

на правах рукописи



**Брюхин Владимир Борисович**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛОВОГО  
РАЗМНОЖЕНИЯ И АПОМИКСИСА У ПОКРЫТОСЕМЕННЫХ  
РАСТЕНИЙ**

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Санкт-Петербург

2023

Работа выполнена в лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института имени В. Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН), Санкт-Петербург

Научный консультант: **Рысков Алексей Петрович**, член-корреспондент РАН, профессор, д.б.н., заведующий лабораторией организации генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена РАН, Москва

Официальные оппоненты: **Соколов Виктор Андреевич**, д.б.н., заведующий лабораторией цитологии и апомиксиса растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

**Эльконин Лев Александрович**, доктор биологических наук главный научный сотрудник отдела биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федерального аграрного научного центра Юго-Востока», Саратов

**Кашин Александр Степанович**, д.б.н., профессор кафедры генетики, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского», Саратов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва

Защита диссертации состоится «24» января 2024 г. в «10.00» часов на заседании Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406). С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru>). Автореферат разослан «15» октября 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01 доктор биологических наук, доцент Гульназ Фаритовна Корытина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и разработанность темы исследования.** Одной из базовых концепций общей и эволюционной биологии является представление о том, что все живые организмы происходят от ранее существовавших организмов. Таким образом, размножение является необходимым условием онтогенеза и филогенеза живых существ, а следовательно, и их эволюции. В процессе последней высшие растения приобрели ряд универсальных стратегий, способствующих репродуктивному успеху. У покрытосеменных растений жизненный цикл представляет собой чередование двух гетероморфных поколений, диплоидного спорофита и гаплоидного гаметофита. В отличие от животных организмов генеративные линии цветковых растений не образуют напрямую женские и мужские гаметы (половые клетки). Вместо этого соматические клетки спорофита совершают два деления мейоза, продуктами которого являются гаплоидные материнские споровые клетки, из которых в процессе гаметогенеза формируются многоклеточные гаметофиты, женский (зародышевый мешок) и мужской (пыльца), в специализированных генеративных органах, семязачатке и пыльнике соответственно (рис. 1). Зародышевый мешок содержит женские гаметы, яйцеклетку и центральную клетку, тогда как пыльца включает в себя мужские гаметы, спермии (Герасимова-Навашина, 1957; Поддубная-Арнольди, 1976; Brukhin, Morozova, 2011; Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017; Brukhin et al., 2019). При половом размножении, в результате двойного оплодотворения происходит слияние одного спермия с яйцеклеткой, а второго с центральной клеткой, что дает начало диплоидному зародышу (новому поколению спорофита) и триплоидному эндосперму (терминальной питательной ткани для зародыша). Кроме того, эндосперм очень важен с экономической точки зрения, поскольку он представляет основной компонент массы большинства зерновых культур, обеспечивающих питанием и энергией человека и животных.

Помимо полового в природе довольно распространено бесполое размножение, при котором не происходит мейоз и отсутствует оплодотворение – вегетативное размножение и апомиксис. При вегетативном размножении новые растения образуются без формирования гамет и семян, тогда как при апомиксисе образуются семена, содержащие бесполой зародыш, генетически идентичный материнскому растению (Хохлов, 1946; 1970; Петров, 1964; 1976; 1988; Солнцева, 1970; Nogler, 1984; Asker, Jerling, 1992; Naumova et al., 2001; Grossniklaus, 2001; Bicknell, Koltunow, 2004; Van Dijk, 2009; Kotani et al., 2014; Брюхин, 2017; Brukhin

et al., 2019). Апомиксис довольно распространён в природе, он встречается у большого количества видов растений, принадлежащих примерно к 148 родам (Hojsgaard et al., 2014). При этом он практически не обнаружен в культурных растениях. Половое размножение обеспечивает материал для формирования генетически и фенотипически изменчивого потомства, что способствует адаптации организмов к изменяющимся условиям окружающей среды и позволяет селекционерам выводить новые сорта культурных растений. Апомиксис же напротив формирует клональное потомство, генетически идентичное материнскому растению, тем самым позволяет фиксировать сложные генотипы, и сохранять комплексы ценных приобретенных признаков в неограниченном ряду поколений (Навашин, 1933; Карпеченко, 1935; Хохлов, 1946; 1970; Петров, 1964; 1976; 1988; Солнцева, 1970; Nogler, 1984; Asker, Jerling, 1992; Naumova, 1993; Батыгина, 1999; Naumova et al., 2001; Koltunow et al., 1995; Grossniklaus et al., 2002; Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017 и др.). В последние десятилетия исследования полового и апомиктического размножения растений привлекает большое внимание ученых во всем мире. Такой интерес вызван следующими причинами: 1) переход спорофита к генеративной фазе и переключение программ развития его соматических клеток на репродуктивный путь является важным событием жизненного цикла растений; 2) понимание генетических и молекулярных механизмов регуляции полового размножения и апомиксиса важнейшее условие фенотипического улучшения урожая и контролируемого управления семенной репродукцией растений в агро секторе (Кашин, 1993; Koltunow et al., 1995; Vielle-Calzada et al., 1996; Grossniklaus et al., 2002; Spillane et al., 2004; Schmidt et al., 2015; Брюхин, 2017; Elkonin et al., 2018; Соколов, Абдырахманова, 2019; Brukhin, Baskar, 2019; Брюхин, Андрусенко, 2021); 3) инженерия апомиктических культур имеет большой потенциал и экономическую ценность для растениеводства. Внедрение апомиксиса в культурные растения и использование его свойств способствует значительному росту сельскохозяйственного производства, что может стать предвестником второй «зеленой революции» (Savidan, Dujardin, 1992; Брюхин, 2017) или, как назвал ее Виелле Кальсада с соавторами, к «асексуальной революции» (Vielle Calzada et al., 1996).

Несмотря на многолетние исследования вопросов молекулярно-генетической регуляции полового и бесполого семенного размножения растений в разных лабораториях мира, до сих пор многие ключевые вопросы остаются не выясненными. В частности, значение деградации сигнальных белков клеточного

цикла и генов убиквитин-протеасомного пути, а также роль экзосомы и ее субъединиц для развития зародышевого мешка и эмбриогенеза были малоизвестным полем. Далеко не до конца изучены гены, участвующие в формировании женского гаметофита, и их функции. Практически отсутствовали сравнительные полногеномные исследования половых и апомиктических растений. Эти и другие вопросы репродукции были исследованы в реферируемой диссертации.

**Целью** исследования было изучение молекулярно-генетических аспектов регуляции полового и апомиктического размножения покрытосеменных растений с использованием полногеномных технологий.

Исходя из поставленной цели были намечены следующие **задачи**:

1. С помощью системы транспозонов *Ac* и *Ds* и последующего двухступенчатого скрининга получить мутантные линии арабидопсиса с нарушением формирования женского гаметофита и эмбриогенеза, осуществить анализ полученных мутантов, выявить нарушенные гены.
2. Изучить влияние генов убиквитинового метаболизма *RPN1a*, *RPN1b*, *CUL3a*, *CUL3b* и комплекса лигазы E3 *CUL4-DDB1* на развитие женского гаметофита и эмбриогенез растений на модельном растении *Arabidopsis thaliana*.
3. Исследовать значение функции экзосом для формирования женского гаметофита, эмбриогенеза и развития проростков арабидопсиса.
4. Изучить и охарактеризовать гены *APOLLO* и *CENH3*, ассоциированные с апомиксисом, у половых и апомиктических видов *Boechnera*.
5. Осуществить сборку и произвести сравнительный анализ геномов половых и апомиктических растений из рода *Boechnera* как ресурса для исследования апомиксиса.
6. Проанализировать существующие данные о роли эпигенетических изменений при размножении и развитии растений.

**Научная новизна работы** заключается в комплексном подходе к изучению базовых этапов размножения растений – мейоза, гаметогенеза, оплодотворения и эмбриогенеза, с использованием морфологических, молекулярно-генетических, цитогенетических и геномных методов и подходов.

1. С помощью инсерционного мутагенеза были произведены более двух с половиной тысяч мутантных линий модельного растения *Arabidopsis thaliana*, а также идентифицированы и проанализированы мутанты с нокаутом генов, влияющих на развитие гаметофитов и эмбриогенез. Проанализирована функция нарушенных генов и фенотип шести мутаций, ассоциированных с развитием

женского гаметофита, изолированных из полученной коллекции мутантов (Brukhin et al., 2011).

2. Обнаружено, что при остановке развития гаметофита соответствующие мутации затрагивают многие важные процессы в клетке, а также, что эти мутации часто ассоциируются с хромосомными перестройками. Выявленные мутации влияют как на мужские, так и на женские гаметофиты, то есть полностью секс-специфичные гаметофитные мутации встречаются редко, что вполне ожидаемо, поскольку многие процессы во время гаплоидной фазы при формировании мужского и женского гаметофитов сходны и необходима экспрессия множества генов (Brukhin et al., 2011).

3. Помимо зиготического эмбриолетального фенотипа, у *Arabidopsis thaliana* нами обнаружено четыре класса наиболее часто встречаемых дефектов женского гаметофита, выделенных согласно сценарию остановки его развития (Brukhin et al., 2005a): митотический, кариогамный, дегенеративный и материнского гаметофитного эффекта, ведущего к абортности семян. Несмотря на преобладающую стадию остановки развития, экспрессия фенотипа у всех мутантов обнаруживала вариабельность (Brukhin et al., 2011).

4. Подтверждено, что убиквитин-протеасомный метаболический путь, выполняющий функцию деградации регуляторных молекул в клетках, является крайне необходимым для гаметогенеза и эмбриогенеза у арабидопсиса.

5. Выявлена важная роль, которую выполняет субъединица RPN1 протеасомы 26S для нормального протекания эмбриогенеза и клеточного цикла. Для гена *RPN1* обнаружены два паралога, являющиеся функционально эквивалентными, но не избыточными в репродуктивном развитии *in planta* (Brukhin et al., 2005b).

6. Обнаружено, что ген куллин (*CUL*)-зависимой убиквитинлигазы *CUL3* представлен в геноме двумя копиями, проявляющими функциональную избыточность по отношению друг к другу; функциональное нарушение обеих копий гена *CUL3* снижает гаметофитную передачу и вызывает гибель образовавшихся зародышей; *CUL3* влияет на формирование паттерна зародыша арабидопсиса и на развитие эндосперма. Также обнаружено, что наблюдаемая абортность зародышей находится под материнским контролем.

7. Установлено, что потеря функции комплекса *CUL4-DDB1*, важного класса куллинсодержащих убиквитинлигаз (E3), задействованного в развитии и размножении растений и действующего как субстратный рецептор, приводит к гибели зародышей в семенах арабидопсиса. Наши исследования предоставили первые доказательства физической и функциональной связи между лигазой *CUL4*

Е3 и комплексом PRC2, что указывает на новую роль убиквитинирования в подавлении экспрессии генов (Dumbliauskas et al., 2011).

8. С помощью генетического, протеомного и полнотранскриптомного анализа впервые представлены доказательства уникальной субфункционализации отдельных коровых субъединиц экзосомы растений и ее роли в размножении и развитии на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Было обнаружено, что отдельные субъединицы экзосомы растений необходимы для развития женских гаметофитов (RRP41) или эмбриогенеза (RRP4), то есть являются существенными структурами для нормального семенного размножения.

9. Обобщены и проанализированы гены-кандидаты, связанные с возникновением апомиксиса (Брюхин, 2017; Brukhin, Baskar, 2019; Brukhin et al., 2019). Выполнен экспрессионный анализ ассоциированных с апомиксисом генов *CENH3* (кодирующий центромерный гистон H3) и *APOLLO* (кодирующий экзонуклеазу NEN3), выявлены различия в экспрессии этих генов у половых и апомиктических видов *Boechea* (Bakin et al., 2022). Осуществлен филогенетический анализ гена *APOLLO*, обнаруживший разделение на две отдельные ветви апо- и половых аллелей гена. Предложен эволюционный сценарий, согласно которому одна из копий *APOLLO* могла приобрести новую функцию у общего предка видов *Boechea*, что привело к выделению апомиктических линий (Kliver et al., 2018).

10. Подтверждено, что геномы апомиктических растений из рода *Boechea* характеризуются высокой гетерозиготностью, сопровождающейся аллоплоидией и анеуплоидией, возникших в результате гибридизационных событий, тогда как половые виды имеют относительно гомозиготный геном (Schranz et al., 2005; Koch et al., 2003; Mandáková et al., 2015; Kliver et al., 2018; Brukhin et al., 2019).

11. На нескольких платформах осуществлено полногеномное секвенирование полового вида *Boechea retrofracta* и апомиктического гибрида видов *B. stricta* и *B. retrofracta*.

12. Впервые выполнена безреференсная сборка генома полового вида *B. retrofracta* и поэтапная безреференсная сборка до уровня хромосом высоко гетерозиготного генома апомиктического растения, древнего природного гибрида половых растений *B. stricta* и *B. retrofracta*, у которого обнаружены дополнительные абберантные хромосомы *Het* и *Del*, являющиеся наиболее вероятными кандидатами, несущими локусы генов, связанных с апомиксисом. Осуществлена аннотация собранных геномов.

13. Проанализирована роль эпигенетических изменений в репродуктивном развитии растений, которые имеют различное приспособительное значение при половом и бесполом размножении. (Brukhin, 2020; Brukhin, Albertini, 2021).

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Получены и проанализированы новые данные по молекулярно-генетической регуляции репродуктивных процессов растений. Проведенные исследования имеют фундаментальное значение для решения ведущих вопросов биологии развития.

Практическое значение работы заключается в том, что исследование семенного размножения и гаметофитного апомиксиса у покрытосеменных является важным ресурсом для интенсификации и повышения эффективности сельского хозяйства, а биоинженерное внедрение элементов апомиксиса в культурные растения позволит на длительный срок закрепить сложные генотипы, в том числе высоко гетрозиготные и полиплоидные генотипы, которые способствуют возникновению гибридной силы при гетерозисе, а также созданию самоподдерживающихся популяций, устойчивых к вредителям и экстремальным факторам внешней среды. Полученные результаты диссертации дополняют знания о молекулярно-генетической регуляции, которые в итоге позволят подойти к целенаправленному управлению этими процессами, будут способствовать интенсивному развитию сельского хозяйства.

Результаты настоящего исследования могут быть использованы научными сотрудниками, преподавателями ВУЗов, включены в учебные пособия и учебники, а также в курсы лекций и практических занятий для студентов, специализирующихся в области молекулярной биологии, генетики развития и биологии растений.

**Методология и методы исследования.** Для исследований, представленных в диссертации, были выбраны адекватные методы и подходы молекулярно-генетического и мутационного анализа, реципрокных скрещиваний, фенотипического и сегрегационного анализа, молекулярной биологии, гибридизации *in situ*, цито-морфологии, микроскопии, цитогенетики, трансформации и реверсии мутаций, молекулярной филогенетики, секвенирования, NGS (полногеномное секвенирование на различных платформах, Illumina, ONT, Hi-C, Bionano Genomics, микрочипы и др.), биоинформатики, проточной цитометрии, масс-спектропии и др. Объектом исследования были растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа (wt) и мутантные растения с интересующими нас фенотипами; половые и апомиктические растения из рода *Boechera*. Предметом исследования являлись особенности полового и

апомиктического размножения растений, молекулярно-генетические, цитологические и геномные различия, определяющие эти два типа размножения. Исследования проводились в лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН, Центре геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского СПбГУ и лаборатории генетики развития растений Цюрихского университета.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Гены, ответственные за гаметофитные мутации у *Arabidopsis thaliana* часто демонстрируют плейотропные эффекты, что выражалось в вариабельности фенотипа ряда мутантов, и принадлежат к различным семействам.
2. Убиквитин-протеасомный метаболический путь (с участием генов *RPN1a*, *RPN1b*, *CUL3a*, *CUL3b*, *CUL4*, *DDB1* и др.) регулирует размножение и развитие растений, в том числе, нормальный гаметогенез и эмбриогенез.
3. Комплекс CUL4-DDB1 арабидопсиса взаимодействует с белком MSI1 и необходим для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA*.
4. Экзосомы, играющие центральную роль в метаболизме РНК, являются важными белковыми комплексами клетки, принимающими участие в регуляции размножения и развития растений. Основные субъединицы растительной экзосомы демонстрируют высокий уровень функциональной пластичности и субфункционализации при гамето- и эмбриогенезе.
5. Гены *CENH3* и *APOLLO* ассоциированы с апомиксисом и дифференциально экспрессируются в семязачатках половых и апомиктических видов растений из рода *Boechera*. Апо-аллели *APOLLO* находятся под положительным отбором, что характерно для паралогов, которые необходимы для выполнения новой функции.
6. Впервые осуществлена полногеномная сборка и аннотация генома полового вида *B. retrofracta* и природного апомиктического гибрида видов *B. stricta* и *B. retrofracta*. Геномы апомиктических гибридов отличаются высокой степенью гетерозиготности по сравнению с геномами половых видов, благодаря комбинации нескольких геномов, участвовавших в гибридизационных событиях, и часто наличием добавочных хромосом *Het* и *Del*, которые связаны с апомиксисом. Повторы TR147 и TR167, фланкирующие определенные гены, отличаются у апомиктических и половых видов.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Полученные результаты и выводы опираются на экспериментальные и литературные данные. Исследования проводили с включением в работу большого объема

экспериментальных данных и анализом литературных сведений. Все экспериментальные наблюдения выполняли в нескольких проворностях, с использованием положительного и отрицательного контроля, использовали t-статистику, для оценки фенотипа мутантных растений применяли критерий согласия  $\chi^2$ , геномные данные были получены с использованием статистики на основе k-mer анализа и других статистических методов анализа, перечисленных в главе Экспериментальные процедуры. Корректность проведенных исследований подтверждена публикацией основных результатов диссертации в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах и изданиях.

**Личный вклад автора в проведение исследования.** Представленная работа, включая ее планирование, получение материала, результатов и написание текста диссертации, является итогом многолетних (1996–2023 гг.) исследований диссертанта. Работа выполнена непосредственно автором, в некоторых случаях работа осуществлялась в рамках совместной деятельности с коллегами. Автор принимал участие во всех этапах работы, ему принадлежит формулировка проблемы, постановка целей и задач, планирование, им получены анализируемые мутантные растения, подготовлен материал для полногеномного секвенирования, произведена обработка результатов и их интерпретация. Автором проанализировано большое количество литературы. Изложенные в диссертации материалы были опубликованы в научных статьях и представлены на тематических конференциях. Все сообщения на научных конференциях и доклады на семинарах по теме настоящей диссертации были осуществлены непосредственно самим автором.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации представлены на расширенном заседании лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии и лаборатории биосистематики и цитологии БИН РАН, проведенного также в рамках заседаний Русского ботанического общества (РБО) и Всероссийского общества генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова (ВОГиС), а также на заседании ученого совета ИБГ УФИЦ РАН. Результаты были доложены на отечественных и международных конференциях и совещаниях: 17-м Международном конгрессе по исследованию полового размножения растений (ICSPRR), Польша (Люблин, 2002); Совещанию по эмбриогенезу и регуляции развития растений, Италия (Турин, 2003); Конференции по исследованию гаметофитов растений, Швейцария (Аскона 2003); 18-м Международном конгрессе по исследованию полового размножению растений (ICSPRR), Китай (Пекин, 2004); XII Конференции по эмбриологии растений, Польша (Краков,

2005); Конференции по растениеводству, Великобритания (Кардифф, 2009); Всемирном эпигенетическом конгрессе, Германия (Берлин, 2009); Всемирном конгрессе AgriGenomic, Бельгия, (Брюссель, 2010); Симпозиуме по эпигенетике в Осло, Норвегия (Осло, 2014); Конференции Последние достижения в области развития растений и их реагирования на окружающую среду, Япония (Авадзи, 2016); XXV – XXVII Конференциях по геномам растений и животных (PAG), США, Калифорния (Сан-Диего, 2017 – 2019); 5-м Конгрессе по геномике растений и генетическому редактированию, Нидерланды (Амстердам, 2017); Международной конференции «Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растений», Белоруссия (Минск, 2017); IV (XII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (С.-Петербург, 2018); 25-м Международном конгрессе по исследованию полового размножению растений (ICSPRR), Япония (Гифу, 2018); 11-ой Международной конференции «Биоинформатика» регуляции и структуры генома\системной биологии BGRS\SB-2018 (Новосибирск, 2018); V Международной конференции «Молекулярная филогенетика и биобанкирование биоразнообразия» (MolPhy) в МГУ (Москва, 2018); VII съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, (Петербург, 2019); 26-м Международном конгрессе по исследованию полового размножения растений (ICSPRR), Чехия (Прага, 2022).

А также в качестве приглашенного докладчика автор докладывал результаты на научных семинарах и школах: семинаре в Королевском датском институте сельскохозяйственных наук DIAS, Дания, май 2003 г.: «Gametophytic and Zygotic Embryo Lethal Mutants in *Arabidopsis*»; институтском семинаре в Институте биологии растений Цюрихского университета, Швейцария, май 2003 г.: «Stranger Than Eden: EXOTIC Mutants in *Arabidopsis*»; семинаре в лаборатории клеточной биологии и биологии развития, Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания, май 2003 г.: «Generation and Analysis of Semi-Sterile Mutants in *Arabidopsis*»; семинаре в Школе биологических и молекулярных наук, Оксфордский университет Брукса, Оксфорд, Великобритания, июнь 2004 г.: «Application of Microscopic Techniques for the Investigations in Plant Development»; семинаре на кафедре зоологии, экологии и растениеводства, Университетский колледж Корка, Корк, Ирландия, октябрь 2004 г.: «Role of The Ubiquitin 26S Proteasome Pathway in Plant Development»; семинаре в институте молекулярной биологии растений CNRS, Страсбург, Франция, декабрь 2004 г.: «The Ubiquitin 26S Proteasome Proteolytic Pathway in Plant Reproduction»; семинаре в институте биотехнологии

Швейцарского федерального технологического университета (ETH), Цюрих, Швейцария, январь 2005 г.: «Utilization of the Ubiquitin 26S Proteasome Pathway in Biotechnology»; семинаре в Национальном институте сельскохозяйственной ботаники (NIAB), Кембридж, Великобритания, сентябрь 2006 г.: «The role of the ubiquitin/ proteasome pathway in plant embryogenesis and morphogenesis, under the scope for plant breeding and genetics»; доклад на заседании Русского ботанического общества, Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия, октябрь 2006 г.: «Скрининг и молекулярно-генетический анализ гаметофитных и эмбриолетальных мутантов арабидопсиса»; семинаре в университете Билефельда, Германия, май 2011 г.: «Genetics of Female Gametophytic and Embryo-lethal Mutants of *Arabidopsis thaliana*»; доклад в университете Восточной Англии, Великобритания, июнь 2012 г.: «Identification of mechanisms of cell-cell interaction that contribute to identity maintenance in tissue»; VI Международной школе молодых ученых «Геномика и системная биология», Москва - Звенигород, ноябрь 2014 г.: «Эпигенетика – вторичный код генома, ее роль в фенотипической пластичности»; V Международной школа «Эмбриология, генетика и биотехнология», Санкт-Петербург, октябрь 2016 г.: «Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса»; VII Межд. Школе молодых ученых «Геномика и системная биология», Москва-Звенигород, ноябрь 2016 г.: «Молекулярно-генетические свойства репродукции растений»; Первой международной школе-конференции ВИР по количественной генетике, Санкт-Петербург, июль 2018: «Геномные исследования апомиксиса и его молекулярно-генетическая регуляция»; Центр Менделя CEITEC, университет Масарика, весенние семинары 2019 г., Брно, Чехия, апрель 2019 г.: «Sexual and Apomictic Development: From Biology to Genomics»; семинаре в Юго-восточном университете Nova, Флорида, США, май 2022: «Reference free heterozygous plant genome assembly».

**Публикации.** По материалам диссертации было опубликовано 30 работ, из них 26 статей в рецензируемых периодических и продолжающихся изданиях, в том числе 23 – в журналах из «Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук», включая высокорейтинговые рецензируемые журналы (EMBO J., Cell, Plants, Epigenomes, The Plant Cell, The Plant J., Sex. Plant Reproduction, Plant Biotechnology, Taxon и др.), 3 статьи в монографиях и 1 учебное пособие. 23

публикации реферируются системой «Web of Science» и одновременно входят в систему «Scopus».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, семи глав с выводами, описания методических процедур, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 714 наименований. Работа изложена на 441 странице машинописного текста и включает 82 рисунка и 38 таблиц.

**Благодарности:** автор выражает глубокую благодарность за помощь в подготовке материала, проведении исследований, биоинформатической обработке результатов, получении данных и их обсуждении коллегам из лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН, коллегам, аспирантам и студентам из Центра геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского СПбГУ, а также зарубежным коллегам, прежде всего, из лаборатории генетики развития растений института биологии растений Цюрихского университета в Швейцарии. Результаты диссертации частично получены благодаря финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 15-54-45001, 16-54-21014, 20-54-46002).

### **КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **Введении** обоснован выбор темы и актуальность исследования, формулируется основная цель и ставятся задачи исследования, обозначенные выше в настоящем автореферате.

**Первая глава** посвящена анализу и роли полового и бесполого размножения посредством семян. Основные атрибуты полового размножения — это *мейоз и оплодотворение*. При мейозе происходит *рекомбинация* гомологичных хромосом и *кроссинговер*, что способствует созданию новых генетических комбинаций на основе наследственного материала родителей, а также имеет место *редукция количества хромосом* вдвое. В результате оплодотворения происходит *слияние гаплоидных гамет*, яйцеклетки и спермия, что приводит к возникновению диплоидной зиготы, первой клетки нового организма, которая содержит рекомбинированный генетический материал родителей. Недостатком полового размножения является расщепление полезных признаков в последующих поколениях, таким образом, что потомство может потерять удачные комбинации родительских генов. В природе сотни видов покрытосеменных растений производят семена из нередуцированных гамет, сформировавшихся без мейоза

(апомейозом), и образуют зародыш посредством партеногенеза, независимого от оплодотворения. Такой способ бесполого размножения получил название *апомиксис* (греч. *apo* — без и *mixis* — смешение). При апомиксисе формируется клональное потомство, что значительно влияет на существующую структуру популяций, уменьшая поток генов, образуя генетическую однородность и уменьшая изменчивость особей в популяции. В разделе 1.1 рассматривается жизненный цикл цветковых растений, который представляет собой чередование диплоидного спорофита (спорообразующего организма) и гаплоидного гаметофита (гаметообразующего организма) (рис. 1). В разделах 1.2 и 1.3

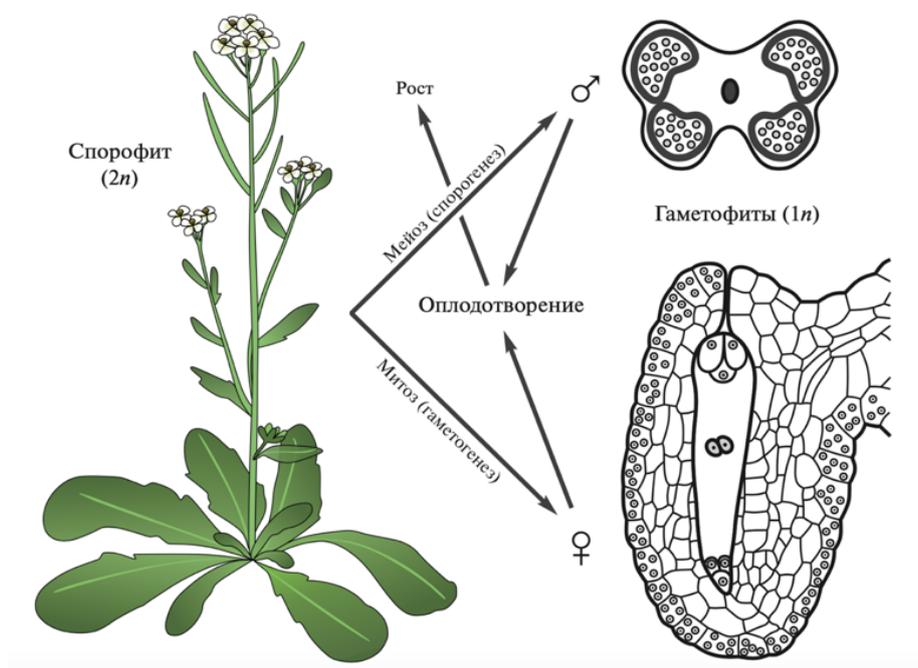


Рисунок 1. Схема чередования спорообразующего (спорофита) и полового гаметообразующего (гаметофита) поколений при развитии и размножении цветковых растений (Брюхин, 2017).

рассматривается структурное разнообразие, эволюция и развитие женского гаметофита (зародышевого мешка). В разделе 1.4 обсуждаются особенности гаметофитного апомиксиса и его потенциальное значение в сельском хозяйстве. Большинство апомиктических видов или линий растений часто имеют гибридное происхождение и обычно являются полиплоидными. Таким образом, апомиксис помогает им избавиться от триплоидного блока, возникающего у полиплоидов при мейозе, и осуществлять семенную репродукцию (Burgess et al., 2014). Наиболее распространенными типами апомиксиса являются: *диплоспория*, *апоспория* (гаметофитный апомиксис) и *адвентивная эмбриония* (спорофитный

апомиксис) (Naumova, 1993; Наумова, 2008; Brukhin, Morozova, 2011; Брюхин, 2017) (рис. 2).

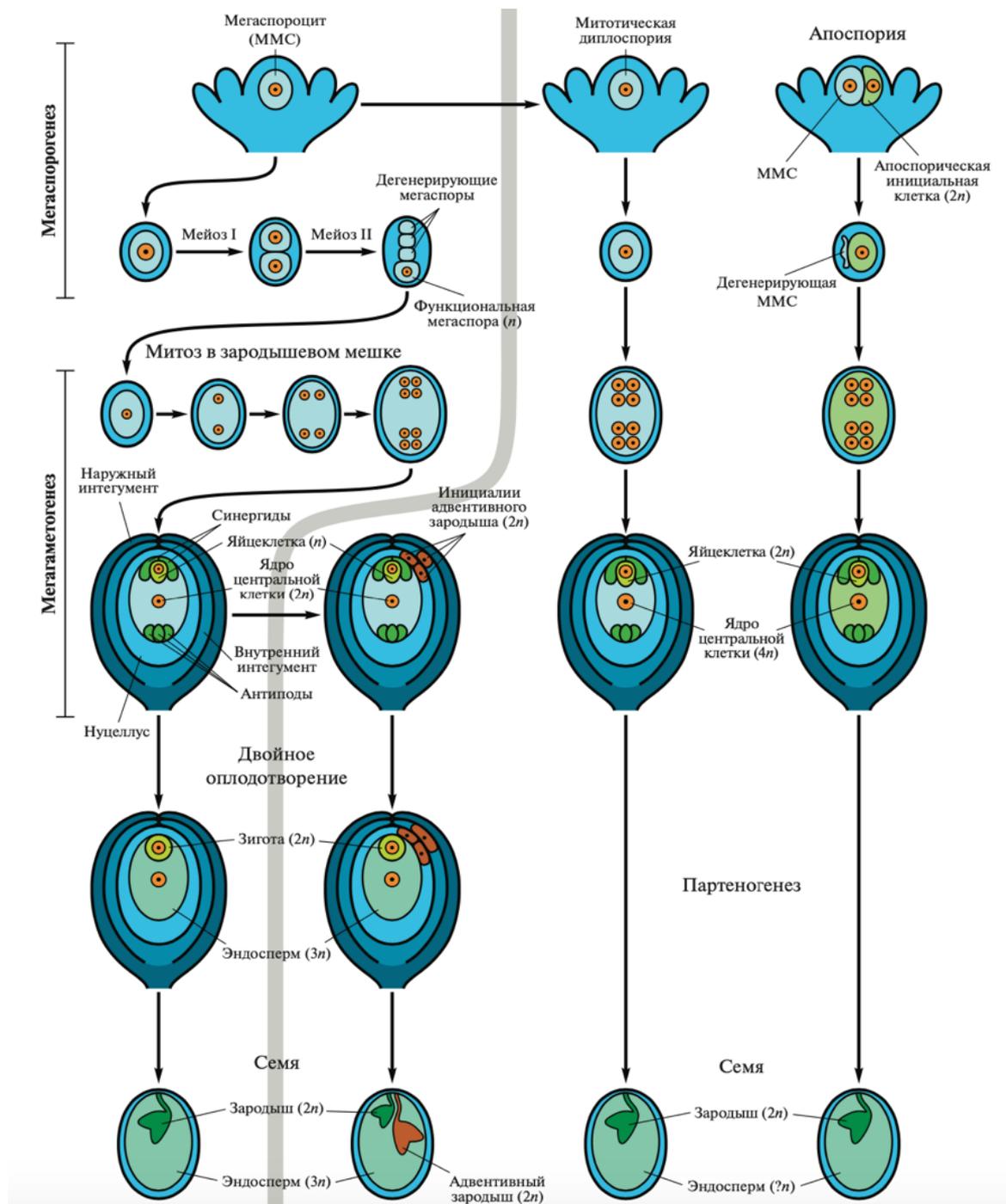


Рисунок 2. Схема полового (слева) и апомиктического (справа) путей развития.

При половом пути материнская клетка мегаспор (MMC) совершает два деления мейоза, образуя тетраду гаплоидных мегаспор, три из которых дегенерируют, а одна (функциональная мегаспора) проходит через три митотических деления, формируя зародышевый мешок, или женский гаметофит. В процессе двойного оплодотворения один спермий оплодотворяет яйцеклетку, образуя зиготу, а второй сливается с ядром центральной клетки, в результате чего возникает первое ядро эндосперма. Из оплодотворенной зиготы

развивается зародыш, а из центральной клетки питающая зародыш ткань эндосперм. Сформированное зрелое семя состоит из диплоидного зародыша, триплоидного эндосперма и семенной кожуры. Справа изображены два типа гаметофитного апомиксиса и спорофитный апомиксис (адвентивная эмбриония) - образование соматических зародышей из спорофитных тканей внутреннего интегумента и нуцеллуса. При апоспории и диплоспории мейоз в материнской клетке мегаспор отсутствует и зародыш развивается партеногенетически из нередуцированной диплоидной яйцеклетки (все ядра зародышевого мешка диплоидны ( $2n$ )), тогда как эндосперм может быть тетраплоидным ( $4n$ ), в случае его автономного развития, либо более высокой пloidности, в случае псевдогамии, то есть оплодотворения центральной клетки гаплоидным ( $1n$ ) или полиплоидным спермием. При апоспории диплоидный зародышевый мешок развивается из нередуцированной апоспорической инициали, тогда как при диплоспории в первом делении мейоза биваленты не расходятся и второе мейотическое деление не наступает, таким образом вместо тетрады гаплоидных мегаспор формируется диплоспора, состоящая из двух диплоидных клеток, из которой и образуется зародышевый мешок. (Брюхин 2017).

Во **второй главе**, в разделе 2.1 рассмотрена морфология развития семязачатка и женского гаметофита покрытосеменных растений, в разделе 2.2 развитие пыльника и мужского гаметофита, в разделе 2.3 идентификация генов, влияющих на развитие гаметофита и типы обнаруженных мутаций женского гаметофита у модельных растений арабидопсиса и кукурузы, влияющие на мегаспорогенез, мегегаметогенез (три последовательных митоза функциональной мегаспоры, кариогамии, целлюляризации) и дегенерацию зародышевого мешка, двойное оплодотворение, гаметофитный материнский эффект. В разделах 2.3.1 и 2.3.2 продемонстрирован использованный нами метод инсерционного мутагенеза на основе меченных селективным маркером *Ac/Ds* транспозонов для получения мутантных линий, влияющих на репродукцию растений, в результате которого нам удалось произвести 2511 мутантных линий, с единственной вставкой несцепленного транспозона *Ds*. Скрининг потомства, полученного в результате самоопыления этих линий, обнаружил 54 (2%) линии с уменьшенным набором семян в плодах. Дальнейший сегрегационный анализ позволил нам изолировать гаметофитные и зиготические эмбриолетальные мутанты из обнаруженных линий с уменьшенным набором семян (рис. 3). Оценка количества *Ds* элементов, присутствующих в геноме каждой линии, осуществлялась с помощью метода геномного саузэрн-блоттинга. Это необходимо для того, чтобы убедиться, что мутантный фенотип обусловлен инсерцией единственного *Ds* элемента. Для фенотипической оценки выявленных мутантов проводили морфологическую характеристику развивающихся семязачатков и семян на просветленных препаратах. Эффективность передачи через мужской (ТЕМ) и женский (ТЕФ) гаметофиты определялась реципрокными скрещиваниями мутантных растений с растениями дикого типа (Brukhin et al.

2011). Хромосомные последовательности, фланкирующие встроенный *Ds* элемент, амплифицировали с помощью термической асимметричной перемежающейся ПЦР (англ. TAIL-PCR, thermal asymmetric interlaced) с использованием вложенных праймеров на концах *Ds*. Характеристика шести выявленных мутантов представлена в табл. 1.

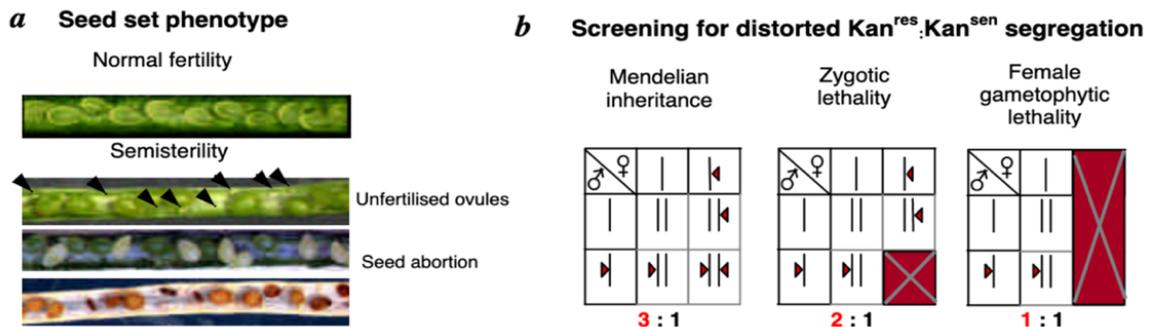


Рисунок 3. Стратегия двухэтапного скрининга, направленного на выявление гаметофитных мутантов, полученных методом инсерционного мутагенеза с использованием модифицированных транспозонов *Ac/Ds*. а) На первом этапе оценивают уменьшение завязываемости семян в стручках. У растения, гетерозиготного по гаметофитной летальной мутации, около половины семязачатков (50%) не увеличиваются в размере и не развиваются в семя. У растений, гетерозиготных по зиготической эмбриолетальной мутации, около 25% семян погибают, тогда как гаметофитная мутация с материнским эффектом обнаруживает 50% абортивных семян. б) На втором этапе коэффициент сегрегации встроенного транспозона анализируется с помощью содержащегося в транспозоне доминантного маркера. Если инсерция с прерыванием какого-либо гена не влияет на трансмиссию, то она наследуется в следующем поколении в соотношении 3: 1, если вызывает эмбриональную летальность 2: 1, а если вызывает летальность женского гаметофита 1: 1. Kan<sup>res</sup> – устойчивые к канамицину; Kan<sup>sen</sup> – чувствительные к канамицину (Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al., 2011).

Таблица 1. Фенотип, сегрегационный и трансмиссионный анализы гаметофитных мутантов.

Мутант	Фенотип		Сегрегация					Трансмиссия			Инсерция <i>Ds</i>	Функция прерванного гена
	фертильности	п семян	Kan <sup>res</sup> :Kan <sup>sen</sup>	п семян	P	TEF	п семян	TEM	N семян			
<i>kupalo</i>	58%N+42%UO	1302	1.04:1	161	0.81	40%	424	68%	275	At2g01070	PTM1-подобный белок	
<i>astlik</i>	49%N+51%UO	570	1.66:1	187	0.23	61%	46	98%	107	Делеция генов: At3g03030 белок семейства F-box At3g03040 белок семейства F-box At3g03050 Целлюлозосинтазоподобный белок семейства АТФаз типа ААА At3g03060 Белок семейства АТФаз типа ААА <i>Ds</i> 3'конец: At1g75990 Субъединица RPN3b протеасомы 26S EMBRYO DEFECTIVE 2719 At4g02700 At5g44520		
<i>amon</i>	59%N+36%UO+5%A	1030	1.13:1	194	0.39	56%	426	24%	31	At2g34680	Ауксин-индуцированный AIR9 в культуре корней	
<i>apis</i>	61%N+31%UO+8%A	1045	0.32:1	212	NA	5%	113	8%	232	At2g01110	TATC-подобный белок, UNFERTILIZED EMBRYO SAC3 ( <i>apg2</i> )	
<i>yarilo</i>	68%N+29%UO+3%A	1221	0.30:1	341	NA	15%	109	9%	146	---		
<i>didilia</i>	70%N+5%UO+25%A	1010	1.05:1	254	0.71	34%	270	59%	195	---		
wt	93%N+6%UO+1%A	844 <sup>a</sup>	3:1 <sup>b</sup>	-	-	100%	-	100%	-	---		

<sup>a</sup> на основе данных

<sup>b</sup> ожидаемые, идеальные значения

N- нормальные семена; A- абортиванные семена; УО- неразвитые семязачатки.  $P \geq 0,05$  основано на ожидаемом коэффициенте сегрегации  $Kan^f$ :  $Kan^s$  1:1 для гаметофитной летальной мутации. NA, неприменимо для мутантов *uar* и *aps*, где соотношение сегрегации было намного меньше 1:1 из-за дефектной передачи через оба пола. Эффективность трансмиссии была рассчитана в соответствии с Howden et al. (1998):  $TE = Kan^f / Kan^s \times 100\%$ ;  $Kan^f$  – проростки, устойчивые к канамицину;  $Kan^s$  – проростки, чувствительные к канамицину; TEF- эффективность женской передачи, TEM- эффективность мужской передачи.

Для подтверждения того, что нарушенный ген является ответственным за наблюдаемый фенотип производился анализ инсерционных линий из других коллекций. Обнаружено, что гены, вызывающие гаметофитные мутации часто демонстрируют плейотропный эффект при остановке развития гаметофита, при этом мутации иногда связаны с хромосомными перестройками. Наиболее часто были обнаружены четыре класса мутантов: *митотический*, *кариогамный*, *дегенеративный* и *материнского гаметофитного эффекта*, приводящего к абортивности семян. Несмотря на преобладающую стадию остановки развития, экспрессия фенотипа у многих мутантов обнаруживала вариабельность, часто наблюдались мутации материнского аллеля с последующей остановкой развития после оплодотворения.

В главе 3 обсуждена молекулярно-генетическая регуляция эмбриогенеза растений на основе литературных и наших данных.

В главе 4 рассмотрены мутанты с нарушением функции генов, отвечающих за *убиквитин-26S-протеасомный метаболический путь*, в которых наблюдались аномалии развития гаметофита и зародышей. Обсуждается исследование этих мутантов в связи с деградацией белков, опосредованной убиквитином. В разделе 4.1 дано объяснение функционирования убиквитин-протеасомного метаболического пути у эукариот (рис. 4 и 5).

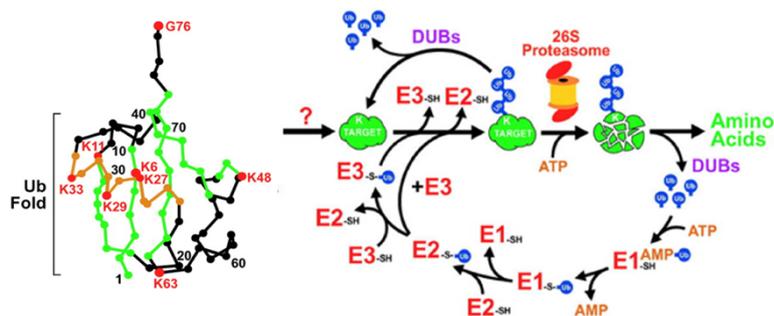


Рисунок 4. Убиквитин-протеасомный путь. А. Убиквитин (Ub) – небольшой консервативный белок, являющийся многократным сигналом распознавания. В. Система базируется на трех энзиматических группах: 1. убиквитин-активирующие (E1) ферменты; 2. убиквитин-конъюгирующие (E2) ферменты; 3. ферменты убиквитинпротеинлигазы (E3). DUBs – деубиквитирующие ферменты. Реакция

убиквитинирования заключается в совместном действии всех трех ферментов: сначала, АТФ-зависимый E1-активирующий фермент образует тиоэфирную связь с С-концом Ub и переносит активированный Ub на E2-конъюгирующий фермент, а затем фермент убиквитинлигаза E3 переносит молекулу Ub на лизиновый остаток субстрата (Peters, 2006). Меченные субстраты распознаются протеасомой 26S, большим мультикаталитическим протеазным комплексом, который расщепляет убиквитинированные белки на короткие пептиды (Smalle, Vierstra, 2004).

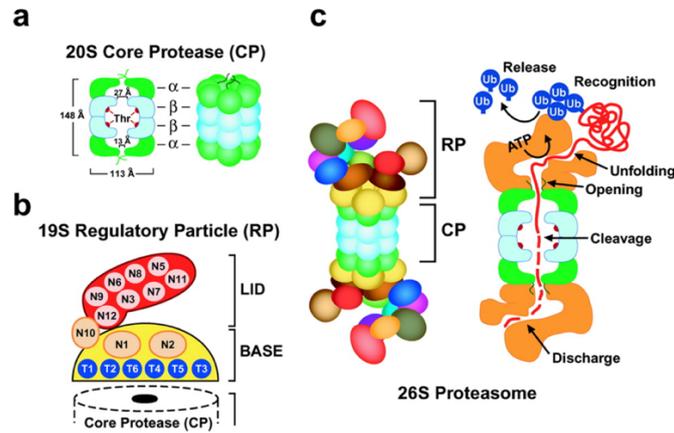


Рисунок 5. Протеасома 26S состоит из двух мультисубъединичных комплексов: коровой протеазы 20S (CP) и регуляторной частицы 19S (RP). В CP происходит протеолиз развернутых белков. RP запускает идентификацию подходящих субстратов для расщепления и направляет входение развернутых белков в полость CP для деградации. RP состоит из 17 субъединиц. Шесть субъединиц основания RP являются АТФазами (от RPT1 до RPT6), которые участвуют в разворачивании и транспортировке субстрата.

В разделе 4.1.1 исследуется роль одной из крупнейших субъединиц протеасомы 26S, RPN1, которую она играет в эмбриогенезе у арабидопсиса. В геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружено два парологичных гена, локализованных в дублированных хромосомных сегментах, — *RPN1a*, расположенном на хромосоме 2 (At2g20580), и *RPN1b* — на хромосоме 4 (At4g28470), они демонстрируют 78% идентичности на уровне аминокислот (Brukhin et al. 2005b). В разделе 4.1.2 дана характеристика мутантов с инсерциями транспозонов в генах *RPN1a* и *RPN1b*. Для каждого из этих генов исследовали по три мутантных аллели со вставкой *Ds*. У гетерозиготных растений *rpn1a-1*, *rpn1a-2* и *rpn1a-3* четверть семян abortируются, как и ожидалось для зиготической эмбриональной летальной мутации. Мутация *rpn1a* расщепляется как рецессивный моногенный признак, эффективность передачи маркера устойчивости к канамицину через мужской и женский гаметофиты является нормальной у всех трех мутантов *rpn1a*. При этом все три мутантные аллели у гетерозиготных растений *rpn1b-1*, *rpn1b-2* и *rpn1b-3* демонстрировали фенотип, не отличимый от растений дикого типа. В разделе 4.1.3 продемонстрирована причинно-следственная связь между

инсерцией *Ds* в *RPN1a* и наблюдаемым фенотипом. Анализ >250 гетерозиготных растений *rpn1a-1* показал, что маркер устойчивости к канамицину и летальность зародышей строго косегрегируют. Ремобилизация *Ds* транспозона в линии *rpn1a-1* путем ее скрещивания со стабильной линией *Ac*, продуцирующей *Ac*-транспозазу, позволило вернуть дикий фенотип: из 24 проанализированных мутантных растений 9 растений, полученных в результате скрещивания гетерозигот *rpn1a-1* с мужскими и женскими родителями *Ac4/Ac4* или *Ac5/Ac5* соответственно, были мозаичными, эти растения продуцировали сегменты как дикого типа, так и мутантные сегменты. Амплификация и секвенирование ПЦР-фрагментов, охватывающих сайт инсерции из ДНК, выделенной из ревертантного сектора, обнаружили, что приблизительно половина (6) секвенированных клонов имеет последовательность дикого типа, а другая половина (4) - ревертантную последовательность. В ревертантной аллели один нуклеотид был делетирован в месте слияния 5' и пять в месте слияния 3', оставляя типичный след (футпринт) *Ds*, вставку из двух нуклеотидов. Вырезание оставило большую инсерцию непосредственно перед стартовым кодоном ATG, восстановив функцию *RPN1a*, о чем свидетельствует фенотипическая реверсия в этом секторе. Результаты цитоэмбриологического анализа, обсуждаемые в разделе 4.1.4 показали, что зародыши, гомозиготные по мутациям в *RPN1a* останавливают свое развитие на глобулярной стадии, при этом наблюдалось преждевременное деление гипофизарной клетки, аномалии формирования протодермы и прокамбиальных клеток зародыша, клетки суспензора были недоразвитыми и менее вакуолизированными, по сравнению с зародышами дикого типа. У мутантных зародышей *rpn1a* наблюдались дефекты прогрессии клеточного цикла (раздел 4.1.5). Мутант *rpn1a-1* скрещивали с маркерной линией, экспрессирующей белок циклин B1;1, слитый с β-глюкуронидазой (GUS). Циклин B1;1, необходимый для митоза, экспрессируется только во время перехода стадий G2/M клеточного цикла. Гибридный белок содержал блок разрушения циклина, что приводит к деградации белка в конце M-фазы. Часть зародышей демонстрировала повышенный уровень активности циклина B1;1-GUS и окрашивалась на этой стадии (рис. 6B), что согласуется с наблюдаемыми фенотипами остановки развития зародышей на ранних стадиях. У 75,2% зародышей (n = 351) экспрессия циклина B1;1-GUS не наблюдалась, либо была очень слабой (рис. 6A), с окрашиванием всего нескольких отдельных клеток, а у 24,8% зародышей накапливали высокий уровень белка циклина B1;1-GUS (рис. 6B). Эти зародыши

останавливались на глобулярной стадии развития и, таким образом, представляли собой гомозиготные мутанты *rpn1a-1*.

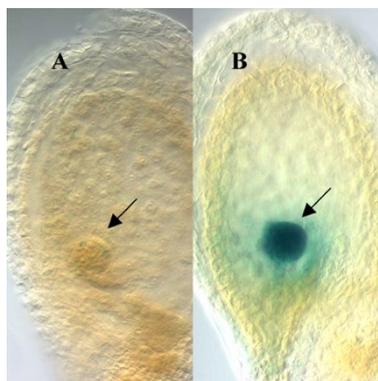


Рисунок 6. (А) Зародыш, несущий по крайней мере одну аллель *RPN1a* дикого типа. Гибридный белок циклин В1;1-GUS деградирует и едва обнаруживается в зародыше (стрелка). (В) Гомозиготный мутантный зародыш *rpn1a-1* из того же стручка, что и в (А) (Brukhin et al., 2005b).

Основные функции протеасомы 26S, заключающиеся в контроле клеточного цикла, были продемонстрированы у дрожжей и у животных (Reed, 2003), особенно при фазовых переходах G1/S и G2/M. Сходные функции могут существовать и у растений, что согласуется с нашим наблюдением того, что гомозиготный мутант *rpn1a* в высокой концентрации накапливает слитый белок циклин В1;1-GUS в зародышах, остановивших свое развитие. Было удивительно, что полученный нами двойной мутант *rpn1a rpn1b* не проявлял более раннего фенотипа во время гаметогенеза или первых делений при развитии зародыша. Мы предположили, что протеасома 26S, по крайней мере частично, все еще функциональна при гаметогенезе и на очень ранних стадиях эмбриогенеза и что истощение ее активности приводит к остановке развития зародыша только на глобулярной стадии. Избыточное накопление циклина В1 свидетельствует в пользу наличия протеолитического дефекта у мутанта *rpn1a* на этой стадии. Либо развитие гаметофитов может включать другие протеолитические системы, которые могут компенсировать потерю функции протеасом, как это было описано у человека. В разделе 4.1.6 описаны эксперименты по экспрессионному анализу генов *RPN1* (рис. 7А). Оба гена *RPN1* экспрессируются во всех исследованных органах, однако они демонстрируют более высокий уровень экспрессии в тканях стебля и стручках, содержащих семена с зародышами на глобулярной стадии. Привлекает внимание и то, что уровень экспрессии *RPN1a* в три-пять раз выше, чем у *RPN1b* во всех проанализированных тканях. Учитывая, что ген *RPN1a* обильно экспрессируется в репродуктивных тканях, а мутанты *rpn1a* демонстрируют дефектный эмбриогенез, мы решили определить характер

экспрессии *RPN1a* и *RPN1b* на клеточном уровне в развивающихся цветках и семенах с помощью гибридизации *in situ* на срезах цветочных почек и стручков

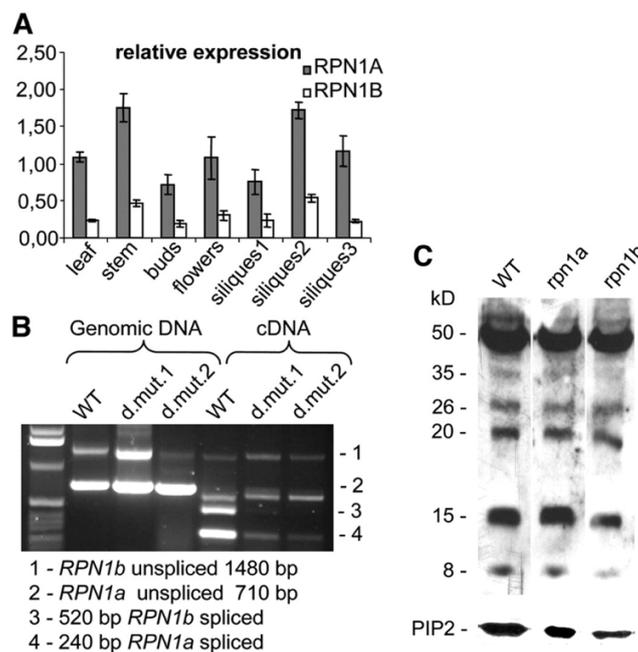


Рисунок 7. Экспрессия и функция генов *RPN1* у дикого типа и мутантов. (A) Относительное накопление транскриптов *RPN1a* и *RPN1b* в тканях растений дикого типа. Оба транскрипта были обнаружены в вегетативных и репродуктивных тканях. *RPN1a* постоянно демонстрировал более высокие уровни экспрессии, чем *RPN1b*. Данные представлены как значения относительно экспрессии *18S* РНК. Столбики погрешностей представляют стандартное отклонение (SD) на основе трех биологических повторов. (B) ОТ-ПЦР-анализ экспрессии генов *RPN1a* и *RPN1b* у двойных мутантов, гетерозиготных по *rpn1a-1* и гомозиготных по *rpn1b-2* и *rpn1b-3* аллелям соответственно (здесь они обозначены как d.mut.1 и d.mut.2). У двойных мутантов мРНК *RPN1b* не обнаруживается, а уровни мРНК *RPN1a* снижены по сравнению с диким типом, вероятно, из-за гетерозиготности. (C) Полиубиквитинированные белки в стручках дикого типа, мутантов *rpn1a/RPN1a* и *rpn1b/rpn1b*. Общий белок разделяли на геле и переносили на мембрану, а полиубиквитинированные белки выявляли с помощью поликлональных антиубиквитиновых антител. Нижняя панель показывает белок плазматической мембраны AtPIP2b в качестве контроля. Положение маркера молекулярной массы показано слева (в кД) (Brukhin et al. 2005b).

с использованием специфичных для *RPN1a* и *RPN1b* антисмысловых и смысловых контрольных зондов. Транскрипты *RPN1a* были обнаружены в меристеме и примордиях цветков, далее особенно сильный сигнал антисмыслового зонда был обнаружен в примордиях семячатков, а после оплодотворения в зародышах на стадии октанта и глобулярной стадии, на более поздних стадиях интенсивность гибридизационного сигнала заметно снижалась до почти неотличимой от смыслового сигнала. В развивающихся цветках и семенах экспрессия паралогов *RPN1* в значительной степени перекрывалась. В

семенах уровни экспрессии высоки на ранних стадиях эмбриогенеза, когда у мутантов *rpn1a* наблюдается задержка развития.

В разделе 4.1.7 описаны результаты экспериментов, доказывающих, что гены *RPN1a* и *RPN1b* не имеют дублирующих функций. Анализ паттернов экспрессии *RPN1a* и *RPN1b* показал, что эти паралогичные гены экспрессируются частично перекрывающимся образом и, следовательно, могут функционировать избыточно. Однако, мутации в *RPN1a* приводят к гибели зародышей, в то время как мутации в *RPN1b* не обнаруживают очевидных фенотипов. У гетерозиготных растений *rpn1a-1/RPN1a-1* было обнаружено, что 26,9% семян ( $n = 67$ ) не давали детектируемого сигнала при использовании *RPN1a*-специфического антисмыслового зонда, в то время как контроль (семена дикого типа) показал четкий сигнал на стадии глобулярного зародыша. В оставшихся 73,1% семян, которые, вероятно, соответствуют гетерозиготам по *RPN1* и зародышам дикого типа сигнал был обнаружен с помощью антисмыслового зонда *RPN1a*. Для характеристики мутантов *rpn1b* на молекулярном уровне, мы провели ОТ-ПЦР-анализ экспрессии генов *RPN1a* и *RPN1b* у двойных мутантов, гетерозиготных по *rpn1a-1* и гомозиготных по *rpn1b-2* и *rpn1b-3* аллелям соответственно (рис. 7B). У двойных мутантов мРНК *RPN1b* не обнаруживается, а уровни мРНК *RPN1a* снижены по сравнению с диким типом, вероятно, из-за гетерозиготности (рис. 7B). Чтобы выявить возможные функциональные различия между паралогичными генами *RPN1*, мы исследовали общий уровень убиквитинирования в стручках, содержащих глобулярные зародыши. В отсутствие функциональных протеасом 26S должно увеличиваться количество и/или уровень полиубиквитинированных белков. Полиубиквитинированные белки анализировали в растениях *rpn1a/RPN1a*, в которых гомозиготные мутантные зародыши возможно не расщепляют убиквитинированные субстраты, и в гомозиготах *rpn1b/rpn1b* (рис. 7C). Мы не обнаружили каких-либо различий в общем уровне полиубиквитинированных белков между двумя мутантами и диким типом. Эти данные указывают на то, что у мутантов функция протеасом в целом существенно не нарушалась и что изоформы *RPN1* возможно имеют довольно специфические функции, приводящие к тонким изменениям. Комплементация мутанта *rpn1a-1* как геном *RPN1a*, так и *RPN1b* под контролем промотора *pRPN1a*, представленная в разделе 4.1.8 показывает, что две изоформы функционально эквивалентны, если экспрессируются идентично. Неспособность гена *RPN1b* заменить потерю функции *RPN1a* во время эмбриогенеза может быть связана с различиями в паттерне или уровне экспрессии паралогов. Вполне

вероятно, что *in planta RPN1a*, но не *RPN1b*, взаимодействует со специфическими субстратами, которые необходимы во время эмбриогенеза, хотя *RPN1b* может выполнять эту функцию, если экспрессируется под контролем промотора *pRPN1a*. Тонкие различия в уровне экспрессии или времени могут также быть важными параметрами для сборки специфических изоформ протеасомы 26S. При том, что протеасома 26S и ее субъединицы играют существенную роль для распознавания специфических субстратов во время репродукции и развития растений, большое значение имеют убиквитиновые лигазы E3, которые распознают и метят убиквитиновыми остатками белковые молекулы, предназначенные для последующего уничтожения.

В разделе 4.3 обсуждено значение генов куллиновых E3 лигаз арабидопсиса, *CUL3A* и *CUL3B*, для нормального протекания эмбриогенеза. Куллин (CUL)-зависимые убиквитинлигазы образуют класс структурно родственных мультисубъединичных ферментов, контролирующих быструю и избирательную деградацию важных регуляторных белков. К этому классу ферментов принадлежат и лигазы CUL3-BTB (Thomann et al., 2005). *CUL3* является важным геном у многоклеточных животных. Модельное растение *Arabidopsis thaliana* кодирует два родственных гена *CUL3* - *CUL3A* и *CUL3B*. Белки *CUL3A* и *CUL3B* арабидопсиса способны взаимодействовать с «пальцевым» белком RING-H2 RBX1 и с несколькими представителями белков растений, содержащими BTB домены, предполагается, что они образуют сходные E3 комплексы на основе CUL3. В геноме арабидопсиса было обнаружено пять экспрессирующихся генов, связанных с куллином, *CUL1*, *CUL2*, *CUL3A*, *CUL3B* и *CUL4* (Risseuw et al., 2003). Мутанты *CUL3A* с потерей функции жизнеспособны и фертильны и демонстрируют только умеренный фенотип; мутант *cul3a* зацветает немного позже, чем контрольные растения, и проявляет пониженную чувствительность к дальнему красному свету (Dieterle et al., 2005). Жизнеспособность мутантных растений *cul3a* может быть связана с функциональной избыточностью между двумя генами *CUL3* у арабидопсиса. Мы исследовали последствия комбинированной потери функции генов *CUL3A* и *CUL3B* для развития растений арабидопсиса. Нами обнаружено, что белки *CUL3A* (At1g26830) и *CUL3B* (At1g69670) были на 88% идентичны на уровне аминокислотной последовательности, они относятся к той же филогенетической кладе, что и *CUL3* у делящихся дрожжей, нематод, дрозофилы и человека. Выравнивание последовательностей белков *CUL3* указывает на высокую степень консервативности. Ранее было показано, что функция *CUL3A* не является

существенной для *Arabidopsis* (Dieterle et al., 2005). В разделе 4.3.1 рассмотрен мутант с потерей функции *cul3b*, у которого не наблюдается морфологических дефектов. Линия GUS, со слитым с промотором CUL3B (CUL3B-GUS), а также РНК блоттинг свидетельствовали о том, что *CUL3B* экспрессируется на всех анализируемых стадиях развития растений, от молодых проростков до цветущих растений. Таким образом, на уровне тканей и органов *CUL3B* имеет сходный с *CUL3A* паттерн экспрессии (Dieterle et al., 2005), что дополнительно указывает на то, что оба куллина могут функционировать избыточно в различных тканях растений (Thomann et al., 2005). В разделе 4.3.2 мы приводим доказательства того, что на клеточном уровне в репродуктивных органах и во время эмбриогенеза гены *CUL3A* и *CUL3B* экспрессируются перекрывающимися пространственными и временными паттернами. Для этого нами проводились эксперименты по гибридизации РНК *in situ* на срезах цветочных почек и развивающихся стручков с использованием *CUL3A* антисмысловых (AS) и смысловых контрольных (S) зондов. На ранних стадиях развития цветка особенно сильные сигналы наблюдались в формирующихся примордиях семязачатков, а затем в удлиняющихся интегументах и тетрадах мегаспор, позже транскрипты были обнаружены в клетках зародышевого мешка. В тычинках высокий уровень транскриптов *CUL3A* обнаруживался в спорогенных клетках и в меньшей степени в тетрадах микроспор. После оплодотворения экспрессия *CUL3A* наблюдалась в зародыше и эндосперме, причем особенно высокой интенсивность сигнала была в глобулярном и сердечковидном зародышах. Гибридизационный сигнал в спорофитных тканях семязачатка был очень слабым. Поскольку антисмысловый зонд *CUL3A* может также обнаруживать и транскрипты *CUL3B*, для более точного выяснения паттернов экспрессии обоих генов при эмбриогенезе мы исследовали трансгенные линии, несущие в геноме конструкции слияния *CUL3A*- или *CUL3B*-промотор-GUS. Слитые трансгены демонстрировали идентичные паттерны экспрессии GUS на разных стадиях развития семян, что еще раз указывает на то, что эти гены могут иметь избыточные функции в исследованных тканях. Поскольку в наших исследованиях отдельные мутанты *cul3a* (Dieterle et al., 2005) и *cul3b* с инсерцией Т-ДНК демонстрировали только малозаметный фенотип или не проявляли его вообще мы сконструировали двойной мутант *cul3a-1/CUL3A cul3b-1* (для простоты обозначенный *cul3a cul3b*), потомство которого анализируется в разделе 4.3.3. Растения *cul3a-1/CUL3A cul3b-1* были подвергнуты самоопылению, а потомство F3 было повторно генотипировано для возможного выявления гомозиготных *cul3a-1 cul3b-1* мутантных растений. Анализ более, чем

50 растений, не выявил ни одного растения с двойной мутацией, что позволяет предположить, что функция *CUL3* важна для жизнеспособности арабидопсиса, а эти два гена обладают избыточной функцией. Мы обнаружили, что у двойного мутанта *cul3a cul3b* зародыши задерживают свое развитие на разных стадиях, хотя большинство из них останавливаются на сердечковидной стадии. Изменения формирования паттерна зародыша, суспензора и эндосперма обнаруживаются уже на глобулярной стадии. Сегрегационный анализ потомства самоопыленных гетерозиготных растений *cul3a-1/CUL3A cul3b-1* показал, что соотношение канамицин устойчивых к канамицин чувствительным проросткам было 1,4:1, а не 2:1, как ожидалось в случае зиготической эмбриолетальной мутации. Аналогично этому потомство самоопыленных растений *cul3a-1 CUL3B/cul3b-1* показало, что устойчивые к сульфадиазину проростки расщеплялись в соотношении 1,3:1. Эти наблюдения предполагают снижение гаметофитной передачи. Эффективность передачи (TE) маркера устойчивости к канамицину была снижена как через мужские (28,3%), так и через женские гаметофиты (79,8%). Как очевидно, снижение TE было намного сильнее через мужской гаметофит (пыльцу). Исследование фертильности зрелых стручков обнаружило, что 19 % семян абортывались после самоопыления двойных мутантов. Учитывая низкую передачу мутации *cul3a/CUL3A cul3b* через пыльцу, ожидается, что только около 10% зародышей будут гомозиготными  $[(TEF / (1 + TEF)) \times (TEM / (1 + TEM))] = (0,798/1,798) \times (0,283/1,283) = 0,098$ . С другой стороны, женская передача снижается на 20,2%, так что ожидается, что еще примерно 10% от общего числа семян остановят свое развитие, даже если аллель, унаследованная по отцовской линии, будет дикого типа. Эти наблюдения позволяют предположить, что примерно 20% летальных зародышей приходится на половину каждого из генотипов *cul3a/cul3a cul3b/cul3b* или *cul3a/CUL3A cul3b/cul3b*, причем последние получают аллель *CUL3A* дикого типа по отцовской линии. Таким образом, сегрегационный анализ, гаметофитная передача и фенотип семян предполагают, что двойной нокаут *CUL3A* и *CUL3B* указывает на материнский контроль развития зародыша (Thomann et al., 2005). Цитоэмбриологический анализ семян мутантов обнаружил сходство фенотипов абортываемых зародышей, определенная часть зародышей, происходящих из мутантных яйцеклеток *cul3a-1 cul3b-1*, абортывается независимо от того, была ли унаследованная по отцовской линии аллель дикого типа или мутантная. Таким образом, мутанты *cul3a cul3b* проявляют гаметофитный материнский эффект эмбриональной летальности при пониженной пенетрантности. В разделе 4.3.4

исследовано каким образом потеря функции *CUL3* влияет на формирование паттерна зародыша и на развитие эндосперма. Цитоморфологический анализ подтверждает, что *CUL3* участвует в регуляции нормального развития зародыша и эндосперма и, по-видимому, также ограничивает деление клеток, особенно в гипофизисе, где у мутантных зародышей наблюдались дополнительные деления и аномальные плоскости деления. В разделе 4.3.5 проанализированы двойные мутанты *cul3a-1 cul3b-1*, семена которых были в состоянии завершить эмбриогенез, но останавливали свой рост вскоре после прорастания. В разделе 4.4.3 обсуждается все ли растительные E3 лигазы на основе CUL регулируют биосинтез фитогормонов или передачу сигналов.

В разделе 4.5 рассмотрена роль еще одного важного класса E3 лигаз, задействованного в развитии и размножении растений, класса E3 убиквитинлигаз, состоящих из CUL4, DDB1 и одного белка WD40, который, действует в качестве субстратного рецептора. E3-лигазы на основе CUL4 (CRL4s) выполняют важные функции на уровне хроматина, включая реакцию на повреждения ДНК у многоклеточных животных, растений и у дрожжей, а также в сайленсинге гетерохроматина. Среди предполагаемых рецепторов CRL4 мы идентифицировали MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), принадлежащий к эволюционно консервативному семейству белков. MSI1-подобные белки играют большую роль в функционировании разных белковых комплексов, включая эпигенетический регуляторный репрессивный комплекс Polycomb 2 (PRC2) (Dumbliauskas et al., 2011; Schmidt et al., 2013; Брюхин, 2017; Brukhin, Baskar, 2019; Brukhin, Albertini, 2021). Мы получили доказательства того, что MSI1 арабидопсиса физически взаимодействует с DDB1A и является частью мультимерного белкового комплекса, включающего CUL4. Потеря функции CUL4 и DDB1 приводит к гибели зародышей. Интересно, что, как и у мутантов класса *fis*, мутанты *cul4* обнаруживают автономную инициацию эндосперма и утрату родительского импринтинга *MEDEA*, гена-мишени комплекса PRC2 арабидопсиса. Кроме того, после опыления у мутантов *cul4* накапливается как транскрипт *MEDEA*, так и белок. Наши исследования предоставили первые доказательства физической и функциональной связи между лигазой CRL4 E3 и комплексом PRC2, что указывает на новую роль убиквитинирования в подавлении экспрессии генов (Dumbliauskas et al., 2011). В разделе 4.5.1 описаны исследования, доказывающие, что MSI-подобные белки представляют собой эволюционно консервативные белки WD40, содержащие мотивы WDxR. Мы обнаружили, что все MSI1-подобные белки с повторами WD40 у различных

организмов несут по крайней мере один консервативный мотив WDxR, сигнатуру DCAF. В разделе 4.5.2 с помощью экспериментов с дрожжевой двухгибридной системой (Y2H), анализа аффинной абсорбции *in vitro* и экспериментов по бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC) приведены доказательства того, что MSI1 арабидопсиса физически взаимодействует с DDB1A и является частью белкового комплекса CUL4-DDB1A-MSI1. В разделе 4.5.3 описан функциональный анализ, показавший, что CUL4 и его адаптеры – гомологи арабидопсиса DDB1A и DDB1B необходимы для нормального эмбриогенеза и формирования семян. Самоопыляющиеся гомозиготные растения *cul4-1* демонстрируют отклонения в развитии семян, что в итоге приводит к их абортивности. Цитологические исследования семян гомозиготных мутантов *cul4-1* обнаруживают низкую пролиферацию эндосперма на стадии октанта, а на более поздних стадиях заметны аномально большие ядра эндосперма и задержка развития зародыша. Мутанты *cul4* с потерей функции из других коллекций были подвергнуты обратному скрещиванию с растениями дикого типа. Генотипирование 137 и 72 самоопыленных мутантных растений *cul4-2* и *cul4-3*, соответственно, не идентифицировало гомозиготные мутанты. Генетический анализ выявил расщепление сцепленного маркера, близкое к 2:1, характерного для эмбриолетальности. Для аллели *cul4-2* коэффициент сегрегации маркера был немного ниже 2:1, что предполагает слабый дефект гаметофитной передачи. Количество абортированных семян в зрелых стручках соответствовало зиготической эмбриолетальности. Поскольку CUL4 взаимодействует с DDB1, образуя комплекс CUL4-E3 лигаза, мы также исследовали, необходимость DDB1 для нормального эмбриогенеза. Геном арабидопсиса кодирует два родственных DDB1 белка, DDB1A (At4g05420) и DDB1B (At4g21100), демонстрирующих 89% идентичности на уровне последовательности аминокислот. Поскольку мутанты с потерей функции *DDB1A* оказывались жизнеспособными, мы идентифицировали мутант, названный *ddb1b-1* с разрывом кодирующей последовательности гена в последнем экзоне. Гомозиготные мутантные растения *ddb1b-1* развивались нормально и были полностью фертильны. Для выяснения возможной избыточности *DDB1A* и *DDB1B* при эмбриогенезе были произведены двойные мутанты *DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1/ddb1b-1* и *ddb1a-2/ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1*, среди самоопыляющегося потомства которых не было выявлено двойных мутантов с нулевыми аллелями. Оценка передачи генов *DDB1* через мужской и женский гаметофиты показала, что эти гены вносят не одинаковый вклад в развитие и/или функцию гаметофита: при отсутствии аллели *DDB1B* для

нормальной передачи через мужской гаметофит требуется аллель *DDB1A*, а для женского гаметофита наоборот. Зародыши из семян двойных гомозиготных растений *ddb1a ddb1b* останавливаются на глобулярной стадии с фенотипом, напоминающим фенотип мутантов *cul4*. Таким образом, для нормального развития зародыша и эндосперма необходимы как *CUL4*, так и *DDB1A/B*.

Гибридизация мРНК *in situ* на срезах цветочных почек и развивающихся стручков с использованием *CUL4*-специфических зондов, представленная в разделе 4.5.4, демонстрирует, что *CUL4* экспрессируется во время эмбриогенеза (рис. 8). В разделе 4.6 осуществлён анализ значения комплексов, содержащих *CUL4*, для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA* при репродукции на основе полученных экспериментальных данных. В частности,

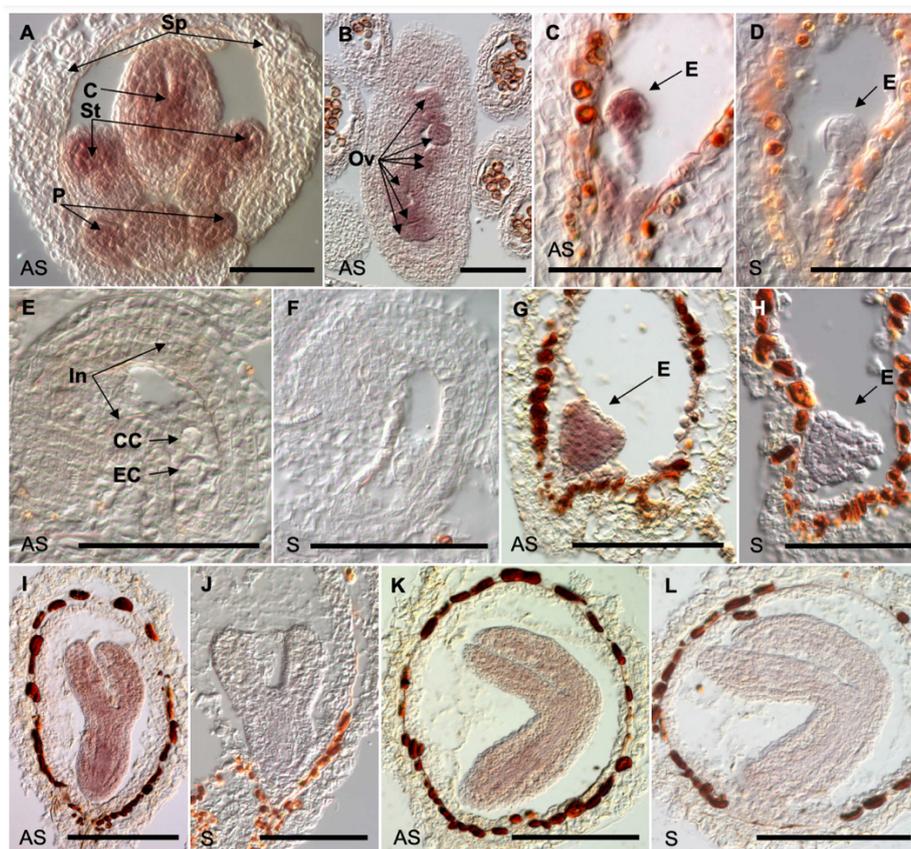


Рисунок 8. Экспрессия гена *CUL4* в тканях цветка и развивающихся семян, проанализированная с помощью гибридизации *in situ*. (A) Продольный срез молодой цветочной почки. (B) Бутон цветка с примордиями семязачатков. (C, D) Зародыш на глобулярной стадии. (E, F) Зрелый зародышевый мешок. (G, H) Зародыш на сердечковидной стадии. (I, J) Зародыш на стадии торпеды. (K, L) Зародыш на стадии изогнутых семядолей. AS - антисмысловый зонд; S - смысловой зонд; C - плодолистик; CC - центральная клетка; E - зародыш; EC - яйцеклетка; Ov - семязачатки; P - лепестки; Sp - чашелистики; St - тычинки. Масштабная линейка = 50 мкм. (Dumbliuskas et al. 2011).

анализ родительской аллель-специфичной экспрессии *MEA* в семенах дикого типа и мутантах нескольких аллелей *cul4* показал, что у растений *cul4* теряется импринтирование экспрессии *MEA* (раздел 4.6.1) и происходит накопление экспрессируемого с отцовской аллели белка MEA-YFP.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что *CUL4* необходим для поддержания репрессии отцовской аллели *MEA*. Поскольку комплекс PRC2 опосредует триметилирование остатка лизина 27 гистона H3 (H3K27me3), тем самым выключая экспрессию гена, мы исследовали, влияет ли потеря функции *CUL4* на метилирование гистонов. Иммунопреципитация хроматина (ChIP) из молодых стручков, выявила снижение триметилирования H3K27 в локусе *MEA*. Примечательно, что аналогичный эффект не наблюдался при иммунопреципитации из тканей молодых цветочных почек, что свидетельствует о том, что *CUL4* участвует в поддержании, а не в установлении репрессивных меток гистонов. Кроме того, было установлено, что при дефиците *CUL4* в семенах накапливаются транскрипт и белок MEA (раздел 4.6.2), что еще раз подтверждает, что активность *CUL4* необходима для ограничения экспрессии *MEA* при развитии семян.

В главе 5 рассмотрено исследование функции экзосом в связи с формированием женского гаметофита, эмбриогенезом и аномалиями развития растений. Экзосома является эволюционно консервативным макромолекулярным комплексом, который играет центральную роль в метаболизме РНК и обеспечивает многочисленные реакции процессинга и деградации малых РНК. Ряд научных публикаций сообщает, что пути, опосредованные малыми РНК (sRNA), играют жизненно важную роль в развитии и спецификации женского гаметофита (обзор Aslam et al., 2022). Рентгеноструктурный анализ экзосомы человека показывает, что для ее целостности необходимы все девять ее основных субъединиц (Liu et al., 2006). До недавнего времени роль индивидуальных субъединиц экзосомы в филогенетическом спектре оставалась неизвестной. Мы представили некоторые доказательства уникальной субфункционализации отдельных коровых субъединиц экзосомы растений, показали ее важную роль для развития зародышевого мешка и эмбриогенеза у арабидопсиса, а также для контроля качества РНК. Кроме того, мы представили первую полногеномную карту мишеней экзосомы высокого разрешения (Chekanova et al., 2007). В разделе 5.1 представлены исследования субъединиц RRP4 и RRP41 внутреннего контура экзосомы арабидопсиса. Для выяснения их состава мы создали трансгенные растения, экспрессирующие TAP-меченый (англ. Tandem Affinity Purification)

RRP4 либо TAP-меченый RRP41 в мутантных растениях *rrp4-1* или *rrp41-1* соответственно (Chekanova et al., 2007). TAP-меченые RRP4 и RRP41 полностью восстановили летальные фенотипы соответствующих им нулевых аллелей. TAP-меченые комплексы очищали, а полипептиды, общие для растений RRP4-TAP и RRP41-TAP, но отсутствующие в растениях дикого типа, анализировали на масс-спектрометре MALDI и MS/MS. Было идентифицировано девять полипептидов, соответствующих известным субъединицам ядра экзосомы: субъединицам, содержащим домен S1 и/или KH RRP4, RRP40A и CSL4, а также субъединицам РН-типа РНКазы RRP41, RRP42, RRP43, RRP45B, RRP46 и MTR3. Мы обнаружили, что мутации в коровых субъединицах экзосомы арабидопсиса вызывают уникальные фенотипы (раздел 5.2). Так, субъединица RRP41 необходима для нормального развития женского гаметофита. Мутантная аллель *rrp41-1* обычно передавалась только по мужской родительской линии, но не по женской ( $n = 194$ ), а самоопыляющиеся гетерозиготы *rrp41/RRP41* продуцировали как нормальные семена, так и абортированные семязачатки в соотношении 1:1. Полученное потомство расщеплялось в соотношении 1:1 - дикий тип к гетерозиготным растениям. Женские гаметофиты мутантных растений останавливали свое развитие ( $n = 422$ ) в основном после первого митоза на двухъядерной стадии (43,1%), реже на одноядерной (1,4%), четырехъядерной (3,3%) и на более поздних стадиях (3,0%). Потеря субъединицы RRP4 у мутанта *rrp4-1* вызывала прекращение развития семян на ранних стадиях эмбриогенеза. Эндосперм семян *rrp4-1* начинал свое формирование, но никогда не достигал стадии целлюляризации. Комплементация дикой аллелью *RRP4* полностью восстанавливала дикий фенотип. Своеобразие мутантных фенотипов и ассоциированные с ними молекулярные сигнатуры указывают на то, что отдельные субъединицы коровой части экзосомы арабидопсиса вносят неравный вклад в ее целостность и функционирование. Полученные нами результаты указывают на серьезные отличия экзосомного комплекса растений от изученных до сих пор экзосомных комплексов в других системах. Для изучения глобального анализа мишеней экзосом арабидопсиса высокого разрешения и выяснения функции RRP4 и RRP41 (раздел 5.3) мы разработали систему иРНК-индуцируемой эстрадиолом для индукции иРНКи-опосредованного нокдауна мРНК *RRP4* (*rrp4iRNAi*) или *RRP41* (*rrp41iRNAi*). Такая система может быть полезной для исследования функций RRP4 и RRP41 *in vivo*, особенно для изучения постэмбриональной функции генов, мутации и нарушения работы которых вызывают гаметофитные или эмбриолетальные фенотипы, что не

позволяет получить мутантные по этим генам растения. Мы использовали метод иРНКи в сочетании с полногеномными мозаичными микрочипами (tiling microarrays). В общей сложности было идентифицировано 1612 геномных областей, демонстрирующих повышенные уровни полиаденилированной РНК при нокдауне *RRP4* (*rrp4<sup>iRNAi</sup>*) и *RRP41* (*rrp41<sup>iRNAi</sup>*) в то время, как понижение уровня экспрессии обнаруживала только около 1/10 от этого количества областей (Chekanova et al. 2007). Было обнаружено, что отдельные субъединицы экзосомы растений функционально специализированы, начиная с того, что они незаменимы для роста и развития, и заканчивая тем, что они необходимы для развития женских гаметофитов (*RRP41*) или эмбриогенеза (*RRP4*), то есть являются крайне важными структурами для нормального семенного размножения. Произведенный нами полногеномный анализ на мозаичных микрочипах (раздел 5.4) выявил множество новых субстратов экзосом, неизвестные ранее метаболические аспекты нескольких важных видов РНК, большую роль, которую экзосома играет в регуляции нкРНК, связанных с гетерохроматическими областями (раздел 5.4.2), а также широкое распространение полиаденилирования, ассоциированного с осуществляемой экзосомой контроля качества РНК у растений (Chekanova et al. 2007). Интересно, что новые специфичные для экзосом РНК обнаруживали поразительно устойчивую ассоциацию с миРНК-продуцирующими локусами, а также с повторяющимися последовательностями: 72% от *rrp4<sup>iRNAi</sup>* и 63% от *rrp41<sup>iRNAi</sup>* ( $p < 0,001$ ). В то время как механистическую основу дифференциальной чувствительности к истощению *RRP4* или *RRP41* еще предстоит определить, рассмотренные примеры аналогичны различным фенотипам других мутантов, что подтверждает представление о субфункционализации основных субъединиц экзосом арабидопсиса, аналогично тому, что наблюдалось для протеасомы и регуляторных белков (Brukhin et al., 2005b). Кроме того, полученные результаты обнаружили «глубоко скрытый» слой транскриптома, состоящий из межгенных некодирующих транскриптов, которые сильно подавляются конститутивной активностью экзосом (Chekanova et al. 2007). Наконец, существенно пополненная нами общедоступная база данных транскриптомов, регулируемых экзосомами (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/exosome>), должна помочь в освещении новых фундаментальных компонентов и регуляторных механизмов в сложных эукариотических транскриптомах.

В главе 6 представлены сравнительные исследования апомиксиса и половой репродукции, а также применение полногеномных технологий для изучения этих процессов. В разделе 6.1 проанализированы гены-кандидаты,

мутации в которых у модельных растений вызывают фенотипы, напоминающие элементы апомиксиса (Брюхин, 2017; Brukhin, Baskar, 2019). Растения из рода *Boecheira* (сем. Brassicaceae) в качестве ресурса для исследования апомиксиса рассмотрены в разделе 6.2. Апомикты из рода *Boecheira* представляют собой удобную модель для изучения апомиксиса, поскольку они являются близкими родственниками модельного растения *A. thaliana*, для которого доступны обширные молекулярно-генетические ресурсы, включая полностью секвенированный и функционально аннотированный геном, что облегчает поиск генов, участвующих в контроле апомиксиса у *Boecheira*; небольшой размер его генома в пределах ~170–230 Мб; наличие апомиксиса у *Boecheira* не только на полиплоидном, но и на аллодиплоидном уровне ( $2n = 14$ ), что представляет собой исключение из известных апомиктических растений. При этом сборка и аннотация геномов апомиктических линий *Boecheira* затруднена из-за высокого уровня гетерозиготности их геномов, возникшей в результате хромосомных перестроек, сопровождающихся аллоплоидией, анеуплоидией и заменой гомеологичных хромосом, происходящими в ходе гибридизационных событий. Цитоэмбриологические и проточно цитометрические исследования половых и апомиктических видов *Boecheira* (раздел 6.2.3) подтвердили, что у апомиктических растений наиболее часто встречается диплоспорический апомейоз *Taraxacum* типа, а развитие зародышевого мешка происходит по типу *Polygonum*. Анализ плоидности зрелых семян методом проточной цитометрии обнаружил у *B. stricta* пики клеток зародыша 2С и 4С и пики эндосперма 3С и 6С, что соответствует половому развитию семени ( $1n+1n$  для зародыша и  $2n+1n$  для эндосперма); у линии М4В пики зародыша 2С и 4С, а также пики эндосперма 6С и 12С, соответствуют апомиксису с псевдогамным развитием эндосперма ( $2n + 0n$  для зародыша и  $4n + 2n$  для эндосперма). У апомиктической линии ES517 было обнаружено, что клетки зародышей являются диплоидными (2С), а клетки эндосперма гексаплоидными (6С) на стадии клеточного цикла G1, что свидетельствует об оплодотворении центральной клетки (2С + 2С) нередуцированным спермермием (2С).

В разделе 6.3 обсуждается анализ экспрессии и филогения ассоциированных с апомиксисом генов *CENH3* и *APOLLO* у половых и апомиктических видов *Boecheira*. На сегодняшний день ген *APOLLO* (Apomixisis-Linked Locus) является одним из очень немногих обнаруженных генов, тесно связанных с апомиксисом у видов *Boecheira* (Corral et al., 2013). Специфичный для центромеры вариант гистона H3, кодируемый геном *CENH3*, необходим для

деления клеток. Мутации в *CENH3* нарушают расхождение хромосом во время митоза и мейоза, поскольку прикрепление микротрубочек веретена деления к мутантной форме гистона *CENH3* не происходит. В диссертации представлены *in silico* характеристики генов *APOLLO* и *CENH3*, которые возможно влияют на процесс апомиксиса (Bakin et al., 2022). Кроме того, охарактеризована структура гена *CENH3* с помощью биоинформатических инструментов, изучены уровни экспрессии транскриптов *APOLLO* и *CENH3* с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР) в гинецее и плодах природных диплоидных апомиктических и половых видов *Boechea* на стадиях (апо)мейоза,

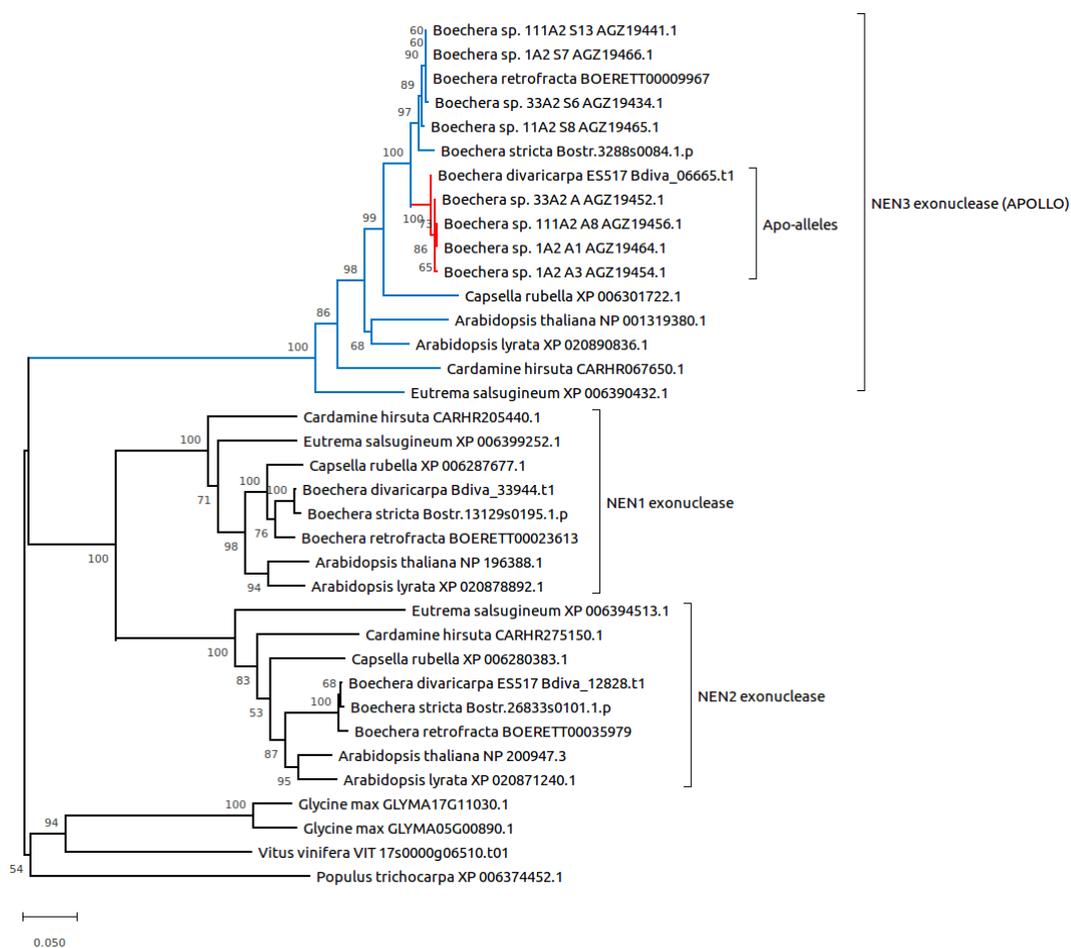


Рисунок 9. Филогенетическое дерево изоформ локуса *APOLLO* (экзонуклеаза NEN) аллелей локуса *APOLLO* апомиктических видов *Boechea* из Corral et al (2013). В качестве внешней группы использовали последовательности *Populus trichocarpa*, *Vitus vinifera* и *Glycine max*. Клада, относящаяся к локусу *APOLLO*, изображена синим цветом, а апо-аллели выделены красным. Числа рядом с узлами представляют соответствующую бутстрап поддержку. Наряду с точной копией локуса *APOLLO* мы наблюдали две другие, более отдаленные копии. Все геномы Brassicaceae в исследовании также несли три копии, связанные с кластерами ортологичных генов ENOG410BURN (локус *APOLLO*), ENOG410BUTR и ENOG410C333 в базе данных EggNOG. Реконструкция филогенетического дерева была осуществлена на основе найденных ортологов у других видов. (Kliver et al., 2018).

а также до и после оплодотворения. В то время как *CENH3* является единственной копией гена у всех видов *Boecheira*, ген *APOLLO* имеет несколько полиморфных аллелей, связанных с половым и апомиктическим воспроизведением у растений *Boecheira*. Эволюционный анализ гена *APOLLO* с использованием метода максимального правдоподобия, представленный в исследовании, показывает, что половые и апомиктические виды *Boecheira* выделяются в разные клады на филогенетическом дереве (рис. 9). Отчасти это может быть связано с тем, что апо-аллели *APOLLO*, присутствующие в геномах апомиктических видов, могут приобретать новую функцию (Kliver et al., 2018). Проведенный анализ экспрессии *APOLLO* показал, что уровни транскриптов гена высоки во время (апо)мейоза, причем в апомиктах сильнее экспрессируются апо-аллели, а в половых только половые аллели гена. После (апо)мейоза и оплодотворения уровни экспрессии обеих аллелей резко снижаются в гинецеях как у апомиктических, так и у половых растений; однако к пятому дню после оплодотворения экспрессия апо-аллелей у апомиктов и половых аллелей у половых растений сильно возросла, причем в апомиктических плодах уровень экспрессии был выше, чем соответствующих аллелей в половых (Bakin et al., 2022). В разделе 6.3.1 представлена характеристика гена *CENH3* и изоформ его белка. Мы обнаружили полиморфные сайты гена *CENH3* в основном в N-концевых областях белка, хотя у *B. retrofracta* и *B. arcuata* был обнаружен один сайт в 91-й аминокислоте и два полиморфных сайта в положении аминокислот 67 и 96 соответственно, в консервативном домене гистона H3/CENP-A. Изменчивость в пределах N-конца может способствовать возникновению апомейоза, так как влияет на сегрегацию хромосом в мейозе (Lermontova et al., 2011; 2015). Индекс сходства гена *CENH3* между всеми изученными видами *Boecheira* составил  $\geq 97\%$  как на уровне нуклеотидов, так и на уровне белка, а на филогенетическом дереве гена *CENH3*, с использованием метода максимального правдоподобия, все изученные виды *Boecheira* выделялись в одну кладу.

Анализ профиля экспрессии гена *CENH3* показал, что перед (апо)мейозом уровень его экспрессии в гинецее половых *B. stricta* были более чем в два раза выше по сравнению с уровнем экспрессии в гинецее апомиктических *B. divaricarpa*. После (апо)мейоза уровни экспрессии гена резко снижались в гинецеях обоих видов. А к 4-му дню после опыления, экспрессия *CENH3* значительно увеличилась в плодах *B. stricta*, оставаясь при этом низкой в плодах *B. divaricarpa*. Более низкие уровни экспрессии до и после опыления у апомиктической *B.*

*divaricarpa* могут указывать на возможную роль гена *CENH3* для возникновения апомейоза и инициации партеногенеза.

Наличие полногеномной сборки хорошего качества позволяет проводить более точные исследования структуры генома, молекулярной регуляции процессов репродукции, филогении и эволюции видов *Boechea*. До недавнего времени из всех видов *Boechea* был секвенирован и собран только геном *B. stricta* (Lee et al., 2017). Мы впервые осуществили сборку геномов двух других видов *Boechea*. В разделе 6.6 обсуждается сборка и аннотация генома *B. retrofracta*, произрастающего в Северной Америке, размножающегося половым способом (Kliver et al., 2018), которая была опубликована и представлена в базе данных NCBI (BioProjects PRJNA418376). Были сконструированы и секвенированы шесть библиотек с использованием трех платформ, включая Illumina, Roche и Sanger: одна библиотека ридов с парными концами (PE), четыре библиотеки mate pairs (MP) и одна концевая библиотека бактериальной искусственной хромосомы (BAC), секвенированной по Сангеру. Нам удалось достигнуть N50, равного 2 297 899 п.н., L50, равного 25, общая длина сборки была 222,25 Мб для конечных скаффолдов. Геном *B. retrofracta* продемонстрировал очень низкий уровень гетерозиготности по сравнению с геномами апомиктических линий. Примечательно, что повторы в геноме *B. retrofracta* занимают 38% размера генома. Почти половина из них были LTR (Long Terminal Repeats) (18,27%). Мы осуществили генотипирование поученного генома и произвели поиск вариантов, было обнаружено 3341 ОНП (SNP) и 1317 инделов. Среди них 103 (3,08 %) ОНП и 97 (7,37 %) инделов были гомозиготными. В геноме *B. retrofracta* всего было предсказано 27 048 белок кодирующих генов и 28 269 транскрипта, а также гены, кодирующие тРНК и рРНК. Общий размер генома (222 Мб) в два раза больше, чем геном у *Arabidopsis thaliana*. В то же время количество генов, кодирующих белок в геноме *B. retrofracta* (27048) несколько меньше, чем в геномах *B. stricta* (27416) и *A. thaliana* (27416), и значительно меньше, чем в геноме *A. lyrata* (31073). Несмотря на самый большой размер генома, количество предсказанных транскриптов у *B. retrofracta* является наименьшим среди четырех сравниваемых видов Brassicaceae. Наличие несколько большего количества генов у *B. stricta* по сравнению с *B. retrofracta*, несмотря на меньший размер генома, может быть связано с анеуплоидией хромосомных фрагментов, либо с перестройками генома, произошедшими в результате интергибридизации, что характерно для многих видов и линий *Boechea*. В ходе распределения белков по ортологическим группам у семи видов крестоцветных (*B. retrofracta*, *B. stricta*, *A. thaliana*, *A. lyrata*,

*Capsella rubella*, *Cardamine hirsuta* и *E. salsugineum*) выявлено 8959 однокопийных ортологов, на основе которых было построено филогенетическое дерево для этих семи видов (Kliver et al., 2018).

Мы также впервые осуществили полногеномную сборку высоко гетерозиготного генома природного апомиктического гибрида *Boechnera* M4B (*B. stricta* × *B. retrofracta*) до уровня хромосом, описанную в разделе 6.7. Мы стремились получить сборку с полностью разрешенными гомологичными (диплоидными) хромосомами, чтобы сохранить истинную структуру апомиктического генома, что облегчает обнаружение геномных областей, связанных с апомиксисом. Для создания сборки данные секвенирования в виде длинных ридов, полученных с помощью Oxford Nanopore Technology (ONT), были собраны ассемблером Canu. Полученная сборка была скорректирована конвейером Nextpolish с использованием коротких ридов, полученных на платформе технологии Illumina. Коррекция сборки осуществлялась с помощью конвейера Bionano Genomics и данных оптического картирования. Полученные суперскаффолды располагались на хромосомах на основе проведенных экспериментов GISH (англ. Genome In Situ Hybridization), выполненных согласно методике, описанной в Mandáková et al., 2015. Сборка размещена на портале NCBI: BioProject JAMKOQ000000000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/774175> Smetanin D., Grossniklaus U., Brukhin V., Mandáková T., Bakin E., Nobre S., Rueda A).

Цитогенетический анализ показал, что гибрид *Boechnera* M4B является апомиктическим анеуплоидом, который воспроизводится, минуя строгий мейоз и спаривание хромосом. Полный ядерный геном этого гибрида представлен 15 хромосомами. Предполагаемыми предковыми видами гибрида были половые диплоиды *B. stricta* и *B. retrofracta*, причем обнаружено, что девять хромосом происходят от генома *B. retrofracta*, а шесть от *B. stricta*. Частично общие сигналы гибридизации зондов, соответствующих геномной ДНК *B. retrofracta* и *B. stricta*, вероятно, связаны с гомогенизацией повторяющихся последовательностей и позволяют предположить, что гибрид M4B, по-видимому, довольно старый и, вероятно, имел более сложную эволюционную историю, чем простая гибридизация. Была выяснена структура хромосом линии M4B и расположение в них геномных блоков кариотипа предков крестоцветных АСК (Ancstral Crucifer Karyotype) (Schranz et al., 2006b; Mandáková et al., 2015). Особый интерес представляет структура хромосом *Het* и *Del*, которые являются добавочными хромосомами, специфичными для апомиктов рода *Boechnera*. Хромосомы *Het* и

*Del* возникли благодаря амплификации перицентромерного хроматина в гомологичной хромосоме *Boe1*, центромерному разрыву между блоками Ca и D и перицентрической инверсии блока Ca. В итоге сформировалась метацентрическая хромосома *Het* с центромерой между блоками Aa и Ca и терминальным герохроматическим вздутием на блоке Ca и телоцентрическая хромосома *Del*, состоящая из блока D.

Для поиска гентических различий у половых и апомиктических видов из рода *Boecheera* были выбраны гены M4B, содержащие "апомиктические" k-меры, для которых осуществлялся поиск гомологов из всех находящихся в открытом доступе видов из рода *Boecheera*. Гомологи в M4B для удобства были разделены на две группы: содержащие (M4B\_APO) и не содержащие (M4B) апо-меры. Мы обнаружили, что для ряда генов, фланкирующие повторы определенной длины отличались у половых и апомиктических видов, что позволило нам предположить, что эти гены могут быть каким-то образом связаны с наличием апомиктического способа воспроизводства. Соответственно, были обнаружены гены, фланкированные этими повторами, у гибрида M4B, *B. retrofracta*, *B. stricta* и их гомологи у *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, функция некоторых из этих гомологов известна у арабидопсиса. Было обнаружено, что основное количество апоспецифических олигонуклеотидов гибридизировалось с терминальным гетерохроматическим вздутием хромосомы *Het*.

Последняя глава 7 представляет собой анализ литературы относительно эпигенетических модификаций, возникающих при размножении и развитии растений (Brukhin, Albertini, 2021). Процессы размножения и развитие растений во многом определяются взаимодействием с внешней средой. Успех этого взаимодействия зависит от пластичности фенотипа, которая помимо унаследованного особью генотипа во многом определяется его эпигенетической регуляцией. Кроме того, переключение с полового на апомиктический путь воспроизводства и импринтирование генов напрямую связаны с эпигенетической регуляцией. Последняя определяет, как генетическая экспрессия изменяется во время дифференцировки одного типа клеток в другой и как паттерны экспрессии генов передаются от одной клетки к ее потомкам. Таким образом, один геном может генерировать множество «эпигеномов». Эпигенетические модификации приобретают особое значение при образовании гамет и репродукции растений, когда эпигенетические метки элиминируются в ходе мейоза и раннего эмбриогенеза, а затем обретаются вновь. Однако при бесполом размножении растений, когда мейоз отсутствует или приостановлен, эпигенетические

модификации, возникшие в родительском спорофите, могут передаваться следующему клональному поколению практически без изменений. У растений, размножающихся половым и бесполом путем, эпигенетическая изменчивость имеет различное приспособительное значение. У бесполой особей эпигенетическая регуляция имеет особое значение для придания пластичности фенотипу, когда генотип остается неизменным на протяжении многих поколений особей.

В разделе 7.1 рассмотрены эпигенетические системы, присутствующие у растений и генетическая регуляция этих систем. Под эпигенетической регуляцией экспрессии генов понимают прежде всего *метилование ДНК*, *модификацию гистонов* путем метилирования, ацетилирования и убиквитинирования N-концов гистонов, а также *посттранскрипционный сайленсинг посредством малых некодирующих РНК*. У модельного растения арабидопсиса известно более 130 генов, регулируемых эпигенетически (Pikaard, Scheid, 2014). У растений основным сайтом метилирования ДНК является 5'-цитозин. Последний встречается в трех контекстах: симметричном CG, CHG и асимметричном CHH, где H представляет собой любой нуклеотид, кроме гуанина (G). Уровни метилирования цитозина в этих контекстах зависят от состояния клетки и являются дифференциальными в различных клетках. В разделе 7.2 проанализировано метилирование при развитии меристемы растений. Разделы 7.3 и 7.4 исследуют эпигенетическую регуляцию микроспорогенеза, развития мужского гаметофита и мегаспорогенеза и развития женского гаметофита соответственно. Описываются гены, регулирующие эти процессы, метилирование в контекстах CG и CHH, состояние пермиссивного хроматина (H3K4me3) и репрессивного хроматина (H3K27me1 и H3K27me3) в соответствующих клетках. При формировании мегаспороцитов (ММС) уровень метилирования ДНК временно снижается в контексте CHH, однако в контексте CG метилирование остается практически неизменным (Ingouff, et al., 2017). Спецификация и дифференцировка ММС, как и функциональной мегаспоры, осуществляется, в том числе, посредством межклеточных взаимодействий с помощью мобильных трансактивирующих миРНК (tasiRNA), продуцируемых в окружающих клетках нуцеллуса и транспортируемых в ММС, в которых реализуется сайленсинг на уровне транскрипции и трансляции (Baulcombe, et al., 2014).

В разделе 7.5 исследуется роль эпигенетических изменений при оплодотворении, эмбриогенезе, эндоспермогенезе и в импринтированных генах.

Оплодотворение способствует ликвидации гипометилирования в сайтах СНН отцовского генома как в зародыше, так и в эндосперме (Ibarra, et al., 2012). Вполне вероятно, что реметилирование отцовского генома происходит с помощью материнских миРНК (Lu, et al., 2012). Одной из причин эпигенетической супрессии мужского генома на ранних стадиях эмбриогенеза может быть материнский контроль размеров зародыша и эндосперма (Grossniklaus, et al., 1998), а также распознавание собственной пыльцы, что может иметь решающее значение при межвидовых скрещиваниях (Creasey, et al., 2014). Правильное и последовательное метилирование генома делящейся яйцеклетки является крайне важным условием нормального эмбриогенеза. Молодые зародыши и ткани эндосперма гипометилированы по сравнению со зрелыми зародышами, что свидетельствует о высокой транскрипционной активности генов в развивающемся зародыше и подготовке к покою зрелого зародыша (Bouyer, et al., 2017; Kawakatsu, et al., 2017; Brukhin, Albertini, 2021). Однако при прорастании семян метаболическая и, соответственно, транскрипционно-генетическая активность зародышевых тканей вновь возрастает, что сопровождается снижением уровня метилирования в контексте СНН, связанного с активацией экспрессии белок-кодирующих генов (Paparreddy, et al., 2020). Поскольку гистоны, унаследованные от яйцеклетки и спермия, не репродуцируются в клетках зародыша, а синтезируются заново, эпигенетическая «память», связанная с гистоновыми метками, элиминируется и не передается следующим поколениям клеток (Paparreddy, et al., 2020). Таким образом, эмбриогенез является вторым после мейоза контрольно-пропускным пунктом или клиринговым боксом (англ. clearing box), который удаляет геномные эпигенетические метки, приобретенные материнским спорофитом.

Несколько иначе происходит эпигенетическая регуляция при апомиксисе, рассмотренная в разделе 7.6. Поскольку при формировании клональных зародышей отсутствует мейоз, который в репродуктивных семязачатках выполняет функцию эпи-очистки, эпигенетически сформированные апомиктические генотипы могут обладать трансгенерационной устойчивостью. Таким образом, эпигенетические варианты апомиктов выполняют функцию генетических вариантов половых, обеспечивая приспособленность и эволюционный потенциал бесполого потомства (Verhoeven, Preite, 2014). Эпигенетические процессы, по-видимому, участвуют в ограничении формирования женского гаметофита одной клеткой у арабидопсиса и у кукурузы (Baulcombe, et al., 2014, Garcia-Aguilar, et al., 2010, Drews, et al., 2011, Koltunow, et

al., 2011, Huanca-Mamani, et al., 2005, Xiao, et al., 2006, Baroux, et al., 2007, Curtis, et al., 2007). Другим важным механизмом, участвующим в регуляции апомиксиса и эпигенетических перестроек, является окислительный стресс. Как было предложено, он является центральным событием в переключении с полового пути на апомиксис у факультативных и циклических апомиктических эукариот (Carman, et al., 2011, Hörandl, Nadacek, 2013). Ряд исследований предполагает, что изменения во время размножения и раннего развития семян регулируются эпигенетически динамическими изменениями состояния хроматина (Baulcombe, et al., 2014, Albertini, et al., 2019, Huanca-Mamani, et al., 2005, Xiao, et al., 2006, Baroux, et al., 2007, Curtis, et al., 2007). Более того, существуют доказательства того, что метилирование ДНК влияет на генеративные клетки или клетки, ассоциированные с зародышевой линией. Фенотипы, подобные апомейозу, индуцировались экспериментально в репродуктивных клетках путем нарушения регуляции метилирования ДНК (García-Aguilar, et al., 2010), а обработка пестиков *Boechera* веществами, влияющими на метилирование ДНК, с высокой частотой способствовала замене диплоспории *Taraxacum* типа на развитие нормальных мейотических тетрад (Gao, 2018). Карбальо с соавторами (Carballo, et al., 2021) показали, что у *E. curvula* апомиктические генотипы имеют более высокие уровни метилирования ДНК по сравнению с половыми, что подтверждает гипотезу о том, что гены, контролирующие половое развитие присутствуют также и у апомиктических растений, но находятся в подавленном состоянии.

**В Заключении** подведены итоги диссертационного исследования и обсуждены дальнейшие перспективы исследований в области молекулярной генетики и регуляции размножения растений. Особый интерес и значение приобретает изучение генетической подошпки, которая лежит в основе процессов, связанных с размножением покрытосеменных, а также того, как происходит их молекулярная регуляция.

За последние более, чем сто лет был накоплен обширный материал, представляющий собой скрупулезные исследования структуры и развития зародышевых мешков, пыльников, эмбриогенеза и апомиксиса у разных видов покрытосеменных на цитологическом и морфологическом уровнях (Maheshwari, 1950; Хохлов, 1967; 1970; Солнцева, 1988; Поддубная–Арнольди, 1976; Яковлев, 1981; Петров, 1988; Johri et al., 1992; Naumova, 1993, Батыгина, Брюхин, 1997 и другие). На рубеже XX и XXI веков благодаря скринингу природных и экспериментально полученных мутантов, в основном модельных растений арабидопсиса, кукурузы и риса, был достигнут значительный прогресс и в

изучении женских гаметофитов цветковых растений на генетическом уровне, в том числе было обнаружено несколько десятков мутаций, связанных с формированием зародышевого мешка и эмбриогенезом (Sundaresan et al., 1995; Moore et al., 1997; Feldmann et al. al., 1997; Howden et al., 1998; Grossniklaus et al., 1998; Bonhomme et al., 1998; Christensen et al., 1998, 2002; Grini et al., 1999; 2002; Ohad, et al., 1999; Moore, 2002; Lalanne et al., 2004; Pagnussat et al. , 2005; Brukhin et al., 2005a; Brukhin et al., 2011; Brukhin, Baskar, 2019). Однако характеристика генов, ответственных за наблюдаемый фенотип, а тем более регуляция этих генов и их мишеней были представлены в намного меньшем количестве исследований (Chaudhury et al., 1997; Grossniklaus et al., 1998; Huck et al., 2003; Kwee, Sundaresan, 2003; Köhler et al., 2005; Brukhin et al., 2005b; Thomann et al., 2005; Chekenova et al., 2007; Wuest et al., 2010; Dumbliauskas et al., 2011 и ряд других, см. обзор Ma, Sundaresan, 2010; Aslam et al., 2022). Не до конца решенными остаются и такие вопросы как – какие гены и локусы контролируют половой процесс и апомиксис, а именно как происходит подготовка и переключение генетических программ клеток с вегетативного на репродуктивное развитие, каким образом осуществляется позиционное решение того, какая из клеток нуцеллуса станет материнской клеткой мегаспор или апоспорой (в случае апоспорического апомиксиса), что запускает партеногенез в апомиктических яйцеклетках, каким образом решается проблема жизнеспособности семян при отклонении соотношений дозового эффекта материнских геномов к отцовским от нормального соотношения 2:1 в эндосперме апомиктов, каковы различия половых и апомиктических видов на полногеномом уровне. На эти и многие другие вопросы репродукции растений, имеющие большое эволюционное и общебиологическое значение, предстоит ответить ученым. Настоящая диссертация сообщает об исследованиях, которые отчасти восполняют пробелы в перечисленных областях и вопросах.

Произведенная нами коллекция инсерционных мутантов арабидопсиса с единичной вставкой транспозона *Ds* в геноме каждой линии позволила изолировать мутации с дефектом репродукции и исследовать наиболее интересные линии мутантов.

Среди различных регуляторных механизмов, контролирующих половое размножение у растений, особое внимание привлекает посттрансляционная регуляция посредством убиквитин-протеасомного пути, направленного на деградацию сигнальных молекул, отвечающих за клеточный цикл и формирование различных клеточных структур. Мы впервые изучили

субъединицу RPN1 протеасомы 26S у растений и у высших эукариот, а также куллиновые E3 лигазы, *CUL3* и *CUL4*, и их значение для развития женского гаметофита и эмбриогенеза. Интеграция генетического, мутационного, протеомного и полнотранскриптомного анализа позволила нам обнаружить роль эксосомы, основная функция которой заключается в регуляции качества РНК, которую она играет в контроле развития женского гаметофита и зародыша, а также факт, что нарушение функции эксосом способствует возникновению эмбриолетального фенотипа и аномалий развития растений. Большое внимание наши исследования уделили генетике апомиксиса, поиску генов, влияющих на апомиксис и их анализу, а также сборке половых и апомиктических геномов *de novo*, их аннотации и сравнительному анализу. Впервые произведенная сборка генома высоко гетерозиготного апомиктического растения до уровня хромосом, выделение генетических локусов, которые отличаются у половых и апомиктических видов из рода *Boechera*, а до этого сборка и аннотация генома полового вида *B. retrofracta* помогут будущим исследованиям в области генетики репродукции растений, о чем можно судить и по постоянно возрастающему цитированию наших публикаций.

### Выводы

1. Установлено, что гены, ответственные за гаметофитные мутации *Arabidopsis thaliana* часто проявляют плейотропный эффект при задержке развития гаметофита. В соответствии с наблюдаемым фенотипом мутантных линий наиболее часто встречаются классы: митотического, кариогамного, дегенеративного и материнского эффекта остановки развития женского гаметофита. Экспрессия фенотипа у многих мутантов обнаруживает вариабельность.
2. Показано, что гены убиквитин-протеасомного метаболического пути играют большую роль в гаметогенезе и эмбриогенезе у арабидопсиса.
3. Выявлено, что субъединица RPN1 протеасомы 26S выполняет важную функцию в контроле прогрессии клеточного цикла и дифференцировки во время эмбриогенеза. Паралогичные гены *RPN1a* и *RPN1b* являются функционально эквивалентными, но не избыточными в репродуктивном развитии.
4. Обнаружено, что гены куллин-зависимой убиквитинлигазы *CUL3a* и *CUL3b* демонстрируют функциональную избыточность, функциональное нарушение обеих копий гена *CUL3* снижает гаметофитную передачу, которая приводит к гибели зародышей и находится под материнским контролем.

5. Выявлено, что комплекс CUL4-DDB1 арабидопсиса взаимодействует с белком MSI1 и необходим для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA*, таким образом, доказана физическая и функциональная связь между лигазой E3 CUL4 и поликомб-репрессивным комплексом (PRC2), что указывает на новую роль убиквитинирования в регуляции экспрессии генов.

6. Показано, что растительная экзосома имеет важное значение для семенного размножения, а отдельные ее субъединицы функционально специализированы – нарушение функции RRP41 останавливает развитие женских гаметофитов, а RRP4 эмбриогенез. Выявлены новые субстраты экзосом, а также обнаружен «глубоко скрытый» слой транскриптома, состоящий из межгенных некодирующих транскриптов, которые сильно подавляются конститутивной активностью экзосом. Полученные результаты указывают на серьёзные отличия экзосомного комплекса растений от изученных до сих пор экзосомных комплексов в других системах.

7. Анализ экспрессии гена *APOLLO*, кодирующего экзонуклеазу NEN3, показал, что уровни его транскриптов высоки во время мейоза и апомейоза, причем в апомиктах сильнее экспрессируются апо-аллели, а в половых только половые аллели гена. На филогенетическом дереве *APOLLO* половые и апомиктические виды *Boechnera* сгруппированы в отдельные клады. В процессе эволюции после серии дупликаций одна из копий белка NEN3 предков *Boechnera* приобрела альтер-функцию, приводящую к апомиксису, апо-аллели находятся под положительным отбором.

8. Впервые осуществлено полногеномное секвенирование и выполнена безреференсная сборка генома полового вида *B. retrofracta* и поэтапная безреференсная сборка до уровня хромосом высоко гетерозиготного генома апомиктического гибрида M4B, у которого идентифицированы дополнительные абберрантные хромосомы *Het* и *Del*, несущие локусы генов, связанных с апомиксисом. Аннотация и сравнительный анализ собранных геномов обнаружили, что аллодиплоидные апомикты *Boechnera* представляют собой высоко гетерозиготные гибриды, по сравнению с геномами половых видов, что является результатом комбинации разрозненных геномов вследствие их гибридогенного происхождения. Для ряда генов, фланкирующие повторы определенной длины отличались у половых и апомиктических видов, что предполагает связь этих генов с наличием апомиктического способа воспроизводства.

9. Цитогенетический анализ выявил, что гибрид М4В является апомиктическим анеуплоидом, предковыми видами которого были половые диплоиды *B. stricta* и *B. retrofracta*. Полный ядерный геном гибрида представлен 15 хромосомами, причем 9 хромосом происходят от генома *B. retrofracta*, а 6 от *B. stricta*. Частично общие сигналы гибридизации зондов, соответствующих геномной ДНК *B. retrofracta* и *B. stricta*, вероятно, связаны с гомогенизацией повторяющихся последовательностей и позволяют предположить, что гибрид М4В – довольно старый и имел более сложную эволюционную историю, чем простая гибридизация. Хромосомы *Het* и *Del* являются добавочными хромосомами, специфичными для апомиктов рода *Boechea*, они возникли благодаря амплификации перицентромерного хроматина в гомологичной хромосоме *Boe1*, центромерному разрыву между блоками Са и D и перицентрической инверсии блока Са.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Список статей в рецензируемых изданиях

1. Soltis, D.E. *Tragopogon pratensis*: Multiple introductions to North America, circumscription, and the formation of the allotetraploid *T. miscellus* / D.E. Soltis, E.V. Mavrodiev, V. Brukhin, E. H. Roalson, D. C. Albach, G. T. Godden, Y. E. Alexeev, M. A. Gitzendanner, C. C. Freeman, J. Rocca, V. N. Suárez-Santiago, P. S. Soltis // TAXON. – 2023. – V. 72 (4). – P. 848-861. – DOI: 10.1002/tax.12936. – WoS, SCOPUS, Q1, IF = 2.586; Глава 6.
2. Bakin, E. Phylogenetic and expression analysis of *CENH3* and *APOLLO* genes in sexual and apomictic *Boechea* species / E. Bakin, F. Sezer, A. Özbilen, I. Kilic, B. Uner, M. Rayko, K.M. Taskin, V. Brukhin // Plants (Basel). – 2022. – V.11(3). – P. 387. – doi: 10.3390/plants11030387. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q2, IF = 4.474; Глава 6, Введение.
3. Brukhin, V. Epigenetic Modifications in Plant Development and Reproduction / V. Brukhin, E. Albertini // Epigenomes. – 2021. – V. 5(4). – P. 25. – doi: 10.3390/epigenomes5040025. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q2, IF = 2.35; Главы 1, 3, 4, 5, 7, Введение.
4. Ochkalova, S. First genome of rock lizard *Darevskia valentini* involved in formation of several parthenogenetic species / S. Ochkalova, V. Korchagin, A. Vergun, A. Urin, D. Zilov, S. Ryakhovskiy, A. Girnyk, I. Martirosyan, D.V. Zhernakova, M. Arakelyan, F. Danielyan, S. Kliver, V. Brukhin, A. Komissarov, A. Ryskov // Genes (Basel). – 2022. – V. 13(9). – P. 1569. – doi: 10.3390/genes13091569. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q2, IF = 4.474; Глава 6.
5. Ryakhovsky, S.S. De novo transcriptome assembly and annotation of parthenogenetic lizard *Darevskia unisexualis* and its parental ancestors *Darevskia valentini* and *Darevskia raddei nairensis* / S.S. Ryakhovsky, V.A. Dikaya, V.I. Korchagin, A.A. Vergun, L.G. Danilov, S.D. Ochkalova, A.E. Girnyk, D.V. Zhernakova, M.S. Arakelyan, V.B. Brukhin, A.S. Komissarov, A.P. Ryskov // Data Brief. – 2021. – V. 39 P. 107685. – doi: 10.1016/j.dib.2021.107685. - WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q3, IF = 2.6; Глава 6.

6. **Brukhin, V.** Epigenetic Control in Plants / **V. Brukhin** // Epigenomes. – 2020. – V. 4(3). – P. 11. – doi: 10.3390/epigenomes4030011. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q2, IF = 2.35; Глава 7, Введение.
7. **Brukhin, V.** The *Boecheera* Genus as a Resource for Apomixis Research / **V. Brukhin**, J.V. Osadtchiy, A. M. Florez-Rueda, D. Smetanin, M.S. Nobre, E. Bakin, U. Grossniklaus // Frontiers in Plant Science. – 2019. – V. 10. – P. 392. – doi: 10.3389/fpls.2019.00392. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q1, IF = 6.627; Главы 1, 6, Введение.
8. **Brukhin, V.** A brief note on genes that trigger components of apomixis / **V. Brukhin**, R. Baskar // Journal of Biosciences. – 2019. – V. 44(2). – P. 45. – DOI: 10.1007/s12038-019-9850-1. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q1, IF = 1.65; Главы 1, 4, 6.
9. Kliver, S. Assembly of the *Boecheera retrofracta* Genome and Evolutionary Analysis of Apomixis-Associated Genes / S. Kliver, M. Rayko, A. Komissarov, E. Bakin, D. Zhernakova, K. Prasad, C. Rushworth, R. Baskar, D. Smetanin, J. Schmutz, D.S. Rokhsar, T. Mitchell-Olds, U. Grossniklaus, **V. Brukhin** // Genes (Basel). – 2018. – V. 9(4). – P. 185. – doi: 10.3390/genes9040185. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q2, IF = 4.474; Главы 1, 6.
10. **Brukhin, V.** Is sex irreplaceable? Towards the molecular regulation of apomixis / **V. Brukhin** // Int. J. Plant Reproduct. Biol. – 2017. – V. 9(2). – P. 153-169. – DOI: 10.14787/ijprb.2017.9.2.153-169. – Глава 6, Введение.
11. Осадчий, Я.В. Апомиксис в роде *Boecheera* (Brassicaceae) текущее состояние проблемы / Я.В. Осадчий, Т.Н. Наумова, **В.Б. Брюхин** // Ботанический журнал. – 2017. – Т. 102 (12) – С. 1587-1607. – DOI: 10.1134/S0006813617120018. – РИНЦ, ВАК. Глава 6.
12. **Брюхин, В.Б.** Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса / **В.Б. Брюхин** // Генетика. – Т. 53 (9) – С. 1001–1024. – doi: 10.1134/S1022795417090046. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, ВАК, IF = 0.691; Главы 1, 2, 3, 4, 6, 7, Введение.
13. **Brukhin, V.** Plant growth and development - basic knowledge and current views / **V. Brukhin**, N. Morozova // Mathematical Modelling Natural Phenomena. – 2011. – V. 6, № 2. – P. 1 - 53. – DOI: 10.1051/mmnp/20116201. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q3, IF = 3.117; Главы 1, 2, 3, 5, 6, 7, Введение.
14. **Brukhin, V.** Female Gametophytic Mutants of *Arabidopsis thaliana* Identified in a Gene Trap Insertional Mutagenesis Screen / **V. Brukhin**, M. Jaciubek, A. Bolanos Carpio, V. Kuzmina, U. Grossniklaus // Int. J. Dev. Biol. – 2011. – V. 55. – P. 73-84. – doi: 10.1387/ijdb.092989vb. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q3, IF = 1.753; Главы 1, 2, 4, 6, 7, Введение.
15. Chekanova, J.A. Genome-Wide High-Resolution Mapping of Exosome Substrates Reveals Hidden Features in the *Arabidopsis* Transcriptome / J.A. Chekanova, B.D. Gregory, S.V. Reverdatto, H. Chen, R. Kumar, T. Hooker, J. Junshi Yazaki, P. Li, N. Skiba, Q. Peng, J. Alonso, **V. Brukhin**, U. Grossniklaus, J.R. Ecker; D.A. Belostotsky // Cell. – 2007. – V. 131 (7). – P. 1340-1353. – doi: 10.1016/j.cell.2007.10.056. – WoS, SCOPUS, Q1, IF = 66.850. Глава 5, Введение.
16. Dumbliauskas, E. The *Arabidopsis* CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEA parental imprinting / E. Dumbliauskas, E. Lechner, M. Alioua, V. Cognat, **V. Brukhin**, F. Berger, C. Koncz, U. Grossniklaus, J. Molinier, P. Genschik // EMBO J. – 2011. – V. 30(4). – P. 731-43. – doi: 10.1038/emboj.2010.359. – WoS, SCOPUS, Q1, IF = 13.783. Главы 2, 4, 6, Введение.
17. **Brukhin, V.** The angiosperm female gametophyte: no longer forgotten generation / **V. Brukhin**, M.D. Curtis, U. Grossniklaus // Current Science. – 2005. – V. 89 (11). – P. 1844-1852. – ISSN 0011-3891. Corpus ID: 44030054. – WoS, SCOPUS, Q1, IF = 1.102. Главы 1, 2, Введение.

18. **Brukhin, V.** The RPN1 subunit of the 26S proteasome in *Arabidopsis* is essential for embryogenesis / **V. Brukhin**, J. Gheyeselincx, V. Gagliardini, P. Genschik, U. Grossniklaus // *Plant Cell*. – 2005. – V. 17 (10). – P. 2723-37. – doi: 10.1105/tpc.105.034975. – WoS, SCOPUS, Q1, IF = 12.085. Главы 2, 4, Введение.
19. Thomann, A. *Arabidopsis CUL3A* and *CUL3B* genes are essential for normal embryogenesis / A. Thomann\*, **V. Brukhin\***, M. Dieterle, J. Gheyeselincx, U. Grossniklaus, P. Genschik // *Plant J*. – 2005. – V. 43 (3). – P. 437-448. \* These authors contributed equally to this work. – doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02467.x. - WoS, SCOPUS, Q1, IF = 7.091. Глава 4, Введение.
20. **Brukhin, V.** Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry / **V. Brukhin**, M. Hernould, N. Gonzalez, C. Chevalier, A. Mouras // *Sex. Plant Rep.* – 2003. – V.15 (6). – P. 311-320. – DOI: 10.1007/s00497-003-0167-7. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q1, IF = 4.217. Заключение.
21. **Brukhin, V.** Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce / **V. Brukhin**, D. Clapham, M. Elfstrand, S. von Arnold // *Plant Cell Reports*. – 2000. – V. 19. – P. 899-903. – doi: 10.1007/s002990000217. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, Q1, IF = 4.964. Глава 4.
22. Filonova, L.H. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm Norway spruce / L.H. Filonova, P.V. Bozhkov, **V.B. Brukhin**, G. Daniel, B. Zhivotovsky, S. von Arnold // *J Cell Sci*. – 2000. – V. 113 (24). – P. 4399-4411. – doi: 10.1242/jcs.113.24.4399. – WoS, SCOPUS, Q1, IF = 5.235. Глава 7.
23. **Brukhin, V.B.** Proliferative activity of callus culture of *Taxus baccata* in relation to anticancer diterpenoid taxol biosynthesis / **V.B. Brukhin**, I.R. Moleva, L.H. Filonova, V.P. Grakhov, Ya.B. Blume, P.V. Bozhkov // *Biotechnology Letters* (Chapman & Hall, London). – 1996. – V. 18, №11. – P. 1309-1314. – doi.org/10.1007/BF00129961. – WoS, SCOPUS, Q3, IF = 2.716. Глава 7.
24. **Brukhin, V.B.** Female gametophyte development and embryogenesis in *Taxus baccata* L. / **V.B. Brukhin**, P.V. Bozhkov // *Acta Soc. Bot. Pol.* – 1996. – V. 65. – №1-2. – P. 135-139. DOI: <https://doi.org/10.5586/asbp.1996.023>. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, IF = 0.69. Глава 1, Заключение.
25. Tchorzewska D., **Brukhin V.B.**, Bednara J. Organelle layers at meiocyte of *Psilotum nudum* // *Acta Soc. Bot. Pol.* – 1996. – V. 65. – №1-2. – P. 91-96. – DOI: <https://doi.org/10.5586/asbp.1996.016>. WoS, SCOPUS. IF = 0.69. Заключение.
26. **Brukhin, V.B.** Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *Paeonia anomala* L. / **V.B. Brukhin**, T.B. Batygina // *Phytomorphology*. – 1994. – V. 44. – №3 & 4. – P. 151-157. – IF = 0.69. Глава 3, 7.

#### Учебные издания и главы в книгах и сборниках

1. **Брюхин, В.Б.** Функциональная генетика и геномика: учебное пособие / **В.Б. Брюхин**, Е.В. Андрусенко. – Санкт-Петербург: Изд. Университета ИТМО, 2021. – 113 С. – <https://books.ifmo.ru/file/pdf/2759.pdf>. Введение.
2. **Brukhin, V.B.** Histochemical and immunohistochemical aspects of embryogenesis / In: *Embryology of flowering plants Terminology and Concepts*. Enfield, NH, USA, Plymouth, UK, Science Publisher, 2006. – V. 2. – P. 370-373. – <https://doi.org/10.1201/9781482280036>. Глава 3, Заключение.
3. Grossniklaus, U. Moore, J.M., **Brukhin, V.**, Gheyselincx, J., Baskar, R., Vielle-Calzada, J-P. Baroux, C., Page, D.R., Spillane, C. Engineering of apomixis in crop plants: what can we learn from sexual model systems / In: I.K. Vasil (Ed) *Plant Biotechnology 2002 & beyond*,

Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. – 2003. – P. 309-314. – [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2679-5\\_63](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2679-5_63). Глава 1, Введение.

4. Батыгина, Т.Б. Эмбриогенез пионовых / Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / Т.Б. Батыгина, В.Б. Брюхин. – Санкт-Петербург: Изд. Мир и Семья, 1997. – Том 2. – С. 539–544. Глава 3. – РИНЦ.

### Список сокращений

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
 миРНК – малые интерферирующие РНК  
 ОНП (SNP) – однонуклеотидный полиморфизм  
 ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией  
 рРНК – рибосомальная РНК  
 РНКи – РНК интерференция  
*Ac* – (англ. *Activator*) транспозон, источник транспозазы  
*APOLLO* – *APOm*ixis *L*inked *L*ocus  
 BAC – Bacterial Artificial Chromosome – искусственная бактериальная хромосома  
 BTV – англ. Bric a brac, Tramtrack, and Broad Complex  
*CENH3* – ген *Centromere Specific Histone 3* – гистон H3-подобный центромерный белок  
 CUL – куллин-зависимые убиквитинлигазы  
 DCAFs – DDB1 and CUL4-Associated Factors, содержат мотивы WDxR, необходимые для эффективного связывания DDB  
 DDB1 – специфический ДНК-связывающий белок при повреждении (англ. damage specific DNA binding protein)  
*Ds* – (англ. *Dissociation*) GT транспозон  
 G1 – первая из трёх фаз клеточного цикла, стадия интерфазы  
*GUS* – репортерный ген  $\beta$ -*глюкуронидазы*  
 H3K27me3 – эпигенетическая модификация белка ДНК гистона H3, метка, указывающая на триметилирование лизина 27 гистона H3  
 Hi-C – высокопроизводительный геномный и эпигеномный метод для захвата конформации хроматина  
 иРНКи – эстрадиол-индуцируемая РНКи (англ. iRNAi – estradiol-inducible RNAi)  
 Kan<sup>s</sup> – устойчивый к канамицину  
 Kan<sup>r</sup> – чувствительный к канамицину  
 LTR – Long terminal repeat – длинные терминальные повторы  
 MEI1 – мейотический белок 1 образования двухцепочечного разрыва (англ. Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1)  
 MMC – (англ. Megaspore Mother Cell) материнская клетка мегаспор  
 MSI1 – подавитель мульткопий IRA1 (англ. Multicopy Suppressor of IRA1)  
 NGS – (англ. Next-Generation Sequencing) технология массового параллельного секвенирования, обеспечивающая сверхвысокую пропускную способность, масштабируемость и скорость  
 PRC2 – поликомб репрессивный комплекс 2 (англ. Polycomb Repressive Complex 2)  
 RBX1 – белок RING бокс 1  
 RPN1 – регуляторная субъединица 1 протеасомы  
 S – фаза клеточного цикла, стадия интерфазы, в которой происходит репликация ДНК  
 TAP – тандемная аффинная очистка (англ. Tandem Affinity Purification)  
 TE – эффективность передачи признака (англ. Transmission Efficiency)  
 Ub – убиквитин  
 UO – (англ. unfertilized ovules) неоплодотворенные семязачатки  
 YFP – желтый флуоресцентный белок (англ. Yellow Fluorescent Protein)  
 Wt – контрольные растения дикого типа (англ. Wild type)