

**ОТЗЫВ официального оппонента,
заведующего лабораторией цитологии и апомиксиса растений
Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, доктора
биологических наук, Соколова Виктора Андреевича, на диссертацию
Брюхина Владимира Борисовича «Молекулярно-генетические аспекты
полового размножения и апомиксиса у покрытосеменных растений»,
представленной на соискание ученой степени доктора биологических
наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология**

Диссертация Владимира Борисовича Брюхина посвящена очень интересной и актуальнейшей теме современной биологии – исследованию полового и бесполого семенного размножения в молекулярно-генетическом аспекте, особое внимание уделено проблеме апомиксиса, природного клонирования генотипов, внедрение элементов которого в хозяйственно-ценные культуры растений может существенно интенсифицировать и удешевить сельскохозяйственную продукцию. Фактически, исследование такого уровня по данной тематике является первым в нашей стране и одним из немногих в мире.

В течение столетий учеными был накоплен большой материал по цитоморфологии репродуктивных процессов растений, однако данные по характеристике генов, ответственных за наблюдаемые процессы, и их регуляцию начали появляться сравнительно недавно, благодаря развитию техники секвенирования и современных методов молекулярно-генетических исследований. Скрупулезно произведенная диссертантом коллекция инсерционных мутантов у модельного растения арабидопсиса и дальнейший элегантный двухступенчатый скрининг на основе фенотипической оценки завязываемости семян и анализа отклонения сегрегации маркерного гена от менделевской генетики позволила автору диссертации выявить обширный материал мутантов с нокаутом единичного гена, демонстрирующих нарушения семенной репродукции. Дальнейший всесторонний молекулярно-

генетический и фенотипический анализ полученных мутантов обнаружил ряд неизвестных ранее интересных закономерностей гаметофитной и эмбриолетальной генетики, а также выявил несколько генов, ответственных за развитие женского гаметофита и эмбриогенез. Была исследована функция этих генов и их мишени, прежде всего генов, ответственных за деградацию сигнальных белков и генов, кодирующих субъединицы экзосомы, которая вовлечена в метаболизм РНК и, как выяснилось изложенными в диссертации исследованиями, в эпигенетический контроль развития зародыша и независимое от оплодотворения развитие эндосперма, благодаря регуляции некодирующей РНК. В работе показана новая роль убиквитинирования в регуляции экспрессии генов путем взаимодействия с репрессивным комплексом (PRC2).

Достоинством диссертации является и впервые продемонстрированное полногеномное секвенирование (WGS) геномов нескольких амфимиктических и апомиктических видов из рода *Boechera* различными методами, а также осуществление сборки геномов *de novo* и их аннотации. В том числе диплоидная сборка генома апомикта до уровня хромосом, которая была выполнена с привлечением методов цитогенетики (GISH, CCP – сравнительной окраски хромосом), что также осуществлено впервые в мире для высоко гетерозиготных апомиктических растений. В собранных хромосомах апомикта *Boechera* M4B была выяснена структура хромосом и расположение в них геномных блоков кариотипа предков крестоцветных (АСК). Сравнительный анализ половых и апомиктических геномов *Boechera* обнаружил значительные отличия в уровне гетерозиготности, анеуплоидию и наличие дополнительных хромосом *Het* и *Del* в собранном геноме апомикта. Кроме того, проведенный сравнительный анализ геномов амфимикта и апомикта выявил, что ассоциированные с некоторыми генами повторы определенной длины отличаются у половых и апомиктических видов, это указывает на возможную связь этих генов с апомиксисом. Многие,

ассоциированные с апомиксисом гены, включая исследованный в диссертации ген *APOLLO*, локализованы на добавочных хромосомах.

Эти и ряд других интересных открытий, представленных в диссертации, подтверждают ее уникальность и насыщенность новой и полезной для исследователей информацией. Решение поставленных задач позволило диссертанту успешно достичь заявленной цели – изучить важные молекулярно-генетические аспекты регуляции полового и апомиктического размножения покрытосеменных растений с использованием полногеномных технологий.

Актуальность выбранной темы не представляет сомнений поскольку, несмотря на большое внимание исследователей к вопросам молекулярно-генетической регуляции полового и бесполого семенного размножения растений, многие важные вопросы остаются не выясненными. В том числе значение убиквитин-протеасомного метаболического пути деградации сигнальных белков; роль, которую играет экзосома в гаметогенезе и эмбриогенезе и другие вопросы. Предоставляет актуальность и понимание генетических и молекулярных механизмов регуляции амфимиксиса и апомиксиса, являющееся важнейшим условием фенотипического улучшения урожая и контролируемого управления семенной репродукцией растений; поиск генов, ассоциированных с апомиксисом, и их функция, а также исследование различий геномов растений, размножающихся половым путем и апомиксисом. Исследования, представленные в диссертации, во многом дают ответы на эти вопросы.

Все поставленные автором диссертации задачи успешно решены и достигнута основная цель исследования. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обладают высокой степенью **обоснованности**, а их **достоверность и новизна** не вызывают возражений. В работе впервые дан анализ гаметофитных и эмбрио-летальных мутаций *Arabidopsis thaliana*, полученных методом инсерционного мутагенеза в скрининге, представляющем несколько тысяч произведенных мутантных

линий. Показано, что убиквитин-протеасомный метаболический путь является крайне существенным для нормального гаметогенеза и эмбриогенеза у арабидопсиса, доказана его роль в регуляции мейоза и митоза и различных процессов развития и размножения растений с участием генов *RPN1a*, *RPN1b*, *CUL3a*, *CUL3b*, *CUL4*, *DDB1*. Впервые представлены доказательства физической и функциональной связи между лигазой CRL4 E3 и поликомб-репрессивным комплексом (PRC2), что указывает на новую роль убиквитинирования в регуляции экспрессии генов. Генетическими и молекулярными методами изучена роль экзосомы и ее субъединиц в размножении и развитии на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Показаны серьёзные отличия экзосомного комплекса растений от изученных до сих пор экзосомных комплексов в других системах. Кроме того, выявлены субстраты экзосомы и ее мутантов, обнаружен глубоко скрытый слой транскриптома, состоящий из межгенных некодирующих транскриптов. Экспрессионный анализ ассоциированных с апомиксисом генов *CENH3* и *APOLLO*, выявил различия в экспрессии этих генов у половых и апомиктических видов *Boechea*, а молекулярно-филогенетический анализ показал, что апо-аллель *APOLLO* вероятно приобрела новую функцию у общего предка видов *Boechea*, что привело к выделению апомиктических линий. Впервые осуществлено полногеномное секвенирование и выполнена безреференсная сборка и аннотация генома полового вида *B. retrofracta* и высоко гетерозиготного генома апомиктического растения *Boechea* (линия M4B) до уровня хромосом, у которого обнаружены дополнительные aberrантные хромосомы *Het* и *Del*, являющиеся наиболее вероятными кандидатами, несущими локусы генов, связанных с апомиксисом. В диссертации детально обобщены и проанализированы существующие данные о роли эпигенетических изменений при размножении и развитии растений.

Достоверность результатов определяется подбором адекватных методов и подходов исследований, использованием большого количества

экспериментальных данных, полученных в нескольких повторностях, а также статистической обработкой данных.

Результаты диссертации опубликованы в 30 работах, из них 3 статьи в монографиях и 1 учебное пособие, 23 публикаций реферируются системой «Web of Science» и одновременно входят в систему «Scopus». Материалы диссертации доложены на множестве международных и локальных тематических конференциях.

Работа Владимира Борисовича Брюхина является серьёзным фундаментальным научным исследованием, ее **теоретическая и практическая значимость** исключительно высока. Результаты вносят существенный вклад в понимание молекулярно-генетической регуляции репродуктивных процессов растений. Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты дополняют знания о молекулярно-генетической регуляции семенного размножения и гаметофитного апомиксиса у покрытосеменных, которые крайне необходимы для улучшения урожая и контролируемого управления семенной репродукцией растений, в том числе экономически значимых. Эти знания в итоге будут способствовать интенсивному развитию и повышению эффективности сельского хозяйства посредством фиксации ценных фенотипических признаков, прежде всего полученных путем гетерозиса, в неограниченном ряду поколений культурных растений, начиная с поколения F₁.

При изучении диссертации у меня не возникло принципиальных замечаний сколь либо значимых для высказывания возражений относительно её качества.

Я с большим удовольствием прочел диссертацию Владимира Борисовича и был рад ее оппонировать. После прочтения работы и ознакомления с публикациями по теме диссертации становится очевидным, что автор является одним из ведущих молекулярно-генетических исследователей репродукции и апомиксиса растений в стране и в мире. Саму

диссертацию можно рассматривать как большой труд, достойный издания в виде отдельной монографии по репродукции растений, которая сочетает в себе обширный объем полученного и обработанного материала, высокую информативность, многообразие применённых молекулярно-генетических и других методов, большую значимость решенных глобальных биологических задач и фундаментальность сформулированных выводов.

В качестве особого дополнения к моему мнению о диссертации вынесенной на защиту, хочу попросить Брюхина Владимира Борисовича, найти время и подготовить монографию на основе выполненной работы. Это весьма и весьма необходимо, так как в мире уже более 15 лет нет изданий обобщающих результаты исследований по апомиксису. И особенно важно для Российской науки, где монографии по генетическому контролю апомиксиса не издавались уже несколько десятилетий.

Заключение

Диссертационная работа Брюхина Владимира Борисовича 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 изучения молекулярно-генетических аспектов регуляции полового и апомиктического размножения покрытосеменных растений, имеющей важное значение для молекулярной биологии развития растений и биологической науки в целом. Таким образом, диссертацию Брюхина Владимира Борисовича, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки) на основании совокупности проведенных исследований и теоретических обобщений следует рассматривать как научное достижение, которое будет способствовать накоплению фундаментальных знаний в области генетического контроля апомиксиса на

молекулярном уровне, что в дальнейшем позволит перейти к практическому использованию бесполосеменного размножения и выведет гибридное семеноводство на новый экономический уровень.

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 2023 г.), а ее автор Брюхин Владимир Борисович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки).



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук
Подпись Соколова В.А.
ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь Ахмедова Л.С.
25 октября 2023 г.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,

заведующий лабораторией цитологии и апомиксиса растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН»

Соколов Виктор Андреевич

«25» октября 2023 г.

Контактные данные: Тел: +7 (383) 363-90-67, 8 993 789 2251, e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru, <https://www.mcb.nsc.ru/laboratory/lcap>

Специальность, по которой оппонентом защищена докторская диссертация: 03.00.15 – Генетика, биологические науки.

Адрес места работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, просп. акад.

Лаврентьева 8/2, Новосибирск 630090, телефон (383) 363-90-67, (383) 363-90-68, e-mail: info@mcb.nsc.ru