


Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения

А.В. Щенникова , А.М. Камионская, А.В. Нежданова, К.С. Гаврилова, М.А. Филюшин, Е.З. Кочиева, К.Г. Скрыбин

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биоинженерии, Москва, Россия

 e-mail: shchennikova@yandex.ru

Считается, что полный микогетеротроф, подъяльник *Monotropa hypopitys*, адаптивно эволюционировал из фотосинтезирующего микорризного предшественника, потеряв при этом аппарат фотосинтеза и вегетативные органы (стебель и листья). Надземная часть растения представляет собой цветонос со стерильными прицветниками и соцветием с каноническим для высших растений типом цветка. У растений происхождения плоского листа и других листовидных латеральных органов связывают с эволюцией генов *YABBY*, которые, в зависимости от профиля экспрессии, разделяются на «вегетативные» и эволюционно более поздние «репродуктивные» гены. Изучение «вегетативных» генов *YABBY* подъяльника позволит выяснить, сохранились ли их функции (определение идентичности клеток абаксиальной поверхности латеральных органов) у растения без листьев. В настоящем исследовании проведен структурно-филогенетический анализ генов подъяльника *MhyFIL1* и *MhyFIL3*, охарактеризованы основные консервативные домены и мотивы кодируемых ими белков и подтверждена принадлежность генов к «вегетативной» кладе *YABBY3/FIL*. Проведена оценка влияния гетерологичной эктопической экспрессии генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3* на фенотип трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum*. Показано, что оба типа растений, *35S::MhyFIL1* и *35S::MhyFIL3*, формируют листья более узкие, чем в норме, и скрученные за счет измененной идентичности клеток адаксиальной поверхности. Выявлены также изменения архитектуры надземной части и корневой системы растений, включая aberrантный филлотаксис и подавление развития апикальных меристем побега и корня. Часть растений *35S::MhyFIL1* и *35S::MhyFIL3* погибала еще на стадии формирования первых листьев, часть не цвела, остальные имели сильно увеличенный период вегетации и при цветении формировали меньше цветков, чем в норме. Цветки не имели видимых отличий от контроля, за исключением ломких цветоножек. Таким образом, отсутствие изменений в строении цветка подъяльника в сравнении с автотрофными видами, а также особенности влияния гетерологичной экспрессии генов *MhyFIL1/3* на развитие растений табака говорят о сохранении генами подъяльника *MhyFIL1/3* функции «вегетативных» генов *YABBY*. При этом у *M. hypopitys* активность *YABBY*-факторов транскрипции группы *FIL* напрямую не связана с потерей способности формировать листья при эволюционном переходе подъяльника от автотрофного питания к гетеротрофии.


Ключевые слова: *Monotropa hypopitys*; микогетеротроф; гетерологичная экспрессия гена; абаксиально-адаксиальная асимметрия; транскрипционные факторы *YABBY*; «вегетативные» *YABBY*; FILAMENTOUS FLOWER.

Для цитирования: Щенникова А.В., Камионская А.М., Нежданова А.В., Гаврилова К.С., Филюшин М.А., Кочиева Е.З., Скрыбин К.Г. Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):405-411. DOI 10.18699/VJ19.509

Transcription factors MhyFIL1 and MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) determine the asymmetric development of above-ground lateral organs in plants

A.V. Shchennikova , A.M. Kamionskaya, A.V. Nezhdanova, K.S. GavriloVA, M.A. Filyushin, E.Z. Kochieva, K.G. Skryabin

Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Institute of Bioengineering, Moscow, Russia

 e-mail: shchennikova@yandex.ru

It is believed that the complete mycoheterotroph pinesap *Monotropa hypopitys* adaptively evolved from a photosynthetic mycorrhizal ancestor, which had lost its photosynthetic apparatus and vegetative organs (stem and leaves). The aerial part of the plant is a reproductive axis with sterile bracts and inflorescence with a flower type canonical for higher plants. The origin of leaves and leaf-like lateral organs is associated, among other factors, with the evolution of the *YABBY* genes, which are divided into "vegetative" and evolutionarily recent "reproductive" genes, with regard to their expression profiles. The study of the vegetative *YABBY* genes in pinesap will determine whether their functions (identification of cell identity on the abaxial surface of the lateral organs) are preserved in the leafless plant. In this

study, the structural and phylogenetic analysis of the pinesap vegetative genes *MhyFIL1* and *MhyFIL3* is performed, the main conserved domains and motifs of the encoded proteins are characterized, and it is confirmed that the genes belong to the vegetative clade *YABBY3/FIL*. The effect of heterologous ectopic expression of the *MhyFIL1* and *MhyFIL3* genes on the phenotype of transgenic tobacco *Nicotiana tabacum* is evaluated. The leaves formed by both types of plants, *35S::MhyFIL1* and *35S::MhyFIL3*, were narrower than in control plants and were twisted due to the changed identity of adaxial surface cells. Also, changes in the architecture of the aerial part and the root system of transgenic plants, including aberrant phyllotaxis and arrest of the shoot and root apical meristem development, were noted. Some of the *35S::MhyFIL1* and *35S::MhyFIL3* plants died as early as the stage of the formation of the first leaves, others did not bloom, and still others had a greatly prolonged vegetation period and formed fewer flowers than normal ones. The flowers had no visible differences from the control except for fragile pedicels. Thus, the absence of structural changes from the *M. hypopitys* flower in comparison to autotrophic species and the effect of *MhyFIL1/3* heterologous expression on the development of tobacco plants indicate the preservation of the functions of the vegetative *YABBY* genes by the *MhyFIL1/3* genes in pinesap. Moreover, the activity of *YABBY* transcription factors of the *FIL* clade in *M. hypopitys* is not directly related to the loss of the ability of pinesap to form leaves during the evolutionary transition from autotrophic nutrition to heterotrophy.

Key words: *Monotropa hypopitys*; mycoheterotroph; heterologous gene expression; abaxial-adaxial asymmetry; transcription factors; *YABBY*; "vegetative" *YABBYs*; FILAMENTOUS FLOWER.

For citation: Shchennikova A.V., Kamionskaya A.M., Nezhdanova A.V., GavriloVA K.S., Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Skryabin K.G. Transcription factors *MhyFIL1* and *MhyFIL3* (*Monotropa hypopitys*) determine the asymmetric development of above-ground lateral organs in plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):405-411. DOI 10.18699/VJ19.509 (in Russian)

Введение

Самым значимым событием в эволюции растений принято считать возникновение фотосинтеза, благодаря которому большинство современных растений является автотрофами и только около 1 % цветковых растений гетеротрофны. Среди последних особое место занимают полные микогетеротрофы, которые в процессе адаптации к неблагоприятным условиям среды обитания обрели способность получать питательные вещества через микоризу (симбиотическую ассоциацию корней с грибами). Спектр последствий подобного приспособления достаточно широк: неспособность к фотосинтезу влечет за собой деградацию и перестройку генома, массивную потерю функциональных генов и др. (Wicke et al., 2016; Graham et al., 2017).

Монотропоидный тип микоризы характерен только для представителей подсемейства *Monotropoideae* семейства *Ericaceae* (Leake, 1994), в том числе для подбельника *Monotropa hypopitys* (синоним *Hypopitys monotropa*). Сравнение геномов бесхлорофилльного *M. hypopitys* и родственного ему фотосинтезирующего вида *Pyrola rotundifolia* выявило существенные структурные перестройки и повышенную скорость накопления нуклеотидных замен в генах подбельника, значительные сокращения его пластома, а также потерю им генетического аппарата фотосинтеза как в пластоме, так и в ядерном геноме (Ravin et al., 2016; Graham et al., 2017). Подобные изменения часто приводят к деградации и/или модификации вегетативных структур (Graham et al., 2017). Так, подбельник не только лишен хлорофилла, но и не образует надземных вегетативных органов: из адвентивных почек в его микоризной корневой системе сразу развивается цветонос, несущий стерильные прицветники и соцветие (Wallace, 1975; Merckx et al., 2013).

Развитие фотосинтеза тесно связано с эволюцией листа, который из радиально-симметричного стал асимметричным, увеличив, таким образом, инсоляцию своей поверхности (Stewart, Rothwell, 1993; Cronk, 2001; Bowman et al., 2002; Beerling, Fleming, 2007). Считается, что

одной из причин возникновения асимметричного листа семенных растений стали явления дупликации и диверсификации генов *YABBY* (Eckardt, 2010). Эволюция предшественника *YABBY* привела к появлению семейства генов с разной специализацией, что могло быть связано с дальнейшими преобразованиями листа и возникновением других асимметричных органов, составляющих цветок (Mathews, Kramer, 2012).

Для современных растений характерна абаксиально-адаксиальная асимметрия всех латеральных органов. Одним из основных факторов, определяющих идентичность абаксиальной (нижней) поверхности органов, являются факторы транскрипции семейства *YABBY* (Bowman et al., 2002; Bartholmes et al., 2012). У покрытосеменных растений выделяют пять подсемейств *YABBY*: три «вегетативных» – *YABBY1/YABBY3* (FILAMENTOUS FLOWER (FIL)), *YABBY2/FASCIATED* (FAS) и *YABBY5* и два «репродуктивных» – *CRABS CLAW* (CRC) и *INNER NO OUTER* (INO) (Yamada et al., 2011; Bartholmes et al., 2012; Finet et al., 2016). «Репродуктивные» *YABBY* имеют узкую специализацию, в то время как «вегетативные» *YABBY* участвуют в определении полярного развития вегетативных и репродуктивных органов, а также важны для правильной организации и филлотаксиса апикальной меристемы побега (McConnell, Barton, 1998; Bartholmes et al., 2012). Таким образом, гены «вегетативных» факторов *YABBY* сохранили профиль экспрессии гена-предшественника, хотя и не способны полностью функционально заместить «репродуктивные» *YABBY* (Yamada et al., 2011; Bartholmes et al., 2012).

Изучение генов *YABBY* полного микогетеротрофа *M. hypopitys* могло бы прояснить возможность сохранения «вегетативными» *YABBY* функций гена-предшественника при потере вегетативных органов. Ранее у подбельника идентифицированы «вегетативные» гены подсемейств *YABBY5* (*MhyYAB5*) и *YABBY3/FIL* (*MhyFIL1*, *MhyFIL2* и *MhyFIL3*) с противоположной динамикой экспрессии (Shchennikova et al., 2018). При этом в прицветниках, которые эволюционно ближе к листьям, чем к органам

цветка, наблюдаются лишь следовые количества транскриптов *MhyFIL2*, а экспрессия *MhyFIL1* и *MhyFIL3* в 5–10 раз ниже экспрессии *MhyYAB5* (Shchennikova et al., 2018). При отсутствии нормальных листьев у подбельника пониженная экспрессия генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3* в прицветниках может свидетельствовать о возможной утрате ими части активности «вегетативных» *YABBY*.

В данной работе мы провели функциональный анализ «вегетативных» генов *YABBY*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3*, у лишенного листьев подбельника *M. hypopitys*. Исследование гомологов генов, определяющих асимметрию листа высших растений, у вида, являющегося полным микогетеротрофом, может расширить представления об эволюции семейства факторов транскрипции *YABBY* в процессе драматической адаптивной перестройки растения.

Материалы и методы

В работе были использованы данные анализа транскриптомов корня, стерильного прицветника и цветка (на стадии антезис) *M. hypopitys* (Beletsky et al., 2016). Для амплификации и клонирования кодирующей последовательности генов подбельника семейства *YABBY*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3*, на основании идентифицированных ранее транскриптов генов (Shchennikova et al., 2018) были подобраны праймеры: прямой – 5'-catcatgtctctctcaattctt-3' (для обоих генов) и обратные – 5'-cttcttgattagtagggggagaca-3' (*MhyFIL1*) и 5'-cttcttgattagtagggggagacc-3' (*MhyFIL3*). Из цветка подбельника, где экспрессия генов максимальна, была выделена суммарная РНК (с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, США) и использована для синтеза кДНК (набор the Reverse Transcription System, Promega, США). На кДНК-матрице с помощью ПЦР (условия: денатурация при 95 °С – 5 мин; 30 циклов денатурации (94 °С – 30 с), отжига (55 °С – 30 с) и синтеза (72 °С – 1 мин); достройка фрагментов (72 °С – 7 мин)) была проведена амплификация полноразмерных кДНК *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. ПЦР-фрагменты ожидаемой длины были очищены (набор MinElute Gel Extraction Kit; QIAGEN, США), клонированы в плазмидный вектор pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, США) и секвенированы (ЦКП «Биоинженерия», ФИЦ Биотехнологии РАН). Анализ последовательностей фрагментов показал, что были амплифицированы и клонированы именно кДНК генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. Для структурного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали программы Clone Manager 7.11 (<http://clone-manager-professional.software.informer.com/>), NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и MEME 5.0.1 (Bailey, Elkan, 1994). Выравнивание последовательностей генов и кодируемых ими белков проводили с помощью ClustalX (Larkin et al., 2007) и MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Для филогенетического исследования белков использовали NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) с построением дерева методом максимального правдоподобия, основанного на модели JTT (Zuckerandl, Pauling, 1965). Для функционального анализа факторов транскрипции *MhyFIL1* и *MhyFIL3* получали трансгенные модельные растения табака *Nicotiana tabacum* с индивидуальной конститутивной экспрессией каждого из генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. Для этого были

сконструированы два бинарных вектора на основе pBin19, содержащие кассету экспрессии кДНК гена (*MhyFIL1/MhyFIL3*) в смысловой ориентации под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и терминатора гена нопалинсинтазы NOS. Штаммами *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, несущими полученные конструкции, проводили трансформацию листовых эксплантов табака с последующей регенерацией трансгенных побегов на селективной среде, как было описано ранее (Goloveshkina et al., 2012). Регенеранты проверяли на наличие в геноме трансгена с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к последовательностям 3'-конца каждого гена (см. выше) и промотора 35S (5'-caatccactatcctctcgaagaccs-3'). Фенотип растений, давших положительный ПЦР-сигнал, сравнивали с контролем (нетрансгенное растение табака), оценивая следующие параметры: период вегетации (от высадки в теплицу до закладки соцветия), строение надземной вегетативной части растения, а также фенотип корня, листа и цветковых органов.

Результаты

Структурно-филогенетический анализ последовательностей известных белков MhyFIL (Shchennikova et al., 2018) с использованием программ NCBI-BLAST, NCBI-CDD и MEGA 6.0 подтвердил их принадлежность кладе *YABBY3/FIL* (рис. 1). При этом MhyFIL3 располагался ближе к предшественнику, чем два других белка – MhyFIL1 и MhyFIL2. Как и ожидалось, ближайшими родственниками MhyFILs оказались представители клады *YABBY3/FIL* видов порядка *Ericales* базальной группы подкласса *Asterids*, к которому принадлежит и подбельник (см. рис. 1). Члены клады *YABBY3/FIL* других групп *Asterids* формировали сестринский субкластер (см. рис. 1). Внутри клады *YABBY3/FIL* белки подкласса *Rosids* (на примере *Arabidopsis thaliana*) образовали базальный субкластер по отношению к анализируемым белкам *Asterids* (см. рис. 1). Анализ возможных консервативных мотивов (MEME 5.0.1) в составе анализируемых белков выявил присутствие двух последовательностей, характерных для всех *YABBY*-факторов транскрипции и соответствующих доменам цинкового пальца (zinc finger, ZF) и *YABBY* (Bartholmes et al., 2012). При этом белки клады *YABBY3/FIL* отличаются от членов других клад присутствием шести кладоспецифичных (междоменных и С-концевых) мотивов, а белки *Asterids*, включая *Ericales*, имеют N-концевой мотив, которого нет у *YABBY3/FIL*-белков *A. thaliana* (*Rosids*) (см. рис. 1). Согласно полученной схеме консервативных мотивов, все три белка MhyFIL структурно ближе к фактору транскрипции *FIL*, чем к *YABBY3* (*A. thaliana*) (см. рис. 1).

Для функционального анализа факторов транскрипции *MhyFIL1* и *MhyFIL3* были получены трансгенные модельные растения табака *N. tabacum* с индивидуальной конститутивной экспрессией кДНК каждого из генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. Независимые трансгенные регенеранты T₀ 35S::*MhyFIL1* (3 шт.) и 35S::*MhyFIL3* (12 шт.), укоренившиеся и давшие настоящие зеленые листья, были адаптированы к теплице.

В сравнении с контролем (нетрансгенное растение табака) полученные растения, как 35S::*MhyFIL1*, так и

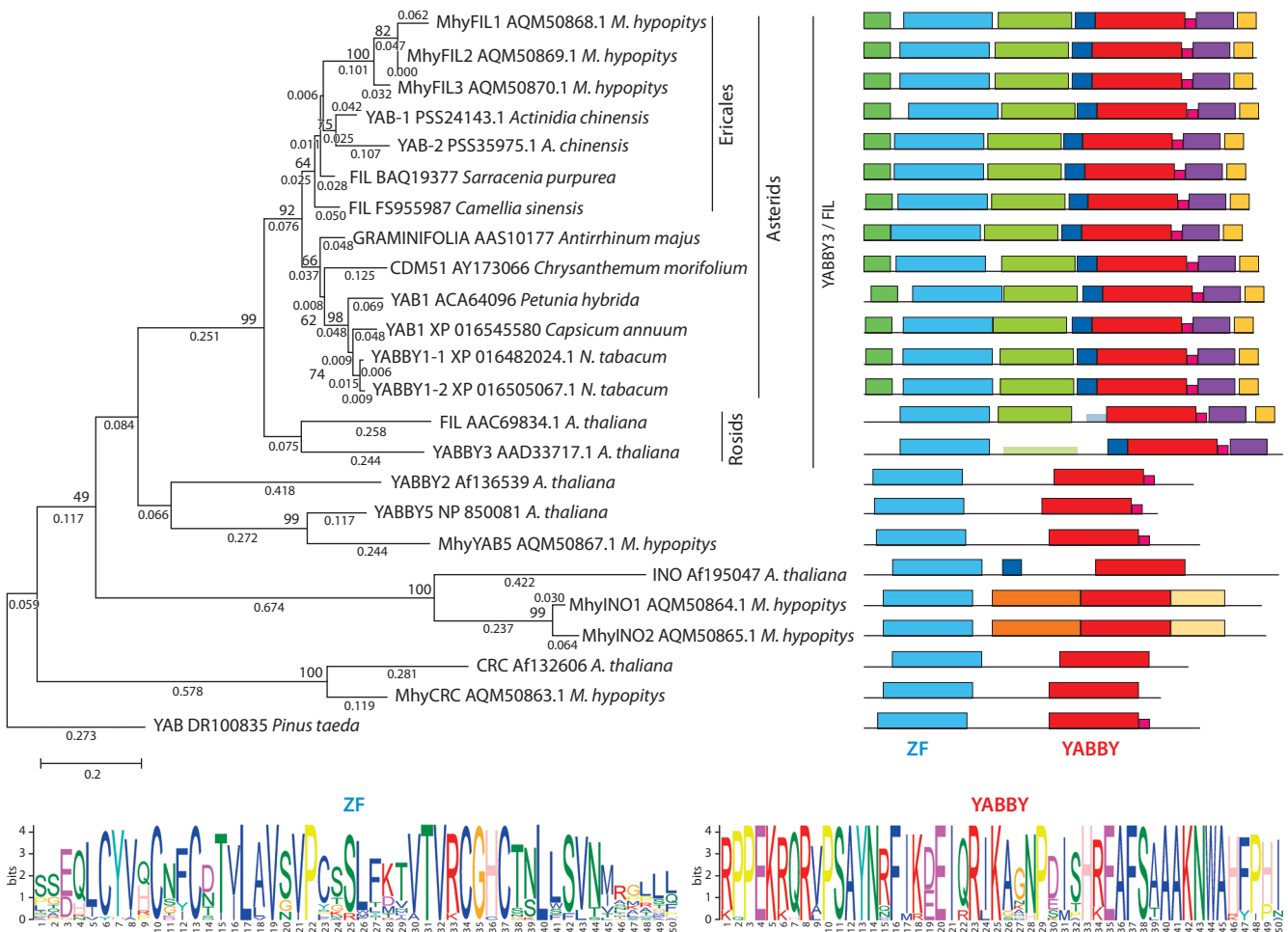


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе выравнивания 24 аминокислотных последовательностей YABBY-факторов транскрипции подъяльника и других видов растений. Анализ проведен в программе MEGA 6.0 методом максимального правдоподобия, основанном на модели JTT (Tamura et al., 2013).

Дерево укоренено с использованием последовательности YAB *Pinus taeda*. Длина ветвей, оцениваемая в генетической дистанции (число замещений на сайт), и существенные значения bootstrap для 1000 выборок показаны в основании ветвей. Против названий белков из базы данных NCBI указан номер доступа. Справа от дендрограммы – схема консервативных мотивов анализируемых белков, полученная в результате анализа их последовательностей в программе MEME 5.0.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>). Внизу приведены последовательности двух мотивов, соответствующих доменам цинкового пальца (ZF) и YABBY.

35S::*MhyFIL3*, кустились (вместо формирования одного стебля), имели значительно увеличенный вегетационный период (в среднем 282 дня против контрольных 48 дней), закрученные в направлении абаксиальной поверхности листья (с измененной идентичностью адаксиальной поверхности) и сильно утолщенный и укороченный корень с аномальными листопадными выростами (вместо разветвленной корневой системы) (рис. 2).

Цветonoсы, образующиеся на одном из побегов «куста» растений 35S::*MhyFIL1* и 35S::*MhyFIL3*, формировали цветки, внешне сходные с цветками дикого типа, но с часто отмирающими/ломкими цветоножками. Семена были получены только от шести растений 35S::*MhyFIL3* и двух растений 35S::*MhyFIL1*. В поколении T₁ изменения морфологии усилились. Лишь одно кустистое растение 35S::*MhyFIL3* сформировало побег дикого типа, который зацвел и дал семена. Полученные семена проросли, однако проростки характеризовались аномальным развитием корня (сильное укорочение и остановка в разви-

тии) и меристемы побега (максимальная высота побега 1.5–3.0 см, кустистость, ранняя остановка в развитии), что приводило к гибели проростков. В связи с этим дальнейший анализ трансгенного фенотипа провести не удалось.

Микроскопический анализ листьев трансгенных растений в сравнении с контролем подтвердил, что идентичность клеток адаксиальной поверхности частично изменилась под влиянием гетерологичной экспрессии каждого из трансгенов (появились структуры, напоминающие устьица, которых в норме не должно быть на верхней поверхности листа), за счет чего, вероятно, и происходило закручивание листьев.

Обсуждение

Принято считать, что микогетеротрофные растения адаптивно эволюционировали из фотосинтезирующих микоризных линий, при этом существование таких растений в условиях слабого освещения привело к инактивации и потере аппарата фотосинтеза (Bidartondo, 2005; Buchanan-

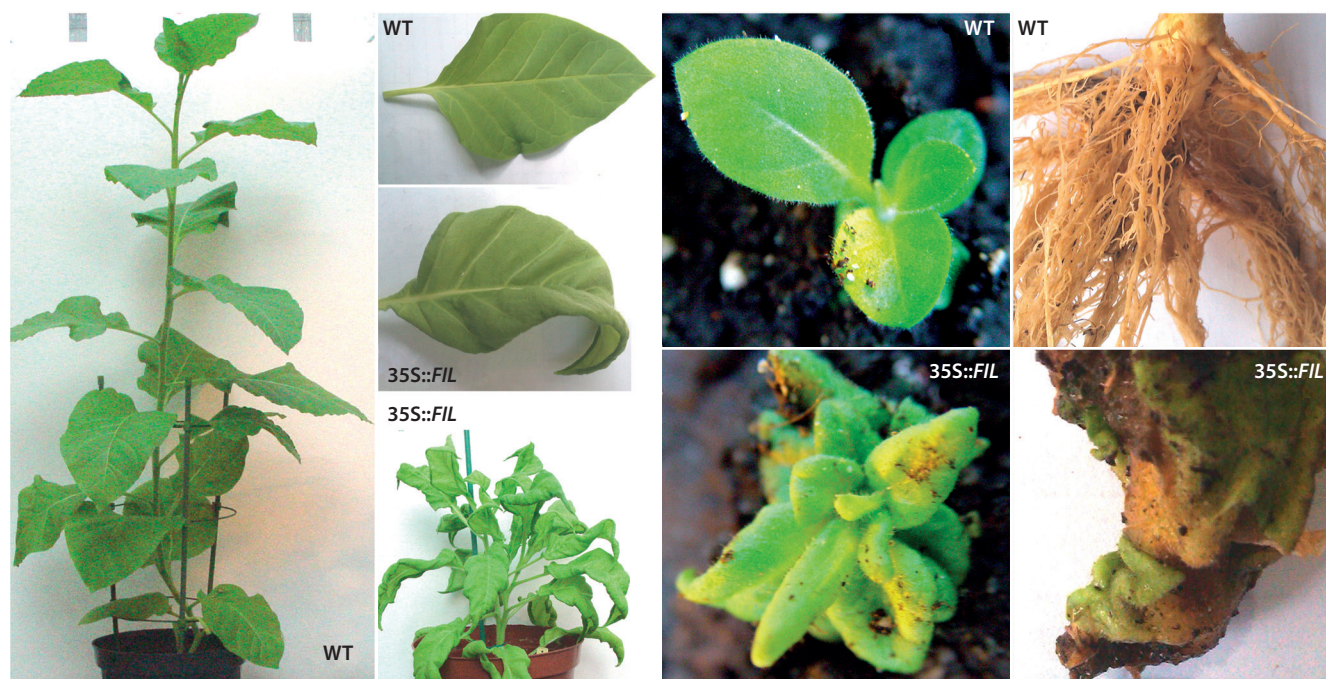


Рис. 2. Трансгенные растения табака 35S::FIL1/3 (35S::FIL) в сравнении с контрольным нетрансгенным растением *N. tabacum* (WT).

Wollaston et al., 2005; Zhang, Zhou, 2013; Ravin et al., 2016). У поддельника *M. hypopitys* это, вероятно, стало причиной последующего исчезновения более не нужных надземных вегетативных структур, включая листья (Wallace, 1975; Merckx et al., 2013). Внешне лишенный хлорофилла цветочнос поддельника часто принимают за стебель с листьями. Однако присутствие в стерильных прицветниках («листьях») транскриптов MADS-box-генов, гомологичных *APETALA3*, *TM6* и *SEPALLATA3*, которые у высших растений в норме экспрессируются исключительно в цветке, явилось одним из подтверждений репродуктивной природы надземной части *M. hypopitys* (Shulga et al., 2018).

Происхождение асимметричных листьев и их дальнейшие преобразования, включая возникновение асимметричных цветковых органов, как уже говорилось выше, связывают с эволюционной дупликацией и диверсификацией специфичных только для растений генов *YABBY* (Eckardt, 2010; Mathews, Kramer, 2012). Структура и функция данных генов детально охарактеризована у фотосинтезирующих модельных и других видов растений (Bowman, 2000; Bowman et al., 2002; Finet et al., 2016; Strable et al., 2017). У полных микогетеротрофов гены *YABBY* также присутствуют и транскрибируются (Shchennikova et al., 2018). Неясно, однако, сохранились ли функции «вегетативных» генов *YABBY* у подобных, не формирующих листьев растений.

В настоящей работе были исследованы возможные функции двух «вегетативных» генов *YABBY* поддельника – *MhyFIL1* и *MhyFIL3* – с помощью получения и характеристики двух видов трансгенных растений табака с сверхэкспрессией каждого из анализируемых генов.

Одновременный нокаут всех «вегетативных» генов *YABBY* у растения *A. thaliana* приводит к формированию

узких скрученных или радиально-симметричных листьев, так как все клетки листа становятся абаксиальными (Stahle et al., 2009). В случае же сверхэкспрессии таких генов теоретически также должно наблюдаться формирование радиально-симметричных листьев, только с абаксиальной идентичностью. Наблюдаемое сужение и закручивание листьев в растениях 35S::MhyFIL1/3 подтверждает это предположение.

Интересно, что вышеописанные эффекты имели место при гетерологичной сверхэкспрессии *FIL*-генов *BraYAB1-702* (*Brassica rapa*) и *TaYAB1* (*Triticum aestivum*) в трансгенных растениях *A. thaliana* (Zhao et al., 2006; Zhang et al., 2013). Оба вида (*B. rapa* и *T. aestivum*) – фотосинтезирующие автотрофы, поэтому сходство проявления конститутивной экспрессии генов *BraYAB1-702* и *TaYAB1* в *A. thaliana* с влиянием экспрессии *MhyFIL1/3* в трансгенных модельных растениях табака говорит о сохранении *FIL*-генами поддельника части функции гена-предшественника, касающейся определения идентичности клеток абаксиальной поверхности листьев.

Правильный морфогенез меристемы зависит от корректной активности *FIL*-генов (Bartholmes et al., 2012). К примеру, для растений *A. thaliana* с двойной мутацией *fil yab3*, помимо других дефектов, характерен aberrантный филлотаксис (Goldshmidt et al., 2008). Показано, что фактор транскрипции *FIL* неавтономно и последовательно влияет на филлотаксис и рост зачатков латеральных органов, координируя экспрессию маркеров (*WUSCHEL*, *CLAVATA3* (*CLV3*)) центральной зоны апикальной меристемы побега (Goldshmidt et al., 2008). А эктопическая экспрессия *SrGRAM* (*FIL*-ген у *Streptocarpus rexii*) полностью подавляет развитие меристемы побега *A. thaliana* (Tononi et al., 2010). Нарушения архитектуры надземной части трансгенных растений 35S::MhyFIL1/3 и, как след-

стве, сильно увеличенное время вегетации могут, таким образом, быть следствием абберрантного филлотаксиса вплоть до остановки развития апикальной меристемы побега, вызванной эктопической сверхэкспрессией генов *MhyFIL1/3*.

Следует особо выделить драматические изменения корневой структуры растений 35S::*MhyFIL1/3*. Мы не нашли в опубликованных ранее статьях сведений о том, что происходит с корнями подобных растений. Возможно, исследователи не концентрировались на этом аспекте, поскольку в норме гены *YABBY* экспрессируются только в листьях и цветке и, следовательно, их функции связаны исключительно с этими органами (Siegfried et al., 1999; Sarojam et al., 2010). Действительно, различные комбинации *yabby*-мутаций у *A. thaliana* не влияют на развитие корня (Boter et al., 2015). Апикальные меристемы корня и побега поддерживаются сходным образом, и маркерами покоящегося центра корневой меристемы являются гены *CLV3* и *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)* (Fiers et al., 2005; Stahl et al., 2009; Chu et al., 2013). Исходя из этого, можно предположить, что фенотип корня 35S::*MhyFIL1/3* – следствие подавления развития апикальной корневой меристемы из-за вмешательства фактора транскрипции MhyFIL1/3 в регуляцию экспрессии генов *N. tabacum*, гомологичных *CLV3* и *WOX5*.

Закключение

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что, несмотря на отсутствие у поддельника надземных вегетативных органов, гены *MhyFIL1/3* сохранили функцию «вегетативных» генов *YABBY*. У *M. hypopitys* факторы транскрипции FIL1 и FIL3 по-прежнему определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения. Это следует из нормального строения органов цветка поддельника и особенностей влияния гетерологичной экспрессии генов *MhyFIL1/3* на развитие растения табака, в частности его листьев. Таким образом, активность генов *MhyFIL1/3* напрямую не связана с потерей поддельником способности формировать листья при эволюционном переходе от аутоτροφного питания к гетеротрофии.

Список литературы / References

Bailey T.L., Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 1994;2:28-36.
Bartholmes C., Hidalgo O., Gleissberg S. Evolution of the *YABBY* gene family with emphasis on the basal eudicot *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). Plant Biol. (Stuttg.). 2012;14(1):11-23. DOI 10.1111/j.1438-8677.2011.00486.x.
Beerling D.J., Fleming A.J. Zimmermann's telome theory of megaphyll leaf evolution: a molecular and cellular critique. Curr. Opin. Plant Biol. 2007;10(1):4-12. DOI 10.1016/j.pbi.2006.11.006.
Beletsky A.V., Filyushin M.A., Gruzdev E.V., Mazur A.M., Prokhor-tchouk E.B., Kochieva E.Z., Mardanov A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G. De novo transcriptome assembly of the mycoheterotrophic plant *Monotropa hypopitys*. Genom Data. 2016;11:60-61. DOI 10.1016/j.gdata.2016.11.020.
Bidartondo M.I. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. New Phytol. 2005;167(2):335-352. DOI 10.1111/j.1469-8137.2005.01429.x.

Boter M., Golz J.F., Giménez-Ibañez S., Fernandez-Barbero G., Franco-Zorrilla J.M., Solano R. FILAMENTOUS FLOWER is a direct target of jaz3 and modulates responses to jasmonate. Plant Cell. 2015;27(11):3160-3174. DOI 10.1105/tpc.15.00220.
Bowman J.L. The *YABBY* gene family and abaxial cell fate. Curr. Opin. Plant Biol. 2000;3(1):17-22. DOI 10.1016/S1369-5266(99)00035-7.
Bowman J.L., Eshed Y., Baum S.F. Establishment of polarity in angiosperm lateral organs. Trends Genet. 2002;18(3):134-141. DOI 10.1016/S0168-9525(01)02601-4.
Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.J. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. Plant J. 2005;42(4):567-585. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02399.x.
Chu H., Liang W., Li J., Hong F., Wu Y., Wang L., Wang J., Wu P., Liu C., Zhang Q., Xu J., Zhang D. A CLE-WOX signalling module regulates root meristem maintenance and vascular tissue development in rice. J. Exp. Bot. 2013;64(17):5359-5369. DOI 10.1093/jxb/ert301.
Cronk Q.C.B. Plant evolution and development in a post-genomic context. Nat. Rev. Genet. 2001;2(8):607-619. DOI 10.1038/35084556.
Eckardt N.A. *YABBY* genes and the development and origin of seed plant leaves. Plant Cell. 2010;22(7):2103. DOI 10.1105/tpc.110.220710.
Fiers M., Golemic E., Xu J., van der Geest L., Heidstra R., Stiekema W., Liu C.M. The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a *CLAVATA2*-dependent pathway. Plant Cell. 2005;17(9):2542-2553. DOI 10.1105/tpc.105.034009.
Finet C., Floyd S.K., Conway S.J., Zhong B., Scutt C.P., Bowman J.L. Evolution of the *YABBY* gene family in seed plants. Evol. Dev. 2016;18(2):116-126. DOI 10.1111/ede.12173.
Goldshmidt A., Alvarez J.P., Bowman J.L., Eshed Y. Signals derived from *YABBY* gene activities in organ primordia regulate growth and partitioning of *Arabidopsis* shoot apical meristems. Plant Cell. 2008;20(5):1217-1230. DOI 10.1105/tpc.107.057877.
Goloveshkina E.N., Shchennikova A.V., Kamionskaya A.M., Skryabin K.G., Shulga O.A. Influence of ectopic expression of Asteraceae MADS box genes on plant ontogeny in tobacco. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2012;109(1):61-71. DOI 10.1007/s11240-011-0074-9.
Graham S.W.G., Lam V.K.Y., Merckx V.S.F.T. Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotrophic plastid genomes. New Phytologist. 2017;214:48-55. DOI 10.1111/nph.14398.
Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23(21):2947-2948. DOI 10.1093/bioinformatics/btm404.
Leake J.R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. New Phytol. 1994;127:171-216. DOI 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04272.x.
Mathews S., Kramer E.M. The evolution of reproductive structures in seed plants: a re-examination based on insights from developmental genetics. New Phytol. 2012;194(4):910-923. DOI 10.1111/j.1469-8137.2012.04091.x.
McConnell J.R., Barton M.K. Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. Development. 1998;125(15):2935-2942.
Merckx V.S.F.T., Freudenstein J.V., Kissling J., Christenhusz M.J.M., Stotler R.E., Crandall-Stotler B., Wickett N., Rudall P.J., Maas-van de Kamer H., Maas P.J.M. Taxonomy and classification. Ed. V.S.F.T. Merckx. Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi. New York: Springer Science+Business Media, 2013; 73-83. DOI 10.1007/978-1-4614-5209-6_1.
Ravin N.V., Gruzdev E.V., Beletsky A.V., Mazur A.M., Prokhor-tchouk E.B., Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Skryabin K.G. The loss of photosynthetic pathways in

- the plastid and nuclear genomes of the non-photosynthetic myco-heterotrophic eudicot *Monotropa hypopitys*. *BMC Plant Biol.* 2016; 16(Suppl. 3):238. DOI 10.1186/s12870-016-0929-7.
- Sarojam R., Sappl P.G., Goldshmidt A., Efroni I., Floyd S.K., Eshed Y., Bowman J.L. Differentiating *Arabidopsis* shoots from leaves by combined *YABBY* activities. *Plant Cell.* 2010;22:2113-2130. DOI 10.1105/tpc.110.075853.
- Shchennikova A.V., Slugina M.A., Beletsky A.V., Filyushin M.A., Mardanov A.A., Shulga O.A., Kochieva E.Z., Ravin N.V., Skryabin K.G. The *YABBY* genes of leaf and leaf-like organ polarity in leafless plant *Monotropa hypopitys*. *Int. J. Genomics.* 2018;2018:7203469. DOI 10.1155/2018/7203469.
- Shulga O.A., Shchennikova A.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Transcriptome-wide characterization of the MADS-box family in Pinesap *Monotropa hypopitys* reveals flowering conservation in non-photosynthetic myco-heterotrophs. *J. Plant Growth Regul.* 2018;37:768-783. DOI 10.1007/s00344-017-9772-9.
- Siegfried K.R., Eshed Y., Baum S.F., Otsuga D., Drews G.N., Bowman J.L. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development.* 1999;126(18):4117-4128.
- Stahl Y., Wink R.H., Ingram G.C., Simon R. A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr. Biol.* 2009;19(11):909-914. DOI 10.1016/j.cub.2009.03.060.
- Stahle M.I., Kuehlich J., Staron L., von Arnim A.G., Goltz J.F. *YABBYs* and the transcriptional corepressors *LEUNIG* and *LEUNIG_HOMOLOG* maintain leaf polarity and meristem activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2009;21(10):3105-3118. DOI 10.1105/tpc.109.070458.
- Stewart W.N., Rothwell G.W. *Paleobotany and the Evolution of Plants.* 2nd ed., Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- Strable J., Wallace J.G., Unger-Wallace E., Briggs S., Bradbury P.J., Buckler E.S., Vollbrecht E. Maize *YABBY* genes *drooping leaf1* and *drooping leaf2* regulate plant architecture. *Plant Cell.* 2017;29(7):1622-1641. DOI 10.1105/tpc.16.00477.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Tononi P., Möller M., Bencivenga S., Spada A. *GRAMINIFOLIA* homolog expression in *Streptocarpus rexii* is associated with the basal meristems in phyllocladophytes, a morphological novelty in *Gesneriaceae*. *Evol. Dev.* 2010;12(1):61-73. DOI 10.1111/j.1525-142X.2009.00391.x.
- Wallace G.D. Studies of the *Monotropoidiae* (Ericaceae): taxonomy and distribution. *Wassman J. Biol.* 1975;33:1-88.
- Wicke S., Muller K.F., dePamphilis C.W., Quandt D., Bellot S., Schneeweiss G.M. Mechanistic model of evolutionary rate variation en route to a nonphotosynthetic lifestyle in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113:9045-9050. DOI 10.1073/pnas.1607576113.
- Yamada T., Yokota S., Hirayama Y., Imaichi R., Kato M., Gasser C.S. Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of *YABBY* genes in angiosperms. *Plant J.* 2011;67(1):26-36. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2011.04570.x.
- Zhang H., Zhou C. Signal transduction in leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 2013;82(6):539-545. DOI 10.1007/s11103-012-9980-4.
- Zhang X.L., Yang Z.P., Zhang J., Zhang L.G. Ectopic expression of *BraYAB1-702*, a member of *YABBY* gene family in Chinese cabbage, causes leaf curling, inhibition of development of shoot apical meristem and flowering stage delaying in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(7):14872-14891. DOI 10.3390/ijms140714872.
- Zhao W., Su H.Y., Song J., Zhao X.Y., Zhang X.S. Ectopic expression of *TaYAB1*, a member of *YABBY* gene family in wheat, causes the partial abaxialization of the adaxial epidermises of leaves and arrests the development of shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* 2006;170(2):364-371. DOI 10.1016/j.plantsci.2005.09.008.
- Zuckerkindl E., Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. Eds. V. Bryson, H.J. Vogel. *Evolving Genes and Proteins.* New York: Acad. Press, 1965;97-166. DOI 10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6.

ORCID ID

A.V. Shchennikova orcid.org/0000-0003-4692-3727
A.M. Kamionskaya orcid.org/0000-0001-9815-9578
A.V. Nezhdanova orcid.org/0000-0003-4175-3175
K.S. Gavrilova orcid.org/0000-0001-8207-3622
M.A. Filyushin orcid.org/0000-0003-3668-7601
E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765
K.G. Skryabin orcid.org/0000-0001-6642-4410

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 14-24-00175 («Геномный анализ как основа изучения механизмов эволюционной адаптации») и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (А.В. Нежданова, К.С. Гаврилова) и с использованием экспериментальной установки искусственного климата (Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.09.2018. После доработки 30.11.2018. Принята к публикации 05.12.2018.