во всех окрашенных образцах, за исключением белого и зеленого, указывает на вероятную вовлечённость соответствующего ТФ в процесс биосинтеза ПА и других пигментов флавоноидного пути в окрашенном волокне.

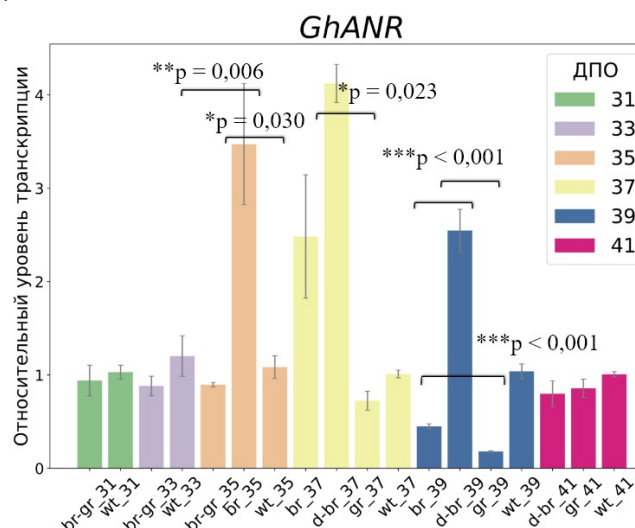
У зелёноволокнистых образцов содержание мРНК гена *Gh4CL* достигало максимума к 41 ДПО; у буро-зелёных – к 35 ДПО, тогда как у других форм относительный уровень транскрипции *Gh4CL* оставался низким (рисунок 7).

Ранее удалось установить взаимосвязь между накоплением флавоноидных метаболитов и активностью генов семейства MYB: выделено два регуляторных гена-кандидата *GhMYB1R1* в субгеномах At и Dt, единственных из числа регуляторных у образцов хлопчатника с зелёной окраской волокна, согласно литературным источникам (Tang et al., 2021). Наибольшее количество мРНК гена *GhMYB1R1* было зафиксировано у буро-зелёного образца к 35 ДПО, а также у образцов с зелёной и светло-бурой окраской волокна к 39 ДПО.

а)



б)



в)

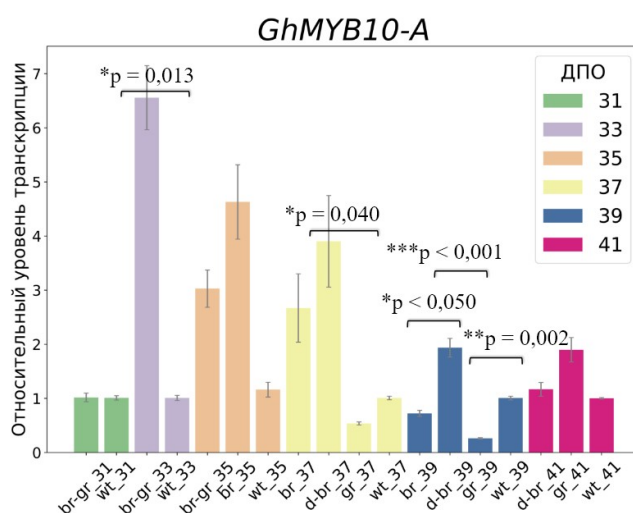


Рисунок 6 – Относительный уровень транскрипции ключевых генов: а) *GhDFR* (Gohir.A05G192500), б) *GhANR* (Gohir.A05G167300) и в) *GhMYB10-A* (Gohir.A06G075700) биосинтеза флавоноидных пигментов в волокне хлопчатника с 31 по 41 ДПО. Данные представлены для каждого гена отдельно в зависимости от типа волокна: d-br – тёмно-бурое (к-8147), br – светло-бурое (к-8138), br-gr – буро-зелёное волокно (к-8146), gr – зелёное (к-8158), wt – белое (к-8020). Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего (SEM) по трем биологическим повторностям.

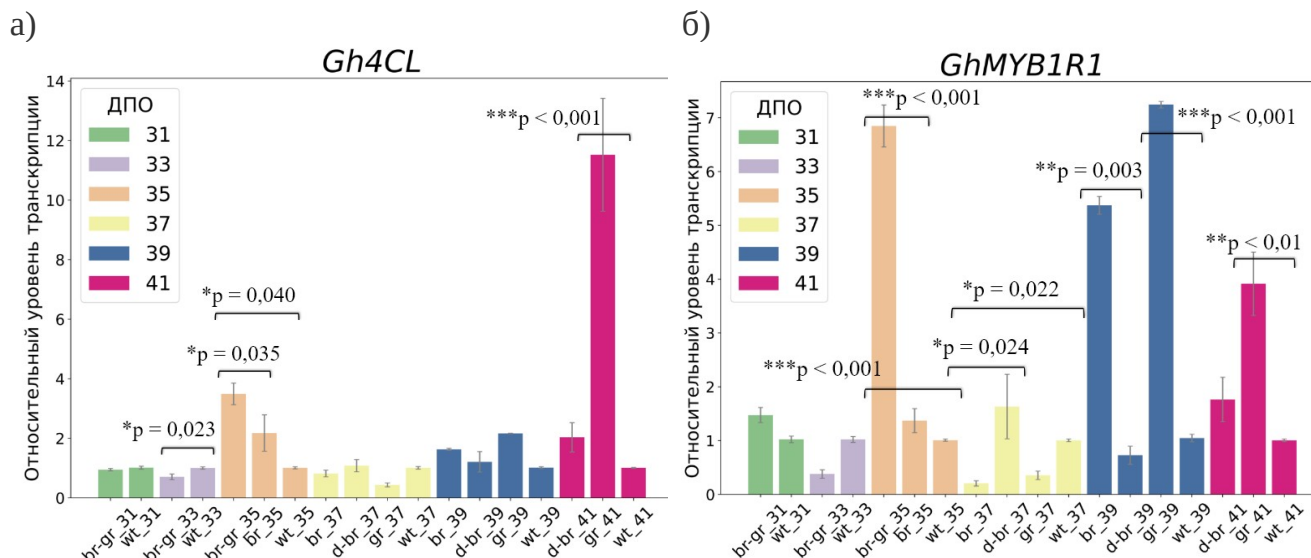


Рисунок 7 – Относительный уровень транскрипции ключевых генов: а) *Gh4CL* (Phytozome: Gohir.A10G049500) и б) *GhMYB1R1* (Phytozome: Gohir.A12G215300) биосинтеза пигментов фенилпропаноидного пути в волокне хлопчатника с 31 по 41 ДПО.

Таким образом, у зеленоволоконистых форм доминировала экспрессия *Gh4CL* и *GhMYB1R1*, что указывает на активацию ранних этапов фенилпропаноидного метаболизма. Образец с буро-зелёным волокном характеризовался одновременным повышенным уровнем мРНК обоих регуляторных генов, наряду со структурными *GhANR* и *Gh4CL*, что может отражать совместное накопление пигментов, обуславливающих двойную окраску.

Обобщая все вышесказанное, можно сделать вывод о том, что дифференциальная экспрессия регуляторных генов *GhMYB1R1* и *GhMYB10-A* у природоокрашенных образцов по сравнению с беловолокнистым, наряду с активностью структурных генов, может быть связана с формированием признака окрашенного волокна у хлопчатника.

GhMYB10-A как компонент MBW-комплекса: регуляция биосинтеза флавоноидов и пигментации волокна хлопчатника. Анализ белок-белковых взаимодействий с помощью STRING v.12.0 выявил экспериментально подтвержденную связь ТФ GhMYB10-A с двумя ТФ семейства bHLH-MYC – bHLH130D (Phytozome: Gohir.D11G127600) и bHLH064D (Gohir.D08G203900), а также с рядом белков семейства WD40: LOC107901465 (Gohir.D06G035600), LOC107945759 (Gohir.D08G116300), LOC107962430 (Gohir.A06G035000), LOC107948000 (Gohir.A08G104600) и LOC107904228 (Gohir.D04G000300).

У *A. thaliana* экспрессия гена *bHLH130D* (*AtTT8*), транскрипционно активируется фактором *AtTT2* (R2R3-MYB), с дальнейшим объединением в комплекс с WD40-белком *AtTTG1*. Этот регуляторный комплекс связывается с промотором гена *BANYULS* (*BAN*) (ортолог гена *GhANR* хлопчатника), кодирующего антоцианидин редуктазу, и активирует его транскрипцию, что способствует накоплению ПА в семенной кожуре арабидопсиса (Baudry et al., 2004, 2006). Аналогичное взаимодействие обнаружено у хлопчатника: белковый продукт гена *GhTT2-3A* (*GhTT2-A1*, ортолог *AtTT2*) активирует транскрипцию *GhbHLH130D* (*bHLH130D*, ортолог *AtTT8*), при этом уровень мРНК гена *GhbHLH130D* у образцов с бурой окраской волокна значительно превышает этот уровень у беловолокнистых форм (Yan et al., 2018). Один из генов WD40 в хромосоме D04 (LOC107904228) ранее был идентифицирован как функциональный ортолог *AtTTG1*

(GenBank: AF530908); показан его вклад в развитие волокна хлопчатника, а также накопление антоцианов и ПА (Baudry et al., 2004; Humphries et al., 2005). Таким образом, можно предположить вероятное вовлечение ТФ GhMYB10-A, как одного из компонентов MBW-комплекса, в регуляцию биосинтеза пигментов флавоноидного пути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании описанных ранее генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* у *A. thaliana* и *G. hirsutum*, в данной работе идентифицированы дублицированные копии соответствующих генов в геноме хлопчатника вида *G. hirsutum*. По результатам филогенетического анализа установлено, что паралогичные копии разошлись до дивергенции диплоидных видов от общего предка рода *Gossypium*. 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 с изменениями по признаку окраски 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 31 по 41 ДПО у образцов хлопчатника с контрастной окраской – белой, бурой, зелёной и буро-зелёной. У образцов с бурым волокном наблюдался повышенный уровень транскрипции 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, 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 имеют и практическую значимость: выявленные аллельные различия, связанные с проявлением светло-бурой окраски волокна, являются основой для дальнейшей разработки удобных для скрининга селекционного материала диагностических ДНК-маркеров с целью выведения 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 Тре37Арг), предположили:
 - нарушение у альтернативной формы *GhMYB10-A* гидрофобного каркаса R2-домена;
 - дестабилизацию структуры «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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и индексируемых в международных системах цитирования Scopus и Web of Science:

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 // Mikhailova A. S., Podolnaya L. P., Khlestkina E. K. 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/10.30901/2658-6266-2026-3-01>

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

1. Диплом III степени за отлично представленный доклад на стендовой сессии в рамках 12-й Международной школы молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика», SBV-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».