

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора  
Кашина Александра Степановича на диссертационную работу  
кандидата биологических наук Брюхина Владимира Борисовича  
«Молекулярно-генетические аспекты полового размножения и  
апомиксиса у покрытосеменных растений», представленную на  
соискание ученой степени доктора биологических наук по  
специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки)

Диссертация В.Б. Брюхина посвящена молекулярно-генетическим аспектам механизмов регуляции полового и апомиктического размножения покрытосеменных растений с использованием полногеномных технологий. Несмотря на то, что пристальное внимание исследователей к проблеме молекулярно-генетической детерминации гаметофитного апомиксиса сохраняется уже как минимум третье десятилетие, многие её аспекты и к настоящему времени остаются далёкими от сколько-нибудь полного понимания. Поэтому изучение комплекса генов, в той или иной мере задействованных в этом, и их молекулярной регуляции, безусловно, заслуживает особого внимания. В этой связи актуальность диссертационной работы В.Б. Брюхина трудно переоценить.

**Научная новизна работы.** Впервые проведено комплексное исследование основных этапов полового размножения растений и отклонений от него, базирующихся на процессах мегагаметофитогенеза и последующего развития его производных, с использованием морфологических, молекулярно-генетических, цитогенетических и геномных методов и подходов. С использованием инсерционного мутагенеза получено колоссальное количество мутантных линий *Arabidopsis thaliana* (более 2500), среди которых идентифицированы и проанализированы мутанты с нокаутом генов, влияющих на развитие гаметофитов и эмбриогенеза. По результатам этого проанализирована функция нарушенных генов и фенотипов шести мутаций, ассоциированных с развитием гаметофита. Подтвердив, что убиквитин-протеасомный метаболический путь является крайне необходимым для гамето- и эмбриогенеза, диссертант впервые показал важную роль, которую выполняет именно субъединица RPN1 протеасомы для нормального протекания эмбриогенеза и клеточного цикла. Показано, что ген куллин-зависимой убиквитинлигазы CUL3 влияет на формирование паттерна зародыша и на развитие эндосперма. Получены первые доказательства важной роли убиквитинирования в подавлении экспрессии генов в эмбриогенезе. Впервые представлены доказательства важной роли экзосомы в размножении и развитии растений. Впервые осуществлены полногеномное секвенирование, сборка de novo и аннотация генома полового вида *B. retrofracta* и древнего природного апомиктического гибрида половых видов *B. stricta* и *B. retrofracta*.

**Теоретическая и практическая и значимость.** Теоретическая значимость состоит в том, что проведенное исследование имеет фундаментальное значение для решения ряда ведущих проблем биологии развития. Практическое значение работы состоит в том, что результаты исследования ещё на один шаг могут приблизить к пониманию механизмов молекулярно-генетической регуляции целого ряда аспектов проблемы семенного воспроизводства цветковых растений и на этой основе, наконец, научиться получать формы культурных растений, способных стабильно воспроизводиться путём гаметофитного апомиксиса с сохранением в ряду поколений высокопродуктивных гетерозисных гибридов и иных хозяйственно ценных признаков.

**Достоверность** полученных результатов основана на многолетних исследованиях автора, значительном объёме материала, использовании различных статистических методов анализа, включая статистику на основе *k*-мер анализа. Достоверность подтверждается апробацией результатов на многочисленных международных научных конференциях, в форме устных докладов и публикацией основных результатов в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах. Список и тех, и других не может не впечатлять,

Диссертационная работа изложена на 441 странице, включает 38 таблиц и 82 рисунков. Состоит из введения, 7 глав, заключения и выводов. Список используемой литературы содержит 714 работ.

Во введении раскрываются актуальность и новизна работы, степень изученности и разработанности проблемы, определяются цель, задачи исследований и положения, выносимые на защиту, обосновывается теоретическое и практическое значение диссертационной работы, излагаются методология и методы исследования.

В главе 1 охарактеризовано половое и бесполое размножение покрытосеменных растений посредством семян, в частности особенности полового воспроизводства, эволюция и типичное развитие мегагаметофита, их структурное разнообразие при амфимиксисе, а также акцентируется внимание на особенностях формирования генеративных структур при гаметофитном апомиксисе и предполагаемое значение апомиктического пути семенного воспроизводства для сельского хозяйства. При этом диссертант оправданно указывает на сложную и многообразную детерминацию этого пути воспроизводства семян и большие сложности, которые по-прежнему остаются на пути его практического освоения, а, следовательно, и решения задачи использования в сельском хозяйстве.

В главе 2 рассматривается проблема молекулярно-генетической регуляции мегагаметофитогенеза. В начале главы подробно описано скоррелированное развитие мега- и микрогаметофита покрытосеменных на примере *Boechea falcata*. Далее автор анализирует результаты использования инсерционного мутагенеза для получения мутантных линий *B. falcata*, влияющих на репродукцию растений. При этом указывает и на

недостаток метода, состоящий в том, что инсерционный мутагенез может вызывать хромосомные перестройки, которые иногда затрудняют анализ мутантов. Всего автором было произведено 2511 мутантных линий, каждая из которых предположительно содержала одну независимую инсерцию. В ходе двухступенчатого скрининга идентифицировано 12 мутантов с нарушением гаметофитных функций. Приводится их подробное описание. Из них было отобрано для последующих исследований 6 мутантов с самоскрещивающимся потомством и с помощью геномного саузерн-блоттинга показано, что в геноме каждого из них содержится по одному DS-элементу. Приведено сравнение 6 выделенных инсерционных мутантов с инсерционными линиями из других коллекций для подтверждения того, что нарушенный ген является ответственным за наблюдаемый фенотип. Выяснено, что экспрессия фенотипа у всех гаметофитных мутантов проявляет плеiotропный эффект и гаметофитные мутации часто связаны с хромосомными перестройками.

В главе 3 кратко охарактеризованы основные этапы эмбриогенеза у покрытосеменных. Указывается, что на разных стадиях эмбриогенеза экспрессируется большое количество генов, но лишь немногие из них являются мастер-регуляторами (основными генами). Дается характеристика, по крайней мере, шести из них. Указывается, что важным событием на всех этапах гаметофито- и эмбриогенеза является деградация регуляторных молекул в нужное время и в соответствующих клетках. Основным путём устранения регуляторных белков является убиквитин-26S-протеасомный метаболический путь.

В главе 4 описывается убиквитин-26S-протеасомный метаболический путь и его связь с эмбриогенезом. Показано, что активность субъединицы RPN1a 26S протеасомы играет важную роль в эмбриогенезе. Потеря функции гена CUL3 также серьезно влияет на формирование зародыша и полностью нарушает постэмбриональное развитие. Доказывается, что комплекс CUL4-DDB1 взаимодействует с белком MSI1 и необходим для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA*.

В главе 5 исследуется функция экзосомного комплекса и его роль в размножении и развитии, объединяя генетический, протеомный и полнотранскриптомный анализы. Показано, что отдельные субъединицы экзосомы растений функционально специализированы. Нарушение функций RRP41 останавливает развитие мегagamетофитов, а нарушение функций RRP4 останавливает эмбриогенез. Констатируется, что имеются серьезные отличия экзосомного комплекса растений от изученных до последнего времени экзосомных комплексов в других живых системах.

В главе 6 с использованием геномных технологий анализируется молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса. Проанализированы гены, потенциально ассоциированные с апомиксисом. Охарактеризован род *Boechera*, как модельный объект для изучения этого явления с акцентом на популяционно-генетические исследования в отношении апомиксиса и его

наследования. Проведён анализ экспрессии ассоциированных с апомиксисом генов *CENH3* и *APOLLO* у половых и апомиктических видов рода с помощью ПЦР в реальном времени, сходства гомологов и филогении этих генов. Излагаются результаты сборки и аннотации генома *B. retrofracta*, полногеномного сравнения *B. retrofracta* и *B. stricta*, а также диплоидной сборки генома апомикта - природного гибрида *Boecheira* M4B (*B. stricta* x *B. retrofracta*) до уровня хромосом.

В главе 7 анализируется проблема эпигенетической модификации при размножении и развитии растений. Рассматриваются аспекты эпигенетической регуляции микро- и мегаспорогенеза, микро- и мегagamетофитогенеза, роль эпигенетических изменений при оплодотворении, эмбриогенезе и эндоспермогенезе, эпигенетическое наследование последующим поколениям при апомиктическом и бесполом размножении. В отношении последнего видится достаточно голословным заключение диссертанта о том, что факультативность гаметофитного апомиксиса обусловлена, в том числе, и обратимостью многих эпигенетических процессов (стр. 301). Мне это кажется несколько надуманным.

Следует отметить чёткость и логичную последовательность подходов диссертанта в реализации поставленных задач, позволивших ему их эффективное решение и достижение сформулированной цели исследования.

Содержание автореферата в тезисной форме полностью и адекватно отражает основное содержание диссертационной работы.

Пожелания и замечания по диссертации Брюхина В.Б. сводятся к следующему:

1) На мой взгляд, часть шестого положения, выносимого на защиту, констатирующая, что геномы апомиктических гибридов отличаются высокой степенью гетерозиготности по сравнению с геномами половых видов, благодаря комбинации нескольких геномов, участвовавших в гибридизационных событиях, страдает очевидностью.

2) Вероятно, объём притязаний диссертанта было бы логичнее распространять кроме молекулярно-генетических аспектов полового размножения, на молекулярно-генетические аспекты только гаметофитных форм апомиксиса. Это следует из того, что за пределами проведённого анализа остались формы спорофитного апомиксиса, при котором зародыш нового организма формируется из одной соматической (не гаметофитной) клетки родительского организма, никакого отношения не имеющей к гаметогенезу. Мегagamетофит при этом выполняет лишь регуляторную функцию. То есть инициальная клетка адвентивного зародыша, если и испытывает воздействие со стороны мегagamетофита митогенных факторов и факторов, приводящих к характерной поляризации её цитоплазмы и характерному развитию, то воздействие экзогенного характера. Вероятно,

при этом молекулярно-генетические механизмы детерминации её развития по эмбриональному пути, мягко говоря, будут несколько иными, чем при гаметофитном апомиксисе.

3) Рис. 1 на стр. 27 некорректен. Из представленной схемы, - при буквальном её прочтении, - следует, что мужской гаметофит у цветковых растений формируется в результате мейоза (спорогенеза), а женский – митоза (гаметогенеза), а в процессе оплодотворения сливаются мужская спора и женская гамета. Подрисуночное описание к рисунку тоже некорректно. В подрисуночном тексте указано: «В тканях спорофитов, в семязачатках и пыльниках, развиваются **мега- и микроспоры** соответственно, из которых в результате последующих **мейотических и митотических делений** формируются гаплоидные поколения, содержащие один набор хромосом ( $1n$ ), женские (зародышевые мешки) и мужские (пыльцевые зерна) гаметофиты». В действительности мега- и микроспоры уже содержат гаплоидный набор хромосом, так как и те, и другие формируются в результате предшествующего мейотического деления из диплоидных материнских клеток мегаспор или микроспороцитов, а гаметофиты в микро- и мегаспорах формируются в ходе только митотических делений. Более корректное описание процесса дано самим диссертантом на стр. 10.

4) На стр. 33 некорректно описано формирование биспорического мегагаметофита. Из ядер двух мегаспор после двух митотических делений формируется один, - а не два, как указывает соискатель, - 8-ядерный 7-клеточный биполярный мегагаметофит.

5) В главе 2 на стр. 50 не дано описание семи морфологически различных стадий развития мегагаметофита *Polygonum*-типа у модельного объекта *Arabidopsis* (FG1 – FG7) (по: Cristensen et al., 1997), что затрудняет понимание дальнейшего изложения. Если имеются в виду стадии развития мегагаметофита, представленные в табл. 1 на стр. 51 при указании класса мутантов, то их получается 6, а не 7. В то же время в тексте работы на стр. 52 автор, исходя из якобы описанных выше стадий (вероятно 7), выделяет уже 9 стадий формирования мегагаметофита.

6) Рис. 59 на стр. 228 не совсем корректно прочитан. На графике скрининга ploидности семян методом проточной цитометрии высокий уровень шума. Пики, соответствующие 4C (на рис. 59A), 6C и 12C соответствуют уровню шума и не могут учитываться для анализа. Но даже если следовать интерпретации, которую сделал диссертант, остаётся непонятным, почему на рис. 59A пик 6C учтён, а пик, соответствующий по расположению 8C, проигнорирован. На рис. 59B то, что указано, как 12C – однозначно просто шум. Непонятно почему не сделана проточная цитометрия стандарта, в качестве которого могла бы выступить часть взрослого растения *B. stricta* (например, лист).

7) В подрисуночной подписи рис. 76 на стр. 284 речь идет о 24 геномных блоках. Автором указано, что «геномные блоки обозначены заглавными буквами и раскрашены разными цветами», но на

цитомолекулярной диаграмме структуры хромосом апомиктического гибрида *Boechea stricta* x *B. retrofracta* (рис. 76А) некоторые подписи обозначенных геномных блоков не читаемы из-за низкого разрешения рисунка. Также, некоторые разные геномные блоки обозначены одним цветом. Например, желтым цветом обозначены сразу шесть геномных блоков, зеленым – четыре, а красным – два геномных блока. Это вносит путаницу в их последующую интерпретацию в структуре хромосом гибрида М4В на рис. 76В.

8) Диссертант в ряде случаев использует несколько своеобразную терминологию с не до конца, на мой взгляд, уловимым смыслом. Например, «прогрессия клеточного цикла», «гаметофитная передача», «спецификация женского гаметофита», «анэуплоидия хромосомных фрагментов».

Однако отмеченные недостатки не затрагивают существа полученных научных результатов. Все исследования выполнены соискателем на современном высоком методическом уровне; основные положения и выводы аргументированы и являются логическим завершением представленной диссертационной работы.

Материалы диссертации представлены в форме устных докладов на 37 международных конференциях, в том числе на 16 из них – в качестве приглашённого докладчика, тем самым они прошли широкую апробацию. Материалы диссертации полно отражены в многочисленных статьях в отечественных и зарубежных журналах, в том числе в 23 статьях в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, 3 статьи в монографиях, 23 статья из списка российских журналов, рекомендованных ВАК для опубликования основных научных результатов диссертаций, одном учебном пособии. Публикация всех работ мною подтверждается.

### Заключение

Диссертационная работа кандидата биологических наук Брюхина В.Б. на тему «Молекулярно-генетические аспекты полового размножения и апомиксиса у покрытосеменных растений», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки), является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологии развития, – задачи выявления механизмов молекулярно-генетической регуляции процессов репродукции цветковых растений. В частности получены новые сведения о механизмах молекулярно-генетической регуляции у них спорогенеза, гаметогенеза, оплодотворения и эмбриогенеза. Полученные результаты предполагают новые подходы к разработке проблемы молекулярно-генетической детерминации гаметофитного

апомиксиса. Диссертационная работа соответствует требованиям п.9-11, 13,14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842 (с изменениями и дополнениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г., 26 сентября 2022 г., 26 января, 18 марта, 26 октября 2023 г.), а ее автор кандидат биологических наук Брюхин Владимир Борисович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук (специальность 1.5.9. Ботаника / 03.00.05 Ботаника), профессор кафедры генетики ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», профессор



Александр  
Степанович  
Кашин

8.12.2023 г.

Подпись Александра Степановича Кашина  
УДОСТОВЕРЯЮ

Ученый секретарь СГУ им. Н.Г. Чернышевского  
доцент, к.х.н.



И.В. Федусенко

Контактные данные:

Тел.: (8452)51-16-30, E-mail: kashinas2@yandex.ru

Адрес места работы:

ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского», 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83 Тел.: (8452)51-16-30, E-mail: kashinas2@yandex.ru