

Утверждаю  
Директор ФГБУН Института физиологии  
Растений им. К.А.Тимирязева  
Российской академии наук  
д.б.н., профессор  
  
Д.А.Лось  
« 30 » сентября 2019 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Евкайкиной Анастасии Игоревны**  
**«Роль транскрипционных факторов KNOX и YABBY в регуляции**  
**морфогенеза в апикальной меристеме побега *Huperzia selago* (L.) Bernh. Ex**  
**Schrank & Mart. (Lycopodiophyta)»**,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности: 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Диссертация посвящена изучению молекулярно-генетических и биохимических механизмов, регулирующих программы роста и морфогенеза растений, такие как эмбриогенез, вегетативный рост и генеративное развитие, что несомненно является важной задачей физиологии растений, имеющей ряд очевидных практических приложений. Диссертация посвящена изучению регуляторных процессов в апикальной меристеме побега (АМП). Ее функционирование ведет к формированию органов, осуществляющих фотосинтез – листьев, а также определяет процесс закладки генеративных органов, то есть функции АМП критически важны для продуктивности растений. Это объясняет повышенный интерес исследователей к изучению регуляторных сетей, в первую очередь транскрипционных факторов и гормональных сигналов, которые определяют заложение листа в АМП и трансформацию АМП в генеративную меристему. К настоящему времени в этих исследованиях, выполняемых на модельных растениях, таких как *Arabidopsis thaliana* или *Oryza sativa*, достигнут огромный прогресс: выявлены ключевые группы генов-регуляторов таких функций АМП, как (1) поддержание пула стволовых клеток в

недифференцированном состоянии (гены *KNOX* первого класса), (2) обеспечение необходимого размера меристемы (гены *WUS* и *CLAVATA*), (3) ингибирование экспрессии генов *KNOX*, приводящее к началу дифференциации клеток (гены *ARP*, *YABBY* и др.), (4) поляризация формирующихся листовых примордиев и образование листьев с дорзовентральной организацией (гены *ARP*, *YABBY* и др.). Однако, при этом становится очевидным, что генетические системы данных модельных объектов не отражают всего многообразия путей регуляции функционирования АМП высших наземных растений. Более того, становится ясным, что глубокое понимание как ролей компонентов регуляторных сетей обеспечивающих функции АМП, так и взаимосвязей между ними, невозможно вне эволюционного контекста, в котором эти сети пополнялись отдельными компонентами. В связи с вышеизложенным диссертационная работа Анастасии Игоревны Евкайкиной, посвященная изучению роли транскрипционных факторов *KNOX* и *YABBY* в АМП равноспорового плауна *Huperzia selago*, что ранее практически не было исследовано, является высоко актуальным и оригинальным исследованием.

Целью рецензируемой диссертационной работы стала характеристика клеточных и молекулярных механизмов функционирования симплексной АМП равноспорового плауна *Huperzia selago* (плаун баранец). Плаун баранец - представитель ранее не изучавшейся эволюционно древней группы растений, которая является сестринской по отношению к другим высшим наземным растениям. У плаунов листья возникли в ходе эволюции независимо от листьев остальных растений, таких как папоротниковидные и семенные растения (микро- и макрофилльная линии эволюции, соответственно). Кроме того, представители выбранной А.И. Евкайкиной для исследований группы отличаются от всех изучавшихся ранее растений структурной организацией АМП: так, если у «модельного плауна» *Selaginella moellendorffii* – представителя разноспоровых плаунов - АМП организована по моноплексному типу, то у равноспоровых плаунов порядка *Lycopodiales*, к которому относится *Huperzia selago*, АМП организована по симплексному типу, как у семенных растений. Для *Huperzia selago* автором впервые проведены были экспериментальные исследования

клеточных и молекулярных механизмов функционирования АМП и на основе обобщения результатов построены модели.

#### Структура и содержание 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. Работа написана правильным языком, без опечаток, и аккуратно оформлена.

Введение, в котором сформулированы цель и задачи работы, убедительно показывает актуальность исследования, которая не в последнюю очередь связана с крайней мало изученностью гормональной и молекулярно-генетической регуляции функций АМП плауновидных вообще, и полным отсутствием данных по равноспоровым плаунам, в частности. Это вызвано рядом объективных трудностей изучения этих растений, таких, как огромный размер их геномов, чередование свободноживущих гаметофита и спорофита, и др. Кроме того, во Введении автор ставит изучаемую проблему в более широкий эволюционный контекст и показывает, каким образом решение поставленных в диссертационной работе задач сможет способствовать сравнению молекулярных программ регуляции формирования листа в АМП для таксонов с разной эволюционной историей и тем самым выяснению вопроса о гомологиях листьев высших наземных растений.

#### Глава 1. Обзор литературы.

Обзор литературы изложен на 56 страницах и состоит из пяти разделов. В первом разделе дан подробный анализ современного состояния исследований в области структурной организации АМП высших растений, представлений о возможных путях эволюции структурных типов АМП, и описаны особенности организации АМП объекта исследования. Также рассматриваются современные представления о молекулярно-генетической организации АМП, полученные в основном для модельных покрытосеменных растений. В совокупности данный

значительный по объему и тщательно разработанный раздел Обзора представляет собой хорошую основу для «наложения» молекулярно-генетических механизмов функционирования АМП на клеточную организацию меристемы. Особое внимание уделяется симпластической организации различных структурных типов АМП, выявленных у высших растений, поскольку плазмодесмы представляют собой важнейшие каналы для перемещения многих транскрипционных регуляторов АМП покрытосеменных растений. Автор проанализировала доступные к настоящему времени данные о функционировании плазмодесм не только для покрытосеменных, но и для представителей других таксонов сосудистых растений.

Второй раздел посвящен анализу современных представлений о происхождении листьев высших наземных растений, которые основаны на новейших данных об экспрессии гомологов ключевых регуляторов АМП в клетках модельных представителей плауновидных, папоротниковидных, голосеменных и покрытосеменных. Согласно проведенному анализу, наиболее перспективной моделью для выявления вопросов эволюции морфогенеза АМП представляются исследования взаимодействий трех основных регуляторов: транскрипционных факторов из семейств KNOX, ARP и YABBY.

Разделы с третьего по пятый посвящены обзору современных представлений о генных семействах, кодирующих вышеназванные факторы транскрипции, паттернах экспрессии этих генов в АМП высших сосудистых растений и их возможной регуляторной роли. Третий раздел, в котором рассматриваются *KNOTTED1*-подобные гомеобокс-гены, наиболее обширный, что объясняется хорошей изученностью данных генов у представителей всех отделов высших растений. Данный раздел представляет собой «обзор в обзоре»; автор делает смелую попытку классифицировать охарактеризованные к настоящему времени гены *KNOX* по признаку локализации их экспрессии и интерпретировать эволюционные преобразования паттернов экспрессии в связи с изменяющимися функциями данных генов в АМП. Разделы 4 и 5, посвященные характеристике регуляторов KNOX – YABBY и ARP, соответственно - помимо суммирования современных представлений о филогении и функциях данных факторов

транскрипции, подчеркивают, что до настоящего времени гомологи YABBY считались характерными только для семенных растений, в то время как гены, кодирующие другую группу ингибиторов KNOX – ARP – обнаруживаются и у несеманных растений, например у разноспорового плауна *Selaginella moellendorffii*.

Как следует из обзора литературы, выявление молекулярных регуляторов АМП и характеристика клеточных паттернов экспрессии кодирующих эти регуляторы генов в АМП представителя не изучавшейся до сих пор группы – равноспорового плауна *Huperzia selago* – представляется актуальной проблемой современной биологии растений. Именно в этом заключается диссертационное исследование, результаты которого представлены в соответствующей главе.

## Глава 2. Материалы и методы.

В главе Материалы и методы приведены данные о двух модельных объектах изученных в работы: основного объекта – равноспорового плауна *Huperzia selago*, и разноспорового плауна *Selaginella kraussiana*, который использовался автором в некоторых экспериментах с целью сравнения гормональной регуляции плазмодесм и паттернов локализации экспрессии генов *KNOX* у двух групп плауновидных; следует подчеркнуть, что обе группы эволюционно почти так же далеки друг от друга, как от семенных растений. Наиболее обширный раздел данной главы представляет собой описание молекулярно-биологических методов, использовавшихся в работе. Всего их около 20. К ним относятся как методы амплификации изучаемых генов, их клонирование и последующая характеристика, так и методы иммуноблоттинга, метод получения РНК-зондов для детекции транскриптов *in situ* путем *in vitro* транскрипции, и метод получения и подготовки РНК для транскриптомного анализа апексов побегов, выполненного совместно с Стокгольмским университетом (Швеция). Важно отметить, что все методы и подходы были впервые адаптированы автором специально для *Huperzia selago*. Последний раздел данной главы описывает использованные цитологические методы, в том числе трансмиссионную электронную микроскопию для анализа плазмодесм и получение РНК-

содержащих срезов для локализации экспрессии генов интереса методом РНК-РНК гибридизации *in situ*. Этот метод является одним из наиболее трудоемких методов современной биологии. Он позволяет «наложить функцию на структуру», то есть, определить с высоким уровнем разрешения, в каких клетках растения активны те или иные гены интереса, и был весьма удачно выбран автором для решения поставленных в работе задач. В диссертационной работе впервые удалось локализовать на клеточном уровне в пределах АМП экспрессию генов-гомологов основных регуляторов функций АМП для плауна баранца.

### Глава 3. Результаты.

Подробно проанализирована структура АМП *Huperzia selago* и исследовано распределение плазмодесм и между клетками АМП плауна баранца. Подтверждена симплексная организация АМП («организация по типу семенных растений») и формирование плазмодесм вторичного происхождения между клетками АМП. Это дало А.И. Евкайкиной основание сразу же проверить в несколько «прямолинейном» эксперименте, имеется ли механизм усиления формирования вторичных плазмодесм под воздействием цитокинина, известный для семенных растений со сходной организацией АМП, уже у плауновидных? Однако, результаты не выявили влияния цитокинина на формирование вторичных плазмодесм у плаунов. Таким образом, можно согласиться с выводом автора, что гормональная регуляция функций АМП у плауновидных и семенных растений различна несмотря на структурное сходство их АМП.

Второй раздел результатов посвящен меристемным регуляторам KNOX 1 класса. Проведено клонирование выявленных в ходе транскриптомного анализа генов группы KNOX 1 класса, экспрессирующихся в АМП плауна баранца, и изучены места локализации активности этих генов; проведено сравнение с локализацией генов KNOX 1 у *Selaginella kraussiana* с моноплексной АМП. Сделан важный вывод о том, что характер локализации транскриптов изученных генов KNOX I класса у *Huperzia selago* существенно отличается от такового *Selaginella kraussiana*. Хотя оба плауна принадлежат к микрофильной линии эволюции, паттерны экспрессии *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* не только в АМП, но

и в закладывающихся листовых примордиях в периферической зоне АМП совпадают с паттернами для генов *KNOX* I класса папоротниковидных, т.е. растений макрофилльной линии эволюции.

Последний раздел данной главы содержит наиболее неожиданные и интересные результаты, а именно, выявление сначала путем биоинформатического анализа, а затем клонирования и секвенирования, гомолога транскрипционных регуляторов *YABBY* у *Huperzia selago*, и характеристика паттерна экспрессии *HsYABBY* в АМП плауна баранца. Неожиданным этот результат можно назвать потому, что ранее (до исследований А.И. Евкайкиной) гомологи *YABBY* обнаруживались в геномах только семенных растений, и например в полностью секвенированном и аннотированном геноме разноспорового плауна *Selaginella moellendorffii* генов *YABBY* нет. Однако, из результатов диссертационной работы следует вполне убедительный вывод, что гены *YABBY* возникли еще у общего предка всех сосудистых растений.

#### Глава 4. Обсуждение

Полученные данные обсуждаются в одноименной главе. Следует согласиться с А.И. Евкайкиной в том, что транскрипция гомологов *KNOX* в АМП плауна баранца свидетельствует о консервативном для высших растений механизме поддержания клеток в недифференцированном состоянии, но локализация транскриптов гомологов *KNOX* I класса *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* помимо АМП в зачатках листьев и спорангиев АМП *Huperzia selago*, отличается от таковой у *Selaginella kraussiana*. Также можно согласиться с предположением диссертанта о том, что у двух групп плауновидных, эволюционно сильно удаленных друг от друга – равно- и разноспоровых плаунов – функции регулятора экспрессии генов *KNOX* I класса взяли на себя две различные группы генов, *YABBY* и *ARP*, соответственно. Об этом свидетельствуют данные, полученные транскриптомным анализом, методами *in situ* РНК-РНК гибридизации и иммуноблоттинга. Обнаруженные автором принципиальные различия в локализации экспрессии *HsYABBY* по сравнению с голо- и покрытосеменными растениями интерпретируются диссертантом в связи с

отсутствием дорзовентральной полярности листьев плаунов: достаточно одной группы генов антагонистов *KNOX* (*ARP* у *Selaginella* или *YABBY* у *Huperzia*), чтобы запустить процесс дифференциации неполярного листа, тогда как у покрытосеменных для формирования ад- и аб-аксиальной сторон листа с различным строением и функциями требуется участие обеих групп генов. Полученные диссертантом данные, таким образом, выявляют пути эволюции характера взаимодействия транскрипционных факторов *KNOX* и их антагонистов при заложении микрофилльных листьев плауновидных и макрофилльных листьев папоротниковидных и семенных растений. Особый интерес представляет обсуждение результатов, относящихся к механизмам функционирования плазмодесм у сосудистых растений, поскольку эта область физиологии растений к настоящему времени разработана практически исключительно для покрытосеменных.

#### Заключение

В Заключении автор кратко и ёмко, с помощью полученных им данных, защищает выдвинутую рядом молекулярных биологов – исследователей эволюции механизмов морфогенеза растений - гипотезу о том, что именно симплексный тип апикальной меристемы побега являлся исходным для высших растений. После этого следуют Выводы (стр. 150), полностью подтвержденные экспериментальными данными.

Диссертантом проведена большая работа по тестированию антител, которые обладали бы способностью специфично связываться с белками *KNOX* плауна баранца. Можно ли заключить на основании полученных данных, что подавление экспрессии гомологов *KNOX* 1 класса в зачатках листьев, как это происходит при их заложении в АМП у покрытосеменных и у *Selaginella*, является эволюционно продвинутым признаком, свидетельствующим о специализации, а продолжающаяся экспрессия в зачатках листьев у *Huperzia selago* и у некоторых плауновидных с симплексным типом АМП. Диссертация является целостным и завершенным исследованием, в котором решена конкретная задача – изучена организация меристемы плаунов и выявлена

специфическая роль важнейших генов-регуляторов. Полученные результаты представляют большую ценность для понимания эволюции апикальных меристем у растений.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы. Результаты исследования были доложены А.И. Евкайкиной на восьми международных и российских конференциях. Они опубликованы в 18 работах, в том числе в 3х публикациях изданий, рекомендованных ВАК РФ.

Суммируя все выше сказанное, следует заключить, что диссертационная работа Евкайкиной Анастасии Игоревны «Роль транскрипционных факторов KNOX и YABBY в регуляции морфогенеза в апикальной меристеме побега *Hyperzia selago* (L.) Bernh. Ex Schrank & Mart. (Lycoperidophyta)» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а Анастасия Игоревна Евкайкина заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений.

Отзыв обсужден и одобрен на расширенном семинаре лаборатории физиологии корня ИФР РАН 30 сентября 2019 г. Протокол № 1.

Ведущий научный сотрудник  
ФГБУН Института физиологии  
растений им. К.А.Тимирязева  
Российской академии наук  
доктор биологических наук, профессор

В.Б. Иванов

127276, ул. Ботаническая, д.35, г. Москва, Россия, тел.: + (499) 678-54-00, факс:  
+7 (499) 678-54-20. E-mail.: ifr@ippras.ru

Подпись: *Иванов В.Б.*  
ЗАВЕРЯЮ  
ЗАВ. ОТД. ЗАВРОС  
*Иванов В.Б.*  
30 сентября 2019 г.

