

# Гомеобоксные гены факторов транскрипции *WOX* в паразитическом растении *Monotropa hypopitys* на стадии цветения

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

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук», Институт биоинженерии, Москва, Россия

Формирование и поддержание популяций стволовых клеток растения контролируются гомеодомен-содержащими факторами транскрипции семейства *WOX*. Эволюция гомеобоксных генов, кодирующих данные белки, считается одной из главных причин многообразия форм цветка и морфологии растения в целом. Механизм регуляции ниш стволовых клеток в апикальных меристемах признан консервативным для цветковых растений разных видов и наиболее подробно исследован на модели *Arabidopsis thaliana*. Морфологическое разнообразие покрытосеменных подразумевает наличие особенностей этого механизма, присущих отдельным видам, при сохранении основных сигнальных путей. Уникальный представитель покрытосеменных бесхлорофилльный микогетеротроф подъяльник *Monotropa hypopitys* получает питательные вещества от корней деревьев через микоризный симбиоз. В индуктивных условиях адвентивные репродуктивные почки на корнях *M. hypopitys* выпускают цветонос с прицветниками и соцветием на конце. *M. hypopitys* так же, как и другие растения, формирует меристемы соцветия, цветка и корня, вероятно, используя консервативные пути регуляции ниш стволовых клеток. Изучение гомеобоксных генов такого растения расширит знания о важных эволюционных факторах транскрипции *WOX* и позволит лучше представлять механизмы контроля стволовых клеток в микогетеротрофных растениях. В данной работе проведен анализ транскриптомов корня, прицветников и цветков двух индивидуальных образцов подъяльника, собранных на стадии цветения. Идентифицированы мРНК пяти генов семейства *WOX*, охарактеризованы их структура, филогения, паттерн экспрессии, а также возможные функции. Совокупность полученных и литературных данных позволила сделать предположения о функциональной роли данных генов в онтогенезе растения. Гены *MhyWUS1* и *MhyWUS2*, возможно, вовлечены в поддержание популяции стволовых клеток меристем цветка и соцветия. Ген *MhyWOX13*, вероятно, участвует в контроле корневой ниши стволовых клеток, формировании семенной коробочки, инициации цветения и базовых клеточных процессах. Область применения генов *MhyWOX4* и *MhyWOX2*, видимо, ограничена регуляцией стволовых клеток камбия и дифференцировкой яйцеклеток и зиготы соответственно.

Ключевые слова: *Monotropa hypopitys*; микогетеротроф; транскриптом; стволовые клетки растения; меристема; WUSCHEL RELATED ГОМЕОБОКС; транскрипционные факторы; гены *WOX*.

## Homeobox genes encoding *WOX* transcription factors in the flowering parasitic plant *Monotropa hypopitys*

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

Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, Russia

The formation and maintenance of plant stem cell populations are controlled by the *WOX* family of homeobox-containing transcription factors. The evolution of *WOX* genes is considered to be one of the main reasons for flower morphology and plant architecture diversity. The stem cell regulation mechanism is considered to be conserved among flowering plants and most thoroughly studied in *Arabidopsis thaliana* as a model. The angiosperms morphological diversity implies that there are species-specific features inherent to this mechanism, while the basic signaling is maintained. The unique flowering achlorophyllous mycoheterotrophic plant *Monotropa hypopitys* obtains nutrients from the tree roots through the mycorrhizal symbiosis. In inductive conditions, the reproductive stem with bracts and an inflorescence at the top is developed from an adventitious root bud. Like other plants, *M. hypopitys* forms the inflorescence, flower and root meristems, presumably using conserved mechanisms regulating stem cell niche. The study of *M. hypopitys* homeobox genes should contribute to the knowledge about the function of *WOX* transcription factors and further understanding of the stem cells control mechanisms in mycoheterotrophic species. The aim of the present study was to analyze *M. hypopitys* root, bracts and flower transcriptomes obtained from two individual flowering plants. In total, five *WOX* genes have been identified and characterized by their structure, phylogeny, expression pattern, and possible functions. The assumption is that the *MhyWUS1* and *MhyWUS2* genes maintain the stem cell population in the inflorescence and flower meristems, *MhyWOX13* has a role in the control of root stem cell niche, seed pod formation, flowering initiation, and basic cellular processes, *MhyWOX4* functions in the

control of cambium stem cells, and *MhyWOX2* participates in the differentiation of egg cells and zygotes.

Key words: *Monotropa hypopitys*; mycoheterotroph; transcriptome; plant stem cells; meristem; WUSCHEL RELATED HOMEBOX; transcription factors; *WOX* genes.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Щенникова А.В., Шульга О.А., Кочиева Е.З., Белецкий А.В., Филюшин М.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Гомеобоксные гены факторов транскрипции *WOX* в паразитическом растении *Monotropa hypopitys* на стадии цветения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(2):234-240. DOI 10.18699/VJ17.242

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shchennikova A.V., Shulga O.A., Kochieva E.Z., Beletsky A.V., Filyushin M.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Homeobox genes encoding *WOX* transcription factors in the flowering parasitic plant *Monotropa hypopitys*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(2):234-240. DOI 10.18699/VJ17.242

**А**пикальная меристема побега активна в течение всей жизни растения. При индуктивных условиях вегетативный апекс побега переходит в репродуктивное состояние соцветия, которое вместо листьев генерирует цветки (Besnard et al., 2011). В центральной зоне меристем всех видов поддерживается стабильная группа медленно делящихся стволовых клеток, потомство которых идет как на пополнение популяции, так и на формирование органов в периферийной зоне посредством дифференцировки. Механизм регуляции данного процесса признан консервативным для цветковых растений разных видов. Наиболее подробно он исследован в модельном растении *Arabidopsis thaliana* (Somssich et al., 2016). Под центральной зоной располагается организующий центр. Он контролирует поддержание популяции стволовых клеток через саморегулирующуюся петлю обратной связи *CLAVATA3 (CLV3)–WUSCHEL (WUS)*. В свою очередь, транскрипционный фактор *WUS* активирует экспрессию *CLV3*, который связывается с рецепторами *CLV1* и *CLV2* и запускает сигнальный путь ограничения экспрессии *WUS*. Тем самым пептид *CLV3* способствует дифференцировке стволовых клеток (Schoof et al., 2000; Katsir et al., 2011; Nimchuk et al., 2011; Yadav et al., 2011). В цветковой меристеме поддержание стволовых клеток носит временный характер до момента инициации всех цветковых органов (Prunet et al., 2009). Механизм терминации цветковой меристемы включает в себя регуляторную петлю *WUS–AGAMOUS (AG)* (Lenhard et al., 2001), которая начинается с активации транскрипции *AG* совместными усилиями *WUS* и *LEAFY (LFY)* (Lohmann et al., 2001) и заканчивается репрессией *WUS* в центре цветковой меристемы одновременно или сразу после инициации плодolistиков (Sun et al., 2009; Liu et al., 2011). В результате цветков с фиксированным количеством органов формируется при подавлении экспрессии *WUS* в момент индукции терминации цветковой меристемы, разный для каждого вида растений, что, предположительно, является одной из причин невероятного разнообразия цветковых форм (Somssich et al., 2016) среди более чем 350 000 видов покрытосеменных растений (Charman, 2009).

В настоящее время считается, что для формирования правильной морфологии растения необходимы гомеодомен-содержащие факторы транскрипции, в частности продукты генов семейства *WOX* (*Wuschel-related homeobox*), гомологичных гену *WUS* (Bürglin, Affolter, 2016). Центральная роль гена *WUS* в регуляции идентичности и поддержании плюрипотентных стволовых клеток в апикальной меристеме побега показана для растений разных

видов (Salvini et al., 2016; Segatto et al., 2016). Экспрессия *WUS* ограничена группой клеток, составляющих организующий центр, к которому прилегают стволовые клетки (Besnard et al., 2011; Sun, Ito, 2015), а подавление его экспрессии приводит к появлению эктопических меристем, преждевременно прекращающих свое развитие (Laux et al., 1996). Помимо контроля популяции стволовых клеток в разных видах меристем, гены *WOX* участвуют также в эмбриональном и репродуктивном развитии растения (Haecker et al., 2004; Sarkar et al., 2007; Breuning et al., 2008; Ji et al., 2010; Lin et al., 2013).

Филогенетические исследования разделили семейство *WOX* на древнюю «*WOX13*» (куда входят *WOX10*, *WOX13*, *WOX14* и их гомологи), промежуточную «*WOX9*» (*WOX8*, *9*, *11*, *12* и их гомологи) и современную «*WUS*» (*WOX1–7*, *WUS* и их гомологи) клады (Haecker et al., 2004; van der Graaff et al., 2009). Члены третьей клады отсутствуют у водорослей, мхов и папоротников (за исключением *Lep- tosporangiatae*) (Nardmann, Wett, 2012). Эволюционная диверсификация генов *WOX* и последующее разделение их функций признаны одним из ключевых факторов влияния на сложность и разнообразие строения растений (Costanzo et al., 2014). Белки современной клады, *WUS* и *WOX1–5*, до сих пор сохраняют некоторые общие функции, даже имея разные паттерны экспрессии (Sarkar et al., 2007; Lin et al., 2013). За исключением *WOX1*, белки данной клады, предположительно, возникли до разделения голосеменных и покрытосеменных растений (Hedman et al., 2013). Кроме *WOX4* (а также членов клады *WOX9* и *WOX13*), всем им свойственна способность поддерживать популяцию стволовых клеток вегетативной и цветковой меристем (Lin et al., 2013). Поддержание стволовых клеток требует как репрессирующей, так и активирующей транскрипционной активности *WUS* (Yadav et al., 2011). Первое свойство обеспечивают избирательно присутствующие на С-конце белков *WOX* консервативные мотивы *WUS-box* и *EAR*, второе – наличие кислотного домена (Vandenbussche et al., 2009; Lin et al., 2013; Pi et al., 2015; Dolzblasz et al., 2016). Показано, что для поддержания популяции стволовых клеток в меристемах побега *WUS-box* незаменим, а *EAR* малозначим, в то время как кислотный домен необходим только для развития женских гаметофитов (Gross-Hardt et al., 2002; Lieber et al., 2011). Область между гомеодоменом и *WUS-box* определяет мобильность *WUS* (Yadav et al., 2011; Daum et al., 2014).

Несмотря на расширяющийся видовой круг растений, у которых идентифицированы и охарактеризованы гены *WOX* (Nardmann et al., 2007; Salvini et al., 2016), практи-

чески ничего не известно о генах *WOX* у Верескоцветных (Ericales). Единственный представитель Ericales, для которого известен ген *WUS*, – *Rhododendron ovatum* – древесное, фотосинтезирующее растение. В данном исследовании идентифицировано семейство генов *WOX* паразитического растения семейства Ericaceae, поддельника *Monotropa hypopitys* – бесхлорофилльного микогетеротрофа. Были охарактеризованы структура, филогения и паттерн экспрессии генов в различных тканях цветущего поддельника. Мы предполагаем, что исследование гомеозисных генов такого уникального растения может расширить знания о важных для эволюции растений факторах транскрипции *WOX* и механизмах контроля стволовых клеток.

## Материалы и методы

В работе использованы данные транскриптомов корней с адвентивными почками, прицветников и цветков двух индивидуальных растений поддельника *M. hypopitys*, собранных в августе 2015 г. в хвойном лесу Калужской области. Растения находились на стадии цветения. Соцветие представляло собой поникающую кисть, состоящую из полностью сформированных цветков. Растения вместе с дерном содержали в теплице в искусственных условиях затемнения и повышенной влажности в течение недели. Образцы ткани для выделения РНК замораживали в жидком азоте. Суммарную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, США). Образцы РНК секвенировали (RNA-seq) с помощью Illumina HiSeq2500 согласно протоколу производителя (Illumina Inc., США). Для каждого из шести транскриптомов получили и собрали в транскрипты 10–15 млн 100-нуклеотидных чтений (Beletsky et al., 2016; Ravin et al., 2016) с использованием программы Trinity v. 2.1.1 (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013; <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>). Индивидуальные чтения собирали в контиги с помощью программы Bowtie 2 (Langmead, Salzberg, 2012). Кодированные белок последовательности идентифицировали посредством программы TransDecoder (<https://transdecoder.github.io/>).

Идентификацию генов семейства *WOX* проводили посредством сравнения RNA-seq транскриптов с последовательностями из банка данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Относительный уровень экспрессии гена вычисляли для каждого транскриптома отдельно как число транскриптов данного гена на миллион транскриптов в транскриптом с нормализацией между образцами с помощью программного обеспечения RSEM (Li, Dewey, 2011). Полученные данные усредняли для каждой пары транскриптомов одного вида (например, для транскриптомов корней двух индивидуальных растений). Стандартное отклонение нормализованного числа транскриптов каждого гена от среднего значения вычисляли с помощью программы Excel.

Для характеристики последовательностей анализировали открытые рамки считывания и транслировали их с помощью программы Clone Manager 7.11 (<http://clonemanager-professional.software.informer.com/>). Консервативные домены выявляли на сервере NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и вручную

сравнивали с литературными данными. Выравнивание последовательностей генов и кодируемых ими белков проводили в программе ClustalX (Larkin et al., 2007). Для филогенетического исследования использовали программы NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA6 (Tamura et al., 2013) с построением древа методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method), основанного на модели коррекции Пуассона (Poisson correction model) (Zuckerkanndl, Pauling, 1965).

## Результаты

Пять мРНК гомеобоксных генов, *MhyWUS1*, *MhyWUS2*, *MhyWOX2*, *MhyWOX4* и *MhyWOX13*, предположительно кодирующих факторы транскрипции семейства *WOX*, были идентифицированы в транскриптомах прицветников, цветков и корней, содержащих репродуктивные почки, и зарегистрированы в базе NCBI (таблица).

Проведен филогенетический анализ последовательностей кодируемых белков, благодаря чему они получили свое название. Гены *MhyWUS1*, *MhyWUS2*, *MhyWOX2* и *MhyWOX4* принадлежат к современной кладе *WUS*, а ген *MhyWOX13* – древней кладе *WOX13* (рис. 1). При этом гены *MhyWUS1* и *MhyWUS2* ортологичны гену *WUS*, а гены *MhyWOX2*, *MhyWOX4* и *MhyWOX13* – предположительные ортологи генов *A. thaliana WOX2*, *WOX4* и *WOX13* соответственно.

Структурный анализ последовательностей генов *MhyWOX* и кодируемых ими аминокислотных последовательностей показал, что гены *MhyWOX13*, *MhyWOX4* и *MhyWUS2* кодируют полноразмерный белок. Два оставшихся транскрипта собрать полностью не удалось, видимо, по причине недостаточного качества приготовленных библиотек или их последующего секвенирования. Данные неполные транскрипты были транслированы в белковые последовательности *MhyWOX2* и *MhyWUS1*, в которых, исходя из сравнения с известными гомологами, могут отсутствовать около 18 и 122 N-концевых аминокислот соответственно. Белки *MhyWOX13*, *MhyWOX4*, *MhyWOX2* и *MhyWUS2* содержат полную последовательность гомеодомена, характерного для гомеодомен-содержащих факторов транскрипции семейства *WOX*. Поиск консервативных последовательностей обнаружил канонический мотив *WUS-box* (Dolzblasz et al., 2016) на С-конце белков *MhyWUS1*, *MhyWUS2*, *MhyWOX2* и *MhyWOX4*, а также мотив *EAR* (L[ED]L[RST]L) (Zhao et al., 2014) на С-конце *MhyWUS1* и *MhyWUS2*. Кислотные участки, обогащенные остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот, были выявлены между гомеодоменом и мотивом *WUS-box* в белках *MhyWUS1*, *MhyWUS2* и *MhyWOX4*, за мотивом *WUS-box* и ближе к С-концу белка *MhyWOX2*, а также за гомеодоменом в последовательности *MhyWOX13*. На рис. 2 суммированы результаты структурного анализа предполагаемых белков *MhyWOX*.

Биоинформатический анализ характера экспрессии выделенных генов выявил наличие мРНК генов *MhyWUS1* и *MhyWUS2* в цветках, ее полное отсутствие в прицветниках и слабое присутствие мРНК *MhyWUS1* в образце корней с репродуктивными почками. Транскрипты *MhyWOX4* были обнаружены преимущественно в корнях, содержащих адвентивные почки, и на низком уровне – в цвет-



Properties of *MhyWOX* genes of *Monotropa hypopitys*

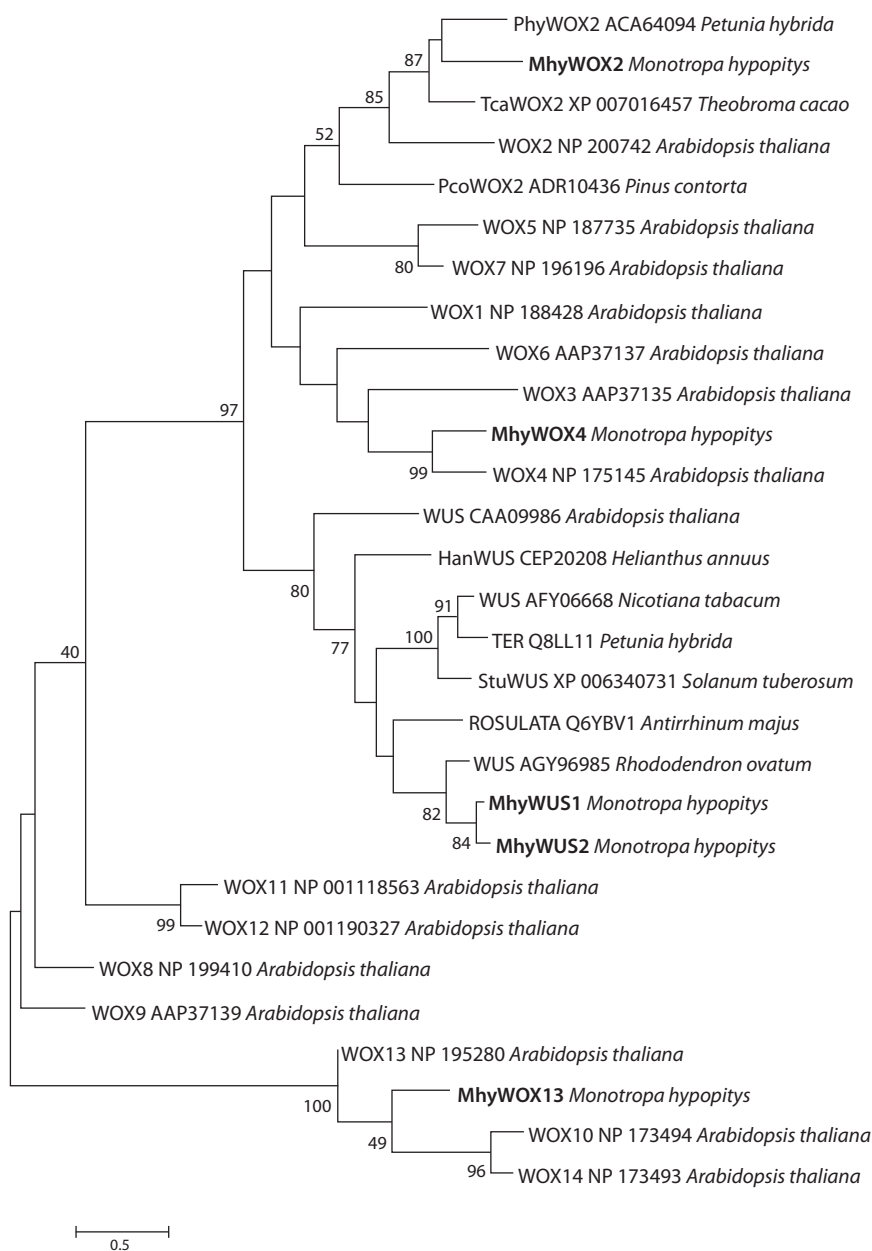
Gene	NCBI accession no.	mRNA size, nt	Protein size, aa	Homologue in <i>A. thaliana</i>	Homeodomain location, aa
<i>MhyWUS1</i>	KY114938	477	158	<i>WUS</i>	–
<i>MhyWUS2</i>	KY114939	870	289	<i>WUS</i>	31–90
<i>MhyWOX2</i>	KY114940	717	238	<i>WOX2</i>	3–61
<i>MhyWOX4</i>	KY114941	660	216	<i>WOX4</i>	81–139
<i>MhyWOX13</i>	KY114942	831	276	<i>WOX13</i>	94–156

ках. Экспрессия генов *MhyWOX2* и *MhyWOX13* найдена во всех тканях с почти 15-кратным преобладанием числа транскриптов *MhyWOX13* по сравнению с *MhyWOX2* (рис. 3).

**Обсуждение**

Уникальный представитель семейства цветущих семенных растений Ericaceae (Верескоцветные в составе базальной группы астеридов) подъельник *Monotropa hypopitys* является бесхлорофилльным микогетеротрофом, который получает питательные вещества от корней деревьев посредством симбиотического взаимодействия с микроскопическими грибами (Leake, 1994). Корневая система *M. hypopitys* состоит из микоризных корней и корней с адвентивными репродуктивными почками, из которых в индуктивных условиях развивается надземная часть растения – цветонос с прицветниками и соцветием на конце (Wallace, 1975; Мухометеротрофу..., 2013).

Подъельник так же, как и другие высшие растения, формирует апикальные меристемы соцветия, цветка и корня, предположительно используя консервативные механизмы регуляции ниш стволовых клеток. Идентификация мРНК пяти генов семейства WOX в транскриптомах подъельника – первое подтверждение такого предположения. Согласно структурному анализу кодируемых генами белков, все они относятся к семейству WOX гомеодомен-содержащих факторов транскрипции. При этом наличие мотивов WUS-box и EAR свидетельствует о репрессирующих транскрипционных свойствах *MhyWUS1*, *MhyWUS2*, *MhyWOX2* и *MhyWOX4*. Присутствие же последовательностей, насыщенных остатками кислых аминокислот, – признак



**Fig. 1.** Phylogenetic tree constructed on the base of evolutionary analysis of 29 amino acid sequences of WOX transcription factors. The lengths of the branches are estimated as genetic distances (number of substitutions per site). Significant bootstrap values (the percentage of trees in which the associated taxa are clustered together) for 1000 replicates are shown at the bases of the branches. The names of proteins available from the NCBI database are followed by GenBank accession numbers. Names of proteins identified in this study are given in boldface.

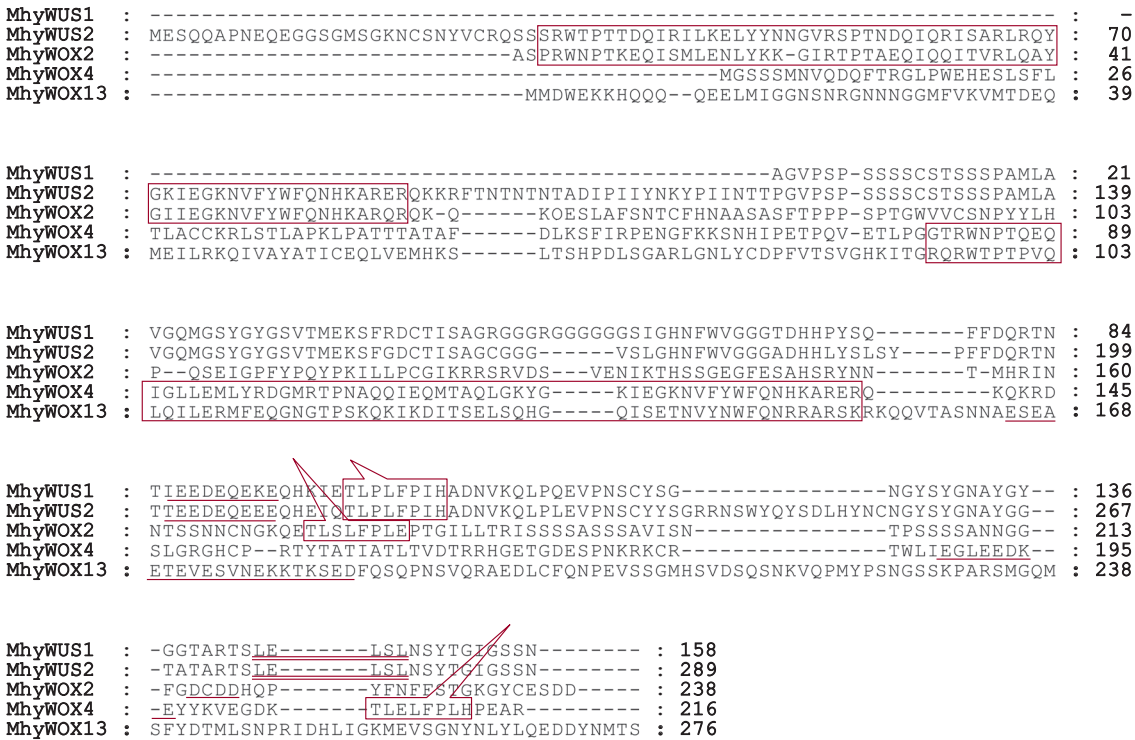


Fig. 2. Conserved sequences characteristic of *M. hypopitys* MhyWOX transcription factors.

Homeobox sequences are highlighted by open boxes. WUS-box motifs are indicated with call-out bars. EAR motifs are highlighted with double underlining. Acid domains are highlighted with solid lines.

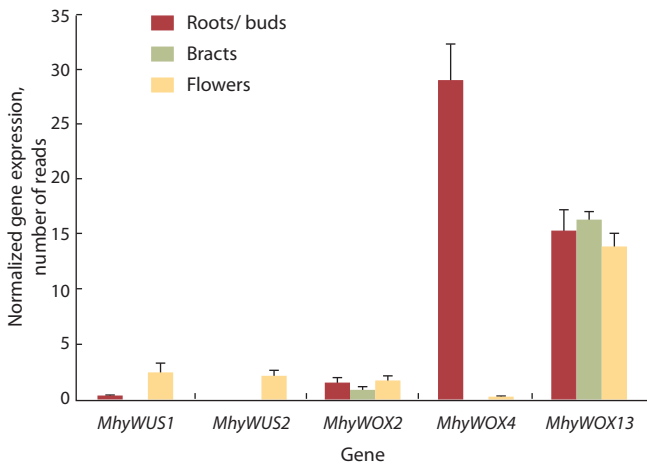


Fig. 3. Expression pattern of *MhyWOX* genes in *M. hypopitys* tissues.

способности всех пяти белков активировать транскрипцию генов-мишеней. Белок MhyWOX13, подобно своему ортологу WOX13, содержит только гомео- и кислотный домены (Dolzblasz et al., 2016).

Из 14 возможных генов семейства WOX, характерных для *A. thaliana*, мы обнаружили экспрессию четырех генов, представителей двух из трех существующих клад – древней и современной. Количество генов WOX может зависеть от систематического положения растения. К примеру, согласно данным NCBI, ортологи WOX14 (*A. thali-*

*ana*) найдены только у представителей семейства Brassicaceae (*Capsella rubella*, *Camelina sativa*, *Brassica* spp. и др.). Полная гетеротрофия поддельника, связанная с деградацией и/или модификацией вегетативных структур растения (Bidartondo, 2005), объясняет отсутствие мРНК генов, ортологических WOX1 и WOX3, совместно участвующих в регуляции развития листовой пластинки и края листа (Nakata et al., 2012). Отсутствие транскрипта гена, подобного WOX5, – одного из основных регуляторов структуры и поддержания функции ствольных клеток в корневой меристеме (Sarkar et al., 2007; Ощепкова и др., 2016), может быть следствием низкого уровня экспрессии ортологичного гена в корневой системе поддельника. Возможно также, что в транскриптомах корней поддельника слишком мала доля, приходящаяся на кончики корней, поэтому транскрипты WOX5 не найдены. В то же время в корнях был обнаружен высокий уровень экспрессии гена MhyWOX13, который может участвовать в развитии корневой ниши ствольных клеток (Deveaux et al., 2008) в поддельнике в качестве основного исполнителя, несмотря на отсутствие мотива WUS-box. На столь же высоком уровне ген MhyWOX13 транскрибируется в прицветниках и цветках, возможно, подобно WOX13, участвуя в развитии перегородки плода и фертильности (Romera-Branchat et al., 2013), инициации цветения (экспрессия в корнях распространяется, предположительно, и на многочисленные адвентивные почки) и других базовых процессах развития (Sakakibara et al., 2014). Отсутствие транскриптов генов, ортологических WOX8 и WOX9, которые функционируют во время раннего эмбриогенеза (Haecker et al., 2004; Breun-

inger et al., 2008), может объясняться приготовлением библиотек мРНК из материала на более ранней стадии цветения. На это указывает и отсутствие транскриптов, подобных *WOX6*, участвующему в регуляции развития семязачатков (Park et al., 2005).

Кроме *MhyWOX2*, современная клада в поддельнике представлена двумя *WUS*-подобными генами с ограниченной цветком экспрессией, которые, предположительно, контролируют популяцию стволовых клеток в меристемах соцветия и цветка (Haecker et al., 2004), и геном *MhyWOX4* с высоким уровнем транскрипции в корнях, который может отвечать за стволовые клетки камбия (Suer et al., 2011). Наличие следовых количеств мРНК *MhyWUS1* в транскриптоме корня говорит о его вероятной активности в меристемах адвентивных почек.

Таким образом, идентифицировано семейство гомеобоксных генов *WOX* в паразитическом высшем растении *M. hypopitys*. Охарактеризованы структура, филогения, паттерн экспрессии, а также возможные функции генов. Полученные результаты свидетельствуют о консервативности механизмов контроля стволовых клеток покрытосеменных растений с участием генов *WOX*.

## Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 14-24-00175. Plants brought from the forest with turf were kept under controlled humidity and illuminance in a pilot climate control facility at the Institute of Bioengineering, Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Beletsky A.B., Filyushin M.A., Gruzdev E.V., Mazur A.M., Prokhor-tchouk E.B., Kochieva E.Z., Mardanov A.B., Ravin N.V., Skryabin K.G. De novo transcriptome assembly of the mycoheterotrophic plant *Monotropa hypopitys*. *Genomics Data*. 2016;11:60-61. eCollection 2017. DOI 10.1016/j.gdata.2016.11.020.
- Besnard F., Vernoux T., Hamant O. Organogenesis from stem cells in planta: multiple feedback loops integrating molecular and mechanical signals. *Cell Mol. Life Sci*. 2011;68(17):2885-2906. DOI 10.1007/s00018-011-0732-4.
- Bidartondo M.I. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytol*. 2005;167(2):335-352. DOI 10.1111/j.1469-8137.2005.01429.x.
- Breuninger H., Rikirsch E., Hermann M., Ueda M., Laux T. Differential expression of WOX genes mediates apical-basal axis formation in the Arabidopsis embryo. *Dev. Cell*. 2008;14(6):867-876. DOI 10.1016/j.devcel.2008.03.008.
- Bürglin T.R., Affolter M. Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*. 2016;125(3):497-521. DOI 10.1007/s00412-015-0543-8.
- Chapman A.D. Numbers of Living Species in Australia and the World. Australian Biological Resources Study, Canberra, Australia, 2009. Available at <http://www.environment.gov.au/node/13869#magnoliophyta>.
- Costanzo E., Trehin C., Vandenbussche M. The role of WOX genes in flower development. *Ann. Bot*. 2014;114(7):1545-1553. DOI 10.1093/aob/mcu123.
- Daum G., Medzihradzky A., Suzaki T., Lohmann J.U. A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(40):14619-14624. DOI 10.1073/pnas.1406446111.
- Deveaux Y., Toffano-Nioche C., Claisse G., Thareau V., Morin H., Laufs P., Moreau H., Kreis M., Lecharny A. Genes of the most conserved WOX clade in plants affect root and flower development in Arabidopsis. *BMC Evol. Biol*. 2008;8:291. DOI 10.1186/1471-2148-8-291.
- Dolzblasz A., Nardmann J., Clerici E., Causier B., van der Graaff E., Chen J., Davies B., Werr W., Laux T. Stem cell regulation by Arabidopsis WOX genes. *Mol. Plant*. 2016;9(7):1028-1039. DOI 10.1016/j.molp.2016.04.007.
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceci E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol*. 2011;29(7):644-652. DOI 10.1038/nbt.1883.
- Gross-Hardt R., Lenhard M., Laux T. WUSCHEL signaling functions in interregional communication during Arabidopsis ovule development. *Genes Dev*. 2002;16(9):1129-1138. DOI 10.1101/gad.225202.
- Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., Macmanes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., Leduc R.D., Friedman N., Regev A. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc*. 2013;8(8):1494-1512. DOI 10.1038/nprot.2013.084.
- Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development*. 2004;131(3):657-668. DOI 10.1242/dev.00963.
- Hedman H., Zhu T., von Arnold S., Sohlberg J.J. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX gene family in the conifer picea abies reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. *BMC Plant Biol*. 2013;13:89. DOI 10.1186/1471-2229-13-89.
- Ji J., Shimizu R., Sinha N., Scanlon M.J. Analyses of WOX4 transgenics provide further evidence for the evolution of the WOX gene family during the regulation of diverse stem cell functions. *Plant Signal. Behav*. 2010;5(7):916-920. DOI 10.1104/pp.109.149641.
- Katsir L., Davies K.A., Bergmann D.C., Laux T. Peptide signaling in plant development. *Curr. Biol*. 2011;21(9):R356-R364. DOI 10.1016/j.cub.2011.03.012.
- Langmead B., Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*. 2012;9:357-359. DOI 10.1038/nmeth.1923.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-2948. DOI 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Laux T., Mayer K.F., Berger J., Jürgens G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development*. 1996;122(1):87-96. <http://dev.biologists.org/content/development/122/1/87.full.pdf>.
- Leake J.R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol*. 1994;127:171-216. DOI 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04272.x.
- Lenhard M., Bohnert A., Jürgens G., Laux T. Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell*. 2001;105(6):805-814. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00390-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00390-7).
- Li B., Dewey C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:323. DOI 10.1186/1471-2105-12-323.
- Lieber D., Lora J., Schrempp S., Lenhard M., Laux T. Arabidopsis WH1 and WH2 genes act in the transition from somatic to repro-



- ductive cell fate. *Curr. Biol.* 2011;21(12):1009-1017. DOI 10.1016/j.cub.2011.05.015.
- Lin H., Niu L., McHale N.A., Ohme-Takagi M., Mysore K.S., Tadege M. Evolutionarily conserved repressive activity of WOX proteins mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(1):366-371. DOI 10.1073/pnas.1215376110.
- Liu X., Kim Y.J., Müller R., Yumul R.E., Liu C., Pan Y., Cao X., Goodrich J., Chen X. AGAMOUS terminates floral stem cell maintenance in Arabidopsis by directly repressing WUSCHEL through recruitment of Polycomb Group proteins. *Plant Cell.* 2011;23(10):3654-3670. DOI 10.1105/tpc.111.091538.
- Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M., Busch M.A., Parcy F., Simon R., Weigel D. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell.* 2001;105(6):793-803. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00384-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00384-1).
- Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi. Ed. V.S.F.T. Merckx. New York: Springer Science+Buisness Media, 2013. DOI 10.1007/978-1-4614-5209-6.
- Nakata M., Matsumoto N., Tsugeki R., Rikirsch E., Laux T., Okada K. Roles of the middle domain-specific WUSCHEL-RELATED HOMEBOX genes in early development of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2012;24(2):519-535. DOI 10.1105/tpc.111.092858.
- Nardmann J., Werr W. The invention of WUS-like stem cell-promoting functions in plants predates leptosporangiate ferns. *Plant Mol. Biol.* 2012;78(1-2):123-134. DOI 10.1007/s11103-011-9851-4.
- Nardmann J., Zimmermann R., Durantini D., Kranz E., Werr W. WOX gene phylogeny in Poaceae: a comparative approach addressing leaf and embryo development. *Mol. Biol. Evol.* 2007;24(11):2474-2484. DOI 10.1093/molbev/msm182.
- Nimchuk Z.L., Tarr P.T., Ohno C., Qu X., Meyerowitz E.M. Plant stem cell signaling involves ligand-dependent trafficking of the CLAVATA1 receptor kinase. *Curr. Biol.* 2011;21(5):345-352. DOI 10.1016/j.cub.2011.01.039.
- Oshchepkova E.A., Omelyanchuk N.A., Savina M.S., Pasternak T., Kolchanov N.A., Zemlyanskaya E.V. Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016;20(4):459-474. DOI 10.18699/VJ16.173. (in Russian)
- Park S.O., Zheng Z., Oppenheimer D.G., Hauser B.A. The PRETTY FEW SEEDS2 gene encodes an Arabidopsis homeodomain protein that regulates ovule development. *Development.* 2005;132(4):841-849. DOI 10.1242/dev.01654.
- Pi L., Aichinger E., van der Graaff E., Llavata-Peris C.I., Weijers D., Hennig L., Groot E., Laux T. Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression. *Dev. Cell.* 2015;33(5):576-588. DOI 10.1016/j.devcel.2015.04.024.
- Prunet N., Morel P., Negrutiu I., Trehin C. Time to stop: flower meristem termination. *Plant Physiol.* 2009;150(4):1764-1772. DOI 10.1104/pp.109.141812.
- Ravin N.V., Gruzdev E.V., Beletsky A.V., Mazur A.M., Prokhorchouk E.B., Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Skryabin K.G. The loss of photosynthetic pathways in the plastid and nuclear genomes of the non-photosynthetic mycoheterotrophic eudicot *Monotropa hypopitys*. *BMC Plant Biol.* 2016; 16(3):238. DOI 10.1186/s12870-016-0929-7.
- Romera-Branchat M., Ripoll J.J., Yanofsky M.F., Pelaz S. The WOX13 homeobox gene promotes replum formation in the Arabidopsis thaliana fruit. *Plant J.* 2013;73(1):37-49. DOI 10.1111/tjp.12010.
- Sakakibara K., Reisewitz P., Aoyama T., Friedrich T., Ando S., Sato Y., Tamada Y., Nishiyama T., Hiwatashi Y., Kurata T., Ishikawa M., Deguchi H., Rensing S.A., Werr W., Murata T., Hasebe M., Laux T. WOX13-like genes are required for reprogramming of leaf and proplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. *Development.* 2014;141(8):1660-1670. DOI 10.1242/dev.097444.
- Salvini M., Fambrini M., Giorgetti L., Pugliesi C. Molecular aspects of zygotic embryogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.): correlation of positive histone marks with HaWUS expression and putative link HaWUS/HaL1L. *Planta.* 2016;243(1):199-215. DOI 10.1007/s00425-015-2405-2.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T. Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature.* 2007;446(7137):811-814. DOI 10.1038/nature05703.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F., Jürgens G., Laux T. The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell.* 2000;100(6):635-644. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80700-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80700-X).
- Segatto A.L., Thompson C.E., Freitas L.B. Contribution of WUSCHEL-related homeobox (WOX) genes to identify the phylogenetic relationships among *Petunia* species. *Genet. Mol. Biol.* 2016. Epub ahead of print. DOI 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0073.
- Somssich M., Je B.I., Simon R., Jackson D. CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development.* 2016;143(18):3238-3248. DOI 10.1242/dev.133645.
- Suer S., Agusti J., Sanchez P., Schwarz M., Greb T. WOX4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2011;23:3247-3259. DOI 10.1105/tpc.111.087874.
- Sun B., Ito T. Regulation of floral stem cell termination in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 2015;6:17. DOI 10.3389/fpls.2015.00017.
- Sun B., Xu Y., Ng K.H., Ito T. A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem. *Genes Dev.* 2009;23(15):1791-1804. DOI 10.1101/gad.1800409.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- van der Graaff E., Laux T., Rensing S.A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol.* 2009;10(12):248. DOI 10.1186/gb-2009-10-12-248.
- Vandenbussche M., Horstman A., Zethof J., Koes R., Rijpkema A.S., Gerats T. Differential recruitment of WOX transcription factors for lateral development and organ fusion in *Petunia* and Arabidopsis. *Plant Cell.* 2009;21(8):2269-2283. DOI 10.1105/tpc.109.065862.
- Wallace G.D. Studies of the Monotropoidae (Ericaceae): taxonomy and distribution. *Wassman J. Biol.* 1975;33:1-88.
- Yadav R.K., Perales M., Gruel J., Girke T., Jönsson H., Reddy G.V. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev.* 2011;25(19):2025-2030. DOI 10.1101/gad.17258511.
- Zhao S., Jiang Q.T., Ma J., Zhang X.W., Zhao Q.Z., Wang X.Y., Wang C.S., Cao X., Lu Z.X., Zheng Y.L., Wei Y.M. Characterization and expression analysis of WOX5 genes from wheat and its relatives. *Gene.* 2014;537(1):63-69. DOI 10.1016/j.gene.2013.12.022.
- Zuckerandl E., Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. N.Y.: Acad. Press, 1965:97-166.