

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ “ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК”**

На правах рукописи

**ТУРНАЕВ ИГОРЬ ИВАНОВИЧ
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ БЕЛКОВ ТРИПТОФАН-
ЗАВИСИМОГО ПУТИ БИОСИНТЕЗА АУКСИНА У
РАСТЕНИЙ**

1.5.7. – генетика

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель
д.б.н., доцент Афонников Д.А.**

**Новосибирск
2024**

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ТЕРМИНОВ, ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Биосинтез ауксина, его значение и взаимодействие с другими процессами.....	12
1.2 Синтез ауксина у наземных растений.....	16
1.2.1 Триптофан-независимый путь биосинтеза ауксина	16
1.2.2 Триптофан-зависимый путь биосинтеза ауксина.....	17
1.2.2.1 Ферменты пути биосинтеза триптофана у растений.....	19
1.2.2.2 Структура и функции белков семейства ТАА.....	20
1.2.2.3 Суперсемейство белков флавин-содержащих монооксигеназ и входящее в него семейство YUCCA.....	22
1.2.2.3.1 Суперсемейство флавин-содержащих монооксигеназ.....	22
1.2.2.3.2 Белки FMO II типа.....	24
1.2.2.3.3 Структура и функции белков YUCCA.....	27
1.3 Метаболизм, транспорт ауксина и регуляция его синтеза.....	30
1.3.1 Метаболизм ауксина.....	31
1.3.2 Транспорт ауксина.....	34
1.3.3 Регуляция биосинтеза ауксина.....	36
1.3.3.1 Ауксин в путях передачи сигналов.....	36
1.3.3.2 Регуляция биосинтеза ауксина в ответ на стрессовые факторы...	39
1.4 Эволюция ферментов пути ТАА/YUCCA биосинтеза ауксина.....	43
1.4.1 Происхождение и эволюция ТАА.....	43
1.4.2 Происхождение и эволюция YUCCA.....	45
1.5 Дупликации генов и эволюция сложности живых организмов ...	48
1.6 Заключение по обзору литературы	51

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	55
2.1 Формирование выборок белковых и транслируемых транскриптомных последовательностей.....	55
2.1.1 Выборки последовательностей белков ферментов пути биосинтеза триптофана.....	55
2.1.2 Выборки белковых последовательностей фермента ТАА.....	56
2.1.3 Выборки белковых и транслируемых транскриптомных последовательностей фермента YUCCA.....	57
2.2 Множественное выравнивание последовательностей.....	61
2.3 Филогенетический анализ.....	62
2.4 Реконструкция 3D структуры белков.....	63
2.5 Анализ доменов и консервативных сайтов белковых последовательностей.....	63
2.6 Оценка взаимосвязи количества гомологов ферментов ПБТ и сложности организмов растений.....	64
ГЛАВА 3 ЭВОЛЮЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА ТРИПТОФАНА.....	66
3.1 Результаты и обсуждение.....	66
3.2 Заключение по главе 3.....	83
ГЛАВА 4 ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ ТАА/YUCCA БИОСИНТЕЗА АУКСИНА У НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ.....	84
4.1 Происхождение ферментов суперсемейства ТАА-подобных белков у наземных растений.....	84
4.1.1 Сравнительный анализ последовательностей ТАА-подобных белков из <i>Klebsormidium nitens</i> и <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
4.1.2 Анализ 3D структур и филогении ТАА-подобных белков.....	86
4.2 Анализ эволюции белков семейства YUCCA.....	90

4.2.1	Эволюция белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса.....	90
4.2.1.1	Филогения белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса.....	90
4.2.1.2	Сравнительный анализ функциональных сайтов и доменов белков флавин-содержащих монооксигеназ В класса.....	98
4.2.1.3	Представленность последовательностей, гомологичных FMO типа Pb, в основных таксонах.....	105
4.2.1.4	Анализ выборки суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ класса В, включающей последовательности транскриптомов растений	108
4.2.1.5	Представленность последовательностей, гомологичных FMO типа Pb, в таксонах транскриптомных проектов растений.....	112
4.3	Обсуждение.....	116
4.4	Заключение по главе 4.....	119
ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ЧИСЛА КОПИЙ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА АУКСИНА.....		122
5.1	Количественный анализ числа гомологов генов ферментов ТАА/YUCCA у растений.....	122
5.2	Положительная корреляция между числом гомологов ряда ферментов пути биосинтеза триптофана и сложностью организмов растений.....	135
5.3	Обсуждение.....	138
5.4	Заключение по главе 5.....	140
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ДИССЕРТАЦИИ.....		142
ВЫВОДЫ.....		146
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....		148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		150
ПРИЛОЖЕНИЕ.....		186

СПИСОК ТЕРМИНОВ, ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

БАТ – белки ассоциированные с транскрипцией
 ГП – горизонтальный перенос
 ГПГ – горизонтальный перенос генов
 ИПК – индол пировиноградная кислота (IPA – Indole-3-Pyruvic Acid)
 ИУК – индол-3-уксусная кислота (IAA - Indole-3-acetic acid)
 НАК(НРА) - нафтилфталиминовая кислота
 НПОП – наиболее поздний общий предок
 ОРС – Открытые Рамки Считывания
 ПД – полногеномная дупликация
 ABCB – ATP-BINDING CASSETTE subfamily B
 ARF – AUXIN RESPONSE FACTOR
 ASA – анранилат синтаза α
 ASB – анранилат синтаза β
 Asp – Аспарагин
 Aux/IAA – Auxin/INDOLE ACETIC ACID
 AUX1/LAX – AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1
 DAO – DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION
 GH3 – GRETCHEN HAGEN3
 Gln – Глутамин
 Glu – Глутаминовая кислота
 Gly – Глицин
 IAA-Ala – IAA-Alanine
 IAA-Asp – IAA-Aspartate
 IAA-Trp – IAA-Tryptophan
 IAMT1 – IAA CARBOXYMETHYLTRANSFERASE1
 IAOx – Indole-3-Acetaldoxine
 IGP – Indole-3-Glycerol Phosphate
 IGPS – Индол-3-глицерол фосфат синтаза
 Ие - Изолейцин
 ILR – INDOLE-LEUCINE RESISTANT 1
 LAX – Auxin Transporter-like Protein
 Met – Метионин
 oxIAA – 2-охо-indole-3-acetic acid
 PAA – Phenylacetic acid, Фенилуксусная кислота
 PAI – Фосфорибозил-антранилат-изомераз
 PAT – Фосфорибозил антранилат-трансфераза
 Phe – Фенилаланин
 PILS – PIN-LIKES
 PIN – PIN-FORMED
 SKP2A – S-Phase Kinase-Associated Protein 2a
 TAA1 – TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1
 TIR1/AFB – TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX
 TRP – фосфорибозил антранилат-трансфераза
 Trp – Триптофан
 TSA – Триптофан синтеза α
 TSB – Триптофан синтеза β
 Tyr – Тирозин
 Val – Валин
 YUC – YUCCA, флавин-содержащая монооксигеназа YUCCA

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Ауксин является важнейшим гормоном растений и участвует в регуляции таких разнообразных процессов, как гравитропизм и фототропизм, формирование архитектуры корней и побегов, морфогенез растений, развитие сосудов, деление и удлинение клеток, апикальное доминирование, старение, реакции на биотический и абиотический стрессы (Lau et al., 2009; Zhao, 2010; Finet, Jaillais, 2012; Woodward, Bartel, 2005; Teale et al., 2006; Scarpella et al., 2006; Halliday 2009; Sundberg, Ostergaard, 2009; Peris et al., 2010; Zhao, 2014). В регуляции роста и развития растений ауксин участвует совместно с другими фитогормонами такими как цитокины, этилен, абсцизовая кислота, гиббереллины, но при этом считается, что он является наиболее важным фитогормоном растений (Mukherjee et al., 2022). Ауксин в настоящее время является наиболее изученным фитогормоном (Paque, Weijers, 2016). Знание механизмов биосинтеза, метаболизма и транспорта ауксина у растений крайне необходимо для понимания практически всех морфогенетических процессов, происходящих в онтогенезе растения и позволит значительно увеличить возможности контроля роста и развития растений, что представляет широкое поле деятельности для создания новых продуктивных или быстрорастущих сортов растений (Розов и др., 2013). Таким образом, изучение механизма биосинтеза ауксина является одной из важных задач для понимания его функционирования. Прогресс в исследованиях биосинтеза ауксина закладывает основу для улучшения важных признаков сельскохозяйственных растений, таких как ветвление побегов или развитие цветков, позволяя регулировать уровни ауксина в определенных тканях/клетках. Четкое понимание биосинтеза ауксина в конечном итоге окажет значительное влияние на сельское хозяйство, а также значительно расширит наши знания в области фундаментальной биологии растений (Zhao, 2014). Знание молекулярных механизмов биосинтеза ауксина позволит в перспективе контролировать концентрацию ауксина в клетках

растений, что дает возможность исследовать молекулярные механизмы регулируемых ауксином процессов развития растений (Zhao, 2014).

Основной путь синтеза ауксина (ПБА) у наземных растений включает два этапа:

- 1) синтез триптофана из хоризмата (путь биосинтеза триптофана, ПБТ) и
- 2) непосредственно синтез ауксина из триптофана (путь биосинтеза ауксина, мы будем для краткости называть его ПБА(ТАА/YUCCA)).

Второй этап, ПБА(ТАА/YUCCA), состоит из двух реакций: превращение триптофана в индол-3-пировиноградную кислоту (ИПК, англ. indole-3-pyruvic acid, IPA) катализируемое ферментом ТАА и превращение ИПК в ауксин осуществляемое ферментом YUCCA (Mashiguchi et al., 2011; Won et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Tivendale et al., 2012, Cheng et al., 2006).

ПБА(ТАА/YUCCA) наиболее исследован у *Arabidopsis thaliana* (резуховидки Таля), в геноме которого присутствуют 3 гена *taa* и 11 генов *yucca*. Интересно, что растения резуховидки, по-видимому, используют разные наборы генов-паралогов *yucca* для биосинтеза ауксина в побеге и в корне, а также на эмбриональной или постэмбриональной стадиях развития растения, несмотря на использование одного и того же набора генов *taa* в побеге и в корне, и на эмбриональной или постэмбриональной стадиях развития (Won et al., 2011). Таким образом, активности генов-паралогов *yucca* у растения являются специфичными к органу и стадии развития растения (Stepanova, 2008; Won et al., 2011; Chen, 2014).

Для изучения молекулярных механизмов функционирования системы биосинтеза ауксина у растений активно используются методы молекулярной эволюции (DeSmet et al., 2011; Mano, Nemoto, 2012). Они позволяют исследовать происхождение и эволюцию белков. Однако филогенетический анализ семейств генов *taa* и *yucca*, не позволил получить однозначные результаты о происхождении и дальнейшей эволюции этих белков у растений.

Юэ и др. (Yue et al., 2014) основываясь на анализе реконструкции филогении семейств белков ТАА и YUCCA у бактерий и растений предположили, что ПБА(ТАА/YUCCA) впервые появился в эволюции растений у наиболее позднего общего предка (НПОП) наземных растений в результате горизонтального переноса генов (ГПГ) от бактерий. Таким образом, ПБА(ТАА/YUCCA) может считаться инновацией первых наземных растений (Yue et al., 2014). Однако немного позже Ванг и др. (Wang et al., 2014) обнаружили гомологи *taa* и *yucca* в геноме Харофитовой водоросли *Klebsormidium nitens*. Это позволило сформулировать альтернативную гипотезу о существовании ПБА(ТАА/YUCCA) у Харофитовых водорослей (до выхода растений на сушу). В результате чего вопрос о происхождении ПБА(ТАА/YUCCA) у растений оказался дискуссионным.

Цель работы. Выявление генов пути биосинтеза ауксина у растений и биоинформатический анализ особенностей их молекулярной эволюции.

Задачи, поставленные для достижения указанной цели, включали:

1. Анализ происхождения и эволюции семейств ферментов пути биосинтеза триптофана;
2. Анализ происхождения и эволюции семейства ТАА;
3. Анализ происхождения и эволюции семейства YUCCA;
4. Оценка дупликаций генов ферментов пути биосинтеза ауксина в эволюции растений и функциональной роли этого процесса.

Научная новизна. Впервые показано, что гомолог растительных ферментов ТАА у Харофитовой водоросли *K. nitens*, KnТАА (NCBI: GAQ80308.1) по функциональным и структурным характеристикам более близок к аллииназам, чем к триптофанаминотрансферазам, и не принимает участия в ПБА, что впоследствии было экспериментально подтверждено независимой группой исследователей.

Впервые показано, что гомолог YUCCA у Харофитовой водоросли *K. nitens* KnFMO (NCBI: GAQ82387.1), не принадлежит к семейству растительных белков YUCCA, а относится к отдельному кластеру-семейству

FMO Pb; функции этого белка отличаются от функций белков семейства YUCCA. Таким образом, впервые строго показано, что ПБА(ТАА/YUCCA) появился в эволюции у общего предка наземных растений как результат горизонтального переноса генов от нерастительных таксонов (предположительно бактерий).

Впервые установлена достоверная положительная связь между увеличением количества гомологов ферментов ПБТ и сложностью организмов растений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Белок KnТАА (NCBI: GAQ80308.1) харовой водоросли *Klebsormidium nitens*, гомологичный ферментам триптофанамиотрансфераз (ТАА) наземных растений, по функциональным и структурным характеристикам более близок к аллииназам, чем к ТАА, и не принимает участия в пути биосинтеза ауксина;
2. Белок KnFMO (NCBI: GAQ82387.1) харовой водоросли *Klebsormidium nitens*, гомологичный ферментам флавиномонаоксигеназам YUCCA (YUCCA) наземных растений, относится к кластеру Pb суперсемейства флавиномонаоксигеназ класса В, не принадлежит к семейству YUCCA и имеет отличные от них функции;
3. Путь биосинтеза ауксина ТАА/YUCCA появился в эволюции у общего предка наземных растений, как результат горизонтальных переносов генов, кодирующих эти ферменты, от нерастительных таксонов.

Теоретическая значимость работы. Результаты настоящего исследования позволили установить происхождение ПБА у растений. На основе биоинформатического анализа и сопоставления наших данных с результатами по анализу ферментативной активности ряда бактериальных белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ показано, что ПБА(ТАА/YUCCA) появился в эволюции у НПОП наземных растений, как результат ГПГ от нерастительных организмов.

Апробация работы. Основные результаты, полученные в рамках настоящей работы, были представлены на третьей Московской интернациональной конференции «Молекулярная филогенетика» (Москва, 2012 г.); восьмой, девятой, десятой, одиннадцатой и двенадцатой международных конференциях «Биоинформатика геномной регуляции и структурной системной биологии» (Новосибирск, 2012, 2014, 2016; 2018; 2020 гг.); IX Международном конгрессе "Биотехнология: Состояние и перспективы развития" (Москва, 2017); международной конференции "Беляевские чтения" (Новосибирск, 2017 г.); конференции PlantGen2019 (Новосибирск, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в журналах из Перечня ВАК (все индексированы в РИНЦ, Scopus и Web of Science), в том числе 2 в зарубежных журналах, а также 9 тезисов в сборниках материалов научных конференций. Все работы опубликованы в соавторстве с коллегами.

Личный вклад автора. Все основные научные результаты были получены автором самостоятельно.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, выводов, списка литературы (382 источника), списка обозначений и сокращений. Работа изложена на 195 страницах (включая Приложение), содержит 27 рисунков, 10 таблиц.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность коллегам, принимавшим участие в выполнении работ, представленных в диссертации, и являющихся соавторами полученных результатов и опубликованных статей: К. В. Гунбину, В. В. Суслову, И. Р. Акбердину.

Реконструкция филогенетического дерева ТАА с помощью программы PhyloBayes 3.3f и предсказания трехмерной структуры С-концевого фрагмента белка KnТАА *K. nitens* были выполнены Гунбиным К.В.

Особую признательность автор выражает академику РАН Н.А. Колчанову за постановку задачи, постоянный интерес к работе и ценные советы и замечания.

Автор выражает искреннюю благодарность Афонникову Д.А. за научное руководство данной работой.

Исследования, проведенные в данной работе, были поддержаны грантом Российского Научного Фонда 14-14-00734, а также бюджетными проектами VI.61.1.2 и 0324–2019-0040-C-01.

Часть расчетов, проведенных в работе выполнена с использованием вычислительных ресурсов Центра коллективного пользования ИЦиГ СО РАН "Биоинформатика" и Суперкомпьютерного центра Новосибирского государственного университета.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

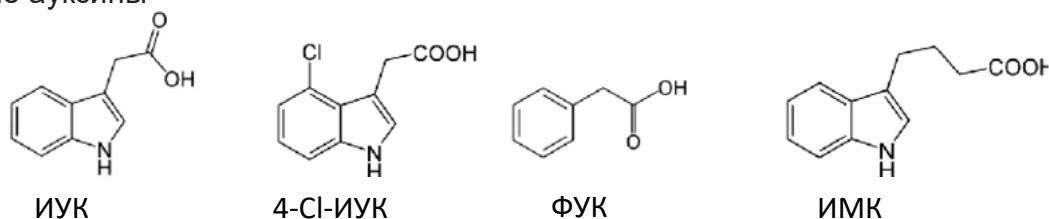
1.1 Биосинтез ауксина, его значение и взаимодействие с другими процессами.

Биология ауксина является одной из старейших областей экспериментальных исследований растений. Ещё в 1880 году Чарльз Дарвин вместе с сыном при проведении опытов на проростках канареечной травы (*Phalaris canariensis* – злаковые) обнаружили, что при боковом освещении проростки изгибаются в сторону источника света (фототропический изгиб) и начинают расти в этом направлении. Причем в опытах было обнаружено, что за фототропический изгиб отвечает верхушка побега. Дарвин предположил, что из верхушки растения вниз передаётся некий, чувствительный к свету, сигнал, который вызывает изгиб побега в направлении источника освещения (Darwin, 1880).

Немного позже это гипотетическое вещество стали называть «ауксин» от греческого слова «αυχεῖν», означающего «расти» (Enders, Strader, 2015). В 1926-1928 годах Ф. Вентом одновременно с Н. Г. Холодным была выдвинута фитогормональная теория тропизмов (фототропизм, геотропизм, гидротропизм и т.д.), названная позже теорией Холодного-Вента (Trewavas, 1992). По этой теории гипотетическое вещество ауксин синтезируется в верхушке побега и движется оттуда к его основанию. При этом интенсивность потока ауксина зависит от освещения. Когда побег освещается сбоку то на затенённой стороне побега поток ауксина ускоряется (растет его концентрация), а на освещённой – замедляется (его концентрация падает). В результате чего на затененной стороне побега клетки, под действием ауксина, делятся/растут растяжением быстрее, чем на освещенной, в итоге побег изгибается в сторону источника света. Аналогично объясняется тропический изгиб в сторону иных важных для существования растения источников: изгиб побегов, корней в направлении градиента влаги, органических или неорганических веществ и т.д.

В дальнейшем Кегль в 1935-1939 выделил индол-3-уксусную кислоту (ИУК), которая была идентифицирована как первый ауксин (Teale et al. 2006). ИУК - основной натуральный ауксин, который составляет 80-95 % всех ауксинов в тканях растений разных видов (Лутова, 2011). Поскольку ИУК является наиболее распространенным эндогенным ауксином в растениях, термины ауксин и ИУК иногда используются взаимозаменяемо (Gray, et al., 2001). Кроме того, также были выделены многие дополнительные соединения (рис. 1), обладающие ауксиновой активностью, включая индол-3-масляную кислоту (ИМК) и нафтилуксусную кислоту (НУК).

Природные ауксины



Синтетические ауксины

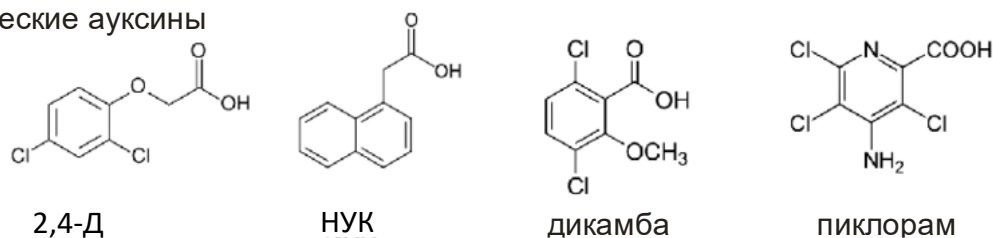


Рисунок 1. Структуры природных и синтетических ауксинов. Ауксины, обнаруженные в растениях, включают активные ауксины индол-3-уксусная кислота (ИУК), 4-Cl-IAA и фенилуксусная кислота (ФУК), а также неактивный предшественник ауксина индол-3-масляная кислота (ИМК). Синтетические ауксины включают активную 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), нафтилуксусную кислоту (НУК), 3,6-дихлор-2-метоксибензойная кислота (дикамба) и пиклорам (производное пиколиновой кислоты). (Enders, Strader, 2015)

Ауксины обнаружены у наземных растений (Bonner, Bandurski, 1952; Brumos et al., 2014), Харофитовых (Cooke et al., 2002; Hori et al., 2014), Зелёных (Niemann, Dorffling, 1980; Cooke et al., 2002; Tarakhovskaya et al., 2007; Stirk et al., 2013), Красных (Ashen et al., 1999; Yokoya et al., 2010; Mikami et al., 2016) и Бурых водорослей (Le Bail et al., 2010; Zizkova et al., 2017), у грибов (Gruen

et al., 1959; Prusty et al., 2004), у некоторых животных (Ichimura, Yamaki, 1975; Lau, 2009; Bertilsson, Palmer, 1972) и у микроорганизмов (Sergeeva et al., 2002; Spaepen et al. 2007; Hussain et al., 2010; Mazhar et al., 2013; Duca, 2014). При этом ауксин уже давно признан гормоном, необходимым для почти всех аспектов роста и развития растений (Davies, 2004; Stepanova et al., 2008; Mockaitis, Estelle, 2008; Chapman, Estelle, 2009; Vanneste, Friml, 2009; Zhao, 2010; Розов и др., 2013; Rahman, 2013; Mironova et al., 2017; Weijers et al., 2018; Blakeslee et al., 2019; Du et al., 2020): апикальное доминирование, гравитропизм и фототропизм, эмбриогенез, ростовые движения, образование сосудов, филлотаксис и листообразование, задержка листопада, стимуляция синтеза этилена, формирование цветков и плодов, развитие пыльцы, ветвление побегов, инициация латеральных корней, стимуляция роста клеток растяжением, деление клеток и их дифференцировка, управление циркадным ритмом открытия и закрытия цветка, регуляция синтеза нуклеиновых кислот, регуляция синтеза белков, обмен веществ в клеточных стенках, дыхание, углеводный и липидный обмен, синтез фотосинтетических пигментов, фотосинтез и синтез вторичных веществ.

Повышенный уровень ИУК или его активизация в процессах передачи сигналов могут способствовать развитию заболеваний при некоторых взаимодействиях растений с патогенами и ослаблять защитные реакции растений (Kunkel, Harper, 2018). Растения используют сигнальные пути и транспорт ауксина для изменения архитектуры корневой системы в ответ на различные биотические и абиотические стимулы ризосферы (Kazan, 2013; Hong et al., 2017). Неудивительно, что биосинтез, регуляция и метаболизм ауксина в растениях, а также эволюция генов, участвующих в этих процессах, привлекают столь пристальное внимание исследователей (Rozov et al., 2015; Tivendale et al., 2014; Brumos, et al., 2014; Matthes et al., 2019).

Таким образом, ауксин является ключевым регулятором многих аспектов роста и развития растений, однако механизмы, лежащие в основе этого процесса, изучены недостаточно хорошо. Обычно считается, что судьба

клеток и формирование органов у растений определяются локальными градиентами ауксина, которые создаются белками семейства PIN (транспортные белки), контролирующими направления потока ауксина через клеточные мембраны и общее распределение ауксина (Friml et al. 2002, 2003; Benkova et al. 2003; Reinhardt et al. 2003; Heisler et al. 2005; Leyser, 2005). Однако в последние годы было установлено что, несмотря на развитую систему транспорта ауксина у наземных растений её недостаточно для обеспечения необходимых минимумов и максимумов концентрации ауксина, в свою очередь обеспечивающих рост и развитие растений, для этого также необходим местный синтез ауксина (Chen et al., 2014; Ma et al., 2017; Zhao, 2018; Casanova-Saez, Voß, 2019; Matthes et al. 2019).

Растения также используют локальный биосинтез ауксина для оптимизации своего роста, когда окружающая среда претерпевает изменения (Stepanova et al., 2008; Chen et al., 2014, 2016; Zhao, 2018). Не зная, где именно синтезируется ауксин в растениях, трудно понять точные механизмы перемещения ауксина и то, как создаются и поддерживаются градиенты ауксина (Cheng et al., 2006; Zhao, 2001). В результате, исследование локального биосинтеза ауксина в последнее время стало важной задачей, решение которой может в значительной степени помочь понять механизмы роста, развития растений и их адаптации к изменениям окружающей среды (Zhao, 2018). Таким образом, актуальной задачей является определение молекулярных механизмов биосинтеза ауксина, что может дать новые подходы для задачи установления молекулярных механизмов развития растений, определения роли ауксина в этих процессах, понимания механизмов транспорта ауксина и изучения роли ауксина в формировании тканей и органов растений (Mano, Nemoto, 2012).

Ауксиновый метаболизм представляет собой сложную сеть, включающую процессы синтеза и транспорта ауксина (ИУК), его инактивацию и катаболизм, что обеспечивает надежность системы регуляции концентрации этого фитогормона в клетках и тканях растения. В проростках

ауксин синтезируется в апексе побега, в примордиях листьев и в молодых листьях, во взрослом растении дополнительно может происходить синтез в других частях, в том числе и в корне (Ljung et al., 2002).

1.2 Синтез ауксина у наземных растений

1.2.1 Триптофан-независимый путь биосинтеза ауксина

Предполагается, что ауксин в растениях синтезируется двумя различными путями: триптофан-зависимым и триптофан-независимым (Normanly, 2010).

Исходя из экспериментальных исследований, проведённых на *Zea mays* и *A. thaliana* ряд авторов предполагали наличие у некоторых наземных растений триптофан-независимого пути синтеза ауксина (Wright et al., 1991; Normanly et al., 1993; Sztein et al., 2000; Cooke et al., 2002).

Также предполагалось, что у споровых растений, таких как печеночные мхи, большая часть ИУК продуцируется триптофан-независимым путем (Sztein et al., 2000; Cooke et al., 2002). Однако выращивание печеночного мха *Marchantia polymorpha* на средах с добавлением триптофана привело к явному фенотипу, сходному с таковым, наблюдаемым для растений, выращенных на ауксине (Dunham, Bryan, 1968). Позже Джаясвал и Джохри (Jayaswal, Johri, 1985) продемонстрировали, что культуры мха *Funaria hygrometrica* могут использовать экзогенный триптофан для синтеза ИУК через промежуточное соединение – индол-3-пировиноградную кислоту (ИПК). Гены *taa* и *yusca* у *M. polymorpha* были названы *taa*, *yusca1* и *yusca2*. Потеря ПБА(ТАА/YUCCA) у них приводит к потере дифференцировки клеток и тканей (Eclund et al., 2015).

В результате, несмотря на то, что есть разрозненные данные, указывающие на возможное существование триптофан-независимого ПБА по крайней мере у некоторых групп растений, молекулярные компоненты этого пути полностью не были идентифицированы (Zhao, 2014, Wang et al., 2015).

1.2.2 Триптофан-зависимый путь биосинтеза ауксина

Ещё в 1947 году было обнаружено, что ауксин синтезируется из триптофана в листьях шпината (Wildman et al., 1947). Однако поиск пути синтеза ауксина из триптофана продолжался более 60 лет. Так к 2010 сложилась схема гипотетических путей биосинтеза ауксина из триптофана в которой предполагалось, что следующие ферменты цитохром P450 79B2 / B3 (CYP79B2/B3), YUCCA (YUC) и триптофан аминотрансфераза (TAA1/TAR) могут действовать в отдельных ПБА (рис. 2А) (Zhao, 2010; Mano, Nemoto, 2012). Эта схема оставалась гипотетической, так как ни для одного из предложенных в ней путей не было подтверждено экспериментально существование всех ферментов и реакций у растений.

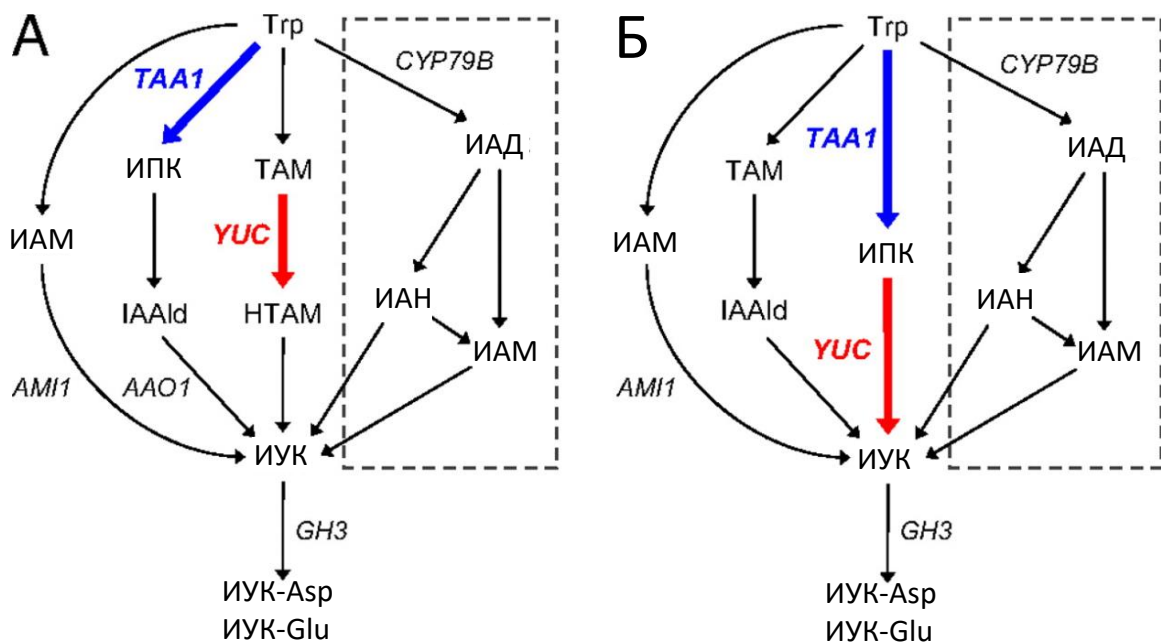


Рисунок 2. Предлагаемый путь биосинтеза ИУК в растениях. (А) Ранее предложенные пути биосинтеза ИУК. (Б) Путь биосинтеза ИУК, открытый в 2011 году (Mashiguchi et al., 2011; Won et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Tivendale et al., 2012, Dai et al., 2013). Жирные стрелки на схемах (А) и (Б) указывают (А) предлагаемые функции TAA1 и YUCCA и (Б) установленные экспериментально в 2011 году. Путь ИАД (индол-3-ацетальдоксим) иллюстрируется пунктирным квадратом. ИУК-Asp и ИУК-Glu (в нижней части схем) представляют собой метаболиты ИУК, исследованные в работе Мано и Немото (Mano, Nemoto, 2012). Рисунок адаптирован из статьи Машигучи и др. (Mashiguchi et al., 2011)

В частности, предполагалось, что ферменты TAA1 (на схеме рис. 2А выделено синим цветом) и YUCCA(YUC) (на схеме рис. 2А выделено красным цветом) действуют в двух различных путях синтеза ауксина (Zhao, 2010; Mano, Nemoto, 2012). Только в 2011-2012 годах, после открытия того, что YUCCA, в реакции, зависимой от кофермента НАДФН (никотинамидадениндинуклеотидфосфат), может превращать ИПК напрямую в ауксин, был полностью идентифицирован триптофан-зависимый ПБА, состоящий из двух последовательных реакций: 1) сначала триптофан, под действием фермента TAA1 преобразуется в ИПК, а затем 2) ИПК преобразуется в ауксин под действием фермента YUCCA (рис. 2Б) (Mashiguchi et al., 2011; Won et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Tivendale et al., 2012, Dai et al., 2013). В настоящее время ПБА(TAA/YUCCA) остаётся единственным полностью описанным путём биосинтеза ауксина у растений (Enders, Strader, 2015). ПБА(TAA/YUCCA) функционально охарактеризован у *A. thaliana*, риса (*Oryza sativa*), кукурузы (*Z. mays*), *Brachypodium distachyon*, петунии (*Petunia hybrida*), печеночного мха *M. polymorpha* и у многих других видов (Zhao, 2018).

Таким образом, установленный у наземных растений полный ПБА состоит из двух этапов: (I) синтез триптофана из хоризмата – ферменты на схеме выделены зеленым цветом текста и (II) синтез ауксина из триптофана – ферменты на схеме выделены синим цветом текста (рис. 3).

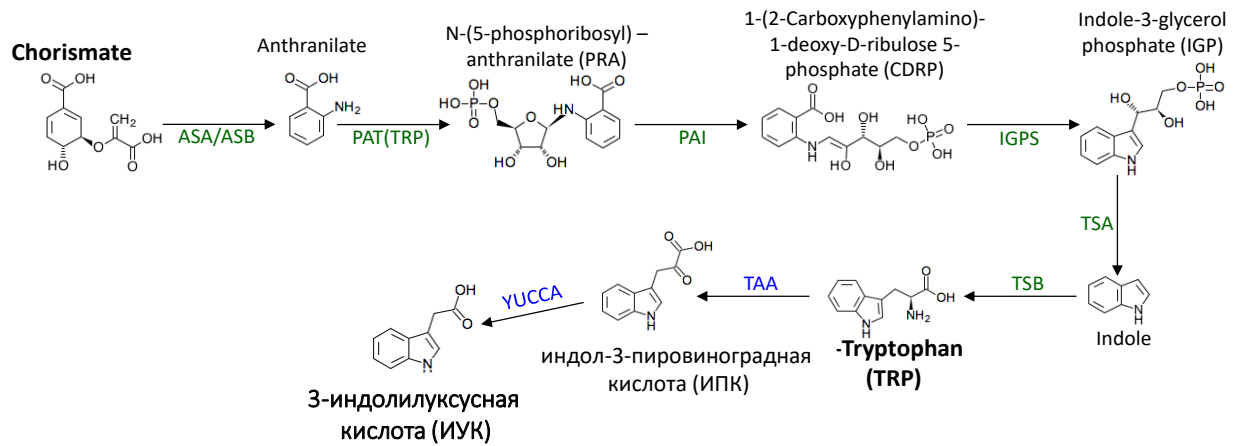


Рисунок 3. Триптофан-зависимый путь биосинтеза ауксина (ИУК). Черным цветом текста обозначены метаболиты, участвующие в ПБА, зелёным – ферменты пути биосинтеза триптофана из хоризмата (обозначения начальных и конечных веществ для обоих путей выделены жирным шрифтом), синим – ферменты биосинтеза ауксина из триптофана. Обозначения ферментов: ASA/ASB – гетеродимер ASA/ASB, ASA - anthranilate synthase α (Niyogi et al., 1992), ASB - anthranilate synthase β (Niyogi et al., 1993); PAT - phosphoribosyl anthranilate transferase (Rose et al., 1997); PAI - phosphoribosylanthranilate isomerase (Li et al., 1995a); IGPS - indole-3-glycerol phosphate synthase (Li et al., 1995b); TSA - tryptophan synthase α (Salvini et al., 2008), TSB - tryptophan synthase β (Zhao et al., 1994); TAA - триптофан аминотрансфераза; YUCCA – флавин-содержащая монооксигеназа YUCCA

1.2.2.1 Ферменты пути биосинтеза триптофана у растений

Триптофан необходим главным образом для синтеза белка у бактерий и грибов, тогда как у растений триптофан, помимо синтеза белка, также является предшественником для синтеза ключевых «вторичных» метаболитов, таких как основной эндогенный ауксин – индол-3-уксусная кислота (ИУК) и другие метаболиты, которые, например, могут участвовать в защите растения от патогенных микроорганизмов и травоядных (Niyogi, Finkl, 1992). Триптофан синтезируется из хоризмата через индол-3-глицеролфосфат в хлоропластах (Radwanski, Last, 1995). У растений путь биосинтеза триптофана (ПБТ) из хоризмата включает шесть последовательных реакций, контролируемых следующими ферментами (Radwanski, Last, 1995; рис. 3):

1. ASA/ASB (антранилат синтаза α /антранилат синтаза β);
2. PAT (TRP) (фосфорибозил антранилат-трансфераза);

3. PAI (фосфорибозил-антранилат-изомераза);
 4. IGPS (индол-3-глицерол фосфат синтаза);
 5. TSA (триптофан синтаза α);
 6. TSB (триптофан синтаза β).
1. Фермент антранилатсинтаза (AS; EC 4.1.3.27) катализирует первую реакцию ПБТ - превращение хоризмата в антранилат (рис. 3). Считается, что у растений голофермент AS является гетеротетрамером, который состоит из двух α -субъединиц (ASA) и двух β -субъединиц (ASB) (Poulsen et al., 1993). α -субъединица обладает каталитической активностью, а β -субъединица обладает аминотрансферазной активностью, которая переносит аминогруппу из глутамина на α -субъединицу (Hong et al., 2006).
 2. Вторая реакция – катализируемое ферментом PAT(TRP) (фосфорибозил антранилат-трансфераза), преобразование антранилата и фосфорилфосфата в фосфорибозилантранилат и неорганический пирофосфат (Rose et al., 1997).
 3. Третья реакция – катализируемое фосфорибозилантранилат изомеразой (PAI), превращение 5-фосфорибозилантранилата в 1-(О-карбоксифениламин)-1-деоксиребулоза-5-фосфат (Li et al., 1995).
 4. Четвёртая реакция – это реакция превращения 1-(О-карбоксифениламин)-1-деоксиребулоза-5-фосфата в индол-3-глицерол фосфат (IGP), катализируемая ферментом IGPS (EC 4.1.1.48) (Tzin, Galili, 2010).
 5. Пятая реакция – субъединица триптофансинтазы альфа (TSA) катализирует превращение индол-3-глицеролфосфата в индол. Это предпоследняя реакцию в ПБТ (Radwanski, 1995).
 6. Шестая реакция ПБТ – субъединица триптофансинтазы бета (TSB) катализирует превращение индола в L-триптофан (Last et al., 1991).

1.2.2.2 Структура и функции белков семейства ТАА

Белки семейства ТАА (L-триптофан-пируват аминотрансфераза; EC 2.6.1.27) содержат только один домен AAT_like (идентификатор БД CDD

cd00609), занимающий центральную часть последовательности. Например, в белке TAA1 *A. thaliana*, размером 391 а.о., этот домен локализован в положении с 71 по 381 а.о. В базе данных PDB (Burley et al., 2022) есть две модели пространственной структуры для белка TAA1 *A. thaliana* 3BWN и 3BWO (Tao et al., 2008).

Семейство белков TAA ограничено только растительными белками (Yue et al., 2014). У *A. thaliana* есть три гена семейства *taa*: *taa1*, *tar1*, *tar2*. Нокаутные мутанты по гену *taa1* демонстрируют измененную реакцию на тень и устойчивы к этилену и нафтилфталаминовой кислоте (НАК), но при этом они не демонстрируют резких дефектов развития при нормальных условиях роста. Двойной нокаутный мутант по генам *taa1* и *tar2* демонстрирует серьезные дефекты в росте растения, связанные со значительным недостатком ауксина: они имеют резкие дефекты в развитии сосудов и цветonoсов и полностью стерильны (Stepanova et al., 2008). Также с использованием тройных нуль-мутантов по *taa1*, *tar1* и *tar2* было показано, что все эти три гена необходимы для правильного формирования паттерна эмбрионов: у мутантов не развивается базальная часть эмбриона (Stepanova et al., 2008). Таким образом, было показано, что ферменты TAA1, TAR1 и TAR2 участвуют в синтезе ауксина на различных стадиях развития резуховидки (Stepanova et al., 2008). Генетическая избыточность генов *taa* у однодольных, по-видимому, меньше, чем у генов *taa* резуховидки. Инактивация одного *taa1*-подобного гена у кукурузы (мутанты *vt2*) приводит к резким дефектам как вегетативного, так и репродуктивного развития (Phillips et al., 2011). Нарушение гена *taa1* у риса приводит к плеiotропным фенотипам, включая мелкие метелки и аномальное развитие сосудов (Yoshikawa et al., 2014).

Гены *taa* высоко консервативны среди наземных растений. Было показано, что ортологи резуховидки *taa1* в кукурузе (*Z. mays*), рисе (*O. sativa*) и брахиподиуме (*Brachipodium distachyon*) играют важную роль в биосинтезе ауксина и его развитии (Phillips et al., 2011; Pacheco-Villalobos et al., 2012; Yoshikawa et al., 2014).

Ближайшими гомологами ТАА являются белки аллииназ – семейство с пока ещё неустановленной у резуховидки функцией (Stepanova et al., 2008) и белки простейших (Yue et al., 2014).

1.2.2.3 Суперсемейство белков флавин-содержащих монооксигеназ и входящее в него семейство YUCCA

1.2.2.3.1 Суперсемейство флавин-содержащих монооксигеназ

Флавин-содержащая монооксигеназа (FMO, EC 1.14.13.8) млекопитающих была впервые описана доктором Даниэлем Циглером и его коллегами из Техасского университета в Остине (Ziegler, 1980, 1988, 1991, 1993, 2002; Poulsen, Ziegler, 1995). Тогда как белки ТАА наземных растений имеют близких гомологов только у Харофитовых водорослей и простейших, белки YUCCA относятся к суперсемейству флавин-содержащих монооксигеназ, представленному во всех таксонах живых организмов (Huijbers et al., 2014). Флавин-содержащие монооксигеназы катализируют перенос одного атома молекулярного кислорода на органический субстрат, тогда как другой атом кислорода восстанавливается до воды (Huijbers et al., 2014). Для переноса атома кислорода флавин-содержащие монооксигеназы используют ФАД (флавин-аденин-динуклеотид) в качестве кофактора и НАДФН (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) в качестве донора электронов (Ziegler, 1990). На основании структуры и ферментативных свойств суперсемейство флавин-содержащих монооксигеназ делится на 8 классов (класс А – класс Н) (van Berkel et al., 2006; Huijbers et al., 2014).

Ферменты YUCCA относятся к В классу суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ. Все флавин-содержащие монооксигеназы класса В содержат два типичных мотива «складка Россмана» (GxGxxG/A): первый расположенный ближе к N-концу белка – ФАД связывающий сайт и второй расположен около середины белка - НАДФН связывающий сайт (Riebel et al., 2014). И между ними, недалеко от НАДФН связывающего сайта (второго

мотива складка Россмана) расположен FMO сайт (FxGxxxHxxxF/Y/W). Белки флавин-содержащих монооксигеназ класса В включают три подкласса:

1) Монооксигеназы Байер-Виллигера I типа (BVMO I типа) (существуют также BVMO II типа, но они принадлежат к флавин-содержащим монооксигеназам класса А). BVMO (BVMO I типа) содержат мотив сайта FMO – FxGxxxHxxxWP/D и главным образом катализируют реакцию окисления Байера-Виллигера, хотя они также способны окислять соединения, содержащие гетероатомы такие как N, S, В или Se (Riebel et al., 2012);

2) N-гидроксилирующие монооксигеназы (NMO) имеют сходство с двумя другими подклассами класса В (с BVMO и FMO), но не имеют характерного для этих двух подклассов мотива FMO сайта. Вместо этого в области расположения этого сайта у NMO обнаруживается лишь один консервативный гистидин (Riebel et al., 2012). NMO обычно конвертируют первичные амины с длинной цепью (Stehr et al., 1998; Riebel et al., 2014).

3) Флавин-содержащие монооксигеназы (FMO – FMO Млекопитающих - ЕС 1.14.13.8) – имеют мотив FMO сайта (сайта идентификации FMO) FxGxxxHxxxF/Y (рис. 4) и в основном катализируют реакции окисления гетероатомсодержащих соединений, в то время как они неэффективны в реакциях окисления Байера-Виллигера (способность ферментов подкласса BVMO). FMO в основном изучались как ферменты разлагающие ксенобиотики и, таким образом, обеспечивающие в живых организмах утилизацию токсичных соединений (Ziegler, 1990; Dolphin et al., 1997; Riebel et al., 2012). Следует отметить, что название этого подкласса «FMO» из класса В суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ совпадает с названием самого суперсемейства, поэтому, чтобы избежать путаницы, мы дальше по тексту будем обозначать этот подкласс как FMO, а всё суперсемейство будем называть полным именем – «флавин-содержащие монооксигеназы».

Белки YUCCA (EC 1.14.13.168) в свою очередь являются семейством, относящимся к третьему из вышеперечисленных подклассов – FMO (Fraaije et al., 2002; Riebel et al., 2012; Ballou et al., 2013).

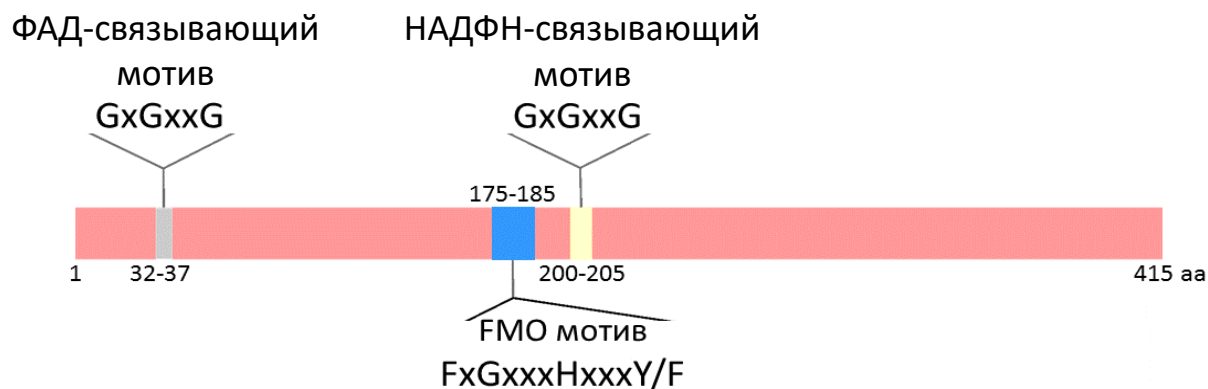


Рисунок 4. Схема расположения активных сайтов в последовательностях белков семейства FMO. Позиции сайтов указаны для белковой последовательности AT4G13260 – *A. thaliana* YUCCA2 (адаптировано из Schlaich, 2007)

1.2.2.3.2 Белки FMO II типа

Недавно, в ряде работ группы Рибель и др. был проведен филогенетический и, что важно, биохимический анализ нескольких бактериальных белков подкласса FMO суперсемейства флавин-монооксигеназ класса В. Эти результаты позволили расширить представление о разнообразии и специфических функциях белков суперсемейства флавин-монооксигеназ. В исследовании гомологов FMO бактерии *Rhodococcus jostii* RHA1, проведенном группой Рибель и др. (Riebel et al., 2013), было выявлено новое, для подкласса FMO флавин-содержащих монооксигеназ класса В, семейство FMO II типа, включающее семь белков от FMO-A до FMO-G бактерии *R. jostii* RHA1, а также гомологичный им белок FMO-X из бактерии *Stenotrophomonas maltophilia*. Соответственно, ранее известные и хорошо изученные последовательности FMO растений, животных и бактерий были отнесены к группе, названной ими FMO I типа (Riebel et al., 2013) (рис. 5). В этом семействе белки FMO-E, FMO-F, FMO-G формировали одну кладу.

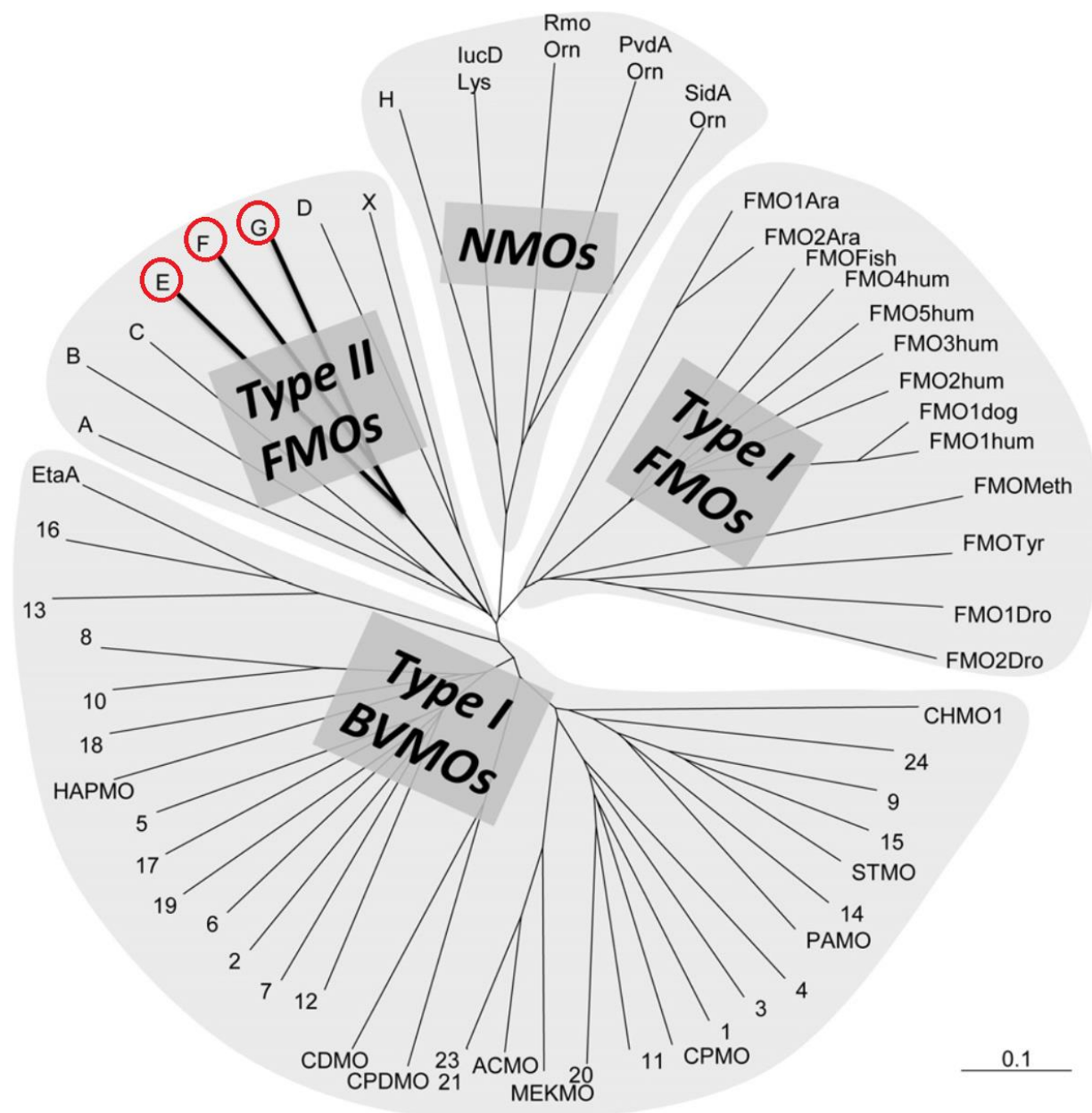


Рисунок 5. Филогенетическое дерево монооксигеназ и известных флавино-содержащих монооксигеназ класса В из работы (Riebel et al., 2013). Указаны основные типы подкласса FMO, а также новое семейство FMO II типа, включающее белки FMO-E, FMO-F, FMO-G бактерии *R. jostii* RHA1 (соответствующие листья обведены красными кружками).

В работе Рибель и др. (Riebel et al., 2013) были выявлены структурные отличия последовательностей FMO-E, FMO-F, FMO-G от остальных представителей семейства FMO этого организма. Прежде всего, если для других белков мотив сайта FMO содержал последовательности

FxGxxxHxxxYR, то для белков FMO-E, FMO-F, FMO-G были обнаружены мотивы FxGxxxHxxxYD, FxGxxxHxxxHP и FxGxxxHxxxFV, соответственно. Во-вторых, эти три белка на N-конце содержали дополнительный участок последовательности, длиной около 160 а.о., отсутствующий у прочих белков FMO (Riebel et al., 2013).

Белки FMO-E, FMO-F, FMO-G также обладали специфическими ферментативными особенностями, отличающие их от белков других групп FMO. Так, белки новой группы FMO II типа *R. jostii* RHA1 (FMO-(E-G)) в качестве кофермента для своих реакций могут в равной степени использовать и НАДФН, и НАДН. Тогда как все остальные ферменты флавин-содержащих монооксигеназ В класса в качестве кофермента способны эффективно использовать НАДФН, но не НАДН.

Другим принципиальным отличием белков FMO-E, FMO-F, FMO-G *R. jostii* RHA1 является способность этих белков катализировать как окисление гетероатомов (S или N) (способность белков FMO I типа), так и реакции окисления Байера-Виллигера (способность белков подкласса BVMO, не принадлежащих подклассу FMO). Тогда как остальные белки FMO II типа у *R. jostii* RHA1 FMO-A, FMO-B, FMO-C и FMO-D, также, как и классические FMO (FMO I типа) способны окислять гетероатомы (S или N), но не эффективны в реакции окисления Байера-Виллигера. Таким образом, способность FMO-E, FMO-F, FMO-G катализировать и окисление гетероатомов и реакцию окисления Байера-Виллигера делает их каталитически сходными с белками подкласса BVMO I, и отличает их от других белков подкласса FMO (Riebel et al., 2013; Riebel et al., 2014).

На основании этих результатов Рибель и соавт. (Riebel et al., 2013) предположили, что ферменты FMO-E, FMO-F, FMO-G можно выделить в отдельный класс, который эволюционировал отдельно от остальных представителей FMO.

1.2.2.3.3 Структура и функции белков YUCCA

Белки YUCCA (ЕС 1.14.13.168) содержат только один структурный домен, аннотированный в базе данных CDD с идентификатором COG2072 (домен CzcO). Этот домен занимает большую часть белковой последовательности в центре. Так, например, в белке YUCCA1 *A. thaliana* длиной 414 а.о. домен CzcO расположен от 22 до 393 а.о. Белки YUCCA содержат несколько активных сайтов. Это сайты связывания ФАД (флавиноаденин-динуклеотид), и НАДФН, имеющие одинаковый мотив и расположенные на N-конце и в середине белка, соответственно (рис. 4). Ближе к сайту связывания НАДФН, расположен сайт FMO, предположительно вносящий вклад в связывание НАДФН (Fraaije et al., 2002; Cheesman et al., 2003) и взаимодействующий с флавином (ФАД) (Eswaramoorthy et al., 2006). Мутации первого и третьего глицинов в сайте связывания ФАД или третьего глицина в сайте связывания НАДФН полностью нарушают функции YUCCA по биосинтезу ауксина у *A. thaliana* (Hou et al., 2011) и *Z. mays* (Gallavotti et al., 2008). Это позволяет предположить, что ФАД- и НАДФН-связывающие мотивы GxGxxG (рис. 4) являются ключевыми для активности YUCCA.

Катализируемая ферментом YUCCA реакция преобразования ИПК в ИУК (ауксин) на молекулярном уровне включает несколько этапов (рис. 6). Первым шагом реакции является восстановление фактора ФАД до ФАДН под действием НАДФН (рис. 6, реакция 1). Далее ФАД взаимодействует с O₂ с образованием флавин-С4а-(гидро)пероксидного промежуточного продукта (рис. 6, реакция 2). Заключительным шагом является реакция С4а-промежуточного соединения с ИПК с образованием ИУК (рис. 6, реакции 3 и 4).

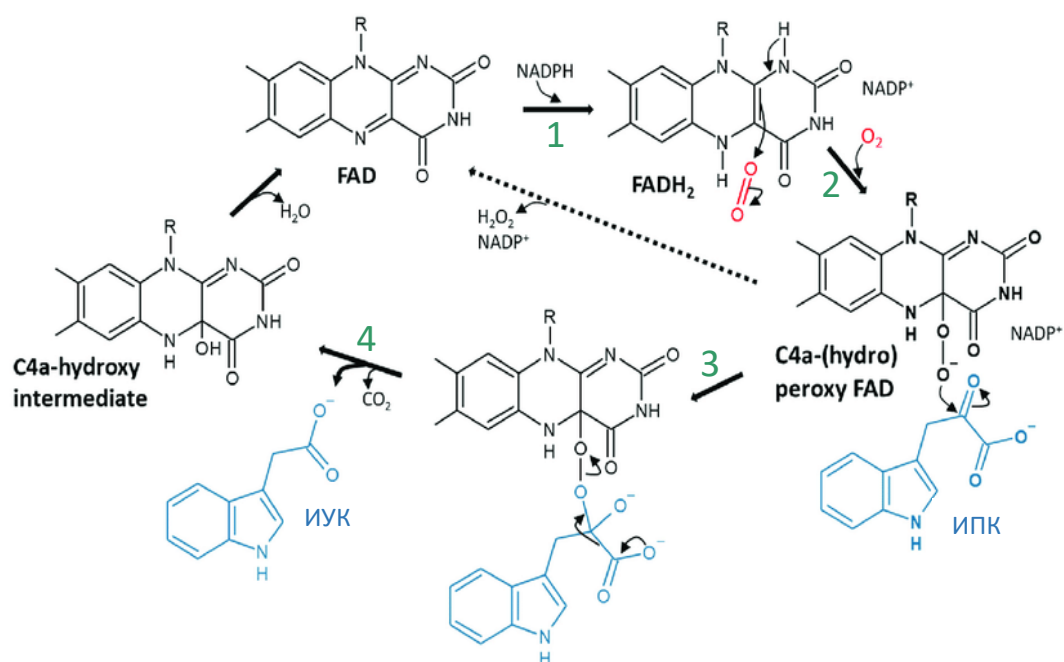


Рисунок 6. Каталитический механизм фермента YUCCA для реакции превращения ИПК (индол-3-пировиноградной кислоты) в ИУК (ауксин). Черным цветом на схеме обозначен кофактор ФАД (FAD), синим субстрат ИПК и продукт реакции ИУК. Рисунок адаптирован из статьи Тодберга и Нельсона (Thodberg, Neilson, 2020)

Гены семейства *уисса* лучше всего исследованы у *A. thaliana*, у которого идентифицировано 11 членов этого семейства: *yusca1-yusca11* (Zhao et al. 2001; Cheng et al., 2006, 2007). Наиболее эффективным методом для определения функций генов является анализ нокауты (Alberts et al., 2008). Одиночные нокаутные мутанты по какому-либо из одиннадцати генов *уисса* у *A. thaliana* неожиданно не имели никаких дефектов в росте и развитии растений (Cheng et al., 2006). Однако нокауты по нескольким генам *уисса* в ряде случаев имели значительные дефекты в эмбриогенезе, росте проростков, образовании сосудов, цветов и т.д. (Cheng et al. 2006, 2007). По результатам анализа мутаций установлено, что функции некоторых генов *уисса* в значительной степени перекрываются, что позволило разделить белки *уисса* на 4 подсемейства: (1) *yusca1,4*; (2) *yusca2,6*; (3) *yusca3,5,7-9* и (4) *yusca10,11*. Функции белков внутри этих подсемейств частично или полностью

перекрываются, поэтому только инактивация всех генов любого из подсемейств *yucca* приводит к значительным нарушениям развития.

Ферменты YUCCA демонстрируют отчетливую органоспецифическую экспрессию и строгую субклеточную компартментализацию (Zhao, 2018; Matthes et al., 2019; Blakeslee et al., 2019). Например, YUCCA1, YUCCA2, YUCCA4 и YUCCA6 являются основными белками YUCCA функционирующими в побегах (Chen et al., 2014). Так двойные мутанты *yucca1-4-* и *yucca2-6-*, все тройные комбинации делеций этих генов и комбинация по четырем делециям генов *yucca* (*yucca1-4-2-6-*) имели дефекты в формировании сосудов и развитии цветка (Cheng et al., 2006). Двойной мутант *yucca1-yucca4-* (*yucca1*: At4g32540; *yucca4*: At5g11320) не может образовывать третичные прожилки на листьях и образует только прерывистые прожилки на цветах (Cheng et al., 2006). Если у мутанта *yucca1-yucca4-* нарушаются также и гены *yucca2*(AT4G13260) и *yucca6*(AT5G25620), то фенотип *yucca1-yucca4-* усиливается (Cheng et al., 2006). Повышенная экспрессия *yucca8/9* важна для изменения морфологии и формы листьев у ореха авелланского (*Gevuina avellane*) способствующей его адаптации к различным условиям освещения (Ostria-Gallardo et al., 2016). Более того, было показано, что гены *yucca* регулируют угол наклона листьев как у однодольных, так и у двудольных. Было показано, что гомологи *yucca6* резуховидки Таля в картофеле (*Solanum tuberosum*) и рапсе масличном (*Brassica napus* L.) влияют на модуляцию угла наклона их листьев (Kim et al., 2013, Wang et al., 2016). Гены, кодирующие YUCCA3, YUCCA5, YUCCA7, YUCCA8, YUCCA9 ответственны за продукцию ауксина в корнях (Stepanova et al., 2008; Chen et al., 2014). Когда инактивируются эти 5 генов *yucca3*(AT1G04610), *yucca5*(AT5G43890), *yucca7*(AT2G33230), *yucca8*(AT4G28720) и *yucca9*(AT1G04810) у растения развиваются очень короткие и агравитропные корни (Chen et al., 2014). Экспрессия антисмысловой РНК к гену *yucca1* у риса (*O. sativa*) привела к образованию дефектного корня, который напоминает фенотип корня нечувствительного к ауксину мутанта по этому гену

(Yamamoto et al., 2007). Отсутствие YUCCA6 вызвало дефекты в образовании корней у земляники лесной (*Fragaria vesca* L.) (Liu et al., 2014). Гены *yusca1*, *yusca4*, *yusca10*, *yusca11* *A. thaliana* являются основными YUCCA генами экспрессирующимися во время эмбриогенеза (Cheng et al., 2007). Мутации по всем четырем генам: *yusca1*-, *yusca4*-, *yusca10*-, *yusca11*- приводили к редукции базальной части эмбриона (Cheng et al., 2007).

В настоящее время 3D структуры для белков YUCCA отсутствуют. Ближайшими к ним, по сходству последовательностей, белками, для которых получены 3D структуры, являются белки флавин-содержащих монооксигеназ. Например, это флавин-содержащая монооксигеназа *S. pombe*, для которой получена трехмерная структура с индексом банка PDB 2GVC.

Гены семейства YUCCA помимо *A. thaliana* описаны также у томата (*Solanum lycopersicum*) (Exposito-Rodriguez et al., 2011), картофеля (*S. tuberosum*) (Kim et al., 2013), петунии (*Petunia hybrida*) (Tobena-Santamaria et al., 2002), кукурузы (*Zea mays*) (Li et al., 2015), риса (*O. sativa*) (Yamamoto et al., 2007), мохообразных: *M. polymorpha* (Lockhart, 2015) и *Physcomitrella patens* (Rensing et al., 2008) и других видов растений.

Мутанты, у которых выключены функции генов *taa* или *yusca* показывают значительное снижение концентрации ауксина. Однако, если мутанты со сверхэкспрессией ТАА не показывают эффектов повышенного уровня ауксина, то у мутантов со сверхэкспрессией YUCCA (двойной мутант по генам *yusca2*(At4g13260) и *yusca3*(At1g04610) уровень ауксина значительно повышается. Это позволило сделать вывод, что в ПБА(ТАА/YUCCA) фермент YUCCA, но не ТАА, катализирует реакцию, являющуюся лимитирующим звеном этого пути (Zhao et al., 2001).

1.3 Метаболизм, транспорт ауксина и регуляция его синтеза

Синтез ауксина тесно сопряжён с рядом процессов, также влияющих на его концентрацию и активность, таких как процессы метаболизма и транспорта

ауксина, а также регуляцию синтеза ауксина в ответ на различные сигналы, опосредованные соответствующими путями передач (Ljung et al., 2002; Zhao, 2018). Механизмы этих процессов позволяют лучше понять роль и метаболизм ауксина у растений.

1.3.1 Метаболизм ауксина

Из-за своей высокой активности, значительная часть ИУК (около 90%) находится в виде неактивных соединений (конъюгатов) с аминокислотами и сахарами (Wisniewska et al., 2006; Normanly, 1997). Свободная ИУК биологически активна в разнообразных процессах развития растений; однако большинство конъюгатов ИУК неактивны и служат резервуаром для поддержания надлежащего баланса свободной ИУК, детоксикации ее излишков или ее запасания, либо являются транспортной формой ауксина (Полевой, 1982; Цыганкова и др., 2005; Ludwig-Muller, 2011). Идентифицирован широкий спектр молекул-ферментов, которые конъюгируют (соединяют) аминокислоты или углеводы с ауксином. Например, ацил-амидо синтазы группы II кодируемые генами GRETCHEN HAGEN3 (GH3) (Staswick et al., 2005; Wisniewska et al., 2006; Westfall et al., 2010) соединяют (конъюгируют) ауксин с аминокислотами. В результате для *A. thaliana* установлено, что его ферменты ИУК-амино синтазы GH3 связывают ИУК с Glu, Asp, Met, Trp, Phe, Gly, Gln, Tyr, Ile и Val (Staswick et al., 2005). При этом в некоторых из этих конъюгатов, например, ИУК-Asp и ИУК-Glu ИУК связан необратимо, то есть синтез таких конъюгатов является способом подготовки ИУК для его дальнейшей деградации. Однако в других конъюгатах, таких как ИУК-Ala и ИУК-Leu ИУК связан обратимо, и он может быть освобождён из них действием ИУК-амино гидролаз. То есть в таких конъюгатах ИУК запасается в неактивной форме и может быть быстро получен из них при необходимости в результате их деконъюгации

специальными ИУК-амино гидролазами (Staswick et al., 2005). GH3 появились в эволюции у НПОП всех таксонов наземных растений (Schmidt, 2021).

В свою очередь UDP глюкозилтрансферазы (UGT) UGT74D1 и UGT84B1 (Jackson et al., 2001) гликозилируют ауксин, также переводя его в неактивную форму. Ферменты UGT присутствуют во всех таксонах растений (Wilson, Tian, 2019).

Также различные исследования показали, что превращение активного ИУК (IAA) в неактивный метиловый ИУК-эфир (MeIAA или MeИУК) происходит под действием фермента IAA CARBOXYMETHYLTRANSFERASE1 (IAMT1) (Qin et al., 2005; Li et al., 2008). В свою очередь, эти формы хранения ауксина могут ещё и регулировать гомеостаз ауксина (и, следовательно, его функции) во время роста и развития растений (Ljung, 2013). IAMT1 обнаружены только у семенных растений (Schmidt, 2021).

Хотя важность окисления ИУК была показана во многих работах *in vivo*, ферменты, катализирующие эту реакцию (окисление ИУК до охИУК), были идентифицированы совсем недавно. Первая предполагаемая оксидаза ИУК, ADVENTITIOUS ROOT RELATED OXYGENASE (ARRO-1), была идентифицирована у яблони (Butler, Gallagher, 1999; Butler, 2000; Smolka et al., 2009), а вторая, DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION (DAO), была идентифицирована у риса (*O. sativa*) во время изучения у него генетических механизмов мужской стерильности (Zhao et al., 2013).

Недавно стало известно, что DAO1 (DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1) резуховидки действует совместно с GH3 для поддержания оптимального уровня неактивных ауксинов, таких как оксиндол-3-ИУК (охИУК) или индол-3-ацетил-аспарагиновая кислота (ИУК- Asp) (Mellor et al., 2016; Porco et al., 2016). ИУК способствует жесткой регуляции уровня концентрации своей активной формы, например, путем стимулирования экспрессии генов *gh3* и *dao* (Stepanova, Alonso, 2016). Гены *gh3* появились в эволюции у НПОП всех таксонов наземных растений (Schmidt, 2021). Гены

dao были идентифицированы только у семенных растений (Schmidt, 2021). Показано, что эти гены отсутствуют у Харофитов (Charophyta) (Bowman et al., 2021), хотя у них есть окисленные формы ИУК, эти два факта вместе предполагают наличие у Харофитов неизвестного пути окисления ИУК.

Аминокислотные конъюгаты ИУК могут быть гидролизваны до свободного ИУК ферментами ИУК-амидогидролазами. Деконъюгации способствует амидогидролаза IAA-LEUCINE RESISTANT1 (ILR) (Bartel, Fink, 1995). Среди амидогидролаз *A. thaliana* ILR1, IAR3 и ILL2 проявляют сходную активность, которая соответствует ингибированию фенотипов роста корней (LeClere et al., 2002), а гидролиз ими ИУК-Asp был показан *in vitro* (LeClere et al., 2002). Семейство ILR-подобных белков по литературным данным появилось в эволюции у позднейших общих предков голосеменных и покрытосеменных растений. У хламидомонад (род, принадлежащий Chlorophyta – Зеленые водоросли), мхов и папоротников ортологи этих белков не выявляются (Campanella et al., 2003).

Интересно отметить, что образование конъюгатов ауксина дает возможность сопоставить общий эволюционный прогресс в развитии царства растений и сопутствующее ему усложнение систем метаболизма гормонов. Для регуляции концентраций свободного ауксина низшие растения используют стратегию синтеза ауксина и последующей его деградации, тогда как высшие, уже обладающие сложной сосудистой системой, инактивируют избыточный ауксин, образуя ИУК-конъюгаты, а затем, по мере необходимости, гидролизуют их, высвобождая активный гормон (Cooke et al., 2002; Розов и др., 2013). Конъюгация свободного ауксина, например, во время созревания семян, служит механизмом запасания ИУК в форме, позволяющей быстро высвободить свободный ауксин во время прорастания семян. Такой механизм работает у всех покрытосемянных растений (Bartel, 1997). Аналогичный эффект наблюдается для открытия и закрытия цветов кувшинки (Ke et al., 2018).

1.3.2 Транспорт ауксина

Отличительной особенностью ауксина, в сравнении с другими фитогормонами, является его система транспорта в растении: помимо транспорта по сосудам флоэмы, у него имеется активный полярный (то есть направленный) межклеточный транспорт (Swarup et al., 2001; Vanneste, Friml, 2009; Petrasek, Friml, 2009).

Неравномерному содержанию ауксина в различных тканях и органах растений способствует активный межклеточный транспорт, осуществляемый за счёт четырех семейств белков (Zazimalova et al. 2010; Peer et al., 2011), к которым относятся следующие семейства:

- 1) Белки семейства AUXIN-INSENSITIVE1/LIKE AUX1 (AUX/LAX) обеспечивают поступление ауксина в клетку (Bennett et al., 1996; Peret et al., 2012).
- 2) Белки семейства PIN-FORMED (PIN) являются вторичными переносчиками ауксина и обеспечивают отток ауксина из клеток. Белки PIN локализованы на цитоплазматической мембране клетки асимметрично, такая полярность их распределения в клетке определяет направленность межклеточного потока ауксина (Krecek et al, 2009; Blilou et al., 2005; Petrasek, Friml, 2009).
- 3) Белки подсемейства ABC транспортеров (ABCB), также, как и белки PIN, осуществляют отток ауксина (Blilou et al., 2005; Friml et al., 2003; Geisler et al., 2006).
- 4) Ответственными за внутриклеточное распределение ауксина в наземных растениях считаются PILS-переносчики (PIN-LIKES). Белки PILS были идентифицированы на основании их сходства с PIN-белками и локализованы в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), предположительно транспортируют ауксин из цитоплазмы в ЭПР (Barbez et al., 2012), изменяя чувствительность тканей к ауксину (Beziat et al., 2017; Sauer, Kleine-Vehn, 2019).

Сообщается, что гомологи AUX/LAX (первые из вышеперечисленных групп белков транспортеров ауксина) присутствуют во всем растительном

царстве (Swarup, Peret, 2012; Schmidt, 2021) и, возможно, развились до эволюции наземных растений, поскольку последовательности, подобные AUX/LAX, присутствуют у нескольких одноклеточных и колониобразующих видов Chlorophyta (De Smet et al., 2011), у Харофитов гомологи AUX1 есть у *Penium margaritaceum* (Jiao et al., 2019) и *Klebsormidium nitens* (Hori et al., 2014) (предыдущее название этого вида – *Klebsormidium flaccidum* NIES-2285; вид *Klebsormidium flaccidum* NIES-2285 был переименован в *Klebsormidium nitens* NIES-2285 в 2016 году, см. http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/).

У Зеленых водорослей (Chlorophyta) гены PIN-семейства не обнаруживаются (De Smet et al., 2011; Schmidt, 2021). При этом гены PINs были идентифицированы у Харофитовых водорослей *Spirogyra pratenis* (De Smet et al., 2011), *K. flaccidum* UTEX321 (Viaene et al., 2013) и *K. nitens* NIES-2285 (Hori et al., 2014) с помощью транскриптомного и геномного анализов, но их функции в транспорте ауксина остаются неясными. Существование полярного транспорта ауксина подтверждается у нескольких видов Харофитовых водорослей (Dibb-Fuller, Morris, 1992; Klambt et al., 1992; Boot et al., 2012; Zhang, van Duijn, 2014; Zabka et al., 2016). Это предполагает, что гены PINs появились в эволюции у НПОП Харофитов и наземных растений.

Белки ABCB появились в эволюции зелёных растений уже у одноклеточных зелёных водорослей и присутствуют во всех группах растений (De Smet et al., 2011; Xiong et al., 2015; Khasin et al., 2018; Schmidt, 2021).

Гены PILs высоко консервативны во всех таксонах растений, начиная с Зеленых водорослей (Chlorophyta), т.е. они, по-видимому, развились до появления растений (Feraru et al., 2012; Khasin et al., 2018).

1.3.3 Регуляция биосинтеза ауксина

1.3.3.1 Ауксин в путях передачи сигналов

Ауксин действует путем регуляции транскрипции через активность по крайней мере трех семейств белков, к которым относятся:

- (1) Белки F-box TIR1/AFB (Dharmasiri et al., 2005; Mockaitis, Estelle, 2008);
- (2) Белки Aux/IAA (Overvoorde et al., 2005; Remington et al., 2004; Luo et al., 2018);
- (3) Белки ARF (auxin response factor) (Okushima et al., 2005; Guilfoyle, Hagen, 2007; Luo et al., 2018).

Путь передачи сигнала от ауксина к генам ответа на ауксин через каскад TIR1/AFB-Aux/IAA-ARF называют каноническим ауксиновым ответом. Каскад TIR1/AFB-Aux/IAA-ARF действует следующим образом. В отсутствии ауксина репрессорный транскрипционный комплекс, [Aux/IAA]/ARF, связан с регуляторными сайтами ауксинового ответа (AuxREs, консенсус TGTCTC) (Ulmasov et al., 1995; Ulmasov et al., 1999) в соответствующих промоторных областях генов. В результате подавляется транскрипция этих генов (Guilfoyle et al., 1998; Ulmasov et al., 1999; Tiwari et al., 2001, 2004; Weijers et al., 2005; Szemenyei et al., 2008; Chapman, Estelle, 2009; Luo et al., 2018). Когда уровень ауксина увеличивается, то ауксин связывается с субъединицей F-box TIR1/AFB лигазы SCF типа E3. Этот комплекс ауксин/[TIR1/AFB] в свою очередь убиквитинирует белок репрессор транскрипции Aux/IAA, входящий в состав комплекса [Aux/IAA]/ARF, запуская деградацию этого белка 26S протеасомой (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski, Leyser, 2005; Maraschin et al., 2009; Chapman, Estelle, 2009; Calderon Villalobos et al., 2012). Деградация белка репрессора Aux/IAA приводит к высвобождению транскрипционного фактора ARF, который начинает активировать транскрипцию с промоторов, с которыми он связан. Таким образом, происходит переключение от репрессии транскрипции ауксин-ответственных генов комплексом [Aux/IAA]/ARF к активации этих

генов транскрипционным фактором ARF в ответ на повышение концентрации ауксина (Ramos et al., 2001; Zenser et al., 2001).

Эти три ключевых сигнальных семейства генов *tir1/afb*s, *aux/iaa*s и *arfs*, продукты которых (TIR1/AFB, Aux/IAA и ARF) регулируют транскрипцию генов в манере, зависимой от ауксина, кодируются в *A. thaliana* шестью, 29-ю и 23-мя генами, соответственно (Chapman, Estelle, 2009). Многочисленные возможные комбинаций между отдельными членами этих трех семейств генов с предположительно различными сигнальными способностями каждого из генов могут в конечном итоге отвечать за широкий спектр выходов ауксиновой сигнализации, наблюдаемых в ходе роста и развития растений (Calderon Villalobos et al., 2012; Salehin et al., 2015).

У Зеленых водорослей не обнаружены гомологи TIR1, Aux/IAA, ARF (de Smet et al., 2011). Также, у Харофитовой водоросли *K. nitens*, в отличие от наземных растений, включая мхи, не обнаружена сигнальная система ауксина, состоящая из TIR1-Aux/IAA-ARF (Hori et al., 2014). Эти компоненты, по-видимому, появились у наземных растений после их дивергенции с Харофитовыми водорослями и, вероятно, обеспечили более сложную ауксиновую сигнализацию у наземных растений.

Помимо канонического ответа на ауксин описаны также неканонические пути передачи ауксинового сигнала: ABP1 (auxin binding protein1) путь и IBR5 (indole-3-butyric acid response5) путь (Lau et al., 2009; Tromas et al., 2010) и SKP2A путь (Powers, Strader, 2016).

Белок ABP1 только связавшись с ауксином приобретает способность связываться со своим рецептором TKR (transmembrane kinase receptor), локализованным в плазматической мембране. В результате TKR активируется и запускает два нижележащих пути ROP2-RIC4 и ROP6-RIC1. Первый из этих путей ROP2-RIC4 ингибирует эндоцитоз PIN1 (направленный транспортер ауксина) через содействие накоплению кортикальных актиновых филаментов (Nagawa et al., 2012). Второй путь ROP6-RIC1 активирует полимеризацию тубулиновых микротрубочек (Powers, Strader, 2016). Оба этих пути

регулируют расположение полярных транспортеров на клеточной мембране, таким образом, ауксин, через ABP1 путь передачи сигнала, регулирует свой собственный направленный транспорт через клетки.

Второй из вышеперечисленных фермент IBR5 (indole-3-butyric acid response5), предполагаемая протеинфосфатаза двойной специфичности, является положительным регулятором реакции на ауксин. Мутации в *ibr5* приводят к уменьшению высоты растений, дефектному развитию сосудов, увеличению зубчатости листьев, уменьшению количества боковых корней и устойчивости к фитогормонам: ауксину и абсцизовой кислоте (Strader et al., 2008).

Было показано, что IBR5 является фосфатазой, которая способствует развитию ауксинового ответа, включая индуцируемую ауксином транскрипцию, иначе, чем ауксиновый рецептор TIR1, и без дестабилизации репрессорных белков Aux/IAA (Strader et al., 2008). Пути передачи ауксинового сигнала через IBR5 недостаточно изучены.

ABP1 и IBR5 вероятно присутствуют у всех зелёных растений начиная с зелёных водорослей (Chlorophyta) (de Smet et al., 2011; Hori et al., 2014; Khasin et al., 2018).

Сигнальный путь SKP2A (S-phase kinase associated protein 2a) также запускается при повышении концентрации ауксина. Через этот сигнальный путь осуществляется регуляция ауксином прохождения клетками цикла деления (del Pozo et al., 2002, 2006). Транскрипционный фактор E2FC/DPB связываясь с соответствующими сайтами в промоторах ряда генов клеточного цикла подавляет их экспрессию. Это происходит следующим образом. F-box белок SKP2A связывает ауксин, в результате чего образовавшийся комплекс ауксин/SKP2A способствует деградации E2FC/DPB в ауксин-зависимой манере. Деградация E2FC/DPB снимает репрессию генов клеточного цикла. В результате чего с освободившимися от E2FC/DPB сайтами в промоторах соответствующих генов клеточного цикла связывается активирующий транскрипцию комплекс E2F+/DP+, что приводит к активации экспрессии

этих генов, отвечающих за прогрессию клеточного цикла, и, в свою очередь, к активации клеточного деления (del Pozo et al., 2002, 2006; Powers, Strader, 2016). Растения, сверхэкспрессирующие SKP2A, увеличивают число клеток в G2/M, снижают уровень пloidности и развивают большее число примордиев боковых корней (Jurado et al., 2008). Таким образом, SKP2A – это ауксин-связывающий белок, который согласовывает передачу ауксинового сигнала с пролиферацией клеток (Jurado et al., 2010).

Эволюция белков SKP2A у растений недостаточно изучена.

1.3.3.2 Регуляция биосинтеза ауксина в ответ на стрессовые факторы

Как говорилось выше, основным путем биосинтеза ауксина у наземных растений является двухстадийный ПБА(ТАА/YUCCA), состоящий из двух последовательных реакций, контролируемых двумя ферментами: 1) ТАА – превращающей триптофан в ИПК и 2) YUCCA – преобразующей ИПК в ауксин (Mashiguchi et al., 2011; Won et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Tivendale et al., 2012, Dai et al., 2013).

Недавние исследования предоставили некоторые доказательства того, что, опосредованный YUCCA, биосинтез ауксина необходим для адаптации растений к засухе (Cha et al., 2015; Shi et al., 2014). Например, значимо меньшее снижение массы растений в условиях воздействия испарения при комнатной температуре было обнаружено у проростков резуховидки сверхпродуцирующих ауксин (избыточная экспрессия YUCCA8/9 по сравнению с диким типом), что предполагает у них повышенную способность сохранять воду в тканях (Hentrich et al., 2013). Также было показано, что на засухоустойчивость растений влияли уровни экспрессии генов *yucca7* (показано на резуховидке (Lee et al., 2012)) и *yucca6* (показано на резуховидке (Cha et al., 2015; Shi et al., 2014) и на картофеле (*S. tuberosum*) (Kim et al., 2013; Park et al., 2013)). Также мутанты риса (*O. sativa*) по гену *yucca*, называемому

constitutively wilted 1 (cow1) демонстрировали типичные формы увядания, что предполагает важную роль этого гена в водном гомеостазе (Woo et al., 2007).

Высшие растения адаптируются к высокой температуре путем резкого изменения своей архитектуры. При высокой температуре окружающей среды растения демонстрируют резкое удлинение стеблей в качестве адаптивной реакции на тепло (Franklin et al., 2011). Этот ответ опосредован повышенным уровнем фитогормона ауксина и требует активации как биосинтеза ауксина, так и сигнальных и транспортных путей (Sun et al., 2012). Показано, что транскрипционный регулятор фитохром-интегрирующий фактор 4 (Phytochrome Interacting Factor 4, PIF4) и фитогормон ауксин участвуют в регуляции удлинения гипокотилия у резуховидки, индуцированного высокой температурой. В статье Сан и др. (Sun et al., 2012) сообщается, что PIF4 регулирует, вызванное высокой температурой, удлинение гипокотилия через прямую активацию гена фермента биосинтеза ауксина *yucca8*. Установлено, что высокая температура положительно регулирует совместный уровень транскриптов PIF4 и YUCCA8. Эксперименты по методу задержки в геле и иммунопреципитации хроматина демонстрируют, что PIF4 связывается с G-box-содержащей областью промотора *yucca8*. Анализ экспрессии генов в листьях табака (*Nicotiana benthamiana*) подтверждает, что PIF4 непосредственно активирует экспрессию YUCCA8 *in vivo*. Важно отметить, что нокаутная мутация по *yucca8* может в значительной степени подавить фенотип длинного гипокотилия у растений со сверхэкспрессией PIF4, а также уменьшить вызванное высокой температурой удлинение гипокотилия (Sun et al., 2012). Отметим, что белки PIF появились в эволюции у НПОП Харофитовых водорослей и наземных растений (Possart et al., 2017).

Ген *taa1*, также, как и *yucca8*, активируется транскрипционным фактором PIF4 в ответ на повышение температуры (Franklin et al., 2011).

Адаптивные стратегии, называемые синдромом избегания тени (shade avoidance syndrome, SAS) и обнаружением соседей, наделяют растения способностью быстро расти и быстро достигать света, в ситуациях, когда они

чувствуют конкурентов за потребление света, тем самым избегая затенения (Zhao, 2018; Michaud et al., 2017). Изменения в развитии, вызванные затенением, во многом схожи с теми, которые стимулируются высокой температурой окружающей среды (Quint et al., 2016). Например, как высокая температура, так и тень стимулируют удлинение гипокотилей и черешков (Gray et al., 1998; Quint et al., 2016).

Когда растения затеняются соседями, отношение интенсивности освещения длин волн в области красного света (I_{\max} примерно = 660 нм) к интенсивности освещения в области дальнего красного света (I_{\max} примерно = 730 нм) резко снижается. Растения обнаруживают эти различия в освещенности и используют их как сигнал для усиления роста стебля (Iglesias et al., 2018). Синдром избегания тени вызывается высокой плотностью растений. Обнаружено, что экспрессия генов *uissa2*, 5, 8 и 9 быстро индуцировалась в тени (Tao et al., 2008; Kohnen et al., 2016; Nito et al., 2015; Müller-Moulé et al., 2016). Накопление ауксина при затенении было связано со стимуляцией активности факторов PIF, которые дополнительно положительно активировали уровни экспрессии генов семейства *uissa* (Iglesias et al., 2018). Активация этих генов в условиях затемнения растения происходит за счёт следующего механизма. При нормальном освещении фитохром В (phyB) остается в активной форме и связывается с факторами транскрипции PIF, вызывая фосфорилирование и деградацию факторов транскрипции PIF, что приводит к подавлению экспрессии PIF-зависимых генов. В условиях тени phyB остается в неактивной форме (красная светопоглощающая форма фитохрома), и, следовательно, факторы транскрипции PIF остаются свободными и могут активировать экспрессию PIF-зависимых генов, что, в свою очередь приводит к активации биосинтеза ауксина (Zhao, 2018).

Другой вид стресса, в ответ на который вовлечен ауксин – воздействие токсичных металлов, подавляющее рост растений. Например, ионы алюминия (Al) значительно подавляют удлинение корней у резуховидки (Yang et al., 2017). Оказалось, что ауксин усиливает токсичный эффект ионов Al (Liu et al.,

2016; Yang et al., 2014). Так, мутант *taal*, с пониженной концентрацией ауксина менее чувствителен к ионам *Al*, чем растения дикого типа. При этом добавление ауксина в среду для культивирования или поддержания этого мутанта усиливает ингибирующее действие *Al* на удлинение корней (Yang et al., 2014). Флавин-содержащие монооксигеназы YUCCA также необходимы для воздействия полной токсичности *Al* на рост корней. Гены семейства *yucca* (*yuc*) регулируют локальный биосинтез ауксина в переходной зоне верхушки корня (ПЗ) в ответ на стресс, вызванный воздействием ионов алюминия. В условиях стресса экспрессия *yucca3/5/7/8/9* в ПЗ апекса корня возрастает, что приводит к накоплению ауксина в ПЗ апекса корня и увеличивает ингибирование роста корня в ответ на стрессовые воздействия, обусловленные ионами алюминия (Liu et al., 2016).

В реакции на стресс, индуцированный ионами алюминия, определенную роль играют и белки PIF4. Нарушение экспрессии PIF4 значительно ослабляет ингибирование роста корней, вызванное ионами алюминия, тогда как сверхэкспрессия PIF4 усиливает ингибирующее действие *Al*. PIF4 связывается непосредственно с промоторами *yucca5*, *yucca8* и *yucca9* *A. thaliana* для усиления локального биосинтеза ауксина в переходной зоне корень-апекс, когда растения сталкиваются со стрессом, вызванным ионами алюминия, демонстрируя тем самым еще один пример важной роли модуля PIF-YUCCA (Liu et al., 2016).

Таким образом, генетический модуль PIF-YUCCA отвечает за регулируемые ауксином изменения в морфологии растения в ответ на повышение температуры, затемнение и воздействие токсичных металлов (например, *Al*).

1.4 Эволюция ферментов пути ТАА/YUCCA биосинтеза ауксина

1.4.1 Происхождение и эволюция ТАА

В ходе филогенетического анализа последовательностей суперсемейства ТАА-подобных белков у покрытосеменных растений (рис. 7) было показано их разделение на два семейства: 1) семейство ТАА (включает белки ТАА1, ТАА1 и ТАА2 у *A. thaliana*) и 2) семейство аллииназ (белки ТАА3 и ТАА4 у *A. thaliana*) (Mano, Nemoto, 2012; Kim et al., 2013). Стоит отметить, что в данных работах филогенетический анализ основывался на сравнении белков лишь цветковых растений.

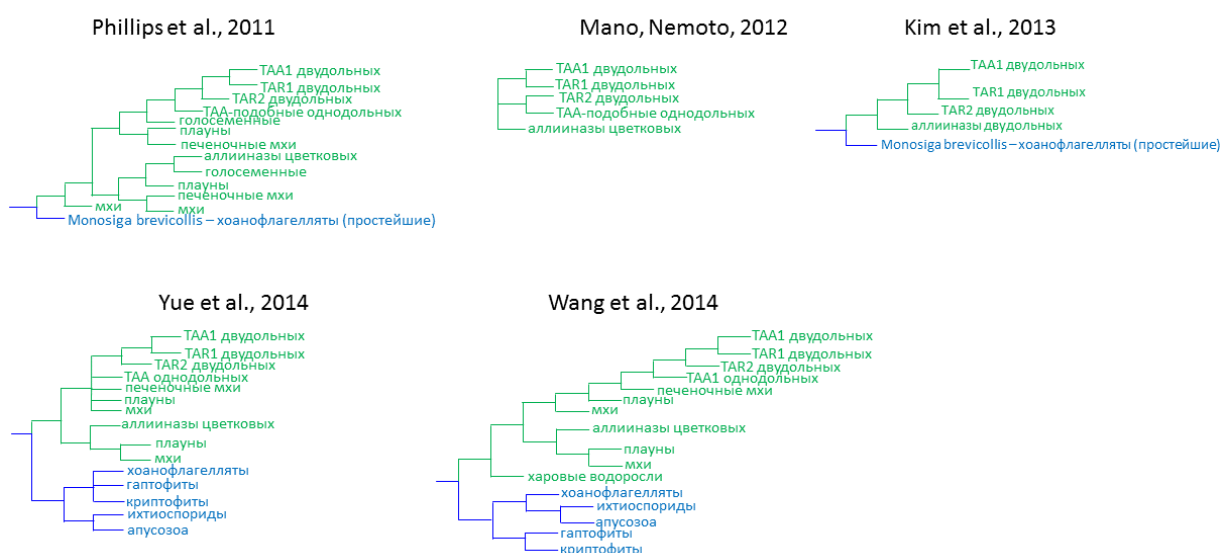


Рисунок 7. Кладогаммы филогенетических деревьев суперсемейства ТАА-подобных белков. Данные о филогении взяты из статей (см. в списке литературы). Зелёным цветом на кладогаммах обозначены последовательности и ветви зелёных растений. Синим цветом – простейших

Другие работы Филлипс с др. и Юэ с др. (Phillips et al., 2011; Yue et al., 2014), за счёт включения в анализ филогении дополнительно гомологов ТАА из нерастительных таксонов, позволили оценить возможное происхождения суперсемейства ТАА-подобных белков у растений (рис. 7). Установлено (Phillips et al., 2011; Yue et al., 2014), что гомологи ТАА1 *A. thaliana* есть только

у наземных растений и отсутствуют у водорослей. При этом ближайшими гомологами ТАА наземных растений у нерастительных организмов оказались белки простейших (гаптофиты, криптофиты, хоанофлагеллаты, ихтеоспориды и апусозои) (Phillips et al., 2011; Yue et al., 2014). На основе этих данных Юэ и др. предположили, что ТАА появились у наземных растений в результате горизонтального переноса (ГП) предкового гена этого семейства от организма нерастительного таксона к наиболее позднему общему предку (НПОП) наземных растений. При этом в работе Филлипса и др. не приведены значения бутстреп поддержки кластеров, соответствующих семействам ТАА и аллииназ, а филогенетическое дерево, построенное для гомологов ТАА Юэ и др. не позволяет разрешить порядок дивергенции (происхождение кластеров) (1) аллииназ, (2) ТАА-подобных белков и (3) группы гомологов ТАА у простейших. Тем не менее в этих двух работах аллииназы и ТАА высших растений представляют собой два разделившихся кластера последовательностей в согласии с работами Мано и Немото, Кима и др. (Mano, Nemoto, 2012; Kim et al., 2013).

Таким образом, на момент начала нашей работы одной из гипотез происхождения генов *taa* у наземных растений явилась гипотеза о ГП гомологичных *taa* генов от нерастительных таксонов к НПОП наземных растений.

Однако позже в результате анализа полной геномной последовательности Харофитовой водоросли *K. nitens* (другое название *K. flaccidum*), проведённого группой Ванга и др. (Wang et al., 2014), в ее геноме была обнаружена последовательность KnТАА (идентификатор в первой версии аннотации геномного проекта kfl00051_0080; позднее этой последовательности в банке данных NCBI был присвоен идентификатор GAQ80308.1), которая обладала сходством с последовательностью ТАА1 *A. thaliana*. Исходя из этого Ванг и др. предположили, что гомологи ТАА существовали у Харофитовых водорослей, которые, как предполагают, являются предками наземных растений (McCourt, 2004; Leliaert et al., 2012).

Согласно предположениям Ванга и др. (Wang et al., 2014) эти гены могли возникнуть у Харофитов в результате более раннего ГП к ним предкового, для семейства *taa*, гена от организма нерастительного таксона (бактерии, простейшие или грибы). Таким образом, согласно гипотезе Ванга и др. (Wang et al., 2014) наземные растения наследуют ген *taa* от Харофитов, что противоречит гипотезе Юэ и др. (Yue et al., 2014).

1.4.2 Происхождение и эволюция YUCCA

Филогенетический анализ последовательностей YUCCA цветковых растений (рис. 8) позволил выделить в них 4 группы: (1) YUCCA10-11; (2) YUCCA2, 6; (3) YUCCA3, 5, 7-8 и (4) YUCCA1, 4. Названия этих групп соответствуют установившимся названиям одиннадцати белков (генов) YUCCA *A. thaliana* (Cheng et al., 2006; Mano, Nemoto, 2012; Kim et al., 2013; Li et al., 2014). Каждая из 4-х групп включает либо белки цветковых (как однодольных, так и двудольных) либо только белки двудольных (Mano, Nemoto, 2012; Li et al., 2014).

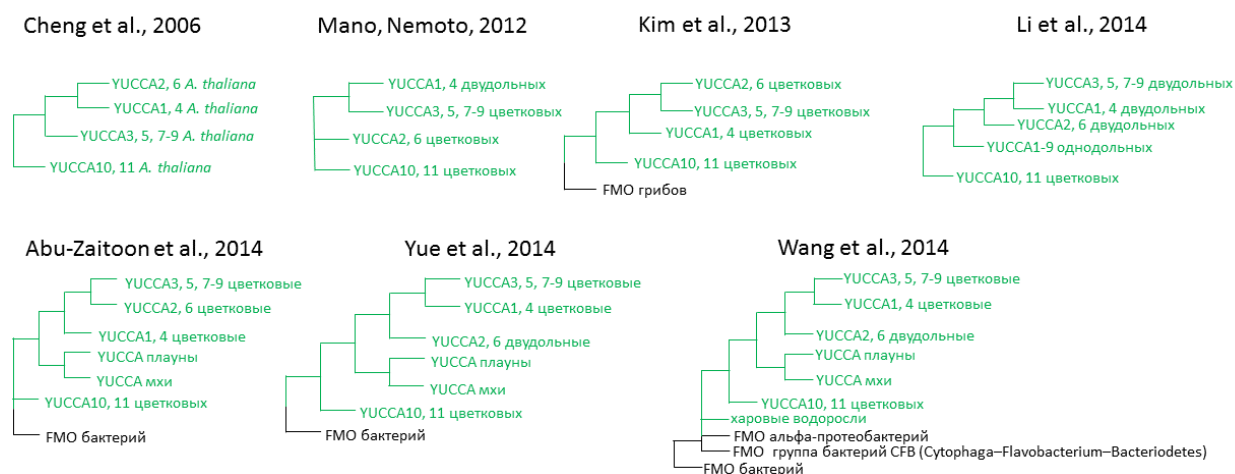


Рисунок 8. Кладогаммы филогенетических деревьев семейства YUCCA. Данные о филогении взяты из статей (см. в списке литературы). Зелёным цветом на кладогаммах обозначены последовательности и ветви Зелёных растений. Чёрным цветом – нерастительных организмов

В работах Абу-Зайтун и др. (Abu-Zaitoon et al., 2014) и Юэ и др. (Yue et al., 2014) для исследования филогении семейства *уисса* (рис. 8) в выборку генов покрытосеменных были включены и белки из геномов *Physcomitrella* (*P. patens* subsp *patens* версии 1.1) и *Selaginella* (*S. moellendorffii* v1.0), а также гомологи *уисса* обнаруженные в базе GenBank. В этих работах было установлено, что близкие гомологи для белков YUCCA (рис. 8) также, как и близкие гомологи для белков ТАА (рис. 7), обнаруживаются только у наземных растений, но отсутствуют у водорослей. Филогенетический анализ YUCCA, проведённый Абу-Зайтун и др. (Abu-Zaitoon et al., 2014), и Юэ и др. (Yue et al., 2014) (рис. 8), в отличие от предыдущих работ, включает также и нерастительные белки, что позволяет оценить возможное происхождение YUCCA у растений. Ближайшими гомологами по отношению к растительным белкам YUCCA на филогенетическом дереве оказались белки бактерий: альфа-протеобактерий, актинобактерий и Firmicutes (Yue et al., 2014). Авторы показали, что структура кластеров генов YUCCA семенных растений на полученном филогенетическом дереве согласуется с ранее полученными данными (Mano, Nemoto, 2012; Li et al., 2014).

Юэ и др., по результатам проведённой ими филогении, предположили, что белки YUCCA, аналогично белкам ТАА, появились в результате ГП гена *fmo* от бактерии к НПОП наземных растений.

Однако недостатком филогений YUCCA, реконструированной Абу-Зайтун и др. (Abu-Zaitoon et al., 2014), и Юэ и др. (Yue et al., 2014), является то, что во время проведения исследования ещё не были прочитаны последовательности такого важного для происхождения наземных растений таксона, как Харофитовые водоросли. В результате поиск, проведённый позже группой Ванг и др. (Wang et al., 2014) в геноме Харофиты *K. nitens*, выявил гомолог YUCCA – kfl00109_0340; NCBI: GAQ82387.1 (рис. 8). Исходя из этого факта Ванг и др. (Wang et al., 2014) предположили, что *уисса* у растений произошли в результате ГП предкового гена *fmo* от бактерии к Харофитовым

водорослям. Выявленное наличие гомологов и ТАА и YUCCA у *K. nitens* позволило авторам статьи сформулировать альтернативную гипотезу о появлении ПБА(ТАА/YUCCA) уже у Харофитовых водорослей, которые считаются предками наземных растений (McCourt, 2004; Leliaert et al., 2012). Таким образом, согласно гипотезе Ванга и др. (Wang et al., 2014) появление ПБА(ТАА/YUCCA) биосинтеза ауксина произошло ещё до выхода растений на сушу.

Ряд исследований показали способность водорослей (Chlorophyta) синтезировать ауксин (Basu et al., 2002; Le Bail et al., 2010; Mikami et al., 2016; Ohtaka et al., 2017; Labeeuw et al., 2016). При этом сравнение данных генома одноклеточных хлорофитов (зелёные водоросли, Chlorophyta) и высших растений (Streptophyta) показало, что первые несут несколько ортологов генов, участвующих в синтезе и транспорте ауксина (De Smet et al., 2011), но продемонстрировали низкую степень сходства для ортологов YUCCA (за исключением *Chlorella vulgaris*) и отсутствие у Зеленых водорослей ортологов ТАА (De Smet et al., 2011; Labeeuw et al., 2016). Данные сравнительного анализа предполагают, что у Зеленых водорослей (Chlorophyta) функционируют иные пути биосинтеза ауксина, чем ПБА(ТАА/YUCCA).

Кроме того, стоит отметить, что во многих из вышеперечисленных исследований использовались неаксенные (не очищенные от организмов симбионтов) культуры водорослей, то есть, остается неизвестным идет ли речь об ауксине, синтезируемом самой водорослью или ее бактериальными симбионтами (Evans, Trewavas, 1991; Fernandes et al., 2011; Bagwell et al., 2014; Dittami et al., 2014; Amin et al., 2015). Существует множество, порой противоречивых, сообщений о продукции ауксина или ауксиноподобных веществ у водорослей (Cooke et al., 2002; Le Bail et al., 2010), но были также высказаны опасения, что эти вещества могут продуцироваться микробами, ассоциированными с водорослями (Evans, Trewavas, 1991).

1.5 Дупликации генов и эволюция сложности живых организмов

Эволюция биологической сложности является одним из важных результатов процесса эволюции (Werner et al., 2015). Эволюция привела к появлению удивительно сложных организмов, хотя реальный уровень сложности очень трудно точно определить или измерить в биологии (Adami, 2002; Longo, Montevil, 2012). Интуитивно понятно, что при сравнении одноклеточных водорослей, многоклеточных водорослей и цветковых растений по сложности структурной организации последние являются наиболее сложными, а одноклеточные водоросли наименее сложными. Однако, определить меру сложности организмов, которая бы давала ее количественную оценку, оказалось довольно трудно.

Существует множество показательных изменений в анатомии и морфологии, но они не поддаются количественной оценке, вместо этого в последние годы в качестве показателя сложности организма в основном рассматривают количество типов клеток (Hedges et al., 2004; Cardoso, 2017).

Классификация клеток по типам основана на том, что клетки одного типа имеют сходную структуру и функции, которые отличаются от клеток других типов (Arendt, 2008; Zeng, 2022). Многоклеточный организм может содержать ряд широко различающихся и специализированных типов клеток, таких как мышечные клетки и клетки кожи, которые отличаются как по внешнему виду, так и по функциям, но имеют одинаковые геномные последовательности. У бактерий имеются клетки двух типов (вегетативные клетки и споры), у дрожжей – 3–4 типов, у водорослей и грибов – примерно 5 типов, у губок – 11, у кишечнополостных – 14–20, у растений – от 20 до 40, у кольчатых червей – примерно 55 типов клеток (Стегний, 2013). У млекопитающих определяется более 100 клеточных типов (Bell, Mooers, 1997). Так у человека выделяют около 400 клеточных типов (Hatton et al., 2023).

Однако, данные по количеству клеточных типов доступны для ограниченного количества видов, что ограничивает возможность использования

этого параметра в качестве количественного индекса сложности живых организмов.

Расшифровка геномов выявила, что: (I) Сложность прокариот в целом коррелирует с размерами геномов и числом генов. (II) Наблюдается рост размеров генома и числа генов при переходе от прокариот к эукариотам и от одноклеточных к многоклеточным. (III) Однако, у эукариот отсутствует связь между биологической сложностью, размером геномов и числом генов (Carroll, 2001; Taft, Mattick, 2003; Суслов и др., 2004; Колчанов и др., 2004). То есть размер генома и число генов не является показателем сложности, по крайней мере для эукариот.

Анализ геномных последовательностей прокариот, проведенный ван Нимвегеном (van Nimwegen, 2003) и Ранеа и др. (Ranea et al., 2004), показал, что количество генов в разных функциональных категориях зависит от общего числа генов по степенному закону. Для разных функциональных категорий экспонента степенного закона имеет разные значения. Высокие значения, ~ 2 , характерны для белков, участвующих в транскрипции и ее регуляции, а также для белков, участвующих в трансдукции сигналов. Низкие значения, $< 0,5$, характерны для белков, участвующих в биосинтезе белка, клеточном цикле и репликации ДНК (van Nimwegen, 2003). Другие функциональные группы генов имеют промежуточные значения.

Ван Нимвеген также получил несколько схожие результаты при анализе последовательностей геномов эукариот, доступных на момент выполнения его работы (van Nimwegen, 2003). Проведенное у эукариот сравнение предсказанных последовательностей белков одноклеточных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и многоклеточной нематоды *Caenorhabditis elegans*, показало, что у нематоды гораздо больше белков и типов белков, участвующих в транскрипции и ее регуляции, а также в трансдукции сигналов, чем у дрожжей (Chervitz et al., 1998). Впоследствии анализ белков с этими функциями у растений (Aravind, Subramanian, 1999), мухи *Drosophila melanogaster* (Rubin et al., 2000) и человека

(Lander et al., 2001) показал, что репертуар этих белков становится больше и разнообразнее по мере роста сложности организмов (Vogel, Chothia, 2006).

В работе Ланг и др. (Lang et al., 2010) было показано, что число клеточных типов, рассматриваемое как мера сложности организма, положительно и достоверно коррелирует с долей генов, кодирующих белки, ассоциированные с транскрипцией (БАТ), среди всех белок-кодирующих генов генома. Таким образом, при эволюционном росте сложности организмов растёт доля БАТ, включающих факторы транскрипции и другие транскрипционные регуляторы. Авторы статьи Ланг и др. (Lang et al., 2010) предполагают, что связь между числом клеточных типов, сложностью организма и числом БАТ объясняется тем, что регулируемая экспрессия генов необходима для определения морфологии, функциональных возможностей и судьбы развития как одиночных живых клеток, так и клеток, обитающих в социальной среде многоклеточного организма (Lang et al., 2010). Эволюционное развитие организмов во всех царствах жизни, по-видимому, тесно связано с эволюцией и расширением семейств генов БАТ (Hsia, McGinnis 2003; Levine, Tjian 2003; Gutierrez et al. 2004; Carroll, 2005).

Число генов-компонентов генных сетей в ходе эволюции увеличивается за счет дупликаций генов, с их последующей дивергенцией (Teichmann, Babu, 2004). Дупликации генов и геномов являются основным источником новых генов и новых функций и сыграли ключевую роль в эволюции геномной сложности и сложности организма (Ohno, 1970; Lynch, Conery, 2000).

Существует множество доказательств того, что многие, если не большинство, эукариотических геномов претерпели от одного до нескольких крупномасштабных событий полногеномных дупликаций (ПД, whole-genome duplication – WGD) в их эволюционной истории (например, Paterson et al. 2006; Edger and Pires 2009; Van de Peer et al. 2009; Glombik et al., 2020).

Дупликации генов у живых организмов происходят относительно часто. У бактерий, червя *C. elegans*, дрозофилы, человека скорость спонтанных дупликаций генов 10^{-7} до 10^{-3} на ген/на поколение (Anderson, Roth, 1981; Lipinski et al., 2011; Watanabe et al., 2009; Turner et al., 2008). Скорость

дупликаций генов у растений, по-видимому, выше, так как в их эволюции нередки ПД, а также гибридизации геномов разных растений. Так, только в эволюции покрытосеменных растений ПД происходила несколько раз за последние 200 миллионов лет (Lyons et al., 2008; Soltis et al., 2009; Lee et al., 2013; Renny-Byfield, Wendel, 2014).

Дуплицированные гены избыточны, вследствие чего один из пары генов может накапливать вредные мутации быстрее, в результате чего он либо теряется при естественном отборе, либо может приобрести новую функцию. В последнем случае в эволюции будут сохраняться оба гена, продукты которых выполняют разные функции (Ohno, 1970; Kleinjan et al., 2008; Rastogi, Liberles, 2005; Conrad, Antonarakis, 2007).

Какие гены сохраняются после такого события, по-видимому, имеет решающее значение, для баланса доз генов особенно среди членов сигнальных и регуляторных сетей. БАТ принадлежат к функциональному классу генов, который, как было установлено, преимущественно сохраняются (в двойной дозе) после дупликации в большинстве исследований, посвященных крупномасштабным и другим событиям "сбалансированных дупликаций" (Edger and Pires 2009; Родионов, 2023). Этот вывод часто обсуждался как свидетельство важности событий дупликации генома для наблюдаемого увеличения морфологической сложности в линиях животных и растений (Freeling and Thomas, 2006). У растений, благодаря вышеупомянутому более высокому уровню сохранения БАТ после событий дупликации (Lespinet et al. 2002; Shiu et al. 2005), вклад БАТ в общее число генов более выражен, чем у других эукариот (Riano-Pachon et al. 2008).

1.6 Заключение по обзору литературы

Ауксин – это небольшая молекула, но она является ключевым регулятором роста, деления и дифференцировки клеток растений и, соответственно, роста и развития растения. Также ауксин важен для реакций

растения на изменения в окружающей среде. Эффекты влияния ауксина на рост и дифференцировку тканей зависят от минимумов и максимумов его концентрации, которые формируются в различных органах и тканях растения и на разных временных стадиях его развития. Концентрация свободного ауксина определяется взаимодействием процессов его синтеза и транспорта, накоплением его неактивных форм, его деградацией, а также его регуляцией рецепторами ответа на стресс. В связи с чем вокруг молекулы ауксина в результате большого количества обратных связей между этими процессами сформировалась сложная система. За время поиска и исследования путей биосинтеза ауксина (более 60-ти лет), начиная с открытия, того, что ауксин вырабатывается в листьях шпината из триптофана (Wildnan et al., 1947), накоплено большое количество данных по этому вопросу. Следует также иметь ввиду, что различные аспекты биосинтеза ауксина исследованы на различных уровнях детализации в зависимости от вида растений. Так, лучше всего исследован биосинтез ауксина у модельного объекта двудольных растений *A. thaliana* (Zhao et al. 2001; Stepanova et al., 2008; Cheng et al., 2006, 2007, 2014). В меньшей степени этот процесс исследован у ряда других цветковых растений: риса (*O. sativa*), кукурузы (*Z. mays*), картофеля (*S. tuberosum*), томата (*S. lycopersicum*) (Kriechbaumer et al., 2006; Yamamoto et al., 2007; Exposito-Rodriguez et al., 2011; Abu-Zaitoon, 2012; Bernardi et al., 2012; Kim et al., 2013). До недавнего времени о том, как проходит синтез ауксина в остальных классах растений, имелись либо скудные данные, либо их, для некоторых классов, вообще не было.

Как было описано выше, в разделах по эволюции генов *taa/yusca*, на момент начала наших исследований существовало две гипотезы происхождения ПБА у наземных растений. Первую гипотезу сформулировали Юэ и др. (Yue et al., 2014). Они предположили на основе своего анализа, что как гены *taa*, так и *yusca* произошли у НПОП наземных растений в результате ГПГ от организма из нерастительных таксонов (бактерий, простейших или грибов).

Альтернативную гипотезу предложили Ванг и др., обнаружившие гомологи ТАА/YUCCA у Харофитовых водорослей (Wang et al., 2014). Эта гипотеза заключалась в том, что наземные растения унаследовали ПБА(ТАА/YUCCA) в результате вертикальной эволюции от своих предков, Харофитовых водорослей.

Следует отметить, что на момент исследований Юэ и др. (2014) информация о полных геномах была известна только для небольшого числа видов растений, и данные о последовательностях были получены ими из банка данных NCBI. Тот факт, что полностью секвенированный геном *K. nitens* позволил поставить под сомнение гипотезу Юэ и др. (Wang et al., 2014) показывает, как важно использовать в таких задачах как можно более полные наборы секвенированных последовательностей самых различных видов.

С развитием технологий секвенирования информация о геномных и белковых последовательностях растений растет быстрыми темпами. В 2014 году были представлен первый вариант данных в проекте 1000 растительных геномов (Matasci et al., 2014). В 2019 году был представлен его окончательный вариант (<https://sites.google.com/a/ualberta.ca/onekp/>) (Leebens-Mack, 2019). Также, Green Algal Tree of Life project предоставляет массовое секвенирование транскрибуемых транскриптомных последовательностей Зеленых водорослей (https://figshare.com/articles/Green_algal_transcriptomes_for_phylogenetics_and_comparative_genomics/1604778) (Cooper, Delwiche, 2016). Это позволяет использовать огромные массивы данных для решения задачи о происхождении ПБА у наземных растений.

Целью данной работы было исследование происхождения и эволюции ПБА у растений на основе детальной реконструкции филогении различными методами, а также использования структурной информации о белках ТАА и YUCCA с дополнительным использованием широкого массива данных из проектов по массовому секвенированию транскриптомов растений. На первом этапе нашего исследования мы провели филогенетический анализ ферментов ПБТ, продукт которого триптофан является субстратом для синтеза ауксина в

ПБА(ТАА/YUCCA). На втором и третьем этапах, соответственно, был проведён комплексный сравнительный анализ филогении, консервативных сайтов и доменов семейств белков ТАА и YUCCA. На четвёртом этапе был проведён анализ распространённости белков пути биосинтеза триптофана (ПБТ), ТАА и YUCCA в таксонах растений, и количественный анализ уровня дубликации их генов у растений разных таксонов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Формирование выборок белковых и транслируемых транскриптомных последовательностей

2.1.1 Выборки последовательностей белков ферментов пути биосинтеза триптофана

Для формирования выборок белков ферментов ПБТ (ASA, ASB, PAT, PAI, IGPS, TSB, TSA) и фермента TAA (рис. 3) был проведен поиск гомологов для указанных выше ферментов для каждого их паралога у *A. thaliana* с помощью программы Blastp из пакета BLAST (Camacho et al. 2008) (параметры поиска были взяты по умолчанию с порогом E-value $1e^{-10}$) в базах данных NCBI nr и Plaza 2.5 (Van Bel et al., 2012). Полученные для каждого паралога гомологи объединялись в общую для этого фермента выборку.

Последовательности полученных выборок выравнивались программой MAFFT (Katoh, Toh, 2008), доступной на сайте samem (<http://pixie.bionet.nsc.ru/samem/>), используя матрицу BLOSUM62 (остальные параметры взяты по умолчанию). Визуализация выравниваний проводилась с помощью программы Bioedit 7.0.9.0 (Hall, 1999). Из выравнивания удалялись последовательности, которые плохо выравнивались в районе консервативных доменов белков либо содержали крупные делеции ≥ 30 а.о. либо делеции/вставки, нарушающие важные функциональные сайты белков. После такой отбраковки последовательностей выравнивания строились заново. По полученным в результате этого выравниваниям реконструировались филогенетические деревья методом FASTTREE (Price et al., 2009). На них мы, по положению на дереве белков с хорошо известными функциями, определяли, какие кластеры относятся к ортологам искомого фермента, а какие к ферментам с иной, отличной функцией. Последовательности кластеров на деревьях, отнесенные нами к отличным от анализируемых ферментам, удалялись из выборок. В результате были получены итоговые выборки гомологов ферментов, использованные нами для дальнейшего

анализа. Такой предварительный анализ позволил исключить последовательности с неподходящей для нашего исследования функцией из дальнейшего анализа.

2.1.2 Выборки белковых последовательностей фермента ТАА

Аналогичный вышеописанному предварительный анализ и селекцию последовательностей мы провели и для белков семейства ТАА. Поиск гомологов ТАА1 (AT1G70560.1) *A. thaliana* проводился с помощью программы BLASTP (Camacho et al. 2008) в базе данных Plaza 2.5 (Van Bel et al., 2012), NCBI GenBank (Benson et al., 2013), на портале генома Объединенного института генома (JGI) (<http://genome.jgi.doe.gov/>) с параметрами как указано выше (в пункте 2.1.1) и в геноме *Klebsormidium nitens* NIES-2285 V1.0 (Hori et al., 2014). Следует отметить, что на момент начала нашей работы для генома *K. nitens* была доступна версия аннотации 1.0. Согласно этой аннотации, гомолог генов ТАА в геноме, КнТАА, имел идентификатор kfl00051_0080. Позднее была опубликована версия аннотации генома 1.1, которая была депонирована в базу данных NCBI. В этой версии КнТАА имеет идентификатор GAQ80308.1. Последовательность GAQ80308.1 была скорректирована и содержит, в отличие от kfl00051_0080 лишь один ТАА- подобный домен. Ниже будет описан анализ последовательности kfl00051_0080, представлявшего белок КнТАА в первой версии аннотации генома.

Последовательности выравнивались, для них реконструировалась предварительное филогенетическое дерево и проходила фильтрация белков по функции как описано выше. В результате была получена итоговая выборка белковых последовательностей ТАА-подобных белков, которая использовалась в дальнейшем анализе.

2.1.3 Выборки белковых и транслируемых транскриптомных последовательностей фермента YUCCA

Для анализа белков YUCCA/FMO были сформированы две выборки последовательностей флавин-содержащих монооксигеназ класса В. Флавин-содержащие монооксигены класса G использовались для этих выборок в качестве внешней группы.

Первая выборка флавин-содержащих монооксигеназ класса В (class_B_FMO_proteins), включающая только последовательности белков, формировалась из нескольких подвыборок: 1-6 подвыборки в табл. 1.

Таблица 1. Таксоны ближайших к растительным белкам ПБТ не растительных белков ПБТ на филогенетических деревьях

выборки	целевая последовательность	базы данных, в которых проведен поиск гомологов	программа поиска	E-value
выборка белков YUCCA				
1-я подвыборка	YUCCA2 AT4G13260.1 A. <i>thaliana</i>	БД Plaza 2.5	BLASTP	1e ⁻¹⁰
2-я подвыборка	-//-	геномный проект Picea abies	BLASTP	1e ⁻¹⁰
3-я подвыборка	-//-	БД NCBI	BLASTP	1e ⁻¹⁰
4-я подвыборка	GAQ82387.1 K. <i>nitens</i>	БД NCBI	BLASTP	1e ⁻⁷⁰
5-я подвыборка	последовательности FMO-A — FMO-G из <i>R. jostii</i> RHA1 и FMO-X из <i>S. maltophilia</i> (Riebel et al., 2013)			
6-я подвыборка	последовательности KDE39435.1 <i>Nitrincola lacisaponensis</i> , OHZ38954.1 <i>Agrobacterium vitis</i> , OSX95564.1 <i>Bacillus mycoides</i> , CUV18971.1 <i>Ralstonia solanacearum</i> , Q5W9R9.1 <i>Pseudomonas sp.*</i> из БД NCBI			
выборка транскриптов YUCCA и GAQ82387.1				
7-я подвыборка	YUCCA2 AT4G13260.1 A. <i>thaliana</i>	БД 1000 plant genomes (Leebens-Mack, 2019) и Green Algae (Cooper, Delwiche, 2016)	BLASTP	1e ⁻⁵⁰
8-я подвыборка	GAQ82387.1 K. <i>nitens</i>	-//-	BLASTP	1e ⁻⁷⁰

* - эти пять последовательностей взяты в выборку в качестве внешней группы

Далее эти шесть подвыборок были объединены в одну выборку флавино-содержащих монооксигеназ В класса. Полученная выборка выравнивалась программой Mafft (Katoh, Toh, 2008), доступной на сайте samem (<http://pixie.bionet.nsc.ru/samem/>), используя матрицу BLOSUM62, с

остальными параметрами по умолчанию. Из выравнивания удалялись последовательности, которые плохо выравнивались в районе домена CzcO (ACCOG2072): либо они несли крупные делеции ≥ 30 а.о. в этом домене либо делеции/вставки, нарушающие важные функциональные сайты белков. Домен CzcO в белках флавин-содержащих монооксигеназ В класса (class В flavoprotein monooxygenases) расположен в центре последовательностей белков FMO/YUCCA и занимает большую их часть (из базы данных CDD; Jiya et al., 2023). В результате такой процедуры выбраковки из исходной выборки было удалено менее 2-х % последовательностей. Затем строилось филогенетическое дерево с помощью программы RAxML. После чего мы прореживали кластеры филогенетического дерева, удаляя из выборки избыточные последовательности. Так в кластерах YUCCA растительных FMO1, FMO2 были оставлены только белки следующих видов: в качестве представителей настоящих мхов - *Physcomitrella patens*, плаунов - *Selaginella moellendorffii*, хвойных – *Picea abies*, однодольных – *O. sativa ssp. indica*, двудольных – *A. thaliana*. В случае, когда в кластере, как это наблюдается для кластера растительных белков FMO2, отсутствуют белки *O. sativa ssp. Indica* /или *A. thaliana*, вместо них, в качестве представителей однодольных и двудольных, были оставлены, соответственно, белки *Z. mays* либо *Sorghum bicolor* у однодольных и белки *Ricinus communis* либо *Theobroma cacao* у двудольных. В остальных кластерах дерева число белков сокращалось за счёт удаления сходных, избыточных последовательностей, например, ортологов у родственных видов. Полученная в результате выборка перевыравнивалась и снова строилось филогенетическое дерево. В итоге была получена выборка class_B_FMO_proteins, которая использовалась в данной работе.

Следует отметить, что при формировании указанной выборки мы опирались на качественно секвенированные последовательности из баз данных NCBI или последовательности полногеномных проектов с хорошей аннотацией, представленные в БД PLAZA 2.5 (Van Bel et al., 2012), которые наилучшим образом подходят для наиболее точного филогенетического

анализа. Однако, так как полное секвенирование геномов представляет сложную задачу, на момент выполнения работы полные геномы были представлены лишь для нескольких десятков организмов, преимущественно покрытосеменных. Для некоторых таксонов полногеномные данные отсутствовали либо таксон был представлен лишь одним видом с полностью секвенированным геномом (папоротники, мхи, печеночные мхи и др.).

Таким образом, таксономическое разнообразие полногеномных проектов и БД NCBI/PLAZA не позволяло провести адекватный филогенетический анализ семейства YUCCA для широкого круга таксонов (включая одноклеточные водоросли, Харофитовые водоросли, плауны и пр.). Поэтому мы сформировали вторую выборку последовательностей, в которую включили данные проекта 1000 геномов растений (Leebens-Mack, 2019) и проекта Green Algae (Cooper, Delwiche, 2016). Эти данные представляют собой сборки транскрибируемых транскриптомных последовательностей из более чем 1000 видов растений (1124 вида в проекте «1000 геномов растений» и 31 вид зелёных водорослей в проекте «Green Algae») из самых разнообразных таксонов растений. Отметим, однако, что эти данные не представляют полного набора кодируемых в организме белков, но лишь тех, которые экспрессировались в ограниченном наборе тканей/органов, использованных для формирования этих баз данных. Тем не менее, широта представленности разнообразных таксонов делают эти данные очень полезными для филогенетического анализа.

Вторая выборка флавинов-содержащих монооксигеназ класса В, названная нами `class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic` включала белковые последовательности выборки `class_B_FMO_proteins` и дополнительно транслированные последовательности из транскриптомов, полученных в результате выполнения проектов 1000 геномов растений (Leebens-Mack, 2019) и Green algae (Cooper, Delwiche, 2016). Выборка `class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic` формировалась следующим образом. К белковым последовательностям выборки `class_B_FMO_proteins`

были добавлены две подвыборки последовательностей из транскриптомных проектов: 7 и 8 подвыборки в табл. 1.

Далее, как уже упоминалось, две вышеописанные подвыборки транслируемых транскриптомных последовательностей объединялись с последовательностями из выборки `class_B_FMO_proteins`. Затем проводилась выбраковка «плохих» последовательностей, тем же способом, что описан выше для выборки `class_B_FMO_proteins`. Далее, также, как это описано выше, для выборки `class_B_FMO_proteins`, проводилась выбраковка последовательностей иных близкородственных ферментов. Полученная выборка ещё раз выравнивалась программой MAFFT и по полученному выравниванию программой FASTTREE строилось филогенетическое дерево. После чего из этой выборки были удалены транслируемые транскриптомные последовательности однодольных и двудольных растений, принадлежащих к кластеру YUCCA, чтобы уменьшить избыточность последовательностей в этом кластере дерева, так как последовательности YUCCA однодольных и двудольных достаточно хорошо представлены белковыми последовательностями из геномных проектов, взятыми из выборки `class_B_FMO_proteins`. В итоге была получена выборка `class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic`, которая тоже использовалась в данной работе.

2.2 Множественное выравнивание последовательностей

Для полученных в результате предварительного отбора последовательностей белковых семейств множественное выравнивание проводилось с помощью программы Promals - PROfile Multiple Alignment with predicted Local Structure (<http://prodata.swmed.edu/promals/promals.php>) (Pei, Grishin, 2007), используя матрицу Blossum62 и другие параметры взятые по умолчанию.

2.3 Филогенетический анализ

Филогенетический анализ семейств ферментов ПБТ проводился с использованием метода максимального правдоподобия, реализованного в программе IQ-TREE версия 1.6.12 (Nguyen et al., 2015). Для белков ASA определена модель эволюции LG+F+R9, для – ASB – LG+R10, для PAT – LG+R6, PAI – LG+R5, IGPS – LG+I+G4, TSA – LG+R5, TSB – LG+R10. Статистическая поддержка узлов дерева проводилась методом ультрабыстрого бутстрепа. Проводилось 1000 итераций бутстрепа.

Филогенетический анализ суперсемейства ТАА-подобных белков проводился Байесовским методом: программа PhyloBayes 3.3f (Lartillot et al., 2009) (модель со смешанными профилями (CAT) использовалась с учетом того факта, что различные сайты белка находятся под разным эволюционным давлением; параметры: -dgam 6 -cat -nchain 2 30 0.1 100). Множественное выравнивание последовательностей белков, соответствующих остаткам 710-1144 транслированного KnTAA (kfl00051_0080), учитывающее данные о вторичной структуре белка, было проведено с помощью программы PROMALS (Pei, Grishin, 2007). Дополнительно использовали метод максимального правдоподобия (программа IQ-TREE, модель эволюции JTT+I+G4).

Филогенетический анализ семейства FMO/YUCCA проводился с использованием метода максимального правдоподобия (ML), реализованного в программах: IQ-TREE версия 1.6.12 (Nguyen et al., 2015), модель эволюции для дерева, построенного только на белковых последовательностях – LG+F+R6, для дерева, построенного на белковых и транслированных транскриптомных последовательностях – LG + F + R7 (статистическая поддержка узлов дерева – методом ультрабыстрого бутстрепа; проводилось 1000 итераций бутстрепа) и RAxML версия 8.1.4 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis, 2014) – модель эволюции PROTGAMMALGF. Дополнительно использовали программу mrBayes версия

3.2.5 (Huelsенbeck, Ronquist, 2001) – модель эволюции WAG (12 цепей по трем независимым участкам были проанализированы в течении 1 000 000 итераций, отбор деревьев проводился через каждые 100 итераций).

Для визуализации филогенетических деревьев использовалась программа Archaeopterix (версия 0.9917) (Han, Zmasek, 2009).

2.4 Реконструкция 3D структуры белков

Реконструкция 3D структур белка KпТАА (kfl00051_0080) *K. nitens* была проведена Гунбиным Константином Владимировичем с помощью программы i-TASSER. (Roy et al., 2010).

2.5 Анализ доменов и консервативных сайтов белковых последовательностей

Для идентификации предполагаемых доменов в белковых последовательностях, мы использовали инструмент CD-search доступный на веб-сайте NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer, Bryant, 2004). Дополнительно мы использовали программу hhblits инструмент из пакета HH-site3 package (Steinegger et al., 2019) для поиска гомологов с известными консервативными белковыми доменами, содержащимися в базе данных Pfam (Finn et al., 2014). Для поиска белковых доменов в выровненных последовательностях семейства FMO типа Пб применялась программа hhsearch (Steinegger et al., 2019).

Консенсусы консервативных сайтов у белков FMO были определены и визуализированы с помощью программы WebLogo версия 2.8.2 (Crooks et al., 2004).

Для поиска гомологов с помощью PHI-BLAST (Zhang et al., 1998) программы, учитывающей при поиске не только гомологию последовательностей, но, также, обязательное наличие в них заданных

пользователем мотивов сайтов, был задан порог распознавания $E\text{-value} = 1e^{-10}$. В качестве поисковых запросов были взяты следующие репрезентативные белковые последовательности со следующими заданными консенсусами их FMO мотивов: (1) для группы FMO типа IIb – бактериальный белок FMO NCBI:WP_019017022.1 из бактерии *Halomonas lutea* с консенсусом FMO мотива FxGxxxHxxxH; (2) для FMO-подобных белков (для растительных и бактериальных белков этой группы проводилось два отдельных поиска) – растительный белок FMO БД Plaza:PT09G14380 / NCBI:XP_002312911.2 из двудольного растения *Populus trichocarpa* и бактериальный белок FMO NCBI:WP_054213635.1 из бактерии *Actinobacteria bacterium* OK074 с консенсусом FMO мотива FxGxxxHxxxY/F; (3) для BVMO – бактериальный белок FMO NCBI:WP_012854150.1 из *Bartonella henselae* с консенсусом FMO мотива FxGxxxHxxxW. Данный поиск проводился среди прокариот и эукариот в базе данных NCBI.

2.6 Оценка взаимосвязи количества гомологов ферментов ПБТ и сложности организмов растений

Для данного анализа были взяты последовательности ферментов ПБТ *A. thaliana*: анранилат синтазы α (ASA, идентификаторы TAIR (Lamesch, 2012): AT5G05730, AT2G29690); анранилат синтазы β (ASB: AT1G25220, AT5G57890); фосфорибозил анранилат-трансферазы (PAT(TRP): AT5G17990); фосфорибозил-анранилат-изомеразы (PAI: AT1G07780, AT5G05590, AT1G29410); индол-3-глицерол фосфат синтазы (IGPS: AT2G04400, AT5G48220); триптофан синтазы α (TSA: AT4G02610, AT3G54640) и триптофан синтазы β (TSB: AT5G54810, AT4G27070). С помощью программы BLASTP 2.2.29+ ($E\text{-value} < 10^{-40}$) проведен поиск гомологов этих ферментов в 24-х полностью секвенированных геномах растений из базы данных Plaza 2.5 (Van Bel, 2012): 5-ти геномов зелёных водорослей, 1-го – мха, 1-го – плауна, 4-х – однодольных и 13-ти –

двудольных. Для каждого фермента проводился реципрокный поиск. То есть мы провели поиск гомологов, для всех паралогов каждого фермента ПБТ из *A. thaliana* среди последовательностей 24-х геномов растений. Затем результаты поисков для всех гомологов фермента ПБТ объединялись, в результате чего мы получили выборки для каждого фермента ПБТ.

Множественное выравнивание последовательностей в полученных выборках проводилось с помощью программы Mafft 7.110 (Kato, Toh, 2008). Проверялись наличие и целостность в последовательностях ключевых консервативных доменов, информация о которых была взята из базы данных CDD версии 3.10 (Ji, et al., 2023). Последовательности со значительными нарушениями доменов удалялись из выборки. Если среди полногеномных данных гомологи какого-либо фермента не обнаруживались, мы проводили дополнительный поиск среди последовательностей EST из баз данных GenBank и Ensemble.

Известно, что в процессе эволюции усложнение организма связано с увеличением сложности регуляторной компоненты его генома (Колчанов и др., 2004). Поэтому для оценки сложности организмов мы использовали параметр $F_{\text{БАТ}}$ - отношение количества генов белков, ассоциированных с транскрипцией (БАТ) к общему числу генов, кодирующих белки в геноме. $F_{\text{БАТ}}$ может быть точно оценен на основе полногеномных данных и хорошо коррелирует с такой широко известной характеристикой сложности организмов, как число клеточных типов (Lang et al., 2010). Данные по количеству генов БАТ растений вышеуказанных таксонов и по $F_{\text{БАТ}}$ взяты из статьи (Lang et al., 2010). Для оценки значимости взаимосвязи между числом гомологов и $F_{\text{БАТ}}$ геномов растений мы использовали коэффициент корреляции Пирсона.

Корреляционный анализ взаимосвязи количества белков ферментов ПБТ с индексом $F_{\text{БАТ}}$ был проведен (в разделе 5.2) с помощью программы Statistica 8.0.

ГЛАВА 3. ЭВОЛЮЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА ТРИПТОФАНА

3.1 Результаты и обсуждение

Биосинтез ауксина у растений включает два последовательных пути: биосинтез триптофана из хоризмата (ПБТ) и биосинтез ауксина из триптофана (ПБА(ТАА/YUCCA)) (рис. 3). Данная глава посвящена изучению молекулярной эволюции ферментов пути биосинтеза триптофана из хоризмата (ПБТ). Мы построили филогенетические деревья для семи семейств белков ферментов биосинтеза триптофана из хоризмата методом максимального правдоподобия, реализованного в программе IQ-TREE (Nguyen et al., 2015). Результаты представлены на рисунках 9 – 15 и будут описаны ниже.

Белки антранилат синтаз α (ASA) присутствуют у всех исследованных растений (у красных, зелёных водорослей и наземных растений). Ближайшими нерастительными белками к растительным белкам ASA оказались белки цианобактерий. У однодольных ASA дивергировали на две группы, соответствующих ASA-A и ASA-B на филогении, и у двудольных – ASA также дивергировали на две группы ASA1 и ASA2 (рис. 9).



Рисунок 9. Филогенетическое дерево гомологов белка ASA. Филогенетическое дерево реконструировано методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). Цвета ветвей филогенетического дерева соответствуют таксономической принадлежности вида: зелёный – зелёные растения, красный – красные водоросли, коричневый – грибы, голубой – простейшие, фиолетовый – цианобактерии, чёрный – остальные бактерии. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Белки антранилат синтаз β (ASB) (рис. 10) присутствуют у всех исследованных растений: красных, зелёных водорослей и наземных растений. Ближайшими нерастительными белками к ним оказались также, как и в случае ASA, белки цианобактерий. В процессе эволюции этих белков не наблюдается дупликаций генов *asb* на уровне дивергенции крупных таксонов растений (наземных растений, двудольных/однодольных). Дупликации этих генов наблюдаются только на уровне отдельных видов и демонстрируют большое разнообразие по количеству копий генов: у *A. thaliana* гены *asb* представлены в 6 копиях, у *A. lyrata* в двух, у *Glycine max* в одной и т.д.

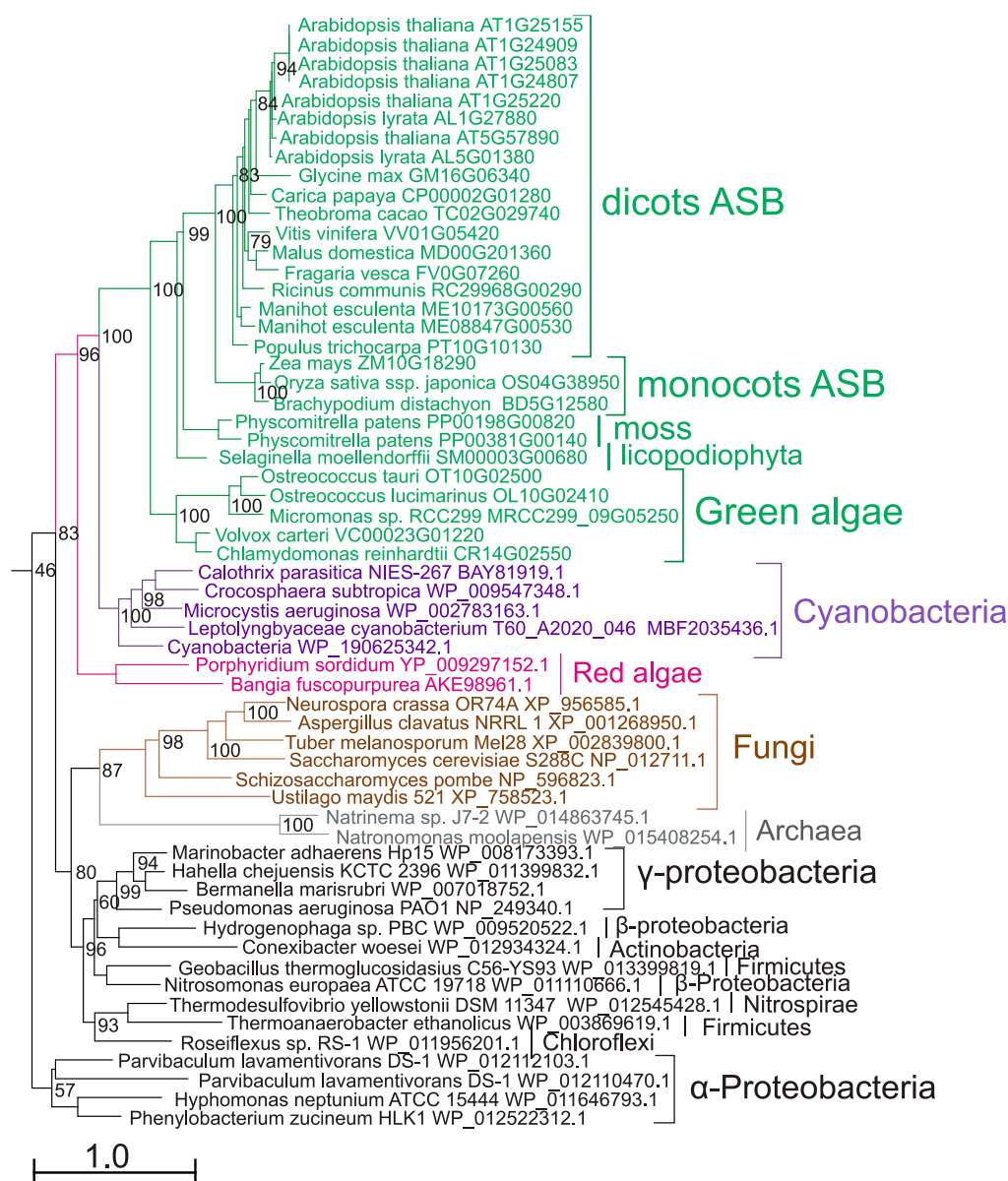


Рисунок 10. Филогенетическое дерево гомологов белка ASB. Филогенетическое дерево реконструировано методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). Цвета ветвей филогенетического дерева соответствуют таксономической принадлежности вида: зелёный – зелёные растения, красный – красные водоросли, коричневый – грибы, фиолетовый – цианобактерии, чёрный – остальные бактерии, серый – археи. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Белки фосфорибозил антранилат-трансферазы (PAT) (рис. 11) присутствуют у красных, зелёных водорослей и у наземных растений во всех исследованных видах. Ближайшими не растительными белками к ним оказались белки гаптофита (простейшие) *Emiliania huxleyi* и Актинобактерий. Как и в случае генов *asb*, не наблюдается дупликаций этих генов на уровне дивергенции

крупных таксонов растений (наземных растений, двудольных/однодольных). Для большинства видов гены *pat* представлены одной копией, за редким исключением (например, у *Vitis vinifera* 2 копии гена *pat*).

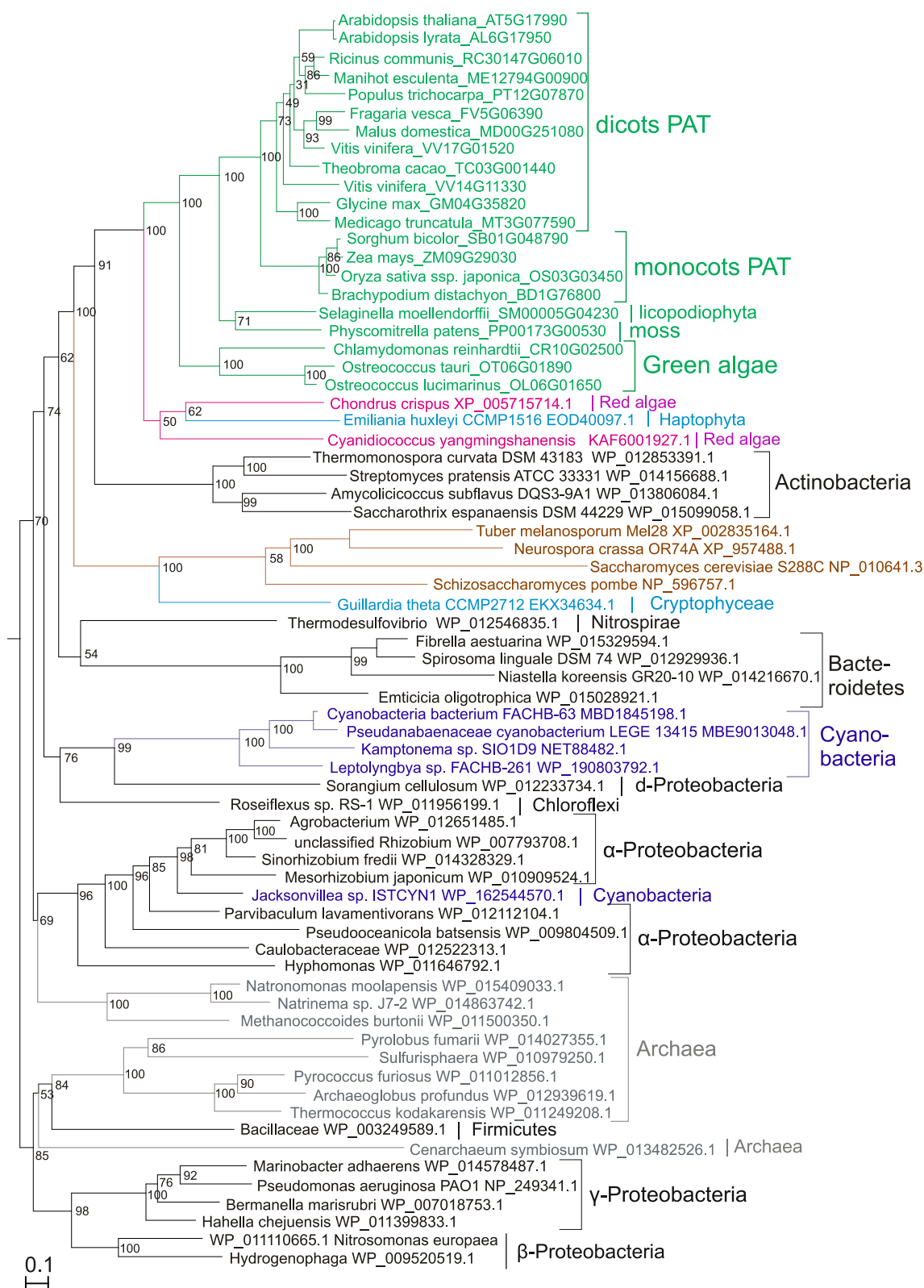


Рисунок 11. Филогенетическое дерево гомологов белка PAT (TRP). Филогенетическое дерево реконструировано методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). Цвета ветвей филогенетического дерева соответствуют таксономической принадлежности вида: зелёный – зелёные растения, красный – красные водоросли, фиолетовый – цианобактерии, коричневый – грибы, голубой – простейшие, чёрный – бактерии, серый – археи. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Белки фосфорибозил-антранилат-изомераз (РАI) (рис. 12) присутствуют у красных, зелёных водорослей и у наземных растений во всех исследованных видах. Ближайшими к белкам РАI растений оказались белки простейших и грибов. В свою очередь, ближайшими к белкам РАI растений бактериальными белками оказались белки класса *Chloroflexi* и порядка *Актинобактерий*. Семейство РАI включает дупликацию на две группы у однодольных растений – РАI-А и РАI-В. Для отдельных видов двудольных также наблюдаются дупликации этих генов (например, 3 копий у *A. thaliana*).

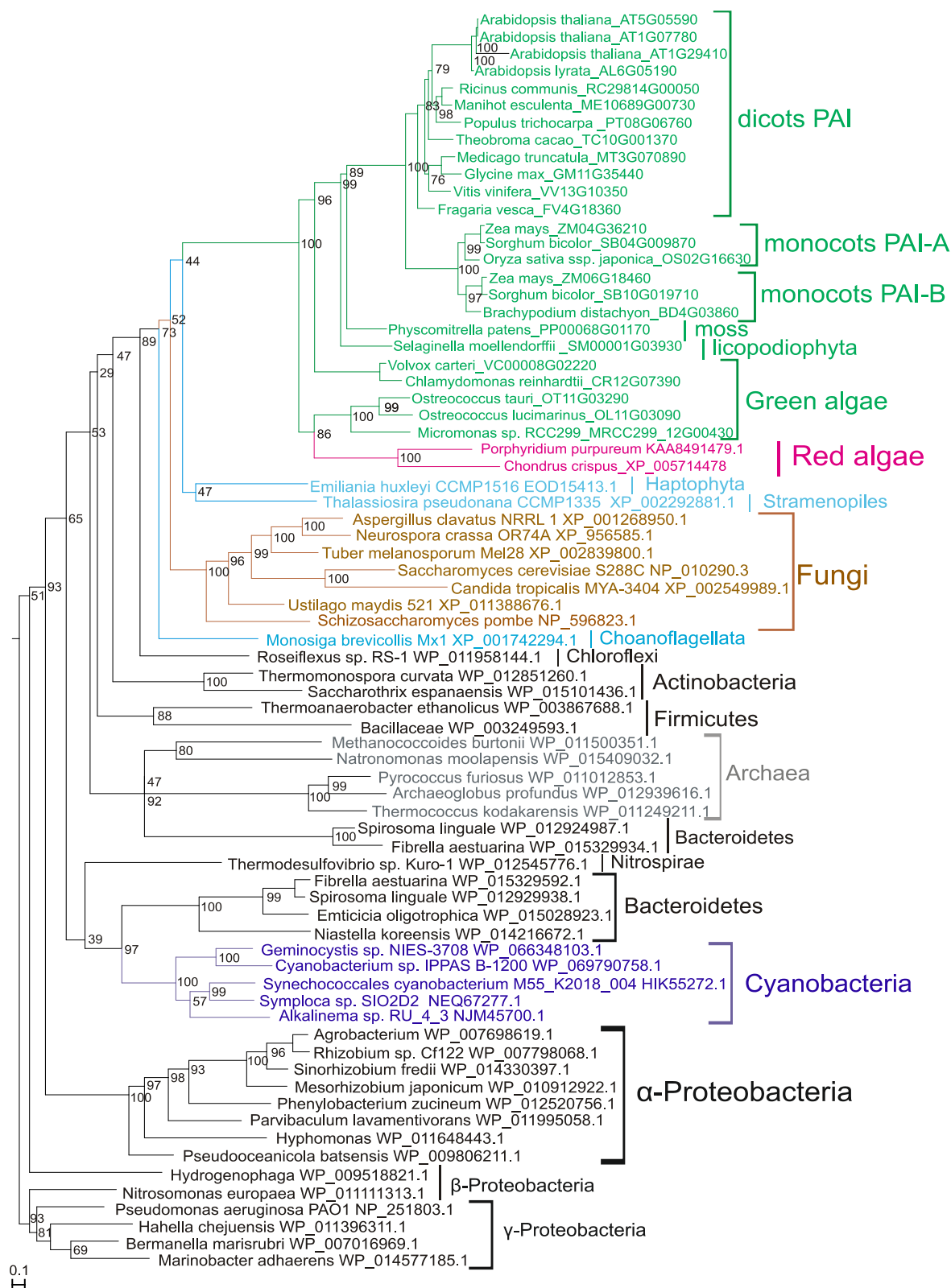


Рисунок 12. Филогенетическое дерево гомологов белка PAI из растительных и нерастительных таксонов. Филогенетическое дерево реконструировано методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). Цвета ветвей филогенетического дерева соответствуют таксономической принадлежности вида: зелёный – зелёные растения, красный – красные водоросли, фиолетовый – цианобактерии, коричневый – грибы, голубой – простейшие, чёрный – бактерии, серый – археи. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Белки индол-3-глицерол фосфат синтаз (IGPS) (рис. 13) присутствуют у красных, зелёных водорослей и у наземных растений во всех исследованных видах. Ближайшими нерастительными белками к ним оказались белки цианобактерий. На этапе дивергенции двудольных растений белки IGPS дивергировали на три кластера названных нами IGPS-A, IGPS-B и IGPS-C. Как и в случае семейства PAI для отдельных видов двудольных также наблюдаются дубликации генов IGPS (до 2-х копий).

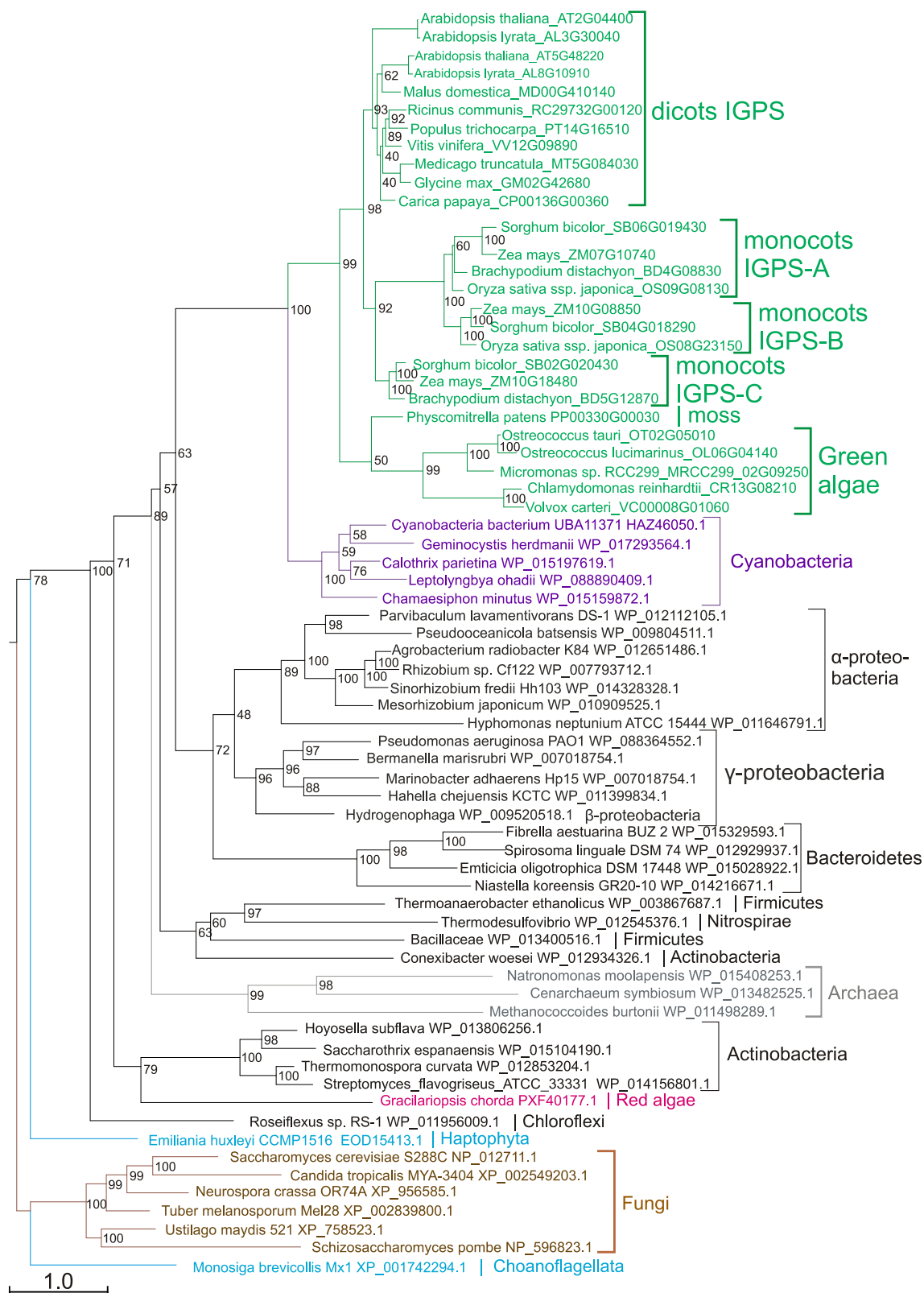


Рисунок 13. Филогенетическое дерево гомологов белка IGPS. Филогенетическое дерево реконструировано методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). Цвета ветвей филогенетического дерева соответствуют таксономической принадлежности вида: зелёный – зелёные растения, красный – красные водоросли, фиолетовый – цианобактерии, коричневый – грибы, голубой – простейшие, чёрный – бактерии, серый – археи. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Белки триптофан синтаз α (TSA) (рис. 14) присутствуют у красных, зелёных водорослей и у наземных растений во всех исследованных видах. Ближайшими нерастительными белками к ним оказались белки цианобактерий. У однодольных TSA дивергировали на три кластера, соответствующих TSA-A, TSA-B и TSA-C, и у двудольных – также на два кластера TSA1 и TSA2.

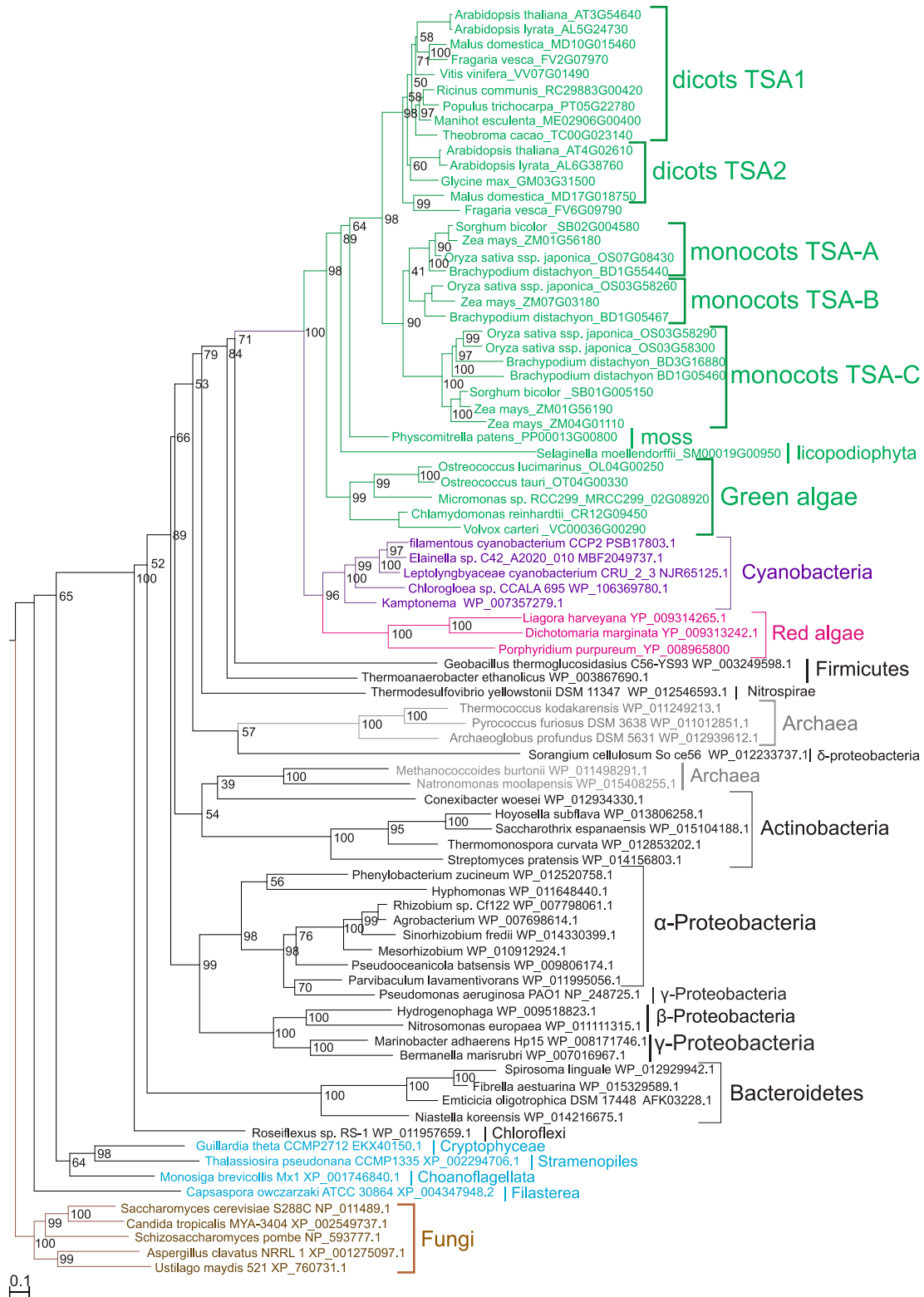


Рисунок 14. Филогенетическое дерево гомологов белка TSA. Филогенетическое дерево реконструировано методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). Цвета ветвей филогенетического дерева соответствуют таксономической принадлежности вида: зелёный – зелёные растения, фиолетовый – цианобактерии, красный – красные водоросли, коричневый – грибы, голубой – простейшие, чёрный – бактерии, серый – археи. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Белки триптофан синтаз β (TSB) (рис. 15) присутствуют у красных, зелёных водорослей и у наземных растений во всех исследованных видах. Ближайшими нерастительными белками к ним оказались белки цианобактерий. У двудольных TSB дивергировали на две группы, соответствующие TSB1 и TSB2. Внутри каждой из этих групп для отдельных видов двудольных также наблюдаются дубликации этих генов (до 2-х копий).

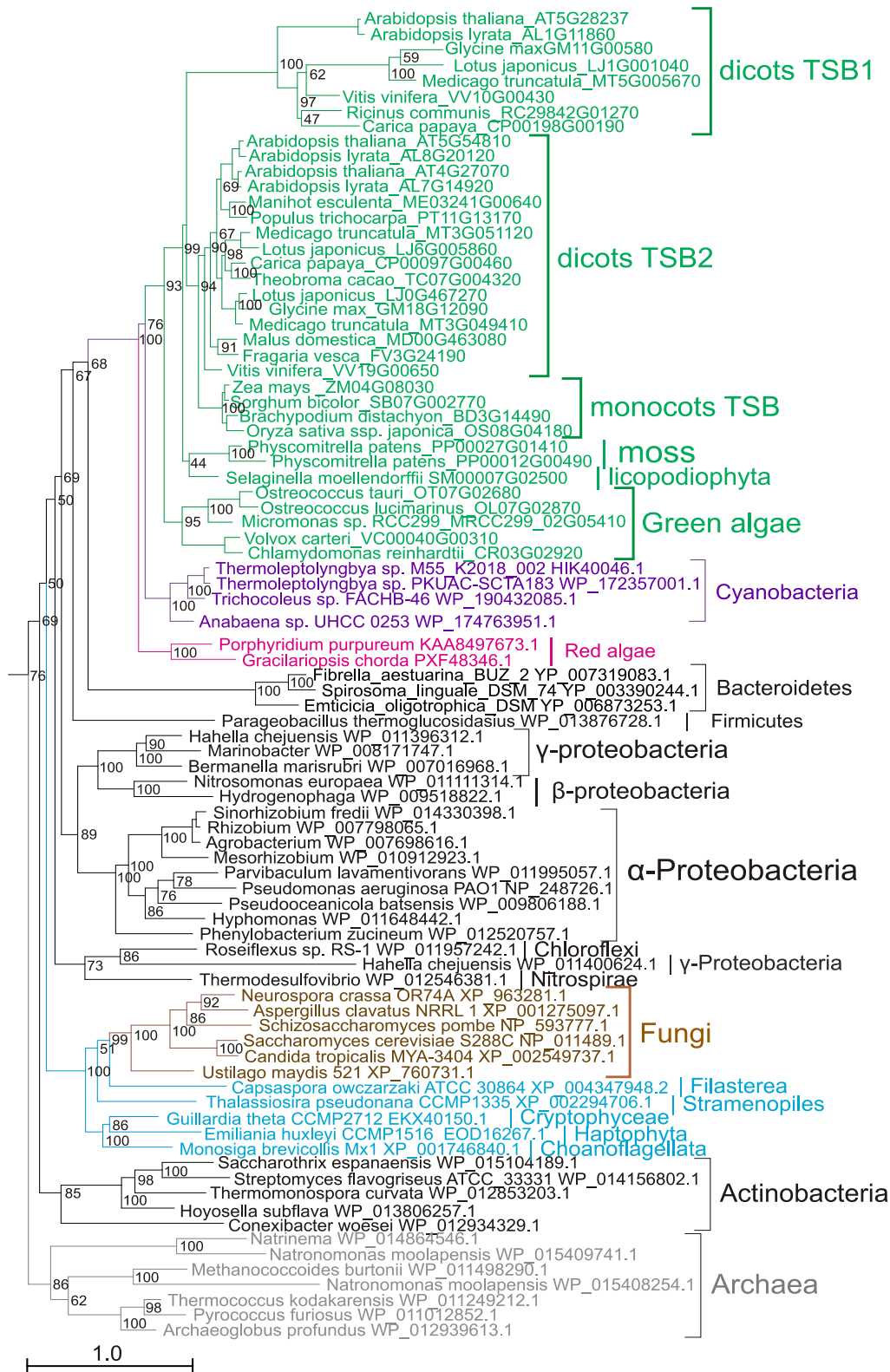


Рисунок 15. Филогенетическое дерево гомологов белка TSB. Филогенетическое дерево реконструировано методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). Цвета ветвей филогенетического дерева соответствуют таксономической принадлежности вида:

зелёный – зелёные растения, фиолетовый – цианобактерии, красный – красные водоросли, коричневый – грибы, голубой – простейшие, чёрный – бактерии, серый – археи. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Реконструкция филогенетических деревьев ферментов ПБТ показала, что эти ферменты присутствуют как у красных и зелёных водорослей, так и у наземных растений. Следовательно, белки семейств ПБТ произошли у современных наземных растений в результате вертикальной эволюции от генов зелёных водорослей. Для большинства семейств наблюдается их разделение на группы (клады), в таксонах однодольных либо двудольных. При этом для некоторых ферментов дубликации генов у общего предка видов таксона наблюдаются лишь для одного из этих крупных таксонов.

В таблице 2 представлены результаты идентификации нерастительных таксонов, от генов которых предположительно, произошли ферменты ПБТ растений, полученные в работе Юэ и др. (Yue et al., 2014) и в нашей работе.

Таблица 2. Таксоны ближайших к растительным белкам ПБТ нерастительных белков ПБТ на филогенетических деревьях (рис. 9-15)

ферменты ПБТ	данные Yue et al.	наши данные
ASA	Плактомицеты	Цианобактерии
ASB	Цианобактерии/Глаукофита/Простейшие	Цианобактерии
PAT	Хламидии	Простейшие/Актинобактерии
PAI	Хламидии/G-протеобактерии	Простейшие
IGPS	Цианобактерии	Цианобактерии
TSA	Цианобактерии	Цианобактерии
TSB	Цианобактерии	Цианобактерии

Наш анализ показал, что белки всех семейств ПБТ широко представлены у исследованных нами растительных таксонов. Наиболее близкими нерастительными белками к белкам ПБТ растений в семействах ASA, ASB, IGPS, TSA и TSB оказались белки цианобактерий (рис. 9, 10, 13, 14, 15, соответственно); в семействе PAT – белки актинобактерий и простейших (гаптофита *E. Huxleyi* CCMP1516) (рис. 11) и в семействе PAI – белки

простейших (гаптофита: *E. Huxleyi* CCMP1516, страменопила: *Thalassiosira pseudonana* CCMP1335) (рис. 12).

Это предполагает, что, по крайней мере, белки ASA, ASB, IGPS, TSA и TSB могли появиться в ходе эволюции у общих предков зелёных и красных водорослей от цианобактерий. Этот вывод частично согласуется с выводом авторов Юэ и др. (табл. 2) о том, что, хотя происхождение ряда ферментов ПБТ нельзя определенно установить из-за слабого филогенетического сигнала, белки растений IGPS, TSA и TSB (как и в нашем исследовании) вероятно происходят от цианобактерий, а растительный РАТ произошли от Хламидий (в нашем исследовании от Актинобактерий). Однако результаты нашего исследования предполагают, что белки растений ASA и ASB также происходят от цианобактерий, хотя исследования Юэ и др. (Yue et al., 2014) указывают на происхождение семейства ASA от бактерий плактомицет, а происхождение ASB в их исследовании по дереву точно не определяется (таб. 1). Таким образом, по нашим данным, наиболее часто встречающимися предковыми организмами ферментов ПБТ растений являются цианобактерии.

Полученные результаты могут быть связаны с предполагаемым происхождением растительных организмов в результате поглощения фотосинтезирующих цианобактерий, являющихся фотосинтезирующими прокариотами, не фотосинтезирующими одноклеточными эукариотами (Moore et al., 2019; Demoulin et al., 2019; Howe et al., 2008). В последствии эти симбиотические цианобактерии, по-видимому, стали хлоропластами растений. Далее геном хлоропластов, наряду с другими органеллами, стал источником для притока новых генов в ядерный геном растений за счёт эндосимбиотического генного переноса (из органелл в ядро) (Moore et al., 2019; Demoulin et al., 2019; Howe et al. 2008). Таким образом, предполагаемое Юэ и др. (Yue et al., 2014) для IGPS, TSA и TSB растений, а также, дополнительно, нами для ASA и ASB растений, происхождение от цианобактерий хорошо согласуется с современными научными представлениями.

Как было отмечено выше, дубликации исследуемых ферментов синтеза триптофана на паралоги в ходе эволюции, во всех случаях происходили совместно с образованием (дивергенцией) крупных таксонов организмов либо после (но не до) их образования. В результате чего дивергенция генов ферментов ПБТ на паралоги происходит только внутри крупных таксонов, то есть каждый крупный таксон имеет свой уникальный для него набор паралогов фермента. Так, субъединица ASA, фермента ASA/ASB, представлена одним геном у исследованных водорослей и плауна (рис. 9). В то же время уже после образования таксонов моховидных, однодольных и двудольных в каждом из них произошли три независимые дубликации гена ASA: у мхов дубликация на два паралога PP00077G00840 и PP00077G00420; у однодольных дубликация на два паралога ASA-A и ASA-B; и у двудольных дубликация на два паралога ASA1 и ASA2 (рис. 9). Тогда как, в геномах видов, принадлежащих другим таксонам, семейство ASA представлено только одним геном, как это хорошо видно для видов зелёных водорослей (рис. 9).

Количество гомологов (паралогов) ферментов ПБТ оказалось в основном небольшим: 1, 2, 3 копии генов фермента. Хотя в отдельных случаях их число доходит до 6-ти копий, как у гена *asb* *A. thaliana*. В то же время фермент PAT во всех исследованных видах как красных и зелёных водорослей, так и наземных растений представлен только одной копией гена *pat*.

Паралоги — это гомологичные гены, произошедшие в результате дубликации гена определённого организма и имеющие отличные друг от друга функции. Гены с близкой гомологией в геноме одного вида не обязательно являются паралогами. Растения в их эволюции прошли ряд полно-геномных дубликаций (ПД) (Glombik et al., 2020). Также у растений возможны гибридизации геномов в результате гибридизации видов, причем не только близко-, но и дальнородственных (Glombik et al., 2020). Поэтому на вопрос, являются ли гены с близкой гомологией в геноме организма паралогами или нет, часто нельзя дать однозначного ответа. В связи с чем дальше по тексту мы будем использовать термин паралоги с осторожностью. И, когда речь идёт о

количественном анализе уровня дупликаций генов, мы будем называть копии генов – гомологами.

3.2 Заключение по главе 3

Анализ филогении белков ферментов ПБТ показал, что эти ферменты присутствуют у красных, зелёных водорослей, и наземных растений. Следовательно, белки семейств ПБТ произошли у современных наземных растений в результате вертикальной эволюции от предковых генов зелёных водорослей. В нашем исследовании наиболее близкими к белкам ферментов растений в 5 из 7 семейств ПБТ – ASA, ASB, IGPS, TSA и TSB – оказались белки цианобактерий. Это поддерживает гипотезу Юэ и др. (Yue et al., 2014) о происхождении ферментов ПБТ у растений от цианобактерий, хотя в их исследовании это было показано только для 3-х из 7-ми ферментов ПБТ (IGPS, TSA и TSB), в нашем исследовании это было показано уже для 5-ти из 7-ми ферментов ПБТ (ASA, ASB, IGPS, TSA и TSB).

ГЛАВА 4. ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ ТАА/УУССА БИОСИНТЕЗА АУКСИНА У НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ

4.1 Происхождение ферментов суперсемейства ТАА-подобных белков у наземных растений

4.1.1 Сравнительный анализ последовательностей ТАА-подобных белков из *Klebsormidium nitens* и *Arabidopsis thaliana*.

Для того чтобы уточнить происхождение ТАА у растений мы провели детальный анализ структуры последовательности КнТАА *K. nitens* (Hori et al., 2014) в сравнении с белками семейства ТАА наземных растений (рис. 16).

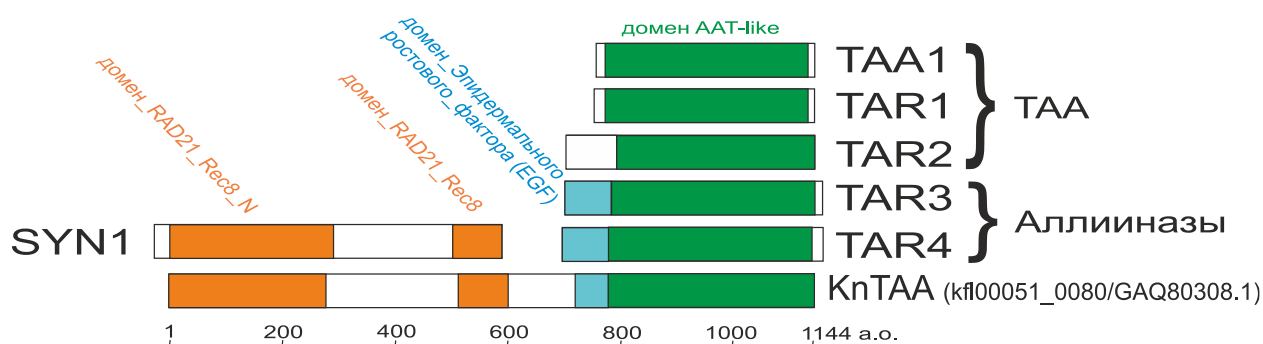


Рисунок 16. Доменный состав последовательности КнТАА *K. nitens* по сравнению с белками, связанными с триптофан-аминотрансферазой (ТАА), и RAD21-подобным белком SYN1 из *A. thaliana*. Цветными прямоугольниками обозначены консервативные домены белковых последовательностей; белые прямоугольники соответствуют районам неконсервативных последовательностей; шкала позиций аминокислотных остатков (а.о.) в последовательности КнТАА находится внизу рисунка

Длина КнТАА, в соответствии с текущей аннотацией генома *K. nitens* (v1.0, kfl00051_0080), составляет 3432 нуклеотида (нт), что дает транслированную последовательность из 1144 аминокислотных остатков (а.о.). Это более чем в два раза превышает длину последовательностей ТАА наземных растений (350–520 а.о.) (рис. 16 – белки ТАА1, ТАА1, ТАА2). Проведённый с помощью BLASTP (Camacho et al. 2008) анализ белок-кодирующей последовательности КнТАА в сравнении с аминокислотными

последовательностями ТАА из *A. thaliana* (Van Bel et al. 2012) показал значительное сходство С-концевого района этого белка (остатки 710–1144, рис. 16) с родственными ферментами ТАА белков (TAA1, TAR1, TAR2) (уровень сходства E-value $<9e^{-66}$, матрица BLOSUM62) и с аллииназами (TAR3, TAR4) (уровень сходства E-value $<1e^{-76}$, матрица BLOSUM62). При этом N-конец последовательности KnTAA (остатки 1–654) аналогичен Rad21/Rec8-подобному белку *A. thaliana* (NP_850773.1, уровень сходства E-value $<2e^{-37}$) и Rad21/Rec8-подобному белку *S. moellendorffii* (XP_002974692, уровень сходства E-value $<1e^{-49}$) (рис. 16). Rad21/Rec8-подобный белок у *A. thaliana* является мейотическим когезином и участвует в обеспечении сцепления плеч хромосом и поддержания сцепления центромер во время поздних стадий мейоза I (Cai et al. 2003).

Таким образом, последовательность KnTAA представляет собой слияние когезин-подобных (Rad21/Rec8) и ферментативных (ТАА-подобных) доменов (рис. 16). Интересно, что мы не наблюдали такой комбинации доменов в геномных последовательностях других растений из базы данных Plaza 2.5 (Van Bel et al., 2012) или в транскриптомах Харофитов (Ju et al., 2015).

Аномальная длина последовательности белка KnTAA (kfl00051_0080) *K. nitens* и наличие у него дополнительных когезин-подобных доменов вызывает сомнение в способности этого белка превращать триптофан в индол-3-пировиноградную кислоту (ИПК) (основная функция белков ТАА). Возможно, такая комбинация доменов могла быть следствием недостаточно качественной аннотации генома (слияние двух ОРС разных генов).

Также, проведённый нами анализ показал, что С-концевая часть транслированной последовательности KnTAA содержит небольшой участок (остатки 715–765), который имеет сходство с доменом эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor, EGF), представленный в последовательностях аллииназ цветковых растений (Stepanova et al., 2008), но отсутствующий в последовательностях белков семейства ТАА (TAA1, TAR1,

TAR2). EGF домен выделен голубым цветом на схемах последовательностей аллииназ TAR3, TAR4 и последовательности KnTAA (рис. 16).

4.1.2 Анализ 3D структур и филогении TAA-подобных белков.

Также мы провели реконструкцию пространственной структуры С-терминального фрагмента (гомологичного TAA) белка KnTAA *K. nitens* и сравнили ее с известными пространственными структурами TAA1 *A. thaliana* и Аллииназы *Allium sativum*. Трёхмерная белковая структура С-концевого фрагмента транслированной последовательности KnTAA (остатки 710-1144) была предсказана, используя программное обеспечение I-TASSER (Roy et al., 2010). Расчёт трёхмерной структуры был произведён Гунбиным К.В. Сравнение белковых структур показало, что модель последовательности KnTAA имела более высокое структурное сходство с аллииназой чеснока *Allium sativum* [Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>) ID 1LK9: A; EC 4.4.1.4] среднеквадратичное отклонение Ca (RMSD) 0.55 Å, выровнено 412 остатков. Сходство модели с с триптофан аминотрансферазой TAA1 *A. thaliana* [PDB ID 3BWN: A; EC 2.6.1.27, 2.6.1.99] было выражено в меньшей степени: среднеквадратичное отклонение Ca RMSD 1.79 Å, выровнено 355 остатков.

Кроме того, чтобы уточнить происхождение генов TAA у наземных растений, мы исследовали филогенетические отношения между всеми гомологами TAA, доступными в полностью секвенированных геномах в Plaza 2.5 (Van Bel et al., 2012), NCBI GenBank (Benson et al., 2013) и на портале генома Объединенного института генома (JGI) (<http://genome.jgi.doe.gov/>). Поиск гомологов С-концевого фрагмента транслированной последовательности KnTAA (kfl00051_0080, остатки 710-1144), проведенный с помощью программы BLASTP, выявил значительное сходство с ним (значение E-value $<1e^{-6}$) только последовательностей наземных растений и простейших (что согласуется с данными Юэ и др. (Yue et al., 2014)).

На основании полученной выборки последовательностей ТАА нами были построены филогенетические деревья ТАА (метод максимального правдоподобия – рис. 17; Байесовский метод– Приложение: рисунок П1).



Рисунок 17. Филогенетическое дерево семейства ТАА, реконструированное методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). Зелёным цветом ветвей обозначены белки растений и коричневым белки простейших. Шкала расстояний показана вверху рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Реконструированное этими методами филогенетические деревья (рис. 17; Приложение: рисунок П1) демонстрирует два хорошо обособленных кластера. Первый кластер, включает триптофан-аминотрансферазы (белки ТАА) наземных растений, в частности, три белка *A. thaliana*: ТАА1 (AT1g70560) и, родственные белку ТАА1 белки TAR1 (ТАА-related1; AT1g23320) и TAR2 (ТАА-related2; AT4g24670). Участие этих трёх белков в основном ПБА было показано экспериментально (Mashiguchi et al. 2011; Stepanova et al., 2008). Второй кластер включает аллииназы, среди которых два белка *A. thaliana*: TAR3 (ТАА-related3; At1g34040) и TAR4 (ТАА-related4; At1g34060). Функции аллииназ остаются неясными (Stepanova et al., 2008). Отличительной чертой аллииназ из аллииназного кластера (TAR3, TAR4) является наличие у них на N-конце домена Эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor (EGF)) (позиции 32-89 в белке TAR4 *A. thaliana*) (рис. 16), отсутствующего у белков кластера ТАА: ТАА1, TAR1, TAR2 (рис. 16).

Характер эволюции семейства ТАА у наземных растений (рисунок 17, Приложение: рисунок П1) сходен с таковым для белков ферментов ПБТ: АСА, АСВ, РАТ, РАІ, ІGPS, TSA и TSB (рис. 9 – 15). Т.е. дубликации генов *taa* происходят либо совместно с дивергенцией растений на крупные таксоны (уровня не ниже класса), либо после неё, но не до образования крупных таксонов растений. В результате чего каждый из крупных таксонов имеет свой уникальный для данного таксона набор паралогов ТАА. Так, в результате дубликации предкового гена у НПОП однодольных образовалось два, характерных для всех 4-х исследованных видов однодольных, паралога ТАА, представленные, например, у *O. sativa* генами *os05g07720* и *os01g07500* (рис. 17). Также у двудольных в результате дубликации их предкового гена *taa* образовалось 2 паралога, которые представлены у *A. thaliana*: первый паралог представлен генами *taal/tar1* (*taal*:AT1g70560 и *tar1*:AT1g23320 у *A. thaliana*) и второй паралог – геном *tar2* (AT4g24670 у *A. thaliana*). Кроме того, из значимых для эволюции семейства ТАА-подобных белков событий стоит отметить дубликацию у крестоцветных, возможно у предка рода Резуховидка,

предкового гена *taal/tar2* на два паралога, которые имеют виды, этого рода, представленные, например, у *A. thaliana* генами: *taal(at1g70560)* и *tar2(at1g23320)*. Последняя дупликация произошла, соответственно, после образования таксона двудольных. В результате, образование паралогов ТАА1-подобных генов происходит независимо во всех крупных таксонах. В свою очередь кластер аллииназ (*tar3:at1g34040 A. thaliana*, *tar4:at1g34060 A. thaliana*) представляет собой единое семейство, которое в ряде видов представлено только одной копией гена (у всех исследованных видов однодольных и у двудольных: *V. vinifera*, *Carica papaya*, *F. vesca*, *Malus domestica*). При этом дупликации генов в семействе аллииназ наблюдаются лишь для отдельных видов и семейств растений (например, наличие двух ортологов: TAR3 и TAR4 в роде Резуховидка) (рис. 17; Приложение: рисунок П1).

На филогенетических деревьях ТАА наиболее близкими к растительным белкам оказались белки простейших. При этом не было обнаружено близких к ТАА гомологов ни у зелёных водорослей, ни у бактерий.

В результате, последовательность КпТАА из *K. nitens* по нашим данным расположена ближе ко второму кластеру – кластеру аллииназ (рис. 16; рис. 17; Приложение: рисунок П1). Т.е. последовательность КпТАА более близка к аллииназам, чем к ТАА, что согласуется с вышеизложенными данными по сравнению трёхмерной структуры КпТАА *K. nitens* и других ТАА-подобных белков (ТАА и аллииназ) принадлежащих *A. thaliana*. Это предполагает, что функция КпТАА более близка к аллииназам, чем к ТАА наземных растений. Фермент ТАА (ЕС 2.6.1.99) катализирует первую реакцию в ПБА(ТАА, YUCCA): L-tryptophan + pyruvate \rightleftharpoons indole-3-pyruvate (ИПК) + L-alanine (Tao et al., 2008). Тогда как об аллииназах (ЕС 4.4.1.4) известно только то, что они катализируют реакцию преобразования небелковой аминокислоты алиина в алицин у ченока (*Allium sativum*) и лука (*Allium*). Алицин отвечает за запах и вкус этих растений и, по-видимому, обеспечивает их защиту от поедания травоядными животными, а также за их бактерицидные свойства (Weiner et al.,

2009). Роль аллииназ у других растений, как уже упоминалось выше, не установлена (Stepanova et al., 2008).

Таким образом, наши исследования 3D структур белков и филогении показывают, что белок КпТАА на основании наших данных следует отнести к аллииназам. Это предполагает, что белок КпТАА *K. nitens* может иметь иную функцию, чем функция ТАА наземных растений и, таким образом, его участие в биосинтезе ауксина: в реакции первой реакции ПБА(ТАА/YUCCA), превращение триптофана в ИПК, маловероятно.

4.2 Анализ эволюции белков семейства YUCCA

4.2.1 Эволюция белков суперсемейства флавин-содержащих

монооксигеназ В класса

4.2.1.1 Филогения белков суперсемейства флавин-содержащих

монооксигеназ В класса

Для того чтобы уточнить эволюционное происхождение белков семейства YUCCA мы провели филогенетический анализ белков В класса суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ, к которому относится, в том числе, и семейство YUCCA. Для это мы провели филогенетический анализ на основе двух типов данных (см раздел 2.1.3 Выборки белковых и транскрибуемых транскриптомных последовательностей фермента YUCCA): (1) выборка последовательностей class_B_FMO_proteins, полученных с помощью поиска по гомологии в базе данных последовательностей белков NCBI nr и БД Plaza 2.5 (последовательности, полученные в результате качественного секвенирования, однако при достаточно узкой представленности таксонов растений); (2) выборка class_B_FMO_proteins расширенная за счет добавления к ней последовательностей из проектов широкомасштабного секвенирования последовательностей геномов и транскриптомов растений 1000 plant genomes (1Kp) (Leebens-Mack, 2019) и Green algae (Cooper, Delwiche, 2016) (эти базы данных получены в результате

секвенирования NGS, но содержащиеся в них последовательности гораздо более широко представлены в таксонах растений, свыше 1000 видов) данная выборка обозначена как `class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic`.

С использованием первой из этих выборок мы также проводили анализ структуры (доменный состав) и функций (активные сайты) для белков семейства YUCCA.

Поиск гомологов белков YUCCA для формирования выборки (1) выполняли с помощью программы BLASTP (Camacho et al. 2008) с порогом распознавания $E\text{-value} = 1e^{-5}$ среди аминокислотных последовательностей базы данных NCBI (см. Материалы и методы). В выборку, в дополнение к распознанным гомологам YUCCA, были также включены белки из статьи Рибель и др. (Riebel et al., 2013): семь аминокислотных последовательностей генов от *fmo-a* до *fmo-g* из бактерии *Rhodococcus jostii* RHA1 и аминокислотная последовательность гена *fmo-x* бактерии *Stenotrophomonas maltophilia*. Эти белки были использованы для уточнения филогенетических отношений гомологов YUCCA и, в частности, подгруппы FMO II типа, предложенной ранее Рибель и др. (Riebel et al., 2013).

Для последовательностей белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса (выборка последовательностей `class_B_FMO_proteins`) было построено филогенетическое дерево методом максимального правдоподобия с помощью программы IQ-TREE (рис. 18). В качестве внешней группы к белкам суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса были взяты белки G класса из того же суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ.

На филогенетическом дереве, реконструированном методом IQ-TREE (рис. 18), мы выделили три подкласса белков из суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса:

1) FMO (включает 5 групп белков: YUCCA – голубой фон; YUC-подобные FMO – темно-зеленый фон; цианобактериальные FMO – серый фон;

ФМО II типа – бледно-желтый, розовый и ярко-желтый фон и ФМО I типа – бледно-зеленый фон);

2) NMO – оранжевый фон;

3) BVMO – сиреневый фон.

Внешняя группа на дереве – белки суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ G класса – выделена синим цветом фона.

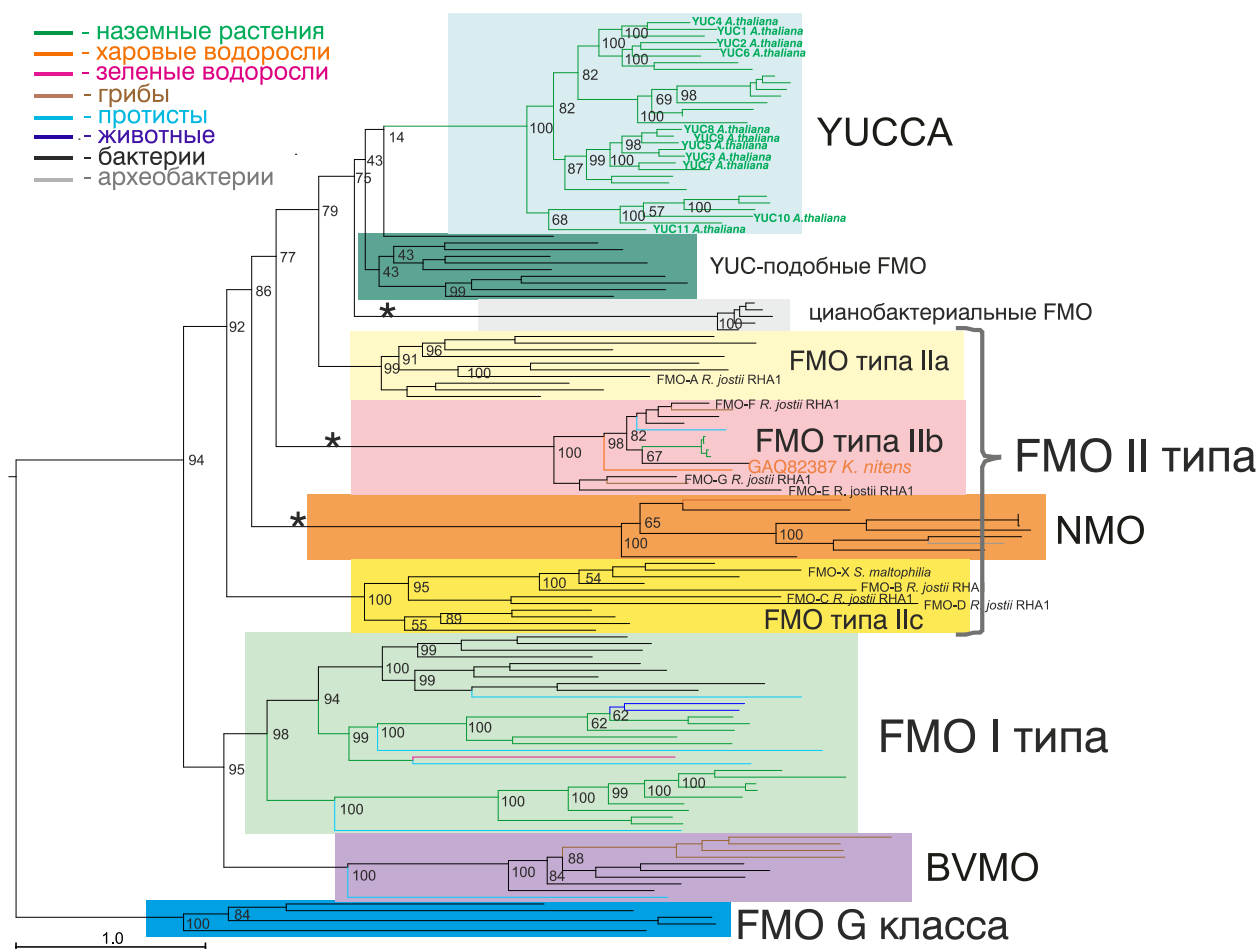


Рисунок 18. Филогения суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса, реконструированная методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). На дереве подписаны некоторые белки, важные для идентификации кластеров: FMO-A – FMO-G из *R. jostii* RHA1; FMO-X *S. maltophilia* (B2FLR2); GAQ82387.1 *K. nitens*; белки YUCCA: YUCCA1 – YUCCA11 *A. thaliana* (идентификаторы гена из БД Plaz 2.5: *at4g32540*, *at4g13260*, *at1g04610*, *at5g11320*, *at5g43890*, *at5g25620*, *at2g33230*, *at4g28720*, *at1g04180*, *at1g48910*, *at1g21430*). * - обозначены длинные ветви, предшествующие соответствующим кластерам. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Первая группа белков подкласса FMO - YUCCA хорошо обособлена и включает только белки растений (рис. 18, голубой фон). Наиболее близкими к YUCCA оказались белки группы YUC-подобных FMO, включающие бактериальные белки трёх таксонов: Протеобактерии, Bacteroidetes и Actinobacterii (рис. 18, темно-зеленый фон). Чуть дальше от YUCCA на дереве расположена третья группа белков, представленная только у Цианобактерий - цианобактериальные FMO (рис. 18, серый фон). Четвертая группа белков, названная Рибель и др. (Riebel et al., 2013) FMO II типа (рис. 18, бледно-желтый, розовый, ярко-желтый фоны) является наиболее гетерогенной. Эта группа включает белки бактерий, растений, грибов и простейших. Группа FMO II типа распадается на три хорошо обособленные подгруппы, названные нами FMO типа IIa (рис. 18, бледно-желтый фон), FMO типа IIb (рис. 18, розовый фон) и FMO типа IIc (рис. 18, ярко-желтый фон). Последовательности FMO типа IIa и FMO типа IIc встречаются только у бактерий. Тогда как FMO типа IIb содержит, кроме бактериальных, ещё и белки растений, грибов и простейших (рис. 18, 19). Следующая и последняя, наиболее удалённая от YUCCA из белков подкласса FMO, группа белков FMO I типа, название которой также предложено Рибель и др. (рис. 18, бледно-зелёный фон) – представлена белками бактерий, простейших, растений и животных, чьи белки FMO, в основном, хорошо исследованы (Riebel et al., 2013).

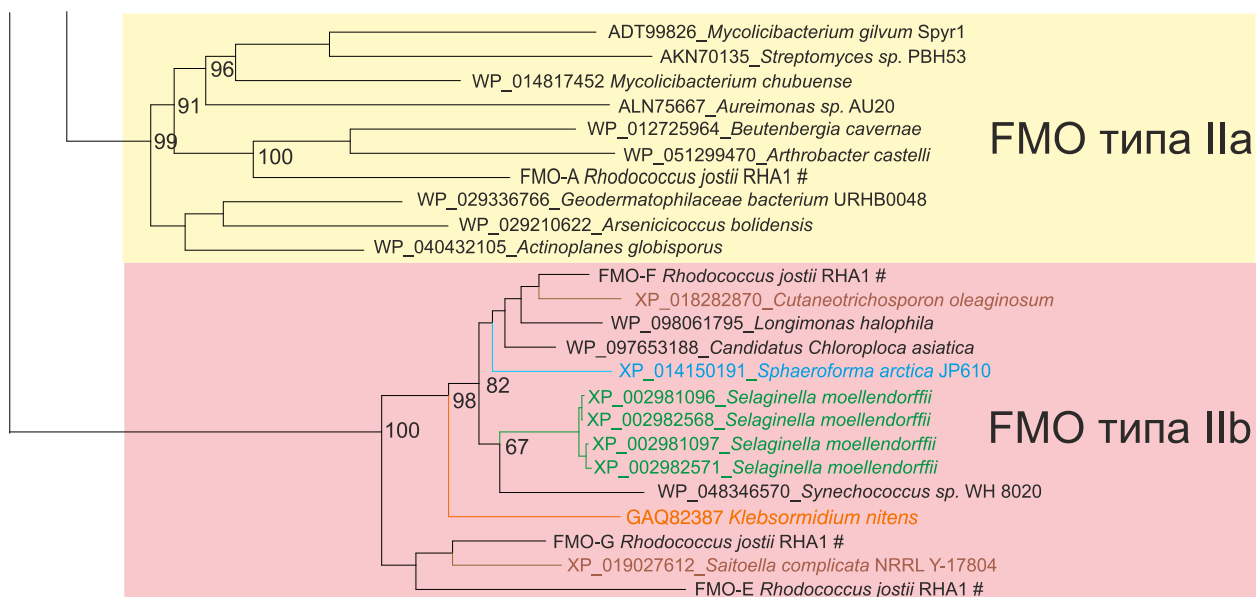


Рисунок 19. Фрагмент филогенетического дерева белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса (рис. 18), включающий две группы белков: FMO типа IIa (выделены бледно-желтым фоном) и FMO типа IIb (выделены розовым фоном). Знаком # отмечены последовательности FMO-A, FMO-E, FMO-F, FMO-G *R. jostii* RHA1, взятые из работы Рибель и др. (Riebel et al., 2013); Остальные обозначения как на рис. 18

Второй подкласс из суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса – NMO (рис. 18, оранжевый фон) – представлен белками бактерий и грибов.

Белки третьего подкласса – BVMO (рис. 18, фиолетовый фон) – представлены у грибов, простейших и бактерий.

Кластер FMO типа IIb включает следующие последовательности растительных организмов: четыре последовательности плауна *S. moellendorffii*, а также последовательность GAQ82387.1 Харофитовой водоросли *K. nitens* NIES-2285, которая является ближайшим гомологом YUCCA у этой водоросли по данным Wang et al. (Wang et al., 2014). Последовательности белков FMO-E, FMO-F, FMO-G *R. jostii* RHA1, взятые из работы Riebel et al. (Riebel et al., 2013), также относятся к кластеру FMO типа IIb (рис. 18 – на дереве, построенном программой IQ-TREE; см. также Приложение: рисунки П2Б и П2Б – на деревьях RaxML и mrBayes, соответственно). Однако другие белки FMO *R. jostii* RHA1 и *S. maltophilia* попадают в другие кластеры: белок FMO-A (*R. jostii* RHA1) – в кластер FMO

типа IIa и белки FMO-B, FMO-C, FMO-D (*R. jostii* RHA1), FMO-X (*S. maltophilia*) – в кластер FMO типа IIc.

Полученные результаты позволяют выделить белки кластера FMO типа IIb в особую группу из более обширной группы FMO II типа, так как:

а) это обособленный кластер с высоким уровнем бутстрэп-поддержки (рис. 18);

б) этот кластер единственный из FMO II типа включает белки разных царств (рис. 18, 19);

в) этот кластер содержит последовательности ферментов FMO-E, FMO-G, FMO-F *R. jostii* RHA1 обладающие уникальным набором каталитических свойств (Riebel et al., 2013; Riebel et al., 2014).

В табл. 3 описаны каталитические свойства белков семейств флавин-содержащих монооксигеназ класса В. Белки FMO II типа (FMO типов IIa, IIc, IIb) *R. jostii* RHA1 FMO-(A-G) отличаются от белков остальных семейств, как это было обнаружено Рибель и др. (Riebel et al., 2013), тем, что в качестве кофермента для своих реакций они могут в равной степени использовать и НАДФН, и НАДН (табл. 3, третий столбик). Тогда как все остальные ферменты флавин-содержащих монооксигеназ В класса в качестве кофермента способны эффективно использовать НАДФН, но не НАДН. Также, если белки FMO-A (принадлежит семейству FMO типа IIa – рис. 18, 19), FMO-B, FMO-C и FMO-D (принадлежат семейству FMO типа IIc – рис. 18) проявляют каталитическую активность, сходную с классическими FMO (FMO I типа) – они способны окислять гетероатомы (S или N), и не эффективны в реакции окисления Байера-Виллигера. То белки FMO-E, FMO-F, FMO-G (принадлежат семейству FMO типа IIb – рис. 18, 19) катализируют и окисление гетероатомов S/N и реакцию окисления Байера-Виллигера, демонстрируя, тем самым, активность сходную с белками подкласса BVMO I типа (табл. 3, второй столбик).

Таким образом, белки FMO типа IIb являются новыми НАДН зависимыми монооксигеназами Байер-Виллигера (Riebel et al., 2013). Что

делает их интересным объектом для исследования биокатализа: они способны осуществлять те же реакции, что и белки BVMO I типа, но, за счёт использования более дешевого в выделении, чем НАДФН и, содержавшегося в более высокой концентрации в клетках кофермента НАДН, их использование и применение в биокатализе более эффективно (Riebel et al., 2013; Riebel et al., 2014).

Таблица 3. Свойства групп белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса

группа	Реакция	коэнзимы	участие в процессах	таксоны
YUCCA	окислительное декарбоксилирование	НАДФН	биосинтез ауксина	наземные растения
YUC-подобные FMO	—	—	—	бактерии
цианобактериальные FMO	—	—	—	цианобактерии
FMO типа IIa	окисление S/N	НАДН or НАДФН	—	бактерии
FMO типа IIc	окисление S/N	НАДН or НАДФН	—	бактерии
FMO типа IIb	окисление Байер-Виллигера; окисление S/N	НАДН or НАДФН	—	растения, грибы, бактерии
FMO I типа	окисление S/N	НАДФН	детоксикация организма	растения, животные, простейшие, бактерии
NMO	гидроксилирование N	НАДФН	биосинтез сидерофоров*	грибы, бактерии
BVMO I типа	окисление Байер-Виллигера; окисление S/N	НАДФН	метаболизм нетипичных источников углерода; синтез токсинов, антибиотиков и противораковых соединений.	грибы, простейшие, бактерии

*сидерофоры — секретируемые бактериями или грибами низкомолекулярные вещества, транспортирующие в клетку железо (Olucha, Lamb, 2011).

Для оценки устойчивости топологии филогенетических деревьев суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса мы дополнительно к программе IQ-TREE (рис. 18) использовали программы RAxML (Приложение: рисунок П2А) и mrBayes (Приложение: рисунок П2Б).

На рис. 20 показаны кладограммы трёх деревьев белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса, построенных с помощью трёх программ: IQ-TREE (рис. 18), RAxML и mrBayes. Топология дерева RAxML практически не отличается от топологии дерева, построенного программой IQ-TREE (рис. 20). Небольшое различие есть только в позициях кластеров

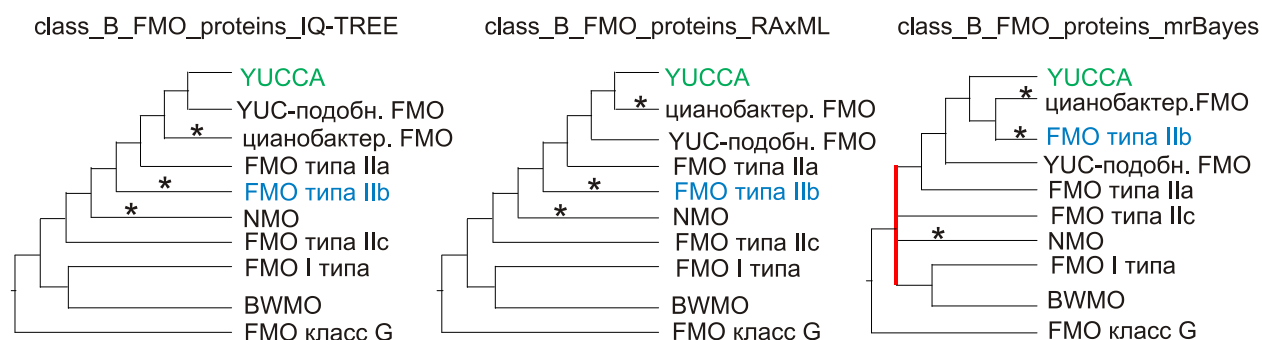


Рисунок 20. Упрощенные кладограммы филогенетических деревьев белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ класса В, построенные с помощью трёх программ: IQ-TREE (филогенетическое дерево на рис. 18), RAxML (филогенетическое дерево в Приложении: рисунок П2А) (обе используют для реконструкции филогении метод максимального правдоподобия) и mrBayes (филогенетическое дерево в Приложении: рисунок П2Б) (использует байесовский метод).

Зелёным цветом текста выделен кластер YUCCA, синим - кластер FMO типа IIb. * - длинные ветви, предшествующие соответствующим кластерам (длину этих ветвей см. на филогенетических деревьях - рис. 18, в Приложении: рисунки П2А и П2Б). Красной линией на схеме выделена тетрафуркация в схеме филогенетического дерева, реконструированного методом mrBayes

цианобактериальных FMO и YUC-подобных FMO: в дереве, построенном IQ-TREE, ближайшим к кластеру YUCCA оказался кластер YUC-подобных FMO, оба эти кластера дивергировали от общего предка с кластером цианобактериальных FMO, напротив, на дереве, полученном при помощи

RAxML, ближайшей к YUCCA оказался кластер цианобактериальных FMO, оба эти кластера дивергировали от общего предка с кластером YUC-подобных FMO (рис. 20). В свою очередь, топология дерева флавин-содержащих монооксигеназ класса В, реконструированного программой mrBayes, значительно отличается от таковой для деревьев IQ-TREE и RAxML. На дереве mrBayes наиболее близкими к YUCCA оказались кластеры цианобактериальных FMO и FMO типа IIb (рис. 20). Кроме этого, филогения mrBayes разрешается только частично: на дереве наблюдается прикорневая тетрафуркация, в которую вовлечены все основные кластеры белков флавин-содержащих монооксигеназ В класса (тетрафуркация выделена красной линией на кладограмме дерева mrBayes - рис. 20).

4.2.1.2 Сравнительный анализ функциональных сайтов и доменов белков флавин-содержащих монооксигеназ В класса

Мы провели сравнительный анализ белковых последовательностей по трём мотивам функциональных сайтов (ФАД-связывающий, FMO сайт и НАДФН-связывающий) во всех 10-ти группах белков, выделенных нами на филогенетическом дереве флавин-содержащих монооксигеназ В класса: YUCCA, YUC-подобные FMO, цианобактериальные FMO, FMO типа IIa, FMO типа IIb, FMO типа IIc, NMO, FMO I типа, BVMO и флавин-содержащие монооксигеназы G класса (рис. 18). На рисунке 4 показано расположение ФАД-связывающего, FMO и НАДФН-связывающего мотивов в последовательности флавин-содержащей монооксигеназы из семейства YUCCA (абсолютные позиции мотивов приведены на рисунке для последовательности YUCCA2 (AT4G13260) *A. thaliana* (Schlaich, 2007)). На рисунке 21 показаны консенсусы этих трёх мотивов в формате LOGO (Crooks et al., 2004) для 10-ти вышеперечисленных групп последовательностей.

Консервативные мотивы сайтов			ФАД-связывающий мотив	FMO мотив	НАДФН-связывающий мотив
Консервативные сайты в FMO			GxGxx ^G _A	FxGxxxHxxx ^{YK} _{FR}	GxGxx ^G _A
флавин-содержащие монооксигеназы В класса	FMO	YUCCA	GAGP ^s SG	F G V H ^{ss} YK	GcGN ^s SG
		YUC-подобные FMO	GAGP ^s SG	F G V H ^s YR	G GN ^s SG
		Цианобактериальные FMO	GAGFCG	F ^s G HSSAY ^k	GSGN ^s SA
		FMO типа Па	GAG ^{PA} SG	F ^{WT} G L H ^{AS} YR	G G ^N SG
		FMO типа Пб	GgG ^Q SG	F G QH ^{SS} H	G ^s NN ^s SA
	NMO		G GP ^{FN}	R C F H ^s Y	G ^s GQ ^s SA
	FMO	FMO типа Пс	G GN ^s SG	F G Q L H ^s YR	GgGQ ^s SA
		FMO I типа	GAG ^s SG	F G V L H ^s YR	G G ^s SA
	BVMO		GAG ^s SG	F G F H ^s W	GTGASA
флавин-содержащие монооксигеназы G класса			G G G	—	G G G

Рисунок 21 – Распределение и выравнивание ключевых функциональных сайтов у белков флавин-содержащих монооксигеназ В класса. В данной таблице, соответственно, в 2-4 столбцах показаны консенсусы трёх мотивов белков флавин-содержащих монооксигеназ В класса: FMO-связывающего, FMO и НАДН-связывающего сайтов. Позиции для трёх представленных в таблице сайтов (ФАД-связывающего, FMO мотива и НАДФН-связывающего) в последовательностях FMO показаны, на примере белка AT4G13260 *A. thaliana* YUCCA2, см. на рис. 4

Рассматриваемые группы оказались однородными по последовательностям представленных в них мотивов за исключением NMO и флавин-содержащих монооксигеназ G класса (рис. 21).

Так, у NMO в районе расположения FMO сайта обнаруживается лишь один консервативный гистидин (xxxxxxHxxxx) (рис. 21, третий столбец). Тогда как у белков флавин-содержащих монооксигеназ G класса сайт FMO отсутствует полностью (рис. 21, третий столбец). Как видно из рисунка 21 (столбец 2), ФАД-связывающий мотив у последовательностей всех рассматриваемых групп белков, кроме FMO типа IIc и NMO, является сходным и содержит три высококонсервативных глицина (G). У FMO типа IIc третий глицин часто заменяется на аланин (A), тогда как у NMO в большинстве случаев наблюдается замена третьего глицина на аспарагин (N).

Для FMO мотива (рис. 21, столбец 3) в последовательностях групп YUCCA, YUC-подобных FMO, цианобактериальных FMO, FMO типа IIa, FMO типа IIc и FMO типа I характерен консенсус FxGxxxHxxx(Y/F)(K/R) в предпоследней позиции которого преобладает тирозин (Y). Для BVMO в этом мотиве предпоследний символ представлен консервативным триптофаном (W).

Для последовательностей FMO типа IIb характерен консенсус FMO сайта: FxGxxxHxxx(H/y/f)P. Предпоследний символ этого мотива у 70% последовательностей представлен гистидином (H), однако у остальных 30% его заменяют тирозин (Y) или фенилаланин (F). Тогда как у остальных групп подкласса FMO (FMO I типа, FMO IIa типа, FMO типа IIc, цианобактериальные FMO, YUC-подобных FMO, YUCCA) в этой позиции находятся как раз только тирозин (Y) или фенилаланин (F). Тогда как гистидин (H) на этой позиции во всех остальных группах FMO, помимо FMO типа IIb, встречается лишь у двух последовательностей – в кластере FMO I типа (рис. 21, столбец 3). В последней позиции FMO мотива у белков группы FMO типа IIb расположен пролин (P), напротив у остальных групп FMO на этой позиции находятся лизин (K) либо аргинин (R).

Что касается мотива НАДФН-связывающего сайта (рис. 21, столбец 4), то для ферментов YUCCA, FMO типа IIc и флавин-содержащих монооксигеназ G класса характерны все три консервативных глицина (G) расположенные на первой, третьей и пятой позициях в этом мотиве. Хотя, у белков YUC-подобных FMO, FMO типа IIa, FMO типа IIb, NMO и FMO I типа третий глицин часто заменяется на аланин (A).

Наконец для групп цианобактериальных FMO и BVMO характерно наличие высококонсервативного аланина в последней позиции (рис. 21, столбец 4). В белках FMO типа IIb вместо второго консервативного глицина в 75% случаев встречается N - аспарагин: тогда как в других девяти исследованных группах белков эта аминокислота (N - аспарагин) на этой позиции не встречается ни одного раза. Аминокислоты НАДФН-связывающего мотива в группе FMO I типа аналогичны таковым в группах FMO типа IIa, FMO типа IIc, цианобактериальных FMO, YUC-подобных FMO, YUCCA (рис. 21, столбец 4).

Таким образом, в консенсусах FMO и НАДФН-связывающего мотивов большинства белков кластера FMO типа IIb имеются аминокислоты, нехарактерные для белков FMO типа IIa и FMO типа IIc (как и для всех остальных белков подкласса FMO) (рис. 21).

Отметим, что последовательность FMO мотива в белке GAQ82387.1 *K. nitens*, относящегося к группе FMO типа IIb, на предпоследней позиции имеет аминокислоту H, которая также наблюдается в этой позиции у белка FMO-F *R. jostii* RHA1 (рис. 22) (Riebel et al., 2013).

Мы провели сравнительный анализ консервативных доменов трёх групп белков:

- 1) FMO типа IIb;
- 2) FMO-подобные белки, включающие FMO I типа, FMO типа IIa, FMO типа IIc, цианобактериальные FMO, YUC-подобные FMO и YUCCA
- 3) BVMO (рис. 22).

Белки YUCCA, YUC-подобных FMO, цианобактериальных FMO, FMO типа Па, FMO типа Пс и FMO I типа были объединены нами в одну общую группу FMO-подобных белков, так как между последовательностями этих групп имеются лишь небольшие различия в их консервативных сайтах (см. рис. 21). Группы белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ G класса и NMO в данном сравнительном анализе не рассматриваются, так как состав их консервативных сайтов значительно отличается от остальных рассматриваемых групп белков (главное, что в обеих этих группах белков отсутствует FMO сайт).

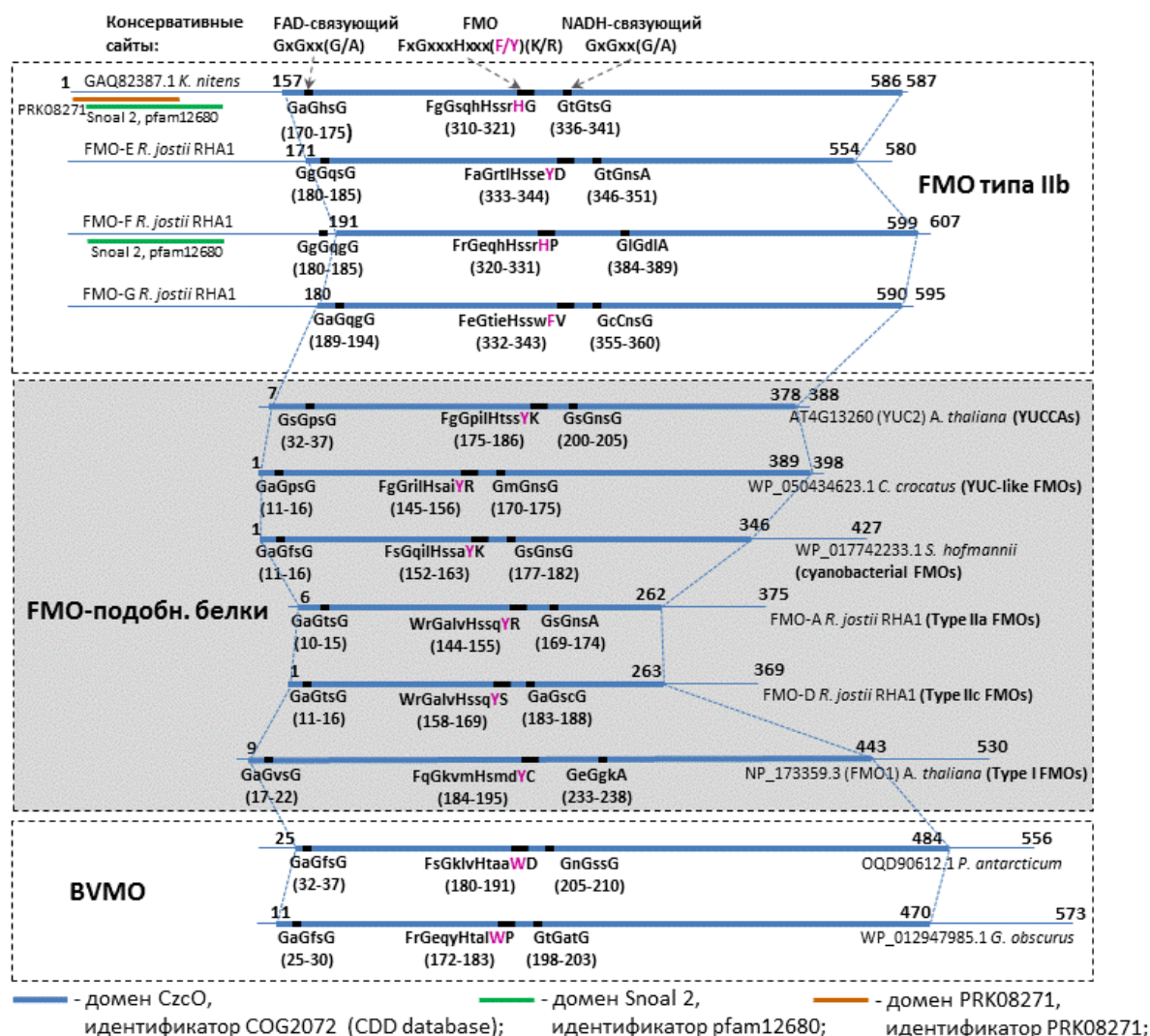


Рисунок 22 – Сравнение консервативных доменов трёх групп белков: (1) ФМО типа IIb; (2) ФМО-подобных белков (YUCCA, YUC-подобные ФМО, цианобактериальные ФМО, ФМО типа IIa, ФМО типа IIc, ФМО I типа) и (3) BVMO. Сокращения на рисунке: *C. crocatus* — бактерия *Chondromyces crocatus*; *S. hofmannii* – цианобактерия *Scytonema hofmannii*; *P. antarcticum* – гриб *Penicillium antarcticum*; *G. obscurus* – бактерия *Geodermatophilus obscurus*

Поиск консервативных доменов в базе данных CDD для последовательностей белков подклассов ФМО/BVMO (это белки, принадлежащие к трем рассматриваемым группам ФМО типа IIb, ФМО-подобных белков и BVMO) выявил один консервативный домен CzcO (accession COG2072), присутствовавший во всех последовательностях. Этот домен находится в центральной части белков, занимая от 65 до 98% их последовательности (рис. 22). В свою очередь, программа hhsearch в этом

районе последовательностей идентифицирует домен Pfam PF00743.19 (FMO-подобные белки, E-value $<1e^{-30}$).

Из рисунка 22 видно, что последовательности FMO типа IIb имеют N-терминальный район длиной около 160 а.о., который отсутствует у остальных белков FMO I типа, FMO типа IIa, FMO типа IIc, YUC-подобных FMO, YUCCA, цианобактериальных FMO и BVMO. Однако этот район присутствует во всех последовательностях FMO типа IIb.

Анализ, проведённый с помощью программы CD-search (порог E-value по умолчанию 0.01) в отдельных последовательностях, позволил обнаружить сходство данной области (1-160 а.о.) у последовательности GAQ82387.1 *K. nitens* с ещё двумя доменами: Snoal2 (SnoalL-подобный домен, идентификатор домена – pfam12680, E-value = $1.70e^{-04}$) и фактор РНК-полимеразы сигма-70 (идентификатор домена PRK08241, E-value = $9.67e^{-04}$) (рис. 22). Домен Snoal2 (pfam12680) также был обнаружен (с E-value = $4.21e^{-03}$) в последовательности FMO-F *R. jostii* RHA1 (рис. 22). Выявленный в вышеназванных последовательностях домен Snoal2 характерен для суперсемейства белков NTF2-like. NTF2-like суперсемейство представляет собой универсальную группу белков, имеющих общий тип укладки (Eberhardt et al., 2013). Белки NTF2-like можно в широком смысле разделить на две функциональные категории: ферментативно активные (поликетид циклаза SnoalL, сциталондегидратаза и др.) и не обладающие ферментативной активностью (связывающие лиганд) белки. Низкое сходство последовательностей FMO типа IIb с известными доменами этого семейства, однако, не позволяет с уверенностью судить об возможной функции соответствующего района белков (1-160 а.о. белков FMO типа IIb). Поиск по CDD не выявил сходства с какими-либо известными доменами на этом участке в последовательностях FMO-E и FMO-G *R. jostii* RHA1. Но при низком уровне сходства с доменами Snoal2 последовательностей других белков FMO типа IIb (см. на рис. 22 последовательности GAQ82387.1 *K. nitens* и FMO-F *R. jostii* RHA1), отсутствие

такой гомологии у белков FMO-E и FMO-G *R. jostii* RHA1 не вызывает удивления.

Анализ отдельных последовательностей с помощью программы hhblits (E-value по умолчанию 0.1) в базе данных Pfam дал аналогичные результаты. Для последовательностей FMO-F и GAQ82387.1 были идентифицированы субдомены семейства Pfam PF13577.6, другое его название SnoaL_4 (E-values 0.19 и 0.00061 для каждого из этих двух белков, соответственно). Этот тип домена, как и Snoal2, относится к суперсемейству NTF2-like. Для последовательностей FMO-E и FMO-G известные домены, также, как и при поиске по CD, не были обнаружены.

Для выяснения функции этого фрагмента (1-160 а.о.) мы использовали поиск известных доменов Pfam при множественном выравнивании уже всех рассматриваемых белков FMO типа IIb с помощью программы Hhsearch. Наибольшее покрытие (позиции 35-112 а.о.) было обнаружено для доменов PF02982.14 (Scytalone_dh; E-value = 0.00041) и PF02136.20 (NTF2; E-value = 0.00049). Все эти домены, как Snoal2 и SnoaL_4, относятся к суперсемейству NTF2-подобных доменов.

Таким образом, последовательности FMO типа IIb отличаются от FMO-подобных последовательностей наличием дополнительного домена на их N-конце, который, вероятно, принадлежит NTF2-подобному суперсемейству.

4.2.1.3 Представленность последовательностей, гомологичных FMO типа IIb, в основных таксонах

Чтобы лучше понять распространенность в организмах из разных таксонов белков FMO типа IIb, FMO-подобных белков (YUCCA, YUC-подобные FMO, цианобактериальные FMO, FMO типа IIa и FMO типа IIc, FMO I типа) и BVMO мы провели поиск гомологов белков вышеуказанных трёх групп среди основных таксонов про- и эукариот.

В таблице 4 показана представленность обнаруженных гомологов белков FMO типа IIb, FMO-подобных белков и BVMO в основных таксонах, с

учётом уровня их (гомологов) сходства с выбранными в качестве поисковых запросов белками (см. подпись к табл. 4).

Таблица 4 – Представленность гомологов трех групп белков в основных таксонах в зависимости от уровня сходства (по базе данных NCBI)

	Животные	Грибы	Растения	Бактерии	Археи
ФМО типа IIb *					
0 — $1e^{-70}$ **	0	419***	4	1387	1
$1e^{-70}$ — $1e^{-40}$	0	80	0	2	0
$1e^{-40}$ — $1e^{-05}$	0	8	3	19	0
все гомологи	0	507(285)****	7(4)	1408(1041)	1(1)
BVMO					
0 — $1e^{-70}$	8	918	1	3155	1
$1e^{-70}$ — $1e^{-40}$	4	3475	2	1090	9
$1e^{-40}$ — $1e^{-05}$	4	1198	1	1605	1
все гомологи	16(6)	5591(549)	4(2)	5850(1656)	11(9)
ФМО-подобные белки из растений					
0 — $1e^{-70}$	0	0	512	0	0
$1e^{-70}$ — $1e^{-40}$	0	0	16	4	0
$1e^{-40}$ — $1e^{-05}$	2486	417	302	2052	0
все гомологи	2486(409)	417(244)	831(106)	2056(1306)	0
ФМО-подобные белки из бактерий					
0 — $1e^{-70}$	0	0	0	329	0
$1e^{-70}$ — $1e^{-40}$	2	0	612	537	0
$1e^{-40}$ — $1e^{-05}$	2917	1305	993	8660	0
все гомологи	2919(187)	1305(433)	1605(114)	9526(837)	0

Обозначения: * ФМО типа IIb: гомологи белка WP_019017022.1 бактерии *H. lutea*; BVMO: гомологи белка WP_012947985.1 бактерии *G. obscurus*; ФМО-подобные белки из растений: гомологи белка XP_002312911.2 растения *P. trichocarpa*; ФМО-подобные белки из бактерий: гомологи белка WP_054213635.1 бактерии *A. bacterium* OK074. **Интервалы оценок сходства (E-value) для PHI-BLAST гомологов; строка «Все гомологи» подразумевает количество гомологов, распознанных с E-value в интервале от 0 до $1e^{-05}$. ***Число распознанных с помощью PHI-BLAST гомологов. ****В скобках приведено число видов, в которых распознаны гомологи.

Анализируя базу данных NCBI, мы обнаружили, что белки группы ФМО типа IIb, гомологичные белкам ФМО-E, ФМО-F, ФМО-G *R. jostii* RHA1, широко распространены в таких таксонах как бактерии и грибы. Кроме того, они обнаруживаются у отдельных видов архей (*Natronomonas moolapensis*,

Halorubrum depositum), простейших (*Sphaeroforma arctica* JP610, *Symbiodinium microadriaticum*, *Fragilariopsis cylindrus* CCMP1102 – гомологи простейших не представлены в табл. 4, по ним проводился отдельный поиск) и зелёных растений (Klebsormidiophyceae: *K. nitens*; печёночные (маршанциевые) мхи: *M. polymorpha*; плауновидные: *S. moellendorffii*), но отсутствуют у таких таксонов, как настоящие мхи (Бриофиты), папоротники и семенные растения (табл. 4, 5).

Как отмечено выше по тексту, белки групп FMO типа IIb, также как белки BVMO широко распространены среди бактерий и грибов, но практически отсутствуют у архей, растений и животных (белки FMO типа IIb у животных вообще отсутствуют). Тогда как FMO-подобные белки оказались широко распространенными во всех исследованных таксонах, за исключением архей. Степень сходства между последовательностями бактерий и грибов значительно выше внутри групп FMO типа IIb и BVMO, по сравнению с таковой в группе FMO-подобных белков. Это хорошо видно при сравнении результатов поисков гомологов бактериальных последовательностей среди белков грибов в рассматриваемых в таблице группах белков. Так, например, значительное количество близких гомологов к бактериальным последовательностям среди последовательностей грибов в нашем исследовании было обнаружено в интервале значений E-value от 0 до $1e-70$ для групп белков FMO типа IIb (419) и BVMO (918), но никаких близких гомологов белков бактерий среди последовательностей грибов не было обнаружено в группе FMO-подобных белков в интервале значений E-value от 0 до $1e-40$ (табл. 4, столбец 4).

4.2.1.4 Анализ выборки суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ класса В, включающей последовательности транскриптомов растений

Для более полной идентификации последовательностей суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса в растительных организмах, мы расширили выборку белков флавин-содержащих монооксигеназ В класса (class_B_FMO_proteins) за счёт добавления гомологичных им последовательностей из транскриптомных проектов: 1KP [The 1000 plants genomes. Доступной онлайн: <https://sites.google.com/a/ualberta.ca/onekp/> (accessed on 24 July 2020) (Leebens-Mack et al., 2019) и Green Algal Tree of Life [Green algal transcriptomes for phylogenetics and comparative genomics. Доступной онлайн: https://figshare.com/articles/Green_algal_transcriptomes_for_phylogenetics_and_comparative_genomics/1604778 (accessed on 24 July 2020) (Cooper, Delwiche, 2016) (выборка class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic).

Филогенетическое дерево флавин-содержащих монооксигеназ В класса для этой выборки, построенное с помощью программы IQ-TREE, показано на рисунке 23. Это дерево содержит все основные группы последовательностей флавин-содержащих монооксигеназ В класса, которые мы выделили выше по тексту на рисунке 18, также, как и белки флавин-содержащих монооксигеназ G класса выступающие в качестве внешней группы.

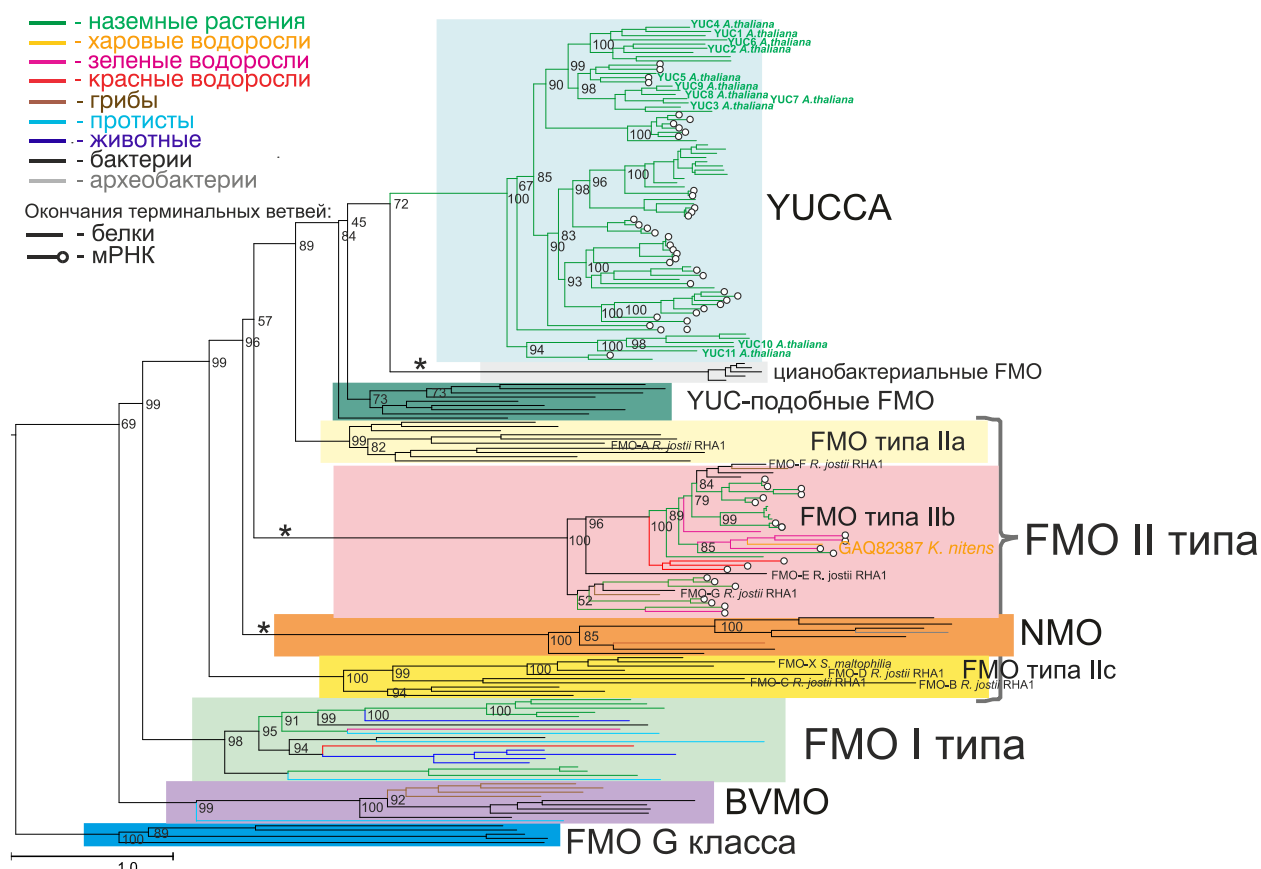


Рисунок 23. Филогения флавин-содержащих монооксигеназ В класса (class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic), включающая, как последовательности белков из полногеномных данных, так и последовательности из транскриптомных сборок, реконструированная методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE). В качестве внешней группы взяты белки флавин-содержащих монооксигеназ класса G. На дереве подписаны некоторые белки, важные для идентификации кластеров: FMO-A – FMO-G из *R. jostii* RHA1; FMO-X из *S. maltophilia* (B2FLR2); GAQ82387.1 из *K. nitens*; белки YUCCA: YUCCA1 – YUCCA11 *A. thaliana* (идентификаторы генов из базы данных Plaza 2.5 для этих генов *yucca* приведены в подписи к рисунку 18). * - обозначены длинные ветви, предшествующие соответствующим кластерам. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

Кластер белков FMO типа IIb показан более подробно на рис. 24. В нем, кроме белков бактерий и грибов, представлены также белки красных водорослей (Rhodophyta), зелёных водорослей (Chlorophyta), Харофитовых водорослей (Charophyta: семейство Klebsormidiaceae), а также основных таксонов наземных растений (настоящие мхи, печеночные мхи, антоцеротовидные мхи, плауны, папоротники, хвойные и семенные растения: как однодольные, так и двудольные). Отметим, что предки современных

наземных растений и Харофитовые водоросли, содержащие семейство Klebsormidiaceae, тесно связаны между собой в эволюции (Yue et al., 2014; Wang et al., 2014).

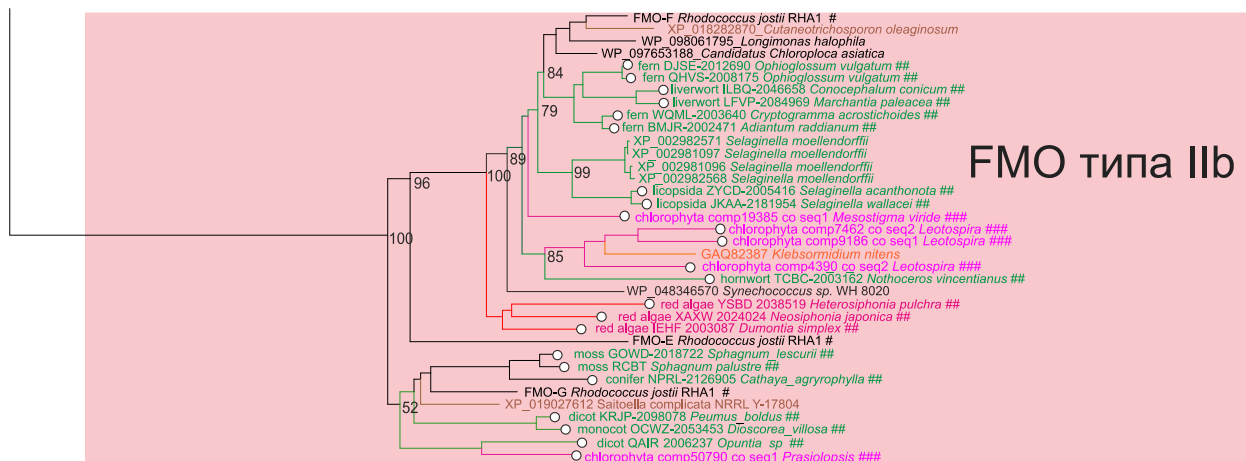


Рисунок 24. Фрагмент филогенетического дерева

class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic (полноразмерные белки + транскрипуемые транскриптомные последовательности) рис. 23, включающий только кластер FMO типа IIb. Обозначения аналогичны таковым на рис. 23. Три последовательности белков, отмеченные значком #, взяты из исследования Рибель и др. (Riebel et al., 2013); ## – последовательности, взятые из БД 1000 plant genomes (Matasci et al., 2014) и ### – из БД The Green Algal Tree of Life project (Cooper, Delwiche, 2016)

Чтобы оценить надежность филогении для расширенного набора последовательностей флавин-содержащих монооксигеназ В класса, мы дополнительно оценили филогенетические деревья, реконструированные программами RAxML (Приложение: рисунок П3А) и mrBayes (Приложение: рисунок П3Б). Стоит отметить, что набор кластеров белков и принадлежность последовательностей к кластерам на филогенетических деревьях, построенных по выборке class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic (рис.23; Приложение: рисунки П3А, П2Б), не изменились по сравнению с филогенетическим деревом исходной выборки class_B_FMO_proteins, включавшей только белковые последовательности (рис. 18; Приложение: рисунки П2А, П2Б). Сравнение этих деревьев (Приложение: рисунки П3А (RAxML), П3Б (mrBayes)) и дерева построенного с помощью программы IQ-TREE (рис. 23) показало, что топологии деревьев, построенные по смешанной

выборке (белки + транслированные транскрипты) программами IQ-TREE и RAxML (их кладограммы показаны на рис. 25), не отличаются друг от друга.

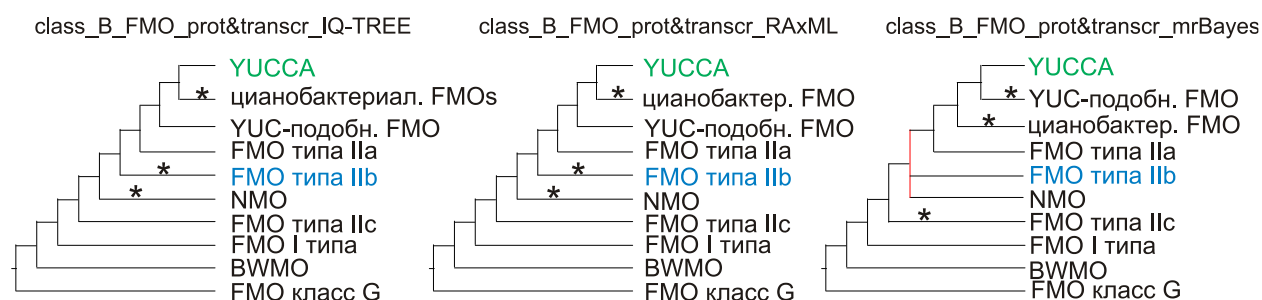


Рисунок 25. Упрощенные кладограммы филогенетических деревьев class_B_FMO_proteins_and_transcriptomic, построенные с помощью трёх программ: IQ-TREE (филогенетическое дерево на рис. 23), RAxML (филогенетическое дерево в Приложении: рисунок П3А) (обе используют для реконструкции филогении метод максимального правдоподобия) и mrBayes (филогенетическое дерево в Приложении: рисунок П3Б) (использует байесовский метод). Зелёным цветом текста выделен кластер YUCCA, синим - кластер FMO типа IIb. * - обозначены длинные ветви, предшествующие соответствующим кластерам (длину этих ветвей см. на филогенетических деревьях - рис. 23, и в Приложении: рисунки П3А и П3Б). Красной линией выделена трифуркация в кладограмме, реконструированной с помощью mrBayes

Дерево, оцененное mrBayes, на самом деле имеет только одно различие в положении клад по отношению к деревьям IQ-TREE и RAxML, а именно, кластеры цианобактериальных FMO и YUC-подобных FMO меняют свое положение: в деревьях IQ-TREE и RAxML кластер цианобактериальных FMO наиболее близок к YUCCA, а кластер YUC-подобных FMO дивергирует от общего предка с двумя этими кладами, тогда как в дереве mrBayes белки YUC-подобных FMO становятся наиболее близкими к YUCCA, а уже кластер цианобактериальных FMO дивергирует от общего предка с обоими этими кладами. Дерево, построенное mrBayes по смешанной выборке (белки + транслированные транскрипты) (рис. 23) также имеет неразрешенные узлы, как и дерево mrBayes, построенное только по белкам (рис. 18), поскольку оба дерева содержат базальную трифуркацию между /NMO/, / FMO типа IIb и FMO типа IIa / и /YUCCA/ – она обозначена красной линией на кладограмме

mrBayes (сравните кладограммы на рис. 20 – деревья, построенные по белковым выборкам и на рис. 25 – деревья, построенные по смешанным выборкам белков и транскриптов).

На основании проведенного анализа филогении белков суперсемейства флавин-содержащих монооксигеназ В класса (рис. 18, 23) выявленная группа белков FMO типа IIb хорошо отделяется от других групп белков этого суперсемейства (в том числе и от других последовательностей FMO II типа: FMO типа IIa и FMO типа IIc). Это надежно подтверждается тремя различными программами реконструкции филогении (IQ-TREE, RAxML и mrBayes) для двух наборов последовательностей флавин-содержащих монооксигеназ В класса: (1) только белки (рис. 18, Приложение: рисунки П2А и П2Б) и (2) смешанная выборка белков и транслированных транскриптов (рис. 23, Приложение: рисунки П3А и П3Б).

Также важно отметить, что наиболее близкими к белкам YUCCA в большинстве филогенетических деревьев оказались не белки FMO типа IIb, но белки YUC-подобных FMO, представленные у бактерий (β -протеобактерии, δ -протеобактерии и Bacteroides) и цианобактериальные FMO, представленные соответственно цианобактериями (см. кладограммы филогенетических деревьев на рис. 20 и 25). За исключением филогенетического дерева, построенного программой mrBayes, по выборке включающей только последовательности белков (см. кладограмму class_B_FMO_proteins_mrBayes на рис. 20), где белки FMO типа IIb и цианобактериальных FMO, соответственно, наиболее близки к кластеру YUCCA.

4.2.1.5 Представленность последовательностей, гомологичных FMO типа IIb, в таксонах транскриптомных проектов растений

В таблице 5 представлены результаты идентификации гомологов *K. nitens* GAQ82387.1 и *A. thaliana* YUCCA2 AT4G13260 программой blastP в двух базах данных: базе 1000 plant genomes (1KP) – содержащей

транслируемые транскриптомные последовательности растений (Leebens-Mack et al., 2019) и базе NCBI – содержащей белковые последовательности.

Таблица 5 – Поиск гомологов двух последовательностей – *K. nitens* GAQ82387.1 (группа ФМО типа IIb) и *A. thaliana* YUCCA2 AT4G13260 (группа YUCCA) – в двух базах данных: 1000 plant genomes и NCBI

Taxonomy				Гомологи GAQ82387.1 в базе 1000 plant genomes (1KP)	Гомологи GAQ82387.1 в базе NCBI	Гомологи YUCCA в базе 1000 plant genomes (1KP)	Гомологи YUCCA в базе NCBI
Streptophyta	Streptophytina	Embryophita	Eudicots (596)	4(3)	-	434(333)	1680(114)
			Monocots (104)	1(1)	-	47(35)	444(26)
			Conifers (73)	1(1)	-	4(4)	-
			Cycadales (4)	-	-	2(2)	-
			Leptosporangiate Monilophytes (65)	90(33)	-	25(19)	-
			Eusporangiate Monilophytes (12)	1(1)	-	-	-
			Lycophytes (22)	5(4)	6(1)	-	10(1)
			Hornworts (9)	9(5)	-	3(3)	-
			Liverworts (28)	17(9)	2(1)	10(10)	6(2)
			Bryophyta (41)	1(1)	-	24(18)	6(1)
		Zygnemophyceae (5)	-	-	-	-	
		Coleochaetophyceae (3)	-	-	-	-	
		Charophyceae (1)	-	-	-	-	
		Mesostigmatophyceae (1)	-	-	-	-	
		Chlorokybophyceae (1)	-	-	-	-	
		Kebsormidiophyceae (2)	2(2)	1(1)	-	-	
		Chlorophyta	Green algae* (152)	5(4)	1(1)	-	-
Rhodophyta	Red algae (28)	3(3)	-	-	-		

Обозначения: В столбце 1 – приведены названия таксонов согласно классификации NCBI (в скобках – число видов каждого таксона в БД 1000 plant genomes, а для таксона Green algae также и число видов в БД The Green Algal Tree of Life project – обозначено *). В столбцах 2-5 – число гомологичных последовательностей (в скобках – число видов, у которых обнаружены гомологи)

Согласно анализу базы данных 1000 растительных геномов – 1KP (табл. 5) – количество гомологов YUCCA (в качестве поискового запроса

использовалась последовательность AT4G13260.1 *A. thaliana*) оказалось более трехсот среди двудольных и более 40 среди однодольных растений по сравнению с лишь отдельными гомологами GAQ82387.1 (семейство FMO типа IIb) в этих двух таксонах с учетом того, что количество видов двудольных в базе 1KP почти 600 и однодольных более 100.

Второй интересный результат заключается в том, что гомологи GAQ82387.1 из *K. nitens* обнаружены в отдельных транскриптах водорослей, а именно в четырех транскриптах низших водорослей (Chlorophyta), красных водорослей (Rhodophyta) и водорослей Streptophyta (только в семействе Klebsormidiophyceae). Однако у водорослей не был обнаружено каких-либо гомологов YUCCA как в базах данных 1KP, так и в NCBI.

Относительно высокое содержание гомологов AT4G13260 (YUCCA) и GAQ82387.1 (FMO типа IIb) наблюдается в одном из двух таксонов папоротников Leptosporangiate monilophytes (табл. 5): гомологи AT4G13260 присутствуют, соответственно, у 19 видов и гомологи GAQ82387.1 у 33 видов этого таксона из 65 видов, представленных в базе данных 1000 plant genomes.

Большое количество гомологов обоих генов у папоротников и низших наземных растений вызывает вопрос о том, присутствуют ли гомологи этих двух генов одновременно в геноме одного и того же вида. Мы изучили этот вопрос и показали результаты в таблице 6. В этой таблице перечислены виды (столбец 1), у которых были идентифицированы гомологи обоих белков, как GAQ82387.1 (FMO типа IIb), так и AT4G13260 (YUCCA).

Таблица 6. Виды растений, для которых обнаружены как гомологи *K. nitens* GAQ82387.1, так и *A. thaliana* YUCCA2 AT4G13260 (в базе 1000 растительных (1KP) геномов). В столбцах 3 и 4 – число обнаруженных гомологов белков для каждого вида

Идентификаторы вида в базе 1000 растительных геномов	таксон	GAQ82387.1	YUCCA
TVSH_201823_ <i>Bituminaria bituminosa</i>	Core Eudicots/Бобовоцветные	1	2
WWQZ_211706_ <i>Medinilla magnifica</i>	Core Eudicots/Миртоцветные	1	1
OCWZ_200432_ <i>Dioscorea villosa</i>	Monocots/ Диоскорейные	1	2
AFPO_201018_ <i>Blechnum spicant</i>	Leptosporangiate Monilophytes	4	1
BMJR_200209_ <i>Adiantum tenerum</i>	Leptosporangiate Monilophytes	2	2
DCDT_207190_ <i>Cheilanthes arizonica</i>	Leptosporangiate Monilophytes	3	1
FLTD_200266_ <i>Pteris ensigormis</i>	Leptosporangiate Monilophytes	1	2
GANB_201380_ <i>Cyathea spinulosa</i>	Leptosporangiate Monilophytes	4	1
KIIX_201108_ <i>Pilularia globulifera</i>	Leptosporangiate Monilophytes	2	1
KJZG_200972_ <i>Asplenium platyneuron</i>	Leptosporangiate Monilophytes	5	1
NDUV_201591_ <i>Vittaria appalachiana</i>	Leptosporangiate Monilophytes	1	2
NOKI_201577_ <i>Lindsaea linearis</i>	Leptosporangiate Monilophytes	5	1
PNZO_215202_ <i>Culcita macrocarpa</i>	Leptosporangiate Monilophytes	1	1
RICC_200988_ <i>Cystopteris reevesiana</i>	Leptosporangiate Monilophytes	3	1
UFJN_208949_ <i>Diplazium wichurae</i>	Leptosporangiate Monilophytes	3	1
UOMY_200602_ <i>Osmunda sp.</i>	Leptosporangiate Monilophytes	1	1
WQML_200900_ <i>Cryptogramma acrostichoides</i>	Leptosporangiate Monilophytes	1	2
YLJA_207326_ <i>Polypodium amorphum</i>	Leptosporangiate Monilophytes	2	1
RXRQ_201835_ <i>Phaeoceros carolinianus</i>	Hornworts	3	1
TCBC_200001_ <i>Megaceros vincentianus</i>	Hornworts	1	1
HMHL_201008_ <i>Marchantia paleacea</i>	Liverworts	2	1
ILBQ_200700_ <i>Conocephalum conicum</i>	Liverworts	2	1
TXVB_207470_ <i>Lunularia cruciata</i>	Liverworts	3	1
RCBT_ <i>Sphagnum palustre</i>	moss	1	1

Как видно из таблицы 6 гомологи AT4G13260 (YUCCA) и GAQ82387.1 (по базе данных 1KP) одновременно представлены у трех видов печеночных

мхов, двух видов антероцеротовых мхов, одного вида настоящих мхов, 13 видов лептоспорангиевых папоротников, одного вида однодольных и двух видов двудольных. Это согласуется с результатами анализа генома печеночного мха *M. polymorpha* (Bowman et al., 2017), свидетельствующими о существовании в этом геноме гомологов и FMO типа Пб и YUCCA. Полученные результаты наводят на мысль, что эти два семейства белков в соответствующих растениях выполняют различные функции.

Кроме того, белки YUC-подобных FMO, представленные в бактериях (β -протеобактерии, δ -протеобактерии и *Bacteroides*) и цианобактериальные FMO, представленные соответственно цианобактериями, но не белки FMO типа Пб оказались наиболее близкими к YUCCA в построенном филогенетическом дереве (см. кладограммы филогенетических деревьев на рис. 20 и 25).

Наши исследования дают значительное количество аргументов в пользу гипотезы Юэ и др. (Yue et al., 2014) о происхождении ПБА(ТАА/YUCCA) биосинтеза ауксина в результате ГП(ов) предковых генов ферментов ПБА(ТАА/YUCCA): *taa* и *yucca* от нерастительных таксонов к НПОП наземных растений, и, в основном, они не согласуются с гипотезой о появлении этих белков уже у Харофитовых водорослей (Wang et al., 2014).

Недавние проекты по секвенированию геномов Харофитов *Penium Margaritaceum* (Zygnematales) (Jiao et al., 2019) и *Chara braunii* (Jiao et al., 2019; Nishiyama et al., 2018), *Nitella* (Ke et al., 2015) поддерживают гипотезу Юэ и др. (Yue et al., 2014) о происхождении ТАА и YUCCA у наземных растений: ни ТАА, ни YUCCA гомологи в этих геномах не идентифицированы.

4.3 Обсуждение

Согласно результатам нашего исследования, мы предположили горизонтальный перенос предковых генов для белков ТАА и YUCCA из геномов нерастительных организмов (скорее всего бактерий) к НПОП наземных растений. ГПГ у многоклеточных эукариот часто обсуждается, но

все больше данных указывают на его широкое влияние на эволюцию и адаптацию наземных растений (Copley, Dhillon, 2002; Yue et al., 2012; Li et al., 2012; Yang et al., 2013). Так, для примера, ген *ilr2*, регулирующий чувствительность к конъюгату ауксина и транспорт металлов в семействе горчицы *Brassicaceae* (Крестоцветные) и других цветковых растениях, как сообщается, был приобретен растениями у вирусов (Liu, et al., 2011; Chiba et al., 2011). Мозаичная природа Триптофан-зависимого ПБА(ТАА/YUCCA) у наземных растений дает дополнительные доказательства важной роли латеральной генетической передачи в генерации и оптимизации эволюционных новшеств у эукариот (Huang, Gogarten, 2008; Yue et al., 2014).

Положение клады FMO типа IIb варьирует, относительно других групп, на дереве флавин-содержащих монооксигеназ В класса в зависимости от метода реконструкции и набора последовательностей в выборке (рис. 20). На деревьях белковых последовательностей флавин-содержащих монооксигеназ В класса, построенных программами IQ-TREE (class_B_FMO_proteins_IQ-TREE) и RAxML (class_B_FMO_proteins_RAxML), клада FMO типа IIb не является родственной для клады YUCCA. Тогда как сестринской, по отношению к кладе YUCCA, является клада YUC-подобных FMO (рис. 20). Однако на дереве, построенном программой mrBayes (class_B_FMO_proteins_mrBayes), ближайшими к YUCCA оказались белки FMO типа IIb и цианобактериальных FMO (рис. 20). К тому же реконструкция, проведенная программой mrBayes, не способна разрешить дерево полностью, в результате образуется тетрафуркация между основными кладами дерева (рис. 20). Расширение белковых выборок флавин-содержащих монооксигеназ В класса за счет дополнения их последовательностями из транскрипционных проектов привело к стабилизации клады FMO типа IIb на всех трех деревьях, построенных программами IQ-TREE, RAxML и mrBayes, в положении, указывающем на отсутствие близкого родства между этой кладой (FMO типа IIb) и кладой YUCCA (рис. 25). Уровень недоразрешения дерева, построенного программой mrBayes по белковой выборке (рис. 20), при переходе к дереву,

построенному по расширенной выборке (рис. 25), уменьшается: вместо тетрафуркации в первом случае (рис. 20), во втором (рис. 25) – в дереве наблюдается трифуркация, захватывающая и кладу FMO типа IIb.

Одной из возможных причин этой неустойчивости филогении флавин-содержащих монооксигеназ В класса является влияние трех длинных ветвей, ведущих к кластерам цианобактериальных FMO, NMO и FMO типа IIb (эти ветви выделены знаком «*» на филогенетических деревьях: рис. 18, 23; в Приложение: рисунки П2А, П2Б, П3А, П3Б; и на кладограммах всех этих деревьев: рис. 20, 25). Байесовский метод реконструкции филогении по данным Колашковски и др. (Kolaczowski et al., 2009) более чувствителен к присутствию длинных ветвей в дереве, чем метод максимального правдоподобия (ML). Поэтому авторы этой статьи предлагают при значительном различии филогений, построенных Байесовским методом (в нашей работе это программа mrBayes) и ML (в нашей работе это программы IQ-TREE и RAxML), склоняться в пользу ML топологии.

С другой стороны, для некоторых клад (например, YUC-подобных FMO) значения бутстреп поддержки ветвей довольно низкие, как для методов максимального правдоподобия (IQ-TREE и RAxML), так и для методов mrBayes. Например, недостаточна бутстреп поддержка, чтобы сделать заключение, что FMO типа IIb и цианобактериальные FMO группируются вместе на дереве, построенном по выборке, включающей только белки, (class_B_FMO_proteins) с помощью программы mrBayes (Приложение: рисунок П2Б). Тем не менее, высокая бутстреп поддержка получена для кластера FMO типа IIb, независимо от его положения на дереве (и метода реконструкции филогении). Таким образом, мы можем сделать вывод, что этот кластер хорошо отделен от других кластеров, но его положение на дереве в некоторых наших анализах не четко определяется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4

Исследование структуры, доменов и филогенетического положения белка KnTAA (kfl00051_0080/GAQ80308.1) *K. nitens* показало, что он, по филогенетическому положению, составу доменов (имеет EGF домен характерный для аллииназ, но отсутствующий у белков TAA) и трехмерной структуре скорее относится к аллииназам, чем к белкам TAA. Также белок KnTAA *K. nitens* имел аномальную длину для семейства TAA (более чем в два раза больше, чем белки TAA) и включал дополнительный N-концевой домен, гомологичный когензиновому белку SYN1. Полученные результаты поддерживают гипотезу Юэ с соавт. (Yue et al., 2014) о том, что белок TAA был приобретен первыми наземными растениями в результате ГПГ к ним от бактерий, но не гипотезу Ванг и др. (Wang et al., 2014) о более раннем приобретении TAA Харофитовыми водорослями также в результате ГПГ к ним от бактерий. Однако в последующей работе Романи (Romani, 2017) было определено, что аномально большая длина последовательности KnTAA, так и наличие в ней доменов дополнительных по сравнению с TAA белками, по-видимому, является ошибкой сборки генома *K. nitens*, которую анализировали Ванг и др. (Wang et al., 2014). Также в статье Романи (Romani, 2017) было установлено, что домен EGF есть не только у аллииназ, но у белков TAA мхов и плаунов. Он предположил, что в дальнейшей эволюции растений EGF домен у белков TAA, по-видимому, был утрачен, так как в последовательностях TAA семенных растений он отсутствует.

Вместе с тем не было выявлено гомологов KnTAA *K. nitens* при поиске в транскриптомах пяти других видов Харофитов (*Mesostigma viride*, *Coleochaete orbicularis*, *Spirogyra pratensis*, *Nitella mirabilis* и *Chara brauni*) (Ju et al., 2015; Nishiyama et al., 2018). Впоследствии Романи (Romani, 2017) предположил, что отсутствие транскриптов TAA у вышеперечисленных видов Харофитовых водорослей может быть связано и с тем, что ген, кодирующий TAA, может транскрибироваться только при определённых условиях и потому

не обнаруживаться в транскриптомах вышеперечисленных пяти видов Харофитов. Но пока отсутствие гомологов ТАА1 в транскриптомах вышеперечисленных Харофитов поддерживает гипотезу Юэ и др. (Yue et al., 2014), о том, что основной ПБА(ТАА/YUCCA) появился у НПОП наземных растений.

Также экспериментальные данные Аи и др. (Ai et al., 2018) показали неспособность рекомбинантного белка КпТАА из *K. nitens* (гомолог ТАА и аллииназ) восстанавливать дефекты роста и развития у мутантных по гену *taa* растений *A. thaliana* при его сверхэкспрессии в таких мутантах. Таким образом, было подтверждено экспериментально наше предположение, что фермент КпТАА, гомологичный ТАА, не является ферментом, действующим в ПБА(ТАА/YUCCA) (Turnaev et al., 2015; Ai et al., 2018).

В конечном итоге несмотря на то, что в исследовании Романи (Romani, 2017) был выдвинут ряд контраргументов в отношении гипотезы Юэ и др. (Yue et al., 2014) о происхождении ТАА у НПОП наземных растений, нами и рядом других исследователей эта гипотеза была подтверждена.

Мы подробно изучили филогению флавин-содержащих монооксигеназ В класса с целью определения взаимосвязи между белками YUCCA наземных растений и GAQ82387.1 *K. nitens* (гомолог YUCCA). В результате, мы продемонстрировали, что группа белков, названная Рибель и др. (Riebel et al., 2013) FMO II типа, делится на три группы, которые мы называли FMO типа IIa, FMO типа IIb и FMO типа IIc (Turnaev et al., 2020). Белки FMO типа IIb, которые также включают ранее описанные белки GAQ82387.1 из Харофитовой водоросли *K. nitens* (Wang et al., 2014) и белки FMO-E, -F, -G из бактерии *R. jostii* RHA1 (Riebel et al., 2013), значительно различаются аминокислотным составом своих сайтов, их доменами, представленностью в разных таксонах, и, вероятно, их функциями по сравнению с YUCCA. На основании проведённого сравнительного исследования структурных особенностей и филогении белков флавин-содержащих монооксигеназ класса В мы делаем вывод о том, что белки FMO типа IIb и YUCCA не являются

близкородственными. Это в большей степени поддерживает гипотезу Юэ и др. (Yue et al., 2014) о приобретении YUCCA первыми наземными растениями в результате ГПГ от бактерий к НПОП наземных растений, чем гипотезу Ванг и др. (Wang et al., 2014) о более раннем приобретении гена *уисса* Харофитовыми водорослями также в результате ГПГ от бактерий к НПОП Харофитовых водорослей и наземных растений.

В результате наши данные поддерживают гипотезу Юэ и др. (Yue et al., 2014) о появлении ПБА(ТАА/YUCCA) (ферменты ТАА-YUCCA) у НПОП всех наземных растений.

Дупликации генов ТАА-подобных белков происходят, также, как это показано для белков ПБТ, совместно с образованием крупных таксонов растений или после их образования, но не до образования крупных таксонов.

Однако для белков YUCCA такая картина эволюции наблюдается лишь до появления эуфилофит (папоротниковые и семенные растения). Тогда как у эуфилофит дупликации белков YUCCA иногда происходят и до образования крупных таксонов, в результате, получившиеся паралоги фермента присутствуют в нескольких крупных таксонах.

ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ЧИСЛА КОПИЙ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА АУКСИНА

5.1 Количественный анализ числа гомологов генов ферментов ТАА/YUCCA у растений

Чтобы лучше понять какую роль в эволюции организмов растений играют процессы дупликации ферментов пути биосинтеза ауксина из триптофана (ТАА и YUCCA) нами было проведено исследование распределения числа копий генов ферментов этого пути в геномах видов растений, принадлежащих к разным таксонам. Для сравнения мы приводим также распределение генов ферментов ПБТ. Для того, чтобы распределение было по возможности более полным мы использовали данные только из полногеномных проектов, представленных в БД Plaza 2.5 (Van Bel et al., 2012). Поиск гомологов ферментов проводился с помощью программы BLASTP. В качестве поисковых запросов для поиска гомологов ферментов ПБА были взяты все паралоги ферментов этого пути у *A. thaliana*. Для выявления гомологов фермента у исследуемых организмов проводился реципрокный поиск по всем паралогам фермента *A. thaliana* для каждого фермента ПБА отдельно. Для более точного определения ортологов ферментов ПБА в разных организмах мы построили филогенетические деревья методом FASTTREE. На построенных деревьях ортологи определялись на основе кластеризации ферментов из разных организмов. В таблице 7 показана представленность ортологов ферментов ПБА в разных таксонах. Порядок ферментов в таблице (слева-направо) соответствует их последовательности в ПБА (рис. 3).

Таблица 7. Наличие гомологов ферментов синтеза ауксина (столбцы) в геномах растений (строки).

семейства белков ВИД	таксон	ASA	ASB	PAT	PAI	IGPS	TSA	TSB	TAA	YUCCA			
										YUCCA1,4	YUCCA2,6	YUCCA 3,5,7,9	YUCCA10,11
<i>Lotus japonicus</i>	двудольные	1	1	1	2	2e-50	1	2	2	1	1	1	1
<i>Medicago truncatula</i>	двудольные	4	7e-91	1	1	1	3e-111	2	3	1	2	2	1
<i>Glycine max</i>	двудольные	4	3	1	2	2	2	3	6	4	8	6	5
<i>Malus domestica</i>	двудольные	9	3	5	-	3	4	5	4	-	-	1	9
<i>Fragaria vesca</i>	двудольные	2	1	5	2	2e-59	4	2	3	1	2	2	2
<i>Manihot esculenta</i>	двудольные	2	2	1	1	2	2	2	2	2	4	4	4
<i>Ricinus communis</i>	двудольные	2	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	4
<i>Populus trichocarpa</i>	двудольные	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3	4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	двудольные	3	6	1	3	2	2	2	3	2	2	5	2
<i>Arabidopsis lyrata</i>	двудольные	3	2	5	1	3	2	2	3	2	2	5	2
<i>Carica papaya</i>	двудольные	2	1	2	4e-88	2	2	1	2	1	2	2	2
<i>Theobroma cacao</i>	двудольные	2	1	1	1	4	1	1	2	1	2	2	3
<i>Vitis vinifera</i>	двудольные	2	1	2	1	1	1	1	3	1	3	1	3
<i>Oryza sativa spp japonica</i>	однодольные	2	2	1	1	2	5	1	2	2	4	2	3
<i>Brachypodium distarhion</i>	однодольные	2	1	1	1	2	5	1	2	2	3	3	4
<i>Sorghum bicolor</i>	однодольные	1	1	1	2	3	2	1	3	-	4	2	3
<i>Zea mays</i>	однодольные	3	5	1	2	2	6	2	4	1	3	4	2
<i>Selaginella moellendorffii</i>	плауны	1	1	1	1	4e-55	1	9e-152	2	3			
<i>Physcomitrella patens</i>	мхи	2	2	1	1	1	1	4	4	6			
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	зел. водоросли (Chlorophyta)	1	1	1	1	1	1	1	-	-			
<i>Ostreococcus tauri</i>	зел. водоросли (Chlorophyta)	1	1	1	1	1	1	1	-	-			
<i>Micromonas sp. RCC299</i>	зел. водоросли (Chlorophyta)	1	1	1	1	1	1	1	-	-			
<i>Volvox carteri</i>	зел. водоросли (Chlorophyta)	1	1	1	1	1	1	1	-	-			
<i>Chlamidomonas reinhardtii</i>	зел. водоросли (Chlorophyta)	-	1	1	1	1	1	1	-	-			

Обозначения: Первый столбец таблицы – виды растений; второй – таксоны, к которым принадлежат растения; 3-14 столбцы – ферменты ПБА. Черным цветом текста выделены названия ферментов ПБТ, зелёным – ферментов ПБА(ТАА/YUCCA). Для YUCCA в таблице отдельно представлены данные для 4-х его основных подсемейств белков – 11-14 столбцы. Цифры в ячейках – это число гомологов фермента, выявленное при анализе полных геномов (цифрами выделенными жирным шрифтом показано присутствие в геноме 3-х или более

генов гомологов фермента; для YUCCA, соответственно, цифры для гомологов выделены жирным шрифтом, когда суммарное число гомологов фермента на геном по всем его подсемействам суммарно составляет 3-и или более гомолога). Числами в таблице, записанными в экспоненциальном виде, представлены значения уровней сходства (E-value) последовательности соответствующего фермента *A. thaliana* с ближайшим к ней гомологом, выявленного только среди EST последовательностей, в случаях, когда не было выявлено гомологов этого фермента среди полногеномных данных. Прочерк обозначает отсутствие гомологов данного белкового семейства как среди последовательностей белков, представленных в полногеномных данных, так и в библиотеках EST

В случае, когда в геномных последовательностях растений не удавалось обнаружить ни одного гомолога соответствующего фермента, для этих геномов проводился дополнительный поиск гомологов в библиотеках EST с помощью программы BLASTP (в таблице 7 в таких случаях мы приводим не число распознанных гомологов, но уровень сходства белковой последовательности соответствующего фермента с ближайшим к ней EST-гомологом – значения уровня сходства приведены в таблице в экспоненциальном виде). В качестве поискового запроса в этом случае выбирался один из гомологов (паралогов) соответствующего фермента ПБА *A. thaliana*. Принадлежность обнаруженных в библиотеках EST гомологов искомого фермента определялась также, как и при поиске гомологов ПБА среди белковых последовательностей БД Plaza 2.5, как описано выше.

Из таблицы 7 можно сделать вывод, что у зелёных водорослей (Chlorophyta) все ферменты ПБТ представлены только одной копией гена. У наземных растений количество гомологов ПБТ варьирует от одного гомолога до 9 (ASA – *Malus domestica*). При этом не прослеживается очевидной закономерности от вида к виду наземных растений, какие гены ПБТ дублированы, а какие нет. Стоит отметить, что гомологи ферментов ПБТ – биосинтеза триптофана из хоризмата (табл. 7) – присутствуют у всех исследованных видов водорослей (за исключением фермента ASA у *Chlamidomonas reinhardtii*) и у наземных растений, что соответствует общепринятым представлениям об универсальности ПБТ у бактерий, грибов и растений (Dosselaere, Vanderleyden, 2001; Braus, 1991; Maeda, Dudareva,

2012). Не обнаружение в одном случае гомологов ASA ни в полногеномных данных, ни среди EST последовательностей зеленой водоросли *C. reinhardtii*, по-видимому, объясняется неполнотой секвенирования генома. Универсальность ферментов ПБТ у растений согласуется с представлениями о вертикальной эволюции растений (Pires, Dolan, 2012).

Однако, ферменты TAA и YUCCA в отличие от ферментов ПБТ обнаруживаются, при поиске в полногеномных проектах, представленных в БД Plaza 2.5 (Van Bel et al., 2012), только у наземных растений, в то время как у водорослей они отсутствуют как в полногеномных, так и в EST данных.

В ПБА (TAA/YUCCA) число гомологов TAA варьирует от 2 до 6 (6 гомологов у *G. max*) на геном и число гомологов YUCCA от 4 (*Lotus japonicus*) до 23 (*Glycine max*). Что касается представленности различных подсемейств YUCCA в геномах цветковых растений, для большинства таксонов характерны наличие ферментов, относящихся к четырем основным подсемействам: (1) YUCCA1, 4; (2) YUCCA2, 6; (3) YUCCA3, 5, 7-9 и (4) YUCCA10, 11 (табл. 7). Однако, для некоторых видов, представители отдельных подсемейств YUCCA не были нами обнаружены ни в полногеномных данных, ни в библиотеках EST. Так не было выявлено гомологов в подсемействах YUCCA1, 4 и YUCCA2, 6 у двудольного *M. domestica* и белков подсемейства YUCCA1, 4 у однодольного *S. bicolor*. Этот результат является достаточно неожиданным, поскольку результаты экспериментов по нокаутам генов *yucca* *A. thaliana*, *O. sativa* и некоторых других видах растений показывают, что у мутантов-нокаутов по всем генам какого-либо из основных подсемейств *yucca* наблюдаются значительные отклонения в росте и развитии растения (табл. 9). Следовательно, этот вопрос нуждается в дальнейшем детальном изучении.

Можно отметить, что в ряде случаев наличие в крупном таксоне нескольких паралогов какого-то из ферментов наблюдается только у представителей отдельных порядков, семейств, родов. Так у двудольных на уровне всего таксона есть только один ген *asb* (табл. 7), но в роде Резуховидки: у *A. thaliana* есть 6 паралогов этого гена и у *Arabidopsis lyrata* - 2 паралога (табл. 7;

рис. 10). В некоторых случаях лишь у одного вида есть несколько специфичных для него паралогов фермента, то есть соответствующие дубликации и дивергенции генов произошли уже в ходе эволюции этого растения. Так белок PAI у *A. thaliana* представлен 3-мя паралогами, тогда как у его ближайшего родственника *A. lyrata* фермент PAI представлен только одним геном (табл. 7; рис. 12). Также у *Z. mays* есть 5, характерных именно для этого растения, паралогов белка ASB (табл. 7; рис. 10). Тогда как у других видов однодольных в этом кластере есть: у *O. sativa* – 2 паралога ASB и у *S. bicolor* и *Brachypodium distarhion* только по одному гену *asb*.

В связи с тем, что дубликации генов, произошедшие после образования в эволюции таксона, приводят к появлению гомологов, которые присутствуют только у части организмов таксонов, мы в таблице 8 при подсчете гомологов учитывали только гомологи характерные для большей части видов таксона (имеющиеся более чем у 90% из исследованных нами видов в таксоне).

Таблица 8. Количество гомологов ферментов биосинтеза ауксина, характерное для более чем 90% исследованных нами видов в крупном таксоне растений

taxon\enzyme	ASA	ASB	PAT	PAI	IGPS	TSA	TSB	TAA	YUCCA
двудольные	2	1	1	1	1	1	1	2	4
однодольные	2	1	1	2	3	3	1	3	
плауны	1	1	1	1	1	1	1	2	3
мхи	2	2	1	1	1	1	4	4	6
зеленые водоросли	1	1	1	1	1	1	1	-	-

Черным цветом текста в таблице (столбцы 2-8) выделены ферменты ПБТ, зелёным (столбцы 9-10) ферменты ПБА (TAA/YUCCA). Жирным шрифтом выделено количество паралогов фермента ≥ 3 .

Таким образом, в таблице учтены только те гомологи, которые возникли в эволюции в результате дивергенций ферментов произошедших до возникновения крупных таксонов или совместно с их возникновением, и не учитывались гомологи, возникшие в результате дивергенций ферментов на более поздних стадиях эволюции таксона (наблюдаемые только у части видов

таксона). Число гомологов фермента YUCCA для однодольных и двудольных в таблице указано в объединённой ячейке, так как каждая из 4-х групп гомологов (подсемейств) этого фермента одновременно включает представителей и однодольных, и двудольных (табл. 8).

Как можно видеть из таблиц 7 и 8 у водорослей дубликации генов ПБТ отсутствуют: все ферменты представлены одним геном. И только у наземных растений, начиная со мхов, некоторые из генов ПБТ (*asa* и *asb*) уже дублицированы. Если рассматривать только дубликации, охватывающие более 90% видов в каждом рассматриваемом в нашем исследовании таксоне (табл. 8), то у мхов двумя гомологичными генами представлены белки ASA и ASB; у однодольных двумя-тремя генами-паралогами представлены ферменты ASA, PAI, IGPS и TSA, хотя у двудольных из ферментов ПБТ только ASA представлен двумя паралогами. Тогда как остальные ферменты ПБТ двудольных представлены только одной копией гена. Напротив, ферменты TATA и YUCCA у наземных растений всегда дублицированы (табл. 8). В ПБА (TAA/YUCCA) у мха *P. patens* TAA представлен четырьмя паралогами и YUCCA – шестью паралогами (табл. 7). У плауна *S. moellendorffii* TAA представлен двумя паралогами, а YUCCA – тремя. В свою очередь, у однодольных TAA представлен тремя паралогами, и двумя паралогами у двудольных. Тогда как YUCCA представлен четырьмя паралогами как у однодольных, так и у двудольных.

Таким образом, проведенный выше анализ позволяет сделать вывод, что для генов *taa* и *yucca* характерно наличие значительно большего числа дубликаций по сравнению с генами ПБТ у наземных растений.

Чтобы количественно оценить уровень дубликаций генов ПБА (TAA/YUCCA) мы на рисунке 26 приводим график среднего количества гомологов генов этого пути в крупных таксонах растений. Для сравнения на графике также показаны соответствующие средние числа гомологов генов ПБТ. Среднее количество генов в таксоне рассчитывалось исходя из данных о количестве генов в геномах растений данного таксона (табл. 7).

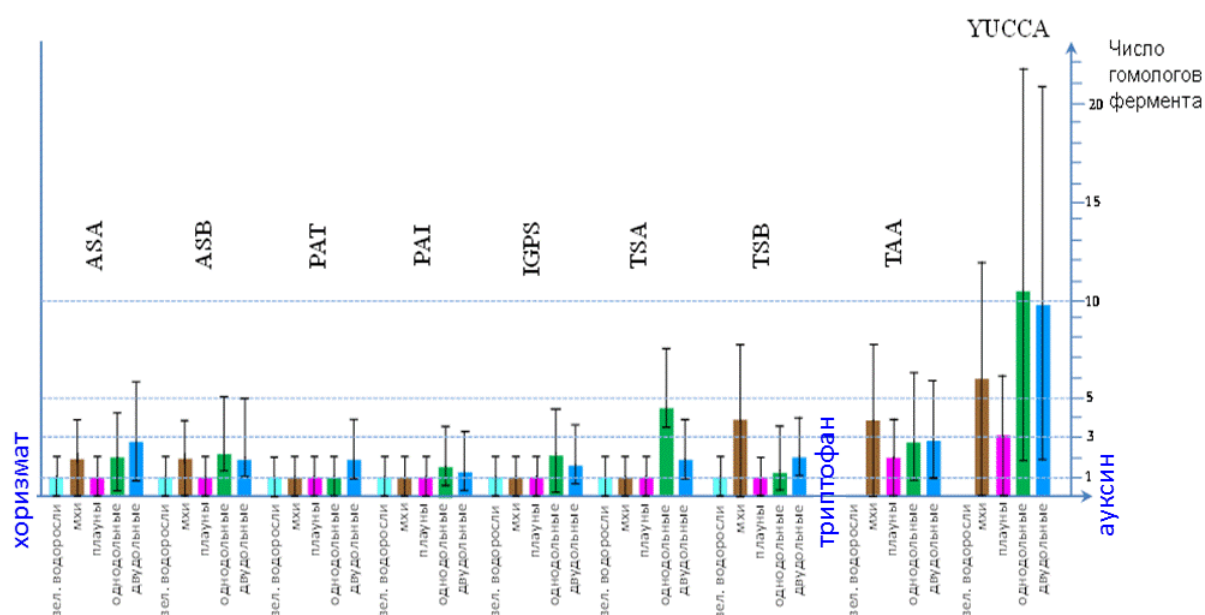


Рисунок 26. Распределение количества генов-гомологов ферментов ПБА в геномах различных таксонов растений. Названия ферментов биосинтеза ауксина расположены в верхней части графика. По оси Y отложено число гомологов фермента на геном в среднем для растений таксона. На столбиках отложены квантили: вниз от вершины столбика первый квантиль $Q_{10.25}$ и вверх третий квантиль $Q_{30.75}$

Среднее число гомологов ферментов ПБТ 1-2, за исключением числа гомологов ASA у двудольных – 2.8, гомологов TSA у однодольных – 4.5 и гомологов TSB у мха – 4 (рис. 26). Таким образом, количественный анализ гомологов ферментов ПБТ в геномах растений показывает, что в ходе эволюции растений происходило умеренное увеличение числа гомологов ферментов ПБТ: каждый фермент представлен только одной копией гена у зелёных водорослей и в среднем 1-4 копиями гена у наземных растений (рис. 26).

Среднее число гомологов ферментов TAA остаётся стабильным от мхов до двудольных от 2-х до 4-х гомологов на геном. Оно несколько выше, чем в среднем для ферментов ПБТ за исключением числа гомологов TSB у мхов: у них есть по 4 гомолога как TSB, так и TAA; TSA у однодольных: у них 4.5

гомолога TSB и 2.7 гомолога TAA; а также ASA у двудольных: у них по 2.8 гомологов как ASA, так и TAA (рис. 26).

Возникает вопрос, какое преимущество для растений в увеличении числа гомологов (паралогов) ферментов TAA? Чтобы разобраться в этом вопросе рассмотрим функции паралогов TAA. Функциональный анализ *taal1*, *tar1*, *tar2* *A. thaliana*, проведённый с помощью различных комбинаций нокаутных мутаций этих генов (Stepanova et al., 2008), показал, что одиночные нокаутные мутанты по гену *taal1*, хотя и демонстрируют изменённую реакцию на тень и устойчивы к этилену и NPA, но не показывают резких дефектов развития при нормальных условиях роста. Выпадение функции *tar1* не влияет на рост и развитие растения (Stepanova et al., 2008). Двойная нокаутная мутация *taal1/tar2* вызывает значительные дефекты в росте растений и развитии их органов: у них резко нарушается развитие сосудов и цветоносов, и они полностью стерильны (Stepanova et al., 2008). При этом для развития эмбриона важны все три гена *taal1*, *tar1* и *tar2*. В работе Степанова и др. (Stepanova et al., 2008) было показано, что, например, в проростках *tar1* экспрессируется на очень низком уровне (более чем в 500 раз меньше, чем *taal1*). *tar1* экспрессируется на незначительном уровне по сравнению с *taal1* и *tar2* в различных тканях, за исключением стручка. В стручке уровень транскриптов *tar1* составляет более половины от уровня *taal1* и в 10 раз меньше, чем уровень *tar2* (Poulet, Kriechbaumer, 2017). Паралогичные гены *tar1*, *tar2* и *taal1* произошли в ходе двух дупликаций. Сначала у НПОП двудольных произошла дупликация предкового гена *taa* на два паралога *tar2* и *taal1/tar1*. Затем у предков рода Резуховидка произошла дупликация гена *taal1/tar1* на паралоги *taal1* и *tar1* (рис. 17, Приложение: рисунок П1). То есть для всех двудольных характерны два паралога *taal1/tar1* и *tar2*, но у видов рода Резуховидка уже 3 паралога *taal1*, *tar1* и *tar2*. Исходя из информации о функциях известных паралогов TAA-подобных генов *A. thaliana* (одиночные мутанты по *taal1* или *tar2* не имеют проявлений в развитии) можно предположить, что функции этих двух паралогов у двудольных

перекрываются (Cheng et al., 2006, Stepanova et al., 2008). Таким образом, оба эти паралога *taa1* и *tar2* обеспечивают базальный синтез триптофана. Стоит отметить, что для ТАА не наблюдается увеличения уровня паралогизации при переходе от мхов и плаунов к семенным растениям.

Гены *уисса* характеризуются наибольшим числом гомологов на геном по сравнению со всеми остальными ферментами ПБА: их примерно в 1.5 раза больше у мхов (6 гомологов YUCCA) и плаунов (3 гомолога YUCCA), примерно в 2.3 раза больше у однодольных (10.5 гомологов на геном в среднем) и примерно в 3.5 раза больше у двудольных (9.7 гомологов YUCCA на геном в среднем) (рис. 26). Как уже отмечалось выше, больше всего представителей фермента YUCCA оказалось у *G. max* - 23 гомолога на геном.

Из тенденции к росту числа гомологов генов ферментов ПБА в ходе эволюции растений выпадает только снижение числа ферментов у плауна *S. moellendorffii* по сравнению со мхом *P. patens* как для трёх ферментов ПБТ (ASA, ASB и TSB – таб. 6, рис. 26), так и для ферментов ТАА и YUCCA (таб. 6, рис. 26). Это может быть связано с редукционным характером эволюции плаунов (Zimmermann, 1951).

Высокий уровень дупликации генов *уисса* в ходе эволюции растений по сравнению со степенью дупликации других ферментов ПБА (рис. 26) вызывает вопрос: какие адаптивные преимущества получают растения, от значительного числа гомологов (паралогов) фермента YUCCA? Лучше всего исследованы функции белков YUCCA у *A. thaliana*. В геноме *A. thaliana* идентифицировано 11 паралогов *уисса* разделенных на четыре подсемейства: (1) *уисса3*, 5, 7-9; (2) *уисса1*, 4; (3) *уисса2*, 6 и (4) *уисса10*, 11. Мутанты по какому-либо одному из этих 11 генов не имеют фенотипических проявлений, так как отсутствие функций одного члена подсемейства компенсируется активностью других его членов (Cheng et al., 2006, Stepanova et al., 2008). В то же время у нокаутных мутантов по парам генов *уисса*, в случаях, если эти пары генов принадлежат к одному подсемейству *уисса*, наблюдаются значительные отклонения в развитии различных органов и тканей на разных стадиях

развития растения. При этом у растений *A. thaliana* с нокаутными мутациями по паре генов *уисса* из разных подсемейств не наблюдается заметных фенотипических эффектов, так как функцию недостающего гена выполняет другой ген из того же подсемейства. То есть белки YUCCA каждого из 4 подсемейств обладают уникальными для данного подсемейства функциями, тогда как функции белков внутри каждого из четырех подсемейств в значительной степени перекрываются между собой в результате чего эффект нокаутных мутаций по одиночным генам подсемейства компенсируется за счёт работы других его генов. В то же время нужно отметить, что у некоторых других растений гены подсемейства *уисса*, представленные у *A. thaliana* двумя и более паралогами, могут быть представлены только одним геном. Так у *P. hybrida* (семейство паслёновые) подсемейство *уисса1,4* представлено одним геном *floozy* (Cheng et al., 2006; Gallavotti et al. 2008; Abu-Zaitoon et al., 2014) нокаутный мутант по которому обладает фенотипическими аномалиями, т.е. у него не находится паралога для компенсации мутации (Tobena-Santamaria et al., 2002). Фенотипические проявления имеют также одиночные мутанты у кукурузы (*Z. mays*) и риса (*O. sativa*) (Yamamoto et al., 2007, Gallavotti et al. 2008), хотя связь с отсутствием паралогов в этом подсемействе у риса не очевидна, так как подсемейство *уисса1,4* содержит два паралога (*Os:уисса1* и *Os:уисса4*).

В таблице 9 представлена, описанная в научной литературе, информация по функциям генов *уисса*. Из таблицы 9 можно видеть, что белки подсемейства *уисса1,4* (гены *уисса1,4* у *A. thaliana* и *floozy* у *P. hybrida*, в таб. 8) контролируют эмбриогенез и развитие семени. Но эти функции белков подсемейства YUCCA1, 4 в значительной степени перекрываются с функциями белков подсемейства YUCCA10, 11, так что только у нокаутного мутанта *уисса1-4,10,11-* наблюдаются кардинальные нарушения развития семени – в результате у этих мутантов не развивается базальная часть эмбриона (Cheng, 2007). Отметим, что в то время, как белки подсемейства YUCCA10, 11 экспрессируются и функционируют только на ранних этапах

эмбрионального развития и в семени, белки подсемейства YUCCA1, 4 участвуют ещё и в контроле формирования органов растения на более поздних стадиях его развития: формирование сосудистой ткани, и цветов. Белки подсемейства YUCCA2, 6 требуются для образования сосудистой ткани и цветов, развития стебля, а также для развития корня. Так, биосинтезирующие ауксин двойные мутанты *yusca1 yusca4*, тройные *yusca1 yusca2 yusca4* и четверные *yusca1 yusca2 yusca4 yusca6* дают постепенно усиливающееся нарушение образования жилок листа. Это предполагает, что для их формирования требуется пороговое количество ауксина, производимого локально флавин-содержащими монооксигеназами YUCCA (Cheng et al., 2006). Например, *yusca2* и *yusca6* являются основными генами *yusca*, экспрессирующимися во время развития пыльцы (Cecchetti et al., 2008; Cecchetti et al., 2017; Cheng et al., 2006). У двойных мутантов *yusca2 yusca6* не развиваются функциональная зрелая пыльца, но другие процессы развития у мутантов практически неотличимы от таковых у растений дикого типа (Cecchetti et al., 2008; Cecchetti et al., 2017; Cheng et al., 2006). Двойные мутанты *yusca1 yusca4* резуховидки не способны формировать третичные жилки в листьях и формируют прерывистые жилки в цветках (Cheng et al., 2006). Также эти мутанты *yusca1 yusca4* образуют меньше цветочных органов (Zhao, 2018). Четверные мутанты *yusca1 yusca2 yusca4 yusca6* производят булабовидные соцветия (Zhao, 2018). *Yusca1*, *yusca2*, *yusca4* и *yusca6* являются основными генами *yusca*, экспрессируемыми в примордиях листьев (Cheng et al., 2007).

Гены *yusca3*, *yusca5*, *yusca7*, *yusca8* и *yusca9* экспрессируются в корнях, а инактивация этих пяти генов *yusca* приводит к развитию коротких и агравитропных корней (Cheng et al., 2007). Однако в подсемействе *yusca3*, 5, 7-9 функции не всех паралофов, насколько это можно определить по данным мутационного анализа, взаимозаменяемы внутри подсемейства. Так белки YUCCA 3, 5, 7 участвуют в контроле развития корня, тогда как два других представителя этого подсемейства белки YUCCA 8 и 9 *A. thaliana* кроме этого ещё индуцируются при ранении, то есть участвуют в стрессовом ответе (табл.

9). Таким образом, мутационный анализ генов семейства *yucca* у *A. thaliana* показывает, что все 11 генов этого семейства у *A. thaliana* являются функциональными.

Таблица 9. Функции гомологов (паралогов) YUCCA у некоторых видов покрытосеменных на основе анализа нокаутных мутантов

Имя гена	асс. номер белка	Функции	Ссылки
<i>At:yuc1</i>	At4g32540	Вовлечён в эмбриогенез и развитие проростков; необходим для развития органов цветков, листьев и сосудистых тканей; предположительно отвечает за биосинтез ауксина в побегах.	Cheng et al., 2007; Zhao, 2001, 2018
<i>Os:yuccal</i>	BAG97267.1	Экспрессируется в верхушке coleoptily, верхушках листьев, корнях и тканях сосудов; антисмысловой вариант вызывает кардинальные аномалии роста и развития корней, стеблей и листьев.	Yamamoto, 2007
<i>Zm:spil</i>	ACI43575.1	Мутант Spil лишен латеральных органов, имеет значительно уменьшенное количество колосков, а сформированные соцветия в конечном итоге лишены цветковых органов.	Gallavotti et al., 2008
<i>At:yuc4</i>	At5g11320	Имеет две каталитически активные изоформы, yuc4a и yuc4b; участвует в эмбриогенезе и развитии проростков; необходим для развития органов цветков, листьев и сосудистых тканей; предположительно отвечает за биосинтез ауксина в побегах.	Cheng et al., 2006, 2007; Zhao, 2018
<i>Petunia:floozy(fzy)</i>	AAK74069.1	Экспрессируется в молодых листьях и прицветниках и в развивающихся цветках; мутант петунии по гену floozy отличается в образовании зачатков органов цветка в трех крайних мутовках цветка и одним из двух прицветников у основания цветка – т.о., он заблокирован на ранней стадии развития; кроме того, не формирует вторичных жилок на листьях и прицветниках и демонстрирует уменьшенное верхушечное доминирование в соцветии.	Tobena-Santamaria, 2002
<i>At:yuc2</i>	At4g13260	Необходим для формирования органов цветков, листьев и сосудистых тканей; предположительно отвечает за биосинтез ауксина в побегах.	Cheng et al., 2006, 2007; Cecchetti et al., 2008; Cecchetti et al., 2017; Zhao, 2018

Продолжение таблицы 9

Имя гена	асс. номер белка	Функции	Ссылки
<i>At:yuc6</i>	At5g25620	Необходим для формирования органов цветков, листьев и сосудистых тканей; предположительно отвечает за биосинтез ауксина в побегах.	Cheng et al., 2006, 2007; Cecchetti et al., 2008; Cecchetti et al., 2017; Zhao, 2018
<i>Os:yucca4</i>	BAV32703	Антисмысловый вариант гена вызывает аномалии роста и развития стебля.	Yamamoto, 2007
<i>At:yuc3</i>	At1g04610	Предположительно отвечает за биосинтез ауксина в побегах. Отвечает за биосинтез ауксина в корнях.	Won, 2011; Cheng et al., 2007; Chen et al., 2014
<i>At:yuc5</i>	At5g43890	Предположительно отвечает за биосинтез ауксина в побегах. Отвечает за биосинтез ауксина в корнях.	Woodward, 2005; Cheng et al., 2007; Chen et al., 2014
<i>At:yuc7</i>	At2g33230	Предположительно отвечает за биосинтез ауксина в побегах. Отвечает за биосинтез ауксина в корнях.	Won, 2011; Cheng et al., 2007; Chen et al., 2014
<i>At:yuc8</i>	At4g04610	Отвечает за биосинтез ауксина в корнях; подобно <i>yuc9</i> , индуцируется ранением; предполагаемый ген стресса.	Won, 2011; Hentrich et al., 2013; Cheng et al., 2007; Chen et al., 2014
<i>At:yuc9</i>	At1g04180	Отвечает за биосинтез ауксина в корнях; подобно <i>yuc8</i> , индуцируется ранением; предполагаемый ген стресса.	Won, 2011; Hentrich et al., 2013; Cheng et al., 2007; Chen et al., 2014
<i>At:yuc10</i>	At1g48910	Играет важную роль на ранних стадиях развития семян.	Cheng et al., 2007
<i>At:yuc11</i>	At1g21430	Играет важную роль на ранних стадиях развития семян.	Cheng et al., 2007
<i>Os:yucca11</i>	Os12G08780	Экспрессия ограничивается тканью эндосперма.	Abu-Zaitoon, 2012

5.2 Положительная корреляция между числом гомологов ряда ферментов пути биосинтеза триптофана и сложностью организмов растений

Исследование Вогель и Хортией (Vogel, Chortia, 2006) 36 видов, из различных таксонов эукариот, показало, что экспансия 194 белковых семейств (оценка проводилась по изменению общего числа белковых доменов в каждом семействе) из 1 219 исследованных ими семейств положительно коррелирует с ростом числа клеточных типов.

Поэтому, если функции триптофана как субстрата для синтеза регуляторных низкомолекулярных соединений существенны для растений, можно предположить, что увеличение числа гомологов ферментов ПБТ, т. е. сложности этого пути, будет коррелировать с увеличением сложности растений в процессе их эволюции.

Наиболее используемым показателем сложности организмов является количество типов клеток (подраздел 1.5 «Дупликации генов и эволюция сложности живых организмов» 1 главы «Обзор литературы»). Однако число клеточных типов оценено для ограниченного круга организмов. В работе Ланг и др. (Lang et al., 2010) была выявлена положительная достоверная корреляция между числом генов (белков), ассоциированных с транскрипцией (БАТ) и числом клеточных типов для ряда организмов, представляющих различные крупные таксоны. В связи с чем, в качестве показателя сложности организмов растений, мы использовали долю генов БАТ среди всех белок-кодирующих генов организма ($F_{\text{БАТ}}$). Этот показатель был взят нами для оценки сложности организмов, так как он доступен для более широкого круга организмов и более точно определяется, чем число клеточных типов.

Таблица 10 – Зависимость числа гомологов ПБТ для каждого из ферментов ПБТ от параметра $F_{\text{БАТ}}$

семейство белков	r	p
ASA	0.56	0.0025*
ASB	0.69	0.031*
PAT	0.29	0.27
PAI	0.79	0.0033*
IGPS	0.59	0.015*
TSA	0.43	0.094
TSB	0.38	0.15

В таблице представлены коэффициенты корреляции (r) и уровни статистической значимости (p) для этих двух параметров. * - достоверные значения ($p < 0.05$). Значение $F_{\text{БАТ}}$ для расчета взаимосвязи было взято из статьи Ланг и др. (Lang et al., 2010).

Исходя из этого мы провели анализ зависимости между сложностью организации растений ($F_{\text{БАТ}}$) и числом гомологов генов ПБТ в геномах 24-х видов растений, принадлежащих разным таксонам, с помощью программы statistica 8.0. Проведенный анализ выявил статистически значимую положительную корреляцию между сложностью организмов растений ($F_{\text{БАТ}}$) и числом гомологов для 4-х из 7 белков ферментов ПБТ: ASA ($p=0.0025$), ASB ($p=0.031$), PAI ($p=0.0033$), IGPS ($p=0.015$) (табл. 10).

Также выявлена значимая положительная корреляция между параметром $F_{\text{БАТ}}$ и суммарным числом гомологов всех ферментов пути биосинтеза триптофана растений ($r=0.77$; $p<0.0005$, рис. 27).

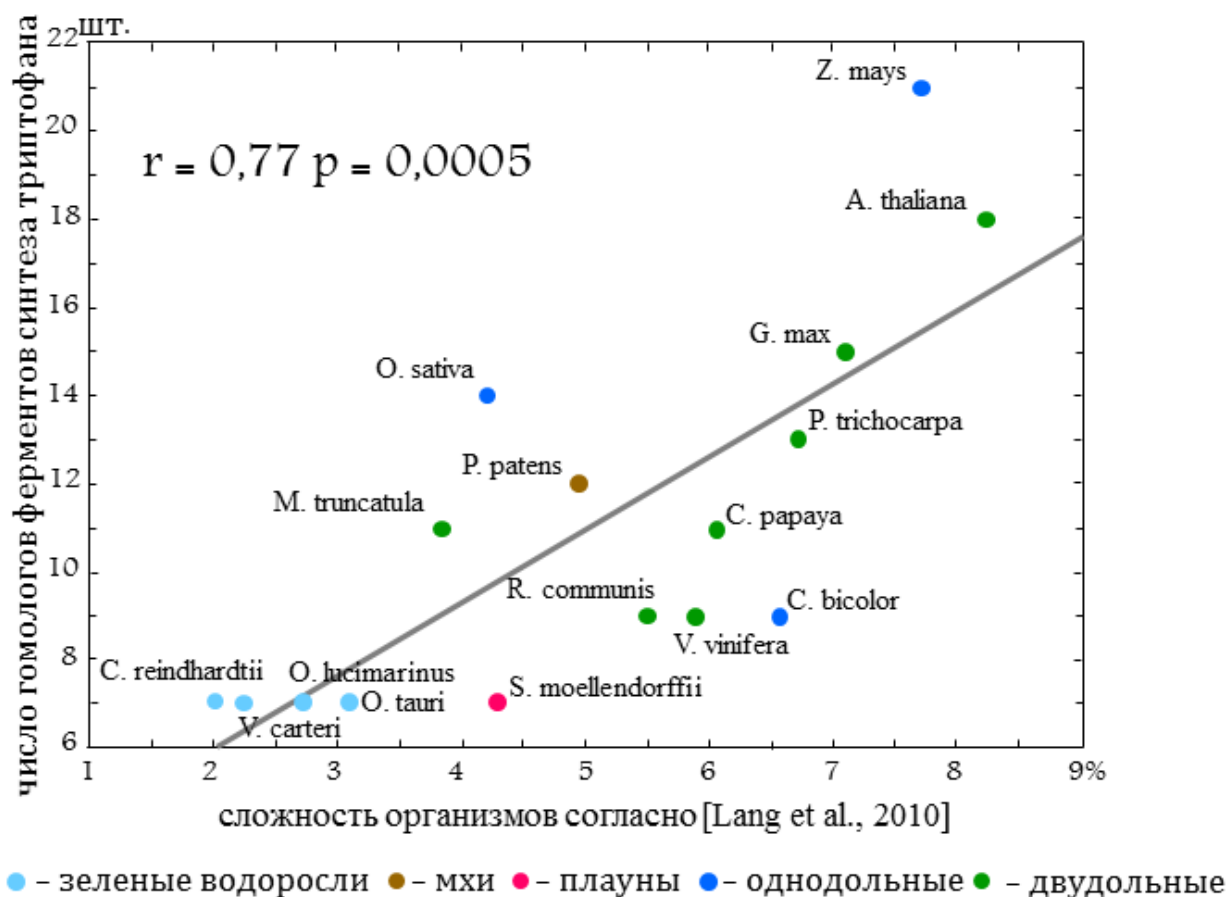


Рисунок 27. График зависимости числа гомологов ферментов пути биосинтеза триптофана от доли генов БАТ в геномах растений, $F_{\text{БАТ}}$. По оси X отложено значение параметра $F_{\text{БАТ}}$ (выраженное в %). По оси Y отложено суммарное число гомологов по всем ферментам ПБТ. Коэффициент корреляции и уровень его значимости для зависимости приведены на графике

На графике (рис. 27) Зеленые водоросли отдела Chlorophyta представлены тремя видами одноклеточных зелёных водорослей *C. reinhardtii*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus tauri* и одним видом колониальных водорослей *Volvox carteri*. *V. carteri* образуют большие, сферические колонии, состоящие из 2-6 тысяч хламиномонадо-подобных клеток (Lee, 2005). У этих 4-х, представленных в исследовании, видов водорослей доля БАТ среди всех белок-кодирующих генов составляет от 2 до 3 % и каждый из ферментов ПБТ в их геномах представлен одной копией гена, то есть у каждого из этих видов 7 ферментов ПБТ представлены 7-ю генами, как это видно на графике. У плауна *S. moellendorffii* доля БАТ составляет 4.5% и ферменты ПБТ у этого

вида представлены тоже 7 генами (то есть каждый фермент представлен 1 копией гена). У мха *P. patens* доля БАТ составляет 5% и все ферменты ПБТ у него представлены уже 12 паралогами (в среднем для пути 1.71 копии гена на фермент). У однодольных доля БАТ составляет от 5 до 6.8% и число всех паралогов ферментов ПБТ у них варьирует от 14 до 21 гена (в среднем от 2 до 3 копий гена на фермент). И у двудольных доля БАТ меняется от 3.8 до 8.5% и число всех паралогов ферментов ПБТ у них составляет от 9 до 18 (в среднем от 1.29 до 2.57 копий гена на фермент). Из чего можно сделать вывод о функциональной связи между уровнем дубликаций генов ферментов биосинтеза триптофана и усложнением организмов растений в ходе эволюции.

5.3 Обсуждение

Для того чтобы понять адаптивный смысл дубликаций ферментов ПБТ рассмотрим описанные в научной литературе функции гомологов (паралогов) ферментов этого пути. Функции паралогов хорошо выявляются в фенотипе в результате нокаутных мутаций генов-паралогов у растений в зависимости от разных состояний среды. Например, у *A. thaliana* ген *asa2* экспрессируется на конститутивном базальном уровне, а уровень экспрессии его паралога *asa1* в десять раз выше и может дополнительно повышаться в ответ на ранение или инфицирование бактериальными патогенами (Niyogi, Fink, 1992). Аналогично гены *asa1* *Ruta graveolens* и *oasa2* *O. sativa japonica* экспрессируются конститутивно, а гены *asa2* *R. graveolens* и *oasa1* *O. sativa* индуцируются ранением растения или в ответ на патогены (Bohlmann et al., 1995; Tozawa et al., 2001). Это предполагает участие второго паралога ASA2/OASA1 в защитном ответе растения. Ген, кодирующий TSB2 у *A. thaliana*, продуцирует только 10 % мРНК триптофан синтазы β в тканях листа, экспрессируется конститутивно на базальном уровне и необходим для роста растения при недостатке освещения. Его паралог, ген, кодирующий TSB1, экспрессирует 90 % всей мРНК триптофан синтазы β , но лишь при ярком освещении, напротив, его экспрессия подавляется недостатком освещения (Last et al., 1991). Т.е. ген

tsb1 обеспечивает работу фермента TSB на высоком уровне при нормальном дневном ярком освещении. В условиях же значительного недостатка света работает только ген *tsb2*, обеспечивая работу фермента и, соответственно, синтез триптофана на низком минимальном уровне.

Таким образом, исходя из известных функций паралогов ASA и TSB у семенных растений, можно предположить, что один из паралогов обычно обеспечивает базальный уровень синтеза триптофана в оптимальной ситуации, а другой паралог (либо несколько паралогов) его синтез в экстренных ситуациях.

Выход растений из водной среды на сушу сопровождался резким увеличением изменчивости параметров среды. Растения приспосабливались к новым условиям за счет усложнения их морфологии: увеличения количества тканей (появление корней; листьев; развитого стебля; новых тканей; позволивших освоить сушу папоротникам, хвощам, плаунам; переход от спор к семенам – у семенных папоротников (ископаемых растений), позволивший растениям оторваться от экосистем с высокой влажностью; появления тканей цветов и плодов у покрытосеменных растений) и усложнения молекулярно-генетических систем растений. Это усложнение морфологии позволило растениям занимать в процессе эволюции все большее число экологических ниш, а также освоить ниши со значительными колебаниями условий (жара – холод, дожди – засуха и т.д.). Это обстоятельство может объяснить выявленные нами положительные корреляции между долей генов БАТ (мерой сложности организма) и числом гомологов ферментов синтеза триптофана как для всего ПБТ в целом, так и для трех (ASA/ASB, PAI и IGPS) из шести его ферментов в частности, так как триптофан служит источником для синтеза ауксина – ключевого гормона, регулирующего развитие растений.

На графике (рис. 27) привлекает внимание выпадение плаунов (*S. moellendorffii*) из общей тенденции к росту уровня дупликации генов ферментов ПБТ в ходе эволюции. Так у плауна, так же как у Зеленых водорослей, все ферменты ПБТ представлены одной копией гена. Тогда как у

мха (*P. patens*) ряд ферментов ПБТ дублировано: ASA представлено 2 паралогами, ASB – 2 паралогами и TSB – 4 паралогами (табл. 7). Хотя мхи появились в эволюции раньше, чем плауны. Сначала в эволюции наземных растений произошла дивергенция на мохообразные и сосудистые растения. Сосудистые растения появились ~410 миллионов лет назад, затем распались на несколько линий, из которых сохранились только две: эуфиллофиты (папоротники и семенные растения) и плауновидные или ликофиты (Banks et al., 2011). Плауны появились в эволюции при дивергенции общих предков сосудистых растений на плауновидные, а также папоротники и семенные растения (Spencer et al., 2020). Это может быть объяснено редуционным характером эволюции плаунов. Предполагается, что плауновидные (ликофиты) возникли путем редукции из более сложного состояния предшественника, в результате процесса эволюционной редукции (Zimmermann, 1951). Так, плауны рода *Selaginella* обладают чрезвычайно маленькими геномами (гаплоидный геном 84-110 Mb) (Little et al., 2007). Тогда как, например, размер генома мха *P. patens* (~487 Mb) (Cove et al., 2015).

5.4 Заключение по главе 5

Выявлена статистически значимая положительная связь ($p=0.0005$) между параметром $F_{\text{БАТ}}$ (долей генов, ассоциированных с транскрипцией по отношению к числу всех белок-кодирующих генов в геноме), рассматриваемым как мера сложности организма, и числом всех гомологов ферментов в ПБТ у растений. Также были выявлены статистически значимые положительные корреляции между $F_{\text{БАТ}}$ и числом гомологов четырёх из семи белков ферментов ПБТ: ASA ($p=0.0025$), ASB ($p=0.031$), PAI ($p=0.0033$), IGPS ($p=0.015$). Эти корреляции могут быть связаны с адаптациями растений в ответ на резкое усложнение условий среды при выходе растений из воды на сушу и её дальнейшем освоении, выражающимися, как в усложнении организмов

(усложнение морфологии, числа тканей), так и в соответствующем усложнении регуляции биосинтеза триптофана.

В ходе исследования распространённости гомологов ПБА было выявлено, что гомологи ферментов ПБТ (ASA, ASB, PAT, PAI, IGPS, TSA и TSB) есть во всех исследованных организмах (исключение составляет отсутствие ASA у *Chlamidomonas reinhardtii* – вероятно по причине недосеквенирования генома). Тогда как гомологи ферментов ТАА и YUCCA есть у всех исследованных наземных растений начиная со мхов и плаунов, но отсутствуют у зелёных водорослей (Chlorophyta).

Количественный анализ числа гомологов ферментов ПБА у растений показал, что все ферменты ПБТ у зелёных водорослей (Chlorophyta) представлены одним гомологом, но у наземных растений происходит умеренная мультипликация (паралогизация) некоторых ферментов этого пути (1 - 4.5 гомолога в среднем на геном для таксонов растений).

При этом число гомологов ТАА достигает 4-х уже у мхов и остаётся стабильным в дальнейшей эволюции наземных растений (2-4 гомолога на геном). Тогда как число гомологов YUCCA кардинально увеличивается в ходе эволюции наземных растений (6 гомологов для мхов, 3 – для плаунов и 10.5 и 9.7 гомологов на геном у однодольных и двудольных, соответственно). Что, вероятно, связано с тем, что осуществляемая ферментами YUCCA последняя реакция ПБА превращение пировиноградной кислоты (ИПК) в ауксин (ИУК) является лимитирующим звеном этого пути (Zhao et al., 2001). Значительное число гомологов (паралогов) фермента с различной регуляцией может быть эффективно только для лимитирующего звена биохимического пути.

Анализ известных функций паралогов ферментов ПБА показал, что в результате паралогизация генов пути биосинтеза триптофана (ПБТ) и ТАА один паралог/паралоги обеспечивает базальные уровни ауксина, а другой (другие) паралог (паралоги) участвует(ют) в реакции организма в целом на экстремальные или оптимальные средовые ситуации. То есть эти ферменты обеспечивают изменение синтеза ауксина на уровне всего организма в ответ

на изменения окружающей обстановки. Таким образом, они отвечают за рост, жизнедеятельность всего растения и его реакции на внешние стимулы. Эволюционные изменения в этих ферментах позволяют всему организму растения адаптироваться к глобальным изменениям внешних условий. Адаптация организма в целом к изменениям в окружающих условиях единственный способ приспособления малодифференцированных организмов к изменяющимся условиям.

Анализ известных функций паралогов YUCCA показал, что эти паралоги активируются стадие- и органо-/тканеспецифично, регулируя в такой манере, локально, деление, рост и дифференцировку клеток. В результате отдельные паралоги YUCCA позволяют регулировать синтез ауксина локально, в различных органах, тканях и на разных стадиях развития растения. Что позволяет растениям реагировать на средовые стимулы локально: реакциями в отдельных органах и тканях или на разных стадиях развития. Также это позволяет растению адаптироваться к глобальным изменениям внешней среды локально, адаптируясь к ним изменениями отдельных органов, тканей или в отдельных стадиях развития. Это особенно актуально для высших растений, так как у них разные органы (корень, стебель, листья) или части растения (разные участки ствола и листья у деревьев на разных ярусах) существуют в совершенно разных экологических условиях и должны адаптироваться к различным ситуациям более-менее независимо друг от друга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ДИССЕРТАЦИИ

Ауксин является ключевым гормоном, контролирующим большинство процессов роста и морфогенеза растений. Так как растения ведут сидячий образ жизни, то регуляция роста и морфогенеза растений является для них основным способом адаптации к условиям окружающей среды. Изучение появления и этапов эволюции ПБА у растений помогает нам понять, за счёт

чего растения смогли перейти от водного к наземному образу жизни и далее адаптировались ко всё более суровым наземным экосистемам.

На первом этапе нашего исследования мы провели анализ эволюции ферментов ПБТ у наземных растений. Наши результаты согласуются с выводом Юэ и др. (Yue et al., 2014) о том, что ряд генов ПБТ появился у общих предков красных и зелёных водорослей в ходе вертикальной эволюции от предков цианобактерий и, дополнительно, подтверждают его. Дивергенции на паралоги всех генов ферментов ПБТ происходят совместно с образованием крупных таксонов, уровня не ниже класса, или позже, но не до их образования.

На втором этапе нашего исследования мы проанализировали эволюцию семейств белков ТАА и YUCCA.

Было показано, что белок КпТАА харофитовой водоросли *K. nitens* более близок к аллииназам, чем к белкам ТАА наземных растений, что поддерживает гипотезу Юэ и др. (Yue et al., 2014) о приобретении ТАА ранними наземными растениями в результате ГПГ от бактерий к НПОП наземных растений.

Также было показано, что впервые описанное нами семейство белков FMO типа Pb, включающее в себя ранее описанный белок GAQ82387.1 *K. nitens* – гомолог YUCCA (Wang et al., 2014), не является близкородственным по отношению к белкам семейства YUCCA. Что поддерживает гипотезу Юэ и др. (Yue et al., 2014) о приобретении YUCCA ранними наземными растениями в результате ГПГ от бактерий к НПОП наземных растений.

На третьем этапе нашего исследования мы проанализировали дубликации ферментов ПБА, чтобы оценить роль их мультипликации (паралогизации) в эволюции функций растений.

Было показано, что существует достоверная положительная корреляция между общим числом гомологов ферментов ПБТ у растений и долей генов, ассоциированных с транскрипцией, в геномах растений (характеристика, рассматриваемая как мера сложности организмов). Аналогичная достоверная положительная корреляция была показана также и между числом отдельных

гомологов ферментов этого пути (ASA, ASB, PAI и IGPS) и долей генов, ассоциированных с транскрипцией, в геномах растений. Последняя отражает сложностью организмов растений. Полученный результат свидетельствует о функциональной связи между уровнем дупликаций генов ферментов ПБТ и усложнением организмов растений в ходе эволюции.

Также показано, что гомологи ферментов ПБТ (ASA, ASB, PAT, PAI, IGPS, TSA и TSB) есть во всех исследованных организмах растений, тогда как гомологи ферментов TAA и YUCCA есть у всех исследованных наземных растений, начиная со мхов, но отсутствуют у зелёных водорослей (Chlorophyta).

Показано, что все ферменты ПБТ у водорослей представлены одной копией гена, тогда как у наземных растений наблюдалось умеренное увеличение числа их гомологов (1 - 4.5 гомолога в среднем на геном).

Также было показано, что число гомологов TAA достигает 4-х у мхов и остаётся стабильным в дальнейшей эволюции наземных растений (2-4 гомолога на геном). При этом в эволюции наземных растений происходит кардинальное увеличение числа гомологов YUCCA (от 6 и 3 гомолога YUCCA на геном у мхов и плаунов до 10.5 и 9.7 гомологов на геном у однодольных и двудольных, соответственно).

Результаты проведённого анализа известных функций паралогов ферментов ПБТ и TAA предполагают, что паралоги их ферментов разделяются функционально на две группы. Паралоги/паралог первой группы отвечают(ет) за базальный синтез продукта, тогда как паралоги/паралог второй группы отвечают за дополнительный индуцибельный синтез продукта в ответ на воздействие внешних факторов (как деструктивных, так и конструктивных для развития и жизни растения).

В свою очередь, результаты анализа функций паралогов YUCCA предполагают, что они разделяются по функциям ткане-, органо- или стадийспецифично. Что может позволять растению адаптироваться к внешним условиям не только «всем организмом», но и «органами», «тканями», «стадиями развития» по отдельности.

Это позволяет нам сформулировать гипотезу, что паралоги ферментов пути синтеза триптофана (ПБТ) и ТАА отвечают за жизнедеятельность и адаптацию растений к изменению внешних условий на уровне всего организма, а паралоги YUCCA за жизнедеятельность и адаптацию к изменению внешних условий на локальных уровнях: на уровне отдельных органов, тканей и стадий развития растения.

Юэ и др. (Yue et al., 2014) была выдвинута гипотеза о происхождении ПБА(ТАА/YUCCA) у первых наземных растений. Затем, на основании исследования генома Харофитовой водоросли *K. nitens* Вангом и др. (Wang et al., 2014) была предложена альтернативная гипотеза о более раннем появлении ПБА(ТАА/YUCCA) в эволюции, уже у Харофитовых водорослей. Предпринятое нами более детальное исследование эволюции и структур ферментов ПБА(ТАА/YUCCA) выявило ряд фактов, свидетельствующих в пользу первоначальной гипотезы Юэ и др. о происхождении ПБА(ТАА/YUCCA) у первых наземных растений. Также в нашем исследовании была уточнена систематика ферментов пути биосинтеза триптофана (ПБТ) и ферментов ТАА и YUCCA.

ВЫВОДЫ

1. На основании сравнительного и филогенетического анализа показано, что ферменты пути биосинтеза триптофана произошли у высших растений (Streptophyta) в результате вертикальной эволюции от зелёных водорослей (Chlorophyta).
2. На основе сравнительного анализа последовательностей и структуры гомологов белка KnTAA (NCBI: GAQ80308.1) Харофитовой водоросли *K. nitens* у растительных и нерастительных таксонов впервые показано более высокое сходство KnTAA с аллииназами наземных растений, чем с белками TAA, свидетельствующее об их неспособности выполнять функцию триптофанаминотрансфераз по синтезу индолил-3-пировиноградной кислоты, что позднее было подтверждено независимым экспериментальным исследованием.
3. На основе филогенетического анализа последовательностей белков суперсемейства флавинмонооксигеназ класса В и белка KnFMO (NCBI: GAQ82387.1) *K. nitens* впервые показано, что этот белок принадлежит к новому семейству FMO IIb типа, включающему последовательности бактерий, красных, одноклеточных и многоклеточных зеленых водорослей, наземных растений и грибов и не является родственным к белкам семейства YUCCA.
4. На основе сравнительного анализа последовательностей и структур суперсемейства флавинмонооксигеназ класса В, YUCCA и белка KnFMO *K. nitens* впервые были показаны различия в их последовательностях и структурах, свидетельствующие о неспособности KnFMO выполнять функцию по синтезу ауксина (индолил-3-уксусной кислоты), что предполагает происхождение пути биосинтеза ауксина у наземных растений в результате горизонтального переноса предковых генов от организмов нерастительных таксонов к общему предку наземных растений.

5. Количество копий генов в геноме у ферментов пути биосинтеза триптофана (как для числа всех копий генов ферментов этого пути, так и для некоторых отдельных ферментов ASA/ASB, PAI и IGPS) достоверно коррелирует со сложностью организмов растений.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Turnaev, I.I.** The Number of Homologs of Some Enzymes Involved in Tryptophan Biosynthesis Is Correlated to the Proportion of Proteins Associated with Transcription in Plants. / И.И. Турнаев, И.Р. Акбердин, В.В. Суслов, Д.А. Афонников // Russian Journal of Genetics: Applied Research. - **2015**. - Т. 5 № 3. - С. 308-312. **IF. Wos 0.6**.
2. **Turnaev, I.I.** Plant auxin biosynthesis did not originate in charophytes. / I.I. Turnaev, K.V. Gunbin, D.A. Afonnikov // Trends Plant Sci. - **2015**. - Т. 20. № 8. - С. 463–465. **IF. 20.5**.
3. **Turnaev, I.I.** The Phylogeny of Class B Flavoprotein Monooxygenases and the Origin of the YUCCA Protein Family. / I.I. Turnaev, K.V. Gunbin, V.V. Suslov, I.R. Akberdin, N.A. Kolchanov, D.A. Afonnikov // Plants (Basel). - **2020**. - Т. 9. № 9. - 1092. **IF 4.0**.

Тезисы конференций

1. **Turnaev, I.I.** Molecular evolution of proteins belonging to auxin biosynthesis gene network in plants. / I.I. Turnaev, Akberdin I.R., Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Afonnikov D.A. В сб.: Abstracts of the eighth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure\systems biology (BGRS-SB – 2012). // - Novosibirsk: IC&G Press. - 2012. - С. 320.
2. **Turnaev, I.I.** Molecular evolution of proteins belonging to auxin biosynthesis gene network in plants. В сб.: Molecular Phylogenetics: Contributions to the 3rd Moscow International Conference "Molecular Phylogenetics", Moscow, Russia, July 31 - August 4, 2012). Compiled by A. Troitsky, L. Rusin, and V. Aleoshin. // I.I. Turnaev, I.R. Akberdin, V.V. Mironova, N.A. Omelyanchuk, D.A. Afonnikov. - М. - 2012. - С. 89.
3. **Turnaev, I.I.** Increasing the number of paralogs for enzymes involved in tryptophan biosynthesis during the evolution of land plants. В сб.: Abstracts of the Ninth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB, June 23-28, 2014). // I.I. Turnaev, K.V. Gunbin, I.R. Akberdin, V.V. Mironova, N.A. Omelyanchuk, D.A. Afonnikov. - Novosibirsk: Publishing House SB RAS. - **2014**. - С. 163.
4. **Turnaev, I.I.** Molecular evolution of yucca protein family. В сб.: The tenth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure / systems biology (BGRS-SB – 2016). // I.I. Turnaev, V.V. Suslov, K.V. Gunbin, D.A. Afonnikov. – Novosibirsk. - **2016**. - С. 324.

5. **Турнаев, И.И.** Молекулярная эволюция белков семейства YUCCA, В книге: Беляевские чтения. Тезисы докладов Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. // И.И. Турнаев, В.В. Суслов, К.В. Гунбин, Д.А. Афонников. - Новосибирск: ИЦиГ СО РАН. - **2017**. - С. 181.
6. **Турнаев, И.И.** Анализ эволюции пути биосинтеза ауксина у наземных растений, В сборнике: БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ. материалы IX международного конгресса. // И.И. Турнаев, К.В. Гунбин, В.В. Суслов, И.Р. Акбердин, Н.А. Колчанов, Д.А. Афонников. - Новосибирск: ИЦиГ СО РАН. - **2017**. - С. 394–395.
7. **Turnaev, I.** Discordant evolution of YUCCA family proteins demonstrated along sequence. В книге: Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2018). The Eleventh International Conference. // I. Turnaev, K. Gunbin, V. Suslov, D. Afonnikov. - Новосибирск: ИЦиГ СО РАН. - **2018**. - С. 192.
8. **Turnaev, I.I.**, Suslov V.V., Afonnikov D.A., Gunbin K.V., Phylogenetic relationships between fmo classes and the origin of YUCCA, В книге: Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019). Abstracts. Eds. A.V. Kochetov, E.A. Salina; Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. // I.I. Turnaev, V.V. Suslov, D.A. Afonnikov, K.V. Gunbin. - Новосибирск: ИЦиГ СО РАН. - **2019**. - С. 217.
9. **Turnaev, I.** FMO superfamily protein phylogeny and the origin of yucca family. В сб.: Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2020). The Twelfth International Multiconference Abstracts. // I. Turnaev, V. Suslov, K. Gunbin, D. Afonnikov. - Новосибирск: ИЦиГ СО РАН. - **2020**. - С. 261–262.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колчанов, Н.А. Моделирование биологической эволюции: регуляторные генетические системы и кодирование биологической организации. / Н.А. Колчанов, В.В. Суслов, К.В. Гунбин // Информационный вестник ВОГИС. - 2004. - Т. 8. № 2. - С. 86–99.
2. Лутова, Л.А. Генетика развития растений. / Л.А. Лутова, Т.А. Ежова, И.Е. Додуева, М.А. Осипова. Учебник под редакцией академика РАН С.Г. Инге-Вечтомова. - С-пб.: Изд-во Н-Л. 2011. - 432 с.
3. Полевой, В.В. Фитогормоны. / В.В. Полевой. Л., - 1982. - С. 81–124, 217–223.
4. Родионов, А.В. Генетические механизмы прогрессивной эволюции и видообразования у растений: мультипликация генов как способ адекватного и наследуемого ответа генома на действие факторов внешней среды. / А.В. Родионов // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. - 2023. - Т. 22. N. 1. DOI: 10.14258/pbssm.2023061.
5. Розов, С.М. Ауксин: биосинтез, метаболизм, транспорт. / С.М. Розов, А.А. Загорская, Е.В. Дейнеко, В.К. Шумный // Успехи современной биологии. - 2013. - Т. 133. N. 1. - С. 50–62.
6. Стегний, В.Н. Цитогенетика эволюционного процесса. / В.Н. Стегний. Учебно-методическое пособие. Томск. - 2013. - С. 39. <https://core.ac.uk/download/pdf/287482599.pdf>
7. Суслов, В.В. Генетические механизмы кодирования биологической сложности. / В.В. Суслов, К.В. Гунбин, Н.А. Колчанов // Экологическая генетика. - 2004. - Т. 2. В. 1. - С. 13–26.
8. Цыганкова, В.Г. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Молекулярно-генетический контроль проведения и реализации сигналов ауксинов. / В.Г. Цыганкова, Л.А. Галкина, Л.И. Мусатенко, К.М. Сытник // Biopolymers and cell. -2005. - Т. 21. N. 3. - С. 187–219.
9. Abu-Zaitoon, Y.M. A large increase in IAA during development of rice grains correlates with the expression of tryptophan aminotransferase OsTAR1 and a grain-specific YUCCA. / Y.M. Abu-Zaitoon, K. Bennett, J. Normanly, H.M. Nonhebel // Physiologia plantarum. - 2012. - V. 146. N. 4. - С. 487–499.
10. Abu-Zaitoon, Y.M. Phylogenetic analysis of putative genes involved in the tryptophan-dependent pathway of auxin biosynthesis in rice. / Y.M. Abu-Zaitoon // Applied biochemistry and biotechnology. - 2014. - V. 172. N. 5. - С. 2480–2495.
11. Adami, C. What is complexity? / C. Adami // BioEssays. - 2002. - V. 24. N. 12. - С. 1085–1094. doi:10.1002/bies.10192.

12. Ai, Y. Preliminary study on the function of TAA1, a key enzyme in auxin biosynthesis, in *Klebsormidium flaccidum*. / Y. Ai, Z.-H. Zhang, Y.-Y. Zheng, B.-J. Zhong, Z.-Q. Zhu // *Zhiwu Shengli Xuebao/Plant Physiol. J.* - 2018. - V. 54. N. 9. - C. 1451–1458.
13. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell.* / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter - 5. - Garland Science. - 2008. - C. 1392. - ISBN 0815341059.
14. Amin, S.A. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. / S.A. Amin, L.R. Hmelo, H.M. Van Tol, B.P. Durham, L.T. Carlson, K.R. Heal, R.L. Morales, C.T. Berthiaume, M.S. Parker, B. Djunaedi, A.E. Ingalls, M.R. Parsek, M.A. Moran, E.V. Armbrust // *Nature.* - 2015. - V. 522. - C. 98–101.
15. Anderson, P. Spontaneous tandem genetic duplications in *Salmonella typhimurium* arise by unequal recombination between rRNA (*rrn*) cistrons. / P. Anderson, J. Roth // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* - 1981. - V. 78. N. 5. - C. 3113–3117.
16. Aravind, L. Origin of multicellular eukaryotes—Insights from proteome comparisons. / L. Aravind, G. Subramanian // *Curr Opin Genet Dev.* - 1999. - V. 9. - C. 688–694.
17. Arendt, D. The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. / D. Arendt // *Nat. Rev. Genet.* - 2008. - V. 9. - C. 868–882
18. Ashen, J.B. GC-SIM-MS detection and quantification of free indole-3-acetic acid in bacterial galls on the marine alga *Prionitis lanceolata* (Rhodophyta). / J.B. Ashen, J.D. Cohen, L.J. Goff // *Journal of Phycology.* - 1999. - V. 35. N. 3. - C. 493–500.
19. Augier, H. Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. I. Recherche et tentatives d'identification des auxines. / H. Augier // *Bot Mar.* - 1976. - V. 19. - C. 127–143.
20. Bagwell, C.E. A diverse assemblage of indole-3-acetic acid producing bacteria associate with unicellular green algae. / C.E. Bagwell, M. Piskorska, T. Soule, A. Petelos, C.M. Yeager // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 2014. - V. 173. N. 8. - C. 1977–1984.
21. Ballou, D.P. “The reaction mechanisms of Groups A and B flavoprotein monooxygenases,” in *Handbook of Flavoproteins: Complex Flavoproteins, Dehydrogenases and Physical Methods.* / D.P. Ballou, B. Entsch. eds R. Hille, S. Miller, B.A. Palfey - Berlin: De Gruyter. - 2013. - C. 1–28.
22. Banks, J.A. *Selaginella* Genome Identifies Genetic Changes Associated with the Evolution of Vascular Plants. / J.A. Banks, T. Nishiyama, M. Hasebe, J.L. Bowman, M. Gribskov, C. dePamphilis, V.A. Albert, N. Aono, T. Aoyama, B.A. Ambrose, N.W. Ashton, M.J. Axtell, E. Barker, M.S. Barker, J.L. Bennetzen, N.D. Bonawitz, C. Chapple, C. Cheng, L.G.G. Correa, M. Dacre, J. DeBarry, I. Dreyer, M. Elias, E.M. Engstrom, M. Estelle, L. Feng, C. Finet, S.K. Floyd, W.B. Frommer, T. Fujita, L. Gramzow, M. Gutensohn, J. Harholt, M. Hattori, A. Heyl, T. Hirai,

- Y. Hiwatashi, M. Ishikawa, M. Iwata, K.G. Karol, B. Koehler, U. Kolukisaoglu, M. Kubo, T. Kurata, S. Lalonde, K. Li, Y. Li, A. Litt, E. Lyons, G. Manning, T. Maruyama, T.P. Michael, K. Mikami, S. Miyazaki, S.-I. Morinaga, T. Murata, B. Mueller-Roeber, D.R. Nelson, M. Obara, Y. Oguri, R.G. Olmstead, N. Onodera, B.L. Petersen, B. Pils, M. Prigge, S.A. Rensing, D. M. Riaño-Pachón, A.W. Roberts, Y. Sato, H.V. Scheller, B. Schulz, C. Schulz, E.V. Shakhov, N. Shibagaki, N. Shinohara, D.E. Shippen, I. Sørensen, R. Sotooka, N. Sugimoto, M. Sugita, N. Sumikawa, M. Tanurdzic, G. Theissen, P. Ulvskov, S. Wakazuki, J.-K. Weng, W.W.G.T. Willats, D. Wipf, P.G. Wolf, L. Yang, A.D. Zimmer, Q. Zhu, T. Mitros, U. Hellsten, D. Loqué, R. Otiilar, A. Salamov, J. Schmutz, H. Shapiro, E. Lindquist, S. Lucas, D. Rokhsar, I.V. Grigoriev // *Science*. - 2011. - V. 332. N. 6032. - C. 960–963. doi:10.1126/science.1203810
23. Barbez, E. A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. / E. Barbez, M. Kubes, J. Rolčík, C. Beziat, A. Pěňčík, B. Wang, M.R. Rosquete, J. Zhu, P.I. Dobrev, Y. Lee, E. Zazimalova, J. Petrsek, M. Geisler, J. Friml, J. Kleine-Vehn // *Nature*. - 2012. - V. 485. N. 7396. - C. 119–122.
24. Bartel, B. ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. / B. Bartel, G. Fink // *Science*. - 1995. - V. 268. N. 5218. - C. 1745–1748.
25. Bartel, B. Auxin biosynthesis. / B. Bartel // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* // - 1997. - V. 48. C. 51–66.
26. Basu, S. Early embryo development in *Fucus distichus* is auxin sensitive. / S. Basu, H. Sun, L. Brian, R.L. Quatrano, G.K. Muday // *Plant Physiol.* - 2002. - V. 130. N. 1. - C. 292–302.
27. Bell, G. Size and complexity among multicellular organisms. / G. Bell // *Biological Journal of the Linnean Society*. - 1997. - V. 60. N. 3. - C. 345–363. doi:10.1111/j.1095-8312.1997.tb01500.x
28. Benjamins, R. Auxin: The looping star in plant development. / R. Benjamins, B. Scheres // *Annu Rev Plant Biol.* - 2008. - V. 59. - C. 443–465.
29. Benkova, E. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. // E. Benkova, M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertova, G. Jurgens, J. Friml / *Cell*. - 2003. - V. 115. - C. 591–602.
30. Bennett, M.J. Arabidopsis AUX1 Gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism. / M.J. Bennett, A. Marchant, H.G. Green, S.T. May // *Science*. - 1996. - V. 273. N. 5237. - C. 948–950.
31. Benson, D.A. GenBank. / D.A. Benson, M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, E.W. Sayers // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - V. 41 (Database issue). - C. D36–42.

32. Bernardi, J. Chourey Impaired P.S. Auxin Biosynthesis in the defective endosperm18 Mutant Is Due to Mutational Loss of Expression in the ZmYuc1 Gene Encoding Endosperm-Specific YUCCA1 Protein in Maize. / J. Bernardi, A. Lanubile, Q.-B. Li, D. Kumar, A. Kladnik, S.D. Cook, J.J. Ross, A. Marocco, P.S. Chourey Impaired // *Plant Physiol.* - 2012. - V. 160. N. 3. - C. 1318–1328.
33. Bertilsson, L. Indole-3-acetic acid in human cerebrospinal fluid: identification and quantification by mass fragmentography. / L. Bertilsson, L. Palmer // *Science.* - 1972. - V. 177. N. 4043. - C. 74–76.
34. Beziat, C. Light triggers PILS-dependent reduction in nuclear auxin signalling for growth transition. / C. Beziat, E. Barbez, M.I. Feraru, D. Lucyshyn, J. Kleine-Vehn // *Nature Plants.* - 2017. - V. 3. Article number 17105.
35. Birney, E. Ensembl 2006. / E. Birney, D. Andrews, M. Caccamo, Y. Chen, L. Clarke, G. Coates, T. Cox, F. Cunningham, V. Curwen, T. Cutts, T. Down, R. Durbin, X.M. Fernandez-Suarez, P. Flicek, S. Gräf, M. Hammond, J. Herrero, K. Howe, V. Iyer, K. Jekosch, A. Kähäri, A. Kasprzyk, D. Keefe, F. Kokocinski, E. Kulesha, D. London, I. Longden, C. Melsopp, P. Meidl, B. Overduin, A. Parker, G. Proctor, A. Prlic, M. Rae, D. Rios, S. Redmond, M. Schuster, I. Sealy, S. Searle, J. Severin, G. Slater, D. Smedley, J. Smith, A. Stabenau, J. Stalker, S. Trevanion, A. Ureta-Vidal, J. Vogel, S. White, C. Woodwark, T.J.P. Hubbard // *Nucleic Acids Res.* – 2006. - V. 34. - C. D556–D561.
36. Blakeslee, J.J. Auxin biosynthesis: Spatial regulation and adaptation to stress. / J.J. Blakeslee, R.T. Spatola, V. Kriechbaumer // *J. Exp. Bot.* - 2019. - V. 70. N. 19. - C. 5041–5049.
37. Blilou, I. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. / I. Blilou, J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme, B. Scheres // *Nature.* - 2005. - V. 433. N. 7021. - C. 39–44.
38. Bohlmann, J. Purification and cDNA cloning of anthranilate synthase from *Ruta graveolens*: modes of expression and properties of native and recombinant enzymes. / J. Bohlmann, V. DeLuca, U. Eilert, W. Martin // *Plant J.* - 1995. - V. 7. N. 3. - C. 491–501.
39. Bonner, J. Studies of the Physiology, Pharmacology, and Biochemistry of the Auxins. / J. Bonner, R.S. Bandurski // *Annual Review of Plant Physiology.* – 1952. - V. 3. - C. 59–86.
40. Boot K.J.M. Polar auxin transport: An early invention. / K.J.M. Boot, K.R. Libbenga, S.C. Hille, R. Offringa, B. van Duijn // *J Exp Bot.* - 2012. - V. 63. - C.4213–4218.
41. Bowman, J.L. Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. / J.L. Bowman, T. Kohchi, K.T. Yamato, J. Jenkins, S. Shu, K. Ishizaki, S. Yamaoka, R. Nishihama, Y. Nakamura, F. Berger, C. Adam, S.S. Aki, F. Althoff, T. Araki, M.A. Arteaga-Vazquez, S. Balasubramanian, K. Barry, D. Bauer, C.R. Boehm, L. Briginshaw, J.

Caballero-Perez, B. Catarino, F. Chen, S. Chiyoda, M. Chovatia, K.M. Davies, M. Delmans, T. Demura, T. Dierschke, L. Dolan, A.E. Dorantes-Acosta, D.M. Eklund, S.N. Florent, E. Flores-Sandoval, A. Fujiyama, H. Fukuzawa, B. Galik, D. Grimanelli, J. Grimwood, U. Grossniklaus, T. Hamada, J. Haseloff, A.J. Hetherington, A. Higo, Y. Hirakawa, H.N. Hundley, Y. Ikeda, K. Inoue, S.-I. Inoue, S. Ishida, Q. Jia, M. Kakita, T. Kanazawa, Y. Kawai, T. Kawashima, M. Kennedy, K. Kinose, T. Kinoshita, Y. Kohara, E. Koide, K. Komatsu, S. Kopischke, M. Kubo, J. Kyojuka, U. Lagercrantz, S.-S. Lin, E. Lindquist, A.M. Lipzen, C.-W. Lu, E. De Luna, R.A. Martienssen, N. Minamino, M. Mizutani, M. Mizutani, N. Mochizuki, I. Monte, R. Mosher, H. Nagasaki, H. Nakagami, S. Naramoto, K. Nishitani, M. Ohtani, T. Okamoto, M. Okumura, J. Phillips, B. Pollak, A. Reinders, M. Rövekamp, R. Sano, S. Sawa, M.W. Schmid, M. Shirakawa, R. Solano, A. Spunde, N. Suetsugu, S. Sugano, A. Sugiyama, R. Sun, Y. Suzuki, M. Takenaka, D. Takezawa, H. Tomogane, M. Tsuzuki, T. Ueda, M. Umeda, J.M. Ward, Y. Watanabe, K. Yazaki, R. Yokoyama, Y. Yoshitake, I. Yotsui, S. Zachgo, J. Schmutz // *Cell*. - 2017. - V. 171. N. 2. - C. 287–304.

42. Bowman, J.L. On the Evolutionary Origins of Land Plant Auxin Biology. / J.L. Bowman, E.F., Sandoval, H. Kato // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2021. – V. 13. N. 6. – C. a040048.

43. Braus, G.H. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. / G.H. Braus // *ASM Journals – Microbiological Reviews*. - 1991. - V. 55. N 3. - C. 349–370.

44. Brumos, J. Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. / J. Brumos, J.M. Alonso, A.N. Stepanova // *Physiologia Plantarum*. - 2014. - V. 151. N. 1. - C. 3–12. doi: 10.1111/ppl.12098.

45. Burley, S.K. RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. / S.K. Burley, C. Bhikadiya, C. Bi, S. Bittrich, H. Chao, L. Chen, P.A. Craig, G.V. Crichlow, K. Dalenberg, J.M. Duarte, S. Dutta, M. Fayazi, Z. Feng, J.W. Flatt, S. Ganesan, S. Ghosh, D.S. Goodsell, R.K. Green, V. Guranovic, J. Henry, B.P. Hudson, I. Khokhriakov, C.L. Lawson, Y. Liang, R. Lowe, E. Peisach, I. Persikova, D.W. Piehl, Y. Rose, A. Sali, J. Segura, M. Sekharan, C. Shao, B. Vallat, M. Voigt, B. Webb, J.D. Westbrook, S. Whetstone, J.Y. Young, A. Zalevsky, C. Zardecki // *Nucleic Acids Research*. - 2023. - V. 51, N. D1. – C. D488–D508. doi:10.1093/nar/gkac1077

46. Cai, X. The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. / X. Cai, F. Dong, R.E. Edelman, C.A. Makaroff // *J. Cell Sci.* - 2003. - V. 116. N. 14. - C. 2999–3007.

47. Calderon Villalobos, L.I.A. A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. / L.I.A. Calderon Villalobos, S. Lee, C. De Oliveira, A. Ivetac, W. Brandt, L. Armitage, L.B. Sheard, X. Tan, G. Parry, H. Mao, N. Zheng, R. Napier, S. Kepinski, M. Estelle // *Nature Chemical Biology*. - 2012. - V. 8. N. 5. - C. 477–485.
48. Camacho, C. BLAST+: architecture and applications. / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, T.L. Madden // *BMC Bioinformatics*. - 2008. - V. 10. - Article number 421.
49. Campanella, J.J. A molecular phylogenomic analysis of the ILR1-like family of IAA amidohydrolase genes. // J.J. Campanella, D. Larko, J. Smalley / *Comp Funct Genomics*. - 2003. - V. 4. N. 6. - C. 584–600.
50. Cardoso, D.L. Relating protein functional diversity to cell type number identifies genes that determine dynamic aspects of chromatin organisation as potential contributors to organismal complexity. / D.L. Cardoso // *PLoS One*. - 2017. - V. 12. N. 9. - C. e0185409. doi: 10.1371/journal.pone.0185409.
51. Carroll, S.B. Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity / S.B. Carroll // *Nature*. – 2001. - V. 409. - C. 1102–1109. doi:10.1038/35059227
52. Carroll, S.B. Evolution at two levels: on genes and form. / S.B. Carroll // *PLoS Biol*. - 2005. - V. 3. - C. e245.
53. Casanova-Saez, R. Auxin metabolism controls developmental decisions in land plants. / R. Casanova-Saez, U. Voß // *Trends Plant Sci*. - 2019. - V. 24. N. 8. - C. 741–754.
54. Cha J.Y. A novel thiol-reductase activity of Arabidopsis YUC6 confers drought tolerance independently of auxin biosynthesis. / J.-Y. Cha, W.-Y. Kim, S.B. Kang, J.I. Kim, D. Baek, I.J. Jung, M.R. Kim, N. Li, H.-J. Kim, M. Nakajima, T. Asami, J.S.M. Sabir, H.C. Park, S.Y. Lee, H.J. Bohnert, R.A. Bressan, J.M. Pardo, D.-J. Yun // *Nat. Commun*. - 2015. - V. 6. Article number 8041.
55. Cecchetti, V. Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. / V. Cecchetti, M.M. Altamura, G. Falasca, P. Costantino, M. Cardarelli // *Plant Cell*. - 2008, - V. 20. N. 7. - C. 1760–1774.
56. Cecchetti, V. An auxin maximum in the middle layer controls stamen development and pollen maturation in Arabidopsis. / V. Cecchetti, D. Celebrin, N. Napoli, R. Ghelli, P. Brunetti, P. Costantino, M. Cardarelli // *New Phytol*. - 2017. - V. 213. N. 3. - C. 1194–1207.
57. Chapman, E.J. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. / E.J. Chapman, M. Estelle // *Annu Rev Genet*. - 2009. - V. 43. - C. 265–285.

58. Cheesman M.J. Critical role of histidine residues in cyclohexanone monooxygenase expression, cofactor binding and catalysis. / M.J. Cheesman, K.M. Byron, A.E. Rettie // *Chem.-Biol. Interact.* - 2003. - V. 146. - C. 157–164.
59. Chen, Q. Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in Arabidopsis roots. / Chen Q., X. Dai, H. De-Paoli, Y. Cheng, Y. Takebayashi, H. Kasahara, Y. Kamiya, Y. Zhao // *Plant Cell Physiol.* - 2014. - V 55. N 6. - C. 1072–1079. doi:10.1093/pcp/pcu039
60. Chen, L. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during de novo root organogenesis in Arabidopsis. / L. Chen, J. Tong, L. Xiao, Y. Ruan, J. Liu, M. Zeng, H. Huang, J.-W. Wang, L. Xu // *J Exp Bot.* - 2016. - V. 67. N. 14. - C. 4273–4284.
61. Cheng, Y. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. / Y. Cheng, X. Dai, Y. Zhao // *Genes Dev.* - 2006. - V. 20. N. 13. - C. 1790–1799.
62. Cheng, Y. Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in Arabidopsis. / Y. Cheng, X. Dai, Y. Zhao // *Plant Cell.* – 2007. - V. 19. N. 8. - C. 2430–2439.
63. Chervitz, S.A. Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: Orthology and divergence. / S.A. Chervitz, L. Aravind, G. Sherlock, C.A. Ball, E.V. Koonin, S.S. Dwight, M.A. Harris, K. Dolinski, S. Mohr, T. Smith, S. Weng, J.M. Cherry, D. Botstein // *Science.* - 1998. - V. 282. - C. 2022–2028.
64. Chiba, S. Widespread Endogenization of Genome Sequences of Non-Retroviral RNA Viruses into Plant Genomes. / S. Chiba, H. Kondo, A. Tani, D. Saisho, W. Sakamoto, S. Kanematsu, N. Suzuki // *PLoS Pathog.* - 2011. - V. 7. N. 7. - C. e1002146.
65. Chourey, P.S. Sugar–Hormone Cross-Talk in Seed Development: Two Redundant Pathways of IAA Biosynthesis Are Regulated Differentially in the Invertase-Deficient miniature1 (mn1) Seed Mutant in Maize. / P.S. Chourey, Q.-B. Li, D. Kumar // *Molecular Plant.* - 2010. - V. 3. N. 6. - C. 1026–1036.
66. Collett, C.E. Hormonal interactions in the control of Arabidopsis hypocotyl elongation. / C.E. Collett, N.P. Harberd, O. Leyser // *Plant Physiol.* - 2000. - V. 124. N. 2. - C. 553–562.
67. Conrad, B. Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of human disease. / B. Conrad, S.E. Antonarakis // *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* - 2007. - V. 8. - C. 17–35.
68. Cooke, T.J. Evolutionary patterns in auxin action. / T.J. Cooke, D. Poli, A.E. Sztein, J.D. Cohen // *Plant Mol Biol.* - 2002. - V. 49. N. 3-4. - C. 319–338.
69. Cooper, E.D. Green algal transcriptomes for phylogenetics and comparative genomics. / E.D. Cooper, C.F. Delwiche // *Biology.* - 2016. DOI:10.6084/m9.figshare.1604778.v1.

70. Copley, S.D. Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. / S.D. Copley, J.K. Dhillon // *Genome Biol.* - 2002. - V. 3. N. 5. - C. research0025.1–research0025.16.
71. Cove, D.J. The Moss *Physcomitrella patens*: A Novel Model System for Plant Development and Genomic Studies. / D.J. Cove, P.-F. Perroud, A.J. Charron, Stuart F. McDaniel, A. Khandelwal, and R.S. Quatrano. Department of Biology, Washington University. – 2015., - St. Louis. - MO 63130. - USA.
72. Crooks, G.E. WebLogo: A sequence logo generator. / G.E. Crooks, G. Hon, J.M. Chandonia, S.E. Brenner // *Genome Research.* - 2004. - V. 14. N. 6. - C. 1188–1190.
73. Dai, X. The Biochemical Mechanism of Auxin Biosynthesis by an Arabidopsis YUCCA Flavin-containing Monooxygenase. / X. Dai, K. Mashiguchi, Q. Chen, H. Kasahara, Y. Kamiya, S. Ojha, J. DuBois, D. Ballou, Y. Zhao // *J. Biol. Chem.* - 2013. - V. 288. N. 3. - C. 1448–1457.
74. Darwin, C. The Power of Movement in Plants. / John Murray - London. - 1880.
75. Davies, P.J. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! / Kluwer Academic Publishers. – London. 2004
76. Davies P.J. The Plant Hormone: Their Nature, Occurrence, and Functions. Из книги Plant Hormones / – Kluwer, Dordrecht, the Netherlands. 2010.
77. De Smet, I. Unraveling the Evolution of Auxin Signaling. / I. De Smet, U. Voß, S. Lau, M. Wilson, N. Shao, R.E. Timme, R. Swarup, I. Kerr, C. Hodgman, R. Bock, M. Bennett, G. Jürgens, T. Beeckman // *Plant Physiol.* - 2011. - V. 155. N. 1. - C. 209–221.
78. Du, M., Spalding, E.P., Gray, W.M. Rapid Auxin-Mediated Cell Expansion. // *Annual Review of Plant Biology.* - 2020. - V. 71. - C. 379–402. doi: 10.1146/annurev-arplant-073019-025907.
79. del Pozo, J.C. Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCFAtSKP2 pathway in response to light. / J.C. del Pozo, M.B. Boniotti, C. Gutierrez // *Plant Cell.* - 2002. - V. 14. N. 12. - C. 3057–3071.
80. del Pozo, J.C. The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis. / del J.C. Pozo, S. Diaz-Trivino, N. Cisneros, C. Gutierrez // *Plant Cell.* - 2006; - V. 18. N. 9. - C. 2224–2235.
81. Demoulin, C.F. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. / C.F. Demoulin, Y. J. Lara, L. Cornet, C. François, D. Baurain, A. Wilmotte, E.J. Javaux // *Free Radical Biology and Medicine.* - 2019. – V. 140. - C. 206–223.

82. Dharmasiri, N. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. / N. Dharmasiri, S. Dharmasiri, D. Weijers, E. Lechner, M. Yamada, L. Hobbie, J.S. Ehrismann, G. Jürgens, M. Estelle // *Dev Cell*. - 2005. - V. 9. N. 1. - C. 109–119.
83. Dibb-Fuller, J.E. Studies on the evolution of auxin carriers and phototropin receptors: Transmembrane auxin transport in unicellular and multicellular Chlorophyta. / J.E. Dibb-Fuller, D.A. Morris // *Planta*. - 1992. - V. 186. - C. 219–226.
84. Dittami, S.M. Genome and metabolic network of “Candidatus Phaeomarinobacter ectocarpi” Ec32, a new candidate genus of Alphaproteobacteria frequently associated with brown algae. / S.M. Dittami, T. Barbeyron, C. Boyen, J. Cambefort, G. Collet, L. Delage, A. Gobet, A. Groisillier, C. Leblanc, G. Michel, D. Scornet, A. Siegel, J.E. Tapia, T. Tonon // *Front Genet*. - 2014. - V. 5. - C. 241.
85. Dolphin, C.T. Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. / C.T. Dolphin, A. Janmohamed, R.I. Smith, E.A. Shephard, I.R. Phillips // *Nat. Genet*. - 1997. - V. 17. N. 4. - C. 491–494.
86. Dosselaere, F.A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. / F. Dosselaere, J. Vanderleyden // *Crit Rev Microbiol*. - 2001. - V. 27. N. 2. - C. 75–131.
87. Duca, D. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. / D. Duca, J. Lorv, C.L. Patten, D. Rose, B.R. Glick // *Antonie Van Leeuwenhoek*. - 2014 - V. 106. N. 1. - C. 85–125.
88. Dunham, V.L. Effects of Exogenous Amino Acids on the Development of *Marchantia polymorpha* Gemmalings. / V.L. Dunham, J.K. Bryan // *Am. J. Bot*. - 1968. - V. 55. N. 7. - C. 745–752.
89. Eberhardt, R.Y. Filling out the structural map of the NTF2-like superfamily. / R.Y. Eberhardt, Y. Chang, A. Bateman, A.G. Murzin, H.L. Axelrod, W.C. Hwang, L. Aravind // *Bmc Bioinformatics*. - 2013. - V. 14. Article number 327.
90. Edger, P.P. Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. / P.P. Edger, J.C. Pires // *Chromosome Res*. - 2009. - V. 17. - C. 699–717.
91. Eklund, D.M., Auxin Produced by the Indole-3-Pyruvic Acid Pathway Regulates Development and Gemmae Dormancy in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. / D.M. Eklund, K. Ishizaki, E. Flores-Sandoval, S. Kikuchi, Y. Takebayashi, S. Tsukamoto, Y. Hirakawa, M. Nonomura, H. Kato, M. Kouno, R.P. Bhalerao, U. Lagercrantz, H. Kasahara, T. Kohchi, J.L. Bowman // *The Plant Cell*. - 2015. - V. 27. N. 6. - C. 1650–1669.
92. Enders, T.A. Auxin Activity: Past, present, and Future. / T.A. Enders, L.C. Strader // *Am J Bot*. - 2015. - V. 102. N. 2. - C. 180–196.

93. Eswaramoorthy, S. Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. / S. Eswaramoorthy, J.B. Bonanno, S.K. Burley, S. Swaminathan // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2006. - V. 103. N. 26. - C. 9832–9837.
94. Evans, L. Is algal development controlled by plant growth substances? / L. Evans, A. Trewavas // *J. Phycol.* - 1991. - V. 27. N.3. - C. 322–326.
95. Exposito-Rodriguez, M. Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: The ToFZY gene family. / M. Exposito-Rodriguez, A.A. Borges, A. Borges-Perez, J.A. Perez // *Plant Physiol. Biochem.* - 2011. - V. 49. - C. 782–791.
96. Facchinelli, F. Chlamydia, cyanobiont, or host: who was on top in the ménage à trois? / F. Facchinelli, C. Colleoni, S.G. Ball, A.P. Weber // *Trends Plant Sci.* - 2013. - V. 18. N. 12. - C. 673–679.
97. Feraru, E., Vosolsobě S., Feraru M.I., Petrášek J., Kleine-Vehn J. Evolution and structural diversification of PILS putative auxin carriers in plants. / E. Feraru, S. Vosolsobě, M.I. Feraru, J. Petrášek, J. Kleine-Vehn // *Frontiers in Plant Science*. - 2012. - V. 3. - C. 227.
98. Fernandes, N. "Genomes and virulence factors of novel bacterial pathogens causing bleaching disease in the marine red alga *Delisea pulchra*. / N. Fernandes, R.J. Case, S.R. Longford, M.R. Seyedsayamdost, P.D. Steinberg, S. Kjelleberg, T. Thomas // *PLoS ONE*. - 2011. - V. 6. N. 12. - C. e27387.
99. Figueiredo, D.D. Auxin production couples endosperm development to fertilization. / D.D. Figueiredo, R.A. Batista, P. Roszak, C. Köhler // *Nature Plants*. - 2015. - V. 1. - C. 15184.
100. Finet, C. AUXOLOGY: When auxin meets plant evo-devo. / C. Finet, Y. Jaillais // *Developmental Biology*. - 2012. - V. 369. N. 1. - C. 19–31.
101. Finn, R.D. Pfam: The protein families database. / R.D. Finn, A. Bateman, J. Clements, P. Coghill, R.Y. Eberhardt, S.R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E.L. Sonnhammer, J. Tate, M. Punta // *Nucleic Acids Res.* - 2014. - V. 42. - C. D220–D230.
102. Fraaije, M.W. Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. / M.W. Fraaije, N.M. Kamerbeek, van W.J. Berkel, D.B. Janssen // *FEBS Lett.* - 2002. - V. 518. N. 1-3. - C. 43–47.
103. Franklin, K.A. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. / K.A. Franklin, S.H. Lee, D. Patel, S. V. Kumar, A.K. Spartz, C. Gu, S. Ye, P. Yu, G. Breen, J.D. Cohen, P.A. Wigge, W.M. Gray // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2011. - V. 108. N. 50. - C. 20231–20235.

104. Friml, J. AtPIN4 mediates sink driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. // J. Friml, E. Benkova, I. Blilou, J. Wisniewska, T. Hamann, K. Ljung, S. Woody, G. Sandberg, B. Scheres, G. Jurgens, K. Palme / *Cell*. - 2002. - V. 108 - C. 661–673.
105. Friml, J. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of Arabidopsis. / J. Friml, A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa, G. Jürgens // *Nature*. - 2003. - V. 426. N. 4963. - C. 147–153.
106. Gallavotti, A. sparse inflorescence1 encodes a monocot-specific YUCCA-like gene required for vegetative and reproductive development in maize. / A. Gallavotti, S. Barazesh, S. Malcomber, D. Hall, D. Jackson, R.J. Schmidt, P. McSteen // *PNAS*. - 2008. - V. 105. N. 39. - C. 15196–15201.
107. Geisler, M. The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. / M. Geisler, A.S. Murphy // *FEBS Letters*. - 2006. - V. 580. N. 4. - C. 1094–1102.
108. Glombik, M. Competition of Parental Genomes in Plant Hybrids. / M. Glombik, V. Bačovský, R. Hobza, D. Kopecký // *Front. Plant Sci.: Sec. Plant Systematics and Evolution*. - 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00200>
109. Gray, W.M. High temperature promotes auxinmediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. / W.M. Gray, A. Ostin, G. Sandberg, C.P. Romano, M. Estelle // *PNAS*. - 1998. - V. 95. - C. 7197–7202.
110. Gray, W.M. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. / W.M. Gray, S. Kepinski, D. Rouse, O. Leyser, M. Estelle // *Nature*. - 2001. - V. 414. N. 6861. - C. 271–276.
111. Gruen, H.E. Auxins and fungi. / H.E. Gruen // *Ann. Rev. Plant Physiol*. - 1959. - V. 10. - C. 405–440.
112. Guilfoyle, T. The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. / T. Guilfoyle, T. Ulmasov, G. Hagen // *Cellular and Molecular Life Sciences*. - 1998. - V. 54. N. 7. - C. 619–627.
113. Guilfoyle, T.J. Auxin response factors. / T.J. Guilfoyle, G. Hagen // *Curr Opin Plant Biol*. - 2007. - V. 10. N. 5. - C. 453–460.
114. Gutierrez, RA Phylogenetic profiling of the Arabidopsis thaliana proteome: what proteins distinguish plants from other organisms? / R.A. Gutierrez, P.J. Green, K. Keegstra, J.B. Ohlrogge // *Genome Biol*. - 2004. - V. 5. - C. 15.
115. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. / T.A. Hall // *Nucl. Acids. Symp. Ser*. - 1999. - V. 41. - C. 95–98.

116. Halliday, K.J. Integration of Light and Auxin Signaling. / K.J. Halliday, J.F. Martínez-García, E.-M. Josse // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* - 2009. - V. 1. N. 6. - C. a001586.
117. Han, M.V. PhyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. / M.V. Han, C.M. Zmasek // *BMC Bioinformatics.* - 2009. - V. 10. Article number 356.
118. Hatton, I.A. The human cell count and size distribution. // *Cell biology.* - 2023. - V. 120. N. 39. - C. e2303077120. doi:10.1073/pnas.2303077120
119. Hedges, S.B. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. / S.B. Hedges, J.E. Blair, M.L. Venturi, J.L. Shreeve // *BMC Evolutionary Biology* - 2004. - V. 4. N. 2. doi:10.1186/1471-2148-4-2
120. Heisler, M.G. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. // M.G. Heisler, C. Ohno, P. Das, P. Sieber, G.V. Reddy, J.A. Long, E.M. Meyerowitz / *Curr. Biol.* - 2005. - V. 15. - C. 1899–1911.
121. Hentrich, M. YUCCA8 and YUCCA9 overexpression reveals a link between auxin signaling and lignification through the induction of ethylene biosynthesis. / M. Hentrich, B. Sánchez-Parra, M.-M. Pérez Alonso, V. Carrasco Loba, L. Carrillo, J. Vicente-Carbajosa, J. Medina, S. Pollmann // *Plant Signal. Behav.* - 2013. - V. 8. N. 11. - C. e26363.
122. Hong, S.-B. Expression of the Arabidopsis feedback-insensitive anthranilate synthase holoenzyme and tryptophan decarboxylase genes in *Catharanthus roseus* hairy roots. / S.-B. Hong, C.A.M. Peebles, J.V. Shanks, K.-Y. San, S.I. Gibson // *Journal of Biotechnology.* - 2006. - V. 122. N. 1. - C. 28–38.
123. Hong, J. H., Savina, M., Du, J., Devendran, A., Ramakanth, K.K., Tian, X., Sim, W.S., Mironova, V.V., Xu, J. A sacrifice-for-survival mechanism protects root stem cell niche from chilling stress. // *Cell.* - 2017. - V. 170. - C. 102–113. doi:10.1016/j.cell.2017.06.002.
124. Hori, K. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. / K. Hori, F. Maruyama, T. Fujisawa, T. Togashi, N. Yamamoto, M. Seo, S. Sato, T. Yamada, H. Mori, N. Tajima, T. Moriyama, M. Ikeuchi, M. Watanabe, H. Wada, K. Kobayashi, M. Saito, T. Masuda, Y. Sasaki-Sekimoto, K. Mashiguchi, K. Awai, M. Shimojima, S. Masuda, M. Iwai, T. Nobusawa, T. Narise, S. Kondo, H. Saito, R. Sato, M. Murakawa, Y. Ihara, Y. Oshima-Yamada, K. Ohtaka, M. Satoh, K. Sonobe, M. Ishii, R. Ohtani, M. Kanamori-Sato, R. Honoki, D. Miyazaki, H. Mochizuki, J. Umetsu, K. Higashi, D. Shibata, Y. Kamiya, N. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, S. Ida, K. Kurokawa, H. Ohta // *Nature Communications.* - 2014. - V. 5. - C. 3978.
125. Howe, C.J. The origin of plastids. / C.J. Howe, A.C. Barbrook, R.E.R. Nisbet, P.J. Lockhart, A.W.D. Larkum // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* - 2008. - V. 363. N. 1504. - C. 2675–2685.

126. Hsia, C.C. Evolution of transcription factor function. / C.C. Hsia, W. McGinnis // *Curr Opin Genet Dev.* - 2003. - V. 13. - C. 199–206.
127. Hou, X. Allelic analyses of the Arabidopsis YUC1 locus reveal residues and domains essential for the functions of YUC family of flavin monooxygenases. / X. Hou, S. Liu, F. Pierri, X. Dai, L.-J. Qu, Y. Zhao // *J. Integr. Plant Biol.* - 2011. - V. 53. - C. 54–62.
128. Huang, J. Concerted gene recruitment in early plant evolution. / J. Huang, J.P. Gogarten // *Genome Biology.* - 2008. - V. 9. N. 7. - C. R109.
129. Huelsenbeck, J.P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. / J.P. Huelsenbeck, F. Ronquist // *Bioinformatics.* - 2001. - V. 17. N. 8. - C. 754–755.
130. Huijbers, M.M.E. Flavin dependent monooxygenases. / M.M.E. Huijbers, S. Montersino, A.H. Westphal, D. Tischler, W.J.H. van Berkel // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* - 2014. - V. 544. - C. 2–17.
131. Hussain, A. Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. / A. Hussain, M. Krischke, T. Roitsch, S. Hasnain // *Current Microbiology.* - 2010. V. 61. N. 5. - C. 361–369.
132. Ichimura, H. Indole-3-acetic acid in chick embryos. / H. Ichimura, T. Yamaki // *Development, Growth and Differentiation.* - 1975. - V. 17. N. 3. - C. 275–279.
133. Iglesias, M.J. Multiple links between shade avoidance and auxin networks. / M.J. Iglesias, R. Sellaro, M.D. Zurbriggen, J.J. Casal // *Journal of Experimental Botany.* - 2018. - V. 69. N. 2. - C. 213–228.
134. Jackson, R.G. Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. / R.G. Jackson, E.K. Lim, Y. Li, M. Kowalczyk, G. Sandberg, J. Hoggett, D.A. Ashford, D.J. Bowles // *J Biol Chem.* - 2001. - V. 276. N. 6. - C. 4350–4356.
135. Jayaswal, R.S. Occurrence and biosynthesis of auxin in protonema of the moss *Funaria hygrometrica*. / R.S. Jayaswal, M.M. Johri // *Phytochemistry.* - 1985. - V. 24. N. 6. - C. 1211–1214.
136. Jiao, C. The Genome of the Charophyte Alga *Penium margaritaceum* Bears Footprints of the Evolutionary Origins of Land Plants. / C. Jiao, I. Sørensen, X. Sun, H. Sun, H. Behar, S. Alseekh, G. Philippe, K.P. Lopez, L. Sun, R. Reed, S. Jeon, R. Kiyonami, S. Zhang, A.R. Fernie, H. Brumer, D.S. Domozych, Z. Fei, J.K.C. Rose // *J. Cell.* - 2019. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.019.
137. Jiyao, W. The conserved domain database in 2023. / J. Wang, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, N.R. Gonzales, M. Gwadz, S. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, R.A. Yamashita, M. Yang, D. Zhang, C. Zheng, C.J. Lanczycki, A. Marchler-Bauer // *Nucleic Acids Res.* - 2023. - V. 51. N. D1. – C. D384–D388. doi: 10.1093/nar/gkac1096

138. Ju, C. Conservation of ethylene as a plant hormone over 450 million years of evolution. / C. Ju, B. Van de Poel, E.D. Cooper, J.H. Thierer, T.R. Gibbons, C.F. Delwiche, C. Chang // *Nature Plants*. - 2015. - V. 1. Article number 14004.
139. Jurado, S. SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway/ S. Jurado, S. Diaz-Trivino, Z. Abraham, C. Manzano // *The Plant Journal*. - 2008. - V. 53. N. 5. - C. 828–841.
140. Jurado, S. The Arabidopsis cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. / S. Jurado, Z. Abraham, C. Manzano, G. Lopez-Torrejon, L.F. Pacios, J.C. Del Pozo // *Plant Cell*. - 2010. - V. 22. - C. 3891–3904.
141. Kasahara, H. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. - 2015. - V. 80. - C. 34–42. doi:10.1080/09168451.2015.1086259.
142. Katoh K. Recent Developments in the MAFFT Multiple Sequence Alignment Program. / K. Katoh, H. Toh // *Brief. Bioinform.* - 2008. - V. 9. N. 4. - C. 286–298.
143. Kazan, K. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. // *Annals of botany*. - 2013. - V. 112. - C. 1655–1665. doi:10.1093/aob/mct229.
144. Ke, M. Rethinking the origin of auxin biosynthesis in plants. / M. Ke, Y. Zheng, Z. Zhu // *Front. Plant Sci.* - 2015. - V. 6. - C. 1093.
145. Ke, M. Auxin controls circadian flower opening and closure in the waterlily. / M. Ke, Z. Gao, J. Chen, Y. Qiu, L. Zhang, X. Chen // *BMC Plant Biology*. - 2018. - V. 18. - C. 143.
146. Kepinski, S. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. / Kepinski S., Leyser O. // *Nature*. - 2005. - V. 435. N. 7041. - C. 446–451.
147. Khasin M. Molecular machinery of auxin synthesis, secretion, and perception in the unicellular chlorophyte alga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230. / M. Khasin, R.R. Cahoon, K.W. Nickerson, W.R. Riekhof // *PLoS One*. - 2018. - V. 13. N. 12. - C. e0205227.
148. Kim J.I. Overexpression of Arabidopsis YUCCA6 in potato results in high-auxin developmental phenotypes and enhanced resistance to water deficit. / J.I. Kim, D. Baek, H.C. Park, H.J. Chun, D.-H. Oh, M.K. Lee, J.-Y. Cha, W.-Y. Kim, M.C. Kim, W.S. Chung, H.J. Bohnert, S.Y. Lee, R.A. Bressan, S.-W. Lee, D.-J. Yun // *Mol. Plant*. - 2013. - V. 6. N. 2. - C. 337–349.
149. Klamt, D. Auxin dependent growth of rhizoids of *Chara globularis*. / D. Klamt, B. Knauth, I. Dittmann // *Physiol Plant*. - 1992. - V. 85. - C. 537–540.
150. Kleinjan, D.A. Subfunctionalization of Duplicated Zebrafish pax6 Genes by cis-Regulatory Divergence. / D.A. Kleinjan, R.M. Bancewicz, P. Gautier, R. Dahm, H.B. Schonthaler, G. Damante, A. Seawright, A.M. Hever, P.L. Yeyati, V. van Heyningen, P. Coutinho // *PLoS Genetics*. - 2008. - V. 4. N. 2. - C. e29.

151. Kohnen M.V. Neighbor detection induces organ-specific transcriptomes, revealing patterns underlying hypocotyl-specific growth. / M.V. Kohnen, Schmid-Siebert E., M. Trevisan, L.A. Petrolati, F. Sénéchal, P. Müller-Moulé, J. Maloof, I. Xenarios, C. Fankhauser // *Plant Cell*. - 2016. - V. 28. N. 12. - C. 2889–2904.
152. Kolaczowski, B. Long-Branch Attraction Bias and Inconsistency in Bayesian Phylogenetics. / B. Kolaczowski, J.W. Thornton // *PLoS One*. - 2009, - V. 4. N. 12. - C. e7891.
153. Krecek, P. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. / P. Krecek, P. Skůpa, J. Libus, S. Naramoto, R. Tejos, J. Friml, E. Zazimalova // *Genome Biology*. - 2009. - V. 10. Article number 249.
154. Kriechbaumer, V. Auxin biosynthesis in maize. / V. Kriechbaumer, W.J. Park, A. Gierl, E. Glawischnig // *Plant Biol (Stuttg)*. - 2006. - V. 8. N. 3. - C. 334–339.
155. Kriechbaumer, V. Localization and interactions between Arabidopsis auxin biosynthetic enzymes in the TAA/YUC-dependent pathway. / V. Kriechbaumer, S.W. Botchway, C. Hawes // *Journal of Experimental Botany*. - 2017. - V. 68. N. 12. - C. 4195–4207.
156. Kunkel, B.N., Harper, C.P. The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. // *Journal of Experimental Botany*. - 2018. - V. 69. - C. 245–254. doi:10.1093/jxb/erx447.
157. Labeeuw, L. Indole-3-Acetic Acid Is Produced by *Emiliania huxleyi* Coccolith-Bearing Cells and Triggers a Physiological Response in Bald Cells. / L. Labeeuw, J. Khey, A.R. Bramucci, H. Atwal, de la A.P. Mata, J. Harynuk, R.J. Case // *Front Microbiol*. - 2016. - V. 7. - C. 828.
158. Lamesch, P. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. / P. Lamesch, T.Z. Berardini, D. Li, D. Swarbreck, C. Wilks, R. Sasidharan, Robert Muller, Kate Dreher, D.L. Alexander, M. Garcia-Hernandez, A.S. Karthikeyan, C. H. Lee, W.D. Nelson, L. Ploetz, S. Singh, A. Wensel, E. Huala // *Nucleic Acids Res*. - 2012. - V. 40. - C. D1202–D1210.
159. Lander, E.S. Initial sequencing and analysis of the human genome. / E.S. Lander, L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra,

- E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W. R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R.A. Gibbs, D.M. Muzny, S.E. Scherer, J.B. Bouck, E.J. Sodergren, K.C. Worley, C.M. Rives, J.H. Gorrell, M.L. Metzker, S.L. Naylor, R.S. Kucherlapati, D.L. Nelson, G.M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D.R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R.W. Davis, N.A. Federspiel, A.P. Abola, M.J. Proctor, R.M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D.R. Cox, M.V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G.A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B.A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W.R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blöcker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J.A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D.G. Brown, C.B. Burge, L. Cerutti, H.C. Chen, D. Church, M. Clamp, R.R. Copley, T. Doerks, S.R. Eddy, E.E. Eichler, T.S. Furey, J. Galagan, J.G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L.S. Johnson, T.A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W.J. Kent, P. Kitts, E.V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T.M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J.V. Moran, N. Mulder, V.J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A.F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y.I. Wolf, K.H. Wolfe, S.P. Yang, R.F. Yeh, F. Collins, M.S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K.A. Wetterstrand, A. Patrinos, M.J. Morgan, P. de Jong, J.J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y.J. Chen, J. Szustakowki // *Nature*. - 2001. - V. 409. - C. 860–921. doi:10.1038/35057062
160. Lang, D. Genome-wide phylogenetic comparative analysis of plant transcriptional regulation: a timeline of loss, gain, expansion, and correlation with complexity. / D. Lang, B. Weiche, G. Timmerhaus, S. Richardt, D.M. Riano-Pachon, L.G.G. Correa, R. Reski, B. Mueller-Roeber, S.A. Rensing // *Genome Biol Evol*. - 2010. - V. 2. - C. 488–503.
161. Lartillot, N. PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. / N. Lartillot, T. Lepage, S. Blanquart // *Bioinformatics*. - 2009. - V. 25. N. 17. - C. 2286–2288.
162. Last, R.L. Tryptophan mutants in *Arabidopsis*: the consequences of duplicated tryptophan synthase β genes. / R.L. Last, P.H. Bissinger, D.J. Mahoney, E.R. Radwanski, R. Gerald, G.R. Fink // *The Plant Cell*. - 1991. - V. 3. N. 4. - C. 345–358.

163. Lee, R.E. *Phycology* (неопр.) / R.E. Lee. - 3rd. - Cambridge University Press. - 2005.
164. Lau, S. Auxin signaling in algal lineages: fact or myth? / S. Lau, N. Shao, R. Bock, G. Jürgens, I. De Smet // *Trends in plant science*. - 2009. - V. 14. N. 4. - C. 182–188.
165. Le Bail, A. Auxin metabolism and function in the multicellular brown alga *Ectocarpus siliculosus*. / Le Bail A., Billoud B., Kowalczyk N., Kowalczyk M., Gicquel M., Le Panse S., Stewart S., Scornet D., Cock J.M., Ljung K., Charrier B. // *Plant Physiol.* - 2010. - V. 153. N. 1. - C. 128–144.
166. Lee, M. Activation of a flavin monooxygenase gene *YUCCA7* enhances drought resistance in *Arabidopsis*. / M. Lee, J.H. Jung, D.Y. Han, P.J. Seo, W.J. Park, C.M. Park // *Planta*. - 2012. - V. 235. - C. 923–938.
167. Lee, T.H. PGDD: a database of gene and genome duplication in plants. / T.H. Lee, H. Tang, X. Wang, A.H. Paterson // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - V. 41. - C. D1152–D1158.
168. Leebens-Mack, J.H. One Thousand Plant Transcriptomes and the Phylogenomics of Green Plants. / J.H. Leebens-Mack, M.S. Barker, E.J. Carpenter, M.K. Deyholos, M.A. Gitzendanner, S.W. Graham, I. Grosse, Z. Li, M. Melkonian, S. Mirarab, M. Porsch, M. Quint, S.A. Rensing, D.E. Soltis, P.S. Soltis, D.W. Stevenson, K.K. Ullrich, N.J. Wickett, L. DeGironimo, P.P. Edger, I.E. Jordon-Thaden, S. Joya, T. Liu, B. Melkonian, N.W. Miles, L. Pokorny, C. Quigley, P. Thomas, J.C. Villarreal, M.M. Augustin, M.D. Barrett, R.S. Baucom, D.J. Beerling, R.M. Benstein, E. Biffin, S.F. Brockington, D.O. Burge, J.N. Burris, K.P. Burris, V. Burtet-Sarramegna, A.L. Caicedo, S.B. Cannon, Z. Çebi, Y. Chang, C. Chater, J.M. Cheeseman, T. Chen, N.D. Clarke, H. Clayton, S. Covshoff, B.J. Crandall-Stotler, H. Cross, C.W. dePamphilis, J.P. Der, R. Determann, R.C. Dickson, Di Stilio V.S., S. Ellis, E. Fast, N. Feja, K.J. Field, D.A. Filatov, P.M. Finnegan, S.K. Floyd, B. Fogliani, N. García, G. Gâteblé, G.T. Godden, F. Goh, S. Greiner, A. Harkess, J.M. Heaney, K.E. Helliwell, K. Heyduk, J.M. Hibberd, R.G.J. Hodel, P.M. Hollingsworth, M.T.J. Johnson, R. Jost, B. Joyce, M.V. Kapralov, E. Kazamia, E.A. Kellogg, M.A. Koch, M. von Konrat, K. Könyves, T.M. Kutchan, V. Lam, A. Larsson, A.R. Leitch, R. Lentz, F.W. Li, A.J. Lowe, M. Ludwig, P.S. Manos, E. Mavrodiev, M.K. McCormick, M. McKain, T. McLellan, J.R. McNeal, R.E. Miller, M.N. Nelson, Y.H. Peng, P. Ralph, D. Real, C.W. Riggins, M. Ruhsam, R.F. Sage, A.K. Sakai, M. Scascitella, E.E. Schilling, E.M. Schlösser, H. Sederoff, S. Servick, E.B. Sessa, A.J. Shaw, S.W. Shaw, E.M. Sigel, C. Skema, A.G. Smith, A. Smithson, C.N.J. Stewart, J.R. Stinchcombe, P. Szövényi, J.A. Tate, H. Tiebel, D. Trapnell, M. Villegente, C.N. Wang, S.G. Weller, M. Wenzel, S. Weststrand, J.H. Westwood, D.F. Whigham, S.X. Wu, A.S. Wulff, Y. Yang, D. Zhu, C.L. Zhuang, J. Zuidof, M.W. Chase, J.C. Pires, C.J. Rothfels, J. Yu, C. Chen, L. Chen, S.F. Cheng, J.J. Li, R. Li, X. Li, H.R. Lu, Y.X. Ou, X. Sun, X.M. Tan, J.B. Tang, Z.J. Tian, F. Wang, J. Wang, X.F. Wei, X. Xu, Z.X. Yan, F. Yang, X.N. Zhong, F.Y. Zhou,

- Y. Zhu, Y. Zhang, S. Ayyampalayam, T.J. Barkman, N.P. Nguyen, N. Matasci, D.R. Nelson, E. Sayyari, E.K. Wafula, R.L. Walls, T. Warnow, H. An, N. Arrigo, A.E. Baniaga, S. Galuska, S.A. Jorgensen, T.I. Kidder, H.H. Kong, P. Lu-Irving, H.E. Marx, X.S. Qi, C.R. Reardon, B.L. Sutherland, G.P. Tiley, S.R. Welles, R.P. Yu, S. Zhan, L. Gramzow, G. Theißen, K.S. Wong // *Nature*. - 2019. - V. 574. N. 7780. - C. 679–685.
169. Lespinet, O. The role of lineagespecific gene family expansion in the evolution of eukaryotes. / O. Lespinet, Y.I. Wolf, E.V. Koonin, L. Aravind // *Genome Res*. - 2002. - V. 12. - C. 1048–1059.
170. Leyser, O. Auxin distribution and plant pattern formation: how many angels can dance on the point of PIN? // O. Leyser / *Cell*. - 2005. - V. 121. - C. 819– 822.
171. Leliaert, F. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. / F. Leliaert, D.R. Smith, H. Moreau, M.D. Herron, H. Verbruggen, C.F. Delwiche, O. De Clerck // *Crit Rev Plant Sci*. - 2012. - V. 31. - C. 1–46.
172. Levine, M. Transcription regulation and animal diversity. / M Levine, R. Tjian // *Nature*. - 2003. - V. 424. - C. 147–151.
173. Lewis, L.A. Green algae and the origin of land plants. / L.A. Lewis, R.M. McCourt // *Am J Bot*. - 2004. - T. 91. N. 10. - C. 1535–1556.
174. Li, J. Isolation of cDNAs Encoding the Tryptophan Pathway Enzyme Indole-3-Glycerol Phosphate Synthase from *Arabidopsis thaliana*. / J. Li, S. Chen, L. Zhu, R.L. Last // *Plant Physiology*. - 1995a. - V. 108. N. 2. - C. 877–878.
175. Li, J. *Arabidopsis* phosphoribosylanthranilate isomerase: molecular genetic analysis of triplicate tryptophan pathway genes. / J. Li, J. Zhao, A.B. Rose, R. Schmidt, R.L. Last // *The Plant Cell*. - 1995b. - V. 7. N. 4. - C. 447–461.
176. Li, L. The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in *Arabidopsis*. / L. Li, X. Hou, T. Tsuge, M. Ding, T. Aoyama, A. Oka, H. Gu, Y. Zhao, L.-J. Qu // *Plant Cell Rep*. - 2008. - V. 27. N. 3. - C. 575-584.
177. Li, G. Nonseed plant *Selaginella moellendorffii* has both seed plant and microbial types of terpene synthases. / G. Li, T. Köllner, M. Planck, Y. Yin, Y. Jiang // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2012. - V. 109. N. 36. - C. 14711–14715.
178. Li, N Isolation and characterization of three Ta genes from wheat. / N. Li, N. Yin, Z. Niu, W. Hui, J. Song, C. Huang, H. Wang, L. Kong, D. Feng // *Gene*. - 2014. - V. 546. - C. 187–194.
179. Li, W. Genome-wide analysis and expression patterns of the YUCCA genes in maize. / W. Li, X. Zhao, X. Zhang // *J. Genet. Genom*. - 2015. - V. 42. - C. 707–710.
180. Liang, Z. *Mesostigma viride* genome and transcriptome provide insights into the origin and evolution of streptophyta. / Z. Liang, Y. Geng, C. Ji, H. Du, C. Eng Wong, Q. Zhang, Y. Zhang,

- P. Zhang, A. Riaz, S. Chachar, Y. Ding, J. Wen, Y. Wu, M. Wang, H. Zheng, Y. Wu, V. Demko, L. Shen, X. Han, P. Zhang, X. Gu, H. Yu // *Advanced Science*. - 2019. - V. 7. N. 1. - C. 1901850.
181. Lipinski, K.J. High spontaneous rate of gene duplication in *Caenorhabditis elegans*. / K.J. Lipinski, J.C. Farslow, K.A. Fitzpatrick, M. Lynch, V. Katju, U. Bergthorsson // *Current Biology*. - 2011. - V. 21. N. 4. - C. 306–310.
182. Little, D.P. Nuclear genome size in *Selaginella*. / D.P. Little, R.C. Moran, E.D. Brenner, D.W. Stevenson // *Genome*. - 2007. - V. 50. N. 4. - C. 351–356. doi: 10.1139/g06-138. doi:10.1139/g06-138
183. Liu, H. Widespread horizontal gene transfer from circular single-stranded DNA viruses to eukaryotic genomes. / Huiquan Liu, Yanping Fu, Bo Li, Xiao Yu, Jiatao Xie, Jiasen Cheng, Said A Ghabrial, Guoqing Li, Xianhong Yi, Daohong Jiang // *BMC Evol Biol*. - 2011. - V. 11. - C. 276.
184. Liu, H. Auxin biosynthesis by the YUCCA6 flavin monooxygenase gene in woodland strawberry. / H. Liu, W.F. Xie, L. Zhang, V. Valpuesta, Z.W. Ye, Q.H. Gao, K. Duan // *J. Integr. Plant Biol*. - 2014. - V. 56. - C. 350–363.
185. Liu, G. Local transcriptional control of YUCCA regulates auxin promoted root-growth inhibition in response to aluminium stress in *Arabidopsis*. / G. Liu, S. Gao, H. Tian, W. Wu, H.S. Robert, Z. Ding // *PLoS Genet*. - 2016. - V. 12. N. 10. - C. e1006360.
186. Ljung, K. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. / K. Ljung, R.P. Bhalerao, G. Sandberg // *Development*. - 2002. - V. 28. N. 4. - C. 465–474.
187. Ljung, K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. / K. Ljung // *Development*. - 2013. - V. 140. N. 5. - C. 943–950.
188. Lockhart J. The elegant simplicity of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell*. - 2015. - V. 27. – C. 1565.
189. Longo, G. "Randomness Increases Order in Biological Evolution" / G. Longo, M. Montevil // In Dinneen, Michael J.; Khoussainov, Bakhadyr; Nies, Andre (eds.). *Computation, Physics and Beyond. Lecture Notes in Computer Science*. Springer Berlin Heidelberg. – 2012. - V. 7160. C. 289–308. doi:10.1007/978-3-642-27654-5_22
190. Ludwig-Müller J. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. / J. Ludwig-Müller // *Journal of Experimental Botany*. - 2011. - V. 62. N. 6. - C. 1757–1773.
191. Luo, J. Aux/IAA Gene Family in Plants: Molecular Structure, Regulation, and Function. / J. Luo, J.-J. Zhou, J.Z. Zhang // *Int J Mol Sci*. - 2018, - V. 19. N. 1. - C. 259.
192. Lyons, E. Finding and comparing syntenic regions among *Arabidopsis* and the outgroups papaya, poplar, and grape: CoGe with rosids. / E. Lyons, B. Pedersen, J. Kane, M. Alam, R. Ming,

- H. Tang, X. Wang, J. Bowers, A. Paterson, D. Lisch, M. Freeling // *Plant Physiol.* - 2008. - V. 148. N. 4. - C. 1772–1781.
193. Ma, Q. Auxin signaling: A big question to be addressed by small molecules. / Q. Ma, P. Grones, S. Robert // *J. Exp. Bot.* - 2017. - V. 69. N. 2. - C. 313–328.
194. Maeda, H. The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. / H. Maeda, N. Dudareva // *Annu Rev Plant Biol.* - 2012. - V. 63. - C. 73–105.
195. Mano, Y. The pathway of auxin biosynthesis in plants. / Y. Mano, K. Nemoto // *Journal of Experimental Botany.* - 2012. - V. 63. N. 8. - C. 2853–2872.
196. Maraschin, F.dos S. Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. / F.dos S. Maraschin, J. Memelink R., Offringa // *The Plant Journal.* - 2009. - V. 59. - C. 100–109.
197. Marchler-Bauer, A. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. / A. Marchler-Bauer, C. Zheng, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, L.Y. Geer, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, C.J. Lanczycki, F. Lu, S. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, R.A. Yamashita, D. Zhang, S.H. Bryant // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - V. 41. - C. D348–D352.
198. Martin-Arevalillo, R. Evolution of the Auxin Response Factors from charophyte ancestors. / R. Martin-Arevalillo, E. Thévenon, F. Jégu, T. Vinos-Poyo, T. Vernoux, F. Parcy, R. Dumas // *Plos Genetics.* - 2019. - V. 15. N. 9. - C. e1008400.
199. Mashiguchi K., The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. / K. Mashiguchi, K. Tanaka, T. Sakai, S. Sugawara, H. Kawaide, M. Natsume, A. Hanada, T. Yaeno, K. Shirasu, H. Yao, P. McSteen, Y. Zhao, K. Hayashi, Y. Kamiya, H. Kasahara // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2011. - V. 108. N. 45. - C. 18512–18517.
200. Matasci, N. Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. / N. Matasci, L.-H. Hung, Z. Yan, E.J. Carpenter, N.J. Wickett, S. Mirarab, N. Nguyen, T. Warnow, S. Ayyampalayam, M. Barker, J.G. Burleigh, M.A. Gitzendanner, E. Wafula, J.P. Der, C.W. dePamphilis, B. Roure, H. Philippe, B.R. Ruhfel, N.W. Miles, S.W. Graham, S. Mathews, B. Surek, M. Melkonian, D.E. Soltis, P.S. Soltis, C. Rothfels, L. Pokorny, J.A. Shaw, L. DeGironimo, D.W. Stevenson, J.C. Villarreal, T. Chen, T.M. Kutchan, M. Rolf, R.S. Baucom, M.K. Deyholos, R. Samudrala, Z. Tian, X. Wu, X. Sun, Y. Zhang, J. Wang, J. Leebens-Mack, G. K.-S. Wong // *Gigascience.* - 2014 - V. 3. - C. 17.
201. Matthes, M.S. Auxin evodevo: Conservation and diversification of genes regulating auxin biosynthesis, transport, and signaling. / M.S. Matthes, N.B. Best, J.M. Robil, S. Malcomber, A. Gallavotti, P. McSteen // *Mol. Plant.* - 2019. - V. 12. N. 3. - C. 298–320.

202. Mazhar, S, 2013. Auxin producing non-heterocystous cyanobacteria and their impact on the growth and endogenous auxin homeostasis of wheat. / S. Mazhar, J.D. Cohen, S. Hasnain // *Journal of Basic Microbiology*. - 2013. - V. 53. N. 12. - C. 996–1003.
203. Mellor, N. Dynamic regulation of auxin oxidase and conjugating enzymes AtDAO1 and GH3 modulates auxin homeostasis. / N. Mellor, L.R. Band, A. Pencik, O. Novak, A. Rashed, T. Holman, M.H. Wilson, U. Voß, A. Bishopp, J.R. King // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2016. - V. 113. N. 39. - C. 11022–11027.
204. Michaud, O. Local auxin production underlies a spatially restricted neighbor-detection response in Arabidopsis. / O. Michaud, A.S. Fiorucci, I. Xenarios, C. Fankhauser // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2017. - V. 114. N. 28. - C. 7444–7449.
205. Mikami, K. Comprehensive quantification and genome survey reveal the presence of novel phytohormone action modes in red seaweeds. / K. Mikami, I.C. Mori, T. Matsuura, Y. Ikeda, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Hirayama // *Journal of Applied Phycology*. - 2016. - V. 28. - C. 2539–2548.
206. Mironova, V., Teale, W., Shahriari, M., Dawson, J., Palme, K. The systems biology of auxin in developing embryos. // *Trends in plant science*. - 2017. - V. 22. - C. 225-235. doi:10.1016/j.tplants.2016.11.010.
207. Mockaitis, K. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. / K. Mockaitis, M. Estelle // *Annu Rev Cell Dev Biol*. - 2008. - V. 24. - C. 55–80.
208. Moore, K.R. An Expanded Ribosomal Phylogeny of Cyanobacteria Supports a Deep Placement of Plastids. / K.R. Moore, C. Magnabosco, L. Momper, D.A. Gold, T. Bosak, G.P. Fournier // *Front Microbiol*. - 2019. - V. 10. - C. 1612.
209. Moustafa, A. Chlamydiae has contributed at least 55 genes to Plantae with predominantly plastid functions. / A. Moustafa, A. Reyes-Prieto, D. Bhattacharya // *PLoS One*. - 2008. - V. 3. N. 5. - C. e2205.
210. Mukherjee, A. The bioactive potential of phytohormones: A review. / A. Mukherjee, A.K. Gaurav, S. Singh, S. Yadav, S. Bhowmick, S. Abeysinghe, J.P. Verma // *Biotechnol Rep (Amst)*. - 2022. - V. 35. - C e00748. doi: 10.1016/j.btre.2022.e00748
211. Müller-Moulé, P. YUCCA auxin biosynthetic genes are required for Arabidopsis shade avoidance. / P. Müller-Moulé, K. Nozue, M.L. Pytlak, C.M. Palmer, M.F. Covington, A.D. Wallace, S.L. Harmer, J.N. Maloof // *Peer J*. - 2016. - V. 4. - C. e2574.
212. Mutte, S.K. Origin and evolution of the nuclear auxin response system. / S.K. Mutte, H. Kato, C. Rothfels, M. Melkonian, G.K.-S. Wong, D. Weijers // *Elife*. - 2018. - V. 7. - C. e33399.
213. Nemhauser, J.L. Back to basics: what is the function of an Aux/IAA in auxin response? / J.L. Nemhauser // *New Phytol*. - 2018. - V. 218. N. 4. - C. 1295–1297.

214. Nguyen, L.-T. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. / L.-T. Nguyen, H.A. Schmidt, A. von Haeseler, B.Q. Minh // *Molecular Biology and Evolution*. - 2015. - V. 32. N. 1. - C. 268–274.
215. Niemann, D.I. Growth inhibitors and growth promoters in *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta). / D.I. Niemann, K. Dörffling // *J Phycol*. - 1980. - V. 16. N. 3 - C. 383–389.
216. Nishiyama, T. The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. / T. Nishiyama, H. Sakayama, J. de Vries, H. Buschmann, D. Saint-Marcoux, K.K. Ullrich, F.B. Haas, L. Vanderstraeten, D. Becker, D. Lang, S. Vosolsobě, S. Rombauts, P.K.I. Wilhelmsson, P. Janitza, R. Kern, A. Heyl, F. Rümpler, L.I.A.C. Villalobos, J.M. Clay, R. Skokan, A. Toyoda, Y. Suzuki, H. Kagoshima, E. Schijlen, N. Tajeshwar, B. Catarino, A.J. Hetherington, A. Saltykova, C. Bonnot, H. Breuninger, A. Symeonidi, G.V. Radhakrishnan, F. Van Nieuwerburgh, D. Deforce, C. Chang, K.G. Karol, R. Hedrich, P. Ulvskov, G. Glöckner, C.F. Delwiche, J. Petrášek, Y.V. de Peer, J. Friml, M. Beilby, L. Dolan, Y. Kohara, S. Sugano, A. Fujiyama, P.-M. Delaux, M. Quint, G. Theißen, MartinHagemann13JesperHarholt33C. Dunand, S. Zachgo, J. Langdale, F. Maumus, D. Van Der Straeten, S.B. Gould, S.A. Rensing // *Cell*. - 2018. - V. 174. N. 2. - C. 448–464.
217. Nito, K. Spatial regulation of the gene expression response to shade in *Arabidopsis* seedlings. / K. Nito, T. Kajiyama, J. Unten-Kobayashi, A. Fujii, N. Mochizuki, H. Kambara, A. Nagatani // *Plant Cell Physiol*. - 2015. - V. 56. N. 7. - C. 1306–1319.
218. Nagawa, S. ROP GTPase-Dependent Actin Microfilaments Promote PIN1 Polarization by Localized Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis. / S. Nagawa, T. Xu, D. Lin, P. Dhonukshe, X. Zhang, J. Friml, B. Scheres, Y. Fu, Z. Yang // *PLoS Biol*. - 2012. - V. 10. N. 4. - C. e1001299.
219. Normanly, J. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. / J. Normanly, J.D. Cohen // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1993. - V. 90. N. 21. - C. 10355–10359.
220. Normanly, J. Auxin metabolism. / J. Normanly // *Physiologia Plantarum*. - 1997. - V. 100. N. 3. - C. 431–442.
221. Normanly, J. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. / J. Normanly // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. - 2010. - V. 2. N. 1. - C. a001594.
222. Nowak, J. Auxin induced stress tolerance in algae. / J. Nowak, B. Sonaike, G. W. Lawson // *Environ Pollut*. - 1988. - V. 51. N. 3. - C. 213–218.

223. Niyogi, K.K. Two anthranilate synthase genes in Arabidopsis: defense-related regulation of the tryptophan pathway. / K.K. Niyogi, G.R. Fink // *Plant Cell*. - 1992. - V. 4. N. 6. - C. 721–733.
224. Niyogi, K.K. Suppressors of trp 1 fluorescence identify a new Arabidopsis gene, TRP4, encoding the anthranilate synthase β subunit. / K.K. Niyogi, R.L. Last, G.R. Fink, B. Keith // *Plant Cell*. - 1993. - V. 5. N. 9. - C. 1011–1027.
225. Nystedt, B. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. / B. Nystedt, N.R. Street, A. Wetterbom, A. Zuccolo, Y.-C. Lin, D.G. Scofield, F. Vezzi, N. Delhomme, S. Giacomello, A. Alexeyenko, R. Vicedomini, K. Sahlin, E. Sherwood, M. Elfstrand, L. Gramzow, K. Holmberg, J. Hällman, O. Keech, L. Klasson, M. Koriabine, M. Kucukoglu, M. Käller, J. Luthman, F. Lysholm, T. Niittyla, A. Olson, N. Rilakovic, C. Ritland, J.A. Rossello, J. Sena, T. Svensson, C. Talavera-Lopez, G. Theißen, H. Tuominen, K. Vanneste, Z.-Q. Wu, B. Zhang, P. Zerbe, L. Arvestad, R. Bhalerao, J. Bohlmann, J. Bousquet, R.G. Gil, T.R. Hvidsten, P. de Jong, J. MacKay, M. Morgante, K. Ritland, B. Sundberg, S.L. Thompson, Y. Van de Peer, B. Andersson, O. Nilsson, P.K. Ingvarsson, J. Lundeberg, S. Jansson // *Nature*. - 2013. - V. 497. N. 7451. - C. 579–584.
226. Ohno S. Evolution by Gene Duplication. Springer. Berlin, Germany, - 1970.
227. Ohtaka, K. Primitive Auxin Response without TIR1 and Aux/IAA in the Charophyte Alga *Klebsormidium nitens*. / K. Ohtaka, K. Hori, Y. Kanno, M. Seo, H. Ohta // *Plant Physiol*. - 2017. - V. 174. N. 3. - C. 1621–1632.
228. Okushima, Y. Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. / Y. Okushima, P.J. Overvoorde, K. Arima, J.M. Alonso, A. Chan, C. Chang, J.R. Ecker, B. Hughes, A. Lui, D. Nguyen, C. Onodera, H. Quach, A. Smith, G. Yu, A. Theologis // *Plant Cell*. - 2005. - V. 17. N. 2. - C. 444–463.
229. Olucha J., Lamb A.L. Mechanistic and structural studies of the N-hydroxylating flavoprotein monooxygenases. / J. Olucha, A.L. Lamb // *Bioorg Chem*. - 2011. - V. 39. N. 5-6. - C. 171–177.
230. Ostin, A. Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. / A. Ostin, M. Kowalczyk, R.P. Bhalerao, G. Sandberg // *Plant Physiology*. - 1998. - V. 118. N. 1. - P. 285–296.
231. Ostria-Gallardo, E. Transcriptomic analysis suggests a key role for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE, NAC and YUCCA genes in the heteroblastic development of the temperate rainforest tree *Gevuina avellana* (Proteaceae). / E. Ostria-Gallardo, A. Ranjan, D.H. Chitwood, R. Kumar, B.T. Townsley, Y. Ichihashi, L.J. Corcuera, N.R. Sinha // *New Phytol*. - 2016. - V. 210. - C. 694–708.

232. Overvoorde, P.J. Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. / P.J. Overvoorde, Y. Okushima, J. M. Alonso, A. Chan, C. Chang, J.R. Ecker, B. Hughes, A. Liu, C. Onodera, Hong Quach, A. Smith, G.a Yu, A. Theologis // *Plant Cell*. - 2005. - V. 17. N. 12. - C. 3282–3300.
233. Pacheco-Villalobos, D. Disturbed local auxin homeostasis enhances cellular anisotropy and reveals alternative wiring of auxin-ethylene crosstalk in *Brachypodium distachyon* seminal roots. / D. Pacheco-Villalobos, M. Sankar, K. Ljung, C.S. Hardtke // *PLoS Genet*. - 2012. - V. 9. N. 6. - C. e1003564.
234. Paque, S. Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. / S. Paque, D. Weijers // *BMC Biology* volume. - 2016. - V. 14, N. 67. doi: 10.1186/s12915-016-0291-0.
235. Park, H.C. Roles of YUCCAs in auxin biosynthesis and drought stress responses in plants. / H.C. Park, J.Y. Cha, D.J. Yun // *Plant Signal. Behav.* - 2013. - V. 8. N. 6. - C. e24495.
236. Parry, G. Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors / G. Parry, L.I. Calderon-Villalobos, M. Prigge, B. Peret, S. Dharmasiri, H. Itoh, E. Lechner, W.M. Gray, M. Bennett, M. Estelle // *PNAS*. - 2009. - V. 106. N. 52. - C. 22540–22545.
237. Paterson, A.H. Many gene and domain families have convergent fates following independent whole-genome duplication events in *Arabidopsis*, *Oryza*, *Saccharomyces* and *Tetradon*. / A.H. Paterson, B.A. Chapman, J.C. Kissinger, J.E. Bowers, F.A. Feltus, J.C. Estill // *Trends Genet.* - 2006. - V. 22. - C. 597–602.
238. Patwardhan, A. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. / A. Patwardhan, S. Ray, A. Roy // *J Phylogen Evolution Biol.* - 2014. - V. 2. N. 2. doi: 10.4172/2329-9002.1000131.
239. Peer, W.A. Seven things we think we know about auxin transport. / W.A. Peer, J.J. Blakeslee, H. Yang, A.S. Murphy // *Mol. Plant*. - 2011. - V. 4. N. 3. - C. 487–504.
240. Pei, J. PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. / J. Pei, N.V. Grishin // *Bioinformatics*. - 2007. - V. 23. N. 7. - C. 802–808.
241. Peret, B. AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. / B. Peret, K. Swarup, A. Ferguson, M. Seth, Y. Yang, S. Dhondt, N. James, I. Casimiro, P. Perry, A. Syed, H. Yang, J. Reemmer, E. Venison, C. Howells, M.A. Perez-Amador, J. Yun, J. Alonso, G.T.S. Beemster, L. Laplace, A. Murphy, M.J. Bennett, E. Nielsen, R. Swarup // *The Plant Cell*. - 2012. - V. 24. N. 7. - C. 2874–2885.
242. Peris, C.I.P. Green beginnings - pattern formation in the early plant embryo. / C.I.P. Peris, E.H. Rademacher, D. Weijers // *Curr Top Dev Biol*. - 2010. - V. 91. - C. 1–27.
243. Petrasek, J. Auxin transport routes in plant development. / J. Petrasek, J. Friml // *Development*. - 2009. - V. 136. N. 16. - C. 2675–2688.

244. Phillips, K.A. Vanishing tassel2 encodes a grass-specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. / K.A. Phillips, A.L. Skirpan, X. Liu, A. Christensen, T.L. Slewinski, C. Hudson, S. Barazesh, J.D. Cohen, S. Malcomber, P. McSteen // *Plant Cell*. - 2011. - V. 23. N. 2. - C. 550–566.
245. Pinon, V. Local auxin biosynthesis regulation by PLETHORA transcription factors controls phyllotaxis in Arabidopsis. / V. Pinon, K. Prasad, S.P. Grigg, G.F. Sanchez-Perez, B. Scheres // *PNAS*. - 2013. - V. 110. N. 3. - C. 1107–1112.
246. Pires, N.D. Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. / N.D. Pires, L. Dolan // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. - 2012. - V. 367. N. 1588. - C. 508–518.
247. Porco, S. Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. / S. Porco, A. Pencik, A. Rashed, U. Voß, R. Casanova-Saez, A. Bishopp, A. Golebiowska, R. Bhosale, R. Swarup, K. Swarup, P. Penakova, O. Novak, P. Staswick, P. Hedden, A.L. Phillips, K. Vissenberg, M.J. Bennett, K. Ljung // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2016. - V. 113. N. 39. - C. 11016–11021.
248. Possart, A. Characterization of Phytochrome Interacting Factors from the Moss *Physcomitrella patens* Illustrates Conservation of Phytochrome Signaling Modules in Land Plants. / A. Possart, T. Xu, I. Paik, S. Hanke, S. Keim, H.-M. Hermann, L. Wolf, M. Hiß, C. Becker, E. Huq, S.A. Rensing, A. Hiltbrunner // *The Plant Cell*. - 2017. - V. 29. N. 2. - C. 310–330.
249. Poulet, A. Bioinformatics Analysis of Phylogeny and Transcription of TAA/YUC Auxin Biosynthetic Genes. / A. Poulet, V. Kriechbaumer // *Int J Mol Sci*. - 2017. - V. 18. N. 8. - C. 1791.
250. Poulsen, C. Purification and characterization of anthranilate synthase from *Catharanthus roseus*. / C. Poulsen, R.J. Bongaerts, R. Verpoorte // *Eur. J. Biochem*. - 1993. - V. 212. N. 2. - C. 431–440.
251. Poulsen, L.L. Multisubstrate flavin-containing monooxygenase: application of mechanism to specificity. / L.L. Poulsen, D.M. Ziegler // *Chem Biol Interact*. - 1995. - V. 96. - C. 57–73.
252. Powers, S.K. Up in the air: Untethered Factors of Auxin Response. / Samantha K. Powers, C.L. Strader // *F1000Res*. - 2016. - V. 5. - C. F1000 Faculty Rev-133.
253. Price, N.M. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. / M.N. Price, P.S. Dehal, A.P. Arkin // *Mol Biol Evol*. - 2009. - V. 26. - C. 1641–1650.
254. Prusty, R. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. / R. Prusty, P. Grisafi, G.R. Fink // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2004. - V. 101. N. 12. - C. 4153–4157.

255. Qin, G. An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. / G. Qin, H. Gu, Y. Zhao, Z. Ma, G. Shi, Y. Yang, E. Pichersky, H. Chen, M. Liu, Z. Chen, L.-J. Qu // *Plant Cell*. - 2005. - V. 17. N. 10. - C. 2693–2704.
256. Quint, M. Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. / M. Quint, C. Delker, K.A. Franklin, Wigge PA, K.J. Halliday, M. van Zanten // *Nat. Plants*. - 2016. - V. 2. - C. 15190.
257. Radwanski, E.R. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. / E.R. Radwanski, R.L. Last // *Plant Cell*. - 1995. - V. 7. N.7. - C. 921–934.
258. Radwanski, E.R. Arabidopsis thaliana tryptophan synthase alpha: gene cloning, expression, and subunit interaction. / E.R. Radwanski, J. Zhao, R.L. Last // *Mol Gen Genet*. - 1995, - V. 248. N. 6. - C. 657–667.
259. Rahman, A. Auxin: a regulator of cold stress response. // *Physiologia plantarum*. - 2013, - V. 147. N. 28-35. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01617.x.
260. Ramos, J.A. Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. / J.A. Ramos N. Zenser O. Leyser J. Callis // *The Plant Cell*. - 2001. - V. 13. N. 10. - C. 2349–2360.
261. Ranea, J.A. Evolution of protein superfamilies and bacterial genome size. / J.A. Ranea, D.W. Buchan, J.M. Thornton, C.A. Orengo // *J Mol Biol*. - 2004. - V. 336. - C. 871–887.
262. Rastogi, S. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. / S. Rastogi, D.A. Liberles // *BMC Evolutionary Biology*. - 2005. - V. 5. - C. 28.
263. Reinhardt, D. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. / D. Reinhardt, E.-R. Pesce, P. Stieger, T. Mandel, K. Baltensperger, M. Bennett, J. Traas, J. Friml, C. Kuhlemeier // *Nature*. - 2003. - V. 426. - C. 255–260.
264. Remington, D.L. Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. / D.L. Remington, T.J. Vision, T.J. Guilfoyle, J.W. Reed // *Plant Physiol*. - 2004. - V. 135. N. 3. - C. 1738–1752.
265. Rensing, S.A. The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. / S.A. Rensing, D. Lang, A.D. Zimmer, A. Terry, A. Salamov, H. Shapiro, T. Nishiyama, P.-F. Perroud, E.A. Lindquist, Y. Kamisugi, T. Tanahashi, K. Sakakibara, T. Fujita, K. Oishi, T. Shin-I, Y. Kuroki, A. Toyoda, Y. Suzuki, S.-I. Hashimoto, K. Yamaguchi, S. Sugano, Y. Kohara, A. Fujiyama, A. Anterola, S. Aoki, N. Ashton, W.B. Barbazuk, E. Barker, J.L. Bennetzen, R. Blankenship, S.H. Cho, S.K. Dutcher, M. Estelle, J.A. Fawcett, H. Gundlach, K. Hanada, A. Heyl, K.A. Hicks, J. Hughes, M. Lohr, K. Mayer, A. Melkozernov, T. Murata, D.R. Nelson, B. Pils, M. Prigge, B. Reiss, T. Renner, S. Rombauts, P.J. Rushton, A. Sanderfoot, G.

- Schween, S.-H. Shiu, K. Stueber, F.L. Theodoulou, H. Tu, Y. Van de Peer, P.J. Verrier, E. Waters, A. Wood, L. Yang, D. Cove, A.C. Cuming, M. Hasebe, S. Lucas, B.D. Mishler, R. Reski, I.V. Grigoriev, R.S. Quatrano, J.L. Boore // *Science*. - 2008. - V. 319. N. 5859. - C. 64–69.
266. Renny-Byfield, S. Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. / Renny- S. Byfield, J.F. Wendel // *Am J Bot*. - 2014. - V. 101. N. 10. - C. 1711–1725.
267. Riano-Pachon, D.M. PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. / D.M. Riano-Pachon, S. Ruzicic, I. Dreyer, B. Mueller-Roeber // *BMC Bioinformatics*. - 2007. - V. 8. - C. 42.
268. Riebel, A. Expanding the set of rhodococcal Baeyer–Villiger monooxygenases by high-throughput cloning, expression and substrate screening. / A. Riebel, H.M. Dudek, G. de Gonzalo, P. Stepniak, L. Rychlewski, M.W. Fraaije // *Appl Microbiol Biotechnol*. - 2012. - V. 95. N. 6. - C. 1479–1489.
269. Riebel, A. Expanding the biocatalytic toolbox of flavoprotein monooxygenases from *Rhodococcus jostii* RHA1. / A. Riebel, G. de Gonzalo, M.W. Fraaije // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. - 2013. - V. 88. - C. 20–25.
270. Riebel, A. Type II Flavin-Containing Monooxygenases: A New Class of Biocatalysts that Harbors Baeyer–Villiger Monooxygenases with a Relaxed Coenzyme Specificity. / A. Riebel, M.J. Fink, M.D. Mihovilovic, M.W. Fraaije // *ChemCatChem*. - 2014. - V. 6. N. 4. - C. 1112–1117.
271. Romani, F. Origin of TAA Genes in Charophytes: New Insights into the Controversy over the Origin of Auxin Biosynthesis. / F. Romani // *Frontiers in Plant Science*. - 2017. - V. 8. - C. 1616.
272. Rose, A.B. An Allelic Series of Blue Fluorescent *trpl* Mutants of *Arabidopsis thaliana*. / A.B. Rose, J. Li, R.L. Last // *Genetics*. - 1997. - V. 145. N. 1. - C. 197–205.
273. Rozov, S.M., Zagorskaya, A.A., Deineko, E.V., Shumny, V.K. Auxins: Biosynthesis, metabolism, and transport. // *Biology Bulletin Reviews*. - 2013. - V. 3. - C. 286–295. doi:10.1134/S2079086413040087.
274. Roy, A. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. / A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang // *Nature protocols*. - 2010. - V. 5. - C. 725–738.
275. Rubin, G.M. Comparative genomics of the eukaryotes. / G.M. Rubin, M.D. Yandell, J.R. Wortman, G.L. Gabor, Miklos, C.R. Nelson, I.K.. Hariharan, M.E.. Fortini, P.W. Li, R. Apweiler, W. Fleischmann, J. M. Cherry, S. Henikoff, M.. Skupski, S. Misra, M. Ashburner, E. Birney, M.S. Boguski, T. Brody, P. Brokstein, S.E. Celniker, S.A. Chervitz, D. Coates, A. Cravchik, A. Gabrielian, R.F. Galle, W.M. Gelbart, R.A. George, L.S.B. Goldstein, F. Gong, P. Guan, N.L.. Harris, B.A. Hay, R.A. Hoskins, J. li, Z. Li, R.O. Hynes, S.J.M. Jones, P.M. Kuehl, B. Lemaitre, J.T. Littleton, D.K. Morrison, C. Mungall, P.C. O'Farrell, O.K.. Pickeral, C. Shue, L.B. Vossall,

- J. Zhang, Q. Zhao, X.H. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, R. Gibbs, J.C. Venter, M.D. Adams, S. Lewis // *Science*. - 2000. - V. 287. - C. 2204–2215.
276. Salehin, M. SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. / M. Salehin, R. Bagchi, M. Estelle // *The Plant Cell*. - 2015. - V. 27. N. 1. - C. 9–19.
277. Salvini, M. Alpha-tryptophan synthase of *Isatis tinctoria*: gene cloning and expression. / M. Salvini, T.M. Boccardi, E. Sani, R. Bernardi, S. Tozzi, C. Pugliesi, M. Durante // *Plant Physiol Biochem*. - 2008. - V. 46. N. 7. - C. 715–723.
278. Sang, Y. Endogenous auxin biosynthesis and de novo root organogenesis. / Y. Sang, Z. Cheng, X. Zhang // *Journal of Experimental Botany*. - 2016. - V. 67. N. 14. - C. 4011–4013.
279. Sauer, M. PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators. / M. Sauer, J. Kleine-Vehn // *Development*. - 2019. - V. 146. N. 15. - C. dev168088.
280. Scarpella, E. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. / E. Scarpella, D. Marcos, J. Friml, T. Berleth // *Genes Dev*. - 2006. - V. 20. N. 8. - C. 1015–1027.
281. Schlaich, N.L. Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. / N.L. Schlaich // *TRENDS in Plant Science*. - 2007, - V. 12. N. 9. - C. 412–417.
282. Schmidt, V. The role of auxin in streptophyte algae. Supervisor: J. Petršsek, Advisors: R. Skokan, S. Vosolsobe / V. Schmidt // - Prague: Charles University Faculty of Science - 2021.
283. Sergeeva, E Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. / E. Sergeeva, A. Liaimer, B. Bergman // *Planta*. - 2002. - V. 215. N. 2. - C. 229–223.
284. Shi, H. Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. / H. Shi, L. Chen, T. Ye, X. Liu, K. Ding, Z. Chan // *Plant Physiol. Biochem*. - 2014. - V. 82. - C. 209–217.
285. Shiu, S.H. Transcription factor families have much higher expansion rates in plants than in animals. / S.H. Shiu, M.C. Shih, W.H. Li // *Plant Physiol*. - 2005. - V. 139. - C. 18–26.
286. Skokan, R. PIN-driven auxin transport emerged early in streptophyte evolution. / R. Skokan, E. Medvecka, T. Viaene, S. Vosolsobe, M. Zwiewka, K. Müller, P. Skupa, M. Karady, Y. Zhang, D.P. Janacek, U.Z. Hammes, K. Ljung, T. Nodzyński, J. Petršsek, J. Friml // *Nature Plants*. - 2019. - V. 5. - C. 1114–1119.
287. Skoog, F. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. / F. Skoog, C.O. Miller // *Symp. Soc. Exp. Biol*. - 1957. - V. 54. - C. 118–130.
288. Sisi, N.A. ER-Localized PIN Carriers: Regulators of Intracellular Auxin Homeostasis. / N.A. Sisi, K. Ruzicka // *Plants*. - 2020, - V. 9. N. 11. - C. 1527.

289. Soltis, D.E. Polyploidy and angiosperm diversification. / D.E. Soltis, V.A. Albert, J. Leebens-Mack, C.D. Bell, A.H. Paterson, C. Zheng, D. Sankoff, C.W. Depamphilis, P.K. Wall, P.S. Soltis // *Am J Bot.* - 2009. - V. 96. N. 1. - C. 336–348.
290. Spaepen, S. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. / S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans // *FEMS Microbiol Rev.* - 2007. - V. 31. N. 4. - C. 425–448.
291. Spenser, V. What can lycophytes teach us about plant evolution and development? Modern perspectives on an ancient lineage. / V. Spencer, Z.N. Venz, C.J. Harrison // - 2020. // doi:10.1111/ede.12350
292. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. / A. Stamatakis // *Bioinformatics.* - 2014. - V. 30. N. 9. - C. 1312–1313.
293. Stehr, M. A hydrophobic sequence motif common to N-hydroxylating enzymes. / M. Stehr, H. Diekmann, L. Smau, O. Seth, S. Ghisla, M. Singh, P. Macheroux // *Trends Biochem Sci.* - 1998. - V. 23. N. 2. - C. 56–57.
294. Staswick, P.E. Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. / P.E. Staswick, B. Serban, M. Rowe, I. Tiriyaki, M.T. Maldonado, M.C. Maldonado, W. Suza // *Plant Cell.* – 2005. – V. 17. N. 2. – C. 616–627.
295. Steinegger M., Meier M., Mirdita M., Vöhringer H., Haunsberger S.J., Söding J. HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. / M. Steinegger, M. Meier, M. Mirdita, H. Vöhringer, S.J. Haunsberger, J. Söding // *BMC Bioinformatics.* - 2019. - V. 20. Article number 473.
296. Stepanova, A.N. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. / A.N. Stepanova, J. Robertson-Hoyt, J. Yun, L.M. Benavente, D.-Y. Xie, K. Doležal, A. Schlereth, G. Jürgens, J.M. Alonso // *Cell.* - 2008. - V. 133. N. 1. 177–191.
297. Stepanova, A.N. The Arabidopsis YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. / A.N. Stepanova, J. Yun, L.M. Robles, O. Novak, W. He, H. Guo, K. Ljung, J.M. Alonso // *The Plant Cell.* - 2011. - V. 23. N. 11. - C. 3961–3973.
298. Stepanova, A.N. ‘Auxin catabolism unplugged: Role of IAA oxidation in auxin homeostasis.’ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* / A.N. Stepanova, J.M. Alonso // *National Academy of Sciences.* - 2016. - V. 113. N. 39. – C. 10742–10744.
299. Stirk, W.A. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains(1). / W.A. Stirk, V. Ordog, O. Novak, J. Rolcik, M. Strnad, P. Balint, J. van Staden // *J Phycol.* - 2013. - V. 49 - N. 3. - C. 459–467.

300. Strader, L.C. The IBR5 phosphatase promotes Arabidopsis auxin responses through a novel mechanism distinct from TIR1-mediated repressor degradation. / L.C. Strader, M. Monroe-Augustus, B. Bartel // *BMC Plant Biology*. - 2008. - V. 8, - Article number 41.
301. Sun, J. PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth. / J. Sun, L. Qi, Y. Li, J. Chu, C. Li // *PLoS Genet*. - 2012. - V. 8. N. 3. - C. e1002594.
302. Sundberg, S. Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. / S. Sundberg, L. Ostergaard // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. - 2009. - V. 1. N. 6. - C. a001628.
303. Swarup, R. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. / R. Swarup, J. Friml, A. Marchant, K. Ljung, G. Sandberg, K. Palme, M. Bennett // *Genes Dev*. - 2001. - V. 15. N. 20. - C. 2648–2653.
304. Swarup, R. AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview. / R. Swarup, B. Peret // *Front Plant Sci*. - 2012. - V. 3. - C. 225.
305. Szemenyei, H. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. / H. Szemenyei, M. Hannon, J.A. Long // *Science*. - 2008. - V. 319. N. 5868. - C. 1384–1386.
306. Sztein, A.E. Evolutionary patterns in the auxin metabolism of green plants. / A.E. Sztein, J.D. Cohen, T.J. Cooke // *International Journal of Plant Sciences*. - 2000. - V. 161. N. 6. - C. 849–859.
307. Taft, R.J. Increasing biological complexity is positively correlated with the relative genome-wide expansion of non-protein-coding DNA sequences. / R.J. Taft, J.S. Mattick // *Genome Biol*. - 2003. - V. 5. N. 1. - C. P1.
308. Tanaka, K. UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in Arabidopsis. / K. Tanaka, K. Hayashi, M. Natsume, Y. Kamiya, H. Sakakibara, H. Kawaide, H. Kasahara // *Plant Cell Physiol*. - 2014. - V. 55. N. 1. - C. 218–228.
309. Tao, Y. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. / Y. Tao, J.-L. Ferrer, K. Ljung, F. Pojer, F. Hong, J.A. Long, L. Li, J.E. Moreno, M.E. Bowman, L.J. Ivans, Y. Cheng, J. Lim, Y. Zhao, C.L. Ballaré, G. Sandberg, J.P. Noe, J. Chory // *Cell*. - 2008. - V. 133. N. 1 - C. 164–176. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.049.
310. Teale, W.D. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. / W.D. Teale, I.A. Paponov, K. Palme // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. - 2006. - V. 7. - C. 847–859.
311. Teichmann, S.A. Gene regulatory network growth by duplication. / S.A. Teichmann, M.M. Babu // *Nat Genet*. - 2004. - V. 36. N. 5. - C. 492–496.

312. Thodberg, S. The “Green” FMOs: Diversity, Functionality and Application of Plant Flavoproteins. / S. Thodberg, E.H.J. Neilson // *Catalysts*. - 2020. - V. 10. N. 3. - C. 329.
313. Tivendale, N.D. Biosynthesis of the Halogenated Auxin, 4-Chloroindole-3-Acetic Acid. / N.D. Tivendale, S.E. Davidson, N.W. Davies, J.A. Smith, M. Dalmais, A.I. Bendahmane, L.J. Quittenden, L. Sutton, R.K. Bala, C. Le Signor, R. Thompson, J. Horne, J.B. Reid, J.J. Ross // *Plant Physiology*. - 2012. - V. 159. N. 3. - C. 1055–1063.
314. Tivendale, N.D. The shifting paradigms of auxin biosynthesis. // N.D. Tivendale, J.J. Ross, J.D. Cohen / *Trends in plant science*. - 2014. - V. 19. - C. 44–51. doi:10.1016/j.tplants.2013.09.012.
315. Tiwari, S.B. AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. / S.B. Tiwari, X.J. Wang, G. Hagen, T.J. Guilfoyle // *Plant Cell*. - 2001. - V. 13. N. 12. - C. 2809–2822.
316. Tiwari, S.B. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. / S.B. Tiwari, G. Hagen, T. Guilfoyle // *Plant Cell*. - 2003. - V. 15. N. 2. - C. 533–543.
317. Tiwari, S.B. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. / S.B. Tiwari, G. Hagen, T.J. Guilfoyle // *Plant Cell*. - 2004. - V. 16. N. 2. - C. 533–543.
318. Tobena-Santamaria, R. FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. / R. Tobena-Santamaria, M. Bliet, K. Ljung, G. Sandberg, J.N.M. Mol, E. Souer, R. Koes // *Genes Dev*. - 2002. - V. 16. - C. 753–763.
319. Tromas, A. AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. / A. Tromas, I. Paponov, C. Perrot-Rechenmann // *Trends Plant Sci*. - 2010. - V. 15. - C. 436–446.
320. Tozawa, Y. Characterization of rice anthranilate synthase alpha-subunit genes OASA1 and OASA2. Tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback-insensitive mutant of OASA1. / Y. Tozawa, S. University, H. Hasegawa, K. Wakasa // *Plant Physiology*. - 2001. - V. 126. N. 4. - C. 1493–1506.
321. Trewavas, A.J. What remains of the Cholodny-Went theory? Introduction. / A.J. Trewavas // *Plant Cell Environ*. - 1992. - V. 15. N. 7. - C. 761.
322. Turnaev, I.I. Plant auxin biosynthesis did not originate in charophytes. / I.I. Turnaev, K.V. Gunbin, D.A. Afonnikov // *Trends Plant Sci*. - 2015. - V. 20. - C. 463-465.
323. Turnaev, I.I. The Phylogeny of Class B Flavoprotein Monooxygenases and the Origin of the YUCCA Protein Family. / I.I. Turnaev, K.V. Gunbin, V.V. Suslov, I.R. Akberdin, N.A. Kolchanov, D.A. Afonnikov // *Plants (Basel)*. - 2020. - V. 9. N. 9. - C. 1092.

324. Turner, D.J. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. / D.J. Turner, M. Miretti, D. Rajan, H. Fiegler, N.P. Carter, M.L. Blayney, S. Beck, M.E. Hurles // *Nature Genetics*. - 2008. - V. 40. N. 1. - C. 90–95.
325. Tzin, V. The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. / V. Tzin, G. Galili // *Arabidopsis Book*. - 2010. - V. 8. - C. e0132.
326. Ulmasov, T. Composite structure of auxin response elements. / T. Ulmasov, Z.B. Liu, G. Hagen, T.J. Guilfoyle // *The Plant Cell*. - 1995. - V. 7. N. 10. - C. 1611–1623.
327. Ulmasov, T. Dimerization and DNA binding of auxin response factors, T. Ulmasov, G. Hagen, T. Guilfoyle // *J. Plant Journal*. Blackwell Publishing Ltd. - 1999. - V. 19. N. 3. - C. 309–319.
328. Van Bel, M. Dissecting Plant Genomes with the PLAZA Comparative Genomics Platform. / M. Van Bel, S. Proost, E. Wischnitzki, S. Movahedi, C. Scheerlinck, Y. Van de Peer, K. Vandepoele // *Plant Physiol*. -2012. - V. 158. N. 2. - C. 590–600.
329. van Berkel, W.J.H. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. / W.J.H. van Berkel, N.M. Kamerbeek, M.W. Fraaije // *J. Biotechnol*. - 2006. - V. 124. N. 4. - C. 670–689.
330. Van de Peer Y. The evolutionary significance of ancient genome duplications. / Y. Van de Peer, S. Maere, A. Meyer // *Nat Rev Genet*. - 2009. - V. 10. - C. 725–732.
331. Van Nimwegen, E. Scaling laws in the functional content of genomes. / E. van Nimwegen // *Trends Genet*. - 2003. - V. 19. - C. 479–484.
332. Viaene, T. Origin and evolution of PIN auxin transporters in the green lineage. / T. Viaene, C.F. Delwiche, S.A. Rensing, J. Friml // *Trends Plant Sci*. - 2013. - V. 18. - C. 5–10.
333. Vogel, C. Protein family expansions and biological complexity. / C. Vogel, C. Chothia // *PLoS Comput Biol*. - 2006. - V. 2. N. 5. - C. e48.
334. Vanneste, S. Auxin: a trigger for change in plant development. / S. Vanneste, J. Friml // *Cell*. - 2009. - V. 136. N. 6. - C. 1005–1016.
335. Wang, B. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. / B. Wang, J. Chu, T. Yu, Q. Xu, X. Sun, J. Yuan, G. Xiong, G. Wang, Y. Wang, J. Li // *PNAS*. - 2015. - V. 112. N. 15. - C. 4821–4826.
336. Wang, C. Origin of plant auxin biosynthesis in charophyte algae. / C. Wang, Y. Liu, S.-H. Li, G.-Z. Han // *Trends in Plant Science*. - 2014. - V. 19. N. 12. - C. 741–743.
337. Wang, C. Commentary: plant auxin biosynthesis did not originate in charophytes. / C. Wang, S.-S. Li, G.-Z. Han // *Plant Sci*. - 2016. - V. 7. - C. 158.

338. Wang, H. Identification of BnaYUCCA6 as a candidate gene for branch angle in *Brassica napus* by QTL-seq. / H. Wang, H. Cheng, W. Wang, J. Liu, M. Hao, D. Mei, R. Zhou, L. Fu, Q. Hu // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – C. 38493.
339. Wang, S. Genomes of early-diverging streptophyte algae shed light on plant terrestrialization. / S. Wang, L. Li, H. Li, S.K. Sahu, H. Wang, Y. Xu, W. Xian, B. Song, H. Liang, S. Cheng, Y. Chang, Y. Song, Z. Çebi, S. Wittek, T. Reder, M. Peterson, H. Yang, J. Wang, B. Melkonian, Y. Van de Peer, X. Xu, G.K.-S. Wong, M. Melkonian, H. Liu, X. Liu // *Nature Plants.* – 2019. – V. 6. – C. 95–106.
340. Watanabe, Y. Molecular spectrum of spontaneous de novo mutations in male and female germline cells of *Drosophila melanogaster*. / Y. Watanabe, A. Takahashi, M. Itoh, T. Takano-Shimizu // *Genetics.* – 2009. – V. 181. N. 3. – C. 1035–1043.
341. Weijers, D. Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. / D. Weijers, E. Benkova, K.E. Jager, A. Schlereth, T. Hamann, M. Kientz, J.C. Wilmoth, J.W. Reed, G. Jurgens // *EMBO J.* – 2005. – V. 24. N. 10. – C. 1874–1885.
342. Weijers, D. Auxin: small molecule, big impact. / D. Weijers, J. Nemhauser, Z. Yang // *Journal of Experimental Botany.* – 2018. – V. 69. – C. 133–136. doi:10.1093/jxb/erx463.
343. Weiner, L. Thiol-disulfide organization in alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*). / L. Weiner, I. Shin, L.J.W. Shimon, T. Miron, M. Wilchek, D. Mirelman, F. Frolow, A. Rabinkov // *Protein Sci.* – 2009. – V. 18. N. 1. – C. 196–205. doi: 10.1002/pro.10.
344. Werner, A. Transpositional shuffling and quality control in male germ cells to enhance evolution of complex organisms. / A. Werner, M.J. Piatek, J.S. Mattick // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2015. – V. 1341. N. 1. – C. 156–163.
345. Westfall, C.S. Modulating plant hormones by enzyme action: the GH3 family of acyl acid amido synthetases. / C.S. Westfall, J. Herrmann, Q. Chen, S. Wang, J.M. Jez // *Plant Signal Behav.* – 2010. – V. 5. N. 12. – C. 1607–1612.
346. Wildman, S.G. The enzymatic conversion of tryptophan to auxin by spinach leaves. / S.G. Wildman, M.G. Ferri, J. Bonner // *Arch Biochem.* – 1947. – V. 13. N. 1. – C. 131–144.
347. Wilson, A.E. Phylogenomic analysis of UDP-dependent glycosyltransferases provides insights into the evolutionary landscape of glycosylation in plant metabolism. // A.E. Wilson, L. Tian // *the plan journal.* – 2019. – V. 100. N. 6.
348. Wisniewska, J. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. / J. Wisniewska, Xu J., D. Seifertova, P.B. Brewer, K. Ruzicka, I. Blilou, D. Rouquie, E. Benkova, B. Scheres, J. Friml // *Science.* – 2006. – V. 312. N. 5775. – C. 883.
349. Won, C. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. / C. Won, X. Shen,

- K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory, Y. Zhao // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. - 2011. - V. 108. N. 45. - C. 18518–18523.
350. Woo, Y.M. Constitutively wilted 1, a member of the rice YUCCA gene family, is required for maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio. / Y.M. Woo, H.J. Park, M. Suudi, J.I. Yang, J.J. Park, K. Back, Y.M. Park, G. An // *Plant Mol. Biol.* - 2007. - V. 65. N. 1–2. - C. 125–136.
351. Woodward, A.W. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. / A.W. Woodward, B. Bartel // *Ann Bot.* - 2005. - V. 95. N. 5. - C. 707–735.
352. Wright, A.D. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in the Mutant Maize orange pericarp, a Tryptophan Auxotroph. / A.D. Wright, M.B. Sampson, M.G. Neuffer, L. Michalczuk // *Science*. - 1991. - V. 254. N. 5034. - C. 998–1000.
353. Xiong, J. Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. / J. Xiong, J. Feng, D. Yuan, J. Zhou, W. Miao // *Scientific Reports*. - 2015. - V. 5. - C. 1–15.
354. Yamamoto, Y. Auxin Biosynthesis by the YUCCA Genes in Rice. / Y. Yamamoto, N. Kamiya, Y. Morinaka, M. Matsuoka, T. Sazuka // *Plant Physiology*. - 2007. - V. 143. N. 3. - C. 1362–1371.
355. Yang, Z. Evolution of land plant genes encoding L-Ala-D/L-Glu epimerases (AEEs) via horizontal gene transfer and positive selection. / Z. Yang, Y. Wang, Y. Zhou, Q. Gao, E. Zhang, L. Zhu, Y. Hu, C. Xu // *BMC Plant Biology*. - 2013. - V. 13. Article number 34.
356. Yang, Z.B. TAA1-regulated local auxin biosynthesis in the root-apex transition zone mediates the aluminum-induced inhibition of root growth in Arabidopsis. / Z.B. Yang, X. Geng, C. He, F. Zhang, R. Wang, W.J. Horst, Z. Ding // *Plant Cell*. - 2014. - V. 26. N. 7. - C. 2889–2904.
357. Yang, Z.B. Synergistic action of auxin and cytokinin mediates aluminum-induced root growth inhibition in Arabidopsis. / Z.B. Yang, G. Liu, J. Liu, B. Zhang, W. Meng, B. Muller, K.-I. Hayashi, X. Zhang, Z. Zhao, I. De Smet, Z. Ding // *EMBO Rep.* - 2017. - V. 18. - C. 1213–1230.
358. Yokoya, N.S. Endogenous cytokinins, auxins, and abscisic acid in red algae from Brazil. / N.S. Yokoya, W.A. Stirk, J. van Staden, O. Novak, V. Tureckova, A. Pencik, M. Strnad // *Journal of Phycology*. - 2010. - V. 46. N. 6. - C. 1198–1205.
359. Yoshikawa, T. The rice FISH BONE gene encodes a tryptophan aminotransferase, which affects pleiotropic auxin-related processes. / T. Yoshikawa, M. Ito, T. Sumikura, A. Nakayama, T. Nishimura, H. Kitano, I. Yamaguchi, T. Koshiba, K.I. Hibara, Y. Nagato, J.I. Itoh // *Plant J.* - 2014. - V. 78. N. 6. - C. 927–936.

360. Yue, J. Origin of plant auxin biosynthesis. / J. Yue, X. Hu, J. Huang // Trends Plant Sci. - 2014. - V. 19. N. 12. - C. 764–770.
361. Zabka, A. PIN2-like proteins may contribute to the regulation of morphogenetic processes during spermatogenesis in *Chara vulgaris*. / A. Zabka, J.T. Polit, K. Winnicki, P. Paciorek, J. Juszcak, M. Nowak, J. Maszewski // Plant Cell Rep. - 2016. - V. 35: - C. 1655–1669.
362. Zazimalova, E. Auxin transporters—why so many? / E. Zazimalova, A.S. Murphy, H. Yang, K. Hoyerová, P. Hosek // Cold Spring Harbor perspectives in biology. - 2010. - V. 2. N. 3. - C. a001552
363. Zeng, H. What is a cell type and how to define it? / H. Zeng // Cell. – 2022. - V. 185. N. 15. - C 2739–2755. doi:10.1016/j.cell.2022.06.031
364. Zenser, N. Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. / N. Zenser, A. Ellsmore, C. Leasure, J. Callis // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2001. - V. 98. N. 20. - C. 11795–11800.
365. Ziegler D.M. Microsomal flavin-containing monooxygenase: oxygenation of nucleophilic nitrogen and sulfur compounds. In: Jakoby WB, editor. Enzymatic basis of detoxication. Vol. 1. NY: Academic Press. - 1980. - V. 201.- C. 227.
366. Ziegler D.M. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. Drug Metab Rev. - 1988. - V. 19 - C. 1–32.
367. Ziegler D.M. Mechanism, multiple forms and substrate specificities of flavin-containing monooxygenases. In: Hlavic P, Damani LA, editors. N-Oxidation of Drugs: Biochemistry, Pharmacology and Toxicology. London: Chapman and Hall. - 1991. - V. 59. - C. 68.
368. Zimmermann, W. Main results of the ‘telome theory’. / W. Zimmermann //Palaeobotanist. - 1951. - V. 1. - C. 456 – 470.
369. Zhang, Z. Protein sequence similarity searches using patterns as seeds. / Z. Zhang, W. Miller, A.A. Schäffer, T.L. Madden, D.J. Lipman, E.V. Koonin, S.F. Altschul// Nucleic Acids Research. - 1998. - V. 26. N. 17 - C. 3986–3990.
370. Zhang, S. Cellular auxin transport in algae. / S. Zhang, B. van Duijn // Plants (Basel). - 2014. - V. 3. - C. 58–69.
371. Zhao, G.-P. Synechocystis PCC 6803 contains a single gene for the β subunit of tryptophan synthase with strong homology to the *trpB* genes of *Arabidopsis* and maize (*Zea mays* L.). / G.-P. Zhao, R.L. Somerville, P.R. Chitnis // Plant Physiol. - 1994. - V. 104. N. 2. - C. 461–466.
372. Zhao, Y. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. / Y. Zhao, S.K. Christensen, C. Fankhauser, J.R. Cashman, J.D. Cohen, D. Weigel, J. Chory // Science. - 2001. - V. 291 N. 5502. - C. 306–309.

373. Zhao, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. / Y. Zhao // *Annu Rev Plant Biol.* - 2010. - V. 61. - C. 49–64.
374. Zhao, Y. Auxin Biosynthesis. / Y. Zhao // *Arabidopsis Book.* - 2014. - V. 12. - C. e0173.
375. Zhao, Y. Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. / Y. Zhao // *Annu. Rev. Plant Biol.* - 2018. - V. 69. - C. 417–435.
376. Ziegler D.M. Microsomal flavin-containing monooxygenase: oxygenation of nucleophilic nitrogen and sulfur compounds. In: Jakoby WB, editor. *Enzymatic basis of detoxication*. Vol. 1. NY: Academic Press. - 1980. - V. 201. - C. 227.
377. Ziegler, D.M. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. / D.M. Ziegler // *Drug Metab Rev.* - 1988. - V. 19 - C. 1-32.
378. Ziegler, D.M. Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. / D.M. Ziegler // *Trends Pharmacol Sci.* - 1990. - V. 11. N. 8. - C. 321–324.
379. Ziegler, D.M. Mechanism, multiple forms and substrate specificities of flavin-containing monooxygenases. In: Hlavic P, Damani LA, editors. *N-Oxidation of Drugs: Biochemistry, Pharmacology and Toxicology*. London: Chapman and Hall. - 1991. - V. 59. - C. 68.
380. Ziegler, D.M. Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. / D.M. Ziegler // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* - 1993. - V. 33. - C. 179–199.
381. Ziegler, DM. An overview of the mechanism, substrate specificities and structure of FMOs. / D.M. Ziegler // *Drug Metab Rev.* - 2002. - V. 34. - C. 503–511.
382. Zizkova, E. Control of cytokinin and auxin homeostasis in cyanobacteria and algae. / E. Zizkova, M. Kubeš, P.I. Dobrev, P. Přibyl, J. Šimura, L. Zahajská, L.Z. Drábková, O. Novák, V. Motyka // *Annals of Botany.* - 2017. - V. 119. N. 1. - C. 151–166.

ПРИЛОЖЕНИЕ

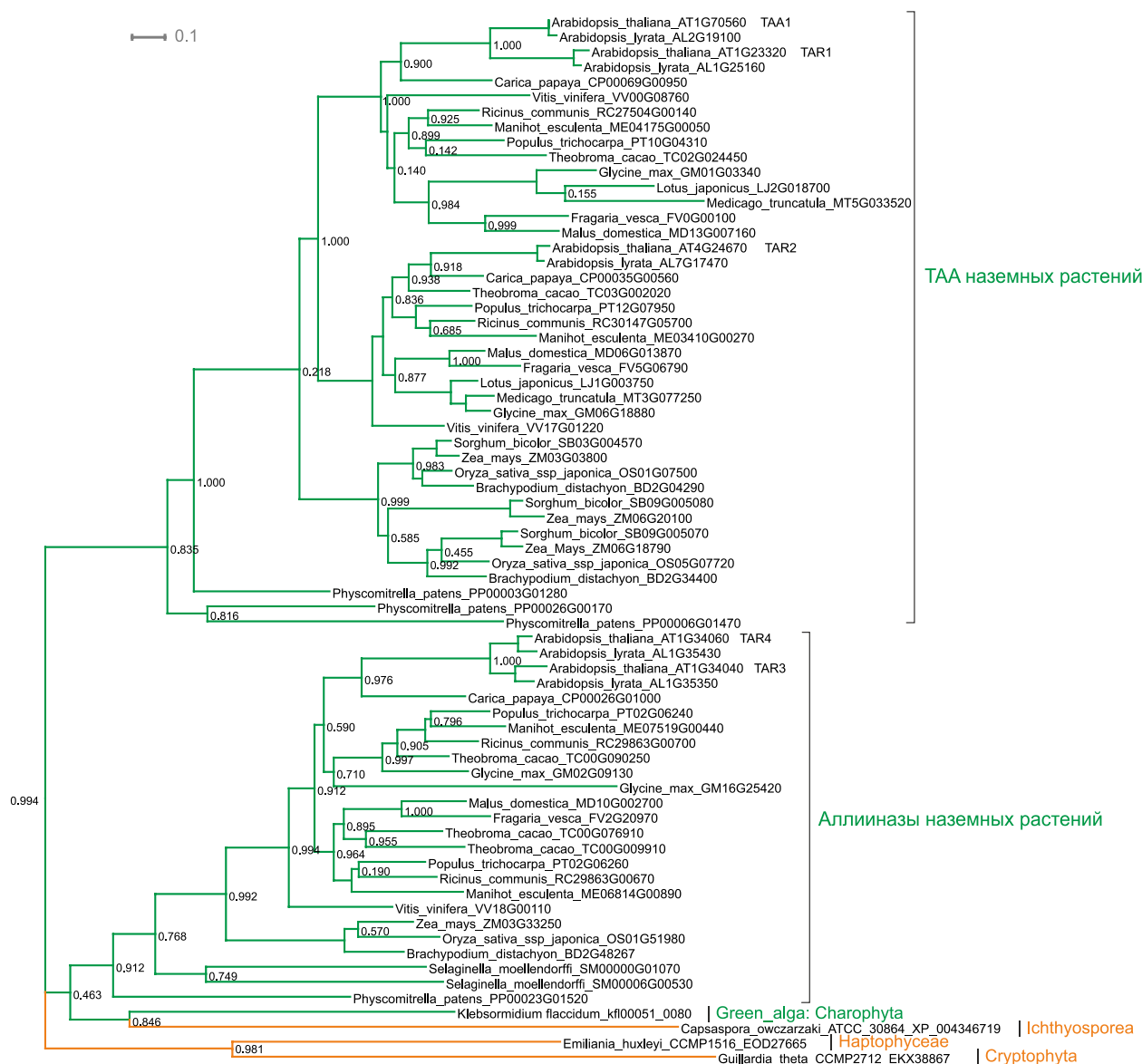
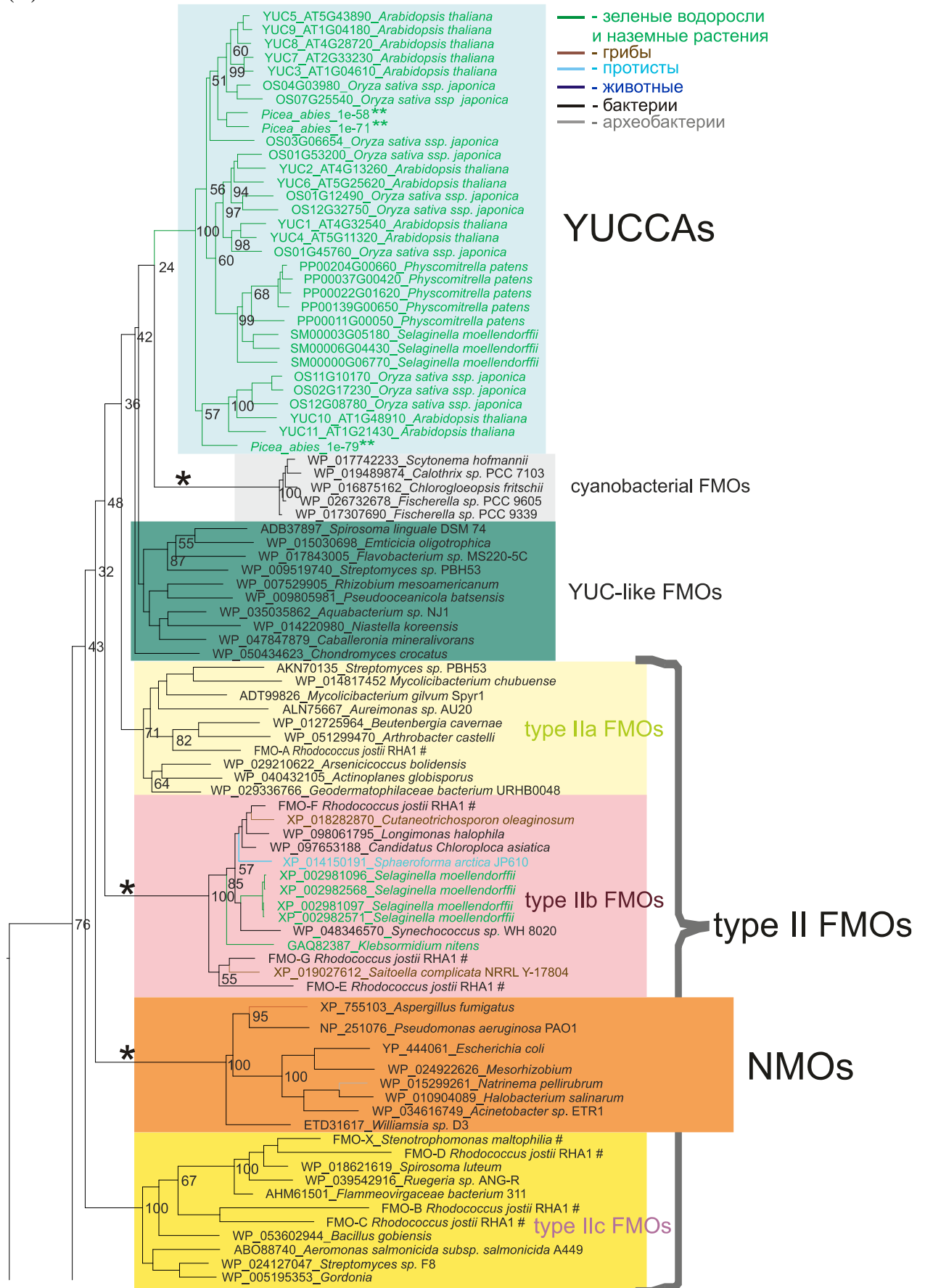
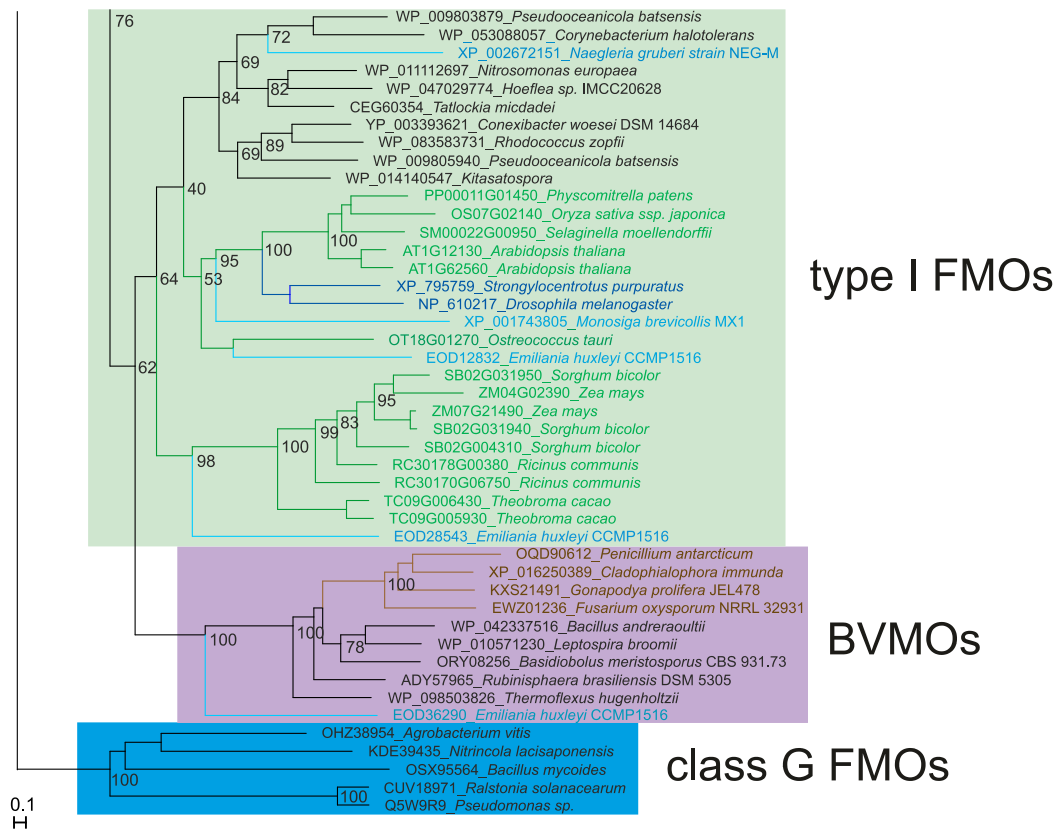


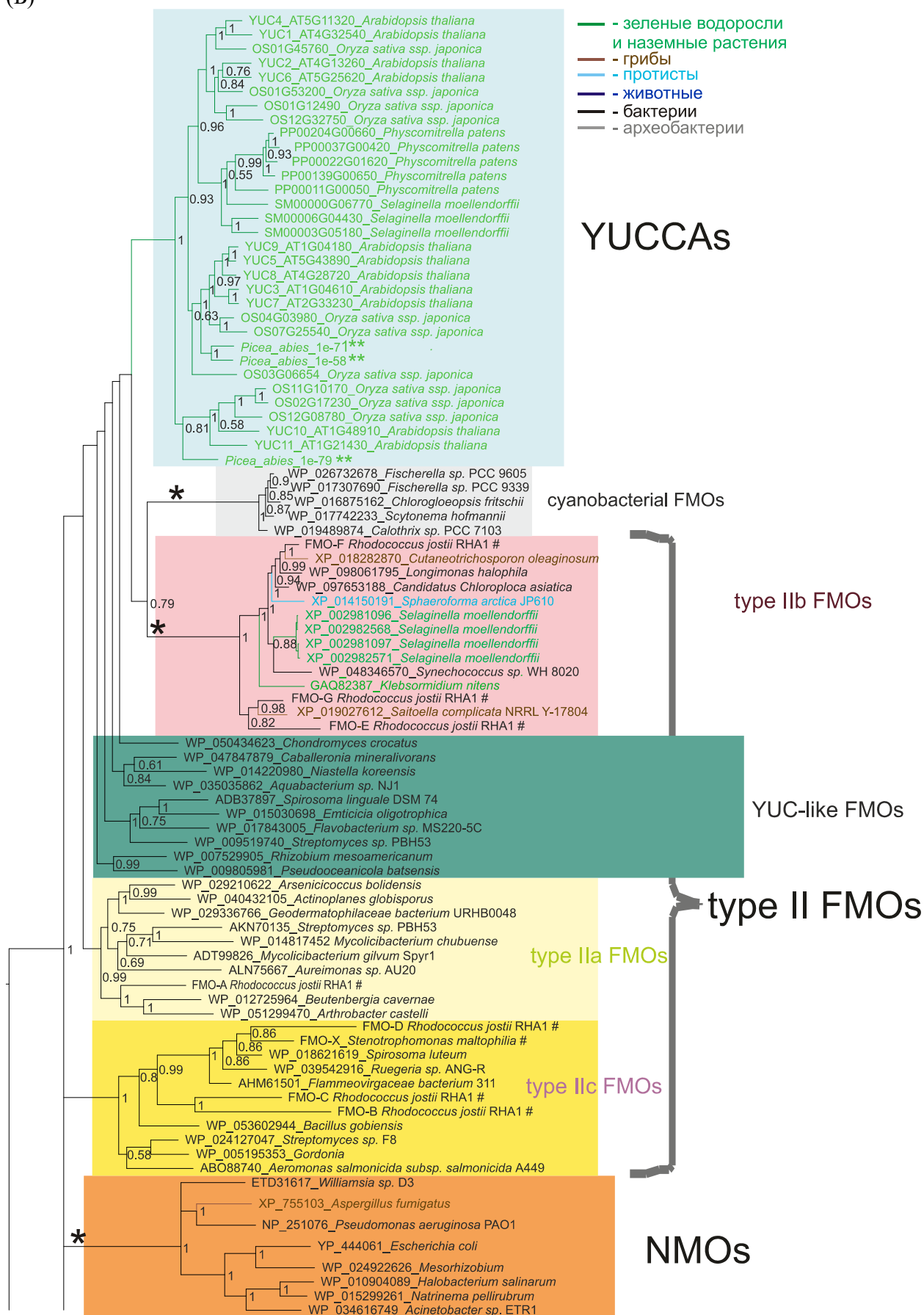
Рисунок П1. Филогенетическое дерево семейства ТАА, реконструированное Байесовским методом (программа PhyloBayes 3.3f) (Lartillot et al., 2009). Зелёным цветом ветвей обозначены белки растений и коричневым – белки простейших. Шкала расстояний показана вверху рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

(A)





(B)



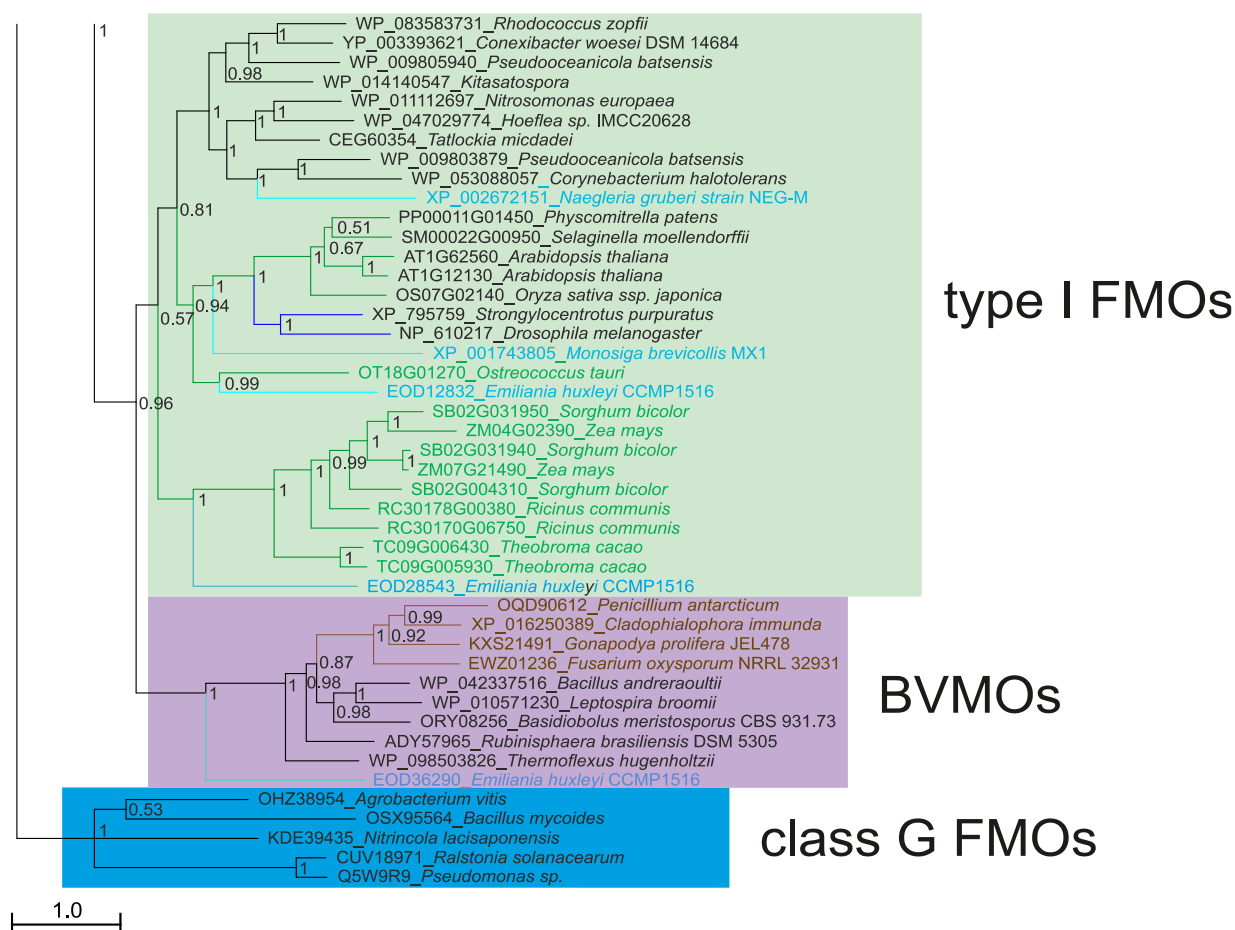


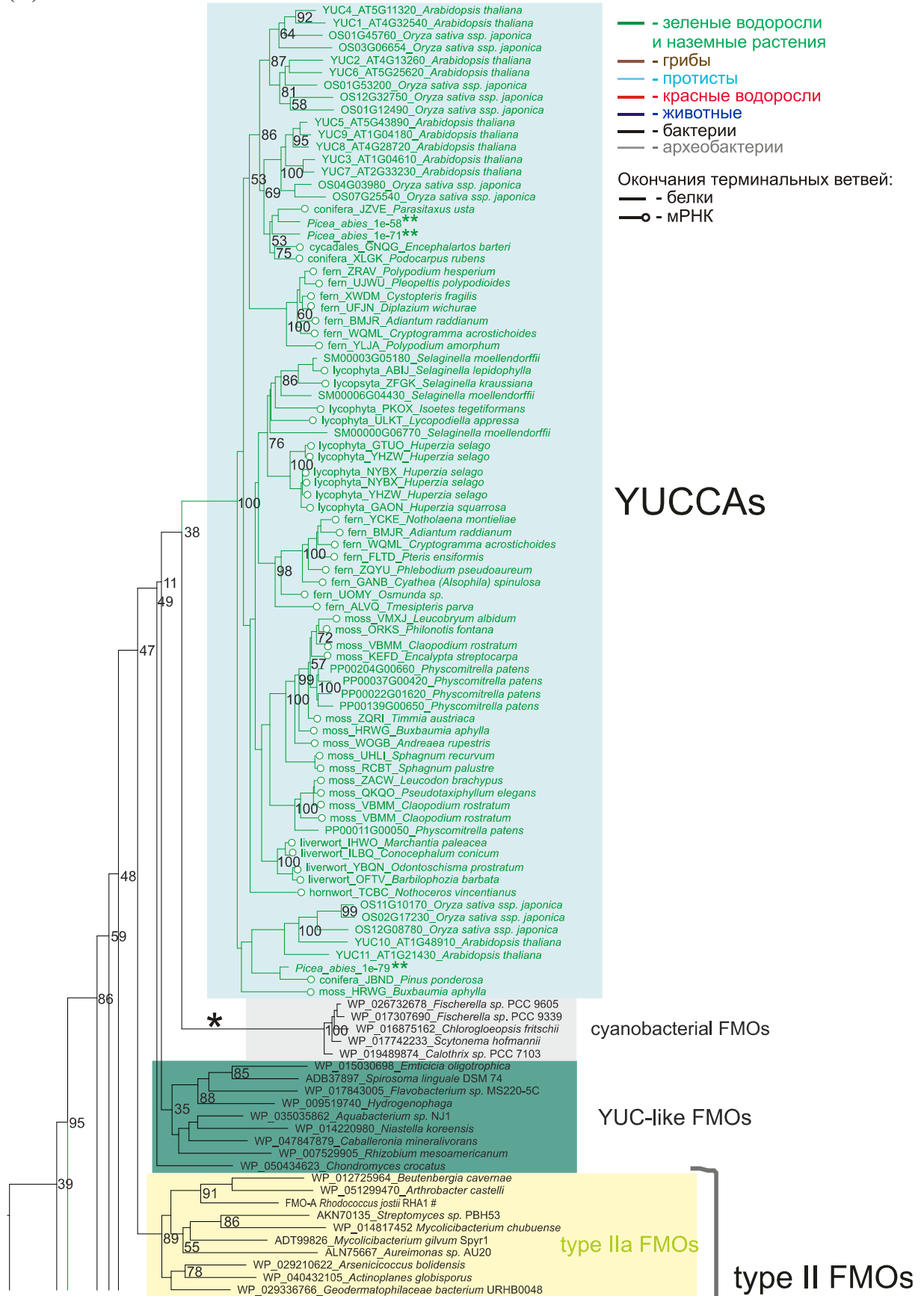
Рисунок П2. Филогения флавин-содержащих монооксигеназ класса В, включающая только последовательности белков.

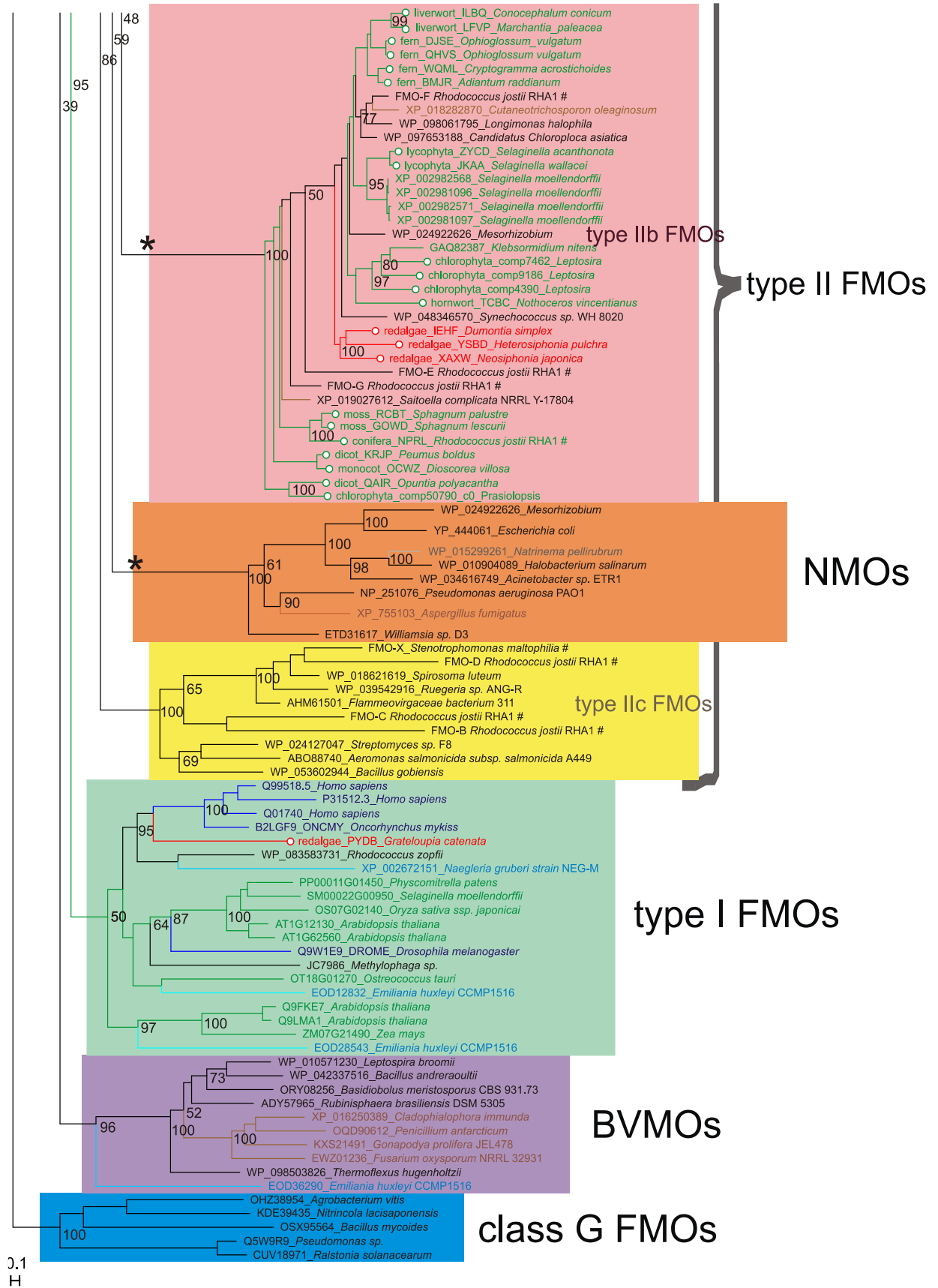
А) Филогения флавин-содержащих монооксигеназ класса В, реконструированная методом максимального правдоподобия (программа RaxML). # - белки, взятые из статьи Riebel et al., 2013: FMO-A – FMO-G из *R. jostii* RHA1, FMO-X из *S. maltophilia*.

* – обозначены длинные ветви на дереве. ** – белки распознанные в Spruce Genome Project (Nystedt et al., 2013).

Б) Филогения флавин-содержащих монооксигеназ класса В, реконструированная Байесовским методом (программа mrBayes). Обозначения те же, что и на рисунке А. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева

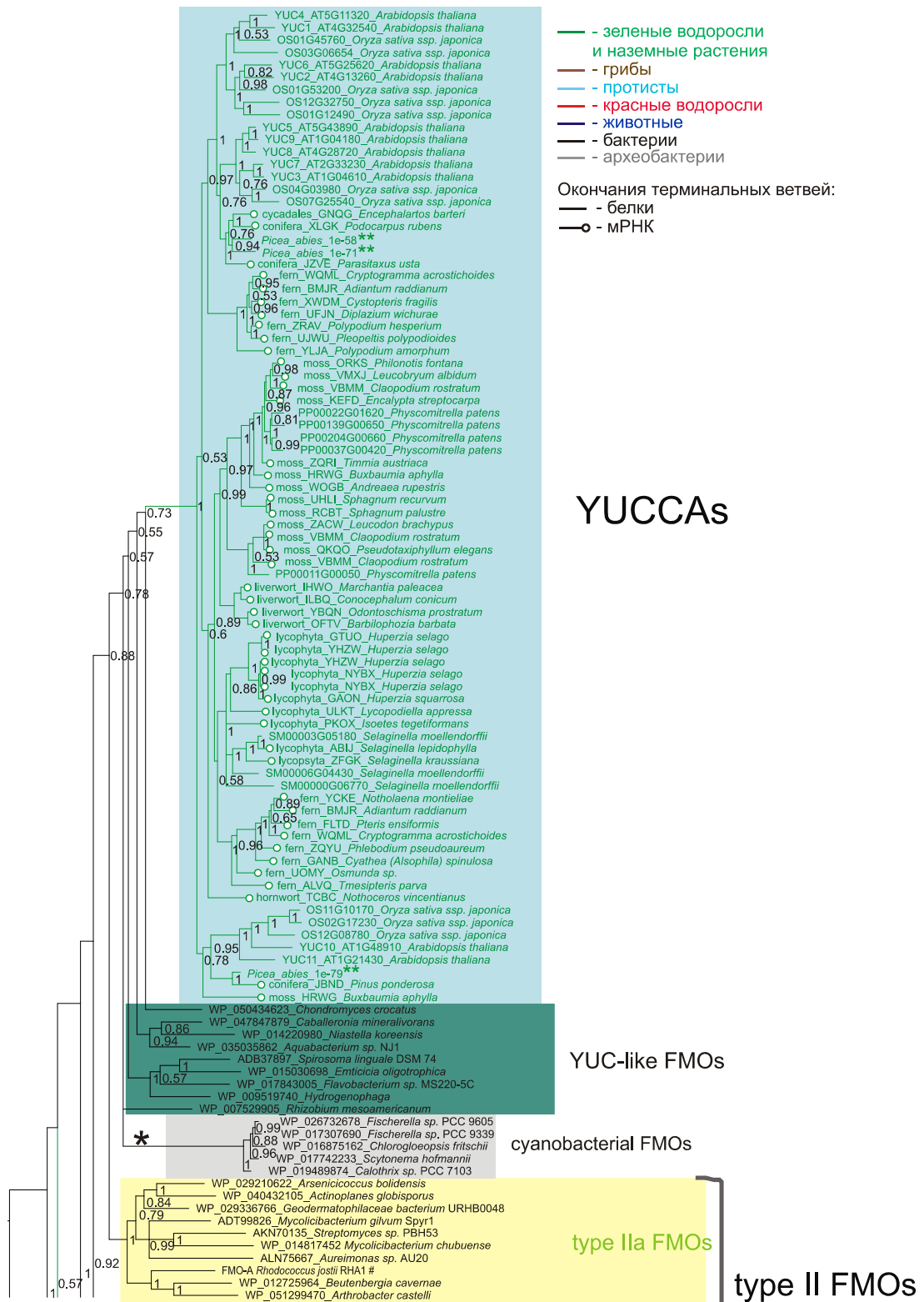
(A)





0.1
H

(B)



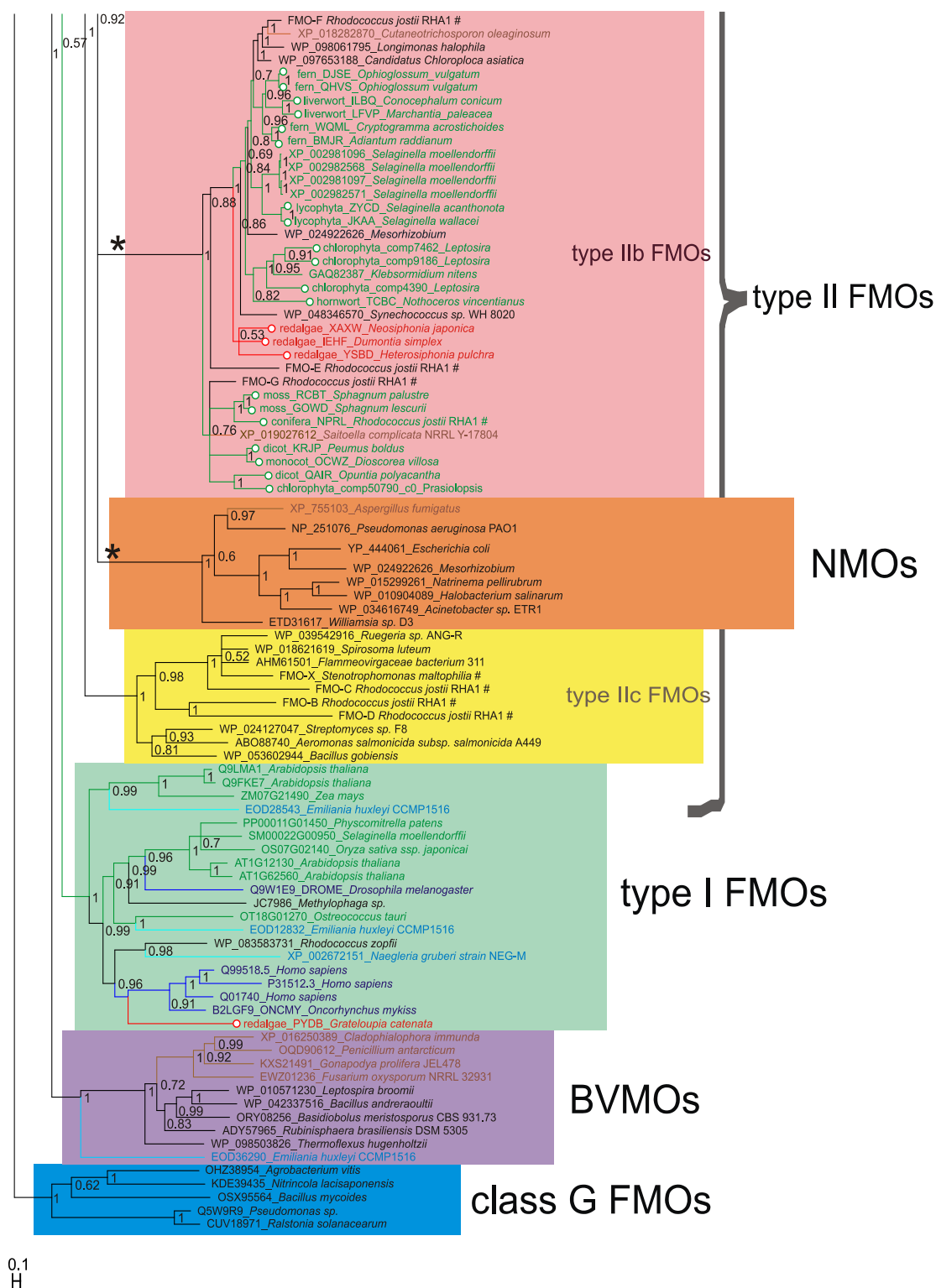


Рисунок ПЗ. Филогения флавин-содержащих монооксигеназ класса В, как последовательности белков из полногеномных данных, так и последовательности мРНК из транскриптомных проектов.

А) Филогения флавин-содержащих монооксигеназ класса В, реконструированная реконструированная методом максимального правдоподобия (программа *RaxML*). # - белки, взятые из статьи Riebel et al., 2013: FMO-A – FMO-G из *R. jostii* RHA1, FMO-X из *S. maltophilia*.

* – обозначены длинные ветви на дереве. ** – белки распознанные в Spruce Genome Project (Nystedt et al., 2013).

Б) Филогения флавин-содержащих монооксигеназ класса В, реконструированная Байесовским методом (программа mrBayes). Обозначения те же, что и на рисунке А. Шкала расстояний показана внизу рисунка слева, величины бутстреп поддержки показаны рядом с внутренними узлами дерева