

УДК 577

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МЕРИСТЕМ-СПЕЦИФИЧНОГО ГЕНА *WOX5* ПРИ ОРГАНОГЕНЕЗЕ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ<sup>1</sup>

© 2011 г. М. А. Осипова\*, Е. А. Долгих, Л. А. Лутова\*

Всероссийский Научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,  
196608 Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3

\*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

E-mail: mary\_osipova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.10 г.

Окончательный вариант получен 17.06.10 г.

В последние годы активно исследуется роль генов *WOX*, кодирующих транскрипционные факторы с гомеодоменом, в развитии апикальных меристем побега и корня. Однако роль генов *WOX* в контроле пролиферации клеток в других типах меристем малоизучена. Наша работа посвящена изучению роли гена *WOX5* в развитии меристемы специализированных органов — азотфиксирующих клубеньков, формирующихся на корнях бобовых растений при симбиозе с бактериями ризобиями. Мы показали, что ген *WOX5* вовлечен в развитие меристемы клубенька бобовых растений, оценили количественно его экспрессию на различных этапах клубенькообразования, а также изучили локализацию его экспрессии с помощью конструкции, содержащей промотор *WOX5*, соединенный с репортерным геном. Обсуждается роль транскрипционного фактора *WOX5* в органогенезе клубеньков и его возможное взаимодействие с гормональной системой при развитии клубеньков.

**Ключевые слова:** развитие клубенька, бобово-ризобияльный симбиоз, меристемоспецифичные гены, *WOX*.

### ВВЕДЕНИЕ

При симбиозе бобовых растений с почвенными бактериями семейства *Rhizobiaceae* (так называемыми ризобиями) на корнях растений формируются новые органы — симбиотические клубеньки, в которых бактерии осуществляют процесс биологической фиксации молекулярного азота. Бобово-ризобияльный симбиоз представляет собой сложно регулируемый процесс, контролируемый генами обоих партнеров. Развитие симбиоза начинается с сигнальных взаимодействий между бактериями и растением-хозяином. В ответ на выделяемые в ризосферу бобовыми растениями флавоноиды бактерии синтезируют липохитоолигосахаридные молекулы Nod-факторы. Nod-факторы связываются со специфичными рецепторами бобовых растений и активируют каскад событий, ведущих к развитию инфекции и формированию клубеньков (Ben Amor et al., 2003; Radu-

toiu et al., 2003; Limpens et al., 2003). При рецепции Nod-факторов, в клетках корневой эпидермы происходит деполяризация мембраны (Ehrhardt et al., 1992, 1996; Harris et al., 2003), возникают колебания концентрации кальция в перинуклеарном пространстве (Felle et al., 1999; Engstrom et al., 2002; Charron et al., 2004), изменения в структуре цитоскелета (Van Brussel et al., 1992; de Ruijter et al., 1999) и, как следствие, деформации клеток эпидермы (Lerouge et al., 1990), а также экспрессируются гены ранних нодулинов (*ENOD* гены, от англ. early nodulins) (Horvath et al., 1993; Albrecht et al., 1998). Вызываемые Nod-факторами ответные реакции в эпидерме корня четко скоординированы с процессами, происходящими в коре корня — реактивацией делений клеток коры корня и перицикла и формированием примордия/меристемы клубенька (Oldroyd, Downie, 2008). У группы бобовых растений (*Lotus japonicus*, *Glycine max*), которые формируют клубеньки детерминированного типа, реактивация делений происходит в клетках внешней коры, тогда как у растений (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*), формирующих клубеньки недетерминированного типа, напротив, делятся клетки внутренней коры. Так как Nod-факторы не проникают внутрь корня, а остаются связанными с клетками эпидермы, в контроль процессов реактивации делений клеток и закладки

<sup>1</sup> Работа была поддержана грантами РФФИ 10-08-01207а, РФФИ-НСИ 09-04-92865а, РФФИ 08-04-00537а, РФФИ 11-04-01689, грантом Президента для поддержки научных школ НШ-5399.2008.4, НШ 7623.2006.04; Государственным контрактом от Федерального агентства по науке и инновациям 02.740.11.0276, Государственным контрактом от Федерального агентства по образованию П1301, CRDF ST-012; CRDF-Минобразования RUXO-012-ST-06 (BP2M12), грантом РФФИ-NWO 047.018.001 и грантом Правительства Санкт-Петербурга 2.6/27-04/012.

примордия могут быть вовлечены эндогенные регуляторы самого растения (в частности, гормоны). Однако механизмы такой регуляции еще далеки от понимания. Как было показано, реактивацию клеточных делений в коре корня стимулирует цитокинин (Murray et al., 2007; Tirichine et al., 2007). У модельных бобовых *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus* были выявлены компоненты цитокининового сигнального пути, вовлеченные в развитие клубенька, а именно рецептор цитокинина MtCRE1/LjLHK1 и регуляторы цитокининового ответа RR B-типа и A-типа (MtRR1, MtRR4, соответственно). Показано, что Nod-факторы стимулируют накопление флавоноидов, ингибирующих полярный транспорт ауксина в месте инфекции (Hirsch et al., 1989; Mathesius et al., 1998; Grunewald et al., 2009). Это приводит к локальному изменению соотношения концентрации ауксина и цитокинина в тканях корня и, вероятно, активации цитокининового ответа. Таким образом, Nod-факторы запускают реакции в эпидерме корня, приводящие к развитию инфекции, и в то же время, манипулируя гормональной системой растений, стимулируют действие эндогенных регуляторов пролиферации клеток растений цитокининов, индуцирующих развитие примордия клубенька.

Наряду с механизмами локального контроля, в процесс формирования клубеньков у бобовых растений также вовлечены и системные механизмы (так называемая, система авторегуляции клубенькообразования). Авторегуляция является механизмом, посредством которого растение ингибирует дальнейшее формирование клубеньков на корнях после того, как уже появились несколько первых клубеньков (Caetano-Anolles, Gresshoff, 1991). В авторегуляцию вовлечены рецептор-подобные киназы семейства CLAVATA, действующие в побегах, которые были идентифицированы у нескольких видов бобовых. Предполагается, что инокуляция растений ризобиями приводит к выработке сигнала (неизвестной природы), который поступает из корней в надземную часть, связывается там с системой белков CLAVATA, что в свою очередь, способствует активации другого сигнала, который поступает в корни и ингибирует дальнейшую закладку клубеньков (Okakura, Kawaguchi, 2006). Таким образом, формирование клубеньков у бобовых растений находится под контролем сложной системы регуляции, локальные и системные механизмы которой еще предстоит расшифровать.

В течение многих лет в литературе обсуждается вопрос об эволюционном происхождении клубеньков. Согласно наиболее распространенной гипотезе, клубеньки возникли в ходе эволюции на основе модификации программы развития боковых корней (Mathesius et al., 2000; Bright et al., 2005). Эту гипотезу подтверждает выявление мутаций, затрагивающих как развитие боковых корней, так и развитие клу-

беньков (Bright et al., 2005). Кроме того, известны аномалии развития клубеньков, при которых из меристемы сформировавшегося клубенька развивается эктопический корень. Интересно, что такая аномалия может быть обусловлена как мутацией растительного гена (*PsCoch*) (Ferguson et al., 2005), так и мутациями в генах бактерий (в частности, генов, контролирующих биосинтез пиримидинов и пуринов) (Ferraioli et al., 2004). Общая особенность развития бокового корня и клубенька состоит в том, что инициация клеточных делений при образовании примордиев клубеньков, также как и закладка примордиев боковых корней у бобовых растений происходит напротив пучков ксилемы. Кроме того, в системный контроль (авторегуляцию) развития клубеньков и боковых корней могут быть вовлечены общие компоненты: у мутантов, характеризующихся увеличением количества клубеньков (суперклубенькообразующие мутанты) также увеличено и число боковых корней, по сравнению с диким типом (Searle et al. 2003). Все эти данные в совокупности подтверждают существование общих регуляторных механизмов, лежащих в основе развития бокового корня и клубенька. Помимо того, что клубеньек, также как и боковой корень возникает *de novo* в результате реактивации клеточных делений в тканях корня, другой важной особенностью, сближающей развитие клубенька с боковым корнем, является наличие у него собственной меристемы. К настоящему времени, вопрос о том, каким образом регулируется развитие и функционирование меристемы клубенька, остается малоизученным. Незавершенным остается вопрос о существовании общих механизмов, регулирующих развитие меристемы клубенька и корня. Как показали исследования последних лет, важную роль в регуляции активности меристемы корня играет гомеобокс-содержащий ген *WOX5* (Haescker et al., 2004). У мутантов по гену *WOX5* корень укорочен, структура покоящегося центра меристемы нарушена (размер клеток покоящегося центра увеличен), а прилежащие клетки-инициали претерпевают дифференцировку (Sarkar et al., 2007). Ген *WOX5* экспрессируется в покоящемся центре (организаторе) меристемы корня и отвечает за поддержание клеточных делений и подавление дифференцировки прилежащих клеток-инициалей (стволовых клеток), однако конкретный механизм его действия остается неизученным. *WOX5* является представителем семейства гомеодомен-содержащих транскрипционных факторов *WOX*, играющих важную роль в развитии меристем растений (Haescker et al., 2004, обзор см. Лутова, Додуева, 2007). Наиболее изучена роль *WOX* в регуляции пролиферации клеток в апикальной меристеме побега. В меристеме побега (в организующем центре) экспрессируется представитель семейства *WOX* — ген *WUS*. Транскрипционный фактор *WUS* стимулирует деления

клеток, непосредственно взаимодействуя с компонентами цитокининового сигнального ответа, обеспечивая локальное усиление действия цитокинина, гормона, стимулирующего пролиферацию, в меристеме (Leibfried et al., 2005). С другой стороны, ген *WUS* взаимодействует с системой белков *CLAVATA*, включающей гетеродимерный рецепторный комплекс *CLV1/CLV2* и пептидный лиганд *CLV3* (*CLE*-пептид) и регулирует поддержание пула стволовых клеток в меристеме (Schoof et al., 2000). Как показали исследования на модельном объекте, арабидопсисе, продукты генов *WUS* и *WOX5* функционально эквивалентны (Sarkar et al., 2007): оба эти гена экспрессируются в “организующих центрах” меристем и обеспечивают поддержание пула стволовых клеток, стимулируя их пролиферацию и блокируя дифференцировку. На основании сходства выполняемых функций можно предположить схожий механизм действия регуляторов *WUS* и *WOX5*. Последние данные свидетельствуют о том, что *WOX5* может взаимодействовать с *CLAVATA*-подобной системой в меристеме корня: *CLE*-пептид (компонент системы *CLAVATA*) *CLE40* ограничивает область экспрессии *WOX5* в меристеме корня таким же образом, как *CLV3* ограничивает область экспрессии гена *WUS* в меристеме побега (Stahl, Simon, 2009). Влияние *WOX5* на цитокининовый ответ в меристеме корня изучено не было. Таким образом показано, что *WOX5* стимулирует пролиферацию и подавляет дифференцировку стволовых клеток-инициалей в меристеме корня, но конкретные механизмы его действия к настоящему времени не известны.

Поскольку программы развития боковых корней и клубеньков эволюционно близки, мы предположили, что ген *WOX5* может быть также вовлечен в контроль органогенеза клубеньков. К настоящему времени роль *WOX5* в развитии клубенька остается неизученной, хотя в литературе имеются данные о возможном участии этого гена в развитии клубенька (Wan, 2007). Контролируется ли развитие меристемы клубенька и меристемы бокового корня общими регуляторными факторами? Этот вопрос приобретает особый интерес в свете дискуссии об эволюционном происхождении клубенька. Принципиальные различия в индукции развития клубенька и бокового корня связаны с гормональной регуляцией этих процессов. Индуктором образования боковых корней является ауксин, стимулирующий пролиферацию клеток перицикла при развитии примордия бокового корня. Было показано, что ген *WOX5*, экспрессия которого активируется при первых делениях клеток перицикла, является ауксин-регулируемым (Gonzali et al., 2005; Imin et al., 2007; Chen et al., 2009). Таким образом, при развитии бокового корня ауксин может активировать экспрессию гена *WOX5*, участвующего в развитии меристемы бокового корня. В отличие от ауксина, гормон цитокинин подав-

ляет развитие бокового корня. Локальное усиление концентрации цитокинина в клетках перицикла (например, вызванное сверхэкспрессией гена биосинтеза цитокинина изопентинилтрансферазы) нарушает закладку примордиев боковых корней. Экзогенное добавление цитокинина вызывает изменение направлений клеточных делений в формирующемся примордии, нарушая его структуру, что приводит к формированию “плоского” примордия бокового корня (Laplaze et al., 2007). В противоположность этому, было показано, что именно цитокинин играет ключевую роль в активации делений клеток коры при развитии примордия клубенька. Каковы же относительные роли ауксина и цитокинина в инициации развития примордия клубенька? Какую роль играет активируемый ауксином ген *WOX5* в закладке меристемы клубенька? Существует ли связь *WOX5* с действием цитокинина и с действием системы *CLAVATA*?

В поисках ответа на поставленные вопросы может помочь изучение экспрессии гена *WOX5* при развитии клубенька, в особенности на начальных этапах его развития. В этой статье мы показали, что ген *WOX5* вовлечен в развитие меристемы клубенька бобовых растений, оценили количественно его экспрессию на различных этапах клубенькообразования, а также изучили локализацию его экспрессии с помощью конструкции, содержащей промотор *WOX5*, соединенный с репортерным геном.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Штаммы бактерий

Для инокуляции растений гороха *Pisum sativum* L. использовали штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* CIAM 1026 (Safonova, Novikova, 1996), полученный из коллекции ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (<http://www.aggiam.spb.ru/eng/lab10/>). Для инокуляции растений люцерны *M. truncatula* использовали штамм *Sinorhizobium meliloti* 2011. Жидкие культуры выращивали на качалке при 28°C в среде *B*- (van Brussel et al., 1977) до оптической плотности  $A_{600} = 0.7-1$  (приблизительно  $10^7-10^8$  клеток на мл). Для инокуляции использовали 1 мл бактериальной суспензии на растение.

Для трансформации растений использовали штамм *Agrobacterium rhizogenes* MSU440.

### Растительный материал и условия выращивания растений

В работе использовали горох (*Pisum sativum* L.) сортов *Frisson* и *SGE*, а также полученные на основе сорта *SGE* мутантные линии *SGENod-8* (*sym38*), *SGEFix-2* (*sym33*), *SGENod-3* (*sym35*) из коллекции

ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (<http://www.arriam.spb.ru/eng/lab9/collections.html>), а также линию люцерны диплоидной *Medicago truncatula Gaertn A17*.

Семена стерилизовали с использованием концентрированной серной кислоты в течение 10 минут с последующей 5-кратной промывкой в стерильной воде. Семена высевали на 1% водный агар и проращивали в темноте в течение 4–5 дней. В экспериментах по изучению экспрессии генов проростки гороха переносили в горшки с вермикулитом, поливали жидкой средой Jensen (Jensen, 1942). Растения выращивали в фитотроне с режимом день/ночь 16/8 часов, 21°C, относительной влажности 75%, освещенности. Образцы корней для выделения РНК собирали на 5, 7, 9, 11, 15, 22 дни после инокуляции, корни 3–4 растений на вариант.

#### Идентификация гена *WOX5*

На основании взятых из базы данных GenBank нуклеотидных последовательностей гена *WOX5 Arabidopsis thaliana* (GenBank AY251396) и *Medicago truncatula* (GenBank BF649819) были подобраны вырожденные праймеры к консервативным участкам, которые использовали для получения продукта на матрице ДНК и кДНК гороха:

WOX5\_F: AAGTGYGGKCGWTGGAATCC,

WOX5\_R: CTC AAYCGTAAGTCYAAATGGYGG.

Для выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот применяли программу AlignX, использующую алгоритм Clustal W (Thompson et al., 1994), из пакета Vector NTI Advance 10 (InforMax, Inc <http://www.informaxinc.com>). Амплификацию проводили по следующей программе: 30 сек при 94°C, затем 30 сек при 56°C и 40 сек при 72°C, 28 циклов, 5 мин при 72°C. Полученный продукт выделяли из геля с помощью DNA extraction kit (Fermentas, Латвия) согласно предложенному производителем протоколу. Выделенные фрагменты лигировали с использованием T4 ДНК-лигазы (Sigma, США) в течение ночи при 14–16°C в векторе pAL-TA (Евроген, Россия). Полученной реакционной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (DH5). Отбор трансформантов производили на среде LB/ampicillin/IPTG/X-Gal. Плазмидную ДНК выделяли из ночной культуры клеток *E. coli* методом лизиса с щелочью (Lee, Rasheed, 1990). Анализ первичных последовательностей проводили с помощью автоматического секвенатора SEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США) по протоколу производителя.

#### Анализ экспрессии генов

Образцы корней для выделения РНК собирали на 5, 7, 9, 11, 15, 22 дни после инокуляции. Чтобы избежать попадания примордиев боковых корней в анализируемый материал, брали участки корня между боковыми корнями. Эксперимент повторяли в двух независимых биологических повторностях. РНК выделяли с использованием реагента TRI® (Sigma, США) согласно протоколу производителя. Обработку с помощью фермента ДНКазы (Fermentas, Латвия) проводили в течение 1 часа при 37°C, с последующим осаждением с использованием хлороформа. Для синтеза кДНК брали по 2.5 мкг РНК. Реакцию синтеза кДНК проводили в реакционной смеси общим объемом 20 мкл, содержащей 10 mM tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM дНТФ, 100 пМ олиго(dT12), 1 ед. ингибитора РНКаз (Fermentas, Латвия) и 200 ед. обратной транскриптазы М-MLV (Fermentas, Латвия) в течение 1 часа при 37°C с последующим прогреванием в течение 5 минут при 95°C. Полученные пробы кДНК разбавляли до 100 мкл. В состав реакционной смеси для ПЦР общим объемом 20 мкл входило 2 мкл полученного раствора кДНК в 10 mM трис-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM дНТФ, 10 пМ каждого праймера 1 ед. Таq-полимеразы. Амплификацию проводили по следующей программе: 30 сек при 94°C, затем 30 сек при 56°C и 40 сек при 72°C, 28 циклов, 5 мин при 72°C с праймерами к гену *PsWOX5* и гену убиквитина:

*PsWOX5\_FOR*

5'-GGTTTCAA AATCATAAGGCTAGGGA-3',

*PsWOX5\_REV*

5'-TCAACCGTAAGTCTAATGGTGGATG-3',

*Ubiquitin\_FOR*:

5'-ATGCAGATC/TTTTGTGAAGAC-3',

*Ubiquitin\_REV*:

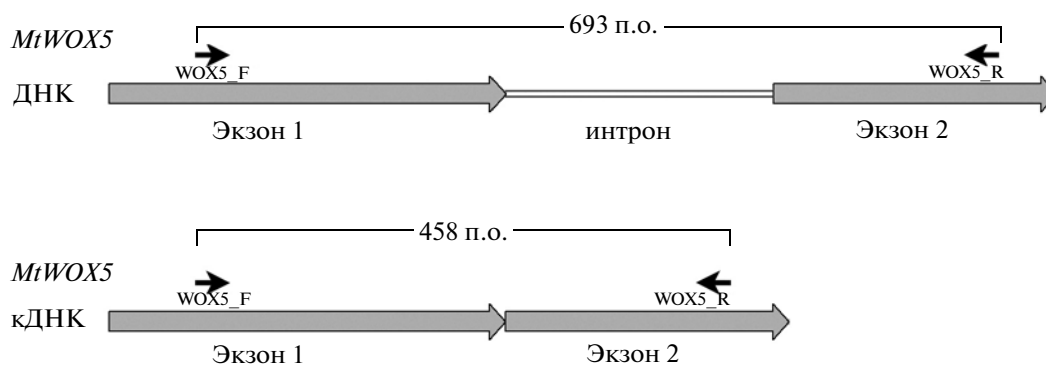
5'-ACCACCACGG/AAGACGGAG-3'.

Продукты ПЦР разделяли в 1.5% агарозном геле. Для контроля качества и количества РНК в анализируемых образцах проводили реакцию с праймерами к конститутивно экспрессирующемуся гену убиквитину.

#### ПЦР, совмещенная с обратной транскрипцией, с детекцией в реальном времени

ПЦР в реальном времени с помощью системы Bio-Rad iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием коммерческого набора iQ SYBR Green Supermix. Реакцию проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1X буфер для ПЦР, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM дНТФ, 1 ед. Таq-полимеразы “jumpstart”, 10 пМ каждого праймера и 0.5xSYBR Green I. Ам-





**Рис. 1.** Схема расположения вырожденных праймеров на матрице ДНК и кДНК *MtWOX5*, используемых для идентификации гена *WOX5* у гороха.

пификацию проводили по следующей программе: 95°C в течение 30 сек, 56°C в течение 30 сек и 72°C в течение 40 сек. Флуоресценцию интеркалирующего красителя SYBR Green I регистрировали в конце каждого цикла при 72°C. Количественную оценку экспрессии анализируемого гена проводили с помощью программы BioRad IQ5. Данные по количественной оценке анализируемого гена представлены в относительных единицах, рассчитанных при сравнении с уровнем экспрессии референсного гена убиквитина. Для каждого образца реакцию проводили в трех повторностях.

#### Получение генетической конструкции *pMtWOX5::GUS*

Для амплификации промотора гена *MtWOX5* на матрице геномной ДНК люцерны диплоидной амплифицировали фрагмент размером 1967 п.о. до старт-кодона АТГ гена *MtWOX5* с помощью высокоточной полимеразы Pfu (Силекс, Россия). Амплификацию проводили с использованием праймеров:

*pMtWOX5\_FOR*

5'-CACCCAACCAAGCCTTATCATAGTAT-3' и

*pMtWOX5\_REV*

5'-GCTCTCTTCCATATTTCAATTCTAGA-3',

по следующей программе: 30 сек при 94°C, 40 сек при 56°C и 3 мин при 72°C, 28 циклов.

Полученный фрагмент клонировали в векторе pENTR(tm)/D-TOPO® (Invitrogen, США). Правильность вставки промотора в вектор путем проверяли с помощью секвенирования. После этого промотор переклонировали с помощью attR-attL рекомбинации в вектор pBGWFS7 (VIB-Ghent, Бельгия), содержащий последовательности репортерных генов GFP/GUS и терминатора T35S. Полученную конструкцию вводили в клетки *Agrobacterium rhizogenes* MSU440.

#### Трансформация гороха и люцерны диплоидной

Штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, несущим генетическую конструкцию *pMtWOX5::GFP/GUS*, трансформировали растения люцерны диплоидной и гороха. Трансформацию осуществляли по протоколу, описанному Лимпенсом и соавторами (Limpens et al., 2004), путем нанесения суспензии бактерий на срез в области гипокотили асептических проростков *in vitro* и культивирования проростков с агробактериями в течение 4–5 дней на твердой питательной среде Färhaeus. После трансформации экспланты переносили на питательную среду Emergence (Limpens et al., 2004) с добавлением антибиотика цефотаксима 300 мкг/мл и культивировали до регенерации корней, после чего растения пересаживали в горшочки, заполненные субстратом вермикулитом с добавлением жидкой питательной среды Färhaeus. Инокуляцию люцерны диплоидной проводили с использованием штамма ризобий *Sinorhizobium meliloti* 2011, а растения гороха инокулировали штаммом ризобий *Rhizobium leguminosarum* CIAM1026.

#### Локальный анализ экспрессии гена *WOX5*

Детекцию активности репортерного гена GUS осуществляли с помощью субстрата X-Gluc (Sigma-Aldrich, США), инкубируя растительные ткани в буфере для GUS-окрашивания (NaPO<sub>4</sub> – буфер, pH 7.0; 0.5 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>; 0.5 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>; 0.05% Triton X-100; 0.5 мМ X-Gluc в ДМФ) при 37°C в течение 1.5–2 часов. Срезы тканей растений получали с использованием микротомы с вибрирующим лезвием HM 650V (Micom International GmbH). Микроскопический анализ проводили с использованием микроскопа LSM 510 META NLO (Carl Zeiss).

		(1) 1	10	20	30	40	50	60	74	Section 1
<i>PsWOX5</i>	(1)	ATTGGTTTC	AAAAATCA	TAAAGGCTAGG	GAAAGAC	AAAAACGTC	GGAAGGTTT	CTTTTGATGATG	TAAGGATGTT	
<i>MiWOX5</i>	(1)	ATTGGTTTC	AAAAATCA	CBAAGCTAG	GAAAGAC	AAAAACGTC	GTAAGGTTT	CTTTTGATGATG	CAAGGATGTC	
	(75) 75	80	90	100	110	120	130	148		Section 2
<i>PsWOX5</i>	(75)	ATTGTTTCAT	CATAGAGACA	ACTCCATG	CAATGCTTC	TAAACAAA	AGTTTGTG	AGATGTA	CTACTCAGAG	CCTAATAG
<i>MiWOX5</i>	(75)	ATAGTTTCAT	---AGAGACA	ACTCTATGA	TGCTTCA	CACAAA	GGTTTGTG	CTGAGATG	TACTCAGAG	CCTGATAG
	(149) 149	160	170	180	190	200	210	222		Section 3
<i>PsWOX5</i>	(149)	GGTGATTG	AGACTCTT	GAGCTTTT	CCATTTGA	ACTCCCTT	GGTGAA	TGAGATC	AGAACTG	GAGAAGCTG
<i>MiWOX5</i>	(146)	AGTGATTG	AGACTCTT	GAGCTTTT	CCATTTGA	ACTCCATTT	GGTGAA	TGAGATC	AGAACTG	AGAGCTG
	(223) 223	230	240	250	260	270	280	296		Section 4
<i>PsWOX5</i>	(223)	TGCATGTG	AAATGA	AGTAGGG	AAATCC	TATATTG	CTTACACAT	GCACAA	TGGGTG	AGCAAATAG
<i>MiWOX5</i>	(214)	TGCATG	CAAATGA	ATGCAGGG	AAATCA	ATGTTTGC	ATACACAT	GTACAAT	GGGAG	ACAAATGG
	(297) 297	315								Section 5
<i>PsWOX5</i>	(297)	CCATTAG	ACTTAC	GGTTGA						
<i>MiWOX5</i>	(288)	CCATTG	GACTTAC	GGTTGA						

Рис. 2. Выравнивание последовательности нуклеотидов амплифицированного фрагмента кДНК гена гороха *PsWOX5* с соответствующим участком кДНК гена люцерны диплоидной *MiWOX5*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Идентификация гена *PsWOX5* у гороха

На основании взятых из базы данных GenBank нуклеотидных последовательностей гена *WOX5 Arabidopsis thaliana* и *Medicago truncatula* были подобраны вырожденные праймеры к консервативным участкам, которые использовали для получения продукта на матрице кДНК гороха (см. рис. 1).

С использованием вырожденных праймеров на матрице ДНК и кДНК гороха (Frison) были получены продукты ожидаемого размера. Анализ последовательностей, полученных в результате амплификации, выявил сходство данных фрагментов с соответствующими последовательностями арабидопсиса и люцерны диплоидной (см. рис. 2). На основании анализа полученных последовательностей нами были подобраны полностью комплементарные праймеры к кДНК гороха *PsWOX5* (от *Pisum sativum WOX5*), которые использовали для анализа экспрессии этого гена при развитии клубеньков гороха.

### Анализ экспрессии гена *PsWOX5* при развитии клубеньков у гороха

Мы проанализировали экспрессию *PsWOX5* на различных сроках после инокуляции ризобиями. В целом, после инокуляции уровень экспрессии *PsWOX5* возрастал, достигал максимума к 9–11 дню после инокуляции (дни), затем на 15 дни происходило снижение экспрессии гена *PsWOX5* (см. рис. 3, а, б). Так, по сравнению с 5 дни, на 7 дни наблюдали увеличение экспрессии гена *PsWOX5* в 3.6 раза, к 9 дни экспрессия *PsWOX5* увеличивалась в 6 раз, а к 11 дни – в 9.4 раз. К 15 дни наблюдали снижение экспрессии *PsWOX5*, по сравнению с 11 дни, в 4.6 раза, а на 22 дни – уровень экспрессии *PsWOX5* снижался в 22 раза (см. рис. 3, б). В неинокулированных контрольных образцах экспрессию гена *PsWOX5* не наблюдали (см. рис. 3, а).

Кроме того, мы проанализировали экспрессию *PsWOX5* у мутантов с нарушением развития примордиев/меристемы клубеньков *sum35* и *sum38*. У мутантов *sum35* наблюдается ранний блок в развитии клубеньков: не происходит активация делений клеток коры, тогда как у мутантов *sum38* образуются очень редкие примордии клубеньков, но меристема не формируется. У мутантов *sum35* и *sum38* экспрессия гена *PsWOX5* в ответ на инокуляцию нами не была выявлена. При этом у дикого типа и у мутанта *sum33*, у которого меристема клубенька формируется, но происходят нарушения на последующих этапах клубенькообразования, наблюдали экспрессию *PsWOX5* в ответ на инокуляцию (см. рис. 4).

В совокупности, полученные данные свидетельствуют о том, что ген *PsWOX5* действительно вовлечен в развитие примордия/меристемы клубенька гороха.

Таким образом, мы проанализировали динамику экспрессии гена *WOX5* в тканях корня гороха в ответ на инокуляцию ризобиями, начиная с 5 дни. На этом сроке у гороха происходит рост инфекционных нитей, посредством которых ризобии проникают внутрь коры корня. Параллельно с этим активно протекают деления клеток внутренних слоев коры и перицикла, приводящие к формированию примордия клубенька – группы пролиферирующих клеток, формирующих зачаток клубенька, которые впоследствии дают начало тканям клубенька (Voroshilova et al., 2009). Согласно нашим данным, на этом сроке происходит значительное увеличение экспрессии гена *WOX5* в инокулированных корнях гороха. Такое увеличение может быть связано с активной пролиферацией клеток примордия клубенька, поскольку ген *WOX5*, согласно литературным данным, вовлечен в регуляцию пролиферации клеток. Примерно к 9–11 дни растущие инфекционные нити достигают пролиферирующих клеток примордия клубенька и бактерии начинают их инфицировать, проникая в клетки корня посредством эндоцитоза.

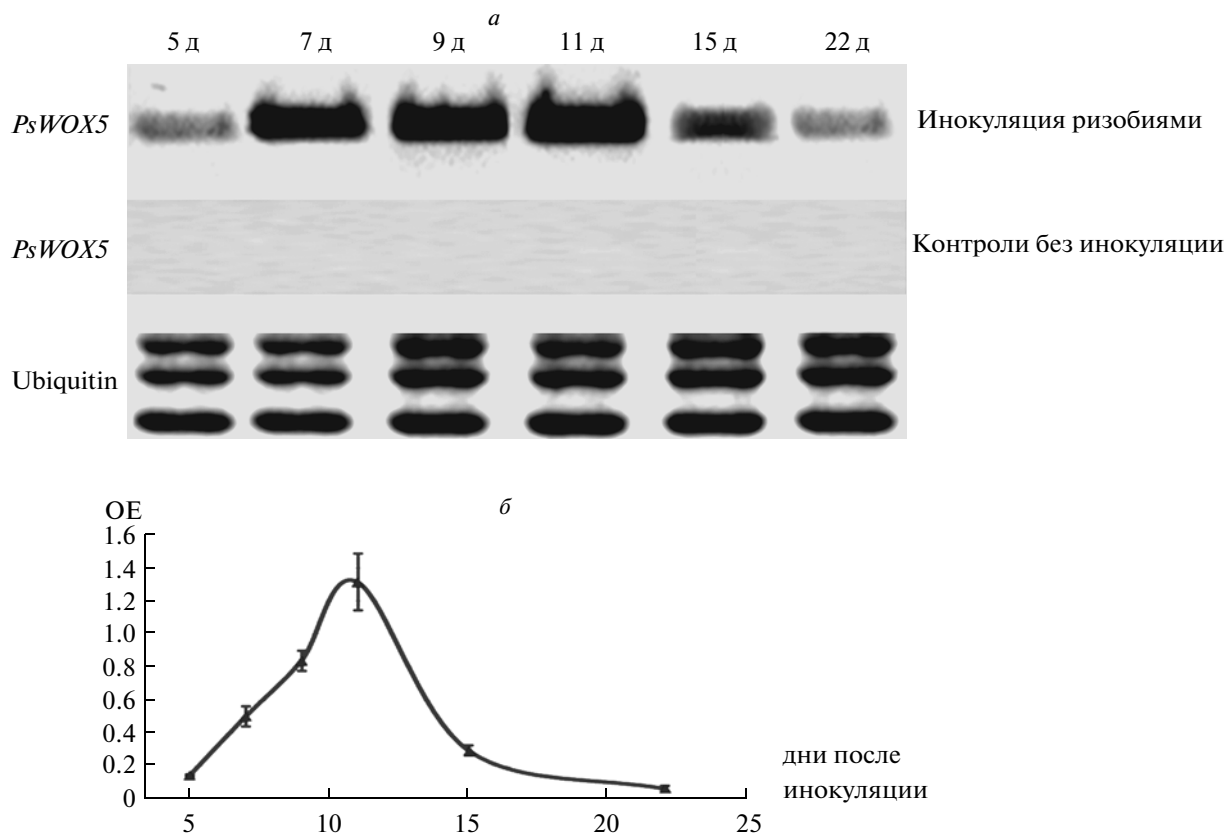


Рис. 3. Анализ динамики экспрессии гена *PsWOX5* при развитии клубенька гороха линии *Frisson*:

*a* – Анализ динамики экспрессии *PsWOX5* методом ОТ-ПЦР;

*б* – Количественный анализ динамики экспрессии *PsWOX5* методом ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что на этом этапе уровень экспрессии гена *WOX5* в примордиях клубеньков достигает максимального значения. На более поздних сроках (после 11 дни) происходит формирование меристемы клубенька и выход клубенька на поверхность материнского корня (Voroshilova et al., 2009). Обособление зоны меристемы сопровождается формированием характерной для азотфиксирующего клубеньков гистологи-

ческой структуры. Так, в клубеньках возрастом около 15 дни уже различимы зоны, характерные для зрелых клубеньков недетерминированного типа: на верхушке клубенька располагается меристема, за которой располагается зона инфекции, и вслед за ней к основанию клубенька – зона азотфиксации (Brewin, 1991). Согласно нашим данным, к 15 дни происходит значительное снижение уровня экспрессии *WOX5*. Таким образом, начальное увеличение уровня экспрессии *WOX5* по времени совпадает с активной пролиферацией клеток на ранних этапах развития клубенька (формированием примордия), а достижение максимума экспрессии *WOX5* (9–11 дни) предшествует формированию у клубенька собственной меристемы. При этом дифференцировка тканей клубенька (примерно 15 дни) сопровождается значительным снижением уровня экспрессии этого гена.

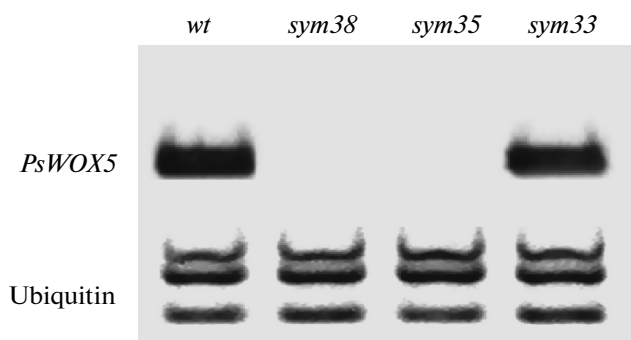


Рис. 4. Анализ экспрессии *PsWOX5* в корнях гороха дикого типа и мутантов *sym35*, *sym38*, *sym33*, инокулированных ризобиями, на 7 день после инокуляции.

Выявленный характер динамики экспрессии гена указывает на его возможное участие в контроле процесса формирования примордия/меристемы клубенька. Однако для подтверждения этого предположения необходимо было провести локальный анализ экспрессии *WOX5* при развитии клубенька.

*Локальный анализ экспрессии WOX5 при развитии корней и клубеньков гороха и люцерны диплоидной*

Для локального анализа экспрессии гена *WOX5* при развитии клубенька нами была создана конструкция, содержащая промотор этого гена, соединенный с репортерным геном бета-глюкоконидазы (*GUS*) (*pMtWOX5::GUS*) (см. рис. 5). Для создания конструкции мы использовали последовательность промоторной области гена *pMtWOX5* люцерны диплоидной (*M. truncatula*). Люцерна диплоидная является модельным бобовым растением, геном которого к настоящему времени полностью расшифрован. Люцерна, как и горох, образует клубеньки недетерминированного типа. Кроме того, о близком эволюционном родстве этих видов свидетельствует наличие тесной синтении между участками генома люцерны диплоидной и гороха посевного (Zhu et al., 2005; Жуков и др., 2009). На основании этого мы ожидали, что активность промотора *M. truncatula* будет регулироваться сходным образом на генетическом фоне гороха, поскольку сходство процессов клубенькообразования предполагает сходство регуляторных механизмов.

Горох известен как труднотрансформируемый объект (Савельева и др., 2005). Агробактериальную трансформацию гороха осложняет низкая регенерационная способность, в частности низкая способность к корнеобразованию. В связи с этим, параллельно с горохом, мы также проводили трансформацию люцерны диплоидной, для которой методы генетической трансформации хорошо отработаны (Chabaud et al., 2006). Кроме того, важной задачей этой части работы был сравнительный анализ локализации экспрессии *pMtWOX5::GUS* в тканях люцерны *M. truncatula* и гороха. Такой анализ позволил бы оценить адекватность использования конструкций, содержащих промотор гена *M. truncatula*, для изучения регуляции активности ортологичного гена у гороха.

В результате трансформации с помощью *A. rhizogenes* нам удалось получить достаточно высокую долю трансгенных корней как у растений люцерны, так и гороха. Однако, следует отметить, что в наших экспериментах процесс регенерации корней у гороха, после трансформации бескорневых эксплантов, в целом был не очень эффективным (1–3 корня на растение). У полученных трансгенных корней гороха и люцерны мы наблюдали экспрессию *pMtWOX5::GUS* в меристеме корня, в области, соответствующей покоящемуся центру меристемы (см. рис. 6: а, в). Это согласуется с литературными данными о локализации экспрессии гена *WOX5* арабидопсиса в покоящемся центре меристемы корня (Haesker et al., 2004). Таким образом, полученная нами конструкция оказалась эффективной для изуче-

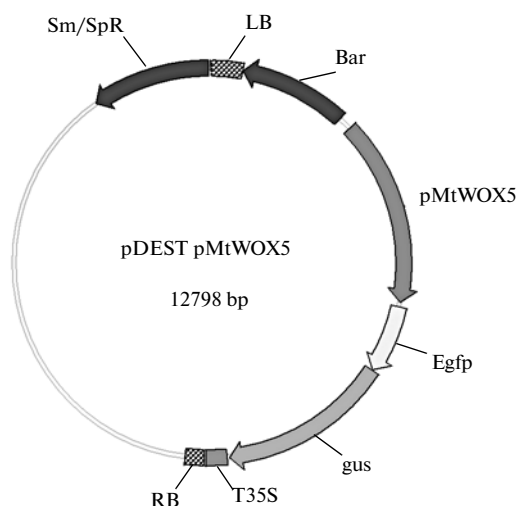


Рис. 5. Схема вектора, используемого для локального анализа экспрессии гена *WOX5*.

ния локализации экспрессии гена *WOX5* как у люцерны *M. truncatula*, так и у гороха.

Корни трансформированных растений были инокулированы ризобиями с целью последующей локализации экспрессии *WOX5* на различных этапах органогенеза клубеньков. У люцерны *M. truncatula* в ответ на инокуляцию происходила нормальная закладка примордиев клубеньков, которые со временем развивались в азотфиксирующие клубеньки. У гороха мы также наблюдали формирование примордиев клубеньков в ответ на инокуляцию, однако такие примордии останавливались в развитии, и оформленных клубеньков на корнях трансформированных растений гороха нам получить не удалось. Остановка развития примордиев клубеньков у гороха на корнях трансформированных растений может быть связана с возможным изменением гормонального статуса корней-регенерантов. Известно, что различные штаммы *A. rhizogenes*, используемые для трансформации, характеризуются различной степенью вирулентности (в частности, влиянием на гормональный статус растения). В частности, используемый нами штамм MSU440 характеризуется достаточно высокой степенью вирулентности, как известно из литературы, может вызвать образование корней-регенерантов с аномальным ростом и морфологией, характеризующихся измененным гормональным статусом (Chabaud et al., 2006). Таким образом, действительно целесообразным представляется сравнительный анализ экспрессии полученной конструкции параллельно у двух объектов.

В данной работе с использованием конструкции *pMtWOX5::GUS* нам удалось локализовать экспрессию гена *WOX5* на ранних этапах развития примордия клубенька у люцерны диплоидной и гороха. В

целом, локализация экспрессии *WOX5* у этих двух видов бобовых оказалась схожей, что позволяет нам обобщать данные по экспрессии изучаемого гена у люцерны диплоидной и гороха (см. рис. 7). Мы показали, что на самых ранних этапах *WOX5* экспрессируется в перицикле напротив тяжа ксилемы, что соответствует месту закладки примордия клубенька (рис. 7, а). Далее экспрессия гена *WOX5* связана с пролиферирующими клетками примордия клубенька (рис. 7, б, в, г). Следует отметить, что локализация экспрессии *WOX5* в клетках примордия клубенька согласуется с высоким уровнем экспрессии этого гена, определенном с помощью метода ОТ-ПЦР, на 5–11 дни – сроках, когда происходит закладка примордиев клубеньков. Таким образом, корреляция этих данных подтверждает наше предположение об участии транскрипционного фактора *WOX5* в процессе формирования примордия/меристемы клубенька.

Кроме того, нами практически не было выявлено экспрессии гена *WOX5* в клетках эпидермы (корневых волосках), что указывает на участие данного гена только в контроле процессов, происходящих в коре и перицикле у двух изученных бобовых растений.

Известно, что у арабидопсиса экспрессия гена *WOX5* индуцируется ауксином (Gonzali et al., 2005; Imin et al., 2007; Chen et al., 2009). Сайты закладки примордиев клубеньков соответствуют зонам накопления ауксина при действии Nod-факторов. Показано значительное перекрытие (90%) спектров белков (протеомные исследования), синтез которых индуцируется в ответ на действие ауксина и инокуляцию ризобиями (van Noorden et al., 2007). С помощью ауксин-регулируемых генетических конструкций GH3::GUS и DR5::GUS у люцерны *M. truncatula* и клевера *Trifolium repens* наблюдали усиление ауксинового ответа в делящихся клетках коры и перицикла на ранних этапах развития примордия клубенька (Mathesius et al., 1998; Huo et al., 2006). Все эти данные указывают на важную роль ауксина в органогенезе клубеньков, однако механизм действия ауксина на процессы, лежащие в основе формирования примордия клубенька, остается не выясненным. В нашей работе мы показали, что ген *WOX5*, известный как ауксин-регулируемый ген, экспрессируется на ранних этапах развития клубенька и вовлечен в развитие примордия. Таким образом, можно предположить, что активация экспрессии *WOX5* опосредована действием ауксина при развитии примордиев клубеньков.

Вместе с тем, для паралога гена *WOX5* у арабидопсиса, функционирующего в меристеме побега, показано их непосредственное участие в цитокининовом ответе. Так, транскрипционный фактор WUS

подавляет экспрессию генов *ARR* А-типа, вовлеченных в контроль цитокининового ответа. Известно, что у арабидопсиса при связывании цитокинина с рецептором, активируются регуляторы цитокининового ответа – транскрипционные факторы *ARR* В-типа и А-типа. *ARR* В-типа связываются с промоторами цитокинин-регулируемых генов и активируют их экспрессию. В свою очередь, транскрипционные факторы *ARR* А-типа по механизму обратной связи подавляют действие транскрипционных факторов В-типа и, тем самым препятствуют дальнейшему распространению цитокининового ответа. Так как WUS подавляет экспрессию генов *ARR* А-типа, то его действие способствует локальному усилению цитокининового ответа. Другой транскрипционный фактор семейства *WOX*, *WOX9*, как предполагается, участвует в активации цитокинин-регулируемых генов наряду с ранее охарактеризованными регуляторами цитокининового ответа – транскрипционными факторами *ARR* В-типа. Таким образом, в меристеме побега гены *WOX* локально усиливают цитокининовый ответ, стимулируя пролиферацию клеток меристемы.

Известно, что на ранних этапах развития клубенька наблюдается усиление цитокининового ответа и экспрессия цитокинин-регулируемых генов, необходимых для развития примордия клубенька. В корнях люцерны *M. truncatula*, инокулированных ризобиями, экспрессия рецептора цитокинина *MiCRE1* локализована в клетках коры и в развивающемся примордии клубенька (Lohar et al., 2006). Таким образом, локализация компонентов, вовлеченных в цитокининовый ответ у бобовых растений, совпадает с локализацией экспрессии гена *WOX5*. Кроме того, в развитие цитокининового ответа у бобовых также вовлечены гены *RR* А- и В-типа. Можно предположить, что ген *WOX5* вовлечен в регуляцию цитокининового ответа при развитии примордия клубенька, аналогично действию его паралога, функционирующего у арабидопсиса.

Интересно отметить, что другим геном, для которого показано участие в формировании примордия клубенька, является цитокинин-регулируемый ген раннего нодулина *ENOD40* (Fang, Hirsh, 1998). На ранних этапах клубенькообразования он экспрессируется в перицикле и в делящихся клетках примордия (Imaizumi-Anraku et al., 2000, Wan et al., 2007). Как известно, продукт гена *ENOD40*, представляющий собой регуляторный пептид, оказывает влияние на ауксиновый ответ в тканях корня (van de Sande et al., 1996). Таким образом, *ENOD40* вовлечен во взаимодействие между цитокининовым и ауксиновым ответом при развитии клубенька.

Так как известно, что транскрипционный фактор *WOX5* является ауксин-регулируемым, но при этом

может влиять на распространение цитокининового ответа (мишенью его действия могут являться RR A-типа), мы предполагаем, что при развитии клубенька *WOX5* играет роль связующего звена между и цитокининовым и ауксиновым ответом. Это предположение требует подтверждения в экспериментах по изучению влияния гормонов цитокинина и ауксина на развитие клубеньков с использованием полученных конструкций.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе мы показали, что ген *PsWOX5* вовлечен в контроль развития клубеньков гороха и экспрессируется на высоком уровне в пролиферирующих клетках развивающихся примордиев клубеньков. Результаты нашей работы демонстрируют, что при развитии разных структур, таких как клубенок и корень, пролиферация клеток у растений контролируется одним и тем же регуляторным геном *WOX5*. При этом, вероятно, особенности развития этих органов определяются тонкой регуляцией взаимодействия транскрипционного фактора *WOX5* с гормонами растений, прежде всего цитокинином и ауксином.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Жуков В.А., Штарк О.Ю., Борисов А.Ю. и др. Молекулярно-генетические механизмы контроля растением ранних стадий развития взаимовыгодных (мутуалистических) симбиозов бобовых // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1449–1460.
- Лутова Л.А., Додуева И.Е. Роль меристемоспецифичных генов растений в формировании генетических опухолей // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 6. С. 420–433.
- Савельева Н.В., Дудник Е.Э., Лутова Л.А. Модификация методов агробактериальной трансформации *in vitro* и *in vivo* для получения трансгенных растений моркови и гороха // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2005. Т. 1. № 1. С. 37–46.
- Albrecht C., Geurts R., Lapeyrie F. et al. Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12a* // Plant J. 1998. V. 15. P. 605–614.
- Ben A.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E.D. et al. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation // Plant J. 2003. V. 34. P. 1–12.
- Bowman J., Yuval E. Formation and maintenance of the shoot apical meristem // Trends in Plant Science. 2000. Vol. 5. № 3. P. 110–115.
- Brewin N.J. Development of the legume root nodule // Annu. Rev. Cell Biol. 1991. V. 7. P. 1–226.
- Bright L.J., Liang Y., Mitchell D.M. et al. The *LATD* gene of *Medicago truncatula* is required for both nodule and root development // Mol. Plant-Microbe Interact. 2005. V. 18. P. 521–532.
- Chaubaud M., Boisson-Dernier A., Zhang J. et al. Agrobacterium rhizogenes-mediated root transformation // The *Medicago truncatula* handbook. Mathesius U, Journet EP, Sumner LW (eds). ISBN 0-9754303-1-9. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>
- Charron D., Pingret J.L., Chaubaud M. et al. Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium nodulation* factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including  $Ca^{2+}$  spiking and specific *ENOD* gene expression // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 3582–3593.
- Chen S.-K., Kurdyukov S., Kereszt A. et al. The association of homeobox gene expression with stem cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula* // Planta. 2009. V. 230. № 4. P. 827–840.
- Crespi M., Gálvez S. Molecular mechanisms in root nodule development // J. Plant Growth Regul. 2000. V. 19. P. 155–166.
- de Ruijter N.C.A., Bisseling T., Emons A.M.C. *Rhizobium* Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes // Mol. Plant Microbe Interact. 1999. V. 12. P. 829–832.
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Long S.R. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors // Science. 1992. V. 256. P. 998–1000.
- Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals // Cell. 1996. V. 85. P. 673–681.
- Engstrom E.M., Ehrhardt D.W., Mitra R.M. et al. Pharmacological analysis of Nod factor-induced calcium spiking in *Medicago truncatula*: evidence for the requirement of type IIA calcium pumps and phosphoinositide signaling // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 1390–1401.
- Fang Y., Hirsch A.M. Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa // Plant Physiol. 1998. V. 116. I. 1. P. 53–68.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A. et al. Nod factors modulate the concentration of cytosolic free calcium differently in growing and non-growing root hairs of *Medicago sativa* L. // Planta. 1999. V. 209. P. 207–212.
- Ferguson B.J., Reid J.B. Cochleata: Getting to the root of legume nodules // Plant and Cell Physiology. 2005. V. 46. № 9. P. 1583–1589.
- Ferraioli S., Taté R., Rogato A. et al. Development of ectopic roots from abortive nodule primordia // Mol. Plant Microbe Interact. 2004. V. 10. P. 1043–1050.
- Gonzali S., Novi G., Loreti E. et al. A turanose-insensitive mutant suggests a role for *WOX5* in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2005. V. 44. P. 633–645.
- Grunewald W., Van Noorden G., Van Isterdael G. et al. Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2553–2562.
- Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B. et al. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana* // Development. 2004. V. 131. P. 657–668.

- Harris J.M., Wais R., Long S.R. Rhizobium-induced calcium spiking in *Lotus japonicus* // Mol. Plant Microbe Interact. 2003. V. 16. P. 335–341.
- Hirsch A.M., Bhuvanewari T.V., Torrey J.G. et al. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86(4). P. 1244–1248.
- Horvath B., Heidstra R., Lados M. et al. Lipooligosaccharides of *Rhizobium* induce infection related early nodulin gene expression in pea root hairs // Plant J. 1993. V. 4. P. 727–733.
- Huo X., Schnabel E., Hughes K. et al. RNAi phenotypes and the localization of a protein:GUS fusion imply a role for *Medicago truncatula* PIN genes in nodulation // J. Plant Growth Regul. 2006. V. 25. P. 156–165.
- Imin N., Nizamidin M., Wu T. et al. Factors involved in root formation in *Medicago truncatula* // J. Experimental Botany. 2007. V. 58. P. 439–451.
- Imaizumi-Anraku H., Kouchi H., Syono K. et al. Analysis of ENOD40 expression in *alb1*, a symbiotic mutant of *Lotus japonicus* that forms empty nodules with incompletely developed nodule vascular bundles // Mol. Gen. Genet. 2000. V. 264. P. 402–410.
- Jensen H.L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I., Proc. Int. Soc. NSW, 1942; 66:68–108.
- Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A. et al. 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. V. 35. P. 429–441.
- Laplaze L., Benkova E., Casimiro I. et al. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 3889–3900.
- Lee S.Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. 1990. V. 9. № 6. P. 676–679.
- Leibfried A., To J.P., Busch W. et al. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators // Nature. 2005. V. 438. P. 1172–1175.
- Limpens E., Ramos J., Franken C. et al. RNA interference in *Agrobacterium* rhizogenes-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula* // Journal of Experimental Botany. 2004. V. 55, N. 399. P. 983–992.
- Limpens E., Franken C., Smit P. et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection // Science. 2003. V. 302. P. 630–633.
- Lohar D.P., Sharopova N., Endre G. et al. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* // Plant Physiol. 2006. V. 140. P. 221–234.
- Mathesius U., Schlaman H.R.M., Spink H.P. et al. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides // Plant J. 1998. V. 14. P. 23–34.
- Mathesius U., Weinman J.J., Rolfe B.J. et al. Rhizobia can induce nodules in white clover by “hijacking” mature cortical cells activated during lateral root development // Mol. Plant-Microbe Interact. 2000. V. 13. P. 170–182.
- Mayer K., Schoof H., Haecker A. et al. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem // Cell. 1998. V. 95. P. 805–815.
- Murray J.D., Karas B.J., Sato S. et al. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis // Science. 2007. V. 315(5808). P. 101–104.
- Oldroyd G.E.D., Downie A.J. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 519–546.
- Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B. et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // Nature. 2003. V. 425. P. 569–570.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S. et al. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers // Nature. 2007. V. 446. P. 811–814.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A. et al. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes // Cell. 2000. V. 100. P. 635–644.
- Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S. et al. Long-distance signalling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase // Science. 2003. V. 299. № 5603. P. 109–112.
- 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. V. 4. № 7. P. 634–635.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 4673–4680.
- Tirichine L., Sandal N., Madsen L.H. et al. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis // Science. 2007. V. 315(5808), P. 104–107.
- Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Priefer U.B. et al. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*–pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis // Annals of Botany. 2002. V. 89. P. 357–366.
- van Brussel A.A.N., Planque K., Quispel A. The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms // Journal of General Microbiology. 1977. V. 101. P. 51–56.
- van de Sande K., Pawlowski K., Czaja I. et al. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume // Science. 1996. V. 273. N. 5273. P. 370–373.
- van Noorden G.E., Kerim T., Goffard N. et al. Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti* // Plant Physiol. 2007. V. 144. P. 1115–1131.
- Wan X., Hontelez J., Lillo A. *Medicago truncatula* ENOD40-1 and ENOD40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. I. 8. P. 2033–2041.
- Wan X. Analyses of nodule meristem persistence and ENOD40 functioning in *Medicago truncatula* nodule formation. Thesis Wageningen University, The Netherlands. 2007.
- Zhu H., Choi H.-K., Cook D.R. et al. Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics // Plant Physiology. 2005. V. 137. P. 1189–1196.

## Features of the Expression of a Meristem-Specific *WOX5* Gene during Nodule Organogenesis in Legumes

M. A. Osipova<sup>b</sup>, E. A. Dolgikh<sup>a</sup>, and L. A. Lutova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> All-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, 196608 Russia  
e-mail: mary\_osipova@mail.ru

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

**Abstract**—In recent years, the role of *WOX* genes encoding homeodomain transcription factors in the development of the apical meristem of shoots and roots has been actively investigated. However, the role of *WOX* genes in the control of the cell proliferation in other meristem types is poorly studied. In our work, we have studied the role of the *WOX5* gene in the development of the meristem in nitrogen-fixing nodules developing on the roots of legumes in a symbiosis with rhizobia. We have shown that the *WOX5* gene is involved in the development of the nodule meristem in legumes, have quantitatively evaluated the gene's expression at different nodule formation stages, and have studied the localization of its expression using a construction containing the *WOX5* promoter conjugated with a reporter gene. The role of the *WOX5* transcription factor in the nodule organogenesis and its possible interaction with the hormonal system in the course of the nodule development has been discussed.

*Keywords:* nodule development, legume–rhizobium symbiosis, meristem-specific genes, *WOX*



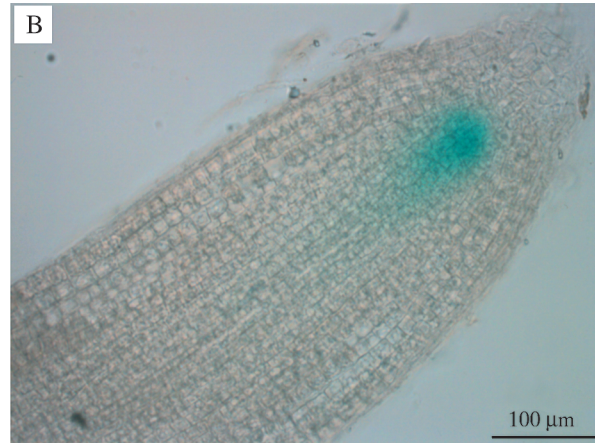
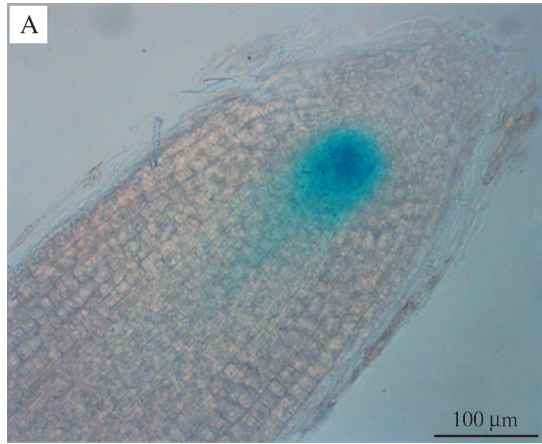


Рисунок 6. Локальный анализ экспрессии гена *WOX5* (*pMtWOX5::GUS*) в кончике корня гороха (А) и люцерны диплоидной (В) (пояснения в тексте)

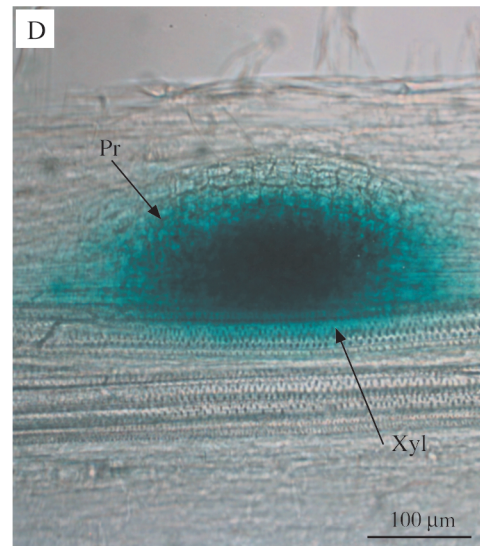
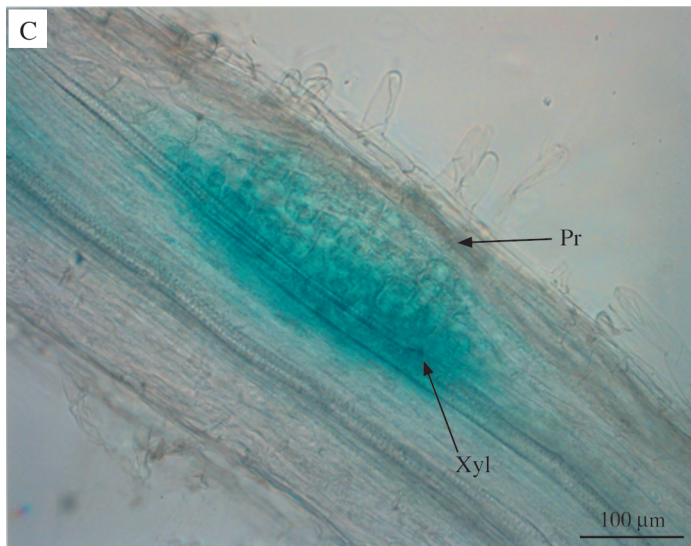
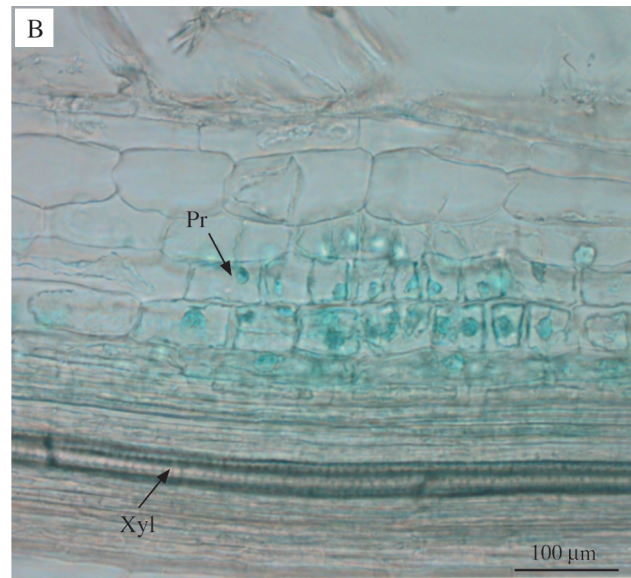
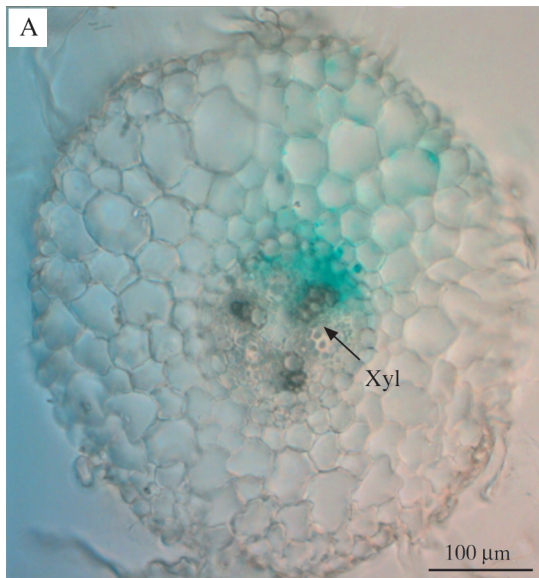


Рисунок 7. Локальный анализ экспрессии гена *WOX5* (*pMtWOX5::GUS*) в примордии клубенька гороха (В, D) и люцерны диплоидной (А, С) (пояснения в тексте)

