

Минобрнауки России
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр Российской академии наук»
(КарНЦ РАН)

На правах рукописи

Чирва Ольга Владимировна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

по результатам научно-квалификационной работы (диссертации)

на тему: **РОЛЬ CLE-ПЕПТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАМБИЯ У ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ**

подготовленной в соответствии с требованиями

Федерального государственного образовательного стандарта

высшего образования по направлению 06.06.01. Биологические науки

(уровень подготовки кадров высшей квалификации)

Научный руководитель:
главный научный сотрудник лаборатории физиологии и цитологии древесных растений
ИЛ КарНЦ РАН,
доктор биологических наук,
Галибина Н.А.

Петрозаводск, 2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ. Рост и развитие растений происходят на протяжении всей жизни организма, характеризуются высокой пластичностью и обеспечиваются специализированными тканями – меристемами, для функционирования которых важно поддержание баланса между образованием новых тканей и сохранением пула недифференцированных (стволовых) клеток. На клеточном уровне для роста растений необходимо наличие генетически запрограммированных программ деления и дифференциации меристематических клеток и их производных, а также их непрерывной корректировки в ответ на изменение условий окружающей среды. За последние годы появилось множество исследований регуляторных механизмов, контролирующей деятельность апикальных меристем корня и побега, на модельном растении *Arabidopsis* подробно описаны генетические сети, лежащие в их основе. При этом все еще не хватает данных о механизмах регуляции латеральных меристем, особенно у древесных растений, так как подобные исследования затруднены их размером, медленным ростом и длинным генеративным циклом. Все многообразие элементов тканей ствола образуется в результате деятельности латеральной меристемы – камбия. Камбий у древесных растений состоит из веретеновидных и лучевых инициалей, при делении которых образуются материнские клетки флоэмы или ксилемы, дающие начало всем структурным элементам тканей ствола. Баланс между пролиферацией клеток камбия и дифференцировкой их производных обеспечивает строение, состав и, в итоге, качество формирующейся древесины. Выяснение молекулярных и физиологических аспектов, регулирующих эти процессы, представляет собой сложную, но, несомненно, актуальную задачу.

Древесные растения играют ключевую роль в лесных экосистемах, а древесина представляет собой важный экономически ценный, экологический материал, возобновляемый источник углерода, используемый во многих отраслях жизни и промышленности. Изучение ксилогенеза, а также поиск способов эффективного управления процессом образования древесины актуален как с точки зрения повышения продуктивности древесных растений, так и получения древесины с заданными свойствами.

Регуляция развития камбиальных клеток находится под генетическим, гормональным и механическим контролем. К числу основных регуляторов развития

латеральных меристем относят несколько групп фитогормонов, в частности – цитокинины, ауксины и низкомолекулярные пептидные гормоны (CLE (CLAVATA3 (CLV3)/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED)-пептиды). CLE пептид TDIF (TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR) и его богатая лейцином рецептор-подобная киназа (LRR-RLK) TDR (*PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (PXY)*)/TDIF РЕСЕРТОР) являются сигнальными компонентами, которые регулируют камбиальную активность и препятствуют дифференцировке трахеальных элементов. Данные о роли TDIF и их рецепторов (TDR) в регуляции вторичного роста древесных растений единичны, при этом до сих пор остается открытым вопрос о возможных регуляторах генов, кодирующих TDIF (CLE) и TDR (PXY). Подобные исследования имеют не только фундаментальную, но и практическую значимость. Показано, что манипуляции с CLE/PXY могут приводить к увеличению продуктивности древесных растений.

К идентифицированным мишеням сигнального пути TDIF/TDR относятся гены *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 (WOX4)* и *WOX14*, участвующие в регуляции пролиферации клеток камбия. Считается, что *WOX4* является паттерном стволовых клеток. Несмотря на то, что *WOX4* и *WOX14* требуются для TDIF-индуцированной пролиферации камбиальных клеток, они не влияют на путь дифференциации ксилемы.

По сравнению с апикальными меристемами побега и корня функциональная характеристика доменов камбия была определена лишь совсем недавно. Выявлены некоторые паттерны ранней ксилемной и флоэмной идентичности, которые, образуясь в материнских клетках флоэмы и ксилемы, перемещаются в стволовые клетки камбия и влияют на их пролиферацию. Следует отметить, что молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе регуляции деления и дифференцировки камбиальных инициалей изучены в основном на модельном растении *Arabidopsis*, на древесных растениях ранее таких исследований не проводилось.

Опираясь на вышеизложенное, были сформулированы следующие цели и задачи исследования:

ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ: изучение роли CLE-пептидов в регуляции дифференцировки стволовых клеток камбия у древесных растений.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Изучить сезонную динамику экспрессии генов *CLE41/44-PXY-WOX4* у двух форм березы повислой;
- Исследовать взаимосвязи генов, кодирующих TDIF-TDR, паттерны ствольных клеток (WOX4), ранней флоэмной идентичности (PEAR) и маркеры ауксинового ответа (MP/ARF5) в камбиальной зоне двух форм березы повислой, отличающихся по строению формирующейся древесины;
- Выявить роль CLE-пептидов группы В (CLE-41) и их рецепторов TDR в нарушении упорядоченности пространственной ориентации структурных элементов ксилемы и флоэмы при формировании узорчатой древесины у карельской березы;
- Исследовать роль CLE-пептидов TDIF и их рецепторов TDR в камбиальной активности деревьев сосны обыкновенной, а также рассмотреть ее связь с возрастом камбия.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. Впервые были изучены молекулярные аспекты дифференцировки ствольных клеток камбия на примере важнейших древесных видов республики Карелия. Для *Betula pendula* Roth var. *pendula*, *B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti и *Pinus sylvestris* L. во временной и пространственной динамике были проанализированы паттерны экспрессии генов сигнального пути TDIF/TDR/WOX – ключевого регулятора активности сосудистого камбия, ингибирующего дифференцировку клеток по ксилемному пути. Выявлено влияние возраста камбия на активность TDIF/TDR/WOX в тканях ствола *P. sylvestris*, исследованы различия в сроках формирования структурных элементов проводящей системы в зависимости от места произрастания. На примере двух форм берёзы повислой изучены некоторые гены, кодирующие ауксин-зависимые транскрипционные факторы, показан их вклад в формирование узорчатой древесины карельской берёзы.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ. Результаты, полученные в рамках настоящего исследования, позволят расширить уже существующие знания о роли и динамике работы ключевого сигнального пути TDIF/TDR/WOX в регуляции развития камбиальных инициалей древесных растений. Кроме того, полученные результаты работы могут иметь важное значение не только в качестве фундаментальных знаний для понимания молекулярно-генетических

особенностей механизмов формирования структурных элементов тканей ствола, но и для управления процессами ксилогенеза. Также, результаты работы могут быть реализованы в области биотехнологий, генной инженерии, лесной промышленности, ввиду возможности повышения продуктивности древесины в эпоху глобального сокращения площади лесных массивов.

Исследование было выполнено на базе лаборатории физиологии и цитологии древесных растений и с использованием оборудования ЦКП ФИЦ «Карельский научный центр Российской академии наук».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Сведения об обзоре литературы

В главе «Обзор литературы» представлены доступные на данный момент в литературе сведения о строении и функциях латеральной меристемы древесных растений – камбия. Рассмотрены известные в настоящее время гормональные и молекулярно-генетические регуляторы делений и дифференцировки стволовых клеток камбия, особый упор сделан на описании роли важнейшего представителя CLE-пептидов – TDIF (*CLE41/44*), его рецептора TDR (*PXY*), и их низлежащей мишени транскрипционного фактора WOX4. Обобщены данные о факторах, опосредующих ауксиновый ответ, а также взаимосвязь ауксинового и пептидного сигналингов. Несмотря на то, что в мировой литературе имеются сведения по изучению механизмов регуляции камбия, такие исследования чаще всего проводятся на ювенильных травянистых растениях (чаще всего в роли модельного объекта выступает *Arabidopsis*) подобные данные, полученные на взрослых древесных растениях, единичны и фрагментарны.

Аналогичных работ по детальному исследованию роли сигнального пути TDIF/TDR/WOXs в регуляции работы камбиальных инициалей *Betula pendula* Roth var. *pendula*, *B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti и *Pinus sylvestris* L. ранее не проводилось.

2. Материалы и методы

В качестве объектов исследования выступали деревья: (1) *B. pendula* с прямослойной древесиной (Вр); (2) *B. pendula* var. *carelica* с узорчатой (Вс FT) и безузорчатой структурой древесины (Вс NFT); (3) *P. sylvestris* разного возраста, произрастающих в различных географических районах. Отбор материала (тканей ствола) производили на высоте 1.3 м над уровнем почвы при помощи «окошек» (6*8 см) в различные фазы камбиального роста 2020 и 2022 г.г. Для каждой даты отбора фиксировали сумму эффективных температур (градусо-дни, при базовой температуре +5°C). Вместе с корой отбирали клетки дифференцирующейся флоэмы и камбия (Фракция 1). Со стороны ствола отделяли клетки дифференцирующейся ксилемы (Фракция 2). Полученный материал подвергали шоковой заморозке жидким азотом и хранили при -80°C до последующего анализа.

2.1. Биоинформатические исследования

Для идентификации генов интереса (*CLE41/44*, *PXY*, *WOX4*, *WOX13*) в геномах двух исследуемых видов предварительно были обнаружены CDS и аминокислотные последовательности соответствующих белков, депонированных в базах данных: (1) для *Betula pendula* – *Arabidopsis thaliana* (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>) и *Populus trichocarpa* (PhytoZome; <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>); (2) для *Pinus sylvestris* – *Arabidopsis thaliana* (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>), *Picea abies* (ConGenIE; <https://congenie.org/>), некоторых видов рода *Pinus* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Полученные данные использовались для нахождения гомологичных последовательностей при помощи BLAST по опубликованному геному березы повислой (Salojärvi et al. 2017; v1.2 scaffolds <https://genomeevolution.org/coge/>) и GymnoPlaza (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/gymno-plaza/>) (Proost et al. 2015).

Предсказание структуры белков производили с использованием Web CD-search tool “Batch” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi?>; Marchler-Bauer, Bryant 2004; Shennan Lu et al. 2020). Дальнейшие биоинформатические операции производились в программе MEGA11 (Tamura et al. 2021). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей было выполнено с помощью ClustalW (метод попарного прогрессивного выравнивания). С помощью методов максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) и ближайшего соседа (neighbor-joining) были получены наиболее вероятные филогенетические деревья генов на основе модели Джонса-Тейлора-Торнтон и Пуассона (Felsenstein 1985; Saitou, Nei 1987; Jones et al. 1992).

Предсказание внутриклеточного расположения белковой структуры производилось при помощи DeepLoc 2.0 (Thumhuri et al. 2022). Процент идентичности белков исследуемого вида и арабидопсиса определяли при помощи онлайн инструмента EMBOSS Needle online tool (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Анализ структуры генов проводили с использованием Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>).

Конструирование праймеров (синтез: Синтол, Россия) производили в программе Beacon Designer 8.21 (PREMIERE Biosoft).

2.2. Выделение и очистка суммарной РНК, синтез кДНК

Выделение и очистку нуклеиновых кислот проводили с использованием СТАВ и SDS буферов, а также дополнительным осаждением LiCl. Дополнительно образцы обрабатывали ДНКазой и ингибиторами РНКаз (Синтол, Москва, Россия), инкубировали в течение часа при 37°C. Обратная транскрипция выполнялась в термоциклере «Т100 Thermocycler» (BioRad, США) с набором реагентов MMLVRT (Evrogen, Россия).

При помощи спектрофотометрии оценивали концентрацию (длина волны 260 нм) и качество полученных препаратов (соотношение длин волн 260/280 и 260/230). Отсутствие геномной ДНК в полученном препарате выявляли при постановке ПЦР с РНК в качестве матрицы.

2.3. Определение уровня экспрессии генов методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ) в реальном времени

Состав ПЦР смеси: 5 мкл qPCR mix SYBR (Evrogen, Россия), 1 мкл прямого и обратного праймеров (Syntol, Россия), 2 мкл кДНК (концентрация в смеси 100 нг) и 16 мкл стерильной воды, свободной от нуклеаз. Амплификацию производили в термоциклере iCycler (BioRad, США), количество циклов – 40.

2.4. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась в среде Microsoft Excel 2007 и PAST (версия 4.03). Нормальность выборки определяли при помощи критерия Шапиро-Уилка, достоверность различий с использованием U-теста Манна-Уитни.

3. Результаты исследования и их обсуждение

С использованием методов биоинформатики были обнаружены исследуемые гены интереса (*CLE41/44*, *PXY*, *WOX4*, *WOX13*), проведен их филогенетический анализ, описана характеристика и структура. Как для берёзы повислой, так и для сосны обыкновенной было выявлено распределение генов семейства *Wuschel* (*WOX*) на три филогенетические клады: древнюю, промежуточную и современную.

В ходе исследования активности генов сигнального пути TDIF/TDR/*WOXs* в тканях ствола разных фенотипов березы повислой с отличающейся структурой древесины была обнаружена приуроченность экспрессии *CLE41/44* к зоне

дифференцирующейся флоэмы и камбиальной зоны с максимумом, приходящимся на начальные фазы камбиального роста (7 и 28 мая). К концу активного камбиального роста уровень транскриптов данного гена постепенно снижался. Важно отметить, что у деревьев Вс NFT активность *CLE41/44* превосходила подобную для Вс FT. На всех изученных формах березы повислой количество транскриптов *PXY* было сопоставимо с другими формами: максимум транскриптов был зафиксирован 11 июня во фракции дифференцирующейся ксилемы. Известно, что активность *WOX4* коррелирует с уровнем пролиферации клеток камбия, что было подтверждено полученными результатами. В различные фазы камбиальной активности мы наблюдали работу данного гена как в клетках флоэмы и камбия, так и ксилемы. Полученные данные свидетельствуют о временном и пространственном распределении активности работы системы TDIF/TDR, что согласуется с результатами, полученными Etchells с соавторами (2016), о необходимости пространственного разделения лиганда (TDIF) и рецептора (TDR) для правильной ориентации сосудистого рисунка и ограничения зоны стволовых клеток. Более того, мы обнаружили, что деревья карельской березы с безузорчатой структурой древесины характеризовались (1) большей экспрессией генов *CLE41/44*, *PXY*, *WOX4*; (2) наиболее активным делением камбия в сторону ксилемы по сравнению с другими изученными формами. В наших предыдущих исследованиях мы охарактеризовали фенотип деревьев Вс NFT как более быстрорастущий по сравнению с деревьями Вр. Прямослойная древесина деревьев Вс NFT характеризовалась высокой плотностью сосудов (Galibina et al. 2021).

Важнейшим регулятором активности камбия является ауксиновая сигнализация. Считается, что представитель семейства HD-ZIP III *HB8* является ключевым регулятором развития камбия по ксилемному типу, а также нижележащей мишенью фактора ауксинового ответа MP/ARF5 (Baima et al. 2001; Ohashi-Ito, Fukuda 2003; Xu et al. 2019). Согласно полученным данным, 28 мая (интенсивные деления камбиальных клеток в сторону ксилемы) экспрессия MP/ARF5 и *HB8* была максимальной во фракции дифференцирующейся ксилемы. Уровень транскриптов *HB8* в клетках дифференцирующейся ксилемы был значимо ниже у деревьев Вс FT. Важно отметить, что во временной динамике деревья Вс FT демонстрировали более низкую активность модуля *HB8/ARF5* относительно деревьев с прямослойной древесиной. Исследования Brackmann с соавторами (2018) показали, что уровень ауксиновой сигнализации

повышается в дифференцирующихся производных камбия, в то время как умеренный уровень сигнализации в стволовых клетках камбия является необходимым для его жизнедеятельности. В то же время *ARF5* ограничивает количество стволовых клеток, непосредственно ослабляя действие гена *WOX4*, стимулирующего развитие стволовых клеток (Suer et al. 2011; Brackmann et al. 2018). Известно, что уменьшение количества сосудов и развитие ауксин-дефицитного фенотипа является отличительной чертой узорчатой карельской березы (Щетинкин 1988; Novitskaya et al. 2020; Galibina et al. 2021). Некоторые исследователи предполагают, что одной из причин развития такой структуры древесины может быть деактивирование ауксина при связывании с аминокислотами и сахарами (Novitskaya et al. 2020; Tarelkina et al. 2020). Во все даты отбора материала дерева Вс FT характеризовались более низкими значениями экспрессии по сравнению с Вр и Вс NFT. Исследования Smetana с соавторами (2019) показали, что комбинации мутантов ТФ *HD-ZIPIII* демонстрируют рассеянные камбиальные деления, а также структурность и узорчатость ксилемы во время вторичного развития (Smetana et al. 2019). Таким образом, основываясь на полученных данных, мы предполагаем, что снижение активности модуля *ARF5/HB8* может быть одним из факторов формирования ауксин-дефицитного фенотипа карельской берёзы.

Согласно полученным данным, экспрессия одного из маркеров флоэмной идентичности *PEAR* чаще всего приурочена к клеткам флоэмы и камбиальной зоны, и была максимальной в начале мая для деревьев березы повислой, затем постепенно падала, а к концу июня наблюдались только следовые количества. Снижение количества транскриптов *PEAR* в более поздние даты отбора (камбиального роста) сопровождалось усилением активности *HB8*. Это согласуется с литературными данными о том, что *PEAR* активирует экспрессию ауксин-зависимых *HD-ZIPIII*. Однако, с другой стороны, белки *HD-ZIPIII* действуют антагонистически по отношению к *PEAR*, формируя петлю обратной отрицательной связи, с ксилемной стороны, ингибируя периклиальные клеточные деления (Smet et al. 2019).

Изучение распределения и уровней экспрессии участников сигнального пути TDIF/TDR/WOX *P. sylvestris* выявил закономерности, схожие с результатами, полученными для березы. При анализе активности исследуемых генов выявлено, что как для 40-летних, так и для 80-летних деревьев сосны обыкновенной характерно

максимальное количество транскриптов *CLE41/44* во фракции флоэмы и камбиальной зоны в период активных делений камбиальных инициалей (22 мая) с постепенным снижением при более поздних датах отбора. Экспрессия *PXY* наблюдалась во всех исследованных тканях, преимущественно сдвигаясь в сторону дифференцирующейся ксилемы. Согласно полученным данным, сигнализация TDIF/TDR запускается в конце мая для стимулирования делений стволовых клеток камбия, а также предотвращения дифференцировки инициалей в сторону ксилемы. Подобное распределение паттернов экспрессии согласуется с данными других исследователей, полученных на различных видах растений (Hirakawa et al. 2008, 2010; Ji et al. 2010; Nieminen 2015; Etchells et al. 2016).

В июне при снижении или практически полном отсутствии транскриптов *CLE41/44*, мы все еще наблюдали активность *PXY* и *WOX4*. В литературных источниках показана роль *WOX4* как посредника между ауксиновым и пептидным сигналами в регуляции работы камбия (Hirakawa et al. 2010; Suer et al. 2011; Brackmann et al. 2018; Smetana et al. 2019; Zhang et al. 2019; Wang et al. 2021). Так, *CLE41/44-PXY* способствует интенсивному делению клеток через активацию *WOX4*, а ауксин через действие транскрипционного фактора ответа ограничивает пул стволовых клеток, ингибируя *WOX4*. Работа ауксиновой и пептидной регуляции тесно взаимосвязана и может действовать по принципам прямой и обратной параллельных связей. Сигнализация TDIF/TDR (1) способствует начальному делению камбиальных клеток и (2) также подавляет активность *ARF5* (Bagdassarian et al. 2020, 2023). Поэтому высокая экспрессия *PXY* (в отсутствие *CLE41/44*) может свидетельствовать об усилении ауксиновой сигнализации.

Изучение активности исследуемых генов в зависимости от камбиального возраста дерева позволило выявить паттерны экспрессии *CLE41/44* и *PXY*, соответствующие ранее представленным результатам. Наибольшая активность *CLE41/44* приходится на фракцию флоэмы и камбиальной зоны, с максимальным значением на высоте 5 метров и возрасте камбия равному 33 годам, а минимальная – на высоте 1 метра (возраст камбия 65 лет). Транскрипты *PXY* были обнаружены в обеих фракциях, преобладая в зоне дифференцирующейся ксилемы, возрастая с увеличением высоты (уменьшением камбиального возраста). Полученные данные могут подтверждать консервативность

сигнального пути *CLE41/44-PXY-WOXs* в тканях ствола при одинаковой фазе камбиального роста.

Транскрипты *WOX13* преимущественно было обнаружены во фракции 1, включающую клетки камбиальной зоны и дифференцирующейся флоэмы. Согласно литературным данным *WOX13* встречается у большинства видов растений, включая мхи и одноклеточные водоросли, и выполняет разнообразные функции в организме (Deveaux et al. 2008; Romera-Branchat et al. 2013; Ramkumar et al. 2018; Segatto et al. 2016; He et al. 2019). Несмотря на повсеместную экспрессию *WOX13*, у некоторых растений паттерн экспрессии был приурочен к определенным тканям. У *Panax ginseng* *PgWOX13a* экспрессируется в лучах ксилемы, паренхиме и камбии главного корня, а *PgWOX13b* - в коре (Wegrzyn et al. 2014). У риса посевного (*Oryza sativa*) *OsWOX13* вероятнее всего вовлечен в механизмы ответной реакции на стресс во время засухи, а также в регуляцию раннего цветения (Minh-Thu et al. 2018). Предыдущие исследования на *Populus* показали роль генов *WOX13* в регуляции камбиальной активности или на более поздних стадиях формирования древесины (Kucukoglu 2015). Интересно, что гены *WOX13* у *Gossypium hirsutum* (*GhWOX13*) были высоко экспрессированы в волокнах хлопка, и их экспрессия постепенно увеличивалась по мере их удлинения. Кроме того, все гены *GhWOX13* имели предполагаемые элементы ответа на гиббереллины, ауксин и брассиностероиды в своих промоторных областях и могли быть индуцированы этими гормонами (He et al. 2019). Исходя из наших результатов и литературных данных, возникает предположение о роли *WOX13* в период снижения камбиальной активности во второй половине вегетационного периода. Подтверждение этой гипотезы требует дальнейших исследований.

4. Выводы

- Активность сигнального пути TDIF/TDR/*WOXs* в тканях ствола двух форм берёзы повислой и сосны обыкновенной изменяется в течение разных фаз камбиального роста, а также различается у разных фенотипов. Активно растущие деревья с широкими годичными кольцами характеризуются усилением *CLE41/44-PXY-WOX4* сигнализации;

- Наибольшая активность *CLE41/44* приурочена к фракции, включающей клетки проводящей флоэмы и камбиальной зоны в начале камбиального роста, максимум транскриптов *PXY* обнаружен в зоне дифференцирующейся ксилемы в течение всего периода роста, а *WOX4* – в камбиальной зоне в период активных делений;
- Ауксин-дефицитные фенотипы карельской берёзы с узорчатой древесиной характеризуются снижением активности транскрипционных факторов модуля *VpARF5-VpHB8*, опосредующих ауксиновую сигнализацию;
- Наиболее высокие значения активности представителя древней клады *WOX13* в тканях ствола сосны обыкновенной приурочена к фракции, включающей клетки проводящей флоэмы и камбиальной зоны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большое количество исследований, посвященных гормональной и пептидной регуляции делений и дифференцировки камбиальных инициалей, чаще всего эти работы проводятся на ювенильных растениях. Гены-участники сигнального пути TDIF/TDR/WOXs были обнаружены у нескольких видов растений, включая древесные покрытосеменные и голосеменные, однако экспрессия этих регуляторов в тканях ствола взрослых деревьев двух форм березы повислой с разной структурой древесины и сосны обыкновенной ранее не проводилось. Данная работа представляет собой еще один шаг в понимании работы системы TDIF/TDR/WOXs в регуляции работы ствольных клеток камбия.

Исследовано распределение экспрессии генов *CLE-PXY-WOX* в период камбиального роста в радиальном ряду: проводящая флоэма/камбиальная зона и дифференцирующая ксилема при различных сценариях ксилогенеза на примере двух форм березы повислой. Мы показали, что максимумы экспрессии генов *CLE41/44* и *PXY* разделены пространственно (проводящая флоэма/камбиальная зона - дифференцирующая ксилема), и во временной динамике. Максимальное количество транскриптов гена *CLE41/44* обнаружено в более ранние фазы камбиального роста, предшествует максимуму экспрессии гена *PXY*. Нижележащей целью TDIF/TDR сигналов является ген *WOX4*, стимулирующий деление камбиальных инициалей. Таким образом, деревья карельской березы с прямослойной древесиной демонстрировали наиболее высокую активность модуля TDIF/TDR/WOXs и характеризовались более интенсивным ростом. Ауксиновый сигналинг на фоне снижения экспрессии генов *CLE41/44* приводит к подавлению экспрессии генов *WOX4* и, соответственно, деления ствольных клеток камбия. Фенотипы деревьев Вс FT с дефицитом ауксина показали высокий уровень экспрессии *WOX4* и снижение роста ксилемы, а также формирование ксилемы с меньшей плотностью сосудов. Значительное снижение количества свободного (физиологически активного) ауксина вследствие его конъюгации с UDP-глюкозой и аминокислотами, описанное ранее, может привести к более драматичным сценариям в деревьях Вс FT в зонах развития структурных аномалий; дифференцирующиеся камбиальные производные сохраняют протопласт и превращаются в клетки запасающей паренхимы.

Были обнаружены гены семейств *ARF* и *HD-ZIP III* в геноме березы повислой. Также мы исследовали активность представителей этих семейств – *MP/ARF5* и его нижележащей мишени - *HB8* в тканях дифференцирующейся флоэмы, камбия и дифференцирующейся ксилемы в разные периоды камбиальной активности. Мы обнаружили, что уровень экспрессии *ARF5* в дифференцирующейся ксилеме растений карельской березы с различной структурой древесины был ниже, чем у деревьев повислой березы. В то же время формирование узорчатой древесины у деревьев Вс FT было связано с низкой экспрессией *HB8*, тогда как у деревьев Вс NFT с прямослойной древесиной экспрессия *HB8* была неотличима от таковой у деревьев Вр.

Мы показали, что в период камбиального роста у *P. sylvestris* экспрессия *CLE-PXY-WOX* генов распределена в камбиальной зоне между клетками флоэмы и ксилемы, с максимумом для каждого гена в той или иной фракции. Уровень транскриптов этих генов изменялся во время камбиального роста (27 мая - 21 июля). В данном исследовании мы впервые изучили профили экспрессии гена, принадлежащего к древней кладе (*WOX13*), в тканях ствола сосны обыкновенной.

Таким образом, впервые получены данные о работе ключевого сигнального пути, регулирующего развитие камбия *TDIF/TDR/WOX* в тканях ствола разных видов древесных растений во временной и пространственной динамике. Понимание молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе формирования древесины, имеет решающее значение для поддержания производства древесины во все более неблагоприятных условиях окружающей среды. Полученные данные имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение для реализации программ, направленных на увеличение продуктивности древесных растений в области биотехнологии и генной инженерии.

Список публикаций, в которых изложены основные результаты научно-исследовательской работы

По теме исследования опубликовано 9 работ, из них 5 статей в высокорейтинговых научных журналах, в том числе рекомендованных ВАК для публикации результатов научных исследований и X тезисов и материалов докладов

1. Galibina N. A., Tarelkina T.V., **Chirva O.V.**, Moshchenskaya Y.L., Nikerova K.M., Ivanova D.S., Semenova L.I., Serkova A.A., Novitskaya L.L. Molecular Genetic Characteristics of Different Scenarios of Xylogenesis on the Example of Two Forms of Silver Birch Differing in the Ratio of Structural Elements in the Xylem // *Plants*. – 2021. – Т. 10. – №. 8. – С. 1593.
2. Galibina N. A., Moshchenskaya Y.L., Tarelkina T.V., **Chirva O.V.**, Nikerova K.M., Serkova A.A., Semenova L.I., Ivanova D.S. Changes in the activity of the *CLE41/PXY/WOX* signaling pathway in the birch cambial zone under different xylogenesis patterns // *Plants*. – 2022. – Т. 11. – №. 13. – С. 1727.
3. Galibina N. A., Moshchenskaya Y.L., Tarelkina T.V., Nikerova K.M., Korzhenevskii M.A., Serkova A.A., Afoshin N.V., Semenova L.I., Ivanova D.S., Guljaeva E.N., **Chirva O.V.** Identification and Expression Profile of *CLE41/44-PXY-WOX* Genes in Adult Trees *Pinus sylvestris* L. Trunk Tissues during Cambial Activity // *Plants*. – 2023. – Т. 12. – №. 4. – С. 835.
4. Мощенская Ю. Л. Галибина Н.А., Тарелкина Т.В., Никерова К.М., **Чирва О.В.**, Новицкая Л.Л. Выбор референсных генов для нормализации данных количественной ПЦР в реальном времени у двух форм березы повислой // *Физиология растений*. – 2021. – Т. 68. – №. 3. – С. 258-267.
5. Moshchenskaya Y. L., Galibina N. A., Korzhenevskii M.A., **Chirva O.V.**, Tarelkina T.V., Nikerova K.M. High-Quality RNA Extraction and Evaluation of Reference Genes for qPCR Assay of *Pinus sylvestris* L. Trunk Tissues // *Russian Journal of Developmental Biology*. – 2023. – Т. 54. – №. 1. – С. 24-36.

Перечень всероссийских и международных конференций, на которых представлены основные результаты научно-исследовательской работы

Основные результаты выпускной квалификационной работы были представлены на 4 международных и российских научных мероприятиях в виде устных и стендовых докладов:

1. V (XIII) Международная ботаническая конференция молодых учёных в Санкт-Петербурге, 25-29 апреля 2022 г., г. Санкт-Петербург - Мощенская Ю.Л., Галибина Н.А., Корженевский М.А., **Чирва О.В.**, Никерова К.М., Ершова М.А. «Молекулярно-генетический контроль деятельности камбия у *Pinus sylvestris* L.».
2. Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий», 27-30 сентября 2022 г., г. Нижний Новгород – **Чирва О.В.**, Мощенская Ю.Л., Галибина Н.А., Корженевский М.А., Никерова К.М., Ершова М.А. «Регуляция активности камбия у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в период активного камбиального роста. Система Cle41/44 – PXY – WOX4.
3. Всероссийская научная конференция с международным участием X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата», 18-23 сентября 2023 г., г. Уфа – Чирва О.В., Афошин Н.В., Серкова А.А., Тарелкина Т.В., Мощенская Ю.Л., Корженевский М.А., Галибина Н.А. «Активность сигнального пути Cle41/44/PXY/WOX в тканях ствола *Pinus sylvestris* L. во время флоэмо- и ксилогенеза».
4. V Российский симпозиум с международным участием «Клеточная сигнализация: итоги и перспективы», 14-17 сентября 2021 г., г. Казань - Галибина Н.А., Тарелкина Т.В., Чирва О.В., Мощенская Ю.Л., Никерова К.М., Иванова Д.С., Семенова Л.И., Серкова А.А., Новицкая Л.Л. «Особенности биосинтеза, инактивации и сигналинга ауксина при формировании узорчатой древесины карельской березы».

Список конкурсных проектов, в рамках которых выполнялись исследования

1. Грант РФФ 21-14-00204 (2021–2023 г.) «Закономерности формирования ядровой древесины у сосны обыкновенной в диапазоне климатических условий: физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы». Руководитель – д.б.н. Галибина Н.А. Роль в проекте – исполнитель.