

Системно-биологический анализ гена *WOX5* и его функций в нише стволовых клеток корня

Е.А. Ощепкова^{1,2}✉, Н.А. Омелянчук^{1,2}, М.С. Савина^{1,2}, Т. Пастернак³, Н.А. Колчанов^{1,2}, Е.В. Землянская^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Институт биологии II/ молекулярной физиологии растений, Фрайбург, Германия

Ген *WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)* кодирует транскрипционный фактор, который является одним из основных регуляторов поддержания структуры и функционирования ниши стволовых клеток в кончике корня растений. Белок *WOX5* экспрессируется в клетках покоящегося центра апикальной меристемы корня, предотвращая дифференцировку прилегающих к нему инициалей колумеллы и участвуя наряду с *SCR*, *SHR*, *PLT1*, *PLT2* в контроле дифференцировки других инициалей меристемы корня. Однако детали механизмов функционирования этого белка неясны. *WOX5* относится к семейству *WUSCHEL related homeobox (WOX)*, родоначальник которого, транскрипционный фактор *WUSCHEL (WUS)*, обеспечивает поддержание ниши стволовых клеток в меристеме побега. Считается, что ген *WOX5* дивергировал от общего с *WUS* предка у древних покрытосеменных, в результате чего произошла специализация ниш стволовых клеток побега и корня. Однако вопрос дальнейшей дивергенции структуры и функций *WOX5* в процессе эволюции цветковых растений изучен слабо. В данном обзоре представлен системно-биологический анализ гена *WOX5* с целью выявления особенностей его эволюции и механизмов функционирования. Для этого в работе проведен филогенетический анализ 62 аминокислотных последовательностей *WOX5* из публично доступных баз данных, обобщены литературные данные о домене экспрессии *WOX5* у арабидопсиса и других видов и его функциях в онтогенезе, приведены результаты экспериментов по выявлению первичных и вторичных мишеней этого транскрипционного фактора, а также обсуждены данные о возможных механизмах прямой и непрямого регуляции экспрессии *WOX5*. В частности, был проведен анализ промоторных областей гена *WOX5* у 30 видов растений и были высказаны гипотезы о возможных прямых регуляторах экспрессии *WOX5* на основании наличия соответствующих потенциальных сайтов связывания в консервативных областях промоторов гена *WOX5*.

Ключевые слова: развитие корня растения; апикальная меристема корня; стволовые клетки растений; транскрипционный фактор *WOX5*; систематический обзор.

Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche

Е.А. Oshchepkova^{1,2}✉, N.A. Omelyanchuk^{1,2}, M.S. Savina^{1,2}, T. Pasternak³, N.A. Kolchanov^{1,2}, E.V. Zemlyanskaya^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Biology II/Molecular Plant Physiology, Centre for BioSystems Analysis (ZBSA), BIOS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg, Freiburg, Germany

WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5) gene encodes the transcription factor, which is one of the key regulators, maintaining structure and functioning of the stem cell niche in plant root tips. Protein *WOX5* is expressed in the quiescent center of the root apical meristem, preventing differentiation of columella initials and altogether with *SCR*, *SHR*, *PLT1* and *PLT2* participating in the control of differentiation of other root meristem initials. However, the details of *WOX5* functioning are unclear. The *WOX5* protein belongs to *WUSCHEL related homeobox (WOX)* family, the founder of which is the transcription factor *WUSCHEL (WUS)* providing maintenance of the stem cell niche in the shoot apical meristem. *WOX5* and *WUS* diverged from a common ancestor at the base of angiosperms, which resulted in a specialization of shoot and root stem cell niches. However, the problem of *WOX5* structural and functional divergence during angiosperm evolution was poorly addressed. In this review we present a systems biology analysis of the *WOX5* gene to reveal specific features of its evolution and functioning. To this end, we performed a phylogenetic analysis on 62 publicly available *WOX5* amino acid sequences, generalized published data about *WOX5* expression domain in *Arabidopsis* and other species and its role in development, integrated the results of experiments on identification of primary and secondary targets for this transcription factor. Data on possible mechanisms of direct and indirect regulation of *WOX5* expression were discussed. Particularly, we performed the analysis of *WOX5* promoter regions from 30 species. Possible direct regulators of the *WOX5* gene expression were proposed based on the presence

of putative binding sites for the candidate transcription factors in conserved *WOX5* promoter regions.

Key words: root development; root apical meristem; plant stem cells; *WOX5* transcription factor; systematic review.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ощепкова Е.А., Омелянчук Н.А., Савина М.С., Пастернак Т., Колчанов Н.А., Землянская Е.В. Системно-биологический анализ гена *WOX5* и его функций в нише стволовых клеток корня. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):459-474. DOI 10.18699/VJ16.173

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Oshchepkova E.A., Omelyanchuk N.A., Savina M.S., Pasternak T., Kolchanov N.A., Zemlyanskaya E.V. Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):459-474. DOI 10.18699/VJ16.173

Непрерывный рост растения на протяжении всей жизни обусловлен постоянным функционированием стволовых клеток в апикальных меристемах (АМ) побега и корня. Как правило, стволовые клетки АМ (называемые инициалами) претерпевают асимметричное деление, при котором одна из дочерних клеток остается стволовой, а другая дает начало специализированным клеткам того или иного типа (Boyer, Simon, 2015). Баланс внутренних факторов, контролирующих асимметричное деление стволовых клеток, обеспечивает поддержание ниши стволовых клеток (НСК) – упорядоченной анатомической структуры, необходимой для правильного апикального роста (Aichinger et al., 2012). В ее основе – организующий центр (ОЦ), непосредственно контактирующий со стволовыми клетками. Клетки ОЦ (в корне он называется покоящимся центром, ПЦ) характеризуются низкой митотической активностью и играют ключевую роль в поддержании индивидуальных характеристик контактирующих с ним стволовых клеток, подавляя их дифференцировку (van den Berg et al., 1997; Scheres, 2007).

Ключевыми регуляторами поддержания структуры и функционирования НСК апикальных меристем являются транскрипционные факторы (ТФ), например, для НСК корня это *PLETHORA1*, *PLETHORA2* (*PLT1/2*), *SCARECROW* (*SCR*), *SHORT-ROOT* (*SHR*) и другие, а также фитогормоны, такие как ауксин и цитокинин (Sablowski, 2011; Aichinger et al., 2012; Clark et al., 2014). Существенный вклад в этот процесс вносят малые РНК и сигнальные пептиды (CLEP). Все вместе они формируют сложную сеть взаимодействий, способную воспринимать и передавать различные регуляторные сигналы (Bennett et al., 2014).

В поддержании ниши стволовых клеток АМ корня важную роль играет ТФ *WOX5* семейства *WUSCHEL* related homeobox (*WOX*), представители которого специфичны для растений и регулируют различные этапы их развития (van der Graaff et al., 2009). У *Arabidopsis thaliana* L. семейство *WOX* представлено 15 транскрипционными факторами. Родоначальник семейства, белок *WUSCHEL* (*WUS*), участвует в поддержании НСК в АМ побега, контролируя сохранение плюрипотентности стволовых клеток (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998), регулирует их количество и паттерн клеточных делений, а также первые этапы дифференцировки их клеток-потомков (Yadav et al., 2010). Остальные представители семейства (в том числе и *WOX5*) были выявлены на основании сходства первичной структуры кодирующих их генов с последо-

вательностью гена *WUS*, благодаря наличию консервативного гомеодомена с характерной структурой (Mayer et al., 1998; Haecker et al., 2004). У белков *WUS* и *WOX1–7* имеется также дополнительный консервативный мотив (так называемый *WUS*-бокс) длиной в восемь аминокислотных остатков (консенсус *TLPLFPMH*) (Haecker et al., 2004; Gao et al., 2014). Характерной чертой ортологов *WOX5*, позволяющей отличать их от других представителей семейства *WOX*, является наличие трипептида *ESK* (глутаминовая кислота, серин, лизин) в гомеодомене на N-конце ДНК-распознающей спирали, который у остальных белков семейства представлен с заменой серина на глицин, т.е. трипептидом *EGK* (Nardmann, Wert, 2012) (Доп. материалы 1¹). Считается, что гены *WUS* и *WOX5* имеют монофилетическое происхождение, и их функциональное разделение началось у древних покрытосеменных (Nardmann et al., 2009). Однако о дальнейшей эволюции *WOX5* у цветковых растений известно немного.

У *A. thaliana* ген *WOX5* экспрессируется в клетках покоящегося центра АМ корня (Haecker et al., 2004) (Доп. материалы 2). Специфическая экспрессия *WOX5* во многом определяет организующие свойства ПЦ. В частности, было показано, что мутации, приводящие к потере функции *WOX5* у *A. thaliana*, вызывают терминальную дифференцировку стволовых клеток колумеллы (Sarkar et al., 2007). Сверхэкспрессия *WOX5*, напротив, блокирует нормальную дифференцировку потомков стволовых клеток, что приводит к появлению нового пула клеток, подобных стволовым. Важную роль в этой регуляции играет межклеточная мобильность белка *WOX5*, который мигрирует из клеток ПЦ в прилегающие к нему стволовые клетки (Pi et al., 2015).

Цель нашей работы – выявление особенностей эволюции гена *WOX5* и механизмов его функционирования на основании анализа данных, опубликованных в статьях или представленных в информационных ресурсах по нуклеотидным и белковым последовательностям. Описание паттерна и регуляции экспрессии гена *WOX5*, его происхождения, а также возможных механизмов его функционирования получено с помощью интеграции информации из всех англоязычных публикаций базы данных PubMed, касающихся гена *WOX5* и его белкового продукта. Для филогенетического анализа аминокислотных последовательностей ортологов *WOX5* были выбраны все последовательности из баз данных Protein database (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2016-20-4/appx2.pdf>

nih.gov/protein/) и UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), аннотированные как *WOX5* или *WOX5-like* и содержащие специфический для *WOX5* трипептид ESK в гомеодомене (см. Доп. материалы 1). Исключение было сделано для последовательностей из *Picea abies* и *Pinus pinaster*, содержащих в гомеодомене трипептид EGK, исходя из предположения о дупликации проортолога *WUS/WOX5* у голосеменных (Hedman et al., 2013). Последовательность гипотетического белка *WOX5-1* плауна (*Selaginella moellendorffii*) выступала в качестве внешней группы. Для анализа промоторных областей ортологов *WOX5* были использованы все доступные в базе данных GeneBank нуклеотидные последовательности 5'-регуляторных областей генов *WOX5*. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью доступных биоинформатических инструментов.

Филогения *WOX5*

В филогенетическом дереве белков семейства *WOX* можно выделить три основные клады: современную (*WUS*), промежуточную (*WOX9/11*) и древнюю (*WOX10/13*) (van der Graaff et al., 2009). Считается, что современная клада специфична для семенных растений, промежуточная содержит последовательности, дивергировавшие у предков сосудистых растений, а древняя включает последовательности с высокой гомологией с генами из зеленых водорослей и мха (Nardmann et al., 2009; Lian et al., 2014). Последовательности *WUS* и *WOX5* относят к современной кладе, их ортологи обнаруживаются у цветковых растений и представителей голосеменных (Hedman et al., 2013), однако гипотетические предковые формы *WUS* выявляются также у некоторых папоротников (Nardmann, Weig, 2012). Тем не менее происхождение и пространственное разделение функций *WUS* и *WOX5* в процессе эволюции нуждаются в дальнейшем исследовании.

Ранее предполагалось, что гены *WUS* и *WOX5* существовали у голосеменных в виде единого предшественника, а в дальнейшем у покрытосеменных произошли его дупликация и разделение белков *WUS* и *WOX5* по функциям (Nardmann et al., 2009). Однако недавно гомологи обоих генов были обнаружены у представителя голосеменных *Picea abies* (Hedman et al., 2013), что свидетельствует о более раннем, чем предполагалось, происхождении гена *WOX5*. Возможно, функциональная дивергенция генов *WUS* и *WOX5* свойственна именно покрытосеменным, поскольку у *P. abies* *WOX5* экспрессируется в кончиках как корней, так и побегов.

В геномах некоторых полиплоидных видов ген *WOX5* представлен несколькими паралогами. Так, в геноме гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* присутствуют три гомологичные копии *WOX5* – *TaWOX5a*, *TaWOX5b* и *TaWOX5c* – с длинами 639, 630 и 633 н. п. соответственно (Zhao et al., 2014). Паттерны экспрессии паралогов, а также аминокислотные последовательности их продуктов практически идентичны, что, вероятно, свидетельствует о функциональной эквивалентности этих белков. В геноме кукурузы (*Zea mays*), древнего сегментного аллотетраплоида (Gaut, Doebley, 1997), два паралога – *ZmWOX5A* и *ZmWOX5B* – напротив, демонстрируют альтернативные паттерны экспрессии (Nardmann et al.,

2007). Так, *ZmWOX5B* экспрессируется в ПЦ и ближайших к нему инициалах клеток сосудистой системы, тогда как *ZmWOX5A* экспрессируется в раннем эндосперме и в зародышевом корешке в 4–6-м слоях под ПЦ после инициации в зародыше примордия первого листа. Исходя из особенностей экспрессии, можно предположить, что *ZmWOX5B* является более близким паралогом канонических *WOX5* других видов, а *ZmWOX5A* приобрел некую новую функцию. Образование *Z. mays* как аллотетраплоида произошло более 11 млн лет назад (Haider, 2013), и этого периода времени оказалось достаточно для того, чтобы паралоги *ZmWOX5A* и *ZmWOX5B* дивергировали в функциональном плане.

Дивергенция последовательностей *WOX5* происходила, судя по всему, на ранних этапах эволюции цветковых растений. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ортологов *WOX5* из восьми разных видов (арабидопсис, пшеница, кукуруза, рис, соя, виноград, горошек и нимфея) позволил сделать вывод о том, что гены *WOX5* однодольных и двудольных растений существенно отличаются: большой район нуклеотидной последовательности между гомеодоменом и *WUS*-боксом, свойственный однодольным, у двудольных отсутствует (Zhao et al., 2014). Это позволило высказать предположение, что гены *WOX5* дивергировали вместе с разделением покрытосеменных растений на однодольные и двудольные. Возможно, что данная дивергенция имеет отношение к разнице в строении корневой системы у этих таксономических классов и связанным с этим различиям в функционировании *WOX5*.

Мы подтвердили дивергенцию *WOX5* у однодольных и двудольных, выявленную ранее (Zhao et al., 2014) на более расширенном списке 62 аминокислотных последовательностей белка *WOX5* 58 видов растений (рис. 1; Доп. материалы 3). Наряду с этим мы выявили значимые различия между аминокислотными последовательностями белка *WOX5* у голосеменных и покрытосеменных растений. Таким разделением на голосеменные и покрытосеменные и последних на однодольные и двудольные филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей белков *WOX5* в целом отражает эволюцию таксонов растений. Исключением является расположение *WOX5* некоторых видов, не соответствующее эволюционному порядку их таксонов, что может свидетельствовать о специфичной структуре меристемы их корня.

Базальные покрытосеменные амборелла волосистоножковая (*Amborella trichopoda*) и кувшинка (*Nymphaea jamesoniana*) на дереве расположились выше разделения однодольных и двудольных, при этом не образуя единой клады. Такое строение филогенетического дерева повторяет результаты ранее проведенных таксономических исследований группы базальных покрытосеменных, основанных на анализе нескольких генов из ядерных, пластидных и митохондриальных геномов (Qiu et al., 2005).

Аир болотный (*Acorus calamus*) принадлежит к базальным однодольным (Duvall, 1993). На эволюционном дереве *WOX5*, построенном нами, этот вид локализуется чуть выше базальных покрытосеменных, до разделения однодольных и двудольных, что соответствует его эволюционной истории. Как и базальные покрытосеменные, аир

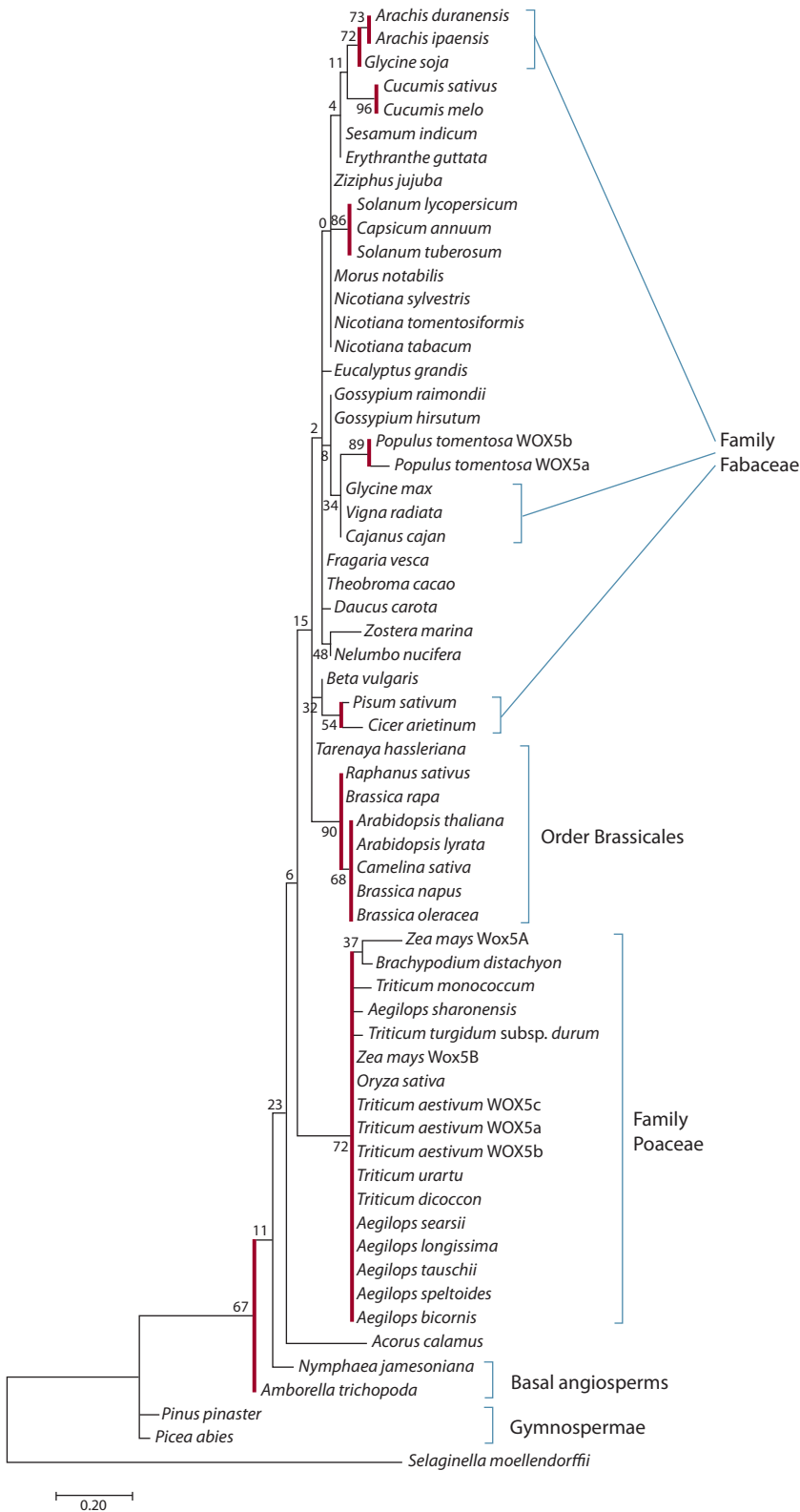


Fig. 1. The phylogenetic tree of *WOX5* proteins.

The tree was constructed by the maximum likelihood method in MEGA7 software (1000 bootstrap iterations). The sequences were aligned in ClustalW (Kumar et al., 2016). The length of each branch corresponds to the number of substitutions in the sequence. A total of 62 amino acid sequences from 58 plant species were analyzed (see Supplement 3). Positions at which the amino acid sequences had gaps in the alignment were disregarded in building the tree. Clades shown in bold have bootstrap 50 or more. The hypothetical *Selaginella moellendorffii* *WOX5*-1 protein sequence was used as an outgroup.

все еще совмещает в своей морфологии и анатомии признаки обоих классов. В апикальной меристеме корня аира слой эпидермиса образуется из периферических клеток кортекса, что характерно для однодольных, в то время как образование придаточный корней у этого вида сходно с таковым у базальных покрытосеменных. Из этого следует, что по строению корня аир и кувшинка ближе друг к другу, чем к другим однодольным и двудольным соответственно (Soukup et al., 2005). Известно, что *WOX5* является одним из ключевых факторов, определяющих развитие строения корня, и это может объяснять полученное нами расположение *AcWOX5* на филогенетическом дереве.

Белки *WOX5* однодольных, представленных видами из семейства злаковых, объединились в одну кладу. Как упоминалось выше, в геноме кукурузы (*Z. mays*) есть два паралога *WOX5*: *WOX5A* и *WOX5B* (Nardmann et al., 2007). В кладе семейства злаковых аминокислотных замен больше всего накоплено в белке *WOX5A* кукурузы. По характеру экспрессии и функциям *WOX5B* ближе к *WOX5* других видов, чем к *WOX5A*, что и отражает результат построения филогенетического дерева. *WOX5* еще одного однодольного растения, взморника морского (*Zostera marina*), неожиданно расположился в кладе двудольных. Следует отметить, что взморник растет в морской воде (Olsen et al., 2016), и возможно, адаптация к таким специфическим условиям обитания привела к возникновению отличий в структуре корня и функциях *WOX5* этого растения. Отметим, что *WOX5* взморника морского на дереве находится близко с последовательностью *WOX5* лотоса орехоносного (*Nelumbo nucifera*), который тоже является водным (но в этом случае пресноводным) растением. Известно, что водные покрытосеменные лишены корневого чехлика (Поплавская, 1971; Kita, Kato, 2005). Эта специфика в развитии корня может быть связана с особенностями функционирования *WOX5* и отражаться на его структуре.

В большой кладе двудольных выделяется субклада семейства крестоцветных, объединившая *Arabidopsis thaliana*, *A. lyrata*, *Brassica napus*,

B. oleracea, *B. rapa*, *Camelina sativa*, *Raphanus sativus*. Рядом с белками семейства крестоцветных находится *Tarenaya hassleriana* из семейства клеомовых, которое принадлежит порядку Brassicales, включающему также семейство крестоцветных (Brassicaceae), что и объясняет близость ThWOX5 и WOX5 крестоцветных на филогенетическом дереве.

Можно заметить, что бобовые не образовали единой клады на дереве, а расположились в разных его частях. При этом белки WOX5 из двух геномов сои, дикорастущей (*Glycine soja*) и окультуренной (*Glycine max*), оказались в разных кладах. Возможная причина такого строения в том, что геномы данных растений имеют значительные отличия, вызванные селекцией в процессе domestikации окультуренной сои, – сравнение их геномов выявило 425 уникальных генов (из них 12 кодируют ТФ), которые присутствуют в возделываемой сое, но отсутствуют в дикорастущей (Joshi et al., 2013).

Филогения белка WOX5 в основном повторяет филогению таксонов растений, исключение могут составлять виды со специальной морфологией корня, адаптированной к определенным условиям среды (например, водные растения).

Паттерн экспрессии WOX5 у арабидопсиса и его функции в онтогенезе

Во взрослых растениях *A. thaliana* WOX5 экспрессируется в ПЦ апикальной меристемы корня, откуда продукт этого гена мигрирует в инициали колумеллы (Haescker et al., 2004; Pi et al., 2015). В зародышах экспрессия WOX5 инициируется при преддетерминации ПЦ, т.е. в предшественниках клеток ПЦ. Начинается экспрессия WOX5 в одноклеточной гипофизе на 32-клеточной глобулярной стадии зародыша (см. Доп. материалы 4). После горизонтального деления клетки гипофизы WOX5 экспрессия продолжается в более близком предшественнике ПЦ, верхней линзообразной клетке гипофизы, и исчезает в ее дочерней клетке, предшественнице клеток колумеллы (Scheres et al., 1994; Haescker et al., 2004). ПЦ полностью формируется на сердечковидной стадии зародыша в результате двух циклов делений верхней линзообразной клетки, и WOX5 экспрессируется во всех его четырех клетках.

Экспрессия WOX5, в первую очередь, необходима для поддержания стволового состояния клеток инициалей колумеллы и ПЦ, так как в ее отсутствие в проростках нулевых мутантов *wox5* все ткани зародышевого корня функционируют нормально, за исключением ПЦ и колумеллы, клетки которых при созревании зародыша и далее при его прорастании дифференцируются и могут значительно увеличиваться в размерах (Sarkar et al., 2007; Forzani et al., 2014). Кроме того, у зрелых зародышей *wox5* мутантов часто имеются три слоя колумеллы вместо четырех в норме (80 % зародышей), у некоторых клеток колумеллы не происходит цитокинез, они занимают два слоя (92 % зародышей), значительно увеличено число клеточных делений в ПЦ (1,4 деления на корень у мутанта и 0,013 в норме) (Forzani et al., 2014). У *wox5* мутанта увеличение числа делений в ПЦ регистрировалось также и в корне проростка. Следовательно, WOX5 контролирует число клеток в колумелле (на стадии ее формирования

в зародыше), число делений в ПЦ и поддержание пула стволовых клеток колумеллы (или дистальных стволовых клеток) в меристеме корня.

В одиночных *wox5* мутантах проксимальные стволовые клетки, т.е. инициали сосудистых клеток, перицикла, эндодермиса/кортекса и эпидермиса/бокового корневого чехлика, развиваются так же, как в диком типе (Sarkar et al., 2007). Однако добавление мутации *wox5* к одиночным мутантам *scr-4* и *shr-1* или к двойному *plt1 plt2* приводит к дифференцировке проксимальных стволовых клеток, что позволяет предполагать, что гены WOX5, SCR, SHR, PLT1 и PLT2 совместно и взаимозаменяемо контролируют поддержание пула проксимальных стволовых клеток.

WOX5 экспрессируется также с первых стадий закладки примордиев боковых и придаточных корней, маркируя предшественников клеток ПЦ в этих корнях (Ditengou et al., 2008; Della Rovere et al., 2013). Тем не менее боковые и придаточные корни образуются в *wox5* мутантах, но с меньшей интенсивностью, чем в диком типе (Gonzali et al., 2005; Tian et al., 2014a). У *wox5* мутантов в боковых корнях так же, как и в первичном корне, происходит преждевременная дифференцировка ПЦ и инициалей колумеллы (Tian et al., 2014a).

Наряду с ПЦ WOX5 экспрессируется в зародыше в примордиях семядолей, где начиная с сердечковидной стадии он выявляется в группах клеток, расположенных в точках формирования в сосудистой системе семядолей латеральных жилок (Haescker et al., 2004). Экспрессия достигает максимума на поздней сердечковидной стадии зародыша, все еще хорошо регистрируется на торпедообразной стадии и затем снижается. В пользу того, что WOX5 наряду с формированием меристемы корня участвует также в формировании семядолей и меристемы побега, говорит тот факт, что у четвертных мутантов *wox1 wox2 wox3 wox5* проростки имеют аномалии развития семядолей и меристемы побега у 82 % растений (одна семядоля вместо двух, палочкообразный вырост на месте АМ и семядолей и полное отсутствие побега у 34, 30 и 18 % растений соответственно) (Breuning et al., 2008). При этом в развитии побега, судя по всему, практически равнозначно и взаимозаменяемо участвуют все четыре WOX гена, так как в одиночных мутантах аномалии побега проявляются только в наличии одной семядоли у 7 % (*wox2*) и 2 % (*wox3*) зародышей; в двойных и тройных мутантах увеличение процента зародышей с одной семядолей происходит только в случаях *wox2 wox3* (12 %) и *wox1 wox2 wox3* (31 %).

WOX5 экспрессируется также в зрелой пыльце и в пыльцевых трубках при ее прорастании (Dorantes-Acosta, Vielle-Calzada, 2006). Экспрессия WOX5 в данном случае необходима для нормального прорастания пыльцы.

Во время инициации и образования каллуса из различных эксплантов арабидопсиса (корней, листьев, лепестков, семядолей) происходит усиление экспрессии WOX5 наряду с другими генами НСК корня и ауксин-активируемыми генами (Sugimoto et al., 2010). При этом активация этих генов происходит за счет эпигенетического репрограммирования, т.е. путем снятия гиперметилирования гистона H3 по Lys27 (H3K27me3) в их промоторах (He et al., 2012). Эти и другие исследования (Che et al., 2007; Atta

et al., 2009) наглядно демонстрируют, что работа генных сетей инициации боковых корней является необходимой стадией в процессе образования каллуса, что включает активацию экспрессии *WOX5*. Другими словами, активация экспрессии *WOX5* и других генов НСК корня необходима для индукции плюрипотентности и репрограммирования клеток. Как уже упоминалось выше, *WOX5* начинает экспрессироваться с первых делений клетки основателя (founder cell) латерального корня (Ditengou et al., 2008). При обработке цитокинином инициация меристемы побега и самого побега возможна напрямую из примордия бокового корня без промежуточной стадии каллусообразования (Chatfield et al., 2013). Экспрессия *WOX5* наряду с другими генами НСК корня может быть маркером состояния плюрипотентности, так как при переносе клеток на среды со специальным составом гормонов можно осуществить регенерацию как побегов, так и корней.

Паттерн экспрессии *WOX5* у других видов растений

Как и у арабидопсиса, экспрессия *WOX5* в ПЦ отмечалась у гороха (*Pisum sativum*) (Osipova et al., 2012), люцерны (*Medicago truncatula*) (Imin et al., 2007; Chen et al., 2009), риса (*Oryza sativa*) (Kamiya et al., 2003) и кукурузы (*Z. mays*) (Nardmann et al., 2007). У люцерны, риса, кукурузы экспрессия *WOX5* была также описана в клетках-предшественниках ПЦ в зародыше (Kamiya et al., 2003; Imin et al., 2007; Nardmann et al., 2007; Chen et al., 2009).

У растений из семейства бобовых, *M. truncatula* и *P. sativum*, *WOX5* также экспрессируется при развитии симбиотических азотфиксирующих клубеньков, участвуя, как и при каллусообразовании, в репрограммировании клеточной дифференцировки (Osipova et al., 2012). На 3–4-й день после индукции образования клубенька *WOX5* транскрипт виден в сайте инициации клубенька (в некоторых клетках перикарда, эндодермиса и кортекса, расположенных напротив ксилемных полюсов). Также небольшой сигнал отмечается во внешних клетках кортекса. На 5–6-й день экспрессия распространяется по всему примордию клубенька. Затем экспрессия *WOX5* постепенно падает и на 12–14-й день регистрируется только на периферии развивающихся клубеньков. В зрелых клубеньках (21–28 дней после индукции) *WOX5* экспрессируется только в нескольких клетках на конце сосудистого пучка клубенька. Развитие опухолей растений гороха, вызываемых бактерией *Agrobacterium tumefaciens*, также связано с увеличением экспрессии *WOX5* в клетках опухоли (Vinogradova et al., 2015). Таким образом, экспрессия *WOX5* у других видов, как и у арабидопсиса, может быть связана с репрограммированием, т. е. изменением пути дифференцировки клетки.

У кукурузы *ZmWOX5B* экспрессируется не только в ПЦ, но и в инициалах стели и их потомках, т. е. в базальной части сосудистой системы (Nardmann et al., 2007). В ходе онтогенеза экспрессия *ZmWOX5B* начинается в центре шестидневного зародыша. Далее на стадии развития котиледонов домен экспрессии *ZmWOX5B* становится окруженным со всех сторон доменом экспрессии гена *KNOTTED1*. Причем в областях экспрессии этих генов нет перекрытия. После этого экспрессия *ZmWOX5B*

фокусируется в ПЦ и расположенных над ним предшественниках клеток сосудистой системы. *ZmWOX5A* экспрессируется в раннем эндосперме сразу после того, как его базальный слой становится клеточным. Далее он регистрируется в суспензоре зародыша (в 4–6 слоях под ПЦ корешка) после первой стадии образования листьев (см. Доп. материалы 4). В проростке *ZmWOX5A* экспрессируется в эпидермисе корня, который участвует в поглощении ионов из ризосферы в корень. Можно сделать вывод, что у кукурузы ортолог *AtWOX5*, каким является *ZmWOX5B*, имеет более расширенный домен экспрессии по сравнению с *AtWOX5*, а его паралог, *ZmWOX5A*, имеет свой собственный специфический домен экспрессии. Во всех видах, в которых исследовали экспрессию *WOX5*, она была обнаружена в ПЦ (хотя бы у одного из паралога *WOX5*), тем не менее у отдельных видов экспрессия может иметь специфические особенности.

Сигнальные пути, регулирующие экспрессию *WOX5*

В регуляции активности гена *WOX5* выявлено участие сигнальных путей ауксина, цитокинина и сахаров. Сахара в растительном мире также играют роль сигнальных молекул и, как ауксин и цитокинин, контролируют значительное число процессов роста и развития (Lastdrager et al., 2014).

Наиболее сложной является тканеспецифичная и дозозависимая регуляция ауксином экспрессии гена *WOX5* (Gonzali et al., 2005; Ding, Friml, 2010). Распределение ауксина имеет максимум в ПЦ и инициалах колумеллы (Sabatini et al., 1999; Brunoud et al., 2012), в то время как РНК *WOX5* экспрессируется в ПЦ, но не обнаружена в инициалах колумеллы. При ауксиновом ответе происходит деградация белков семейства Aux/IAA (Auxin/Indole Acetic Acid), супрессоров ТФ ауксинового ответа (Auxin Response Factors, ARFs) (Sauer et al., 2013). В ПЦ ауксиновый ответ опосредуется Aux/IAA белком IAA17/AXR3 (Ding, Friml, 2010). Сверхэкспрессия IAA17/AXR3 ослабляет в ПЦ как сигнал ответа на ауксин, так и экспрессию *WOX5*, в то время как в *axr3* мутанте и экспрессия *WOX5*, и сигнал ауксинового ответа выходят за пределы ПЦ и регистрируются также в инициалах кортекса/эндодермиса (Tian et al., 2014b). ARF10 и ARF17 в норме подавляют экспрессию *WOX5* в колумелле, так как при подавлении функции обоих генов *WOX5* начинает там слабо экспрессироваться (при этом экспрессия *WOX5* в ПЦ происходит так же, как в диком типе) (Ding, Friml, 2010). Обработка растения экзогенным ауксином в течение 24 ч подавляет экспрессию *WOX5* в пределах его домена (ПЦ) до слабо детектируемой, но вызывает эктопическую экспрессию в инициалах эндодермиса/кортекса. При воздействии ауксином в течение трех суток экспрессия *WOX5* полностью исчезает. В то же время при подавлении функции ARF10 и ARF17, несмотря на такую же длительность обработки ауксином, в ПЦ сохраняется достаточно выраженная экспрессия *WOX5*. При длительности ответа *WOX5* на ауксин, занимающей сутки и более, можно предположить, что *WOX5*, скорее всего, не является прямой мишенью ауксинового ответа, а регулируется ауксином опосредованно.

С другой стороны, при мутации гена *LAX2*, кодирующего белок, импортирующий ауксин в клетку (Like Auxin Resistant 2), снижаются уровень ауксина в ПЦ и экспрессия гена *WOX5* (Zhang et al., 2013). Одним из возможных объяснений может быть существование определенного интервала концентраций ауксина в ПЦ, превышение или понижение которых ведет к снижению активности *WOX5*.

Такая сложная регуляция ауксином экспрессии *WOX5* может происходить из-за того, что белок *WOX5*, в свою очередь, активирует сигнальный путь ауксина, т. е. существует обратная связь (Tian et al., 2014b). *DR5rev::GFP* сигнал (сенсор ауксинового ответа), в норме имеющий максимум в ПЦ, очень слабо проявляется в ПЦ у *wox5* мутантов, подчеркивая важную роль *WOX5* в поддержании максимума ауксина в ПЦ. При исследовании растений, мутантных по *WOX5* или сверхэкспрессирующих этот ген, не было обнаружено изменений в экспрессии генов как деконъюгации ауксина, так и его полярного транспорта, в то время как уровень свободного ауксина и *DR5::GUS* сигнал были повышены по сравнению с нормой в *35S::WOX5-GR* растениях и уменьшены в *wox5* мутантах. Так как влияния *WOX5* на деконъюгацию ауксина отмечено не было, то было высказано предположение о том, что изменения в уровне ауксина при сверхэкспрессии *WOX5* можно объяснить тем, что *WOX5* влияет на синтез ауксина. В растениях со сверхэкспрессией *WOX5* было обнаружено значительное увеличение экспрессии гена *YUC1*, кодирующего один из двух ферментов основного пути биосинтеза ауксина из триптофана (*YUCCA 1*), в то время как ген *TAA1/WEI8*, кодирующий другой фермент этого пути (Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis 1), не показал отличий от дикого типа. В то же время уровень транскрипции *TAA1/WEI8* уменьшался в два раза при сверхэкспрессии *IAA17/AXR3* и, наоборот, увеличивался в четыре раза в *axr3* мутантах (Tian et al., 2014b). Результаты компьютерного моделирования показали, что наличие регуляторного контура, связывающего положительную регуляцию синтеза ауксина, осуществляемую *WOX5*, с его активацией в ответ на ауксин и ингибированием ответа на ауксин с помощью *IAA17/AXR3*, необходимо и достаточно для поддержания максимума ауксина в кончике корня и ниши дистальных стволовых клеток. При самых первых этапах закладки боковых корней повышенный уровень ауксина в клетке-основателе предeterminирует ПЦ через активацию экспрессии *WOX5* (Ditengou et al., 2008).

В корне цитокинин подавляет экспрессию *WOX5* наряду с экспрессией гена *SCR* (кодирующего ТФ семейства GRAS) и генов-транспортеров *AUX1* (*Auxin Resistant 1*) и *LAX2*, привносящих ауксин в клетку (Zhang et al., 2013). Значительное падение уровня *WOX5* транскрипта наблюдается примерно через 8 ч после обработки. Падение экспрессии *LAX2* наблюдалось гораздо раньше. Следовательно, регуляция экспрессии *WOX5* цитокинином может осуществляться через изменение под влиянием цитокинина потоков ауксина в корне, так как фенотип *lax2* мутанта копирует фенотип растения при обработке цитокинином: в нем снижены экспрессия *WOX5* и ответ на ауксин и увеличено число делений клеток ПЦ. Кроме

того, известно, что *SCR* активирует *WOX5* (Sarkar et al., 2007), и регуляция цитокинином *WOX5* может быть также опосредована через *SCR*.

У зародышей арабидопсиса при потере функции двух ингибиторов сигнального пути цитокинина, *ARR7* или *ARR15*, наблюдались эктопическое усиление цитокининового сигнала в клетках базальной части зародыша и существенное уменьшение экспрессии *WOX5* и других генов НСК корня (Muller, Sheen, 2008). При одиночных мутациях подобных аномалий не наблюдалось, что может говорить о взаимной способности *ARR7* или *ARR15* компенсировать недостаток активности другого гена.

Индукция экспрессии *WOX5* осуществляется также туранозой – природным дисахаридом, неметаболизируемым изомером сахарозы (Gonzali, 2005) и, скорее всего, как и индукция цитокинином, опосредована ауксином.

В регуляции экспрессии *WOX5* играют роль сигнальные пути ауксина, цитокинина и других соединений, но основной компонентой этих сигнальных путей, судя по всему, является регуляторный контур ауксин–*WOX5* с дозозависимым и тканеспецифичным контролем ауксином экспрессии *WOX5* и обратной связью, основанной на активации *WOX5* синтеза ауксина.

Регуляция транскрипции гена *WOX5*

Регуляция экспрессии *WOX5* обеспечивается на эпигенетическом, транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях (табл. 1). При этом она может осуществляться как напрямую, при непосредственном контакте регуляторного фактора с промотором, транскриптом или белком *WOX5*, так и через посредников. Однако в большинстве случаев еще не установлено, к какому типу регуляции активности гена *WOX5* (прямого или непрямого) относится воздействие фактора. Для удобства изложения мы разделили эту главу по типам функций факторов, задействованных в регуляции *WOX5*.

Эпигенетические факторы, влияющие на экспрессию *WOX5*

В настоящее время среди всех аспектов регуляции *WOX5* наибольшее число данных имеется относительно регуляции экспрессии *WOX5* эпигенетическими факторами. В ядре эукариот геномная ДНК в комплексе с гистонами образует ДНК-белковый комплекс (хроматин), структура которого в промоторе гена определяет его доступность для ТФ (Clapier, Cairns, 2009). Наряду с метилированием и деметилированием ДНК, модификации гистонов (метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и обратные им процессы) являются событиями эпигенетической регуляции. Основная единица хроматина, нуклеосома, состоит из 146-нуклеотидной ДНК, обернутой вокруг октомера из четырех гистонов (H2A, H2B, H3 и H4), каждый из которых представлен в двух экземплярах. Модификация гистонов достаточно часто осуществляется по лизину (K), например, в гистоне H3 лизины 4, 9, 27 и 36 (H3K4, H3K9, H3K27 и H3K36) могут быть моно- (me), ди- (me₂) и триметилированы (me₃) (Sharma et al., 2015). H3K4 и H3K36 метилированы в промоторах активных генов, в то время как метилирование H3K9 и H3K27 ха-

Table 1. Factors affecting *WOX5* gene expression

Factor	Action on <i>WOX5</i>	Experiments in which the action was revealed
Epigenetic factors involved in transcriptional regulation		
ATX1/SDG27	Suppresses (activates the repressor) <i>WOX5</i> expression in vascular initials	In <i>atx1</i> mutants, <i>WOX5</i> is expressed not only in the quiescent center, but also in vascular initials (Napsucially-Mendivil et al., 2014)
CLF	Suppresses <i>WOX5</i> expression in the quiescent center	In <i>clf</i> mutants, <i>WOX5</i> expression in the quiescent center is elevated (Aichinger et al., 2012)
ELP2	Activates <i>WOX5</i> expression	In <i>elp2</i> mutants, <i>WOX5</i> expression is repressed (Jia et al., 2015)
PKL	Activates <i>WOX5</i> expression	In <i>pk1</i> mutants, <i>WOX5</i> expression is reduced by about 25 % (Aichinger et al., 2012)
ROW1	Suppresses <i>WOX5</i> in proximal meristem cells	In <i>row1-3</i> mutants, <i>WOX5</i> expression extends upward from the quiescent center to the proximal meristem (Zhang et al., 2015)
MINU1 and MINU2	Exert complex regulation of <i>WOX5</i> expression	In <i>minu1 minu2</i> mutants, the <i>WOX5</i> expression level increases. The bulk of <i>WOX5</i> expression occurs in cells above the quiescent center but not in the quiescent center itself, where it is reduced (Sang et al., 2012)
Transcription factors		
PHB and PHV	Suppress <i>WOX5</i> expression	In <i>se</i> mutants, the expression level of <i>mir165/166</i> is not sufficient to remove the <i>PHB</i> and <i>PHV</i> transcripts from the basal part of the embryo (Grigg et al., 2009). As a result, <i>WOX5</i> expression is absent from this region
SHR and SCR	Activate <i>WOX5</i> expression	In <i>shr</i> and <i>scr</i> mutants, <i>WOX5</i> expression is absent or not detected (Sarkar et al., 2007)
Post-transcription and post-translation regulation		
PRL1	Suppresses <i>WOX5</i> expression in the meristematic zone	In <i>prl1-9</i> mutants, the <i>WOX5</i> expression domain is slightly extended and <i>WOX5</i> expression level increased (Ji et al., 2015)
POL/PLL1	Is required for <i>WOX5</i> expression	In <i>pol pll1</i> double mutants, <i>WOX5</i> is not expressed (Song et al., 2008)
ACR4	Suppresses <i>WOX5</i> protein expression	When the CLE40 peptide (binding to ACR4 as a ligand) is added to the medium, columella stem cells differentiate (Stahl, Simon, 2009). This suggests the restriction of the <i>WOX5</i> protein function by the CLE40/ACR4 receptor module

рактенно для репрессированных генов. Метилирование осуществляют лизин-метилтрансферазы, деметилирование – гистон-деметилазы.

ATX1/SDG27 (Set Domain Protein 27) кодирует H3K4 гистон-метилтрансферазу, активирующую экспрессию генов и в корне во многом определяющую его архитектуру (Napsucially-Mendivil et al., 2014). В 62 % *atx1* мутантов *WOX5* помимо ПЦ экспрессируется также в инициалах сосудистой системы над ПЦ. В боковых корнях первого порядка домен экспрессии поднимается еще выше (к дочерним клеткам инициалей сосудистой системы) и наблюдается чаще (в 82 % боковых корней). ATX1/SDG27 является одним из генов, подавляющих экспрессию *WOX5* вне его домена в ПЦ.

CLF белок группы Polycomb участвует в триметилировании гистона H3 по лизину 27 (H3K27me3) и подавляет активность меристемы (Aichinger et al., 2012). У *clf* мутантов увеличена длина корня и экспрессия *WOX5* в ПЦ. У двойных мутантов *clf wox5* длина корня возвращается к норме, что свидетельствует о том, что подавление активности меристемы белком CLF опосредовано частичным регулированием экспрессии *WOX5*.

В то же время экспрессия *WOX5* примерно на 25 % уменьшается в мутанте по гену другого хроматин-ре моделирующего фактора, PKL (PICKLE), и это сопровождается увеличением уровня H3K27me3 (Aichinger et al., 2012).

Белок Elongator Protein 2 (ELP2), являющийся субъединицей эволюционно консервативного гистон-ацетилтрансферазного комплекса, оказывает активирующее действие на экспрессию не только *WOX5*, но и других генов, ответственных за поддержание ПЦ и HCK, таких как *SHR* и *SCR*, и генов семейства транскрипционных факторов *PLETHORA* (Jia et al., 2015). Это было показано на основании подавления экспрессии генов *WOX5*, *SHR*, *SCR*, *PLT1*, *PLT2* в мутантах *elp2*. Наряду с этим в *elp2* мутантах наблюдаются увеличение числа делений в ПЦ и дифференцировка инициалей колумеллы.

Другой белок, Repressor Of Wuschel 1 (ROW1), также обладающий гистон-ацетилтрансферазной активностью, в отличие от белка ELP2, является супрессором *WOX5* (Zhang et al., 2015). ROW1 регулирует экспрессию гена *WOX5*, связываясь с H3K4me3 гистонами в проксимальном участке промотора. Домен экспрессии ROW1 включает

всю проксимальную меристему над ПЦ. При этом в трансгенной линии растений *WOX5::mCherry-ROW1*, в которой *ROW1* экспрессируется в ПЦ (домене экспрессии *WOX5*), экспрессия *WOX5* полностью подавляется. В *row1* мутантах экспрессия *WOX5* распространяется вверх от ПЦ в проксимальную меристему.

Неканонические хроматин-ремодулирующие SWI/SNF АТФазы MINUSCULE, MINU1 и MINU2 принимают участие в контроле развития апикальной меристемы побега и корня (Sang et al., 2012). Среди двойных мутантов *minu1 minu2* высок процент эмбриональных леталей. Выжившие зародыши дают проростки с аномалиями в развитии апикальных меристем. Экспрессия *WOX5* в корне шестидневного проростка *minu1 minu2* мутанта в 15 раз выше нормы. Домен экспрессии сдвинут вверх и латерально, основная экспрессия *WOX5* реализуется в клетках, расположенных на месте инициалей стебля, в то время как в ПЦ экспрессия очень слабая. Для MINU2 белка показано прямое связывание с промотором гена *WOX5* методом иммунопреципитации хроматина.

Транскрипционные факторы, влияющие на экспрессию *WOX5*

В настоящее время выявлено несколько транскрипционных факторов, участвующих в формировании экспрессии гена *WOX5*. О транскрипционных факторах ауксинового ответа ARF10 и ARF17, подавляющих экспрессию *WOX5* (Ding, Friml, 2010), было сказано выше. Также репрессорами по отношению к *WOX5* являются два ТФ, PHABULOSA (PHB) и PHAVOLUTA (PHV), относящиеся к HD-ZIP III классу ТФ (Grigg et al., 2009). Экспрессия этих генов у арабидопсиса регулируется группой миРНК *mir165/166* (Muller et al., 2016). Во время развития меристемы корня миРНК группы *mir165/166* способствуют прекращению экспрессии генов *HD-ZIP III* семейства в базальной части зародыша (Grigg et al., 2009; Smith, Long, 2010). *SERRATE (SE)*, ген, кодирующий белок, имеющий домен «цинковый палец» (тип структуры белка, стабилизированный одним или двумя ионами цинка), участвует в биогенезе миРНК (Iwata et al., 2013). В *se* мутантах уровень миРНК значительно снижен, PHB и PHV остаются в базальной части зародыша, меристема корня не развивается и отсутствует экспрессия генов *WOX5* и *SCR* (Grigg et al., 2009). В тройном мутанте *se-5 phb-13 phv-11* экспрессия *WOX5* и *SCR* присутствовала, меристема корня и сам корень развивались нормально.

Транскрипция *mir165A mir165B* напрямую регулируется ТФ семейства GRAS – SCR и SHR (Carlsbecker et al., 2010). SHR и SCR являются активаторами *WOX5*, поскольку известно, что экспрессия *WOX5* уменьшена или отсутствует в одиночных мутантах по этим генам (Sarkar et al., 2007). SHR и SCR ингибируют PHB опосредованно через miRNA165/6, следовательно, активация *WOX5* этими двумя факторами может заключаться в подавлении его ингибитора PHB (Carlsbecker et al., 2010).

Все перечисленные выше ТФ, вероятно, действуют на экспрессию *WOX5* опосредованно, поэтому поиск их мишеней – прямых регуляторов транскрипции *WOX5* – в настоящее время является одной из актуальных задач в области генных сетей НСК корня.

Посттранскрипционные и посттрансляционные факторы, влияющие на экспрессию *WOX5*

К посттранскрипционной регуляции относят модификации транскрипта, затрагивающие процессы его созревания (сплайсинг и процессинг) или стабильность мРНК, в том числе и регуляцию с помощью микроРНК, а также посттрансляционную регуляцию активности и стабильности белков.

WD40-белок PRL1, который является субъединицей ядерного сплайсосом-активирующего комплекса (Nineteen Complex, NTC), оказывает подавляющее действие на экспрессию *WOX5*, но активирующее действие на экспрессию генов *PLT1* и *PLT2* (Ji et al., 2015). В шестидневных проростках *prl1-9* мутантов уровень *WOX5* транскрипта в пять раз выше, чем в диком типе. Кроме того в *prl1-9* мутантах домен экспрессии *WOX5* расширен латерально и вверх примерно на один слой клеток.

Фосфатазы типа 2С (PP2C, protein phosphatase type 2C) POLTERGEIST (POL) and POLTERGEIST-LIKE1 (PLL1) необходимы для формирования и поддержания НСК как корня, так и побега (Song et al., 2008). Зародыши *pll1 pol* мутантов являются эмбриональными летальными, в них не формируются меристемы побега и корня и отсутствует экспрессия *WOX5* в линзообразной апикальной клетке гипофизы. Экспрессия *WOX5* с конститутивного промотора восстанавливала формирование дистальных ствольных клеток и частично проксимальных ствольных клеток в этих зародышах. Ввиду того, что в *pll1 pol* мутантах с первых делений зародыша нарушена также экспрессия гена *PIN1* транспортера ауксина, то можно так же, как и в нескольких случаях, описанных выше, предполагать, что изменения в экспрессии *WOX5* вызваны нарушениями в распределении ауксина. Кроме того, экспрессия *PIN1* активируется транскрипционным фактором ауксинового ответа ARF5/MONOPTEROS (MP) (Wenzel et al., 2007), экспрессия которого, в свою очередь, может регулироваться POL и PLL1 фосфатазами (Gagne et al., 2008). Возможно, что POL и PLL1 фосфатазы играют двойную роль: поддерживают экспрессию *WOX5* и участвуют в формировании распределения ауксина.

Рецептор-киназы семейства CRINKLY4 (CR4), включая ACR4 (CR4 арабидопсиса), имеют сигнальный пептид, внеклеточный домен, трансмембранную спираль и цитоплазматический серин-треонин киназный домен (Cao et al., 2005). ACR4 вместе с другой рецептор-киназой CLAVATA1 формируют гомо- и гетеродимеры, которые в ответ на сигнальный пептид CLE40 контролируют поддержание меристемы корня и экспрессию *WOX5*, выступая как регуляторный контур CLE40-ACR4-CLV1-WOX5 (Stahl, Simon, 2009; Stahl et al., 2013). *ACR4* экспрессируется в первых трех слоях колумеллы (Stahl, Simon, 2009), куда мигрирует *WOX5* белок (Sarkar et al., 2007). ACR4 фосфорилирует белок *WOX5*, связываясь с последовательностью GSAGAALG(pS)FSVK, расположенной на N-конце пептида (Meyer et al., 2015). Предполагается, что фосфорилирование ограничивает мобильность *WOX5* белка (Stahl, Simon, 2009). Внеклеточный пептид CLE40, который отвечает за дифференцировку клеток колумеллы, негативно влияет на экспрессию *WOX5*, активируя его взаимодействие с ACR4.

Поиск регуляторных элементов в промоторах генов *WOX5*

Экспериментально подтвержденных данных о прямых регуляторах транскрипционной активности гена *WOX5* в настоящее время чрезвычайно мало. Прямое взаимодействие с хроматином в районе промотора *WOX5* показано для эпигенетических регуляторов *WOX5*: гистон-ацетилтрансферазы ROW1, которая специфически связывается с метилированным гистонем H3K4me3, и хроматин-ремоделлирующей АТФазы MINU2 (Sang et al., 2012; Zhang et al., 2015). Какие-либо данные о взаимодействии ТФ с ДНК промотора *WOX5* отсутствуют.

С использованием доступных онлайн-программных пакетов нами был проведен *in silico* анализ 5'-регуляторной области (-1000; +100) гена *WOX5* из 30 видов растений (Доп. материалы 5) с целью предсказания потенциальных *cis*-регуляторных элементов и, соответственно, возможных прямых регуляторов экспрессии *WOX5*. С помощью программы MatInspector (<http://www.genomatix.de/>) в этих регуляторных районах было найдено более 40 семейств транскрипционных факторов, имеющих предполагаемые сайты связывания. Потенциальные сайты связывания только четырех из этих семейств ТФ были распознаны во всех промоторах 30 видов: АНБР, MADS, MYB и DOF (табл. 2).

Для каждого из распознанных семейств ТФ предсказанные сайты связывания попали в два консервативных участка, выявленных в результате попарного выравнивания 5'-регуляторных последовательностей гена *WOX5* *A. thaliana* (*AtWOX5*) с геномными последовательностями других видов крестоцветных (*Arabidopsis lyrata*, *A. halleri*, *Brassica rapa*, *B. rapa* FPCs, *Capsella rubella*, *C. grandiflora*, *Boechera stricta*, *Thellungiella halophila*) в программе Vista (<http://pipeline.lbl.gov/>) (рис. 2). Представителей семейств транскрипционных факторов АНБР, MADS, DOF и MYB (подсемейства MYBL и MYBS) можно рассматривать как основных кандидатов, способных осуществлять прямую регуляцию экспрессии *WOX5*.

Интересным результатом оказалось наличие среди предсказанных сайтов связывания последовательностей, с которыми связывается белок WUS. Учитывая взаимозаменяемость белков WUS и WOX5, а также то, что *in vitro* ТФ WOX5 риса взаимодействует с сайтами связывания WUS (Kamiya et al., 2003), можно предположить, что WOX5 способен осуществлять регуляцию экспрессии своего же гена.

Такие ТФ, как АТНВ1, АТНВ5, АТНВ8, REV, FLC, SOC1, WER, PHR1, DOF1 и DOF2, экспрессируются в корне (см. табл. 2). Кроме того, ТФ АТНВ8 и REV являются гомологами РНВ и РНУ, которые подавляют экспрессию *WOX5* (Grigg et al., 2009).

ТФ семейства MADS наиболее широко описаны как регуляторы цветения у растений (Ng, Yanofsky, 2001), однако они контролируют и другие программы развития, в частности формирование корней (Liu et al., 2015; Yu et al., 2015). Представители семейства MYB известны как регуляторы клеточного цикла. Для некоторых из них показано участие в подавлении клеточных делений в ПЦ (Vilarrasa-Blasi et al., 2014).

Таким образом, экспрессия в корне ТФ АТНВ1, АТНВ5, АТНВ8, REV, FLC, SOC1, WER, PHR1, DOF1 и DOF2,

наряду с наличием их потенциальных сайтов связывания в промоторах всех исследованных *WOX5* генов, и консервативность районов локализации этих сайтов у крестоцветных указывают на возможное участие перечисленных факторов в прямой регуляции экспрессии гена *WOX5*, что позволяет рекомендовать их для экспериментальной проверки.

Гены-мишени транскрипционного фактора *WOX5*

Функция WOX5 как регулятора транскрипции постулируется преимущественно на основании его первичной структуры. Помимо гомеодомена – характерной черты целого ряда ТФ – WOX5 содержит ранее охарактеризованные у других белков домены-репрессоры WUS-бокс и EAR мотив (Haecker et al., 2004; Gao et al., 2014), для каждого из которых способность подавлять транскрипцию генов была показана экспериментально (Hiratsu et al., 2003; Ikeda et al., 2009). Между гомеодоменом и WUS-боксом располагается небольшой участок, состоящий из кислых аминокислот, – потенциальный активатор транскрипции (Ikeda et al., 2009; van der Graaff et al., 2009). В то же время имеются некоторые экспериментальные данные, описывающие участие WOX5 в регуляции транскрипции генов и специфическую роль его функциональных доменов в этом процессе.

В частности, недавно было показано, что белок WOX5 в составе комплекса с корепрессорами TOPLESS/TOPLESS-RELATED (TPL/TPR) и гистон-деацетилазой HDA19 подавляет экспрессию гена *CDF4* в клетках ПЦ и инициалах колумеллы у *A. thaliana* путем деацетилирования гистонов в проксимальном районе промотора *CDF4* (Pi et al., 2015). Ген *CDF4* кодирует ТФ, который способствует дифференцировке клеток колумеллы, и уровень его возрастает по градиенту: от отсутствия экспрессии в покоящемся центре и низкого уровня экспрессии в ствольных клетках колумеллы до высокого уровня экспрессии в дифференцированных клетках колумеллы. Ключевую роль для реализации WOX5-опосредованного подавления экспрессии *CDF4* играет домен WUS-бокс, тогда как EAR мотив значительного влияния на репрессию не оказывает. Связывание WOX5 с промотором *CDF4* происходит по последовательности, в центре которой находится АТТА. Эта последовательность комплементарна коровой последовательности сайта связывания *AtWUS* ТААТ (Lohmann et al., 2001; Yadav et al., 2011). Возможно, что ТФ WUS и WOX5 имеют одну и ту же коровую последовательность в своих сайтах связывания ТААТ/АТТА. По крайней мере, было показано, что WOX5 риса (*OsWOX5*) специфически взаимодействует *in vitro* с сайтом связывания ТФ *AtWUS* (ТААТGG) в промоторе гена арабидопсиса *AGAMOUS* (Kamiya et al., 2003).

WOX5 подавляет экспрессию гена *CYCD3;3*, который контролирует G1-S переход в клеточном цикле, что обеспечивает низкую митотическую активность клеток ПЦ (Forzani et al., 2014). Взаимодействие белка WOX5 с промотором гена *CYCD3;3* было показано с использованием методов иммунопреципитации хроматина и количественной ПЦР (ChIP/qPCR).

Помимо охарактеризованных выше прямых мишеней WOX5, на основании молекулярно-генетических исследова-

Table 2. Transcription factors whose binding sites were identified in the 5'-regulatory region (-1000; +100 bp relative to the transcription start site) of the *WOX5* gene by MatInspector software (<http://www.genomatix.de/>)

Transcription factor family and names	Factors expressed in root and/or hypocotyl cells*
ATHB: ATHB1, 5, 8 (<i>Arabidopsis thaliana</i> Homeobox 1, 5, 8), REV (REVOLUTA), BLR (BELLRINGER), WUS (WUSCHEL)	ATHB1 : in the vasculature, hypocotyl, and root tip (Capella et al., 2015). ATHB5 : in the hypocotyl (most intensely at the shoot/root junction), in the root: in vascular cells in the differentiation zone, and, weakly, in epidermis (Johannesson et al., 2003). ATHB8 : in the root meristematic and elongation zones and also in the procambium and columella (Baima et al., 1995). REV : in the xylem and cambium and also in lateral root primordia (Hawker, Bowman, 2004)
MADS: FLC (Flowering Locus C), SOC1 (Suppressor of Overexpression of Constans 1), AG (AGAMOUS), AP1 (APETALA1), AP3 (APETALA3)	FLC : in the root tip (Michaels, Amasino, 2000). SOC1 : in the root meristem (Lee, Lee, 2010)
MYB: WER (WEREWOLF), PHR1 (Phosphate Starvation Response 1)	WER : in developing non-hair root cells and in nonstomatal cells of the hypocotyl (Lee, Schiefelbein, 1999). PHR1 : in roots (Rubio et al., 2001)
DOF: DOF1, DOF2 (DNA binding with one zinc finger 1, 2)	DOF1 and DOF2 : in root and hypocotyl vascular cells (Ward et al., 2005; Skirycz et al., 2006)

*Factors expressed in the root are shown in bold.

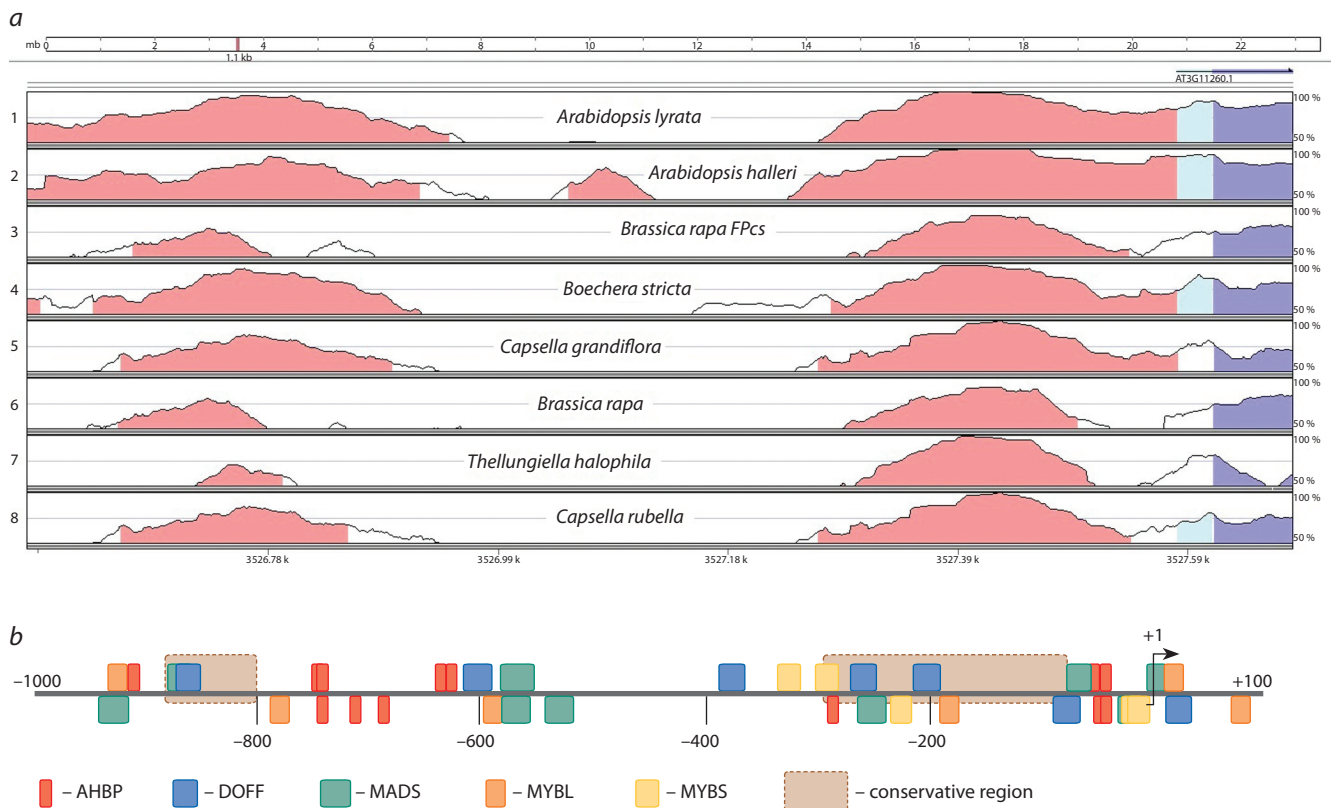


Fig. 2. Analysis of *WOX5* promoter regions in Brassicaceae species.

(a) Pairwise nucleotide sequence alignments of the *AtWOX5* 5'-regulatory region (-1000 to +100 bp, relative to the transcription start) with the *WOX5* promoter sequences of other Brassicaceae species by the Vista program (<http://pipeline.lbl.gov/>). Exons are shown in purple; untranslated regions, in blue; and promoter sequences, in red. Two conserved regions in the promoter region of *AtWOX5* were identified: from -70 to -300 and from -800 to -870 bp (relative to the transcription start). (b) Analysis of the 5'-regulatory region (-1000; +100) of *AtWox5* with the Genomatix MatInspector program (<http://www.genomatix.de/>), allowing *in silico* search for binding sites for TFs using the database of *cis*-regulatory elements. In total, we found more than 40 TF families that possessed putative binding sites in sequences under study. The TF families shown in the figure are selected as present in the *WOX5* promoters of all the 30 plant species examined. The binding sites of all four families are located in conservative areas identified by pairwise alignment of the *AtWOX5* promoter sequence with the promoter sequences of *WOX5* genes belonging to other Brassicaceae species.

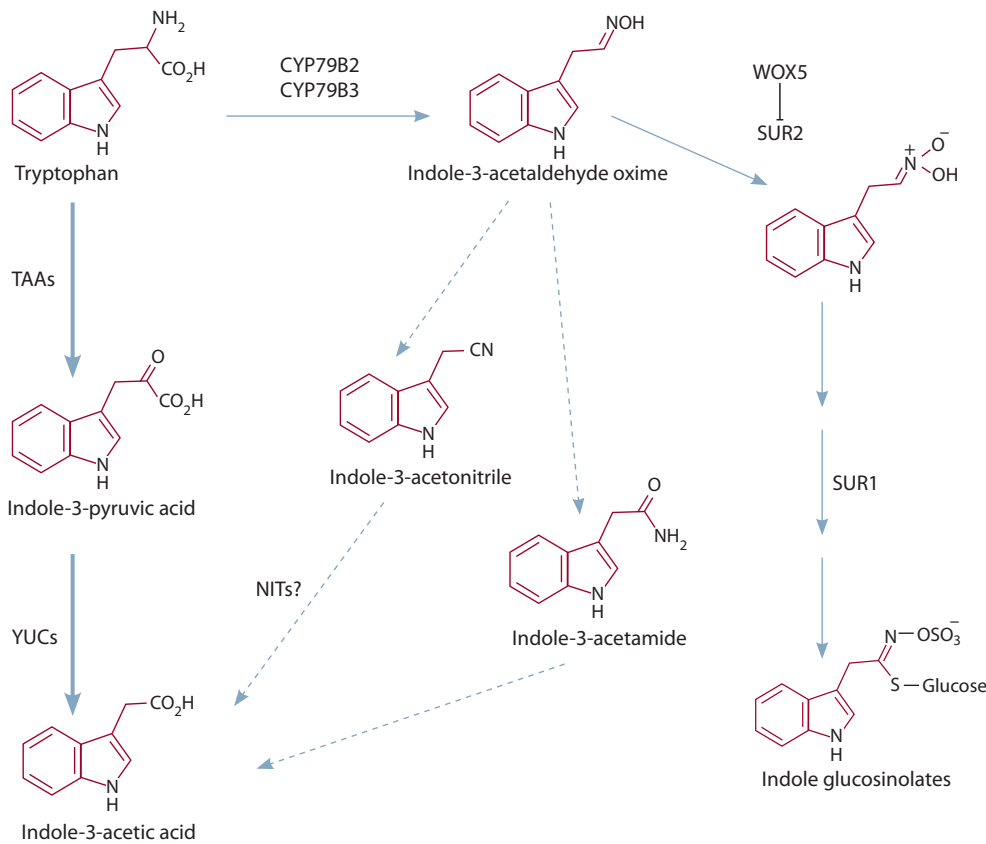


Fig. 3. Auxin (indole-3-acetic acid) and indole glucosinolate synthesis.

Thick gray arrows show the main auxin biosynthesis pathway from tryptophan mediated by TAA (tryptophan aminotransferase of arabidopsis) and YUCCA (YUC, flavin monooxygenase) enzymes. Thin gray arrows show the pathway of indole glucosinolate synthesis from tryptophan involving CYP79B2, cytochrome P450 monooxygenases CYP79B3 and SUR2/CYP83B1, and SUR1 (C-S lyase). Dashed gray arrows indicate the putative alternative pathway for auxin synthesis from indole-3-acetaldoxime, the indole glucosinolate precursor.

дований описано влияние этого ТФ на активность целого ряда ключевых факторов поддержания НСК, хотя прямое взаимодействие *WOX5* с регуляторными районами соответствующих генов экспериментально исследовано не было. С помощью Т-ДНК инсерции был получен *tin* (turanose-insensitive) мутант по гену *WOX5* (Gonzali et al., 2005). Кодированная часть гена *WOX5* (*AT3G11260*) состоит из двух экзонов и интрона. Инсерция Т-ДНК произошла в конце второго экзона. Наряду с этим по месту инсерции выявлена транслокация гена *AT1G48610*, кодирующего неизвестный белок. В результате с промотора *WOX5* гена считывается химерный транскрипт, чья мРНК после сплайсинга состоит из 5'-нетранслируемой области гена *WOX5* и его белок-кодирующей последовательности без 68 последних нуклеотидов до стоп-кодона, за которой следует мРНК *AT1G48610* начиная с шести нуклеотидов конца 3'-нетранслируемой области этого гена. Ввиду того, что *tin* мутант восстанавливается до дикого типа сверхэкспрессией гена *WOX5*, он рассматривается как мутант по этому гену. В *tin* мутанте значительно повышен уровень мРНК гена *SUPERROOT2* (*SUR2*), по сравнению с диким типом. Из этого следует, что белок, считываемый с химерного транскрипта, не подавляет экспрессию гена

SUR2. В диком типе подавление экспрессии осуществляется белком *WOX5* напрямую или через посредников. Ген *SUR2* участвует в биосинтезе ауксина (Mikkelsen et al., 2004). На рис. 3 изображена схема основных путей синтеза ауксина из триптофана у растений. В настоящее время показано, что основным путем биосинтеза ауксина, т.е. индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), из триптофана является ТАА (триптофан аминотрансфераза арабидопсиса)/YUCCA (YUC, флавиносодержащая монооксигеназа) или IPA (индолил-3-пируват) путь (Mashiguchi et al., 2011; Won et al., 2011). Второй путь идет через конверсию триптофана в IAOx (индолил-3-ацетоальдоксим), осуществляемую двумя цитохром Р450 монооксигеназами, CYP79B2 и CYP79B3. У двойного мутанта по генам, кодирующим эти ферменты, уменьшен общий пул ИУК и фенотип соответствует растениям с частично сниженным содержанием ауксина (уменьшение длины растения, гипокотыля, черешков листьев и самих листьев) (Zhao et al., 2002). Индолил-3-ацетоальдоксим является предшественником как ИУК, так и индолил-глюкозинолатов, вторичных метаболитов, осуществляющих защитные функции у растений (Kasahara, 2016). Активация гена *SUR2* переключает IAOx-путь на синтез индолил-глюкозинолатов,

подавление гена *SUR2* – на дополнительный к основному IPA пути синтез ИУК. Таким образом, *WOX5* напрямую или через посредников осуществляет это переключение. Интересно отметить, что IAOx путь имеется только у некоторых видов растений. До настоящего времени гены *CYP79B2* и *CYP79B3* были найдены у крестоцветных, гороха и табака (Quittenden et al., 2009; Sugawara et al., 2009; Nonhebel et al., 2011).

WOX5 является также активатором гена *PLT1*, одного из основных регуляторов гомеостаза НСК в корне, необходимого (наряду с *PLT2*) для поддержания активности и правильной локализации ПЦ в кончике корня (Ding, Friml, 2010). Так, у мутантов *A. thaliana* с потерей функции *WOX5* происходит заметное подавление активности *PLT1*, а при индукции 35S:WOX5-GR уровень *PLT1* транскрипта значительно увеличивается. Ввиду того, что для этого увеличения требуется продолжительная индукция, можно полагать, что регуляция происходит не напрямую, а при участии дополнительных факторов.

Ген *SOMBRERO (SMB)*, содержащий NAC-домен, отвечает за выход дочерних клеток инициалей колумеллы из стадии деления и их дифференцировку (Willemsen et al., 2008; Bennett et al., 2010). В *wox5-1* мутанте экспрессия *SMB* перемещается на один слой вверх в инициали колумеллы (Bennett et al., 2014). Через 4 ч после индукции 35S:WOX5-GR экспрессия *SMB* в колумелле существенно уменьшается и исчезает после 24 ч индукции. Таким образом, *WOX5* подавляет экспрессию *SMB* не только в ПЦ, где он экспрессируется, но и в инициалах колумеллы за счет миграции *WOX5* белка.

Генетические исследования и анализ экспрессии свидетельствуют о наличии прямых мишеней *WOX5* и мишеней второго порядка как в генной сети регуляции дифференцировки клеток колумеллы, так и в генной сети поддержания пула стволовых клеток меристемы корня в целом. Для большинства этих мишеней точные детали осуществления этой регуляции пока неизвестны.

Заключение

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о ключевой роли гена *WOX5* как в дифференцировке клеток колумеллы, так и в поддержании пула стволовых клеток в АМ корня. Точные механизмы осуществления этих функций *WOX5* и регуляции активности самого гена в большинстве случаев неизвестны.

В данной работе наряду с обзором опубликованных данных мы провели филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков *WOX5* разных видов растений, который показал консервативность этих последовательностей, а также специфические особенности у некоторых видов, связанные как с эволюционным порядком, так и с определенными условиями обитания этих видов.

Среди ТФ, для которых удалось провести поиск сайтов связывания, выделены наиболее вероятные кандидаты в регуляторы *WOX5*, так как их сайты связывания присутствуют во всех исследованных промоторах 30 видов растений и располагаются в консервативных участках. Это белки пяти семейств ТФ: АНБР, MADS, MYBL, MYBS,

DOFF. Среди найденных потенциальных регуляторных элементов есть сайты связывания, с которыми *WOX5* предположительно может связываться и осуществлять регуляцию экспрессии собственного гена.

Acknowledgments

The phylogenetic analysis of amino acid sequences of *WOX5* proteins from different species and search for conservative regions and binding sites for various TFs in *WOX5* promoters were supported by the Russian Science Foundation, project 14-14-00734. The integration and analysis of published data were supported by State Budgeted Project 0324-2015-0003.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aichinger E., Kornet N., Friedrich T., Laux T. Plant stem cell niches. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2012;63:615-636. DOI 10.1146/annurev-arplant-042811-105555.
- Atta R., Laurens L., Boucheron-Dubuisson E., Guivarc'h A., Carneiro E., Giraudat-Pautot V., Rech P., Chriqui D. Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *Plant J.* 2009;57:626-644. DOI 10.1111/j.1365-3113x.2008.03715.x.
- Baima S., Nobili F., Sessa G., Lucchetti S., Ruberti I., Morelli G. The expression of the Athb-8 homeobox gene is restricted to provascular cells in Arabidopsis thaliana. *Development.* 1995;121(12):4171-4182.
- Bennett T., van den Toorn A., Sanchez-Perez G.F., Campilho A., Willemsen V., Snel B., Scheres B. SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2010;22:640-654.
- Bennett T., van den Toorn A., Willemsen V., Scheres B. Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development.* 2014;141(21):4055-4064. DOI 10.1242/dev.110148.
- Boyer F., Simon R. Asymmetric cell divisions constructing Arabidopsis stem cell niches: the emerging role of protein phosphatases. *Plant Biol. (Stuttg.)* 2015;17(5):935-945. DOI 10.1111/plb.12352.
- Breuning 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.
- Brunoud G., Wells D.M., Oliva M., Larrieu A., Mirabet V., Burrow A.H., Beeckman T., Kepinski S., Traas J., Bennett M.J., Vernoux T. A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature.* 2012;482(7383):103-106.
- Cao X., Li K., Suh S.G., Guo T., Becraft P.W. Molecular analysis of the CRINKLY4 gene family in Arabidopsis thaliana. *Planta.* 2005;220(5):645-657.
- Capella M., Ribone P.A., Arce A.L., Chan R.L. Arabidopsis thaliana HomeoBox 1 (AtHB1), a Homeodomain-Leucine Zipper I (HD-Zip I) transcription factor, is regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to promote hypocotyl elongation. *New Phytol.* 2015;207(3):669-682.
- Carlsbecker A., Lee J.Y., Roberts C.J., Dettmer J., Lehesranta S., Zhou J., Lindgren O., Moreno-Risueno M.A., Vatén A., Thitamadee S., Campilho A., Sebastian J., Bowman J.L., Helariutta Y., Benfey P.N. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature.* 2010;465(7296):316-321.
- Chatfield S.P., Capron R., Severino A. Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a sys tems approach to probe early events in WUSCHEL dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *Plant J.* 2013;73:798-813.

- Che P., Lall S., Howell S.H. Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta*. 2007;226:1183-1194. DOI 10.1007/s00425-007-0565-4.
- Chen S.K., Kurdyukov S., Kereszt A., Wang X.D., Gresshoff P.M., Rose R.J. The association of homeobox gene expression with stem cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula*. *Planta*. 2009;230(4):827-840. DOI 10.1007/s00425-009-0988-1.
- Clapier C.R., Cairns B.R. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 2009;78:273-304.
- Clark N.M., de Luis Balaguer M.A., Sozzani R. Experimental data and computational modeling link auxin gradient and development in the *Arabidopsis* root. *Front. Plant. Sci.* 2014;5:328. DOI 10.3389/fpls.2014.00328.
- Della Rovere F., Fattorini L., D'Angeli S., Velocchia A., Falasca G., Altamura M.M. Auxin and cytokinin control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* 2013;112(7):1395-1407. DOI 10.1093/aob/mct215.
- Ding Z., Friml J. Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2010;107(26):12046-12051.
- Ditengou F.A., Teale W.D., Kochersperger P., Flittner K.A., Kneuper I., van der Graaff E., Nziengui H., Pinosa F., Li X., Nitschke R., Laux T., Palme K. Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008;2;105(48):18818-18823. DOI 10.1073/pnas.0807814105.
- Dorantes-Acosta A.E., Vielle-Calzada J.P. The male gametophytic mutant *teptizin1* indicates a requirement of the homeobox gene *WOX5* for pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Sex. Plant Reprod.* 2006;1;19(4):163-173.
- Duvall M.R., Learn G.H. Jr, Eguiarte L.E., Clegg M.T. Phylogenetic analysis of *rbcL* sequences identifies *Acorus calamus* as the primal extant monocotyledon. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993;15;90(10):4641-4644.
- Forzani C., Aichinger E., Sornay E., Willemsen V., Laux T., Dewitte W., Murray J.A. *WOX5* suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr. Biol.* 2014;24(16):1939-1944. DOI 10.1016/j.cub.2014.07.019.
- Gagne J.M., Song S.K., Clark S.E. *POLTERGEIST* and *PLL1* are required for stem cell function with potential roles in cell asymmetry and auxin signaling. *Commun. Integr. Biol.* 2008;1(1):53-55.
- Gao B., Wen C., Fan L., Kou Y., Ma N., Zhao L. A *Rosa canina* *WUSCHEL*-related homeobox gene, *RcWOX1*, is involved in auxin-induced rhizoid formation. *Plant Mol. Biol.* 2014;86(6):671-679. DOI 10.1007/s11103-014-0255-0.
- Gaut B.S., Doebley J.F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997;94(13):6809-6814.
- Gonzali S., Novi G., Loreti E., Paolicchi F., Poggi A., Alpi A., Perata P. A turanose-insensitive mutant suggests a role for *WOX5* in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2005;44(4):633-645.
- Grigg S.P., Galinha C., Kornet N., Canales C., Scheres B., Tsiantis M. Repression of apical homeobox genes is required for embryonic root development in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 2009;19(17):1485-1490.
- 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.
- Haider N. The origin of the B-genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetika.* 2013;49(3):303-314.
- Hawker N.P., Bowman J.L. Roles for class III HD-Zip and *KANADI* genes in *Arabidopsis* root development. *Plant Physiol.* 2004;135(4):2261-2270.
- He C., Chen X., Huang H., Xu L. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluri potency from cultured *Arabidopsis* tissues. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002911. DOI 10.1371/journal.pgen.1002911.
- 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.
- Hiratsu K., Matsui K., Koyama T., Ohme-Takagi M. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2003;34(5):733-739.
- Ikeda M., Mitsuda N., Ohme-Takagi M. *Arabidopsis* *WUSCHEL* is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning. *Plant Cell.* 2009;21(11):3493-3505. DOI 10.1105/tpc.109.069997.
- Imin N., Nizamidin M., Wu T., Rolfe B.G. Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 2007;58(3):439-451.
- Iwata Y., Takahashi M., Fedoroff N.V., Hamdan S.M. Dissecting the interactions of *SERRATE* with RNA and *DICER-LIKE 1* in *Arabidopsis* microRNA precursor processing. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(19):9129-9140. DOI 10.1093/nar/gkt667.
- Ji H., Wang S., Li K., Szakonyi D., Koncz C., Li X. *PRL1* modulates root stem cell niche activity and meristem size through *WOX5* and *PLTs* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2015;81(3):399-412.
- Jia Y., Tian H., Li H., Yu Q., Wang L., Friml J., Ding Z. The *Arabidopsis* thaliana elongator complex subunit 2 epigenetically affects root development. *J. Exp. Bot.* 2015. DOI 10.1093/jxb/erv230.
- Johannesson H., Wang Y., Hanson J., Engström P. The *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *ATHB5* is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Mol. Biol.* 2003;51(5):719-729.
- Joshi T., Valliyodan B., Wu J.H., Lee S.H., Xu D., Nguyen H.T. Genomic differences between cultivated soybean, *G. max* and its wild relative *G. soja*. *BMC Genomics.* 2013;14(1):S5. DOI 10.1186/1471-2164-14-S1-S5.
- Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A., Sato Y., Matsuoka M. Isolation and characterization of a rice *WUSCHEL*-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J.* 2003;35(4):429-441.
- Kasahara H. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Biosci. Biotech. Bioch.* 2016;80(1):34-42.
- Kita Y., Kato M. Seedling developmental anatomy of an undescribed Malacotristicha species (Podostemaceae, subfamily Tristichoidae) with implications for body plan evolution. *Plant Syst. Evol.* 2005;1;254(3-4):221-232.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. *MEGA7*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;22.
- Lastdrager J., Hanson J., Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 2014;65(3):799-807.
- Laux T., Mayer K.F., Berger J., Jürgens G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development.* 1996;122:87-96.
- Lee J., Lee I. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *J. Exp. Bot.* 2010;61(9):2247-2254.
- Lee M.M., Schiefelbein J. *WEREWOLF*, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell.* 1999;99(5):473-483.
- Lian G., Ding Z., Wang Q., Zhang D., Xu J. Origins and evolution of *WUSCHEL*-related homeobox protein family in plant kingdom. *Sci. World J.* 2014;2014:534140. DOI 10.1155/2014/534140.
- Liu W., Han X., Zhan G., Zhao Z., Feng Y., Wu C. A novel sucrose-regulatory MADS-box transcription factor *GmNMHC5* promotes root development and nodulation in Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(9):20657-20673. DOI 10.3390/ijms160920657.
- 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.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanadaa A., Yaeno T., Shirasua K., Yaod H., McSteed P., Zhaoe Y., Hayashif K., Kamiyaa Y., Kasahara H. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2011;108(45):18512-18517.

- Mayer K.F., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jürgens G., Laux T. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*. 1998;95(6):805-815.
- Meyer M.R., Shah S., Zhang J., Rohrs H., Rao A.G. Evidence for intermolecular interactions between the intracellular domains of the Arabidopsis receptor-like kinase ACR4, its homologs and the *WOX5* transcription factor. *PLoS ONE*. 2015;10(3). DOI 10.1371/journal.pone.0118861.
- Michaels S.D., Amasino R.M. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant Cell Environ*. 2000;23(11):1145-1153.
- Mikkelsen M.D., Naur P., Halkier B.A. Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J*. 2004;37(5):770-777.
- Muller B., Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*. 2008; 453(7198): 1094-1097. DOI 10.1038/nature06943.
- Muller C.J., Valdes A.E., Wang G., Ramachandran P., Beste L., Uddenberg D., Carlsbecker A. PHABULOSA mediates an auxin signaling loop to regulate vascular patterning in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2016;170(2):956-970. DOI 10.1104/pp.15.01204.
- Napsucially-Mendivil S., Alvarez-Venegas R., Shishkova S., Dubrovsky J.G. Arabidopsis homolog of trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J. Exp. Bot*. 2014. DOI 10.1093/jxb/eru355.
- Nardmann J., Reisewitz P., Werr W. Discrete shoot and root stem cell-promoting *WUS/WOX5* functions are an evolutionary innovation of angiosperms. *Mol. Biol. Evol*. 2009;26(8):1745-1755. DOI 10.1093/molbev/msp084.
- 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.
- Ng M., Yanofsky M.F. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat. Rev. Genet*. 2001;2(3):186-195.
- Nonhebel H., Yuan Y., Al-Amier H., Pieck M., Akor E., Ahamed A., Cohen J.D., Celenza J.L., Normanly J. Redirection of tryptophan metabolism in tobacco by ectopic expression of an Arabidopsis indolic glucosinolate biosynthetic gene. *Phytochemistry*. 2011;72(1):37-48.
- Olsen J.L., Rouzé P., Verhelst B., Lin Y.C., Bayer T., Collen J., Dattolo E., De Paoli E., Dittami S., Maumus F., Michel G., Kersting A., Lauritano C., Lohaus R., Töpel M., Tonon T., Vanneste K., Amirebrahimi M., Brakel J., Boström C., Chovatia M., Grimwood J., Jenkins J.W., Jueterbock A., Mraz A., Stam W.T., Tice H., Bornberg-Bauer E., Green P.J., Pearson G.A., Procaccini G., Duarte C.M., Schmutz J., Reusch T.B., Van de Peer Y. The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature*. 2016;18(530(7590)):331-335. DOI 10.1038/nature16548.
- Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Dolgikh E.A., Goormachtig S. *Wuschel*-related homeobox5 gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation. *Plant Physiol*. 2012;158(3):1329-1341. DOI 10.1104/pp.111.188078.
- Pi L., Aichinger E., van der Graaff E., Llavata-Peris C.I., Weijers D., Hennig L., Groot E. 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.
- Poplavskaia G.I. *Vodnye rasteniya* [Aquatic Plants]. Moscow, Sovetskaya entsiklopediya Publ., 1971;5.
- Qiu Y.L., Dombrowska O., Lee J., Li L., Whitlock B.A., Bernasconi-Quadroni F., Rest J.S., Davis C.C., Borsch T., Hilu K.W., Renner S.S. Phylogenetic analyses of basal angiosperms based on nine plastid, mitochondrial, and nuclear genes. *Int. J. Plant Sci*. 2005;166(5): 815-842.
- Quittenden L.J., Davies N.W., Smith J.A., Molesworth P.P., Tivendale N.D., Ross J.J. Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiol*. 2009;151(3):1130-1138.
- Rubio V., Linhares F., Solano R., Martín A.C., Iglesias J., Leyva A., Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev*. 2001;15(16):2122-2133.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfelt J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., Scheres B. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*. 1999;99(5):463-472.
- Sablowski R. Plant stem cell niches: from signalling to execution. *Curr. Opin. Plant. Biol*. 2011;14(1):4-9. DOI 10.1016/j.pbi.2010.08.001.
- Sang Y., Silva-Ortega C.O., Wu S., Yamaguchi N., Wu M.F., Pfluger J., Gillmor C.S., Gallagher K.L., Wagner D. Mutations in two non-canonical Arabidopsis SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases cause embryogenesis and stem cell maintenance defects. *Plant J*. 2012;72(6):1000-1014.
- 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;446:811-814. DOI 10.1038/nature05703.
- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot*. 2013;64(9):2565-2577.
- Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2007;8:345-354.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C., Weisbeek P. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*. 1994;120:2475-2478.
- Sharma S.K., Yamamoto M., Mukai Y. Immuno-cytogenetic manifestation of epigenetic chromatin modification marks in plants. *Planta*. 2015;241:291-301.
- Skirycz A., Reichelt M., Burow M., Birkemeyer C., Rolcik J., Kopka J., Zanor M.I., Gershenzon J., Strnad M., Szopa J., Mueller-Roeber B., Witt I. DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J*. 2006;47(1):10-24.
- Smith Z.R., Long J.A. Control of Arabidopsis apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature*. 2010; 464(7287):423-426.
- Song S.K., Hoffhuis H., Lee M.M., Clark S.E. Key divisions in the early Arabidopsis embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis. *Dev. Cell*. 2008;15(1):98-109.
- Soukup A., Seago J.L. Jr., Votrubová O. Developmental anatomy of the root cortex of the basal monocotyledon, *Acorus calamus* (Acorales, Acoraceae). *Ann. Bot*. 2005;96(3):379-385.
- Stahl Y., Grabowski S., Bleckmann A., Kühnemuth R., Weidtkamp-Peters S., Pinto K.G., Kirschner G.K., Schmid J.B., Wink R.H., Hülsewede A., Felekyan S., Seidel C.A., Simon R. Moderation of Arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr. Biol*. 2013;23(5):362-371.
- Stahl Y., Simon R. Is the Arabidopsis root niche protected by sequestration of the CLE40 signal by its putative receptor ACR4? *Plant Signal. Behav*. 2009;4(7):634-635.
- Sugawara S., Hishiyama S., Jikumaru Y., Hanada A., Nishimura T., Koshiba T., Zhao Y., Kamiya Y., Kasahara H. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2009;106(13):5430-5435.
- Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root developmental pathway. *Dev. Cell*. 2010;18:463-471.
- Tian H., Jia Y., Niu T., Yu Q., Ding Z. The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in Arabidopsis. *Plant Cell Rep*. 2014a;33(5):745-753.
- Tian H., Wabnik K., Niu T., Li H., Yu Q., Pollmann S., Vanneste S., Govaerts W., Rolcik J., Geisler M., Friml J., Ding Z. *WOX5*-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for

- the patterning of root stem cell niches in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*. 2014b;7(2):277-289.
- Van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P., Scheres B. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*. 1997;390(6657):287-289.
- Van der Graaff E., Laux T., Rensing S.A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol*. 2009;10:248. DOI 10.1186/gb-2009-10-12-248.
- Vilarrasa-Blasi J., González-García M.P., Frigola D., Fàbregas N., Alexiou K.G., López-Bigas N., Rivas S., Jauneau A., Lohmann J.U., Benfey P.N., Ibañez M., Caño-Delgado A.I. Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. *Dev. Cell*. 2014;30(1):36-47. DOI 10.1016/j.devcel.2014.05.020.
- Vinogradova A.P., Lebedeva M.A., Lutova L.A. Meristematic characteristics of tumors initiated by *Agrobacterium tumefaciens* in pea plants. *Russ. J. Genet*. 2015;51(1):46-54.
- Ward J.M., Cufu C.A., Denzel M.A., Neff M.M. The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2005;17(2):475-485.
- Wenzel C.L., Schuetz M., Yu Q., Mattsson J. Dynamics of MONOPTEROS and PIN-FORMED1 expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2007;49(3):387-398.
- Willemsen V., Bauch M., Bennett T., Campilho A., Wolkenfelt H., Xu J., Haseloff J., Scheres B. The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *Arabidopsis* root stem cells. *Dev. Cell*. 2008;15:913-922.
- Won C., Shen X., Mashiguchi K., Zheng Z., Dai X., Cheng Y., Kasahara H., Kamiya Y., Chory J., Zhao Y. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2011;108(45):18518-18523. DOI 10.1073/pnas.1108436108.
- 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.
- Yadav R.K., Tavakkoli M., Reddy G.V. WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. 2010;137(21):3581-3589. DOI 10.1242/dev.054973.
- Yu C., Liu Y., Zhang A., Su S., Yan A., Huang L., Ali I., Liu Y., Forde B.G., Gan Y. MADS-box transcription factor OsMADS25 regulates root development through affection of nitrate accumulation in rice. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0135196. DOI 10.1371/journal.pone.0135196.
- Zhang W., Swarup R., Bennett M., Schaller G.E., Kieber J.J. Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the *Arabidopsis* root apical meristem. *Curr. Biol*. 2013;23(20):1979-1989.
- Zhang Y., Jiao Y., Liu Z., Zhu Y.X. ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nat. Commun*. 2015. DOI 10.1038/ncomms7003.
- 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.
- Zhao Y., Hull A.K., Gupta N.R., Goss K.A., Alonso J., Ecker J.R., Normanly J., Chory J., Celenza J.L. Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Gene Dev*. 2002;16:3100-3112.