

Идентификация и характеристика мРНК генов рецептор-подобных киназ MhyGSO1 и MhyGSO2 в паразитическом растении *Monotropa hypopitys* на стадии цветения


А.В. Щенникова , Е.З. Кочиева, А.В. Белецкий, М.А. Филюшин, О.А. Шульга, Н.В. Равин, К.Г. Скрябин

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

В процессе формирования органов растения баланс программированного деления и позиционной дифференцировки клеток поддерживается за счет межклеточного обмена сообщениями с помощью сигнальных молекул, избирательно узнаваемых рецепторами. Среди последних паралоги GASSHO1 и GASSHO2 – киназы с лейцин-богатыми повторами, участвующие в регуляции идентичности и функционирования различных клеток корня и эпидермиса. Гены GASSHO охарактеризованы главным образом в *Arabidopsis thaliana*. Их несомненная значимость в сочетании с консервативностью базовых процессов онтогенеза придает изучению киназ GASSHO у других видов растений, отличающихся типом питания и нетрадиционным развитием, особенную актуальность. Целью работы была идентификация генов GASSHO у представителя покрытосеменных, подъяельника *Monotropa hypopitys*, который является бесхлорофильным микогетеротрофом. В результате проведенного поиска среди данных секвенирования транскриптомов различных тканей (корни с адвентивными почками, прицветники и цветки) двух индивидуальных растений, находящихся на стадии позднего цветения, были идентифицированы неполные последовательности мРНК двух паралогичных генов *MhyGASSHO1* (*MhyGSO1*) и *MhyGSO2*. Структурный анализ кодируемых ими неполных аминокислотных последовательностей выявил консервативные домены, характерные для рецепторных киназ с лейцин-богатыми повторами, в последовательности *MhyGSO1* и N-концевой лейцин-богатый домен в последовательности *MhyGSO2*. Филогенетический анализ белков *MhyGSO1* и *MhyGSO2* подтвердил их гомологию с киназами GSO1 и GSO2 у представителей Rosids и Asterids. При этом ближайшими гомологами белков *MhyGSO1* и *MhyGSO2* оказались киназы GSO1 и GSO2 у представителей порядка Solanales (Asterids). Количественный анализ транскриптов *MhyGSO1* и *MhyGSO2* выявил экспрессию обоих генов в цветках и прицветниках, а гена *MhyGSO1* – также в корнях с почками. Характер экспрессии исследуемых генов в совокупности с известными данными о генах GSO1 и GSO2 (*A. thaliana*) предполагает взаимодополняющую деятельность паралогов GASSHO в сигнальных путях развития подъяельника, в частности в ответе на экзогенную сахарозу и в развитии репродуктивных органов и эмбриональных соцветий.

Ключевые слова: *Monotropa hypopitys*; микогетеротроф; транскриптом; рецепторные киназы; GASSHO; межклеточная сигнализация; апикальная меристема; ствольные клетки; эмбриогенез; эпидермис.

Identification and characterization of mRNAs of receptor-like kinases MhyGSO1 and MhyGSO2 in flowering parasitic plant *Monotropa hypopitys*

A.V. Shchennikova , E.Z. Kochieva, A.V. Beletsky, M.A. Filyushin, O.A. Shulga, N.V. Ravin, K.G. Skryabin

Institute of Bioengineering, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow, Russia

Plant organ formation is based on the balance of the programmed cell division and positional differentiation maintained by intercellular communication mediated by signaling molecules and receptors. In *Arabidopsis thaliana*, two paralogous leucine-rich repeat receptor-like kinases, GASSHO1 and GASSHO2, redundantly participate in the regulation of various root cells identity and functioning and the proper epidermis patterning. The GASSHO genes are characterized mainly in *A. thaliana*. Their significance in combination with the conservation of basic developmental processes justifies the study of GASSHO kinases in other plant species with different nutrition and developmental features. The aim of this work was to identify the GASSHO genes in an angiosperm plant, pinesap *Monotropa hypopitys*, which is a non-photosynthetic achlorophyllous mycoheterotroph. In different tissues (roots with buds, bracts, and flowers) of two individual plants at the late flowering stage, the transcriptomic data search identified 3'-partial mRNAs of two paralogous genes, *MhyGASSHO1* (*MhyGSO1*) and *MhyGSO2*. Structural analysis of the encoded amino acid sequences revealed conserved domains, specific for leucine-rich repeat receptor-like kinases, in *MhyGSO1*, and the N-terminal leucine-rich domain in *MhyGSO2*. Phylogenetic analysis of *MhyGASSHOs* confirmed their homology with GSO1 and GSO2 kinases of the Rosids and Asterids representatives. The closest homologues of *MhyGSO1* and *MhyGSO2* were GSO1 and GSO2, respectively, of the Solanales members (Asterids). Quantification of the *MhyGSO1* and *MhyGSO2* transcripts revealed expression of both genes in flowers and bracts, and *MhyGSO1* – also in roots with buds. In combination with known data about GSO1 and GSO2, it allowed us to assume the redundant activity of *MhyGASSHO* paralogues

in signaling pathways, in particular, in response to exogenous sucrose and in development of reproductive organs and embryonic inflorescences.

Key words: *Monotropa hypopitys*; mycoheterotroph; transcriptome; receptor-like kinases; GASSHO; intercellular signaling; apical meristem; stem cells; embryogenesis; epidermis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Белецкий А.В., Филюшин М.А., Шульга О.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Идентификация и характеристика мРНК генов рецептор-подобных киназ MhyGSO1 и MhyGSO2 в паразитическом растении *Monotropa hypopitys* на стадии цветения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):334-340. DOI 10.18699/VJ17.250

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Beletsky A.V., Filyushin M.A., Shulga O.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Identification and characterization of mRNAs of receptor-like kinases MhyGSO1 and MhyGSO2 in flowering parasitic plant *Monotropa hypopitys*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):334-340. DOI 10.18699/VJ17.250

В течение жизни растение постоянно находится в процессе формирования новых органов, балансируя между запрограммированным клеточным делением и позиционной дифференцировкой клеток. Источником строительного материала служат популяции ствольных клеток в апикальных меристемах побега и корня, которые закладываются с первых стадий развития зародыша (Aichinger et al., 2012). Функционирование этих клеток осуществляется за счет обмена сообщениями через клеточные мембраны с помощью сигнальных молекул, избирательно узнаваемых рецепторами (Takayama, Sakagami, 2002). Одними из таких рецепторов являются рецепторные киназы (RLK), составляющие около 60 % семейства киназ в модельном растении *Arabidopsis thaliana*. Большая их часть – это киназы с повторами, богатыми лейцином (LRR-RLK) (Shiu, Bleecker, 2003). Белки LRR-RLK участвуют в регуляции многих аспектов развития растения. В *A. thaliana*, например, ERECTA (ER) оказывает влияние на форму органов и архитектуру соцветия (Torii et al., 1996; Yokoyama et al., 1998), CLAVATA1 (CLV1) – на баланс между самообновлением и дифференцировкой ствольных клеток (Schoof et al., 2000), HAESA – на инициацию созревания цветковых органов (Jinn et al., 2000), RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2) – на развитие пыльника (Mizuno et al., 2007). Кроме того, киназы LRR-RLK играют существенную роль в инициации образования и структуризации эпидермиса, от чего зависят успешное эмбриональное развитие и жизнеспособность проростка (Javelle et al., 2011).

На сегодняшний день известны некоторые регуляторы механизма формирования кутикулы (Abe et al., 2003; Aharoni et al., 2004; Hooker et al., 2007; Moussu et al., 2013; De Giorgi et al., 2015; Fiume et al., 2016). Киназы LRR-RLK, RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1 (RPK1) и TOADSTOOL 2 (TOAD2) поддерживают идентичность центрального домена протодермальных клеток во время эмбриогенеза (Nodine, Tax, 2008). На ранней стадии развития зиготы дифференцировка эпидермальных клеток зависит от активности факторов транскрипции ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM L1 (ATML1) и PROTODERMAL FACTOR 2 (PDF2), выключение которых приводит к потере идентичности эпидермальных клеток и нежизнеспособности эмбриона (Abe et al., 2003). Кроме ATML1 и PDF2, обратная сигнальная петля включает также рецепторную киназу ARABIDOPSIS CRINKLY4

(ACR4), координируя поддержание эпидермальной идентичности во внешнем клеточном слое эмбриона (Moussu et al., 2013). На более поздней, глобулярной стадии развития, когда эндосперм начинает накапливать целлюлозу, активируется второй сигнальный путь, включающий рецепторные киназы GASSHO1 (GSO1) и GASSHO2 (GSO2), а также эндосперм-специфичный субтилизин ABNORMAL LEAFSHAPE1 (ALE1) (Tsuwamoto et al., 2008). Данный путь опосредует усиление развития эмбриональной кутикулы, герметизируя эмбрион и стабилизируя эпидермальную идентичность клеток (Moussu et al., 2013; San-Bento et al., 2014). Одновременное выключение генов *GSO1* и *GSO2* ведет к искривлению зародышей и высокой проницаемости кутикулы, а также к слипанию семядолей и аномальному распространению устьиц на семядолях в зародыше и в проростке (Tsuwamoto et al., 2008).

В апикальной корневой меристеме эпидермис на кончике корня формируется потомством инициалей колумеллы корневого чехлика в проксимальной меристеме (Campilho et al., 2006), над которой находится покоящийся центр (ПЦ, или QC) – группа из нескольких редко делящихся ствольных клеток (Drisch, Stahl, 2015; Додуева и др., 2016). Поддержанию популяции ствольных клеток в ПЦ способствует фактор транскрипции WUS-RELATED HOMEODOMAIN BOX 5 (WOX5) (Drisch, Stahl, 2015; Ощепкова и др., 2016). Идентичность ПЦ и окружающих его инициалей, а также радиальное структурирование корня зависят от транскрипционных факторов SHORTROOT (SHR) и SCARECROW (SCR), взаимодействующих с белками JACKDAW (JKD) и MAGPIE (MGP) (Wildwater et al., 2005; Ogasawara et al., 2011). Спецификация судьбы эпидермальных корневых клеток связана с транскрипционными факторами WEREWOLF (WER), GLABRA2 (GL2), GLABRA3 (GL3), ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) и CAPRICE (CPC) (Song et al., 2011) и межклеточным сообщением, опосредованным двумя рецепторными киназами (ACR4 и CLV1) и сигнальным пептидом CLAVATA3 (CLV3) (Stahl et al., 2013). Рецепторная киназа SCRAMBLED (SCM) обрабатывает позиционные сигналы дифференцировки эпидермальных клеток в корне (Kwak, Schiefelbein, 2007, 2014).

Покоящийся центр является источником сигналов, поддерживающих свойства ствольных клеток у окружающих его инициалей. Паралогичные киназы *GSO1* и *GSO2* совместно участвуют в позитивной регуляции деления

инициалей колумеллы, а также в контроле дифференцировки их дочерних клеток и идентичности ствольных клеток корня (Racolta et al., 2014). Кроме того, GSO1 и GSO2 контролируют рост корня проростка, модулируя опосредованный сахарозой сигнальный путь, а также интегрируют сигналы, поступающие от надземных органов и ниши ствольных клеток, для правильного структурирования корневого эпидермиса и поддержания активности апикальной меристемы (Racolta et al., 2014). Выключение обеих киназ вызывает усиление митотического деления в ПЦ, что, вероятно, представляет собой компенсирующую стратегию обновления инициалей со сбившейся дифференцировкой и нарушенным пространственно-временным паттерном клеточного деления. Двойная мутация также приводит к дефектной дифференцировке дочерних клеток инициалей колумеллы и пониженному накоплению крахмала в клетках колумеллы (Racolta et al., 2014).

Поскольку гены *GASSHO* охарактеризованы главным образом в *A. thaliana*, их несомненная значимость в сочетании с консервативностью базовых процессов развития придает изучению киназ *GASSHO* в других видах растений особенную актуальность. В настоящей работе мы идентифицировали мРНК двух генов, гомологичных генам *GASSHO*, в микогетеротрофном растении *Monotropa hypopitys*. Были охарактеризованы структура, филогения и паттерн экспрессии генов в различных тканях *M. hypopitys* на стадии цветения.

Материалы и методы

В работе использованы данные секвенирования генома (не опубликовано) и транскриптомов корней с адвентивными почками, прицветников и цветков (Ravin et al., 2016) двух индивидуальных растений поддельника *M. hypopitys*. Растения были собраны на стадии цветения (соцветие состоит из полностью сформированных цветков) в августе 2015 г. в хвойном лесу Калужской области, привезены вместе с дерном и содержались в условиях теплицы при регулируемых параметрах освещенности и влажности в течение недели. Библиотеки мРНК получены на основе суммарной РНК, выделенной с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, США), и секвенированы с использованием платформы Illumina HiSeq2500 (Illumina Inc., США). Всего получено 10–15 млн коротких (размером около 100 нуклеотидов) чтений для каждого транскриптома, которые были собраны в транскрипты с использованием программы Trinity v.2.1.1 (Haas et al., 2013). Идентификацию генов рецепторных киназ, гомологов *GASSHO*, проводили посредством сравнения транскриптов с последовательностями из банка данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Генную экспрессию вычисляли как

число транскриптов на миллион транскриптов в транскриптоме с нормализацией между образцами с помощью программного обеспечения RSEM (Li, Dewey, 2011). Данные, полученные для каждой пары транскриптомов одного вида, усредняли и вычисляли стандартное отклонение нормализованного числа транскриптов каждого гена от среднего значения с помощью программы Excel. Для структурного анализа последовательностей использовали программы NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и Clone Manager 7.11 (<http://clone-manager-professional.software.informer.com/>). Сравнительный и филогенетический анализы последовательностей генов и кодируемых ими белков проводили с помощью программ NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA6 (Tamura et al., 2013) с построением древа методом максимального правдоподобия (maximum likelihood), основанного на модели коррекции Пуассона (Poisson correction) (Zuckerkanndl, Pauling, 1965).

Результаты

мРНК двух генов, *MhyGSO1* и *MhyGSO2*, предположительно кодирующих ортологи киназы GSO1 (*A. thaliana*), были идентифицированы в транскриптомах различных тканей (корни с адвентивными репродуктивными почками, прицветники, цветки) поддельника и зарегистрированы в базе NCBI (см. таблицу).

Структурный анализ последовательностей кДНК генов *MhyGASSHO* и кодируемых ими аминокислотных последовательностей показал, что удалось собрать только неполные кДНК (без стоп-кодона). Причиной неполной сборки транскриптов может быть недостаточное качество исходного материала, приготовленных библиотек или секвенирования. Полученные кДНК были транслированы, соответственно, в неполные белковые последовательности *MhyGSO1* (предположительно, отсутствуют 30 С-концевых аминокислот) и *MhyGSO2* (присутствуют первые 250 из возможных 1250 аминокислот). Геномный поиск подтвердил существование идентифицированных транскриптов *MhyGASSHO* и не обнаружил генов, гомологичных *GSO2* (*A. thaliana*). Согласно данным NCBI-CDD, для последовательностей белков *MhyGASSHO* характерны N-терминальный богатый лейцином домен LRRNT и богатые лейцином повторы LRR, а в более полно собранном белке *MhyGSO1* присутствует каталитический домен серин-треониновой киназы (рис. 1). Анализ аминокислотных последовательностей в NCBI-BLAST подтвердил, что гены *MhyGSO1* и *MhyGSO2* кодируют рецепторные киназы LRR-RLK, наиболее идентичные GSO1 из *A. thaliana*. При этом *MhyGSO1* демонстрирует большее сходство с GSO1 и всеми известными его ортоло-

Characteristics of *MhyGASSHO* genes in pinesap

Gene name	Accession number, NCBI	mRNA size, nt	Protein size, aa	<i>A. thaliana</i> homologue	Similarity to the homologue, %
<i>MhyGSO1</i>	KY202763	3669	1223	GSO1	67
<i>MhyGSO2</i>	KY202764	750	250	GSO1	43

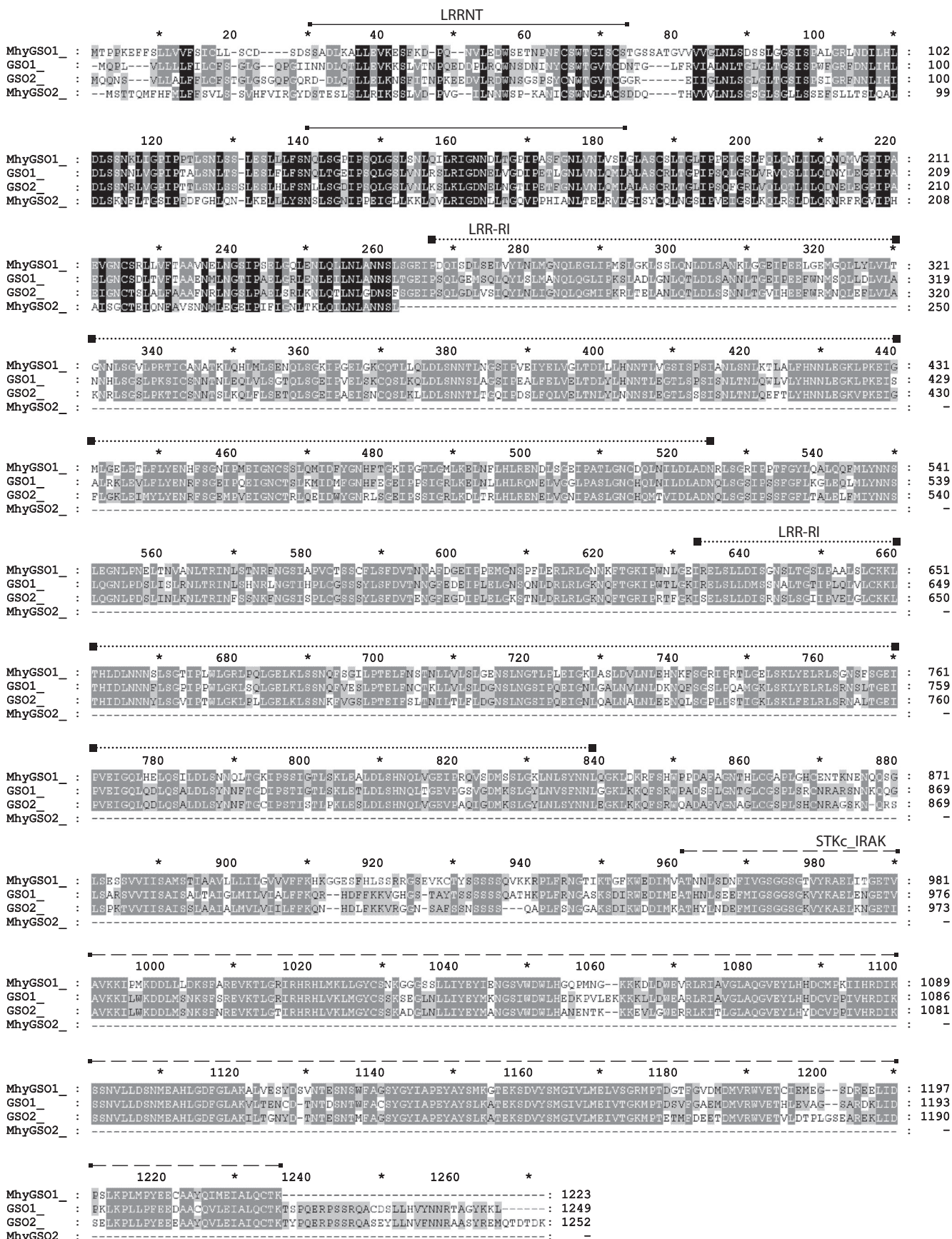


Fig. 1. Comparison of amino acid sequences of MhyGSO1 and MhyGSO2 (pinesap *M. hypopitys*) and known GS01 and GS02 kinases (*A. thaliana*). The solid line indicates the leucine-rich repeat N-terminal domain (LRRNT). The dotted line underlies leucine-rich repeats of the ribonuclease inhibitor-like subfamily (LRR-RI). The dashed line indicates the serine/threonine kinase catalytic domain (STKc) of interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK).

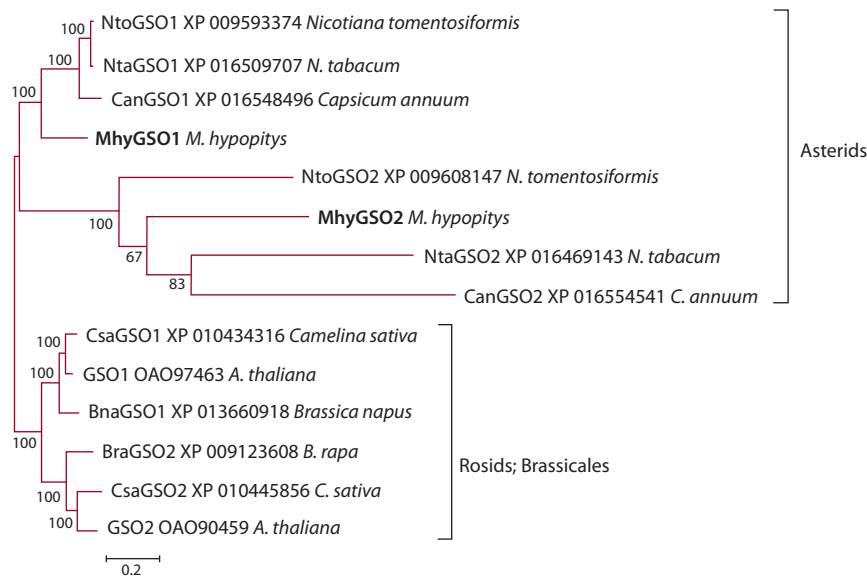


Fig. 2. The unrooted phylogenetic tree constructed on the base of comparative evolutionary analysis of amino acid sequences of MhyGSO1, MhyGSO2, and GASSHO orthologues of Rosids and Asterids species.

The lengths of the branches correspond to the genetic distances (numbers of substitutions per site). Significant bootstrap values (the percentage of trees in which the associated taxa are clustered together) for 1000 replicates are shown at the bases of the branches. The names of proteins available from the NCBI database are followed by GenBank accession numbers.

гами из представителей Rosids и Asterids, в то время как MhyGSO2 наиболее близок белкам-ортологам GSO2 из Asterids.

Структурно-филогенетическое сравнение аминокислотных последовательностей MhyGSO1, MhyGSO2 и ортологов GSO1 и GSO2 у представителей Asterids и Rosids (включая *A. thaliana* и другие Brassicales) показало наиболее тесную кластеризацию белка MhyGSO1 с киназами GSO1 у представителей Asterids и белка MhyGSO2 с киназами GSO2 также у представителей Asterids (рис. 2). Паралоги GSO1 и GSO2 у представителей Brassicales кластеризуются обособленно и вместе составляют сестринскую кладу для группы белков GSO1 и GSO2 у представителей Asterids.

Биоинформатический анализ характера экспрессии выявил наличие мРНК *MhyGSO1* и *MhyGSO2* в цветках и прицветниках. При этом динамика экспрессии этих генов меняется противоположным образом. В корнях с адвентивными почками присутствует только мРНК гена *MhyGSO1* (рис. 3).

Обсуждение

Уникальный представитель цветковых семейства Ericaceae (порядок Ericales в составе базальной группы Asterids), бесхлорофилльный микогетеротроф, подгельник *M. hypopitys* получает питательные вещества от корней автотрофных деревьев через микоризный симбиоз (Leake, 1994). Это растение производит тысячи пылеобразных семян, развитие которых до формирования почек занимает около двух лет (Wallace, 1975; Leake et al., 2004). В течение первого года семена преодолевают морфофизиологическое состояние покоя под влиянием сигналов окружающей среды, а во второй год накапливают с помощью микоризы достаточные для роста нефотосинтезирующего растения углеродные ресурсы (Leake et al., 2004). Таким образом, зародыш находится в спящем состоянии до получения внешних и внутренних индуктивных сигналов. Прорастание семян знаменуется проникновением грибов и формированием микоризной корневой системы. Далее на корнях формируются адвентивные почки, содержащие эмбриональное соцветие, из которых в индуктивных условиях развивается надземная часть растения – цветонос с прицветниками и соцветием на конце (Wallace, 1975; Leake et al., 2004).

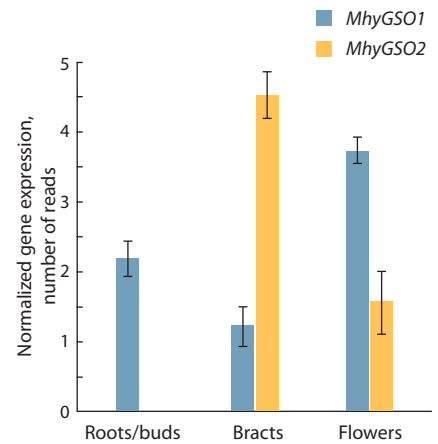


Fig. 3. Tissue-specific expression pattern of *MhyGASSHO* genes in *M. hypopitys* at the late flowering stage.

В норме зародыш семенных растений содержит корешок и почку, из которых развиваются главные корень и побег. Также в зародыше присутствуют гипокотиль и семядоли. Подобно опосредованному микоризой питанию и удалению сигнальных путей фотосинтеза из ядерного и пластидного геномов (Ravin et al., 2016), редуцированная структура зародыша поддельника образовалась, вероятно, как продукт эволюции в процессе приспособления к жизни в практически лишенных света лесных ареалах.

Структурная и генетическая редукция поддельника не коснулась эпидермиса, который является неотъемлемой частью как зародыша, так и растения в целом, благодаря своей защитной функции. Идентификация мРНК генов *MhyGASSHO*, кодирующих рецепторные LRR-RLK киназы MhyGSO1 и MhyGSO2, свидетельствует о наличии консервативного механизма регуляции развития эпидермиса зародыша, корня и, вероятно, надземной части *M. hypopitys*.

Филогенетический анализ генов *MhyGASSHO* предполагает существование общего предшественника генов *GASSHO*, гомологичного *GSO1*, до разделения растений на Rosids и Asterids. В то же время гены, подобные *GSO2*, видимо, появились в результате эволюционных дупликаций, произошедших после разделения Rosids и Asterids. Поэтому с достаточной степенью уверенности можно говорить об ортологии GSO1-киназ у *M. hypopitys* (MhyGSO1) и *A. thaliana*

(GSO1). При этом белок MhyGSO2, паралогичный MhyGSO1 и ортологичный представителям клады GSO2 у Asterids, не является ортологом GSO2 (*A. thaliana*). Таким образом, можно предполагать функциональное сходство между MhyGSO1 и GSO1 (*A. thaliana*). Функции же MhyGSO2, вероятно, произошедшего в процессе дубликации общего предшественника генов GSO1 из Asterids и обновившего свой функциональный статус, должны анализироваться отдельно, так как GSO2 охарактеризован только в *A. thaliana*.

Характер экспрессии генов *MhyGSO1* и *MhyGSO2*, различный по динамике и пересекающийся в прицветниках и цветках подбельника, предполагает взаимодополняющую деятельность в сигнальных путях. В *A. thaliana* экспрессия *GSO1* и *GSO2* обнаружена в стручочках, семенах и цветках, но не в листьях и стебле; в корнях присутствует в малых количествах мРНК *GSO1* (Tsuwamoto et al., 2008). В цветке *GSO1* экспрессируется в тычиночной нити и рыльце пестика, а *GSO2* – в пыльцевых зернах и разделительном слое между бутонем и цветоножкой; в развивающихся зародышах, семядолях и гипокотиле гены активны равномерно (Tsuwamoto et al., 2008). В течение шести дней после прорастания паттерны экспрессии *GSO1* и *GSO2* комплементарны, уровень *GSO1* выше уровня *GSO2*, *GSO1* преимущественно присутствует во внутренних слоях корня, ПЦ и апикальной меристеме побега, а *GSO2* – во внешних слоях и апикальной меристеме корня, включая ПЦ и инициали корневого чехлика (Racolta et al., 2014). Пространственная экспрессия *MhyGSO1* и *MhyGSO2* во взрослом растении, пусть не столь детализированная, однако соответствует характеру экспрессии *GSO1* и *GSO2*. Подобно *GSO1* и *GSO2*, транскрипты *MhyGSO1* присутствуют в корнях, а *MhyGSO2* – отсутствуют. Кроме того, активность *MhyGSO1* может распространяться на корневые адвентивные почки (эмбриональные соцветия), что также соответствует характеру экспрессии *GSO1*. Поскольку MhyGSO2 не является ортологом GSO2, активность *GSO2* на всех стадиях развития зародыша (Tsuwamoto et al., 2008) может не распространяться на *MhyGSO2*. Отсутствие мРНК *GSO1* и *GSO2* в стебле и листьях и наличие мРНК *MhyGSO1* и *MhyGSO2* в предполагаемых прицветниках косвенно подтверждают репродуктивную природу проростка подбельника. Экспрессия *MhyGSO1* и *MhyGSO2* в цветке, возможно, говорит об их активности в репродуктивных органах, подобной активности *GSO1* и *GSO2* (Tsuwamoto et al., 2008).

Интегрируя сигналы эндодермы, сосудистой ткани и эпидермиса, киназы GSO1 и GSO2 участвуют в поддержании правильной схемы клеточного деления и спецификации в нише ствольных клеток и эпидермисе (Racolta et al., 2014). Будучи вовлеченными как в зависимую, так и в независимую от сахарозы сигнализацию, GSO1 и GSO2 стимулируют развитие проростка *A. thaliana* в процессе перехода от зародышевого гетеротрофного питания к фотоавтотрофному росту (Racolta et al., 2014). Гетеротрофное питание, характерное и для зародыша, и для взрослого растения *M. hypopitys*, говорит об участии киназ MhyGSO1 и MhyGSO2 в ответе на экзогенную сахарозу, поступающую через микоризу от корней автотрофных деревьев.

Таким образом, в паразитическом высшем растении *M. hypopitys* идентифицированы два паралогичных гена *MhyGASSHO*. Структурно-филогенетический анализ показал, что кодируемые генами белки принадлежат семейству рецептор-подобных серин-треониновых киназ с богатыми лейцином повторами. При этом MhyGSO1 и MhyGSO2 являются паралогами, и MhyGSO1 – ортологом киназы GSO1 (*A. thaliana*). Характер экспрессии генов в совокупности с данными эволюционного анализа и литературных источников позволил сделать предположение о возможных функциях генов. Полученные результаты свидетельствуют о консервативности механизмов регуляции развития эпидермиса покрытосеменных с участием генов *GASSHO*.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 14-24-00175 “Genome analysis as the base for studying evolutionary adaptation mechanisms”. The authors are grateful to the staff of for granting access to the climatic unit.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abe M., Katsumata H., Komeda Y., Takahashi T. Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development*. 2003;130(4):635-643. DOI 10.1242/dev.00292.
- Aharoni A., Dixit S., Jetter R., Thoenes E., van Arkel G., Pereira A. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2004;16(9):2463-2480. DOI 10.1105/tpc.104.022897.
- Aichinger E., Kornet N., Friedrich T., Laux T. Plant stem cell niches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012;63:615-636. DOI 10.1146/annurev-arplant-042811-105555.
- Campilho A., Garcia B., Toorn H.V., Wijk H.V., Campilho A., Scheres B. Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the *Arabidopsis thaliana* root meristem. *Plant J.* 2006;48(4):619-627. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2006.02892.x.
- De Giorgi J., Piskurewicz U., Loubery S., Utz-Pugin A., Bailly C., Mène-Saffrané L., Lopez-Molina L. An endosperm-associated cuticle is required for *Arabidopsis* seed viability, dormancy and early control of germination. *PLoS Genet.* 2015;11(12):e1005708. DOI 10.1371/journal.pgen.1005708.
- Dodueva I.E., Tvorogova V.E., Azarakhsh M., Lebedeva M.A., Lutova L.A. Plant stem cells: unity and diversity. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):441-458. DOI 10.18699/VJ16.172. (in Russian)
- Drisch R.C., Stahl Y. Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front. Plant Sci.* 2015;6:505. DOI 10.3389/fpls.2015.00505.
- Fiume E., Guyon V., Remoué C., Magnani E., Miquel M., Grain D., Lepiniec L. TWS1, a novel small protein, regulates various aspects of seed and plant development. *Plant Physiol.* 2016;172(3):1732-1745. DOI 10.1104/pp.16.00915.
- Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., Macmanes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., Leduc R.D., Friedman N., Regev A. *De novo* transcript sequence reconstruction

- from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protocols*. 2013;8(8):1494-1512. DOI 10.1038/nprot.2013.084.
- Hooker T.S., Lam P., Zheng H., Kunst L. A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007;19(3):904-913. DOI 10.1105/tpc.106.049304.
- Javelle M., Vernoud V., Rogowsky P.M., Ingram G.C. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol*. 2011;189(1):17-39. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03514.x.
- Jinn T.L., Stone J.M., Walker J.C. *HAESA*, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev*. 2000;14(1):108-117. DOI 10.1101/gad.14.1.108.
- Kwak S.H., Schiefelbein J. The role of the SCRAMBLED receptor-like kinase in patterning the *Arabidopsis* root epidermis. *Dev. Biology*. 2007;302:118-131. DOI 10.1016/j.ydbio.2006.09.009.
- Kwak S.H., Schiefelbein J. TRIPTYCHON, not CAPRICE, participates in feedback regulation of *SCM* expression in the *Arabidopsis* root epidermis. *Plant Signal. Behav.* 2014;9(11):e973815. DOI 10.4161/15592324.2014.973815.
- 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.
- Leake J.R., McKendrick S.L., Bidartondo M., Read D.J. Symbiotic germination and development of the myco-heterotroph *Monotropa hypopitys* in nature and its requirement for locally distributed *Tricholoma* spp. *New Phytol*. 2004;163(2):405-423. DOI 10.1111/j.1469-8137.2004.01115.x.
- Li B., Dewey C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:323. DOI 10.1186/1471-2105-12-323.
- Mizuno S., Osakabe Y., Maruyama K., Ito T., Osakabe K., Sato T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2007;50(5):751-766. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03083.x.
- Moussu S., San-Bento R., Galletti R., Creff A., Farcot E., Ingram G. Embryonic cuticle establishment: the great (apoplastic) divide. *Plant Signal. Behav.* 2013;8(12):e27491. DOI 10.4161/psb.27491.
- Nodine M.D., Tax F.E. Two receptor-like kinases required together for the establishment of *Arabidopsis* cotyledon primordia. *Dev. Biology*. 2008;314(1):161-170. DOI 10.1016/j.ydbio.2007.11.021.
- Ogasawara H., Kaimi R., Colasanti J., Kozaki A. Activity of transcription factor JACKDAW is essential for SHR/SCR-dependent activation of *SCARECROW* and *MAGPIE* and is modulated by reciprocal interactions with *MAGPIE*, *SCARECROW* and *SHORT ROOT*. *Plant Mol. Biol.* 2011;77(4-5):489-499. DOI 10.1007/s11103-011-9826-5.
- Oshchepkova E.A., Omelyanchuk N.A., Savina M.S., Pasternak T., Kolchanov N.A., Zemlyanskaya E.V. Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):459-474. DOI 10.18699/VJ16.173. (in Russian)
- Racolta A., Bryan A.C., Tax F.E. The receptor-like kinases GSO1 and GSO2 together regulate root growth in *Arabidopsis* through control of cell division and cell fate specification. *Dev. Dynamics*. 2014;243(2):257-278. DOI 10.1002/dvdy.24066.
- Ravin N.V., Gruzdev E.V., Beletsky A.V., Mazur A.M., Prokhorchouk 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 mycoheterotrophic eudicot *Monotropa hypopitys*. *BMC Plant Biol*. 2016;16(Suppl. 3):238. DOI 10.1186/s12870-016-0929-7.
- San-Bento R., Farcot E., Galletti R., Creff A., Ingram G. Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2014;77(1):46-58. DOI 10.1111/tpj.12360.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F., Jürgens G., Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*. 2000;100(6):635-644. DOI 10.1016/S0092-8674(00)80700-X.
- Shiu S.H., Bleecker A.B. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2003;132(2):530-543. DOI 10.1104/pp.103.021964.
- Song S.K., Ryu K.H., Kang Y.H., Song J.H., Cho Y.H., Yoo S.D., Schiefelbein J., Lee M.M. Cell fate in the *Arabidopsis* root epidermis is determined by competition between WEREWOLF and CAPRICE. *Plant Physiol*. 2011;157(3):1196-1208. DOI 10.1104/pp.111.185785.
- Stahl Y., Grabowski S., Bleckmann A., Kühnemuth R., Weidtkamp-Peters S., Pinto K.G., Kirschner G.K., Schmid J.B., Wink R.H., Hülsewede A., Felekyan S., Seidel C.A., Simon R. Moderation of *Arabidopsis* root stemness by *CLAVATA1* and *ARABIDOPSIS CRINKLY4* receptor kinase complexes. *Curr. Biol*. 2013;23(5):362-371. DOI 10.1016/j.cub.2013.01.045.
- Takayama S., Sakagami Y. Peptide signalling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2002;5(5):382-387. DOI 10.1016/S1369-5266(02)00284-4.
- 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.
- Torii K.U., Mitsukawa N., Oosumi T., Matsuura Y., Yokoyama R., Whittier R.F., Komeda Y. The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell*. 1996;8(4):735-746. DOI 10.1105/tpc.8.4.735.
- Tsuwamoto R., Fukuoka H., Takahata Y. *GASSHO1* and *GASSHO2* encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos. *Plant J*. 2008;54(1):30-42. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03395.x.
- Wallace G.D. Studies of the Monotropoidae (Ericaceae): taxonomy and distribution. *Wassman J. Biology*. 1975;33:1-88.
- Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J.M., Heidstra R., Blilou I., Korthout H., Chatterjee J., Mariconti L., Gruijsem W., Scheres B. The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell*. 2005;123(7):1337-1349. DOI 10.1016/j.cell.2005.09.042.
- Yokoyama R., Takahashi T., Kato A., Torii K.U., Komeda Y. The *Arabidopsis ERECTA* gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia. *Plant J*. 1998;15(3):301-310. DOI 10.1046/j.1365-313X.1998.00203.x.
- Zuckerkindl E., Pauling L. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins: Symp. held at the Inst. of Microbiology of Rutgers. N. Y.: Acad. Press, 1965:97-166.