

## ОТЗЫВ

официального оппонента

**Цыганова Виктора Евгеньевича**

на диссертацию **Евкайкиной Анастасии Игоревны**

по теме: «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

Работа Евкайкиной Анастасии Игоревны посвящена исследованиям механизмов функционирования апикальной меристемы побега (АМП) у представителей эволюционно древнего таксона плаунов. В качестве объекта были выбраны относящийся к равноспоровым плауновидным *Huperzia selago* и принадлежащий к разноспоровым *Selaginella kraussiana*. При этом основной упор был сделан на изучение первого вида, характеризующегося формированием симплексной АМП, а второй вид был использован для сравнительного анализа, как формирующий моноплексную АМП. В силу ряда причин механизмы функционирования АМП у плауновидных изучены очень слабо, хотя, учитывая, что они представляют собой наиболее древнюю группу ныне живущих сосудистых растений, познание таких механизмов представляет огромный интерес для эволюционной биологии. Поэтому поставленная в диссертационной работе цель представляется весьма актуальной, а сформулированные задачи адекватны для ее достижения.

Диссертация изложена на 173 страницах машинописного текста, иллюстрирована 31 рисунком и 7 таблицами в тексте диссертации. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и «Благодарности».

Во «**Введении**» дается логичное обоснование актуальности изучаемой проблемы, формулируются цель и задачи исследования, научная новизна, научно-практическое значение. Формулируются 5 положений, выносимых на защиту. На взгляд оппонента это многовато и вполне возможно объединить положения 1 и 2, в одно, в котором указывалось бы количество генов-гомологов *KNOX* у *Huperzia selago* и приводились бы данные о паттернах их экспрессии. Также было бы правильно объединить положения 3 и 4, в обобщенном положении приводился бы факт идентификации гена-гомолога *YABBY* у

*Huperzia selago*, паттерн его экспрессии и подчеркивалась бы уникальность идентификации этого гена у несеменных растений.

**Обзор литературы** написан очень хорошим литературным языком и представляет собой детальный анализ статей по организации апикальной меристемы побега высших растений, в нем рассматриваются гипотезы о происхождении листьев сосудистых растений. Значительное внимание в обзоре уделяется описанию функций *KNOTTED1*-подобных гомеобокс-содержащих генов, генов семейства транскрипционных факторов YABBY и чуть менее подробно освещены гены транскрипционных факторов ARP. Несомненно, эти разделы представляют большой интерес и могут быть рекомендованы к публикации в отечественных или зарубежных журналах. Приятно отметить, что каждый подраздел обзора литературы завершается заключением, также отрадно видеть, что многочисленные ссылки на работы далеких годов приводятся в правильной форме: «цитируется по». Обзор украшает таблица 1, в которой суммированы данные по локализации продуктов генов KNOX I класса у различных наземных растений, хотя досадно, что она упоминается на стр. 37, а приводится на странице 49. К недостаткам обзора можно отметить лапидарный стиль диссертанта в иллюстрациях – на 57 страниц текста приводятся только 5 иллюстраций. В обзоре также отсутствует общее заключение. К мелким недостаткам можно отнести появление рисунка 1 на стр. 13, хотя ссылка на него дается только на 17 стр. Присутствует небрежность в написании латинских названий растений – то они идут в бинарной номенклатуре, то появляются в сокращенном виде. Логичным было бы использование сокращенного названия после первого упоминания полного названия. Также при описании ряда генов (например, *rs1* стр. 45) приводится написание строчными буквами, хотя такое написание правомерно лишь для рецессивных аллелей данных генов. Неправомерно использовать слово «подлежать» в смысле лежащий внизу, в русском языке оно имеет другое значение. на стр. 17 сказано «Стенки клеток всех слоев, кроме самого внутреннего, перпендикулярны поверхности апекса.», но все стенки не могут быть перпендикулярны поверхности, часть из них должна быть параллельна. На стр. 43 в 15 строчке предложение «Не только *KNATI* принимает участие в регуляции развития стебля, а не только меристемы двудольных растений» – не согласовано. Также хотелось бы пожелать диссертанту использовать знак «→», а не знак «-».

Переходя к разделу **Материалы и методы**, следует отметить, что он занимает значительную часть диссертации – 31 страницу. Такой значительный объем связан с тем многообразием методов, который использовал в своей работе диссертант. Это широчайший спектр молекулярно-биологических и цитологических методов

исследований, включая выделение ДНК и РНК, ПЦР, трансформацию компетентных клеток, *in vitro* транскрипцию, вестерн-блоттинг, определение содержания белка, РНК-РНК гибридизацию *in situ*, методы световой и электронной микроскопии. Следует отметить, что использованные методы не случайны, а строго дополняют друг друга и их применение способствовало выполнению поставленных задач и достижению цели диссертации. В качестве мелкого недостатка можно отметить, что в подписи к рисунку 6 перепутаны названия использованных в работе видов.

Раздел **Результаты исследований** посвящен малоизученным механизмам развития АПМ у *Huperzia selago*. На взгляд оппонента, наиболее значимым результатом является идентификация гена *HsYABBY* на основании анализа последовательностей, выявленных в ходе транскриптомного анализа, и изучение паттернов локализации его транскриптов в различных тканях апекса побегов. Выявление этого гена является первым примером идентификации генов семейства YABBY у несеманных растений и указывает на происхождение данного гена у общего предка наземных растений. В ходе работы также была проведена характеристика строения АМП у *Huperzia selago*. Весьма значимыми результатами является идентификация у *Huperzia selago* двух генов-гомологов KNOX I класса и трех генов-гомологов KNOX II класса. Для генов *HsKNOX1-1* и *HsKNOX1-2* был проведен анализ паттернов локализации их транскриптов, при этом были выявлены различия от описанного в работе паттерна транскриптов гена *SkKNOX1* у *Selaginella kraussiana*.

Тем не менее, у оппонента возникли некоторые вопросы. Прежде всего, почему при локализации транскриптов в контроле не использовались последовательные срезы (Рис. 11, 12, 20(А, Б), 28)? Кроме того, вызывает удивление почему контрольные и опытные срезы различаются по степени окраски клеточных стенок. Очевидно, что сигнал РНК локализуется в цитоплазме, по окраске которой контроль и опыт должны различаться, но окраска клеточных стенок должна быть одинакова! Усиление окраски стенок в опытном варианте по сравнению с контролем может вызываться повышенным контрастом фото опытного варианта, что может приводить к артефактному усилению окраски РНК сигнала. На взгляд оппонента, представляется неудачным использование термина «внутриклеточная локализация», правильней употреблять «клеточная» или «гистологическая» локализация. На стр. 100 говорится что в АМП *Huperzia selago* крупные призматические клетки делятся «почти исключительно антиклинально и образуют зону поверхностных инициалей», чуть ниже читаем, что «под поверхностными инициалами располагается зона ...клеток... производных периклинальных делений поверхностных инициалей...». На стр. 137 в

«Обсуждении» говорится что эти клетки «делятся как антиклинально, так и периклинально». Какое утверждение истинно? На стр. 101 говорится, что «плотность плазмодесм очень низкая... По визуальной оценке, она ниже, чем в меристеме покрытосеменных растений (Ormenese et al., 2000)». Непонятно как была проведена визуальная оценка, по иллюстрациям в статье? Неудачным выглядит рисунок 73, чтобы его рассмотреть понадобится лупа.

В разделе **Обсуждение результатов** проводится сравнительный анализ полученных в ходе выполнения результатов и литературных данных. Приводится значение проведенного транскриптомного анализа верхушек побегов *Huperzia selago* для анализа механизмов регуляции АМП симплексного типа несеменных растений. Обсуждается консерватизм поддержания клеток в недифференцированном состоянии у высших растений с участием генов *KNOX*. Обсуждается значение идентификации генов *YABBY* и отсутствие гомологов генов *ARP*. Таким образом, полученные данные вносят значительный вклад в наши представления о функционировании АМП у несеменных растений.

Представленные **выводы** достоверны и достаточно хорошо подтверждены результатами.

Список литературы представлен 254 источниками, в т.ч. 251 из них зарубежные.

По результатам исследований диссертантом опубликовано 14 тезисов, что отражает хорошее представление результатов на научных конференциях, а также 2 статьи в журналах и одну в книге из списка изданий, рекомендованных ВАК.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Таким образом, работа Евкайкиной Анастасии Игоревны «Роль транскрипционных факторов *KNOX* и *YABBY* в регуляции морфогенеза в апикальной меристеме побега *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex. Schrank & Mart. (Lycopodiophyta)», представленная на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений, является законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствующей критериям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Евкайкина Анастасия Игоревна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

30.09.2019

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии»

доктор биологических наук



Виктор Евгеньевич Цыганов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной сельскохозяйственной микробиологии»

Адрес: шоссе Подбельского д.3, Пушкин 8, Санкт-Петербург, 196608, Россия

Факс: +7-812-4704362

Телефон: +7-812-4705100 (приемная института)

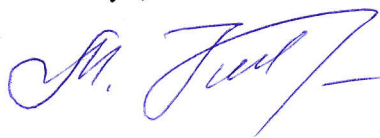
E-mail: Tsyganov@arriam.spb.ru

<http://arriam.ru>

Подпись ЦЫГАНОВА Виктора Евгеньевича, ведущего научного сотрудника лаборатории – заведующего лабораторией Молекулярной и клеточной биологии ФГБНУ ВНИИСХМ, доктора биологических наук, ЗАВЕРЯЮ:

начальник ОК ФГБНУ ВНИИСХМ

30 сентября 2019 г.



М.А. Ковалевская