

Правительство Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»
(СПбГУ)

УДК 575

Reg No НИОКТР:

AAAA-A20-120012490089-0

Инв. No 75378380

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления
научных исследований СПбГУ


_____ Е.В. Лебедева

« » _____ 20__ г.

ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Изучение транскрипционных факторов *WOX*, их регуляторов и их кофакторов в
соматическом эмбриогенезе
(промежуточный)
По гранту РФФИ
(No20-016-00124 от 04.03.2020 г.)

Руководитель НИР,
старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук



В.Е. Творогова

Санкт-Петербург

2021

Реферат

Настоящий проект посвящен изучению механизмов соматического эмбриогенеза на модельном объекте *Medicago truncatula*. За отчетный период мы провели анализ влияния ряда транскрипционных факторов WOX на соматический эмбриогенез у *Medicago truncatula*. Также мы проанализировали механизмы взаимодействия между белками, являющимися предполагаемыми регуляторами соматического эмбриогенеза и провели поиск предполагаемых регуляторов соматического эмбриогенеза среди пептидов семейства CLE.

Введение

Явлению СЭ у различных видов растений посвящается множество исследований, которые нацелены на разработку и оптимизацию протоколов СЭ, поиск или получение высокоэмбриогенных линий растений или выявление генов-участников этого процесса. Причина интереса множества научных групп к этому процессу, специфическому и нехарактерному для растений в естественных условиях, заключается в следующем: СЭ *in vitro* является, наряду с органообразованием, основным способом регенерации растений после генетической трансформации, как с помощью агробактерий, так и с помощью биобаллистических и других методов. Появившиеся в настоящее время технологии редактирования генома растений с помощью CRISPR-Cas9 в подавляющем большинстве также задействуют генетическую трансформацию и регенерацию из соматических тканей. Кроме того, СЭ оказывается крайне полезным, если необходимо за короткие сроки размножить растения с определенным генотипом или если получение семян по тем или иным причинам затруднено или невозможно. Настоящий проект нацелен на поиск и изучение ключевых механизмов, запускающих развитие соматических эмбрионов и, в связи с вышеизложенным, является высокоактуальным.

Основная часть отчета о НИР

На отчетный период были поставлены следующие задачи:

- 1) Получение каллусов растений со сверхэкспрессией исследуемых генов WOX, анализ их способностей к соматическому эмбриогенезу

2) Проверка гипотез о взаимодействии MtNF-YB10 и MtWOX9-1 за счет консервативных аминокислотных остатков с помощью дрожжевой двугибридной системы и бимолекулярной флуоресцентной комплементации.

3) Оценка влияния индуцибельной экспрессии исследуемых генов CLE на экспрессию MtWOX9-1, отработка методики культивирования эксплантов *Medicago truncatula* различных линий в жидкой среде для последующей обработки CLE-пептидами

Полученные за период, на который предоставлен грант, результаты с описанием методов и подходов, использованных при реализации проекта

1) Получение каллусов растений со сверхэкспрессией исследуемых генов *WOX*, анализ их способностей к соматическому эмбриогенезу

На предыдущем этапе, используя ПЦР в реальном времени, а также анализ существующих баз данных и литературы, мы обнаружили шесть генов *WOX* с повышенным уровнем экспрессии в генеративных органах или в ходе соматического эмбриогенеза: *MtWOX2/Medtr4g063735*, *MtWOX3/Medtr7g060630*, *MtWOX6-like/Medtr4g084550*, *MtWOX11-2/Medtr6g027390*, *MtWOX11-like/Medtr7g086940* и *MtWOX9-2/Medtr7g025010*. Также ранее мы обнаружили, что трансформация эксплантов *M. truncatula* конструкцией для сверхэкспрессии *MtWOX2* может приводить к формированию каллусов со значительно увеличенным размером.

Для анализа механизмов влияния сверхэкспрессии *MtWOX2* на развитие каллуса мы провели поиск генов с дифференциальной экспрессией в таких каллусах по сравнению с контрольными. Для этого из каллусов со сверхэкспрессией *MtWOX2* и контрольных каллусов со сверхэкспрессией гена *GUS* была выделена РНК, из нее получена кДНК и секвенирована (по 3 биологические повторности в каждом случае). Исходные риды были проверены с помощью программы FastQC, после чего обрезаны и очищены с помощью программы Trimmomatic. Выравнивание проводили с помощью программы HISAT2, а подсчет выровненных ридов - с помощью программного пакета StringTie. Анализ дифференциальной экспрессии генов был произведен с помощью пакета DeSeq2. Для выявления генов с дифференциальной экспрессией были приняты пороговые значения *p*-value и \log_2 fold change, равные 0,01 и 1,0, соответственно. В результате для 1701 гена из 51629 анализируемых была обнаружена дифференциальная экспрессия (796 генов демонстрировали повышение уровня экспрессии в каллусах *MtWOX2*ое, а 905 генов - снижение уровня экспрессии. Был произведен анализ обогащенных групп Gene Ontology (Biological process) с помощью пакета GSEAbase. Обогащенными оказались 22 группы Gene Ontology среди генов

с пониженным уровнем экспрессии (Рис. 1) и 9 групп - среди генов с повышенным уровнем экспрессии (Рис. 2).

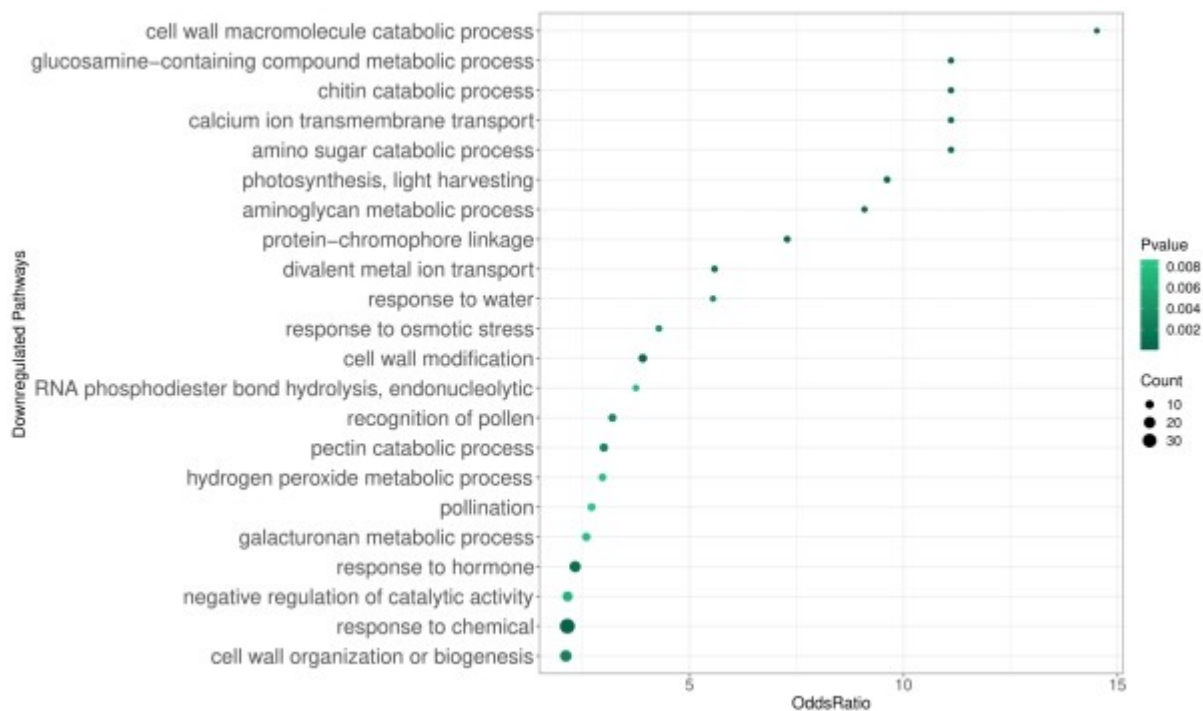


Рисунок 1. Обогащённые группы GO среди генов с пониженной экспрессией. Показаны только пути с числом дифференциально экспрессирующихся генов больше 4.

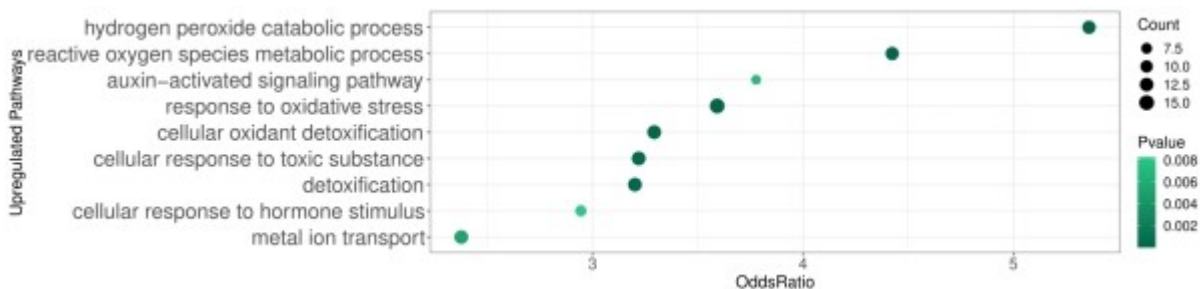


Рисунок 2. Обогащённые группы GO среди генов с повышенной экспрессией. Показаны только пути с числом дифференциально экспрессирующихся генов больше 4.

Ранее в нашей лаборатории уже проводился транскриптомный анализ каллусов со сверхэкспрессией другого представителя семейства WOX - гена *MtWOX9-1* (Tvorogova et al., 2019b). В данном эксперименте было проанализировано по две повторности для каллусов со сверхэкспрессией *MtWOX9-1*, полученных из трансгенных растений, и каллусов, полученных из растений дикого типа. Мы решили сравнить данные, полученные в настоящем исследовании, с имеющимися данными по сверхэкспрессии *MtWOX9-1*. Было обнаружено 398 генов, показавших дифференциальную экспрессию в обоих экспериментах. Если за

общее число генов принять все гены с ненулевым уровнем экспрессии хотя бы в одной из проанализированных проб (таких генов оказалось 32005 из 51629), данное значение значимо отклоняется от теоретически ожидаемого ($p\text{-value}=1.402757e-131$, гипергеометрический тест), что говорит о влиянии *MtWOX9-1* и *MtWOX2* на значимо перекрывающиеся наборы генов.

Из 398 генов, на уровень экспрессии которых влияет сверхэкспрессия как *MtWOX9-1*, так и *MtWOX2*, для 106 наблюдался одинаковый знак изменения (снижение или увеличение уровня) экспрессии в случае сверхэкспрессии *MtWOX2* и *MtWOX9-1*, а для 292 генов знак регуляции был противоположным. Данное распределение значимо отклоняется от ожидаемого (равное количество сходно и противоположно регулируемых генов) ($p\text{-value} < 2.2e-16$, Хи-квадрат). Таким образом, можно сделать вывод о преимущественно противоположном влиянии сверхэкспрессии *MtWOX9-1* и *MtWOX2* на транскриптом каллуса. Среди 292 генов, на которые противоположным образом влияла сверхэкспрессия *MtWOX2* и *MtWOX9-1*, большая часть (182 гена) демонстрировала увеличение уровня экспрессии при сверхэкспрессии *MtWOX9-1* и уменьшение - при сверхэкспрессии *MtWOX2*. Мы провели анализ обогащенных групп Gene Ontology (Biological process) среди этих генов, используя пакет GSEABase, и обнаружили, что существенная часть обогащенных групп связана с развитием соматических эмбрионов (Рис. 3).

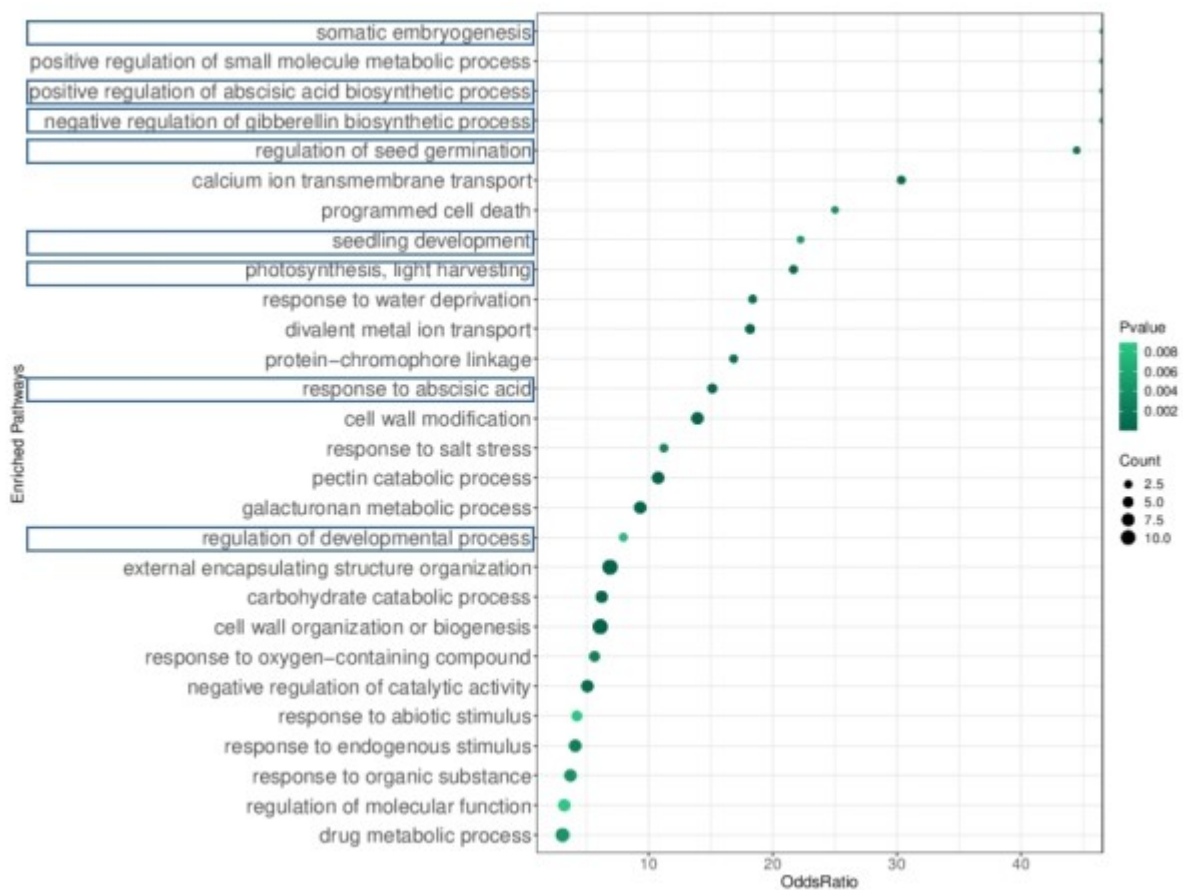


Рисунок 3. Обогащённые группы GO среди генов, экспрессия которых активируется при сверхэкспрессии *MtWOX9-1* и подавляется при сверхэкспрессии *MtWOX2*. Группы, связанные с развитием соматических эмбрионов, обведены синим.

Таким образом, можно предположить, что *MtWOX2*, являясь стимулятором развития каллуса, оказывает негативное влияние на развитие собственно соматических эмбрионов, противоположное влиянию гена *MtWOX9-1*, стимулятора соматического эмбриогенеза.

Помимо изучения механизмов работы гена *MtWOX2* в соматическом эмбриогенезе, за отчетный период мы также проанализировали влияние генов *MtWOX11-like* и *MtWOX11-2* на соматический эмбриогенез.

Для этого мы трансформировали экспланты эмбрионной линии R-108 конструкциями для сверхэкспрессии *MtWOX11-like* или *MtWOX11-2*. В качестве контроля мы использовали каллусы, трансформированные конструкцией для сверхэкспрессии гена *GUS*. Мы не выявили статистически значимых различий по количеству образующихся эмбрионов у контрольных каллусов и каллусов со сверхэкспрессией *MtWOX11-like* или *MtWOX11-2* (рис. 4), хотя наблюдали тенденции к увеличению количества соматических эмбрионов у каллусов со сверхэкспрессией *MtWOX11-like* (p -value < 0.1, тест Вилкоксона).

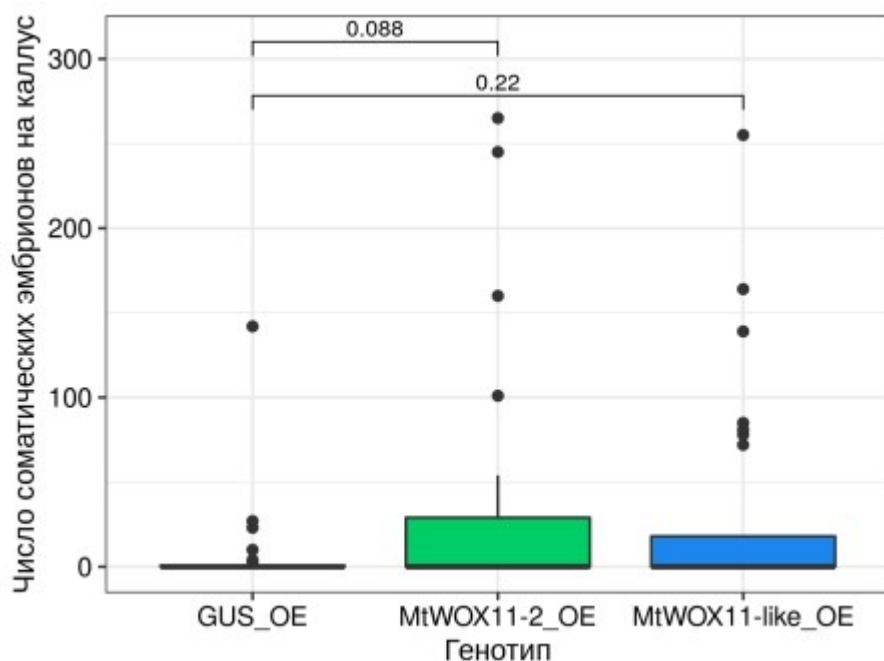


Рисунок 4. Число соматических эмбрионов на каллус, оцененное у каллусов, трансформированных конструкциями для сверхэкспрессии *GUS*, *MtWOX11-2* и *MtWOX11-like*.

Мы предполагаем, что отсутствие значимых различий (с $p\text{-value} < 0.05$) между контрольными и опытными каллусами связано в том числе с недостаточной эффективностью агробактериальной трансформации. В данном эксперименте, как и ранее, мы анализировали каллусы T0, т.е. каллусы, полученные не из трансгенных растений, а из трансформированных эксплантов. Вследствие этого, несмотря на отбор эксплантов на среде с селективным агентом (гигромицином), каллусы содержали также и нетрансгенные части, как в случае опыта, так и в случае контроля, что сглаживало различие между анализируемыми выборками.

Таким образом, данная методика анализа позволяет выявлять гены, сверхэкспрессия которых оказывает сильное стимулирующее воздействие на регенерацию, такие как *MtWOX9-1*. Однако если сверхэкспрессия того или иного гена оказывает более слабый эффект на процессы каллусогенеза и/или регенерации, обнаружить его будет сложнее и нужны будут большие объемы выборок. В связи с этим, в следующем году мы планируем оптимизировать методику агробактериальной трансформации каллусов для повышения количества трансгенной ткани в трансформированных каллусов. Так, показано, что предварительная инкубация агробактерий в среде определенного состава, а также добавление некоторых солей в буфер для инфильтрации значительно увеличивает эффективность трансформации у *A. thaliana* (Wu et al., 2014). Мы планируем опробовать данную методику на эксплантах *M. truncatula*.

Таким образом, на настоящий момент мы оценили влияние на эмбриогенность сверхэкспрессии гена *MtWOX2*, а также генов *MtWOX11-like* и *MtWOX11-2*. К сожалению, особенности нуклеотидной последовательности и/или низкий уровень экспрессии трёх других изучаемых нами генов (*MtWOX9-2*, *MtWOX6-like* и *MtWOX3*) пока не позволили нам получить ПЦР-фрагменты с их кодирующими последовательностями, что является необходимым для создания конструкций для их сверхэкспрессии.

Если в следующем году нам не удастся подобрать нужные условия ПЦР и нужную кДНК для получения данных фрагментов, мы планируем заказать химический синтез кодирующих последовательностей данных генов для оценки влияния их сверхэкспрессии на процессы каллусообразования и соматического эмбриогенеза.

2) Проверка гипотез о взаимодействии *MtNF-YB10* и *MtWOX9-1* за счет консервативных аминокислотных остатков с помощью дрожжевой двугибридной системы и бимолекулярной флуоресцентной комплементации.











На предыдущем этапе, используя дрожжевую двугибридную систему, мы показали, что в клетках дрожжей белок *MtWOX9-1* способен к взаимодействию с белком *MtNF-YB10*, и для

этого взаимодействия необходим гомеодомен белка MtWOX9-1. Также мы обнаружили, что другие гомеодомен-содержащие белки тоже взаимодействуют с MtNF-YB10 в клетках дрожжей. Более того, белок MtWOX9-1, в котором гомеодомен заменен на гомеодомен филогенетически далекого от него белка MtPINTOX, также способен к взаимодействию с белком MtNF-YB10. Это позволило предположить, что для взаимодействия белка MtWOX9-1 с белком MtNF-YB10 необходимы наиболее консервативные аминокислотные остатки гомеодомена MtWOX9-1. Для проверки этой гипотезы мы провели выравнивание гомеодоменов белков, для которых была обнаружена способность к взаимодействию с MtNF-YB10, и выбрали аминокислотные остатки, идентичные у всех анализируемых гомеодоменов (рис. 5). В гомеодоме MtWOX9-1 этим аминокислотным остаткам соответствовали L77, W103 и F104.



Рисунок 5. Выравнивание гомеодоменов белков, для которых была обнаружена способность к взаимодействию с MtNF-YB10. Снизу цветом отмечены проанализированные аминокислотные остатки: красным - аминокислотные остатки, идентичные у всех анализируемых гомеодоменов, коричневым - аминокислотные остатки со сходными у всех анализируемых гомеодоменов физико-химическими свойствами.

Мы проверили, влияют ли аминокислотные замены в данных позициях на способность MtWOX9-1 взаимодействовать с MtNF-YB10 в клетках дрожжей, и обнаружили, что MtWOX9-1, в котором фенилаланин в 104 положении заменен на аланин, демонстрирует более слабое взаимодействие с MtNF-YB10 (рис. 6А).

A	MtWOX9-1	MtWOX9-1-L66A	MtWOX9-1-W103A	MtWOX9-1-F104A
MtNF-YB10				
MtNF-YB10-D32A				
Пустой вектор				













Б	MtWOX9-1	MtWOX9-1-F104A	MtWOX9-1-V100A, F104A	MtWOX9-1-WF104, 104AA	MtWOX9-1-F104A, K108A	Пустой вектор
MtNF-YB10						
Пустой вектор						

Рисунок 6. Результаты анализа взаимодействия белков с помощью дрожжевой двугибридной системы. Дрожжи выращивали на среде без гистидина с добавлением триаминотриазола в концентрации 1 mM. Каждый вариант анализа был проведен в 4 повторностях, из которых на рисунке представлена одна.

Мы предположили, что одновременная замена F104 и соседних консервативных аминокислот может ещё сильнее ингибировать взаимодействие MtWOX9-1 и MtNF-YB10. Однако проверка этой гипотезы не подтвердила наши предположения: замена F104A, как и в первом эксперименте, ухудшала взаимодействие с MtNF-YB10, однако дополнительная замена на аланин соседних консервативных аминокислот (V100, W103, K108) не приводила к ещё большему подавлению взаимодействия по сравнению с заменой F104A (рис. 6, Б).

Таким образом, F104 в гомеодомене MtWOX9-1 является нашим первым кандидатом на роль аминокислотного остатка, важного для взаимодействия данного белка с MtNF-YB10. Данная аминокислота входит в состав третьей альфа-спирали гомеодомена, является высококонсервативной среди гомеодомен-содержащих белков как у растений, так и у животных, и участвует в связывании гомеодомена с ДНК (Doerdelmann et al., 2012, Viola, Gonzalez, 2016). Согласно полученным нами данным, она также может играть роль в белок-белковых взаимодействиях.

За отчетный период мы также проанализировали способность к взаимодействию с MtWOX9-1 белка MtNF-YB10 с аминокислотной заменой D32A, так как на предыдущем этапе мы обнаружили, что аспарагиновая кислота в данном положении характерна для белков MtNF-YB3 и 10, способных к взаимодействию с MtWOX9-1, но заменена на другую аминокислоту у белка MtNF-YB8, не способного к данному взаимодействию. Аминокислотная замена D32A у MtNF-YB10, как и замена F104A у MtWOX9-1, ухудшала взаимодействие, однако не подавляла его полностью (рис.6 А).

Для дальнейшего анализа биологической значимости взаимодействия MtWOX9-1 и MtNF-YB10 мы планируем проверить, будет ли стимулировать соматический эмбриогенез у люцерны белок MtWOX9-1-F104A, а также проверить взаимодействие MtWOX9-1-F104A и MtNF-YB10 с помощью системы бимолекулярной флуоресцентной комплементации. На настоящий момент мы работаем над созданием соответствующих векторных конструкций.

Также мы планируем с помощью дрожжевой двугибридной системы продолжить поиск других аминокислотных остатков, необходимых для взаимодействия MtWOX9-1 и MtNF-YB10.

3) Оценка влияния индуцибельной экспрессии исследуемых генов *CLE* на экспрессию MtWOX9-1, отработка методики культивирования эксплантов *Medicago truncatula* различных линий в жидкой среде для последующей обработки CLE-пептидами.

Ранее нами было показано, что сверхэкспрессия стимулятора соматического эмбриогенеза MtWOX9-1 приводит не только к увеличению эмбриогенности каллусов, но и к изменению уровней экспрессии ряда генов семейства *CLE*, в частности - *MtCLE18*, *MtCLE06* и *MtCLE08*. Поскольку пептиды *CLE* часто влияют на экспрессию генов *WOX* (в ряде случаев - по принципу обратной связи) (Dodueva et al., 2017), мы предположили, что данные гены могут влиять на уровень экспрессии стимулятора СЭ - гена *MtWOX9-1* - и, таким образом, опосредованно влиять на эмбриогенность каллуса. Для проверки данной гипотезы исходно мы планировали трансформировать каллусы конструкциями для сверхэкспрессии перечисленных выше генов *CLE*, проверить наличие в них сверхэкспрессии данных генов и оценить в них уровень экспрессии гена *MtWOX9-1*. С помощью ПЦР в реальном времени мы показали, что сверхэкспрессия *MtCLE18* не оказывает обратного воздействия на уровень экспрессии *MtWOX9-1*. Однако проведение подобного анализа для генов *MtCLE06* и *08* оказалось невозможным, так как каллусы, трансформированные конструкциями для сверхэкспрессии данных генов, не демонстрировали их сверхэкспрессии.

Мы предположили, что сверхэкспрессия *MtCLE06* и *08* оказывает негативное влияние на жизнеспособность каллуса, в связи с чем развиваются только такие каллусы, в которых сверхэкспрессия подавлена. В связи с этим, за отчетный период мы планировали проведение эксперимента с использованием индуцибельной экспрессии данных генов. Для этого мы создали конструкции, в которых кодирующие последовательности *MtCLE06* или *MtCLE08* находятся под промотором, индуцируемым дексаметазоном, и получили каллусы, трансформированные данными конструкциями. Развившиеся каллусы разделяли пополам. Одну половину использовали в качестве контроля, а вторую обрабатывали жидкой средой, содержащей дексаметазон, или пересаживали на твердую среду для культивирования, содержащую дексаметазон. Контрольные каллусы обрабатывали аналогичным образом, однако среда для обработки не содержала дексаметазон. Сбор материала для выделения РНК собирали через 24 часа после начала индукции. Данная система индукции была ранее отработана на *MtCLE18* и было показано, что индукция дексаметазоном может приводить к увеличению уровня экспрессии *MtCLE18* в десятки раз, хотя степень разброса между различными пробами по уровню индукции очень высока. Однако в случае с генами *MtCLE06* и *08* мы не наблюдали увеличения индукции больше, чем в 3.5 раза, ни в одной пробе, и в большинстве проб индукция отсутствовала. Мы предполагаем, что это может быть связано с системами обратной связи, подавляющими экспрессию *MtCLE06* и *08* в каллусах на уровне РНК, например, с помощью РНК-интерференции.

Таким образом, нам не удалось оценить влияние эктопической экспрессии генов *MtCLE06* и *08* на уровень экспрессии *MtWOX9-1* или на соматический эмбриогенез. Однако невозможность добиться их эктопической экспрессии позволяет предположить их негативное влияние на жизнеспособность каллусов. Сверхэкспрессия *MtCLE18* не приводила к изменению эмбриогенности и/или уровня экспрессии *MtWOX9-1* в каллусах. Вследствие этого, мы предполагаем, что возможность использования данных пептидов для стимуляции процесса соматического эмбриогенеза маловероятна.

Также за отчетный период мы планировали отработать методики культивирования эксплантов различных линий в жидкой среде для анализа воздействия химически синтезированных СЛЕ-пептидов на эмбриогенность, однако ни один из изученных нами СЛЕ-пептидов, по видимому, не является потенциальным стимулятором соматического эмбриогенеза.

Тем не менее, мы опробовали методику получения эмбрионов у *M. truncatula* в жидкой среде из эксплантов черешков (Iantcheva et al., 2006). Ранее данная методика была использована нами для анализа влияния гена *MtWOX9-1* на эмбриогенез у высокоэмбриогенной линии R-

108 (Tvorogova et al., 2019). В эксперименте, проведенном за отчетный период, мы проверили, образуются ли соматические эмбрионы в данной системе, если в жидкую среду помимо необходимых регуляторов роста (2.4-D, кинетин и аденин) добавлять антибиотик цефотаксим, который используют при агробактериальной трансформации для уничтожения агробактерий после кокультивации.

В качестве объектов мы использовали высокоэмбриогенную линию R-108 и неэмбриогенную линию 108-1, предковую по отношению к линии R-108 (Hoffmann et al., 1998). Как и ожидалось, условия культивирования эксплантов, у растений линии R-108 способствовали соматическому эмбриогенезу даже в присутствии цефотаксима, в то время как у линии 108-1 они не привели к развитию соматических эмбрионов (рис. 7).

Поскольку цефотаксим не препятствует формированию соматических эмбрионов у высокоэмбриогенной линии, мы предполагаем, что в будущем данный протокол культивирования можно опробовать для агробактериальной трансформации при поиске новых стимуляторов соматического эмбриогенеза.



Рис. 7. А,Б - экспланты неэмбриогенной линии 108-1 (А) и эмбриогенной линии R-108 (Б) после культивации в жидкой среде в условиях, способствующих появлению соматических эмбрионов. В - соматические эмбрионы, образовавшиеся при культивации эксплантов R-108 в жидкой среде в условиях, способствующих появлению соматических эмбрионов.

Использованная литература

- (1) Hoffmann, B.; Trinh, T. H.; Leung, J.; Kondorosi, A.; Kondorosi, E. A New Medicago Truncatula Line with Superior in Vitro Regeneration, Transformation, and Symbiotic Properties Isolated Through Cell Culture Selection. MPMI 1997, 10 (3), 307–315. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.3.307>.
- (2) Iantcheva, A, Vlahova, M., Atanassov, A., Duque, A., Araújo, S., Fevereiro, P. Cell Suspension Cultures. 2006. Medicago truncatula Handbook.

- (3) Doerdelmann, T.; Kojetin, D. J.; Baird-Titus, J. M.; Solt, L. A.; Burris, T. P.; Rance, M. Structural and Biophysical Insights into the Ligand-Free Pitx2 Homeodomain and a Ring Dermoid of the Cornea Inducing Homeodomain Mutant. *Biochemistry* 2012, 51 (2), 665–676. <https://doi.org/10.1021/bi201639x>.
- (4) Wu, H.-Y.; Liu, K.-H.; Wang, Y.-C.; Wu, J.-F.; Chiu, W.-L.; Chen, C.-Y.; Wu, S.-H.; Sheen, J.; Lai, E.-M. AGROBEST: An Efficient Agrobacterium-Mediated Transient Expression Method for Versatile Gene Function Analyses in Arabidopsis Seedlings. *Plant Methods* 2014, 10 (1), 19. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-19>.
- (5) Viola, I. L.; Gonzalez, D. H. Chapter 6 - Structure and Evolution of Plant Homeobox Genes. In *Plant Transcription Factors*; Gonzalez, D. H., Ed.; Academic Press: Boston, 2016; pp 101–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00006-3>.
- (6) Dodueva, I. E.; Tvorogova, V. E.; Azarakhsh, M.; Lebedeva, M. A.; Lutova, L. A. Plant Stem Cells: Unity and Diversity. *Russ J Genet Appl Res* 2017, 7 (4), 385–403. <https://doi.org/10.1134/S2079059717040025>.
- (7) Tvorogova, V. E.; Fedorova, Y. A.; Potsenkovskaya, E. A.; Kudriashov, A. A.; Efremova, E. P.; Kvitkovskaya, V. A.; Wolabu, T. W.; Zhang, F.; Tadege, M.; Lutova, L. A. The WUSCHEL-Related Homeobox Transcription Factor MtWOX9-1 Stimulates Somatic Embryogenesis in *Medicago Truncatula*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2019, 138 (3), 517–527. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01648-w>.
- (8) Tvorogova, V. E.; Krasnoperova, E. Y.; Kudriashov, A. A.; Kuznetsova, K. A.; Potsenkovskaya, E. A.; Fedorova, Y. A.; Ludmila Lutova. Transcriptomic Analysis of *Medicago Truncatula* Calli with MtWOX9-1 Overexpression. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 2019, 23 (6), 691–699. <https://doi.org/10.18699/VJ19.542>.

Публикации

1. Wolabu, T. W.; Wang, H.; Tadesse, D.; Zhang, F.; Behzadirad, M.; Tvorogova, V. E.; Abdelmageed, H.; Liu, Y.; Chen, N.; Chen, J.; Allen, R. D.; Tadege, M. WOX9 Functions Antagonistic to STF and LAM1 to Regulate Leaf Blade Expansion in *Medicago Truncatula* and *Nicotiana glauca*. *New Phytologist* 2021, 229 (3), 1582–1597. <https://doi.org/10.1111/nph.16934>.

2. V. Tvorogova, E. Krasnoperova, A. Kudryashov, K.Kuznetsova, E. Potsenkovskaia, L. Lutova MtWOX9-1 gene as somatic embryogenesis stimulator. Search of targets. Abstract book of The 12th International Multiconference “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology” (6-10 July, 2020, Novosibirsk). P.358.

3. E.Potsenkovskaia, V.Tvorogova, M.Lebedeva, L.Lutova. Somatic Embryogenesis Regulators in *Medicago truncatula*. Plant Posters. In *Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 2020, 56, 42–65, doi:10.1007/s11626-020-00455-4.

4. E. Krasnoperova, V.Tvorogova, L.Lutova. WOX family genes in somatic embryogenesis. *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, And Biotechnology. The 6th International Scientific Conference. Abstracts. 14-18 June 2021, Novosibirsk, Russia. Abstracts. P. 126.*

5. Zlydneva N.S., Kudriashov A.A., Tvorogova V.E., Lutova L.A. CLE-peptides in *Medicago truncatula* somatic embryogenesis. The 6th International Scientific Conference. Abstracts. 14-18 June 2021, Novosibirsk, Russia. Abstracts. P. 237

6. Yakovleva D.V., Tvorogova V.E., Lutova L.A. Evaluation of the effect of the WOX family genes overexpression on the somatic embryogenesis. The 6th International Scientific Conference. Abstracts. 14-18 June 2021, Novosibirsk, Russia. Abstracts. P.234

7. Tvorogova V., Baltin S., Krasnoperova E., Potsenkovskaia E., Yakovleva D., Zlydneva N., Lutova L. The search of somatic embryogenesis regulators in *Medicago truncatula*. *Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution: GRRE2021. Abstracts. P. 30*