

На правах рукописи



Евкайкина Анастасия Игоревна

**Роль транскрипционных факторов KNOX и YABBY в регуляции
морфогенеза в апикальной меристеме побега
Huperzia selago (L.) Bernh. ex Schrank & Mart. (Lycopodiophyta)**

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт–Петербург

2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук

Научный руководитель

кандидат биологических наук,
Войцеховская Ольга Владимировна

Официальные оппоненты:

Цыганов Виктор Евгеньевич
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Всероссийский научно-
исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии,
заведующий лабораторией

Лебедева Мария Александровна,
кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования Санкт-Петербургский
государственный университет, старший
научный сотрудник кафедры генетики и
биотехнологии

Ведущая организация

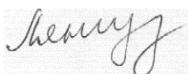
**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт
физиологии растений им. К.А.
Тимирязева Российской академии наук**

Защита состоится 17 октября 2019 г. в 11.00 часов на заседании совета Д 002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2, тел. (812)372-54-42, факс (812)372-54-43, dissovet.d00221102@binran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (www.binran.ru).

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Выявление механизмов развития растений, обладающих различными планами строения, является важнейшей проблемой биологии и проливает свет на вопросы эволюции морфогенеза растений. Механизмы функционирования апикальных меристем побега (АМП) у эволюционно древних таксонов высших растений остаются малоизученными. Между тем, представители этих таксонов принципиально отличаются от цветковых растений по структурно-функциональной организации АМП, генезу плазмодесменных сетей, соединяющих клетки АМП, и гормональной регуляции процессов роста. Представители отдела плауновидные - наиболее эволюционно древние из ныне живущих сосудистых растений (Banks et al., 2011). Эта группа является сестринской по отношению к другим высшим растениям; листья у этой группы и у линии папоротниковидные/семенные растения возникли независимо (микро- и макрофилльная линии эволюции, соответственно). В отделе плауновидные выделяют разноспоровые плауны порядка Selaginellales с моноплексной АМП (как у папоротниковидных), а также разноспоровые плауны порядка Isoëtales и равноспоровые плауны порядка Lycopodiales, с симплексной АМП (как у голосеменных растений). Сравнительное изучение функционирования апикальной меристемы моноплексного и симплексного типов представляет исключительный интерес в контексте выявления анцестрального для высших растений структурного типа апикальной меристемы.

Гормональная и молекулярно-генетическая регуляция функционирования АМП плауновидных исследована крайне мало. В силу их особого филогенетического положения представляет большой интерес изучить, насколько механизмы функционирования АМП у представителей этого отдела сходны с таковыми линии папоротниковидные/семенные растения. Однако, в настоящее время все еще имеет место колоссальное отставание исследований методами молекулярной и клеточной биологии представителей наземных растений, не относящихся к покрытосеменным. Это связано с рядом трудностей: (1) очень большой размер геномов равноспоровых плаунов, хвощей, папоротниковидных и голосеменных делает практически невозможным их секвенирование и аннотирование; (2) чередование самостоятельных свободноживущих стадий несеманных растений (гаметофита и спорофита) и длительный жизненный цикл (годы) хотя бы одной из стадий затрудняет их ведение в культуре и применение методов генетики и геномной инженерии; (3) высокий уровень накопления в тканях вторичных метаболитов (лигнины, смолы и др.) интерферирует с большинством методов молекулярной биологии. В связи с этим в настоящее время большинство исследований сосредоточены на единичных модельных объектах, для которых секвенированы и аннотированы геномы, в т.ч. для *Selaginella*

moellendorffii (кл. Isoetopsida). С появлением технологий секвенирования нового поколения возникает возможность впервые пополнить знания о представителях широкого круга таксонов Embryophyta уникальными данными об их молекулярных и клеточных особенностях.

У всех высших растений АМП отвечает за формирование важнейших фотосинтетических органов – листьев. Поэтому сравнение молекулярных механизмов функционирования АМП различных таксонов целесообразно проводить на примере регуляции формирования листа. Молекулярно-генетические механизмы, регулирующие заложение листа, хорошо изучены у покрытосеменных. Основными регуляторами являются (1) транскрипционные факторы KNOX I класса, которые отвечают за поддержание пула недифференцированных стволовых клеток в меристеме, и (2) транскрипционные факторы ARP и YABBY, которые являются антагонистами KNOX. Взаимодействие ARP и YABBY с KNOX у покрытосеменных приводит к смене программы недетерминированности и неограниченного роста на программу ограничения роста и детерминированности, т.е. к запуску органогенеза; таким образом, первым маркером образования листа в АМП покрытосеменных является подавление экспрессии генов *KNOX* в группе клеток – предшественников примордия. Биоинформатический анализ геномов и транскриптомов представителей Lycopodiophyta, Monilophyta (папоротниковидных *sensu lato*) и Pinophyta выявил наличие гомологов *KNOX*, а также других маркеров апикальных инициалей и недетерминированных клеток меристемы (*CLE*, *WOX*, *HD-Zip III*), у всех высших растений (Ambrose et al., 2016; Floyd, Bowman, 2006, 2007; Frank et al, 2015; Nardmann, Werr, 2012; Vasco et al., 2016). В то же время, данных относительно гомологов ARP и YABBY у высших растений, не относящихся к покрытосеменным, намного меньше. Обнаружение транскриптов генов-гомологов *KNOX* и *ARP* в АМП разноспорового плауна *Selaginella kraussiana* и в развивающихся листовых зачатках папоротника *Osmunda regalis* послужило основанием для утверждения о консервативности KNOX/ARP-взаимодействий у растений и о вероятном возникновении системы KNOX/ARP уже у общего предка плауновидных и других высших растений (Theodoris et al., 2003; Harrison et al, 2005; Luo et al., 2005; Nay, Tsiantis, 2009). Анализ генома модельных высших споровых растений с АМП моноплексного типа не выявил в них гомологов генов *YABBY*, и поэтому считалось, что *YABBY* возникли в эволюции только у семенных растений (Floyd, Bowman, 2006, 2007; Tomescu et al., 2014).

На сегодняшний день растений имеются три основные точки зрения на возникновение листьев в разных таксонах: (1) листья всех растений гомологичны системе теломов безлистных Rhyniophyta (Zimmerman, 1952); (2) листья у одних растений возникли

как результат преобразования системы теломов (т.н. теломные листья или макрофиллы), а у других - *de novo* как выросты коры и эпидермы теломов (т.н. энации или микрофиллы) (Gifford and Foster, 1989); (3) листья в разных таксонах растений возникали независимо и многократно, в том числе путем стерилизации спорангиев (Friedman, 2004; Kenrick, Crane, 1997). Прояснить этот вопрос могло бы сравнение молекулярных программ образования листа в разных таксонах растений (Lutova et al., 2015).

Цель и задачи работы. Целью данной работы стала характеристика клеточных и молекулярных механизмов функционирования симплексной апикальной меристемы побега равноспорового плауна *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank & Mart в рамках разработки вопроса об эволюционных гомологиях листьев высших растений.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать структуру апикальной меристемы побега *Huperzia selago* по особенностям формирования зональной структуры, числу зон и характеру делений клеток зоны поверхностных апикальных инициалей. Охарактеризовать тип и изучить регуляцию формирования плазмодесм в апикальной меристеме побега *Huperzia selago*.

2. В полученных последовательностях секвенированного транскриптома апексов побега *H. selago* после *de novo* сборки и аннотации выявить гены-гомологи *KNOX*, экспрессирующиеся в апикальной меристеме побега *H. selago*. Клонировать фрагменты генов гомологов *KNOX H. selago*, получить меченые дигоксигенином РНК-зонды к *HsKNOX* и выявить локализацию транскриптов этих генов в апикальной меристеме побега *H. selago* методом гибридизации РНК-РНК *in situ*.

3. Для сравнения молекулярно-генетической регуляции симплексной апикальной меристемы побега *H. selago* и моноплексной апикальной меристемы побега *Selaginella kraussiana* клонировать фрагмент кДНК меристемспецифичного гена *SkKNOX1 S. kraussiana*, получить меченые дигоксигенином РНК-зонды к *SkKNOX1* и выявить локализацию транскриптов гена *SkKNOX1* в апикальной меристеме побега *S. kraussiana*.

4. Провести поиск в полученных последовательностях секвенированного транскриптома апексов побега *H. selago* последовательностей транскриптов генов-гомологов антагонистов *KNOX - ARP* и *YABBY*. В случае выявления клонировать фрагменты кДНК гомологов *ARP* и *YABBY H. selago*. На основе клонированных фрагментов получить меченые дигоксигенином РНК-зонды и провести эксперименты по выявлению локализации транскриптов этих генов в апикальной меристеме побега *H. selago*.

5. Сравнить сходство и различия участия транскрипционных факторов *KNOX* и их антагонистов в заложении листа в апикальной меристеме побега представителей двух

классов плауновидных - *Selaginella kraussiana* (Isöetopsida) и *Huperzia selago* (Lycopodiopsida).

Научная новизна работы. Впервые выявлены и охарактеризованы гены-гомологи *KNOX*, экспрессирующиеся в АМП симплексного типа равноспорового плауна (*H. selago*). Впервые для несеменных растений обнаружен гомолог транскрипционных факторов *YABBY* – *HsYABBY* (ранее считалось, что гены *YABBY* свойственны только лишь семенным растениям), и исследован паттерн экспрессии гена *HsYABBY* в АМП *H. selago*. Полученные данные являются аргументами в поддержку точки зрения о гомологии листьев всех групп сосудистых растений. Наличие генов *YABBY* у плауновидных с симплексным типом АМП является новым аргументом в пользу анцестральности данного типа для всех наземных растений, а также указывает на гомологию вторичных плазмодесм (характерных для растений с данным типом меристемы) у наземных растений.

Теоретическая и практическая ценность. Адаптирован и частично разработан комплекс цитологических и молекулярно-биологических методов применительно к представителям равноспоровых плаунов на модели *Huperzia selago*. Часть методов впервые может быть применена для решения научных задач на широком круге объектов, не относящихся к покрытосеменным. Полученные результаты могут быть использованы при чтении курсов лекций по ботанике, эволюции и физиологии растений.

Положения, выносимые на защиту.

1. В апексах побега *Huperzia selago* экспрессируются два гена-гомолога *KNOX* I класса и три гена-гомолога *KNOX* II класса.

2. Транскрипты гомологов *KNOX* I класса *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* локализируются как в центральной и периферической зонах симплексной апикальной меристемы побега, так и в зачатках листьев и спорангиев, с более низким уровнем экспрессии в апикальных инициалах.

3. У несеменных растений впервые обнаружена экспрессия гена-гомолога *YABBY*, что указывает на вероятное возникновение данных транскрипционных факторов уже у общего предка всех наземных растений.

4. Экспрессия гена *HsYABBY* *Huperzia selago* детектируется как в центральной и периферической зонах симплексной апикальной меристемы побега, так и в зачатках листьев и спорангиев, но не в апикальных инициалах.

5. Колокализация экспрессии *HsYABBY*, *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* у *Huperzia selago* указывает на отсутствие антагонистических взаимодействий этих генов.

Личный вклад соискателя. Все исследования, посвященные изучению молекулярно-генетических и механизмов регуляции функционирования апикальной

меристемы побега *H. selago*, проведены лично автором. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем работы.

Степень достоверности. Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием современных методик на высокотехнологичном оборудовании лаборатории молекулярной и экологической физиологии, а также Центра коллективного пользования научным оборудованием «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» БИН РАН.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены на 7 Студенческой Конференции Скандинавских обществ физиологов растений (SPPS) (г. Лауласмаа, Эстония, 2012 г.); на II(X) Молодежной конференции ботаников (Санкт-Петербург, 2012 г.); на Международной конференции «Plant Vascular Biology - PVB 2013», (г. Хельсинки, Финляндия, 2013 г.); на Международном XXV Конгрессе Скандинавских обществ физиологов растений (SPPS) (г. Стокгольм, Швеция, 2015 г.); на VIII Съезде ОФР России (Петрозаводск, 2015 г.); на III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (2015 г.); на V международной Школе для молодых ученых «Эмбриология, генетика, биотехнология» памяти Т. Б. Батыгиной (Санкт-Петербург, 2016 г.); на международной конференции «Intercellular communication in development and disease» (Берлин, Германия, 2017 г.); на IV (XII) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (2018 г.); на XIV Съезде Русского Ботанического Общества (Махачкала, 2018 г.).

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Исследования проводились в период с 2012 г. по 2019 гг. в рамках плановых тем НИР лаборатории молекулярной и экологической физиологии БИН РАН, грантов РФФИ №12-04-32168, 13-04-02000, 14-04-01397, 17-04-00837.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 173 стр. машинописного текста, содержит 7 таблиц, иллюстрирована 31 рисунком и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, который включает 254 источника, в том числе 251 ссылку на работы зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы изложены современные представления о структурных типах организации апикальной меристемы побега, а также об особенностях ее симпластической организации, у современных высших растений различной таксономической

принадлежности. Особое внимание уделяется молекулярной характеристике и анализу паттернов экспрессии для генов, кодирующих факторы транскрипции KNOX, ответственных за сохранение свойств меристемспецифичности, а также их основных антагонистов – YABBY и ARP, которые способствуют клеточной дифференциации, заложению листовых примордиев и формированию в них полярности строения. Также в обзоре литературы рассмотрены современные гипотезы происхождения листьев сосудистых растений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Растительный материал.

Растения *Huperzia selago* собирали в Кузнечном, на скалах берега Ладожского озера, с мая по сентябрь. Для работы использовались верхушки побегов, которые или сразу фиксировали в 4% параформальдегиде (м/об) в буфере MTSB (50 mM PIPES; 5 mM EGTA; 5 mM MgSO₄; pH 6.9-7.0) с добавлением детергентов (0.2% Tween-20 (об/об); 0.2% Triton X-100 (об/об)) с последующим проведением в парафин для иммуногистохимии, или фиксировали 4% (м/об) параформальдегиде с добавлением глутаральдегида (3% об/об) в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2) для проведения в смолу для световой микроскопии, или же делали навески из растертых верхушек побегов растений для молекулярных работ. Вегетативные побеги *Selaginella kraussiana* собирали в оранжерее Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН с мая по август.

Молекулярно-генетические методы. Тотальная РНК выделялась из верхушек побегов *Huperzia selago* с помощью реагента TRIzol. ОТ-ПЦР проводился в автоматическом амплификаторе C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad). Продукты ПЦР клонировали в векторы pBluescript KS(+) (Stratagene, USA) или pJET1.2. (ThermoFisher Scientific, Germany). Обе плазмиды содержат промоторы РНК-полимеразы (T7, T3; Roche Diagnostics, Germany). Наличие вставки подтверждалось методом ПЦР с праймерами к плазмидам и специфическими праймерами к целевой вставке, а также секвенированием.

Штаммы бактерий. Для наработки плазмид с целевой вставкой использовались лабораторные штаммы бактерий *Escherichia coli* TOP 10F и XL1. Blue (Life Technologies).

Экстрагирование тотального белка и вестерн-блоттинг. Для иммунодетекции целевых белков выполняли экстракцию тотального белка *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Selaginella kraussiana* и *Huperzia selago* с помощью фенольного метода экстракции (Carpentier et al., 2005). Выделенный тотальный белок подвергался электрофоретическому разделению и блоттингу на PVDF мембрану (Bio-Rad Laboratories, США). Блоты блокировали 2.5% обезжиренным молоком (Blotto, Santa-Cruz Biotechnology, США) в TBS (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl) с 0,1% Tween-20® (TBS-T). KNOX и ARP белки

идентифицировали с помощью кроличьих антител к STM и AS1 (Agrisera). (конечное разведение для первичных антител составляло 1:1000) и HRP-конъюгированных антител к IgG кролика (Agrisera). Отмывку производили в TBS-T. С помощью реагента SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, США) получали хемилюминесцентный сигнал, который детектировали на чувствительной пленке Fujifilm super RX.

Световая микроскопия. Анализ гистологической организации апикальных меристем растений проводился с помощью световой микроскопии срезов, окрашенных толуидиновым синим. Для детекции тотальной РНК на срезах тканей *Selaginella kraussiana* и *Huperzia selago* использовали флуоресцентный акридиновый оранжевый краситель. Для выявления локализации мРНК генов *KNOX* и *YABBY* РНК-содержащие срезы подвергались РНК-РНК гибридизации *in situ*: обводненные ткани гибридизировали с полученными методом *in vitro* транскрипции РНК-зондами (сконструированными на основе антисенс- и сенс-последовательностей), содержащими меченые дигоксигенином нуклеотиды. Срезы отмывали от не связавшихся зондов в жестких условиях, и инкубировали с антителами к дигоксигенину (Agrisera), конъюгированными с щелочной фосфатазой. Детекцию активности щелочной фосфатазы на срезах проводили по окрашиванию с использованием левамисола, хлорид нитросинего тетразолия и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата. Визуализация проводилась с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus BX51 (Япония) и флуоресцентного моторизованного микроскопа Axio Imager Z1 (Carl Zeiss).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Подсчет плазмодесм в апикальной меристеме побега *Huperzia selago* проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Hitachi H-600 (Hitachi), а также Libra 120 Plus (Carl Zeiss).

Введение цитокинина в побеги *Huperzia selago*. Отрезанные побеги растений *Huperzia selago* инкубировали на водном растворе 6-бензил-аминопурина (6-БАП) концентрацией 5×10^{-5} М в течение 16 часов. Раствор 6-БАП поступал в побеги с транспирационным током. По окончании опыта апексы экспериментальных и контрольных (обработанных водой) растений фиксировали для трансмиссионной электронной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Характеристика строения апикальной меристемы побега *Huperzia selago*, ее симпластической организации и особенностей заложения листа

Апикальная меристема побега (АМП) *Huperzia selago* обладает зоной поверхностных инициалей, состоящей из 4-7 относительно крупных призматических клеток, которые делятся почти исключительно антиклинально. Непосредственно под

поверхностными инициалами располагается зона подповерхностных инициалей, состоящая на продольном срезе из 2-3 слоев крупных изодиаметрических клеток - производных периклиальных делений поверхностных инициалей. Они делятся в разных направлениях. На расстоянии 4-5 клеток от поверхности апекса подповерхностные инициали начинают делиться преимущественно параллельно оси побега (тангентально) или косотангентально, вытягиваться в продольном направлении и дифференцироваться в клетки центрального прокамбиального тяжа. По периферии поверхностные и подповерхностные инициали окружены несколькими десятками клеток, которые делятся как анти- так и периклиально. Совокупность этих клеток образует периферическую, или органогенную, зону, где происходит заложение листьев. На противоположных краях апекса, происходит одновременное образование зачатков двух листьев. Инициации листа *H selago* предшествуют неоднократные периклиальные деления группы из 3-5 поверхностных клеток в периферической части апекса. В результате этих делений в периферической части апекса различимы зачатки листьев, находящихся на разных стадиях развития. Плотность плазмодесм в стенках клеток АМП *Huperzia selago* очень низкая. По визуальной оценке, она ниже, чем в меристеме покрытосеменных растений. Нередко встречаются Н- и У-образные ветвящиеся плазмодесмы, структурно соответствующие определению вторичных плазмодесм. Гормональной индукции образования плазмодесм (с помощью введения 6-бензил-аминопурина (6-БАП) с транспирационным током) в работе не выявлено (рис. 1)

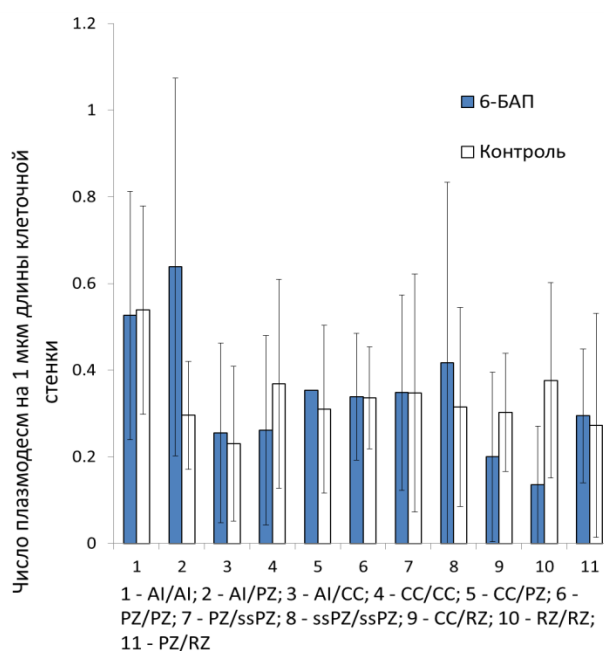


Рис. 1. Распределение плазмодесм между клетками меристемы в побегах после 16-часовой экспозиции с водой (контроль) или 6-БАП. AI, апикальные инициали; PZ, поверхностные клетки

периферической зоны; СС, центральная зона; ssPZ, подповерхностные клетки периферической зоны; RZ, стержневая зона. Масштабная линейка: 50 мкм (А,В,Д); 500 нм (Ж, сверху); 200 нм (Ж, снизу).

2. Исследование внутритканевой локализации транскриптов *SkKNOX1* в апикальной меристеме побега *Selaginella kraussiana*

В рамках данной работы была проведена оптимизация методики подготовки тканей *S. kraussiana* и *H. selago* для проведения исследований характера экспрессии генов, связанных как с меристематическими свойствами апикальной меристемы побега растения, так и клеточной дифференциацией в процессе заложения и формирования листа. Получены РНК-содержащие срезы растительных тканей для изучения характера экспрессии целевых генов у *S. kraussiana* и *H. selago*. Для изучения характера экспрессии генов *KNOX I* класса в апикальной меристеме побега *S. kraussiana* была амплифицирована полная кодирующая последовательность *SkKNOX1* (GenBank, AY667449) *Selaginella kraussiana* с помощью специфических праймеров, подобранных к известной нуклеотидной последовательности (Harrison et al., 2005). На ее основе методом *in vitro* транскрипции были синтезированы меченые дигоксигенином РНК-зонды. Выявление клеточно-тканевых доменов экспрессии *SkKNOX1* проводили методом РНК-РНК гибридизация *in situ*. Оказалось, что транскрипты *SkKNOX1*, как и транскрипты генов *KNOX I* класса семенных растений, детектируются в периферической части АМП *S. kraussiana*, за исключением единственной апикальной инициали ближайших производных, и не визуализируются в зоне заложения листовых примордиев, а также в развивающихся листовых примордиях (рис. 2).

3. Подбор антител к белкам KNOX несеменных растений не выявил специфичных антител

Для оценки возможности визуализации мест локализации белков KNOX I класса в клетках АМП с помощью иммуногистохимии, с целью дальнейшего сопоставления с локализацией их собственной мРНК, методом иммуноблоттинга был проведен анализ специфичности коммерческих антител (Agriser, Швеция), полученных к белку STM *Arabidopsis thaliana*. Несмотря на то, что в образцах выделенного тотального белка растений *A. thaliana* дикого типа (Col-0) визуализировался белковый продукт с ожидаемым молекулярным весом (42 кДа), в образцах тотального белка мутантов-нокаутов *stm* *A. thaliana* обнаруживался белковый продукт со схожим молекулярным весом. Поэтому был сделан вывод о неспецифичном связывании антител, и их непригодности для дальнейшего тестирования.

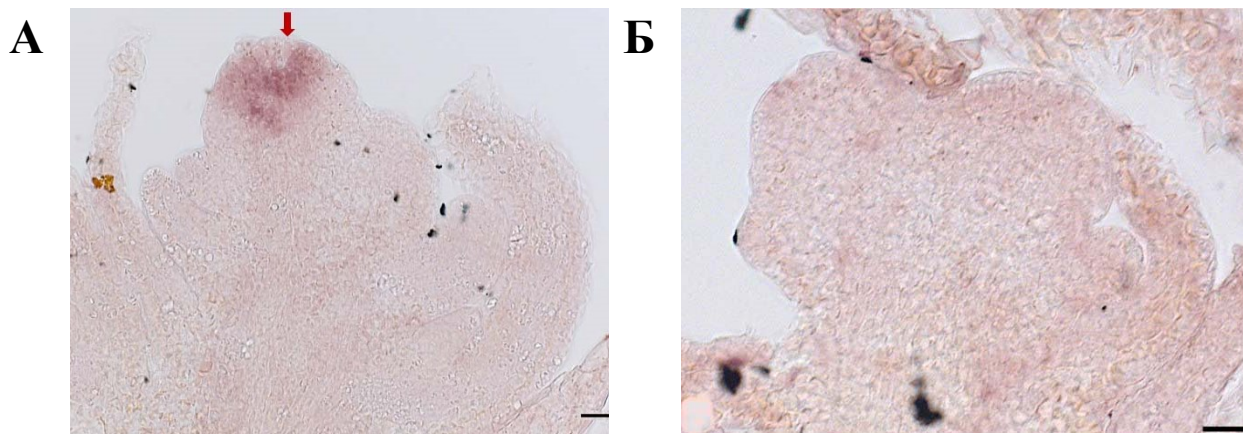


Рис. 2. Внутритканевая локализация транскриптов *SkKNOX1* в апикальной меристеме *Selaginella kraussiana*. А, гибридизация медианных срезов верхушек побегов *Selaginella kraussiana* с антисенс РНК-зондами. Кирпичная окраска маркирует домен экспрессии гена *SkKNOX1*. Стрелка указывает на единственную апикальную инициаль. Б, гибридизация медианных срезов верхушек побегов *Selaginella kraussiana* с сенс РНК-зондами. (отрицательный контроль). Масштабная линейка: 50 мкм.

4. Выделение тотальной РНК из верхушек побегов *Huperzia selago* с целью дальнейшего анализа транскриптома, и сам анализ, позволили выявить гены *KNOX I* класса *Huperzia selago*

Из верхушек побегов *Huperzia selago* была выделена тотальная РНК. Ее обогащение polyA-РНК, синтез и секвенирование кДНК, а также сборка полученных последовательностей, проводились центром SciLifeLab в рамках сотрудничества с Университетом Стокгольма, Швеция (Evkaikina et al., 2017). Длина прочтений составляла не менее 250 нуклеотидов. Сборка проводилась дважды, вторая сборка дала результаты высокого качества. Поиск гомологов целевых генов проводили при помощи функции BlastX search используя Blast 2.2.29+ (Camacho et al., 2009) и отбирали по 20 лучших фрагментов для каждого транскрипта. С помощью Blast2GO V.2.8.0 (Conesa et al., 2005) восстанавливали соответствующие GO (Gene Ontology) идентификаторы и, в соответствии с протоколами Gene Ontology Consortium (2001), отбрасывали фрагменты, которые не использовались для аннотирования. Было выявлено пять транскриптов *KNOX* генов: два транскрипта генов *KNOX I* класса: *HsKNOX1-1* (GenBank, KX761181) и *HsKNOX1-2* (GenBank, KX761182), и три - генов *KNOX II* класса: *HsKNOX2-1* (GenBank, KX761185), *HsKNOX2-2* (GenBank, KX761184) и *HsKNOX2-3* (GenBank, KX761183).

5. Клеточный паттерн локализации транскриптов *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* в симплексной АМП *Huperzia selago* отличается от локализации транскриптов *SkKNOX1* в моноплексной АМП *Selaginella kraussiana*

РНК-зонды для исследования характера экспрессии данных генов были синтезированы на основе полной кодирующей последовательности *HsKNOX1-1* *Huperzia selago*, а также коротких переменных фрагментов кодирующих последовательностей *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2*. Выявление клеточно-тканевых доменов

экспрессии *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* в тканях верхушек побегов *H. selago* методом РНК-РНК гибридизации *in situ* показало, что паттерн локализации отличается от описанного для семенных растений и для *Selaginella kraussiana*, и, напротив, схож с таковым продуктов генов *KNOX* I класса папоротниковидных - растений макрофилльной линии эволюции. мРНК *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* визуализируется во всех клетках симплексной АМП (рис. 3, 4). Наиболее сильный уровень сигнала наблюдается в периферической зоне АМП, где происходит заложение листовых примордиев. Относительно слабый уровень сигнала детектируется в апикальных инициалах, а также в субапикальных клетках центральной зоны АМП. Сильный уровень сигнала также визуализируется в развивающихся листовых примордиях, зачатках спорангиев, центральном прокамбиальном тяже и в прокамбии листовых следов.

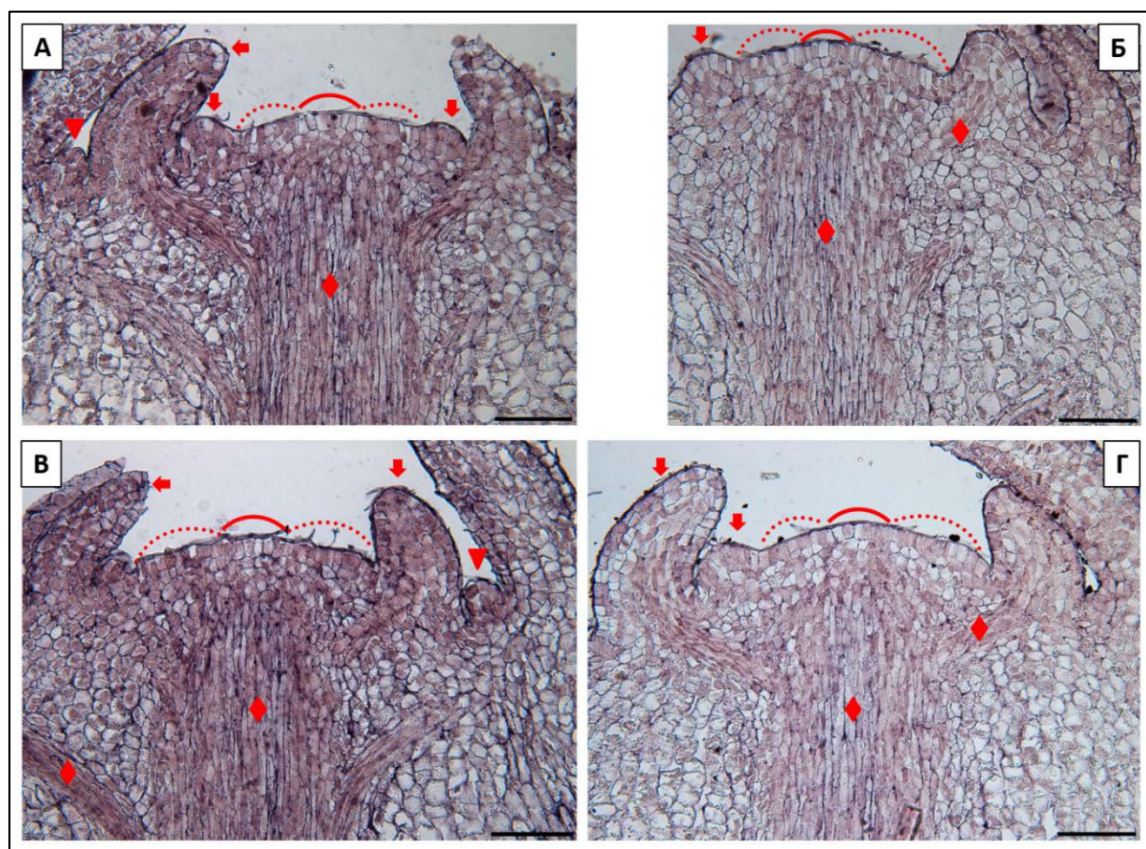


Рис. 3. Внутритканевая локализация транскриптов *HsKNOX1-1* в апикальных меристемах побегов *Huperzia selago* методом РНК-РНК гибридизации *in situ*. **А**, гибридизация медианных срезов верхушек побегов *Huperzia selago* с антисенс РНК-зондами. В эксперименте наносилось 80 нг РНК-зондов на стекло. **Б**, гибридизация медианных срезов верхушек побегов *Huperzia selago* с сенс РНК-зондами (отрицательный контроль). В эксперименте наносилось 80 нг РНК-зондов на стекло. **В**, гибридизация медианных срезов верхушек побегов *Huperzia selago* с антисенс РНК-зондами. В эксперименте наносилось 150 нг РНК-зондов на стекло. **Г**, гибридизация медианных срезов верхушек побегов *Huperzia selago* с сенс РНК-зондами (отрицательный контроль). В эксперименте наносилось 150 нг РНК-зондов на стекло. мРНК *HsKNOX1-1* детектируется в АМП (центральная зона обозначается изогнутой линией; периферическая зона обозначена изогнутой пунктирной линией). Наиболее сильный сигнал наблюдается в периферической зоне АМП, там, где происходит заложение листовых примордиев (изогнутая пунктирная линия), в развивающихся листовых примордиях (стрелки), зачатках спорангиев (вершина стрелки), центральном прокамбиальном тяже и прокамбии листовых следов (ромбы). Относительно слабый сигнал визуализируется в апикальных инициалах

АМП, а также в субапикальных клетках центральной зоны АМП. В мезофилле зрелых листьев уровень сигнала заметно снижается. Масштабная линейка: 100 мкм.

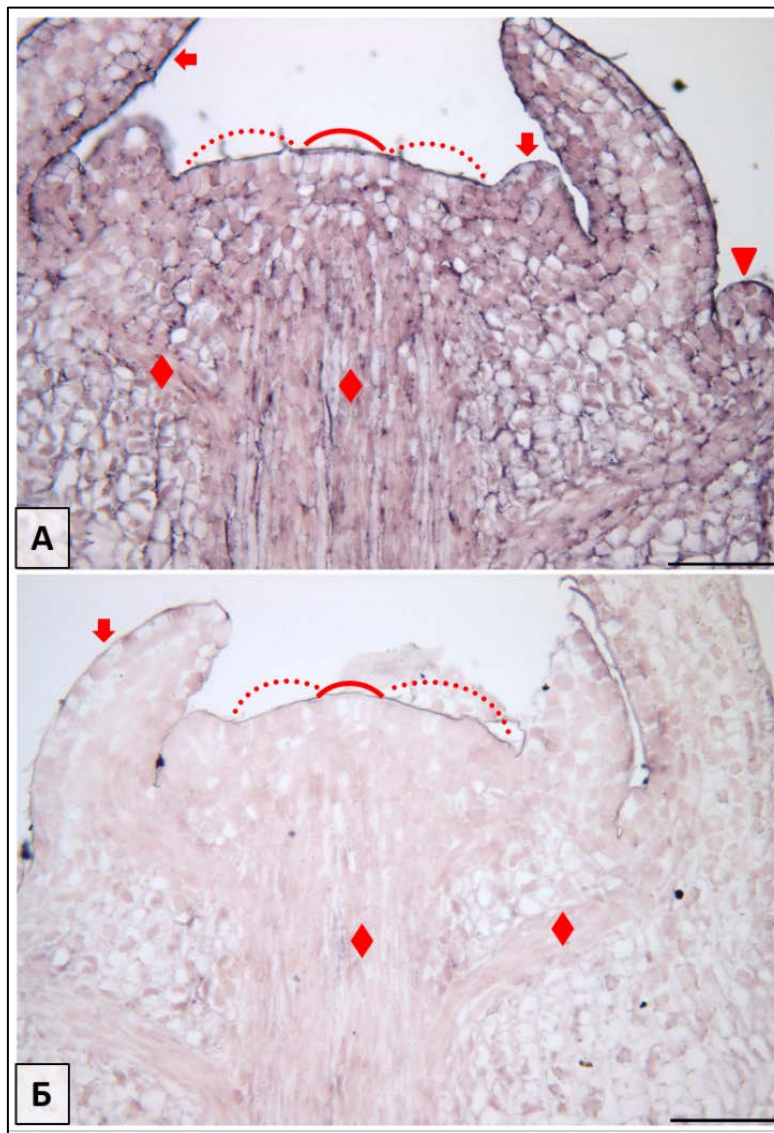


Рис. 4. Внутритканевая локализация транскриптов *HsKNOX1-2* в апикальных меристемах побегов *Huperzia selago*. **А**, гибридизация медианных срезов верхушек побегов *Huperzia selago* с антисенс РНК-зондами. В эксперименте наносилось 20 нг РНК-зондов на стекло. **Б**, гибридизация медианных срезов верхушек побегов *Huperzia selago* с сенс РНК-зондами. (отрицательный контроль). В эксперименте наносилось 20 нг РНК-зондов на стекло. мРНК *HsKNOX1-2* детектируется в АМП (центральная зона обозначена изогнутой линией; периферическая зона обозначена изогнутой пунктирной линией). Наиболее сильный сигнал наблюдается в периферической зоне АМП, где происходит заложение листовых примордиев (изогнутая пунктирная линия), в развивающихся листовых примордиях (стрелки), зачатках спорангиев (вершина стрелки), центральном прокамбиальном тяже и прокамбии листовых следов (ромбы). Относительно слабый сигнал визуализируется в апикальных инициалах АМП. В мезофилле более зрелых листьев уровень сигнала заметно снижается. Масштабная линейка: 100 мкм.

6. Поиск в полученных последовательностях транскриптома верхушек побега *Huperzia selago* генов-гомологов *ARP* и *YABBY*, экспрессирующихся в АМП

В ходе биоинформатического анализа транскриптома верхушек побегов *H. selago* был выявлен *HsYABBY* (GenBank, KX761186) - гомолог семейства генов *YABBY*, ответственных за заложение и полярное развитие листа семенных растений. последовательностей, гомологичных генам семейства *ARP*, также регулирующих

заложение и дифференциацию тканей листа, в транскриптом обнаружено не было. Тогда был предпринят поиск методом ОТ-ПЦР с помощью вырожденных праймеров, а также попытки детекции белка-гомолога ARP с помощью антител к ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) *Arabidopsis thaliana* в образцах тотального белка *H. selago*. В качестве положительного контроля брали образцы тотального белка *Arabidopsis thaliana*, *Selaginella kraussiana* и *Pisum sativum*. У них детектировались на слабом уровне белковые продукты, молекулярный вес которых соответствует ожидаемому (рис. 5Б). Для *Huperzia selago* белков-гомологов ARP не обнаружено (рис. 5Б).

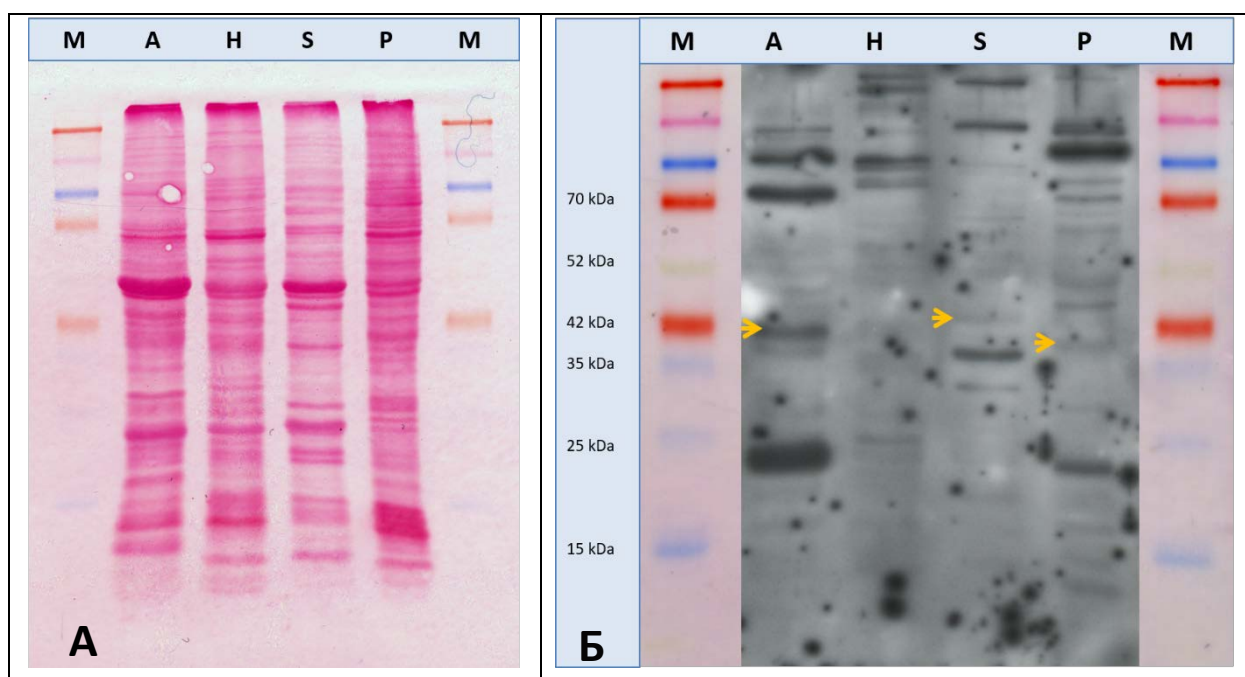


Рис. 5. Поиск белков-гомологов ARP у *Huperzia selago*. **А**, Результат электрофоретического разделения тотального белка *Arabidopsis thaliana* (A), *Huperzia selago* (H), *Selaginella kraussiana* (S) и *Pisum sativum* (P). Окраска белков по Понсо. На дорожку нанесено около 50 мкг тотального белка. **Б**, Анализ специфичности связывания антител с целевым белком методом иммуноблоттинга. Белковые продукты подходящего веса обозначены желтыми стрелками. Используемые антитела: к белку AS1 (AtMYB91) *Arabidopsis thaliana* (AS11 1765; Agrisera). Ожидаемый вес белка STM 42.7 кДа. На рисунке **Б** видно связывание антител с белками подходящего молекулярного веса у растений *Arabidopsis thaliana*, *Selaginella kraussiana* и *Pisum sativum*. У *Huperzia selago* белок подходящего веса не визуализируется. Однако, тестирование антител также выявило их связывание с целым спектром белков разнообразной молекулярной массы исследованных растений. М: маркер молекулярного веса Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific).

7. Исследование внутритканевой локализации *HsYABBY* в АМП *Huperzia selago*

Полная кодирующая последовательность *HsYABBY* *Huperzia selago* была амплифицирована с помощью специфических праймеров в ОТ-ПЦР. В результате секвенирования был выявлен полиморфизм аллелей *HsYABBY*. РНК-зонды для исследования локализации экспрессии *HsYABBY* были синтезированы на основе его полной кодирующей последовательности. Для подтверждения наличия гена-гомолога семейства *YABBY* у *H. selago* была амплифицирована геномная последовательность *HsYABBY* с

помощью специфических праймеров. Структура геномной последовательности *HsYABBY*, а также позиционирование интронов, за исключением первого, полностью соответствует структуре и локализации интронов изученных геномных последовательностей *YABBY* цветковых растений (рис. 6).

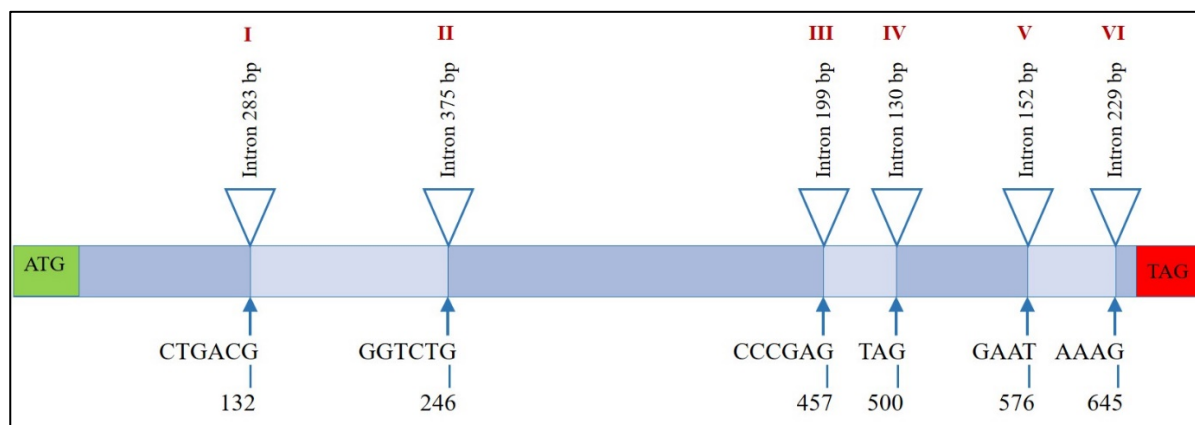


Рис. 6. Структура амплифицированной последовательности фрагмента гена *YABBY*. **ATG:** старт-кодон; **TAG:** стоп-кодон; **I - VI:** интроны. Граница интрон/экзон

Исследование локализации мРНК *HsYABBY* в верхушках побегов *Huperzia selago* также проводили с помощью гибридизации РНК-РНК *in situ* (рис. 7). Как и у семенных растений, у *H. selago* ген *HsYABBY* экспрессируется в листовых примордиях. В клетках закладывающихся примордиев он экспрессируется равномерно и его уровень экспрессии довольно высок (рис. 7А, 7Б, 7Г). В мезофилле зрелых листьев уровень сигнала заметно снижается. В тканях развивающегося листа *HsYABBY* обнаруживает нетипичный для семенных растений характер локализации мРНК: вместо характерной для семенных растений абаксиальной приуроченности в листе, транскрипты *HsYABBY* локализуются в абаксиальной и адаксиальной эпидерме листа (рис. 7А, 7Б, 7Г). Важно отметить, что мРНК *HsYABBY* визуализируется в клетках АМП *H. selago*, чего никогда не наблюдалось при исследованиях семенных растений. При этом наиболее сильный уровень сигнала наблюдается в периферической зоне АМП, там, где происходит заложение листовых примордиев (рис. 7Б). Относительно слабый уровень сигнала детектируется в апикальных инициалах АМП, а также в субапикальных клетках центральной зоны АМП (рис. 7Б). Сильный уровень сигнала отмечается в зачатках спорангиев, центральном прокамбиальном тяже и прокамбии листовых следов (рис. 7А, 7Б).

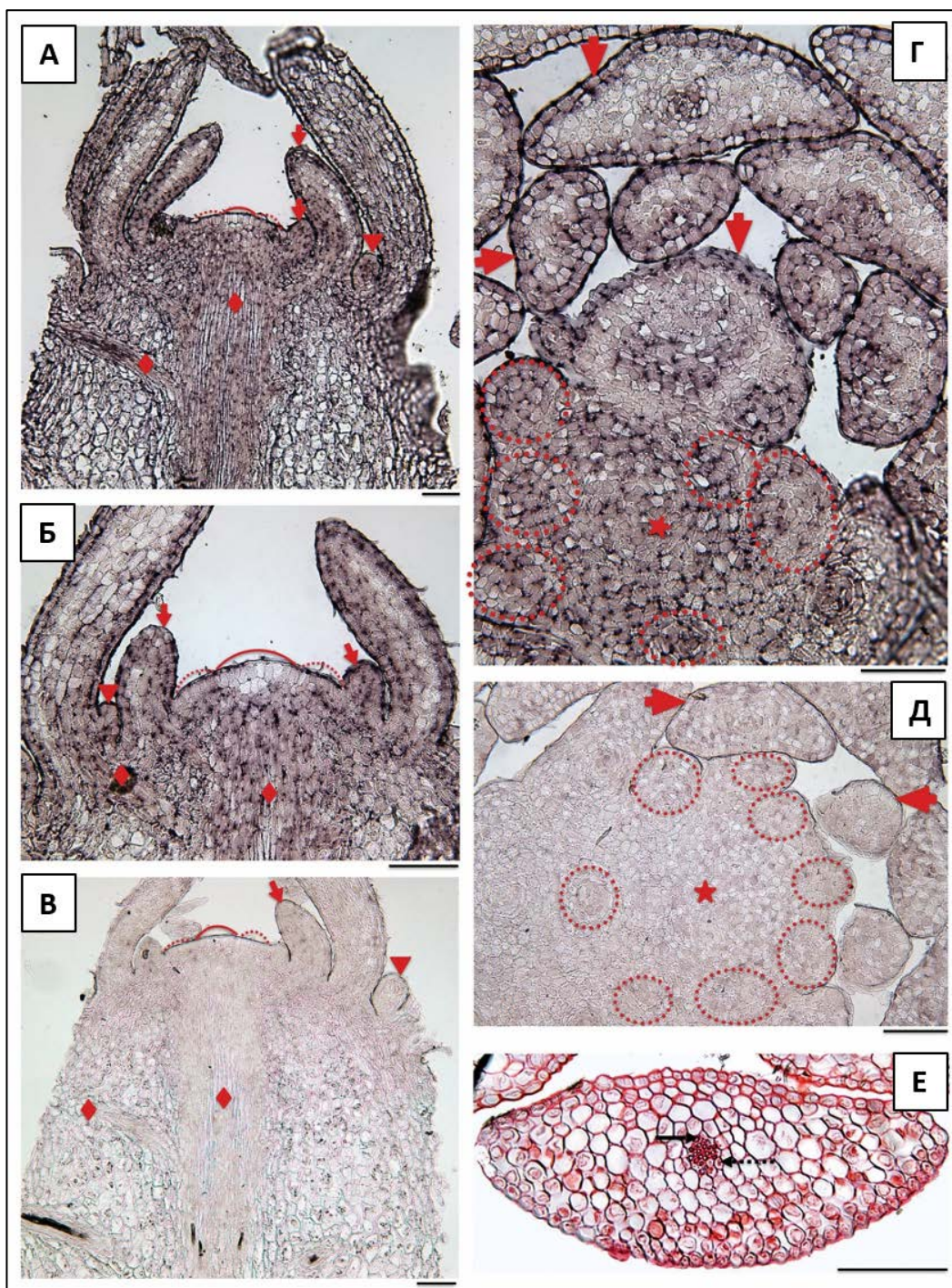


Рис. 7. Локализация транскриптов *HsYABBY* в верхушках побегов *Huperzia selago*. **А, Б, В,** гибридизация медианных срезов верхушек побегов с антисенс (**А, Б**) и сенс РНК- (**В**). Наносилось 200 нг РНК-зондов на стекло. мРНК *HsYABBY* детектируется в АМП (центральная зона обозначена изогнутой линией; периферическая зона - изогнутой пунктирной линией). Наиболее сильный сигнал виден в периферической зоне, где происходит заложение листовых примордиев (изогнутая пунктирная линия), в развивающихся листовых примордиях (стрелки), зачатках спорангиев (вершина стрелки), центральном прокамбиальном тяже и прокамбии листовых следов (ромбы). Относительно слабый уровень сигнала виден в апикальных инициалах и в субапикальных клетках центральной зоны. **Г, Д,** гибридизация поперечных срезов верхушек побегов с антисенс (**Г**) и сенс РНК-зондами (**Д**). Экспрессия *HsYABBY* однородна в самых молодых листовых примордиях; в более зрелых листьях она приурочена к абаксиальной и адаксиальной эпидерме и прокамбию. На рис. **Д** меристема обозначена звездочкой, закладывающиеся листовые примордии - пунктирной линией. Стрелки указывают на более зрелые листовые зачатки. **Е,** Поперечный срез листа *Huperzia selago*. Виден однородный мезофилл, а также амфикрибральный (с ксилемой, окруженной флоэмой) проводящий пучок листа. Стрелка указывает на ксилему, прерывистая стрелочка - на флоэму. Масштабная линейка: 100 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе была описана зональная структура АМП *Huperzia selago*. По ее результатам АМП *Huperzia selago* можно отнести к симплексному типу, который свойственен плауновидным (за исключением Selaginellales) - равноспоровым Lycopodiales и разноспоровым Isoetales, а также большинству голосеменных растений (Gifford, Foster, 1989; Philipson, 1990). В АМП *H. selago* были обнаружены ветвящиеся вторичные H-образные и Y-образные плазмодесмы (Lucas et al., 1993), в отличие от АМП видов *Selaginella*, где визуализируются исключительно неветвящиеся первичные плазмодесмы (Imaichi et al., 2007). Изучение влияния синтетического цитокинина (6-БАП) на индукцию формирования плазмодесм в симплексной АМП *H. selago* не выявило достоверного увеличения их плотности при обработке 6-БАП, что можно рассматривать как аргумент в пользу цитокинин-независимого механизма формирования вторичных плазмодесм у Lycopodiales, в отличие от цветковых растений. Таким образом, в регуляции симпластического транспорта в АМП плауновидных и семенных растений, по-видимому, существуют значительные различия.

С помощью биоинформатического анализа транскриптома верхушек побегов *H. selago* были выявлены последовательности мРНК гомологов транскрипционных факторов KNOX I класса, которые исключительно важны для поддержания меристемспецифических свойств клеток цветковых растений. Было обнаружено два последовательности: *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2*. Оба гена, *HsKNOX1-1*, и *HsKNOX1-2*, экспрессируются в клетках АМП *H. selago*, что указывает на консервативную роль транскрипционных факторов KNOX в АМП различных структурных типов (Harrison et al., 2005; Ambrose, Vasco et al., 2016; Sundas-Larsson et al., 1998; Pham et al., 2003). Однако, и *HsKNOX1-1*, и *HsKNOX1-2* также экспрессируются в закладывающихся примордиях листьев, что сближает их с генами KNOX I класса папоротниковидных растений (Bharathan et al., 2002; Harrison et al., 2005; Ambrose, Vasco et al., 2016) в большей степени, чем генами KNOX I класса цветковых растений или разноспорового плауна *Selaginella kraussiana*.

В рамках разработки вопроса об эволюции морфогенеза в АМП, в работе изучались клеточно-молекулярные аспекты заложения микрофилльных листьев *H. selago*. Заложение листа *H. selago* принципиально отличается от заложения листа разноспорового плауна *S. kraussiana*: заложение листьев происходит не через возникновение новой апикальной инициали листа в поверхностном слое моноплексной АМП *Selaginella kraussiana*, а в результате скоординированных анти- и периклинальных делений нескольких поверхностных клеток в периферической зоне симплексной АМП (Романова и др., 2010). Сопоставление аспектов образования микрофилльных листьев *S. kraussiana* и *H. selago* с

литературными данными позволяет полагать, что заложение как микрофилльных, так и теломных листьев происходит в моноплексной АМП путем возникновения новых апикальных клеток (Романова и др., 2010), а в симплексной АМП - путем скоординированной пролиферации группы клеток периферической зоны (Gifford, Foster, 1989; Романова и др., 2010; Evkaikina et al., 2017). Таким образом, нельзя утверждать, что микрофилльные и теломные листья различаются по способу заложения.

В рамках разработки вопроса о гомологии листьев для *H. selago* был выявлен ген *HsYABBY*, единственный гомолог из двух классов антагонистов транскрипционных факторов *KNOX*, *YABBY* и *ARP* известных для цветковых растений и регулирующих клеточную дифференциацию в зоне заложения листа. Филогенетический анализ показал, что *HsYABBY* является сестринским по отношению его гомологам семенных растений (Evkaikina et al., 2017). Это согласуется с предположениями Finet (2016), согласно которым ближайший общий предок семенных растений уже обладал транскрипционным фактором *YABBY*, однако, добавляет существенный новый аспект. По видимому, разноспоровые плауновидные утратили генное семейство *YABBY*, поскольку ни в аннотированном геноме *Selaginella moellendorffii*, ни в опубликованных транскриптомах разноспоровых плауновидных в базе транскриптомов www.onekp.com гомологичные *YABBY* последовательности не обнаруживаются. Напротив, как в геноме *Selaginella moellendorffii*, так и для другого разноспорового плауна *S. kraussiana*, обнаружены гомологи транскрипционных регуляторов *ARP*. Таким образом, можно предположить, что для подавления экспрессии генов *KNOX* I класса и развития микрофилльных листьев достаточно одного из факторов транскрипции: или *YABBY* (как в случае равноспоровых плауновидных), или *ARP* (как в случае разноспоровых плауновидных). Отметим, что *HsYABBY*, в отличие от его гомологов семенных растений, транскрибируется не только в примordiaх листьев, но и в апикальной меристеме растений *H. selago*, что напоминает ко-экспрессию генных семейств *KNOX* и *ARP* в меристеме *Selaginella kraussiana* (Harrison et al., 2007). Эти данные выявили отсутствие антагонистических взаимодействий между изученными меристемспецифическими факторами *KNOX* I класса и *YABBY/ARP* и, что важно, позволяют предположить принципиально иной механизм формирования микрофилльного листа по сравнению с цветковыми растениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Могут ли полученные данные быть использованы для прояснения вопроса об исходном для высших растений структурном типе АМП?

На том основании, что моноплексная АМП описана для *Chara* и большинства несеманных растений, этот тип АМП традиционно рассматривается в качестве исходного для высших растений (Gifford and Foster, 1989; Kenrick and Crane, 1997). Однако, еще Kidston and Lang (1920) описали АМП только что тогда открытых первых наземных растений Rhyniophyta, как состоящую не из одной, но из группы сходных клеток. Из-за невысокого качества иллюстративного материала эта точка зрения не получила достаточной поддержки. Однако, на основании результатов новейших молекулярных исследований, основанных на сравнении экспрессии клеток разных доменов моноплексной и симплексной АМП с помощью микрочипов, вновь нашла подтверждение гипотеза о том, что именно симплексный тип АМП был исходным для высших растений, впоследствии утерянным у *Selaginella* и большинства монолофитов (псилотовых, хвощей и папоротников) (Frank et al., 2015). На первый взгляд, такой вывод находится в противоречии со взглядами на эволюцию способа формирования плазмодесм – признака, скоррелированного с типом АМП. Общепринята точка зрения о том, что исходны для высших растений исключительно первичные (цитокинетические) плазмодесмы и единственно возможный в таком случае моноплексный тип АМП, а возникновение способности формировать постцитокинетические плазмодесмы, приведшее к появлению АМП с несколькими инициалами, произошло независимо у плауновидных и семенных растений (Cooke et al., 1996; Imaichi and Hiratsuka, 2007). Однако, на основании выявленного нами наличия гомологов ТФ YABBY в АМП *H. selago*, и, таким образом, у общего предка ныне живущих высших растений, с такой же степенью вероятности можно предположить, что для общего предка всех растений были характерны симплексная АМП и вторичные плазмодесмы. Выявленное на основании проведенного нами филогенетического анализа вероятное наличие гомолога YABBY у общего предка всех высших растений также поддерживает эту гипотезу, в рамках которой вторичные плазмодесмы и симплексный тип АМП плаунов и семенных растений, вероятно, гомологичны.

Выявленная нами дупликация генов *KNOX I* класса у предков Lycopodiales может рассматриваться как аргумент в пользу точки зрения о том, что появление симплексной АМП Lycopodiales/Isoetales было следствием возникновения у них, независимо от семенных растений, механизма формирования вторичных плазмодесм, что обусловило эволюцию группы белков *KNOX I* класса, способных к межклеточному транспорту через этот вновь возникший тип плазмодесм.

В рамках разработки вопроса о возможной неклеточноавтономности белков *KNOX I* класса у плауновидных заслуживает внимания выявленный нами факт того, что у Selaginellales с моноплексной АМП и исключительно первичными плазмодесмами была

сохранена регуляция посредством ТФ ARP, тогда как у Lycopodiales такой способ регуляции был утерян. Возможно, локализация и картирование доменов экспрессии *KNOX I* и/или *ARP* и/или *YABBY* в моноплексных и симплексных АМП представителей Lycopodiophyta могло бы прояснить механизмы регуляции в этих типах меристем.

Секвенирование и анализ транскриптома верхушек побегов равноспорового плауна *Huperzia selago* показали значительную филогенетическую удаленность порядков Lycopodiales и Selaginellales: последний общий предок обнаружен примерно 376 млн лет назад, чем объясняется наличие в транскриптоме апексов побегов *H. selago* большого количества генов, не имеющих известных гомологов (Evkaikina et al., 2017). Таким образом, экстраполяция выявленных для видов рода *Selaginella* механизмов регуляции функционирования АМП и заложения листьев на все плауновидные представляется недостаточно надежной. Полученные нами данные также продемонстрировали перспективность привлечения максимально широкого круга “немодельных” объектов из разных таксонов высших растений для получения объективной картины эволюции регуляторных механизмов (Appleby, 2017).

ВЫВОДЫ

1. Апикальная меристема побега *Huperzia selago* по своей клеточной организации относится к симплексному типу. Заложение листьев происходит в результате анти- и периклиналильных делений поверхностных клеток в периферической зоне. В стенках клеток апикальной меристемы побега обнаруживаются как первичные, так и вторичные плазмодесмы. Их образование не индуцируется цитокинином, в отличие от цветковых растений.

2. В апексах побега *Huperzia selago* экспрессируются два гена-гомолога *KNOX I* класса и три гена-гомолога *KNOX II* класса. С помощью гибридизации РНК-РНК *in situ* установлено, что в симплексной апикальной меристеме побега *Huperzia selago* транскрипты гомологов *KNOX I* класса *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* локализуются в центральной и периферической зонах, а также в зачатках листьев и спорангиев. В моноплексной апикальной меристеме побега *Selaginella kraussiana* транскрипты *SkKNOX1* локализованы только в клетках апикальной меристемы, но отсутствуют в листовых зачатках.

3. Впервые для несеменных растений обнаружена экспрессия гена-гомолога *YABBY*, что указывает на вероятное наличие данных транскрипционных факторов уже у общего предка всех наземных растений.

4. С помощью гибридизации РНК-РНК *in situ* установлено, что ген *HsYABBY* в апексах побега *Huperzia selago* экспрессируется в листовых примордиях, а также в клетках

апикальной меристемы, за исключением группы апикальных инициалей. Колокализация экспрессии *HsYABBY*, *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* у *Huperzia selago* указывает на отсутствие антагонистических взаимодействий этих генов.

5. Биоинформатический анализ транскриптома апексов побега *Huperzia selago*, а также амплификация с геномной ДНК с помощью вырожденных праймеров и иммуноблоттинг со специфическими антителами, не выявили экспрессию генов-гомологов *ARP* в апикальной меристеме побега *Huperzia selago*.

6. Экспрессия в апикальной меристеме побега плауновидных лишь одного гомолога из двух групп генов-антагонистов *KNOX* покрытосеменных: *YABBY* у *Huperzia selago* и *ARP* у *Selaginella kraussiana*, указывает на то, что, возможно, для регуляции образования не обладающих анатомической дорсовентральностью микрофилльных листьев достаточно лишь одного транскрипционного фактора: *ARP* либо *YABBY*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Евкайкина А.И.**, L. Berke, M.A. Romanova, E. Proux-Wéra, A.N. Ivanova, C. Rydin, K. Pawlowski, O.V. Voitsekhovskaja. The *Huperzia selago* shoot tip transcriptome sheds new light on the evolution of leaves // *Genome Biology and Evolution*. 2017. V. 9(9). P. 2444–2460.
2. Романова М.А., Науменко А.Н., **Евкайкина А.И.** Особенности апикального морфогенеза в разных таксонах несеманных растений // *Вестник Санкт-Петербургского университета*. 2010. Серия 3. Биология. № 3. С. 29-41.
3. **Евкайкина А.И.**, Romanova M.A., Voitsekhovskaja O.V. Evolutionary aspects of non-cell-autonomous regulation in vascular plants: structural background and models to study // *Frontiers in Plant Science*. 2014. V. 5: 31.

Статьи в сборниках:

1. **Евкайкина А.И.**, Романова М.А., Войцеховская О.В. Плазмодесмы и межклеточный транспорт регуляторных макромолекул - эволюционный аспект // *Ботаника: история, теория и практика (К 300-летию основания Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук): Тр. международной научной конференции, Санкт-Петербург, Россия*. 2014. С. 92-100.

Тезисы конференций:

1. **Евкайкина А.И.**, Климова Е.А., Тютерева Е.В., Добрякова К.С., Иванова А.Н., Rydin C., Berke L., Proux-Wera E., Pawlowski K., Романова М.А., Войцеховская О.В. Молекулярные механизмы возникновения листьев в апикальной меристеме симплексного типа у плаунообразных и голосеменных растений: изучение “немодельных” объектов может прояснить вопрос происхождения листьев высших растений. XIV съезд Русского ботанического общества и конференция «Ботаника в современном мире». 18–23 июня, 2018, Махачкала, Россия. Т. 3. С. 146-149.
2. **Евкайкина А.И.**, Berke L., Романова М.А., Proux-Wéra E., Иванова А.Н., Rydin C., Pawlowski K., Войцеховская О.В. Изучение молекулярных механизмов заложения микрофилльных листьев в апикальной меристеме побега *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank et Mart. (Lycopodiophyta). IV

- (XII) Международная ботаническая конференция молодых ученых. 22–28 апреля, 2018, Санкт-Петербург, Россия. С. 164-165.
3. Voitsekhovskaja O.V., **Евкайкина А.И.**, Berke L., Romanova M.A., Proux-Wéra E., Ivanova A.N., Rydin C., Pawlowski K.. The *Huperzia selago* shoot tip transcriptome sheds new light on the evolution of leaves and plasmodesmata. Intercellular communication in development and disease. 10-15 July, 2017, Berlin, Germany. Abstract reference number: 89.
 4. Романова М.А., Климова Е.А., **Евкайкина А.И.**, Тютерева Е.В., Добрякова К.С., Иванова А.Н., Войцеховская О.В., Pawlowski K., Wera E., Berke L. Апикальная меристема побега и морфологическая эволюция: структурно-функциональные и молекулярные особенности у представителей разных таксонов растений. V Международная Школа для молодых ученых “Эмбриология, генетика и биотехнология”, посвященная памяти член-корреспондента РАН, профессора Татьяны Борисовны Батыгиной. 9-14 октября, 2016, Санкт-Петербург, Россия. С.148-149.
 5. Климова Е.А., **Евкайкина А.И.**, Добрякова К.С., Войцеховская О.В. Неавтономная клеточная регуляция в апикальной меристеме побега *Picea abies* (L.) Karst. Годичное собрание общества физиологов растений России и Научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма». 21-24 июня, 2016, Санкт-Петербург, Россия. С. 119.
 6. **А.И. Евкайкина**, Е.А. Klimova, K.S. Dobryakova, M.A. Romanova, E.V. Tyutereva, O.V. Voitsekhovskaja. Evolutionary aspects of non-cell-autonomous regulation in ancient taxa of vascular plant. 4th International Symposium on Plant Signaling and Behavior. 19-24 June, 2016, St.-Petersburg, Russia. P.72.
 7. Климова Е.А., **Евкайкина А.И.**, Добрякова К.С., Войцеховская О.В. Неавтономная клеточная регуляция в апикальной меристеме побега *Picea abies*. III (XI) Международная ботаническая конференция молодых ученых. 4 – 9 октября, 2015, Санкт-Петербург, Россия. С.76.
 8. **А.И. Евкайкина**, С.Rydin, А.Н. Иванова, М.А. Романова, К.Pawlowski, О.В. Войцеховская. Выявление, характеристика и клеточная локализация гомологов регуляторов апикальной меристемы KNOX у Плаунообразных. III (XI) Международная ботаническая конференция молодых ученых. 4 – 9 октября, 2015, Санкт-Петербург, Россия. С.73.
 9. Е.А. Воронина, **А.И. Евкайкина**, К.С. Добрякова, М.А. Романова, Е.В.Тютерева, О.В. Войцеховская. Неклеточноавтономная регуляция в апикальных меристемах побега эволюционно древних таксонов растений. VIII Съезд общества физиологов растений России "Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий". 21-26 сентября, 2015, Петрозаводск, Россия. С. 113.
 10. **А.И. Евкайкина**, С.Rydin, А.Н. Иванова, М.А. Романова, К.Pawlowski, О.В. Войцеховская. Гомологи регуляторов апикальных меристем KNOX у Плаунообразных: выявление и характеристика. VIII Съезд общества физиологов растений России "Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий". 21-26 сентября, 2015, Петрозаводск, Россия. С.180.
 11. **А.И. Евкайкина**, Е.А. Voronina, K.S. Dobryakova, M.A.Romanova, E.V. Tyutereva, O.V. Voitsekhovskaja Evolutionary aspects of non-cell-autonomous regulation in ancient taxa of vascular plants. 26th congress of the Scandinavian Plant Physiology Society. 9-13 August 2015, Stockholm, Sweden. Abstract reference number: 62.

12. **Anastasiia Evkaikina**, Marina Romanova, Olga Voitsekhovskaja. In search of cell-to-cell transport of KNOX homologs in two lycopodiophyta, *Selaginella kraussiana* and *Huperzia selago*. 3rd International Conference on Plant Vascular Biology. 26 – 30 July, 2013, Helsinki, Finland. Abstract reference number: 2364020.
13. **Евкайкина А.И.**, Романова М.А., Войцеховская О.В. Функционирование апикальных меристем представителей Лусородиопхита: цитологические и молекулярные аспекты. II (X) Международная ботаническая конференция молодых ученых. 11-16 ноября, 2012, Санкт-Петербург, Россия. С. 60.
14. **Anastasiia Evkaikina**, Marina Romanova, Olga Voitsekhovskaja. Cytological and molecular aspects of apical meristem functions in Lycopodiophyta. 7th SPPS PhD Student conference. 12-15 September 2012, Laulasmaa, Estonia. Abstract reference number: P.14.