

### ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Анастасии Игоревны Евкайкиной «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».

Изучение механизмов, контролирующих морфогенез растений, представляет собой важное направление современной биологии развития. В настоящее время накоплено большое количество данных о роли транскрипционных факторов в контроле основных этапов морфогенеза, в поддержании меристематической активности и закладки листьев. Однако, большинство полученных данных относится только к модельным объектам, таким как *Arabidopsis thaliana*, представляющих собой цветковые растения, тогда как для других таксонов растений данные о роли ключевых регуляторов морфогенеза фрагментарны и не позволяют воссоздать полную картину эволюции механизмов, регулирующих развитие растений. Диссертационная работа Анастасии Игоревны Евкайкиной, посвященная изучению генов *KNOX* и *YABBY* у *Huperzia selago*, представителя отдела плауновидных – наиболее эволюционно древних из ныне живущих сосудистых растений – восполняет один из таких пробелов и проливает свет на эволюцию механизмов контроля развития у высших растений. В работе Анастасии Игоревны впервые были выявлены гены семейств *KNOX* и *YABBY*, которые у цветковых растений ответственны за поддержание меристематической активности и дифференциацию листового примordia, соответственно, и изучена локализация их транскриптов в меристеме симплексного типа у несемennого растения – плауна *Huperzia selago*.

Диссертационная работа Анастасии Игоревны Евкайкиной представляет собой объемный труд, изложенный на 173 страницах, содержит 31 рисунок и 7 таблиц. Рукопись включает в себя введение, обзор литературы (около 60 стр.), описание материалов и методов исследования, полученные результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы (254 источника) и благодарности.

Нельзя не отметить высокое качество и информативность обзора литературы. Автору удалось собрать все имеющиеся данные о разных подходах к классификации типов организации меристем в разных таксонах высших растений, а также рассмотреть разные гипотезы происхождения листьев у сосудистых растений. Вторая часть обзора литературы посвящена рассмотрению роли транскрипционных факторов семейств KNOX, YABBY и ARP в регуляции развития растений. Обзор литературы написан хорошим литературным языком, встречаются лишь незначительные опечатки и неточности (например, с. 36 — «гены семейства KNOTTED1» (вместо KNOTTED1-like homeobox (KNOX)), с. 38 — «менее пенетрантный фенотип» (по-видимому, речь идет о разной степени экспрессивности). В конце каждого подраздела автор приводит краткое заключение, что облегчает восприятие информации и структурирует изложенный материал.

Материалы и методы описаны подробно и убеждают читателя в том, что представленная работа выполнена на высоком методическом уровне. Автор использовал широкий спектр молекулярно-генетических методов (клонирование фрагментов генов, конструирование векторов, методы экстракции ДНК, РНК и белка из тканей растений, проведение Вестерн-блот анализа), цитологических методов (приготовление срезов и микропрепаратов, методы световой и электронной микроскопии и др.). Кроме того, в своей работе автор использовал технически сложный метод гибридизации РНК-РНК *in situ*, требующий большой квалификации и точности на всех этапах выполнения. Более того, в рамках данной работы был проанализирован транскриптом *Huperzia selago*, что позволило автору получить приоритетные данные по нуклеотидным последовательностям у данного представителя плауновидных, что, несомненно, открывает новые возможности для изучения геномов несеменных растений.

Раздел «Результаты» написан подробно и хорошо иллюстрирован. К разделу «Результаты» имеются некоторые замечания:

с. 104 — автор пишет, что в ряде случаев при ПЦР на матрице кДНК праймеры к убиквитину давали положительный результат, то есть удавалось получить продукты, соответствующие полосам убиквитина. В связи с этим возникает вопрос, каким образом были сконструированы эти праймеры? Они подобраны к нетранскрибируемому участкам гена убиквитина или же к кодирующим последовательностям? В последнем случае вполне ожидаемо получить продукт на матрице кДНК с праймерами к конститутивно экспрессируемому гену убиквитину.

с. 111 — автор пишет, что коммерческие антитела к белку STM арабидопсиса распознают белковый продукт ожидаемого размера как у растений арабидопсиса дикого типа, так и у мутанта *stm*, на основании чего автор делает вывод о том, что данные антитела

не специфичны в отношении белка STM. Однако, из описания остается неясным, какого рода мутация произошла в гене *STM* у анализируемого мутанта. В ряде случаев, возможно, что потеря функции гена связана с заменами или другими изменениями, приводящими к образованию абберантного белка, который не способен выполнять свою функцию, но при этом может узнаваться антителами, специфичными к белковому продукту дикого типа.

с. 120 – в Таблице 6 («Полиморфизм аллелей *KNOX1-2 Huperzia selago*») приведены вариабельные позиции в различных проанализированных последовательностях гена. При этом в варианте HsKN-No-1-2-5 наблюдается вставка одного нуклеотида в положении 856. Такая вставка, находящаяся в транскрибируемой последовательности, вероятно, должна приводить к сдвигу рамки считывания. Возможно, что данная вариация не является полиморфизмом как таковым и могла возникнуть в результате ошибки секвенирования.

В рамках данной работы транскрипционные факторы YABBY были впервые выявлены у представителя несеменных растений – ранее считалось, что эти регуляторы появились в ходе эволюции лишь у семенных растений. Это открытие является важным для понимания эволюции механизмов регуляции закладки листьев у высших растений. Согласно результатам, полученным автором, в отличие от изученных представителей цветковых растений, у которых экспрессия генов *KNOX* и *YABBY* наблюдается во взаимоисключающих доменах, у *Huperzia selago* наблюдается колокализация транскриптов генов *KNOX* и *YABBY* в клетках меристемы и листовых примордиев, что позволяет сделать вывод об отсутствии антагонистических отношений между этими регуляторами у *H. selago*.

Полученные автором результаты подробно обсуждены в отдельном разделе. В разделе «Обсуждение» автор также приводит данные филогенетического анализа белков семейств *KNOX* и *YABBY* у высших растений.

Все сделанные замечания носят технический характер и не умаляют заслуг диссертанта. В заключении следует отметить, что поставленная диссертантом цель и проделанная работа актуальны и важны для понимания механизмов регуляции развития растений в эволюционном аспекте.

Достоверность полученных результатов, а также обоснованность выводов работы, не вызывают сомнения. Работа выполнена на высоком методическом и теоретическом уровне, с применением современных методов молекулярной биологии и микроскопии. Все основные результаты работы опубликованы и представлены на конференциях. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Несомненно, что проделанная работа представляет собой законченное научное исследование и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Анастасия Игоревна Евкайкина

заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 — «Физиология и биохимии растений».

Официальный оппонент

к.б.н, старший научный сотрудник  
кафедры генетики и биотехнологии

Санкт-Петербургского государственного университета

Мария Александровна Лебедева

mary\_osipova@mail.ru, тел. 8-911-963-68-57

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

1 октября 2019 года

Личную подпись *Лебедевой Марии Александровны*

**ЗАВЕРЯЮ**

**ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА  
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ**



Краснова Е.П.

01.10.2019