

## ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук Эльконина Льва Александровича на диссертационную работу к.б.н. 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**

### Актуальность

Способность к размножению является фундаментальным свойством всех живых существ. Для сохранения вида и увеличения числа особей существует два принципиально различных способа размножения – бесполое, более древнее с эволюционной точки зрения, и половое, возникшее позднее в ходе эволюции. У высших растений половое размножение (амфимиксис) осуществляется в результате череды сложных морфо-функциональных процессов, протекающих в генеративных органах спорофита – семязачатках и пыльниках, в которых происходит мейоз и развитие макро- и микрогаметофитов (зародышевых мешков (ЗМ) и пыльцы), и гаметогенез – образование яйцеклеток и спермиев. В результате слияния одного из спермиев с ядром яйцеклетки и другого спермия с полярными ядрами или вторичным ядром центральной клетки ЗМ и последующего эмбрио- и эндоспермогенеза возникают семена. Детальные исследования этих процессов находятся в фокусе внимания многих лабораторий в разных странах мира, поскольку понимание закономерностей генетического контроля и молекулярных основ этих процессов необходимо для решения разнообразных теоретических и прикладных задач генетики и селекции растений.

Примечательно, одна из форм бесполого размножения у растений – апомиксис – реализуется также в результате формирования в семязачатках зародышевых мешков и последующего эмбриогенеза, происходящего, однако, на основе партеногенетического развития неоплодотворенной яйцеклетки. Ясное понимание механизмов, ответственных за переключение процессов амфи- и апомиксиса на сегодняшний день отсутствует. Несмотря на более чем столетнюю историю исследования, апомиксис до сих пор относится к числу мало понятых природных явлений. В литературе накоплен значительный объем данных о распространении апомиксиса среди разных систематических групп растений, эмбриологических особенностях проявления. Большое внимание к проблеме апомиксиса связано с надеждами, что перенос апомиксиса в культурные растения будет способствовать фиксации гетерозиса у гибридов  $F_1$  и их клональному размножению семенами. Сложность решения данной проблемы обусловлена многокомпонентным характером апомиксиса, включающим способность к формированию нередуцированных ЗМ – диплоспорических, возникающих в результате нарушений мейоза, либо апоспорических, развивающихся из соматических клеток, расположенных вблизи мейотического ЗМ, а также способность к партеногенетическому развитию яйцеклеток. Кроме того, ключевым фактором, обеспечивающим формирование семян при апомиксисе, является развитие эндосперма – автономного или на основе псевдогамии (оплодотворения центральной клетки ЗМ одним из спермиев). Эти компоненты контролируются разными генетическими системами. В этой связи, перенос апомиксиса в культурные растения является чрезвычайно трудной задачей, решение которой невозможно без знания

механизмов формирования нередуцированных ЗМ, партеногенетического развития яйцеклетки, автономного эндоспермогенеза.

В этой связи диссертационная работа к.б.н. Брюхина Владимира Борисовича, посвященная получению и изучению мутантов арабидопсиса с нарушением формирования женского гаметофита и эмбриогенеза, исследованию молекулярных механизмов реализации генетической информации в ходе гаметофито- и эмбриогенеза (функционирования экзосом и протеасом, убиквитинирования белков), изучению экспрессии ассоциированных с апомиксисом генов *APOLLO* и *CENH3* у половых и апомиктических видов рода *Boecheera*, сборке и сравнительному анализу геномов половых и апомиктических растений из рода *Boecheera*, представляется весьма актуальной.

### Научная новизна и теоретическая значимость работы

Автором путем введения в геном арабидопсиса транспозонов кукурузы *Ac-Ds*, создана коллекция инсерционных мутантов с нарушенным развитием женского гаметофита и эмбриогенеза. В результате исследования этих мутантов идентифицированы гены, ассоциированные с развитием женского гаметофита, и проанализированы их функции. Показано, что полученные мутации влияют на развитие как женских, так и мужских гаметофитов. Проведена классификация мутаций женского гаметофита по стадиям, на которых происходит остановка его развития: а именно: митотические, кариогамные, дегенеративные и материнского гаметофитного эффекта, ведущего к абортности семян.

На примере арабидопсиса впервые установлена роль отдельных субъединиц экзосом в развитии женского гаметофита (субъединица RRP41) и эмбриогенеза (RRP4), при этом показано, что экзосомы являются существенными структурами для нормального семенного размножения растений. Выявлена роль субъединица RPN1 протеасомы 26S для нормального протекания эмбриогенеза и клеточного цикла у арабидопсиса. Обнаружены два паралога гена *RPN1*, являющиеся функционально эквивалентными. Показано, что мутация в гене *RPN1a*, индуцированная транспозоном, в гомозиготном состоянии вызывает аборт зародышей.

Показано, что убиквитин-протеасомный метаболический путь, выполняющий функцию деградации регуляторных молекул в клетках, необходим для гаметогенеза и эмбриогенеза арабидопсиса. Установлена роль куллинсодержащих убиквитинлигаз в эмбриогенезе. Обнаружено, что ген куллин-зависимой убиквитинлигазы *CUL3* представлен в геноме арабидопсиса двумя копиями. Потеря функциональной активности комплекса *CUL4-DDB1* (куллинсодержащих убиквитинлигаз E3), имеет летальный эффект. Установлена физическая и функциональная связь между лигазой *CUL4 E3* и комплексом *PRC2*, свидетельствующая о роли убиквитинирования в подавлении экспрессии генов.

Впервые проведено полногеномное секвенирование полового вида *Boecheera retrofracta* и апомиктического гибрида видов *B. stricta* и *B. retrofracta* и выполнена безреференсная сборка их геномов. У апомиктического гибрида обнаружены дополнительные аберрантные хромосомы *Het* и *Del*, вероятно несущие локусы генов, связанных с апомиксисом. Осуществлена аннотация собранных геномов.

Показано, что геномы апомиктических растений из рода *Boecheera* характеризуются

высокой гетерозиготностью, сопровождающейся аллоплоидией и анеуплоидией, тогда как половые виды имеют относительно гомозиготный геном.

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 *Boecheera*.

### **Научно-практическая значимость работы**

Полученные автором данные по молекулярно-генетической регуляции отдельных этапов полового размножения арабидопсиса, а именно, женского и мужского гаметофитогенеза и раннего эмбриогенеза, имеют важное значение для понимания фундаментальных проблем биологии развития растений. Значительный вклад в понимание генетического контроля апомиксиса вносит секвенирование генома апомиктического гибрида видов *B. stricta* и *B. retrofracta*, а также экспрессионный анализ генов *CENH3* и *APOLLO*.

Выявленные данные в будущем могут способствовать практическому использованию апомиксиса у возделываемых видов растений, у которых внедрение элементов апомиксиса с помощью генетической инженерии может быть использовано для закрепления гетерозиса у гибридов F<sub>1</sub>.

Результаты настоящего исследования могут быть использованы научными сотрудниками, а также включены в учебные пособия для студентов, специализирующихся в области молекулярной биологии и генетики развития растений.

### **Обоснованность и достоверность результатов исследования**

Исследования выполнены автором на мировом уровне с применением разнообразных молекулярно-биологических методов (инсерционного мутагенеза с помощью транспозона *Ds*; саузерн-блоттинга; нозерн-блоттинга; иммуно-блоттинга; гибридизации *in situ*; глутатион-S-трансферазного анализа; дрожжевого двух-гибридного анализа; ПЦР; ТАИЛ-PCR; ОТ-ПЦР; РНК-интерференции; тонких биохимических экспериментов по выделению и очистке белков экзосомного комплекса; гибридизации на микрочипах; проточной цитометрии; секвенирования ДНК с использованием трех платформ – Illumina, Roche, Sanger). Все эксперименты выполнены с необходимым числом биологических и технических повторений и внутренних контролей. При анализе трансмиссии полученных гаметофитных мутаций через мужские и женские гаметы проанализированы значительные по размеру выборки (до 400 растений). В цитологическом анализе семязачатков были использованы репрезентативные выборки (80-140 штук). Экспериментальные данные обработаны адекватными методами биологической статистики. При безреференсной сборке генома апомиктического гибрида *B. stricta* / *B. retrofracta* использованы современные биоинформационные ресурсы. Корректность полученных результатов подтверждена публикациями в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа написана на 441 странице машинописного текста; включает в себя введение, 7 глав, отдельную главу с описанием экспериментальных

процедур, заключение, выводы, список использованных сокращений и список цитированной литературы, состоящий из 714 источников (27 отечественных, 687 зарубежных); содержит 38 таблиц и 82 рисунка.

Во введении диссертант отмечает актуальность и разработанность темы исследования, формулирует цель и задачи исследования, выделяет новизну и теоретическую и практическую значимость работы, сообщает об использованных методических подходах, формулирует положения, выносимые на защиту.

В первой главе автором представлен сравнительный анализ полового размножения и апомиксиса у растений, при этом проанализирован большой массив литературных данных, включая многих классиков, начиная от Ч. Дарвина, Г. Винклера, П. Магешвари и отечественных корифеев, начиная с С.Г. Навашина и С.С. Хохлова. Автор описывает структуру женского гаметофита и его разнообразие у разных таксонов покрытосемянных растений, свидетельствующее о разных программах их развития; сообщает о типах апомиксиса и его отличии от полового размножения, особенностях генетического контроля. На основании анализа литературных данных автор делает обоснованный вывод о недостатке знаний о генетическом контроле и молекулярных механизмах, лежащих в основе разных компонентов апомиксиса, и в качестве путей решения этой проблемы намечает важность получения и изучения мутаций женских гаметофитов у половых модельных видов и секвенирование генома природных апомиктов.

Во второй главе рассматриваются последовательные этапы развития женского и мужского гаметофитов покрытосемянных растений (на примере *Boecheera falcata*), двойное оплодотворение, эмбрио- и эндоспермогенез. Приводятся данные о мутантах с нарушениями развития женского гаметофита, описанными в литературе; выявленные мутации классифицированы по стадиям развития женского гаметофита. Описана система генной ловушки на основе инсерции транспозона *Ac/Ds*, которую использовал автор для выявления генов, контролирующих развитие женского гаметофита у арабидопсиса. В основе метода лежало скрещивание линии, гомозиготной по транспозону *Ds*, слитому с геном устойчивости к канамицину *nptII* и геном *gus* без собственного промотора, с линией, гомозиготной по транспозону *Ac*, слитому с геном *IAAH*, детерминирующему чувствительность к  $\alpha$ -нафталинацетамиду. В  $F_2$  отбирали рекомбинанты с реинсерцией транспозона *Ds*, устойчивые к канамицину и проявлявшие окрашивание на GUS, но не содержащие *IAAH*. Гаметофитные мутации выявляли путем анализа расщепления по устойчивости к канамицину в самоопыленном потомстве мутантов с пониженным уровнем фертильности, в котором расщепление должно отклонялось от менделевского соотношения 3:1 и, как справедливо отмечает автор, в случае зиготической летальности соответствовало 2:1, а в случае гаметофитной летальности – 1:1. Автором было получено 2511 мутантных линий, из них 54 (2%) имели сниженный уровень фертильности, из которых было идентифицировано 12 линий, которые сочетали полустерильный фенотип с нарушением коэффициента расщепления. Детально было изучено 6 мутантов, которые характеризовались различными нарушениями в структуре зародышевых мешков или летальностью зародышей. У пяти из этих мутантов трансмиссия была нарушена как через женские, так и через мужские гаметофиты.

В третьей главе автор рассматривает литературные данные об эмбриогенезе у растений и его молекулярно-генетической регуляции, отмечая при этом роль генов,

ответственных за установление апикально-базальных градиентов, формирования семядолей, установления радиальной оси.

В четвертой главе автор рассматривает убиквитин-протеасомный путь регуляции эмбриогенеза у растений: в первой части – исследование мутантов *rpn1a*, полученных с помощью инсерции *Ds*-элемента в ген *RPN1a*, который кодирует 26S-субъединицу протеасомы, взаимодействующую с убиквитин-мечеными белками, и, как считается, ответственную за деградацию регуляторных белков в ходе эмбриогенеза; во второй части – обсуждает полученные результаты. Автором описывается эмбрио-летальный мутант, несущий вставку *Ds*-элемента в ген *RPN1a*, у которого зародыши останавливаются в своем развитии на глобулярной стадии. Весьма убедительно доказан факт инсерции *Ds*-элемента у мутанта *rpn1a* благодаря индукции ревертантов путем скрещивания мутанта с линией, несущей *Ac*-элемент, и ПЦР-анализа полученных в этих экспериментах мозаичных растений, несущих сектора дикого типа и мутантные. Роль *RPN1* в развитии зародышей была доказана в экспериментах по комплементации мутантов *rpn1a* генетическими конструкциями, экспрессирующими белок RPN1a, в которых у трансформантов с увеличением копий Т-ДНК снижалась доля abortивных семян. Автором также были изучены мутанты по генам куллинов (*CUL3A* и *CUL3B*), которые кодируют куллин-зависимые убиквитин-лигазы, необходимые для мечения убиквитином регуляторных белков для их лизиса с помощью протеасом. Было установлено, что мутации *cul3a* и *cul3b* вызывают остановку развития зародышей на сердечковидной стадии, замедление целлюляризации эндосперма и характеризуются нарушенной гаметофитной передачей, как по мужской, так и по женской линии.

Значительная по объему часть 4 главы посвящена описанию роли и исследованию куллин-содержащих убиквитин-лигаз класса E3, на основе белка CUL4, участвующих в сайленсинге гетерохроматина, взаимодействующих с белковыми комплексами, осуществляющими эпигенетическую регуляцию и импринтинг (MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), POLYCOMB 2 (PRC2)). Автор описывает инсерционный мутант со вставкой Т-ДНК в ген *CUL4*, у которого гомозиготное состояние мутации *cul4-1* вызывает нарушение развития эндосперма, ведущее к abortивности семян. Результаты анализа паттерна экспрессии гена *CUL4* путем гибридизации мРНК *in situ* в развивающемся зародыше соответствовали потере функции гена у мутанта *cul4-1*. У мутантов *cul4* автором установлена автономная инициацию эндосперма после кастрации в отсутствие оплодотворения. При интрогрессии в генотип мутанта *cul4* гена *MEDEA*, контролирующего импринтинг отцовских аллелей эндосперма (рецессивная мутация в котором (*mea*) обеспечивает инициацию автономного эндоспермогенеза), который был слит в генетической конструкции с репортерным геном *YFP*, в развивающихся семенах зарегистрирована экспрессия репортерного гена, свидетельствующая об утрате импринтинга отцовского гена *MEDEA*. Автор высказывает справедливое предположение об участии гена *CUL* в импринтинге отцовских аллелей в эндосперме.

В пятой главе автор рассматривает роль экзосом – макромолекулярного комплекса, регулирующего метаболизм РНК, в развитии женского гаметофита и эмбриогенеза. Описаны два инсерционных мутанта арабидопсиса с инсерциями Т-ДНК в гены, кодирующие субъединицы экзосом RRP4 и RRP41. У мутанта *RRP41/rrp41* наблюдалась остановка развития женского гаметофита (преимущественно на двухъядерной стадии);

мутация передавалась только через пыльцу, а гетерозиготные растения расщеплялись в соотношении 1:1. У мутанта *rrp4* происходила остановка развития зародышей на двухклеточной стадии. Эти данные имеют значение для понимания молекулярных механизмов, обеспечивающих половое размножение растений. В данной главе автор также описывает разные виды РНК, являющиеся субстратами экзосом у арабидопсиса, в частности, стабильные структурные РНК и межгенные некодирующие РНК, ассоциированные с гетерохроматическими областями.

Шестая глава посвящена описанию и исследованию генов, ассоциированных с апомиктичным размножением. Автор приводит таблицу, в которой перечислены, практически, все гены, выявленные на сегодняшний день и имеющие отношение к апомиксису. А именно: 4 гена, выявленные у арабидопсиса, контролирующие мейоз, мутации в которых ведут к диплоспории; 4 гена, контролирующие эпигенетические модификации хроматина, мутации в которых ведут к апоспории; 4 гена, кодирующих транскрипционные факторы и контролирующие партеногенез или развитие соматических зародышей (последние вряд ли имеют непосредственное отношение к апомиксису, но использовались в работах по экспериментальному конструированию апомиксиса); 5 генов, контролирующих эпигенетические процессы, мутации в которых ведут к автономному развитию эндосперма; кроме того, в таблице перечислены 4 гена, выявленные у природных апомиктов, мутации в которых ведут к амфимиксису. Прежде, чем перейти к описанию генов апомиксиса, изученных автором, он выделяет ключевые преимущества боечер для исследований в этой области. При этом, приводятся результаты проточной цитометрии ядер семян половой и апомиктической линии боечер, безусловно подтверждающие наличие псевдогамного апомиксиса у изученной линии. В данной главе также обсуждаются генетические аспекты апомиксиса у боечер, а именно: полигаплоидное происхождение диплоидных видов, у которых обнаружен апомиксис, роль дополнительных гетерохроматических хромосом *Het*, *Het'* и *Del*; роль полиморфизма в локусах *APOLLO*: апомиктические линии гетерозиготны и имеют одну «апо»-аллель и одну «секс»-аллель, различающиеся 20-нуклеотидным полиморфизмом в 5'-нетранслируемой области гена, при этом половые генотипы гомозиготны по «секс»-аллелям. Большое значение имеют установленные автором различия в уровне экспрессии этих аллелей у полового и апомиктического видов: показано, что уровень транскрипции гена высокий во время (апо)мейоза, причем в апомиктах сильнее экспрессируются «апо»-аллели, а в половых только половые аллели гена.

Кроме того, в данной главе представлены результаты изучения структуры гена *CENH3*, участвующего в расхождении хромосом в ходе мейоза, а также его промотора у нескольких половых и апомиктических видов. Показаны различия в динамике экспрессии этого гена в гинецее полового (*B. stricta*) и апомиктического видов (*B. divaricarpa*), а также разница в уровне экспрессии этого гена в пыльниках *B. stricta* и *B. divaricarpa*, которая, по мнению автора, может быть причиной нарушений в мужском мейозе у *B. divaricarpa*.

Далее, в этой главе автор рассматривает различные молекулярные инструменты для изучения апомиксиса у боечер – генетическую трансформацию, секвенирование транскриптома, в том числе, с использованием лазерной микродиссекции для выделения апомиктической инициальной клетки, яйцеклетки и центральной клетки и анализа их кДНК.

В этой главе также представлены экспериментальные данные о сборке и аннотации

генома *B. retrofracta*, который, как предполагается, является родоначальником некоторых апомиктических видов и линий бочер. Общий размер генома составил 222 Мб; повторяющиеся последовательности составили 40%; всего было предсказано 27 048 генов и 28 269 транскрипта. Сборка показала низкий уровень гетерозиготности. Это достижение автора значительно облегчит сборку и аннотацию геномов родственных апомиктических гибридных видов и послужит основой для изучения генетических факторов, лежащих в основе апомиксиса.

В этой же главе сообщается также о полногеномном секвенировании и сборке генома апомиктического анеуплоидного гибрида М4В, полученного в результате гибридизации половых видов *B. stricta* × *B. retrofracta*. Примечательно, что у этого гибрида присутствуют те же дополнительные хромосомы *Het* и *Del*, возникшие в результате реорганизации хромосомы *Boel*, которые характерны для апомиктических видов бочер. В ходе этой работы авторы обнаружили, что ряд генов у гибрида отличаются от их гомологов у половых видов фланкирующими повторами TR147 и TR167, и сделали предположение об их участии в контроле апомиксиса. Данная работа является значительным вкладом в понимание генетического контроля апомиктического способа воспроизводства и в перспективе может способствовать созданию апомиктично размножающихся гибридов у других видов растений, в том числе, использующихся в сельскохозяйственном производстве.

В седьмой главе автор обсуждает роль эпигенетических процессов в регуляции развития мужского и женского гаметофитов, оплодотворении, эмбрио- и эндоспермогенезе, а также в апомиксисе (в частности, при формировании нередуцированных женских гамет).

Диссертация завершается главой с описанием экспериментальных процедур, общим заключением, в котором автор связывает выявленные им научные факты с представлениями и гипотезами, существующими в мировой науке, и выводами, которые полностью отражают полученные результаты и строго соответствуют поставленным задачам.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в рецензируемых 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» (26 статей), включая высокорейтинговые международные научные журналы *The Plant Cell*, *The Plant J.*, *Sex. Plant Reproduction*, *Plant Biotechnology*, *Cell*, *EMBO J.*, *Plants*, *Epigenomes*, *Taxon* и др. (23 статьи в журналах, реферируемых системами *Web of Science* и *Scopus*), общее число работ по материалам диссертации – 30, включая 3 статьи в монографиях и одно учебное пособие. Основные положения диссертации доложены на многочисленных международных и отечественных конференциях и совещаниях.

### **Замечания и вопросы**

Принципиальных замечаний по тексту и структуре диссертации нет. Вместе с тем, в тексте присутствуют несколько неточностей, преимущественно связанных с оформлением рисунков и таблиц.

1. В таблице 2, посвященной сегрегационному и трансмиссионному анализу

гаметофитных мутантов, в последней строчке указан wt (дикий тип), однако в 3-м столбце для этого дикого типа указано расщепление 3:1. Как это может быть?

2. На стр. 69 сообщается, что гаметофитные мутации обычно передаются через оба пола. На мой взгляд, это ошибочное утверждение, т.к. гаметофитная мутация мужской стерильности не передается через пыльцу, но только через яйцеклетки.

3. В подрисуночной подписи к рис. 16 (с. 73), указано, что 3'- и 5'-концы встроженных *Ds*-элементов обозначены вертикальными линиями слева и справа, соответственно. Это не ошибка? У каждого гена на рисунке начало слева (на это указывает стрелка с направлением транскрипции), тогда слева должен располагаться 5'-конец, поскольку транскрипция идет в направлении 5' → 3'.

4. К рис. 59 (результаты проточной цитометрии ядер семян) следовало приложить данные статобработки, принятой в экспериментах по проточной цитометрии (как минимум, указать коэффициенты вариации у отдельных пиков).

5. В диссертации присутствует ряд неудачных выражений и формулировок. Так, на с. 237 присутствует термин: «биаллельное наследование» (такого термина в генетике нет; есть биаллельные мутации); на с. 244: «изоформы белка CENH3 показали высокое сходство друг с другом ... на нуклеотидном уровне» (сходство на нуклеотидном уровне имеют гены, а белки – на аминокислотном); на с. 311: «мутации являются причиной встраивания *Ds*-элемента» (по логике, мутации являются следствием встраивания *Ds*-элемента); на с. 315: «раствор, содержащий *Agrobacterium tumefaciens*» (вряд ли жидкую среду с клетками *A. tumefaciens* уместно называть раствором – это суспензия); нет единообразия в обозначении мутантов: мутантный аллель указывается либо на первом месте, а на втором – дикий (*aps/APS*), либо наоборот (*DID/did*); на с. 322: «афинно-очищенное антитело кролика...» (полагаю, термин «антитело» в единственном числе используется только в научной фантастике).

Эти замечания, однако, не носят принципиального характера и никоим образом не снижают ценности и новизны полученных автором результатов. Обширный экспериментальный материал, изученный с использованием самых современных методов, высочайшая новизна полученных результатов свидетельствуют о высоком научно-методическом уровне проведенных исследований. Диссертационная работа, в целом, производит общее благоприятное впечатление и, несомненно, заслуживает высокой оценки.

#### **Соответствие темы диссертации научной специальности**

Диссертационная работа к.б.н. Брюхина Владимира Борисовича «Молекулярно-генетические аспекты полового размножения и апомиксиса у покрытосеменных растений» соответствует шифру специальности 1.5.3. – Молекулярная биология (биологические науки).

#### **Соответствие автореферата содержанию диссертации**

Автореферат включает в себя общую характеристику работы, её краткое содержание, заключение, выводы и список работ автора по теме диссертации. Автореферат оформлен в соответствии с п. 25 «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

