

Краткое сообщение

УДК 575.1/.2

DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-01



Особенности организации дублицированных копий ортологов генов *AtTT2* и *AtTT8* арабидопсиса в геноме аллотетраплоидного хлопчатника

А. С. Михайлова, Е. К. Хлесткина

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

Автор, ответственный за переписку: Александра Сергеевна Михайлова, a.mikhailova@vir.nw.ru

Arabidopsis thaliana L. является классическим модельным объектом, у которого подробно описаны механизмы регуляции биосинтеза флавоноидных пигментов с участием генов *AtTT2*, относящихся к семейству R2R3-MYB, и *AtTT8* из семейства bHLH-MYC. Актуальным остается вопрос о судьбе дублицированных копий у аллополиплоидных видов, возникших в результате межвидовой гибридизации, удобной моделью для изучения которого является хлопчатник вида *Gossypium hirsutum* L. В субгеномах At и Dt *G. hirsutum* идентифицированы копии генов *GhTT2*, *GhMYB10* и *GhTT8*, являющиеся ортологами соответствующих генов *A. thaliana*. В настоящей работе на основе секвенирования аллелей указанных регуляторных генов у образцов хлопчатника с контрастной окраской волокна и гипокотыля оценивается роль аллополиплоидизации в эволюции дублицированных регуляторных генов, кодирующих компоненты MBW-комплекса: транскрипционные факторы семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC, WD40. Для генов семейства R2R3-MYB хлопчатника выявлен асимметричный характер эволюции, при котором гены субгенома At эволюционируют быстрее и находятся под менее строгим очищающим отбором по сравнению с гомеологами субгенома Dt. Секвенированные последовательности впервые депонированы в международную базу данных GenBank (NCBI).

Ключевые слова: *Gossypium hirsutum* L., природноокрашенное волокно, R2R3-MYB, bHLH-MYC, дублицированные копии генов, гомеологичные гены, асимметричный характер эволюции

Благодарности: выражаем благодарность сотрудникам отдела генетических ресурсов масличных и прядильных культур ВИР, а также к.б.н., в.н.с. и куратору коллекции хлопчатника Ларисе Петровне Подольной за предоставление материала для исследований и активное сотрудничество. Работа выполнена в рамках темы НИР FGEM-2022-0007 «Выявление новых генетических маркеров селекционно значимых свойств и новых аллельных вариантов хозяйственно ценных генов в генофонде культурных растений и их диких родичей при помощи геномных и постгеномных технологий».

Для цитирования: Михайлова А.С., Хлесткина Е.К. Особенности организации дублицированных копий ортологов генов *AtTT2* и *AtTT8* арабидопсиса в геноме аллотетраплоидного хлопчатника. *Биотехнология и селекция растений*. 2026;9(3). DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-01

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Михайлова А.С., Хлесткина Е.К., 2026

Brief communication

DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-01

Organization of duplicated copies of the *Arabidopsis* gene orthologs *AtTT2* and *AtTT8* in the allotetraploid cotton genome

Aleksandra S. Mikhailova, Elena K. Khlestkina

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Aleksandra S. Mikhailova, a.mikhailova@vir.nw.ru

Arabidopsis thaliana L. is a classic model organism in which the regulatory mechanisms of flavonoid pigment biosynthesis involving the *AtTT2* gene (R2R3-MYB family) and *AtTT8* (bHLH-MYC family) have been characterized in detail. The fate of duplicated copies in allopolyploid species that arose as a result of interspecific hybridization remains a topical question, and cotton *Gossypium hirsutum* L. provides a convenient model to address it. In the genome of *G. hirsutum*, copies of the genes *GhTT2*, *GhMYB10*, and *GhTT8* have been identified in the At- and Dt-subgenomes; these copies are orthologs of the corresponding *A. thaliana* genes. Based on the sequencing of alleles of these regulatory genes in cotton accessions with contrasting fiber and hypocotyl pigmentation, this study evaluates the role of allopolyploidization in the evolution of duplicated regulatory genes encoding components of the MBW complex, namely R2R3-MYB, bHLH-MYC, and WD40 transcription factors. The cotton R2R3-MYB gene family has been found to evolve asymmetrically, when genes of the At subgenome evolve faster and are subject to a less stringent purifying selection compared to their homeologs in the Dt subgenome. It is for the first time that the gene sequences were deposited in the international GenBank database (NCBI).

Keywords: *Gossypium hirsutum* L., naturally colored fiber, R2R3-MYB, bHLH-MYC, duplicated gene copies, homoeologous genes, asymmetric evolution

Acknowledgements: the authors thank the Department of Oil and Fiber Crop Genetic Resources of VIR, and Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher and the Cotton Collection Curator, Larisa P. Podolnaya, for providing the research material and for active collaboration. The article was prepared within the framework of the VIR project FGEM-2022-0007 “Identifying new genetic markers of significant traits for breeding and new allelic versions of agronomically important genes in the genetic diversity of cultivated plants and their wild relatives using genomic and postgenomic technologies”.

For citation: Mikhailova A.S., Khlestkina E.K. Organization of duplicated copies of the *Arabidopsis* gene orthologs *AtTT2* and *AtTT8* in the allotetraploid cotton genome. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2026;9(3):.. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-01

Financial transparency: the authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal’s opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Mikhailova A.S., Khlestkina E.K., 2026

Введение

Процессы полиплоидизации способствуют расширению видового разнообразия растений и играют важную роль в эволюции их геномов (Otto, Whitton, 2000; Rutland et al., 2021). В новообразованных полиплоидах большинство дублированных генов находится под действием очищающего отбора, однако часть копий подвергается субфункционализации или неофункционализации, либо утрачивает функциональность в ходе псевдогенизации (Force et al., 1999; Magadum et al., 2013). Распределение исходных функций между вновь возникшими дублированными генами или приобретение новых повышает адаптивный потенциал и способствует приобретению пластичности генома у многих видов растений (Leitch, Leitch, 2008; Renny-Byfield, Wendel, 2014).

Удобной моделью для изучения механизмов регуляции дублированных генов и путей их адаптивных изменений являются гены, кодирующие флавоноиды, благодаря хорошо изученным путям метаболизма этих соединений и широкому разнообразию обусловленной ими пигментации в различных тканях растений (Winkel-Shirley, 2001; Koes et al., 2005; Gould, Lister, 2005; Peng et al., 2012; Shoeva et al., 2017). Ферменты, осуществляющие превращения в ходе биосинтеза метаболитов флавоноидного пути, кодируются структурными генами (Saito et al., 2013). Экспрессию этих генов контролирует MBW-комплекс, включающий транскрипционные факторы (ТФ) семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40, кодируемые соответствующими регуляторными генами (Koes et al., 2005). Ранее было продемонстрировано, что регуляторные гены флавоноидного пути, как правило, эволюционируют быстрее структурных генов-мишеней, в связи с чем представляют наибольший интерес для отслеживания таких изменений (Rauscher et al., 1999).

Arabidopsis thaliana L. является классическим модельным объектом, у которого подробно описаны механизмы регуляции биосинтеза флавоноидных пигментов (Walker et al., 1999; Koes et al., 2005; Gonzalez et al., 2008; Katiyar et al., 2012). Накопление проантоцианидинов (ПА), относящихся к классу флавоноидных пигментов, в семенной кожуре *A. thaliana* регулирует MBW-комплекс, компоненты которого кодируют идентифицированные регуляторные гены *AtTT2*, которые относят к семейству R2R3-MYB, *AtTT8* – к семейству bHLH-MYC, *AtTTG1* – к семейству WD40 (Walker et al., 1999; Nesi et al., 2000; Baudry et al., 2004; 2006; Gonzalez et al., 2008). В свою очередь, хлопчатник *Gossypium hirsutum* L. с диплоидным набором хромосом $2n=4x=52$, геномным составом AD₁, представляет собой удобную модель аллотетраплоидного вида, с использованием которой можно детально оценить влияние процесса межвидовой гибридизации диплоидных предков с геномом А, который унаследован от афро-азиатских видов, близких к *Gossypium arboreum* L. и *Gossypium herbaceum* L., и D, унаследованным от аме-

риканских видов, близких к *Gossypium raimondii* L., с последующим удвоением генома, что привело к эволюции дублированных генов, кодирующих компоненты MBW-комплекса.

Среди регуляторных генов хлопчатника, вовлеченных в биосинтез ПА в волокне бурых оттенков, были выделены два гена из семейства R2R3-MYB – *GhTT2-A1*, также известный как *GhMYB36* и *GhTT2-3A*, и *GhMYB10* (ортолог гена *AtTT2 A. thaliana*), один из семейства bHLH-MYC – *GhTT8* (ортолог *AtTT8*), и два из WD40 – *GhTTG1* и *GhTTG3* (ортологи *AtTTG1* и *AtTTG3*) (Humphries et al., 2005; Lu et al., 2017; Yan et al., 2018). Позднее с помощью поиска по гомологии на основании известных генов *AtTT2* (TAIR: AT5G35550) и *AtTT8* (AT4G09820) в геноме *G. hirsutum* дополнительно идентифицированы гомологичные гены-кандидаты, вовлеченные в биосинтез флавоноидных пигментов: шесть из семейства R2R3-MYB, три из bHLH-MYC и три из WD40 (Mikhailova et al., 2022). Вследствие высокой структурной консервативности и строгого очищающего отбора, действующего на гены *WD40*, они являются менее информативными для анализа эволюционной дивергенции. В связи с этим в настоящей работе для оценки давления отбора на дублированные копии регуляторных генов биосинтеза флавоноидов был проведен сравнительный анализ нуклеотидного полиморфизма аллелей – представителей семейств R2R3-MYB и bHLH-MYC у образцов хлопчатника, контрастных по окраске волокна.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования были использованы образцы хлопчатника вида *G. hirsutum* L. с контрастной окраской волокна и гипокотилей из коллекции ВИР (таблица).

Одним из образцов был сорт ‘Браун’ – первый зарегистрированный в России сорт хлопчатника с природно-окрашенным волокном: патент на селекционное достижение № 10638 (Tuz et al., 2023). Сорт получен методом индивидуального отбора из гибридной комбинации ‘Генетик 34’: Туркмения, позднеспелый, коричневое волокно, и C2 8101-73: к-8112, Албания, скороспелый, белое волокно.

Геномную ДНК выделяли из 10-12-дневных гипокотилей проростков хлопчатника по 10 растений каждого образца с использованием набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) по протоколу, рекомендованному производителем. Качество и концентрацию ДНК оценивали методом электрофореза в агарозном геле, а также с помощью спектрофотометрического анализа. Дизайн праймеров, специфичных к целевым фрагментам полноразмерных генов, осуществляли с помощью онлайн-инструмента IDT PrimerQuest software (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/>). Последовательности олигонуклеотидов для полимеразной цепной реакции (ПЦР), использованных в работе, представлены в Приложении 1/

Таблица. Список изученных образцов хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. коллекции ВИР

Table. The studied *Gossypium hirsutum* L. accessions from the VIR collection

№ п/п/ No.	№ по каталогу ВИР/ VIR catalogue No.	Название образца/ Accession name	Происхождение/ Origin	Год включения в коллекцию/ Year of registration in the collection	Окраска гипокотыля/ Hypocotyl color	Окраска волокна/ Fiber color
1	к-7544*	Cm-Sp 6189	Мадагаскар	1986	Зелёная	Темно-бурая
2	к-7544*	Cm-Sp 6189	Мадагаскар	1986	Антоциановая	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	Антоциановая	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

*аллельные различия последовательностей регуляторных генов описаны ранее/ allelic differences in regulatory gene sequences were characterized earlier (Mikhailova et al., 2024)

Supplement¹. Амплификацию геномной ДНК проводили в термоциклерах T-100 (Biorad, США) и SimpliAmp Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Амплифицированные 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 готовой реакционной смеси BigDyeTM Terminator v3.1 и 3 мкл 5X секвенирующего буфера BigDyeTM Terminator v3.1 (BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Очистку продуктов реакции секвенирования от компонентов ПЦР-смеси проводили методом переосаждения этиловым спиртом. ДНК-фрагменты по размерам разделяли методом капиллярного электрофореза с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). Обработку полученных секвенограмм, в том числе оценку качества данных и выравнивание последовательностей на референсный геном, проводили с использованием программного обеспечения Ugene (<http://ugene.net/ru/>) и MEGA-X (Kumar et al., 2018). В качестве референса использовали последовательности беловолокнистого хлопчатника из базы данных Cotton FGD (<https://cottonfgd.org/>).

Результаты и обсуждение

Проведенный ранее анализ *in silico* структурно-функциональной организации генов семейств R2R3-MYB и bHLH-MYC продемонстрировал сохранение экзон-интронной и доменной структур, отсутствие преждевременных стоп-кодонов (за исключением третьей паралогичной копии *GhTT2-A3*) (Mikhailova et al., 2022). По результатам анализа аллельных различий копий регуляторных генов из семейств R2R3-MYB и bHLH-MYC, у образцов хлопчатника с контрастной окраской волокна функционально значимые отличия выявлены только для гена *GhMYB10-A*, белковый продукт которого относится к классу ТФ, регулирующих поздние этапы биосинтеза метаболитов флавоноидного пути (Mikhailova et al., 2024; 2026).

В рамках настоящей работы впервые секвенированы последовательности основного гена-кандидата *GhMYB10-A* у образцов к-8161, к-7314, к-7843 и к-467. На примере выявленного нуклеотидного полиморфизма гомеологичных генов *GhTT2* и *GhMYB10* в субгеномах At и Dt рассмотрены особенности организации дуплицированных копий в аллотетраплоидном геноме хлопчатника. Последовательности генов 12 образцов (см. таблицу) впервые депонированы в международную базу данных GenBank (NCBI) под номерами: PZ542165-PZ542188, PZ555351-PZ555357, PZ561958-PZ561964, PZ562709-PZ562715, PZ562720-PZ562726, PZ564210-PZ564221, PZ564430-PZ564436.

¹ Приложения доступны в онлайн версии статьи/ The supplements are available in the online version of the paper: DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-01

R2R3-MYB. Паралогичные копии генов семейства R2R3-MYB в субгеномах At и Dt содержат три экзона и составляют в длину: 1257 пн (*GhTT2-A1*), 1222 пн (*GhTT2-A2*), 1445 пн (*GhTT2-A3*), 1257 пн (*GhTT2-D1*), 1281 пн (*GhTT2-D2*), 1300 пн (*GhTT2-D3*), 1275 пн (*GhMYB10-A*) и 1292 пн (*GhMYB10-D*). В промоторной и кодирующей последовательностях паралогичных генов *GhTT2* в субгеноме At найдены многочисленные индели длиной от 1 до 32 пн, а также однонуклеотидные замены. В конце третьего экзона гена *GhTT2-A1* у образцов с темно-бурой окраской волокна (к-8147, к-7544) и у образца со светло-бурой окраской (к-4305) выявлена несинонимичная замена С→А в позиции 1070 пн (Приложение 2/ Supplement 2; Mikhailova et al., 2024). Данная замена не затрагивает консервативный R3-мотив MYB-домена и приводит к аминокислотной замене пролина на треонин в последовательности белка. Согласно выявленному полиморфизму аллелей гена *GhTT2-A2*, образцы могут быть разделены на две группы: первая – к-8147, к-7544, к-4305, вторая – к-3488, к-8020, к-8129 (Приложение 3/ Supplement 3). Образцы первой группы отличаются уникальным однонуклеотидным полиморфизмом С→G в положении 922 пн от начала транскрипции, который приводит к замене кодона GCA на GGA и, соответственно, аминокислотного остатка аланина на глицин в белке.

В промоторной области гена *GhTT2-A3* (от 746 до 81 пн относительно старт-кодона) полиморфизм оказался идентичным у большинства образцов за исключением к-3488, к-8020 и к-8129, у которых в позиции 162 пн обнаружена вставка цитозина; у образца к-8129 отсутствовали делеции длиной 33 и 8 пн в положениях 726 и 88 пн соответственно (Приложение 4/ Supplement 4). В кодирующей и 3'-нетранслируемой областях все образцы соответствовали референсу, за исключением синонимичной замены Т→С в положении 542 пн третьего экзона (R3-мотив) и делеции длиной 127 пн, приводящей к сдвигу рамки считывания, формированию преждевременного стоп-кодона TGA и уменьшению длины аминокислотной последовательности с 294 до 157 аа. Такие изменения, как правило, сопровождаются частичной или полной утратой функциональной активности белка (Léon-Kloosterziel et al., 1996; Nesi et al., 2000; Baudry et al., 2006; Mikhailova et al., 2024).

Стоит отметить, что и аллельный вариант *GhTT2-A3* референса также имеет преждевременный стоп-кодон TAG, что указывает на вероятную псевдогенизацию данной копии – процесс, характерный для избыточных дублированных генов со средним временем формирования порядка 3-7 млн лет (Lynch, Conery, 2000). С учетом того, что окрашенное волокно является предковым признаком для рода *Gossypium* L., а беловолокнистые формы закрепились в ходе доместикиации, и того, что дубликация регуляторных генов *GhTT2* и *GhTT8* в субгеномах At и Dt произошла до образования аллотетраплоидной формы, обнаруженный аллельный вариант *GhTT2-A3* меньшей длины, вероятно, является резуль-

татом псевдогенизации, произошедшей у диплоидного донора А-генома еще до аллополиплоидизации (Stephens et al., 1977).

В последовательности *GhTT2-D1* не найдено значимых полиморфных вариантов, за исключением ряда инсерций в конце третьего экзона: -/A (966 пн), -/G (980 пн), -/CAA (1027 пн), для которых также не обнаружено взаимосвязи с окраской волокна (Приложение 5/ Supplement 5). Во втором интроне гена *GhTT2-D2* у образцов к-7522 с темно-бурой окраской волокна, к-8020 с белой и двух со светло-бурой (к-3488 и к-4305) в положениях 434, 450 и 453 пн выявлены замены А→G, А→С и Т→С соответственно, а также делеция ТС в положении 436 пн от старт-кодона ATG (Приложение 6/ Supplement 6). Для остальных изучаемых образцов отличий от референсной последовательности не выявлено. Последовательности *GhTT2-D3* и *GhMYB10-D* у всех рассматриваемых образцов соответствовали референсу (Приложения 7, 9/ Supplements 7, 9).

У образцов со светло-бурой окраской волокна (к-4305, к-3488, к-8129, к-7314) обнаружена вставка длиной 46 пн в промоторной области гена *GhMYB10-A*, а также две несинонимичные замены, приводящие к миссенс-мутациям Лиз26Тре и Тре37Арг в последовательности консервативного функционального R2-мотива MYB-домена (Приложение 8/ Supplement 8). Замена высоко консервативного остатка триптофана в положении 37 дестабилизирует структуру “спираль-петля-спираль”, что, вероятно, снижает ДНК-связывающую активность этого ТФ у образцов со светло-бурой окраской волокна (Kanei-Ishii et al., 1990; Saikumar et al., 1990; Mikhailova et al., 2024). Эти данные позволяют рассматривать *GhMYB10-A* в качестве наиболее перспективного гена-кандидата, ассоциированного с вариабельностью окраски волокна в изучаемой выборке.

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 промоторном, так и в экзон-интронных регионах) по сравнению с референсом, чем гомеологи субгенома Dt. Асимметричную эволюцию генов семейства R2R3-MYB у хлопчатника, при которой субгеном At эволюционирует быстрее и подвергается менее строгому очищающему отбору по сравнению с субгеномом Dt, отмечали и в более ранних исследованиях (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2019). Аналогичное влияние направленного отбора на скорость накопления замен в последовательностях регуляторных генов семейства R2R3-MYB наблюдали ранее у малины черной *Rubus occidentalis* L., которая подобно хлопчатнику была подвергнута недавнему направленному отбору (Liu et al., 2019).

Данная закономерность, вероятно, отражает разное давление отбора на субгеномы в процессе направленной селекции по определенным хозяйственно

ценным признакам. Поскольку субгеном At, 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: устойчивостью к засухе, вредителям и другим абиотическим стрессовым факторам и в меньшей степени был подвергнут отбору по признакам волокна, сохранив консервативный характер изменений с меньшим количеством фиксированных эволюционных замен (Shim et al., 2018).

На текущий момент большинство идентифицированных регуляторных генов-кандидатов, ассоциированных с вариабельностью по признаку окраски волокна, локализованы в субгеноме At *G. hirsutum*. Так, локусы *Lc1* (выделен ген *GhTT2-A1*, R2R3-MYB) и *qBF-A07-2* (*Gh_A07G0100*, WD40) картированы в хромосоме A07, *Lc2* – в A06 (Wang et al., 2014; Hinchliffe et al., 2016; Wen et al., 2018).

Кроме того, у хлопчатника асимметрия между субгеномами выражается в разном тканеспецифичном и органоспецифичном характере экспрессии гомеологов. Согласно исследованию L. Flagel с соавторами, около 24% гомеологичных генов аллополиплоидных видов хлопчатника приобрели асимметричный характер экспрессии непосредственно в момент гибридизации предковых видов (Flagel et al., 2008). Так, среди четырех гомеологов структурного гена *GhDFR* у *G. hirsutum* в хромосомах A05/D05 и A06/D06, ген *GhDFR1* (A05) экспрессируется преимущественно в волокне, тогда как *GhDFR3* (A06) – в лепестках (Zheng et al., 2023). Это указывает на то, что дублированные копии даже в рамках одного субгенома могут приобретать субфункционализацию, проявляя транскрипционную активность в разных типах тканей.

Органоспецифичный характер смещения относительного уровня экспрессии гомеологов отмечен для некоторых генов хлопчатника. Например, ген *adhA* (alcohol dehydrogenase, ADH), локализованный 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 (Adams et al., 2003). Содержание мРНК гена *adhD* превышало 80% в листьях, корнях, стебле, лепестках и плодолистьях, тогда как в тычинках преобладали транскрипты субгенома At. Данный характер экспрессии является классическим примером реципрокного органоспецифичного сайленсинга, подавления экспрессии, лежащего в основе субфункционализации гомеологичных генов после гибридизации диплоидных предков.

Реципрокный сайленсинг *adhA* зафиксирован и у синтетического аллополиплоида *Arabidopsis suecica* (Fr.)

Norrl., полученного в результате гибридизации *A. thaliana* (2n=10) и *Arabidopsis arenosa* L. (2n=32) (Comai et al., 2000). Так, подавлению экспрессии подверглись гены *K7* (характеризуется высокой копийностью у *A. arenosa* и низкой у *A. thaliana*), и *L6* (метилирован у *A. arenosa* и гипометилирован у *A. thaliana*), происходящие из субгенома *A. arenosa*. Одновременно подавлена экспрессия гена *K9*, иначе *RAP2.1*, относящегося к семейству *APETALA2*, унаследованного от *A. thaliana*, в регуляторной области которого выявлен повторяющийся элемент. 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, вновь образовавшиеся организмы с высоким эволюционным и адаптивным потенциалом (Wendel, 2000; Liu, Wendel, 2002).

bHLH-MYC. Дублированные копии генов семейства bHLH-MYC в субгеномах At и Dt содержат восемь экзонов и составляют в длину: 4251 пн (*GhTT8-A1*), 6816 пн (*GhTT8-A2*), 5139 пн (*GhTT8-D1*) и 6850 пн (*GhTT8-D2*). У образцов хлопчатника с темно-бурой окраской волокна (к-8147, к-7544 и к-8129) последовательности гомеологичных и гомологичных копий генов *GhTT8-A1/A2/D1/D2*, а также *GhTT8-A1* соответствовали референсу (Приложения 10-13/ Supplements 10-13). В промоторной последовательности генов *GhTT8-D1* и *GhTT8-D2* найдены отличия только для образцов к-4305, к-3488 со светло-бурным волокном и к-8020 с белым соответственно (Mikhailova et al., 2024).

Анализ секвенированных последовательностей гомеологичных копий генов из семейств R2R3-MYB и bHLH-MYC показал, что промоторные области данных генов со времени дивергенции донорных видов субгеномов At и Dt от общего диплоидного предка рода *Gossypium* около 10 млн лет назад также сильно дивергировали (Wendel, 1989; Mikhailova et al., 2024). Как правило, наибольший вклад в процесс образования видов с новыми фенотипическими характеристиками вносят изменения в последовательности *цис*-регуляторных элементов, нежели мутации в кодирующих последовательностях генов (Wilson et al., 1974; Doebley, Lukens, 1998). Более того, однонуклеотидные замены в промоторных последовательностях могут влиять на способность связывания транскрипционных факторов с целевыми сайтами, приводя либо к увеличению сродства, либо к потере взаимодействий (Ponomarenko, 2001). Соответственно, выявленный нами полиморфизм промоторных последовательностей генов соответствует общепринятой гипотезе о большей вариабельности регуляторных областей, содержащих сайты связывания с транскрипционными факторами (Doebley, Lukens, 1998; Mitsis et al., 2020; Wheeler et al., 2022).

Заключение

В результате секвенирования аллелей идентифицированных ранее регуляторных генов из семейств R2R3-MYB и bHLH-MYC у хлопчатника не выявлено функционально значимых аллельных отличий, за исключением аллельного варианта гена *GhMYB10-A* только у образцов со светло-бурой окраской волокна. При этом дивергенции в большей степени подверглись последовательности регуляторных генов субгенома At из семейства R2R3-MYB, нежели гомеологи в субгеноме Dt. Это может отражать как исторически более высокую пластичность регуляторных регионов генов в субгеноме At, так и асимметричное давление отбора 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. Понимание особенностей организации генома хлопчатника важно для реализации подходов к генетическому анализу в области частной генетики этой культуры, в том числе при изучении системы генов биосинтеза пигментов флавоноидной природы.

References/Литература

- Adams K.L., Cronn R., Percifield R., Wendel J.F. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(8):4649-4654. DOI: 10.1073/pnas.0630618100
- Baudry A., Caboche M., Lepiniec L. 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*. *The Plant Journal*. 2006;46(5):768-779. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02733.x
- Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weissshaar B., Lepiniec L. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 2004;39(3):366-380. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x
- Comai L., Tyagi A.P., Winter K., Holmes-Davis R., Reynolds S.H., Stevens Y., Byers B. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *The Plant Cell*. 2000;12(9):1551-1567. DOI: 10.1105/tpc.12.9.1551
- Doebley J., Lukens L. Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *The Plant Cell*. 1998;10(7):1075-1082. DOI: 10.1105/tpc.10.7.1075
- Flagel L., Udall J., Nettleton D., Wendel J. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology*. 2008;6:16. DOI: 10.1186/1741-7007-6-16
- Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y.L., Postlethwait J. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*. 1999;151(4):1531-1545. DOI: 10.1093/genetics/151.4.1531
- Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Lloyd A.M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/MYB transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*. 2008;53(5):814-827. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03373.x
- Gould K., Lister C. Flavonoid functions in plants. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press; 2005. p.397-441. DOI: 10.1201/9781420039443.ch8
- Hinchliffe D.J., Condon B.D., Thyssen G., Naoumkina M., Madison C.A., Reynolds M., Delhom C.D., Fang D.D., Li P., McCarty J. The *GhTT2_A07* gene is linked to the brown colour and natural flame retardancy phenotypes of *Lcl* cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibres. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(18):5461-5471. DOI: 10.1093/jxb/erw312
- Humphries J.A., Walker A.R., Timmis J.N., Orford S.J. Two WD-repeat genes from cotton are functional homologues of the *Arabidopsis thaliana* *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*) gene. *Plant Molecular Biology*. 2005;57(1):67-81. DOI: 10.1007/s11103-004-6768-1
- Kanei-Ishii C., Sarai A., Sawazaki T., Nakagoshi H., He D.N., Ogata K., Nishimura Y., Ishii S. The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the MYB protooncogene product. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(32):19990-19995. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)45472-X
- Katihar A., Smita S., Lenka S., Rajwanshi R., Chinnusamy V., Bansal K. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics*. 2012;13(1):544. DOI: 10.1186/1471-2164-13-544
- Koes R., Verweij W., Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science*. 2005;10(5):236-242. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.03.002
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35(6):1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Leitch A.R., Leitch I.J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*. 2008;320(5875):481-483. DOI: 10.1126/science.1153585
- Léon-Kloosterziel K.M., van de Bunt G.A., Zeevaart J.A., Koornneef M. *Arabidopsis* mutants with a reduced seed dormancy. *Plant Physiology*. 1996;110(1):233-240. DOI: 10.1104/pp.110.1.233
- Liu B., Wendel J.F. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. *Current Genomics*. 2002;3:489-505. DOI: 10.2174/1389202023350255
- Liu H., Xiong J.-S., Jiang Y.-T., Wang L., Cheng Z.-M. Evolution of the R2R3-MYB gene family in six *Rosaceae* species and expression in woodland strawberry. *Journal of Integrative Agriculture*. 2019;18(12):2753-2770. DOI: 10.1016/S2095-3119(19)62818-2
- Lu Q., Shi Y., Xiao X., Li P., Gong J., Gong W., Liu A., Shang H., Li J., Ge Q., Song W., Li S., Zhang Z., Rashid M.H.O., Peng R., Yuan Y., Huang J. Transcriptome analysis suggests that chromosome introgression fragments from sea island cotton (*Gossypium barbadense*) increase fiber strength in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2017;7(10):3469-3479. DOI: 10.1534/g3.117.300108
- Lynch M., Conery J.S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*. 2000;290(5494):1151-1155. DOI: 10.1126/science.290.5494.1151
- Magadam S., Banerjee U., Murugan P., Gangapur D., Ravikesavan R. Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of Genetics*. 2013;92(1):155-161. DOI: 10.1007/s12041-013-0212-8
- Mikhailova A., Strygina K., Khlestkina E. *In silico* analysis of the regulatory gene families for proanthocyanidin biosynthesis in the genus *Gossypium* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2022;46(5):11. DOI: 10.55730/1300-011X.3039
- Mikhailova A.S., Shvachko N.A., Podolnaya L.P., Brutch N.B., Khlestkina E.K. Candidate Genes for Brown Fiber in Cotton Revealed Among the *R2R3-Myb* and *bHLH-Myc* Gene Families. *Journal of Natural Fibers*. 2024;21(1):2399930. DOI: 10.1080/15440478.2024.2399930
- Mikhailova A.S., Podolnaya L.P., Khlestkina E.K. Expression of phenylpropanoid and flavonoid pathway genes in naturally colored cotton during late fiber development. *Plant Research*. 2026;1:100005. DOI: 10.1016/j.plares.2026.100005
- Mitsis T., Efthimiadou A., Bacopoulou F., Vlachakis D., Chrousos G., Eliopoulos E. Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). *World Academy of Sciences Journal*. 2020;2(1):3-8. DOI: 10.3892/wasj.2020.32
- Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M., Lepiniec L. The *TT8* gene encodes a basic Helix-Loop-Helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *The Plant Cell*. 2000;12(10):1863-1878. DOI: 10.1105/tpc.12.10.1863

- Otto S.P., Whitton J. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*. 2000;34(1):401-437. DOI: 10.1146/annurev.genet.34.1.401
- Peng Q.-Z., Zhu Y., Liu Z., Du C., Li K.G., Xie D.Y. An integrated approach to demonstrating the ANR pathway of proanthocyanidin biosynthesis in plants. *Planta*. 2012;236(3):901-918. DOI: 10.1007/s00425-012-1670-6
- Ponomarenko J.V. ACTIVITY: a database on DNA/RNA sites activity adapted to apply sequence-activity relationships from one system to another. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(1):284-287. DOI: 10.1093/nar/29.1.284
- Rausher M.D., Miller R.E., Tiffin P. Patterns of evolutionary rate variation among genes of the anthocyanin biosynthetic pathway. *Molecular Biology and Evolution*. 1999;16(2):266-274. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026108
- Renny-Byfield S., Wendel J.F. Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. *American Journal of Botany*. 2014;101(10):1711-1725. DOI: 10.3732/ajb.1400119
- Rutland C.A., Hall N.D., McElroy J.S. The impact of polyploidization on the evolution of weed species: historical understanding and current limitations. *Frontiers in Agronomy*. 2021;3:1-12. DOI: 10.3389/fagro.2021.626454
- Saikumar P., Murali R., Reddy E.P. Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in MYB-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(21):8452-8456. DOI: 10.1073/pnas.87.21.8452
- Saito K., Yonekura-Sakakibara K., Nakabayashi R., Higashi Y., Yamazaki M., Tohge T., Fernie A.R. The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013;72:21-34. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.02.001
- Shim J., Mangat P.K., Angeles-Shim R.B. Natural variation in wild *Gossypium* species as a tool to broaden the genetic base of cultivated cotton. *Journal of Plant Sciences and Current Research*. 2018;2:005. DOI: 10.24966/PSCR-3743/100005
- Shoeva O.Y., Glagoleva A.Y., Khlestkina E.K. The factors affecting the evolution of the anthocyanin biosynthesis pathway genes in monocot and dicot plant species. *BMC Plant Biology*. 2017;17(Suppl 2):256. DOI: 10.1186/s12870-017-1190-4
- Stephens S.G. Seed fibre colour in *Gossypium* and its possible significance in the evolution of domesticated cottons. *Journal of Genetics*. 1977;63:63-78. DOI: 10.1007/BF02984277
- Tuz R.K., Asfandiyarova M.S., Podolnaya L.P. 'Braun': the first Russian cotton cultivar with naturally colored fiber. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(1):154-162. [in Russian] (Туз К.З., Асфандиярова М.Ш., Подольная Л.П. 'Браун' – первый российский сорт хлопчатника с природно-окрашенным волокном. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(1):154-162). DOI: 10.30901/2227-8834-2023-1-154-162
- Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C., James C.M., Srinivasan N., Blundell T.L., Esch J.J., Marks M.D., Gray J.C. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 Locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*. 1999;11(7):1337. DOI: 10.2307/3870753
- Wang L., Liu H., Li X., Xiao X., Ai X., Luo C., Zhu L., Li X. Genetic mapping of fiber color genes on two brown cotton cultivars in Xinjiang. *Springer Plus*. 2014;3(1):480. DOI: 10.1186/2193-1801-3-480
- Wang N., Ma Q., Ma J., Pei W., Liu G., Cui Y., Wu M., Zang X., Zhang J., Yu S., Ma L., Yu J. 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. *Frontiers in Genetics*. 2019;10:741. DOI: 10.3389/fgene.2019.00741
- Wen T., Wu M., Shen C., Gao B., Zhu D., Zhang X., You C., Lin Z. Linkage and association mapping reveals the genetic basis of brown fibre (*Gossypium hirsutum*). *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(9):1654-1666. DOI: 10.1111/pbi.12902
- Wendel J.F. New world tetraploid cottons contain old-world cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(11):4132-4136. DOI: 10.1073/pnas.86.11.4132
- Wendel J.F. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*. 2000;42(1):225-249. DOI: 10.1023/A:1006392424384
- Wheeler L.C., Walker J.F., Ng J., Deanna R., Dunbar-Wallis A., Backes A., Pezzi P.H., Palchetti M.V., Robertson H.M., Monaghan A., de Freitas L.B., Barboza G.E., Moyroud E., Smith S.D. Transcription factors evolve faster than their structural gene targets in the flavonoid pigment pathway. *Molecular Biology and Evolution*. 2022;39(3):1-33. DOI: 10.1093/molbev/msac044
- Wilson A.C., Maxson L.R., Sarich V.M. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(7):2843-2847. DOI: 10.1073/pnas.71.7.2843
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. 2001;126(2):485-493. DOI: 10.1104/pp.126.2.485
- Yan Q., Wang Y., Li Q., Zhang Z., Ding H., Zhang Y., Liu H., Luo M., Liu D., Song W., Liu H., Yao D., Ouyang X., Li Y., Li X., Pei Y., Xiao Y. Up-regulation of *GhTT2-3A* in cotton fibres during secondary wall thickening results in brown fibres with improved quality. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(10):1735-1747. DOI: 10.1111/pbi.12910
- Zhang T., Hu Y., Jiang W., Fang L., Guan X., Chen J., Zhang J., Saski C.A., Scheffler B.E., Stelly D.M., Hulse-Kemp A.M., Wan Q., Liu B., Liu C., Wang S., Pan M., Wang Y., Wang D., Ye W., Chang L., Zhang W., Song Q., Kirkbride R.C., Chen X., Dennis E., Llewellyn D.J., Peterson D.G., Thaxton P., Jones D.C., Wang Q., Xu X., Zhang H., Wu H., Zhou L., Mei G., Chen S., Tian Y., Xiang D., Li X., Ding J., Zuo Q., Tao L., Liu Y., Li J., Lin Y., Hui Y., Cao Z., Cai C., Zhu X., Jiang Z., Zhou B., Guo W., Li R., Chen Z.J. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. *Nature Biotechnology*. 2015;33(5):531-537. DOI: 10.1038/nbt.3207
- Zheng H., Jiao J., Niu Q., Zhu N., Huang Y., Ke L., Tang S., Liu H., Sun Y. Cloning and functional analysis of *GhGHDFR1*, a key gene of flavonoid synthesis pathway in naturally colored cotton. *Molecular Biology Reports*. 2023;50(6):4865-4873. DOI: 10.1007/s11033-023-08420-6

Информация об авторах

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

Елена Константиновна Хлесткина, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Information about the authors

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

Elena K. Khlestkina, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

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

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

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила в редакцию 09.06.2026; одобрена после рецензирования 22.06.2026; принята к публикации 12.07.2026.

The article was submitted on 09.06.2026; approved after reviewing on 22.06.2026; accepted for publication on 12.07.2026.