

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.218.01,  
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ УФИМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,  
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА  
НАУК

аттестационное дело №

решение диссертационного совета от 24 января

2024 года №1

О присуждении Брюхину Владимиру Борисовичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Молекулярно-генетические аспекты полового размножения и апомиксиса у покрытосеменных растений» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки) принята к защите 27 сентября 2023 года (протокол заседания № 17/1) диссертационным советом 24.1.218.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (450054, город Уфа, Проспект Октября, 71, лит. 1Е; сайт организации: <http://ufaras.ru/>). Создание диссертационного совета утверждено приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 271/нк от 13 ноября 2018 года (частичные изменения от 30 октября 2020 года № 661/нк, 03 июня 2021 года № 561/нк, 25 января 2022 года № 75/нк, 22 марта 2022 года №257/нк, 14 февраля 2023 года №216/нк).

Текст диссертации размещен на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук 29 августа 2023 года (<http://ufaras.ru>)

**Соискатель** Брюхин Владимир Борисович, 1965 года рождения, в 1988 году окончил специалитет биолого-почвенного факультета Ленинградского государственного университета им. А. А. Жданова по специальности «агрехимия и почвоведение». Диплом об окончании университета ПВ № 307960. С 01 октября 1990 года по 30 ноября 1993 года проходил обучение в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ботанический институт им. В. Л. Комарова» Российской академии наук (БИН РАН), которую окончил в 1993 году по специальности 03.00.05 – «Ботаника». В 1993 году защитил диссертацию на тему «Развитие зародыша пиона *in vivo* и *in vitro*» на

соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.05 – «Ботаника» в этом же учреждении. Диплом кандидата наук № 003444 от 01.04.1994.

С 1993 г. по 1997 г. работал в БИН РАН в должности научного сотрудника. В 1996–2013 гг. являлся приглашенным научным сотрудником ведущих зарубежных лабораторий университетов Польши, Нидерландов, Франции, Швеции, Швейцарии, США и Великобритании, что позволило ему приобрести уникальные навыки работы и сформировало научные интересы в области молекулярной генетики размножения растений. С 2013 по 2020 гг. В.Б. Брюхин работал в Центре геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского Санкт-Петербургского государственного университета в должности заместителя директора. С 2015 г. по настоящее время работает в должности ведущего научного сотрудника лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН. Диссертация выполнена в лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ботанический институт им. В. Л. Комарова» Российской академии наук (БИН РАН).

**Научный консультант** – член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, заведующий лабораторией организации генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена РАН, Рысков Алексей Петрович.

#### **Официальные оппоненты**

**Соколов Виктор Андреевич** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией цитологии и апомиксиса растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского Отделения РАН;

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

**Кашин Александр Степанович** – доктор биологических наук, профессор кафедры генетики, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского»,

дали положительные отзывы на диссертацию (отзывы прилагаются).

Официальный оппонент, доктор биологических наук Кашин Александр Степанович в своем положительном отзыве, отмечая новизну и практическую значимость работы, озвучил следующие замечания и вопросы: 1. На мой взгляд, часть шестого положения, выносимого на защиту, констатирующая, что геномы апомиктичных 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. Мегагаметофит при этом выполняет лишь регуляторную функцию. То есть инициальная клетка адвентивного зародыша, если и испытывает воздействие со стороны мегагаметофита 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. Замечание к корректности Рис. 1 на стр. 27; 4. Замечание к содержанию подписи к Рис. 1 на стр. 27; 5. 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; 6. 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; 7. Рис. 59 на стр. 228 ... На графике скрининга ploidy семян методом проточной цитометрии высокий уровень шума. Пики, соответствующие 4C (на рис. 59А), 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. 59А пик 6C учтён, а пик, соответствующий по расположению 8C, проигнорирован. На рис. 59В то, что указано, как 12C – однозначно просто шум. Непонятно почему не сделана проточная цитометрия

стандарта, в качестве которого могла бы выступить часть взрослого растения *V. stricta* (например, лист); 8. Замечание к оформлению рис. 76 на стр. 284; 9. Использование терминологии с не до конца ... уловимым смыслом. Например, «прогрессия клеточного цикла», «гаметофитная передача», «спецификация женского гаметофита», «анэуплоидия хромосомных фрагментов».

Официальный оппонент, доктор биологических наук Эльконин Лев Александрович в своем положительном отзыве, отмечая новизну и практическую значимость работы, озвучил следующие замечания и вопросы: 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 встроенных 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.

Официальный оппонент, доктор биологических наук Соколов Виктор Андреевич в своем положительном отзыве, отмечая актуальность, новизну, научную и практическую значимость работы сделал следующее замечание: 1. 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.

В отзывах официальных оппонентов дано заключение, что диссертационная работа Брюхина Владимира Борисовича на тему «Молекулярно-генетические аспекты полового размножения и апомиксиса у покрытосеменных растений» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки) является законченной 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. Диссертационная работа Брюхина Владимира Борисовича отвечает критериям п. 9,10,11,13,14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор Брюхин Владимир Борисович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки).

Соискатель Брюхин Владимир Борисович согласился с высказанными замечаниями и дал исчерпывающие ответы на вопросы д.б.н. Кашина Виктора Степановича, д.б.н. Эльконина Льва Александровича и д.б.н Соколова Виктора Андреевича, которые полностью удовлетворили оппонентов. При ответе на первый вопрос оппонента д.б.н. Кашина Александра Степановича Брюхин Владимир Борисович указал на то, что в его работах впервые было показано гетерозиготность на полногеномном уровне для апомиктов *Boecheera*. Отвечая на второй вопрос Брюхин В.Б. согласился, что адвентивная эмбриония (или спорофитный апомиксис) - очень интересное явление, но наши исследования были посвящены в основном гаметофитному апомиксису, наиболее сложной разновидности апомиксиса, о чем упомянуто в начале диссертации. В ответе на третий вопрос было отмечено, что стрелки «мейоз» и «митоз» относятся к формированию обоих гаметофитов, возможно их нужно было объединить, но я их разделил, чтобы лучше было видно. Отвечая на четвертый вопрос, Брюхин В.Б. согласился, что диплоидные материнские клетки мега- и микроспор развиваются в нуцеллусе и пыльнике соответственно, а редуцированные клетки зародышевого мешка и пыльцы из функциональной мегаспоры и микроспоры соответственно, благодаря митотическим делениям. Также Брюхин В.Б. согласился с замечанием пять, подтвердив, что «два» — это опечатка. В ответе на шестой вопрос было отмечено, что описание стадий не дано, потому-что указана ссылка (Cristensen et al., 1997), в работе которого указано, что: FG1 – одноядерный женский гаметофит; FG2-F3 — двуядерный женский гаметофит; FG4 — четырехядерный женский гаметофит с несросшимися полярными ядрами; FG6 — семиклеточный женский гаметофит со слившимися полярными ядрами; FG7, четырехклеточный женский гаметофит: антиподальные клетки дегенерировали; FG8, трехклеточный женский гаметофит: одна из синергидных клеток дегенерирует, и зрелый женский гаметофит состоит из яйцеклетки, центральной клетки и одной оставшейся синергидой. Также Брюхин В.Ю. отметил, что описания на стр. 51 и стр. 52 относятся не столько к упомянутым стадиям, сколько к

категориям наблюдаемых нами мутантных фенотипов. Например, спецификация мегаспор, установление полярности, целлюляризация зародышевого мешка и др. события не были выделены Кристенсенем. Отвечая на седьмой вопрос, Брюхин В.Б. сказал, что стандарт (ткань листа) был использован для калибровки прибора и гетинга. Вполне возможно, что 6с и 12 с появились благодаря шуму и реституционным ядрам эндосперма. Главное, что в апомиктической линии не было обнаружено пика 3С, а в *V. stricta* был. При ответе на восьмой вопрос Брюхин В.Б. согласился, что некоторые хромосомные блоки на рис. рис. 76 на стр. 284 обозначены одним цветом, хотя при использовании зума буквенные обозначения вполне видны. Сами эти блоки и соответствующие им ВАСы указаны в статье Mandakova et al., 2015, ссылка на которую дана в диссертации. В ответе на последний, девятый вопрос, В.Б. отметил, что под гаметофитной передачей имеется в виду передача аллели через женский или мужской гаметофит, анеуплоидия хромосомных фрагментов - это наследование некротное двум не целых хромосом, а хромосомных локусов. Эта терминология распространена в англоязычной литературе.

В ответе Брюхина Владимира Борисовича д.б.н. Эльконину Льву Александровичу на первый вопрос прозвучало, что это ожидаемые, идеальные значения. Имеется в виду, что аллель или мутация, которая не относится к гаметофитной и зиготической расщепляется в сегрегирующей популяции менделевским способом 3:1. 2. Безусловно, летальные мутации со стопроцентной пенетрантностью не могут передаваться через соответствующий гаметофит, однако в данном случае речь идет о мутациях с неполной пенетрантностью, что очевидно из таблицы В ответе на второй вопрос В.Б. сказал, что передача гаметофитных мутаций через оба гаметофита отмечалась и ранее в работах Moore et al., 1997, Howden et al. 1998; Sundaresan, Grossniklaus, Koltunow и др. исследователей. Ответ на третий вопрос был следующим: имеется в виду 3'- и 5'-концы именно встроенных Ds-элементов, как мы их идентифицировали, благодаря праймерам, сконструированным на 3'- и 5'-концах транспозона. Диссертант согласился с замечанием в четвертом вопросе и сказал, что данные по проточной цитометрии у него имеются и используются при подготовке публикаций. Поскольку диссертация очень большого объема, поэтому показан только график с соответствующими пиками. В ответе на пятый вопрос относительно «неудачных выражений и формулировок» В.Б. сказал, что существуют методы трансформации прямой индукцией соматического эмбриогенеза из клеток эксплантата и не прямой посредством соматического эмбриогенеза каллусной культуры тканей. Термин «Biallelic inheritance» (биаллельное наследование) довольно распространен в международной литературе и означает, что ген может экспрессироваться из обеих

хромосом (биаллельная экспрессия) или только из одной (моноаллельная экспрессия). В диссертации на странице 244 сказано: «У всех изученных видов изоформы белка CENH3 показали высокое сходство друг с другом с индексом сходства не менее 97% (как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне).» Это означает, что как изоформы белка, так и кодирующие их гены имеют сходство 97%. Слово «ген» опущено, однако это подразумевает, что белки имеют сходство на аминокислотном уровне, а гены, разумеется, на уровне нуклеотидов. Сборка генома может быть как на гаплоидном уровне (когда родительские гаплотипы в конечной сборке не различаются), так и на диплоидном уровне, где материнский и отцовский гаплотипы собираются отдельно. На указанной странице написано: «сборка с полностью разрешенными гомологичными (диплоидными) хромосомами», слово «диплоидными» относится к гомологичным хромосомам и к слову «сборка». М.С. Навашин - сын С.Г. Навашина. Я цитировал сына, М.С. Навашина. С.Г. Навашин умер в 1930 г. и не мог написать цитируемую статью в 1933 г. На первом месте указывается женская аллель, на втором мужская. Таким образом, поколение F2 обозначалось в зависимости от того, использовали ли пыльцу дикого типа при опылении мутантных растений или наоборот.

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) – в своем положительном отзыве, подписанном заведующей лабораторией молекулярной кариологии ИМБ РАН, главным научным сотрудником, доктором биологических наук по специальностям 03.01.03 Молекулярная биология и 03.02.07 Генетика, профессором Ольгой Викторовной Муравенко, и утвержденным заместителем директора ИМБ РАН, доктором биологических наук, Александром Владимировичем Ивановым указала, что результаты диссертационного исследования содержат 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. В частности, получены новые сведения о гаметофитных и эмбрио-летальных мутациях арабидопсиса и особенностях генетики гаметофитов, о роли генов убиквитин-26S-протеасомного метаболического пути и экзосомы в репродукции растений; исследованы некоторые гены, связанные с апомиксисом и впервые осуществлена сборка высоко гетерозиготного генома апомиктического растения до хромосомного уровня. Полученные результаты предполагают новые подходы к пониманию молекулярно-генетической регуляции репродуктивных процессов растений, таких как новое понимание роли убиквитинирования

в регуляции экспрессии генов при репродукции, роли экзосомы в семенном размножении, значении гетерозиготности и наличия добавочных хромосом при возникновении апомиксиса и др. Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на семинаре лаборатории молекулярной кариологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, протокол № 10-23 от 25 октября 2023 г.

В отзыве ведущей организации подробно проанализированы все аспекты работы и в качестве замечаний отмечены ошибки в оформлении и озвучено замечание в оформлении рисунка 76. Брюхин ВБ согласился с замечаниями и ответил на вопросы ведущей организации, в частности отвечая на первый вопрос, соискатель отметил что рисунок 76 является оригинальным и в нем нет данных от других авторов. В легенде содержатся ссылки на ранее опубликованные работы (Schranz et al., 2006b) и (Mandáková et al., 2015), в которых поясняется метод по определению АСК блоков хромосом у крестоцветных, который использовали в настоящем исследовании.

В заключении отмечается, что диссертационная работа Брюхина Владимира Борисовича «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 молекулярной биологии развития растений и биологической науки в целом. В частности, осуществляется решение актуальной задачи изучения молекулярно-генетических аспектов регуляции полового и апомиктического размножения покрытосеменных растений. 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, а ее автор Брюхин Владимир Борисович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки). Отзыв прилагается.

По теме работы соискателем опубликовано 30 статей, из них 26 работ 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 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 публикаций реферируются системой «Web of Science» и одновременно входят в систему «Scopus».

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Brukhin, V.** The *Boechera* 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.
2. **Брюхин, В.Б.** Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса / **В.Б. Брюхин** // *Генетика*. – 2017. – Т. 53 (9) – С. 1001–1024. – doi: 10.1134/S1022795417090046. – WoS, SCOPUS, РИНЦ, ВАК, IF = 0.691.
3. **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.
4. 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.
5. 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.
6. **Brukhin, V.** The RPN1 subunit of the 26S proteasome in *Arabidopsis* is essential for embryogenesis / **V. Brukhin**, J. Gheyeselink, 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.

Полный список опубликованных работ представлен в автореферате.

#### На диссертацию и автореферат поступило 8 отзывов:

Все полученные отзывы положительные, их прислали:

1. Доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела биотехнологии Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов

растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), **Гавриленко Татьяна Андреевна.**

2. Доктор биологических наук, декан биологического факультета, заведующая кафедрой генетики ФГБОУ «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», **Юдакова Ольга Ивановна.**

3. Доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории анатомии и морфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В. Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН), **Шамров Иван Иванович.**

4. Доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» **Повыдыш Мария Николаевна.**

5. Ведущий научный сотрудник лаборатории морских исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологического института Российской академии наук (ЗИН РАН), доктор биологических наук **Гребельный Сергей Дмитриевич.**

6. Главный научный сотрудник лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского Федерального Исследовательского Центра РАН, доктор биологических наук, профессор **Круглова Наталья Николаевна.**

7. Ведущий научный сотрудник лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ботанический институт им. В. Л. Комарова» Российской академии наук (БИН РАН), доктор биологических наук **Наумова Тамара Николаевна.**

8. Профессор кафедры физиологии и биохимии растений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», доктор биологических наук, **Шишова Мария Федоровна.**

Соискатель Брюхин Владимир Борисович ответил на все замечания, указанные в отзывах на автореферат диссертации.

В ответе на вопрос **Шамрова И. И.**, выразившего сомнение о распространенности апомиксиса в природе, Брюхин В.Б. сказал, что согласно исследованиям британского ученого Э. Дж. Ричардса (2003) «Апомиксис — распространенный признак многолетних растений, который встречается у 60% британской флоры, но в значительной степени игнорируются теоретиками репродуктивной системы. Апомикты могут занимать огромные территории и существовать очень долго, чему благоприятствует «симметричный» отбор.

Апомиксису благоприятствуют способы колонизации, например, послеледниковые. Несмотря на свои теоретические преимущества, апомиксис обычно сосуществует совместно с сексуальностью, утаивая тем самым свои «скрытые недостатки.» По данным упомянутого Д. Хойсгаарда (2014-2018), апомиксис встречается во всех основных семействах покрытосеменных. Экологические исследования апомиксиса еще только начались и поэтому ученым пока сложно представить какой масштаб апомиктов предстоит обнаружить в будущем, исходя хотя бы из того, как много новых видов и родов, содержащих апомиксис, были обнаружены за последние десять лет. На второй вопрос Шамрова И. И. предложившего заменить термин «половое размножение» на термин «репродукция». Брюхин В.Б. ответил, что размножение – это русский термин, который на английском звучит как reproduction (репродукция по латыни), поэтому это синонимы. Диссертация посвящена аспектам регуляции и контроля размножения, или репродукции. В ответе на третий вопрос **Шамрова И. И.** о некорректности термина «митотическая диплоспория». Брюхин В.Б. отметил, что термин «митотическая диплоспория» (англ. mitotic diplospory) широко распространен в научной литературе, особенно при изучении апомиксиса, см работы T.N. Naumova, 1999; P van Baarlen, 2001; J.G. Carman, 2019; A. Schmidt, 2020 и др. исследователей. При митотической диплоспории материнская клетка мегаспоры не подвергается мейозу, мейоз замещается митозом, в результате чего образуется диплоспора, состоящая из двух нередуцированных генетически идентичных клеток.

На замечание **Гребельного С. Д.** о ценности выводов по дифференциальной активности генов и тонких цитогенетических наблюдений, отмеченных в пунктах 8 и 9. Диссертант заявил, что результаты, отмеченные в пунктах 8 и 9 очень ценные и важные, тем более для диссертации по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

На вопрос **Кругловой Н. Н.** Чем определяется, что апо-аллель *APOLLO* находится под положительным эволюционным отбором? Брюхин В.Б объяснил, что соотношение  $Ka/Ks$  (отношение количества несинонимичных замен ( $Ka$ ) гена *APOLLO* к количеству синонимичных замен ( $Ks$ ) у апо-аллелей и секс-аллелей *APOLLO* за тот же период ( $Ka/Ks = 1,4646$ )) указывает на то, что апо-аллели, находятся под положительным отбором, поскольку соотношение  $Ka/Ks > 1$ . Об этом написано на стр. 240 диссертации.

На замечание **Наумовой Т. Н.** термина «бесполое размножение» и «бесполоый зародыш к апомиксису. Брюхин В.Б. отметил, что с молекулярно-генетической точки зрения, основными атрибутами полового процесса являются наличие мейоза с редукцией хромосом, часто сопровождающегося рекомбинацией гомологичных хромосом, а также оплодотворения яйцеклетки спермием (сингамия). Поскольку апомиктический зародыш

формируется, минуя эти процессы (апомейоз и агамогенез) и является генетически идентичным материнскому растению (спорофиту), то есть в молекулярном смысле генетическим клоном, его можно назвать бесполом, в смысле образовавшегося без полового процесса. Я ни в коем случае не смешиваю понятие апомиктического и вегетативного размножения. Поскольку апомиксис происходит в репродуктивных (генеративных) структурах: семязачатках и семенах, а вегетативное размножение идет при помощи вегетативных органов (побегов, стеблей, столонов и т.п.) и не связано с зародышами, а только с вегетативными тканями и почками. Термин «бесполосеменной» по отношению к апомиксису встречается не только в международных научных публикациях, но и в отечественной литературе, например у Соколов и др., 2011; Смолькина, 2023. В англоязычной литературе термин “asexual embryo”, “clonal embryo” встречается практически во всех статьях, посвященных апомиксису. Упомянутый в вопросе В.Н. Тихомиров считал под бесполом размножением, в том числе, и спорогенез. Апомиксис же включает в себя спорообразование, но не полноценный мейоз. Суммируя сказанное, я еще раз хочу подчеркнуть, что апомиксис хоть и имеет место в генеративных органах, но формирует бесполое зародыши либо с участием нередуцированного зародышевого мешка и партеногенеза (при гаметофитном апомиксисе), либо из спорофитных соматических клеток нуцеллуса или интегумента (при адвентивной эмбрионии).

На вопрос **Шишовой М. Ф.** какова возможная последовательность событий, реализующаяся при переключении с полового на апомиктический путь размножения у покрытосеменных растений? Брюхиным В.Б. был дан ответ, что если бы последовательность процессов восприятия сигналов рецепторами, сигнальной трансдукции и дальнейшего запуска каскада экспрессии и регуляции генов была полностью известна, то тайны индукции и регуляции апомиктического способа размножения была бы полностью изучена. Пока можно сказать, что апомиксис – это изменение молекулярных программ половой репродукции в генеративных клетках. В двух словах, в нуцеллусе мегаспороцит за счет экспрессии определенных генов, прежде всего связанных с деградацией сигнальных белков и генов, влияющих на редукцию хромосом, с помощью эпигенетической регуляции, которая вероятно происходит с участием экзосом, способствует замене мейоза на митоз, благодаря чему формируется нередуцированный мегагаметофит. А в дальнейшем диплоидная яйцеклетка начинает экспрессировать гены, способствующие партеногенезу (агамоспермии), эти гены упомянуты в диссертации. Таким образом, в апомиктических семенах возникают клональные зародыши.

Во всех отзывах на автореферат отмечается, что работа Брюхина Владимира Борисовича является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на высоком научном и методическом уровне, выводы диссертации достоверны и полностью отражают поставленные задачи. Во всех отзывах указано, что диссертационная работа отвечает критериям п. 9-11, 13-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор Брюхин Владимир Борисович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки) (отзывы прилагаются).

**Выбор официальных оппонентов обосновывается следующим:**

**Кашин Александр Степанович** – доктор биологических наук, профессор кафедры генетики, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского», является высококвалифицированным специалистом в области изучения апомиксиса и эволюции цветковых работ, что предполагает возможность всестороннего анализа оппонируемой работы.

**Эльконин Лев Александрович** – доктор биологических наук, главный научный сотрудник Отдела биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федерального аграрного научного центра Юго-Востока», является высококвалифицированным специалистом в области изучения нехромосомной наследственности, эпигенетики, цитоплазматическая мужской стерильности, генетической инженерии растений и апомиксиса, автор более 140 публикаций.

**Соколов Виктор Андреевич** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией цитологии и апомиксиса растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского Отделения РАН, один из ведущих в России и мире специалистов в области апомиксиса и молекулярной репродукции растений, автор многочисленных научных публикаций.

Оппоненты имеют соответствующие публикации в журналах из Перечня ВАК и дали свое согласие быть оппонентами диссертационной работы Брюхина Владимира Борисовича.

**Выбор ведущей организации обусловлен тем,** что Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук является ведущим в Российской Федерации научным учреждением в области молекулярной биологии, где проводят научные исследования по направлениям, соответствующим теме диссертационного исследования, в том числе, в области кариологии, хромосомной организации геномов растений и цитогенетики. Результаты работ сотрудников данного учреждения широко известны как в российских, так и международных научных кругах.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**предложены** эффективные экспериментальные методы и подходы для исследования молекулярной регуляции репродуктивных процессов у растений;

**показано,** что гены, ответственные за гаметофитные и эмбрио-летальные мутации модельного растения *Arabidopsis thaliana* часто проявляют плейотропный эффект при задержке развития гаметофита и принадлежат к различным семействам;

**отмечено,** что убиквитин-протеасомный метаболический путь регулирует размножение и развитие растений, в том числе, нормальный гаметогенез и эмбриогенез;

**представлены** сведения о роли экзосом в регуляции размножения и развития растений;

**доказано,** что белковый комплекс CUL4-DDB1 арабидопсиса взаимодействует с белком MSI1 и необходим для поддержания родительского импринтинга гена *MEDEA*.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**Впервые осуществлена** полногеномная сборка и аннотация генома полового вида *B. retrofracta* и природного апомиктического гибрида видов *B. stricta* и *B. retrofracta* до уровня хромосом на основе NGS секвенирования на различных платформах, показаны различия геномов растений с половым и апомиктическим способом размножения;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован** комплекс современных методов 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, статистики и др.;

**изложены** результаты, которые углубляют и расширяют представления о молекулярной основе репродуктивных процессов у растений, прежде всего о мейозе, гаметогенезе и эмбриогенезе;

**раскрыта** роль генов, кодирующих субъединицу RPN1 протеасомы 26S и лигаз E3 CUL3 и CUL4 в контроле развития женского гаметофита и эмбриогенезе у арабидопсиса;

**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.

**Обнаружен** «глубоко скрытый» слой транскриптома, состоящий из межгенных некодирующих транскриптов, которые сильно подавляются конститутивной активностью экзосом.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**разработаны** новые подходы для изучения, производства и молекулярно-генетического анализа инсерционных мутаций у модельных растений с помощью транспозонов Ds и Ac и выявления генов, контролирующих репродуктивные процессы;

**показана** различная динамика экспрессии генов *APOLLO* и *CENH3* при половом и апомиктичным способе репродукции;

**определено**, что апо-аллели *APOLLO* находятся под положительным отбором, что характерно для паралогов, которые необходимы для выполнения новой функции;

**представлены:** методы и результаты 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-спектрологии и др.

Проведенные исследования имеют большое значение для понимания генетических и молекулярных механизмов регуляции полового воспроизведения и апомиксиса, важнейшего условия улучшения урожая и контролируемого управления семенной репродукцией растений, в том числе культивируемых и экономически значимых. С этой целью в работе исследовались важные вопросы биологии развития, такие как выявление генов и их функции в регуляции процессов гамето- и эмбриогенеза, исследование значения генов, участвующих в деградации сигнальных белков для репродуктивных процессов, а также поиск генов, ассоциированных с апомиксисом; исследование различий геномов растений, размножающихся половым путем и апомиксисом и др. 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. Полученные результаты диссертации дополняют знания о молекулярно-генетической регуляции, которые в итоге позволят подойти к целенаправленному управлению этими процессами и будут способствовать интенсивному развитию сельского хозяйства путем фиксации ценных фенотипических признаков, прежде всего полученных путем гетерозиса, в неограниченном ряду поколений культурных растений.

#### **Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:**

**для экспериментальных работ** – достоверность полученных результатов определяется подбором адекватных методов и подходов молекулярно-генетического анализа, использованием высокотехнологичного оборудования различных зарубежных и отечественных научных центров, использованием большого количества экспериментальных растений и выполнением экспериментов в нескольких биологических и технических повторностях, а также статистической обработкой данных. Наблюдаемая воспроизводимость данных исследования и сопоставимые с другими авторами результаты указывают на правильность сформулированных выводов. Корректность проведенных исследований подтверждена публикацией основных результатов исследования в высокорейтинговых международных и отечественных рецензируемых журналах. Также материалы диссертации были доложены на отечественных и международных конференциях и совещаниях;



**теория** работы основана на анализе существенного объема научной литературы по изучаемой тематике работы, на известных данных и фактах, согласующихся с ранее опубликованными материалами по теме диссертации;

**идея базируется** на анализе современной отечественной и зарубежной литературы по изучению сведения о молекулярно-генетической регуляции репродуктивных процессов у покрытосеменных растений, имеют фундаментальное значение для биологии развития растений;

**использованы** современные данные научно-исследовательских работ, связанные с темой диссертации и опубликованные в рецензируемых научных изданиях; помимо этого, информация баз данных в качестве сравнения результатов исследования с полученными данными в предшествующих исследовательских работах;

**установлена** сопоставимость полученных результатов настоящего исследования с данными, опубликованными в более ранних работах зарубежных и отечественных научных авторов. Вместе с тем, полученные в проведенном исследовании результаты отличаются существенной научной новизной;

**использованы** современные методы лабораторных исследований, а также методы статистической обработки результатов. Для интерпретации результатов привлечены сведения из многих литературных источников.

**Личный вклад соискателя заключается** в непосредственном участии в выполнении всех этапов исследования. Автору принадлежит формулировка проблемы, постановка целей и задач, планирование, получение анализируемых мутантных растений, подготовка материала для полногеномного секвенирования, его обработка и 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.

В ходе защиты диссертации критические замечания высказаны не были, заданы вопросы уточняющего и конкретизирующего характера. Соискатель Брюхин Владимир Борисович ответил на все вопросы в ходе заседания.

На заседании 24 января 2024 года Диссертационный совет пришел к выводу, что совокупность защищаемых положений позволяет заключить, что диссертация Брюхина Владимира Борисовича «Молекулярно-генетические аспекты полового размножения и

апомиксиса у покрытосеменных растений» имеет важное научное и практическое значение для решения фундаментальной проблем биологии - теории молекулярно-генетической регуляции амфимиксиса и апомиксиса. Полученные соискателем данные по влиянию генов убиквитинового метаболизма на репродуктивные процессы, впервые продемонстрированная роль экзосом в репродукции и использование не только классических методов функциональной генетики, но и методов сравнительной геномики вносят большой вклад в теорию биологии развития и размножения растений.

Диссертация является цельным и законченным научным исследованием, обладающим внутренним единством изложения, выводы полностью соответствуют поставленным задачам и подчинены единству концепции диссертационного исследования.

Диссертационная работа Брюхина Владимира Борисовича представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На заседании 24 января 2024 года диссертационный совет 24.1.218.01 принял решение присудить Брюхину Владимиру Борисовичу ученую степень доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., профессор, член- корреспондент РАО	 / Хуснутдинова Эльза Камилевна
Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., доцент	 / Корытина Гульназ Фаритовна
	«24» января 2024 года