

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Максимов Никита Михайлович**

**РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В  
ПРОРАСТАНИИ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА СЕМЕННЫХ  
РАСТЕНИЙ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре физиологии растений Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – **Брейгина Мария Александровна**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
- Официальные оппоненты** – **Попова Лариса Геннадьевна**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
- Соколов Дмитрий Дмитриевич**  
доктор биологических наук, профессор, зав.кафедрой ботаники биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
- Мамаева Анна Станиславовна**  
кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и протеомики растений ФГБУН Института биоорганической химии им. Академиков Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина

Защита диссертации состоится «13» декабря 2019 г. в 17.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.03 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М1

E-mail: dissovet\_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/245907559/>

Автореферат разослан «    » ноября 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Вегетативная клетка пыльцевого зерна покрытосеменных растений является традиционной для экспериментальной биологии моделью, с помощью которой изучают целый ряд клеточных процессов и явлений, в основном, связанных с полярным ростом: цитофизиологические основы клеточной полярности, динамику сборки цитоскелета и транспорта мембранного материала, ионную и редокс-регуляцию роста и др. (Becker et al. 2003; Pina and Pinto 2005; Michard et al. 2017). Механизмы прорастания и роста мужского гаметофита у современных хвойных, гинкговых, беннетитовых и саговниковых изучены несравненно хуже, чем у цветковых растений, хотя сравнительно-физиологические исследования, наряду с традиционными палеоботаническими, ботаническими и молекулярно-биологическими данными, могли бы иметь важное значение для построения филогенетической системы семенных растений и понимания их эволюции.

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой агенты с повышенной относительно триплетного кислорода энергией ( $^3\text{O}_2$ ). В высоких концентрациях АФК вызывают разнообразные повреждения биомолекул, в связи с чем в клетке существует целый ряд механизмов защиты и поддержания низкого уровня АФК. Однако показано, что АФК могут выполнять сигнальные и регуляторные функции, при этом их концентрация в клетках и тканях локально возрастает.

Недавно установлено, что такие всплески продукции АФК происходят на нескольких этапах репродуктивного процесса у цветковых растений (McInnis et al. 2006; Hiscock et al. 2007; Zafra et al. 2016), однако было непонятно, какие механизмы обеспечивают ответ на АФК в растущем мужском гаметофите. Также до сих пор было неизвестно, каким образом осуществляется редокс-регуляция прогамной фазы оплодотворения у покрытосеменных растений. Наша работа посвящена данной актуальной теме и демонстрирует участие как эндогенных, так и экзогенных АФК в прорастании пыльцевого зерна и

поддержании роста пыльцевой трубки, а также вскрывает ряд ключевых механизмов редокс-регуляции.

**Цель работы.** Выявить и сопоставить регуляторную роль активных форм кислорода в процессе прорастания мужского гаметофита у модельных растений, представителей покрытосеменных и хвойных.

Для достижения этой цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Проверить гипотезу о наличии на плазмалемме вегетативной клетки мишеней для  $H_2O_2$ . Изучить его действие на ключевой регуляторный модуль в прорастании пыльцы – цитозольный уровень и ток  $Ca^{2+}$ .
2. Выявить другие мишени на плазматической мембране, которые могут участвовать в ответе клетки на экзогенные АФК.
3. Выявить роль  $H_2O_2$  в контроле интегрального показателя ионного гомеостаза – мембранного потенциала – у покрытосеменных и хвойных растений.
4. Провести эксперименты по изучению ионных токов на плазмалемме в присутствии тяжелых металлов, которые вызывают или не вызывают гиперпродукцию АФК.
5. Изучить особенности редокс-регуляции прорастания пыльцы хвойных: выявить АФК, имеющие ключевое значение для запуска полярного роста, и их источник.

**Научная новизна.** Впервые показана  $H_2O_2$ -индуцированная активация входящего  $Ca^{2+}$  тока на протопластах лилии, также продемонстрировано  $H_2O_2$ -индуцированное увеличение  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  в субпротопластах табака. Также впервые показано, что  $H_2O_2$  вызывает активацию выходящего  $K^+$  тока в протопластах лилии. Впервые картирован градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке ели, с помощью ингибиторного анализа изучен вклад отдельных ион-транспортных систем в формирование данного градиента. Двумя независимыми методами показана  $H_2O_2$ -индуцированная гиперполяризация субпротопластов из пыльцевых трубок. Также показано влияние  $H_2O_2$  на градиент в апексе пыльцевой трубки ели. Впервые описаны конкретные мишени для тяжелых

металлов на плазмалемме мужского гаметофита. Впервые продемонстрирован выход АФК из пыльцевыми зёрнами ели, а также показано распределение  $H_2O_2$  в прорастающих пыльцевых зёрнах. Эта группа данных открывает совершенно неизученную область – редокс-регуляцию прогамной фазы у хвойных растений.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Представляемая работа расширяет существующие представления о редокс-контроле трансмембранного ионного транспорта и регуляции мембранного потенциала в вегетативной клетке мужского гаметофита покрытосеменных растений. Кроме того, данная работа вносит существенный вклад в изучение цитофизиологических особенностей роста мужского гаметофита у хвойных. Полученные в работе результаты могут быть использованы при дальнейшем исследовании фундаментальных проблем физиологии и эмбриологии растений в научно-исследовательских учреждениях. Также результаты могут использоваться в учебном процессе в университетах и других ВУЗах, ведущих подготовку биологов широкого профиля. В дальнейшем знания о редокс-регуляции размножения можно использовать для направленного изменения свойств растений и их продуктивности. Это же касается и выявления мишеней для тяжелых металлов, знания о которых могут помочь в получении устойчивых сортов и понимании механизмов защиты при выращивании растений и получении урожая в условиях антропогенной нагрузки.

**Методология диссертационного исследования.** Диссертационная работа выполнена с использованием физиолого-биохимических и статистических методов, а также анализа данных литературы.

**Положения, выносимые на защиту.**

1.  $H_2O_2$  в протопластах вегетативных клеток пыльцевого зерна у исследованных покрытосеменных растений активирует  $Ca^{2+}$  токи и увеличение  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ . Ингибирование входа  $Ca^{2+}$  блокирует регенерацию клеточной оболочки.
2.  $H_2O_2$  активирует выходящий  $K^+$  ток из протопластов пыльцевых зёрен.

3. В пыльцевых трубках ели существует латеральный градиент мембранного потенциала, в регуляции которого участвуют различные ион-транспортные системы.  $H_2O_2$  воздействует на мембранный потенциал в субпротопластах из пыльцевых трубок табака, а также в интактных пыльцевых трубках ели.
4.  $Cu^{2+}$ , способствуя образованию АФК в протопластах, активирует  $H^+$ -АТФазу плазмалеммы, а  $Ni^{2+}$ , не влияя на редокс-статус пыльцевых зёрен, блокирует ток  $K^+$ .
5. Пыльцевые зёрна ели генерируют экстраклеточные АФК на раннем этапе прорастания.
6. Эндогенные АФК необходимы для эффективного прорастания пыльцевых зёрен ели.

**Личный вклад соискателя** заключается в планировании и проведении экспериментальных исследований, представленные результаты получены самим автором или при его непосредственном участии. Фамилии и имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены в стендовых и устных докладах на конференциях: XXI и XXII научные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014, 2015), «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014), XXIII International Congress on Sexual Plant Reproduction (Порту, 2014), «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), V Международная Школа для молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», посвященная памяти члена-корреспондента РАН профессора Татьяны Борисовны Батыгиной (Санкт-Петербург, 2016), II Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Уфа, 2017), XI Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Минск, 2018), «Физиология растений – основа созданий растений будущего» (Казань, 2019).

**Публикации.** Общее число публикаций автора – 5 (статей в журналах, индексируемых в Scopus – 5, Web of Science – 4), из них по теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК и включенных в базы данных Scopus и/или Web of Science, а также 9 тезисов докладов научных конференций.

**Диссертация** состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, состоящего из 269 работ (из них 256 на иностранном языке). Работа изложена на 168 страницах, содержит 1 таблицу и 22 рисунка.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

Включает четыре раздела. Кратко рассмотрены основные цитофизиологические особенности прорастания пыльцевого зерна и роста трубки. Подробно рассмотрена ионная регуляция роста пыльцевой трубки, мембранный потенциал в мужском гаметофите и роль активных форм кислорода в жизни гаплоидного поколения. Особое внимание уделено различным неорганическим ионам, участвующим в регуляции полярного роста в прогамной фазе оплодотворения.

### Глава 2. Материалы и методы

**Объекты исследования.** Пыльца ели (*Picea pungens* Engelm.) с деревьев, растущих в ботаническом саду биологического факультета МГУ, пыльца срезанных растений лилии (*Lilium longiflorum* Thunb. cv. 'WhiteHeaven') и пыльца табака (*Nicotiana tabacum* L.) с растений, выращенных в климатической камере. Сухую пыльцу хранили при -20 °С. Во всех экспериментах использовали пыльцу, преинкубированную во влажной камере в течение 1-2 часов при 25 °С.

Для выделения протопластов из пыльцевых зёрен лилии предварительно проводили регидратацию пыльцевых зёрен, инкубируя их в стандартной среде прорастания. Затем пыльцевые зёрна переносили в гипертоническую среду с

ферментами (Tanaka et al. 1987). Инкубировали 1 час при 29 °С. Для выделения субпротопластов из пыльцевых трубок табака сначала проводили проращивание пыльцевых зерен. Для этого пыльцу инкубировали 1 ч при 25 °С в среде, затем переносили в гипертоническую среду с ферментами и инкубировали на качалке 1 час при 29 °С.

**Флуоресцентная микроскопия.** В работе использовали моторизованный микроскоп AxioPlan 2 imagingMOT (Zeiss, Германия) с программным обеспечением AxioVision 4.5, оснащенный цифровой камерой AxioCamHRc.

Для определения цитоплазматического pH субпротопластов использовали ратиометрический флуоресцентный краситель BCECF (Feijó et al., 1999). В спектре возбуждения флуоресценции BCECF есть как pH-чувствительный участок, так и изобестическая точка. Это позволяет определять значение pH, используя отношение интенсивностей флуоресценции в pH-чувствительном ( $I_1$ ) и pH-нечувствительном канале ( $I_2$ ). Для определения цитоплазматического pH была построена калибровка *in vitro*.

Для определения мембранного потенциала использовали два красителя с разным принципом действия: медленный DiBAC<sub>4</sub>(3) и быстрый Di-4-ANEPPS. Определение абсолютных значений мембранного потенциала проводили с помощью DiBAC<sub>4</sub>(3). Распределение отрицательно заряженных молекул красителя между цитоплазмой и средой описывается уравнением Нернста. В определенном диапазоне концентраций интенсивность флуоресценции линейно зависит от величины мембранного потенциала (Брейгина и др., 2009). Для исследования динамики мембранного потенциала и картирования использовали ратиометрический краситель di-4-ANEPPS. Благодаря своей липофильности молекула красителя встраивается в липидный бислой плазмалеммы. Потенциал-зависимой характеристикой является отношение  $F_b/F_g$ , где  $F_b$  – интенсивности флуоресценции при возбуждении синим светом, а  $F_g$  – интенсивность флуоресценции при возбуждении зеленым светом. При гиперполяризации мембраны величина  $F_b/F_g$  уменьшается.



Определение внутриклеточной концентрации катионов кальция  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  проводили с помощью флуоресцентного красителя Fluo-3 (Wang et al. 2004). Для окрашивания материала клеточной стенки использовали флуоресцентный краситель Tinopal. Для окрашивания ядер использовали краситель DAPI. Для оценки уровня внутриклеточных АФК использовали общепринятый метод окрашивания DCFH-DA. Для оценки жизнеспособности использовали традиционный способ – окрашивание рН – чувствительным флуоресцентным красителем FDA (Yang 1986).

**Флуориметрия.** Уровень внеклеточных АФК оценивали с помощью неспецифического красителя OxyBURST Green H<sub>2</sub>HFF, конъюгированного с БСА, что предотвращало его интернелизацию в клетки. Флуоресценцию внеклеточного раствора измеряли с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF5301.

**Конфокальная микроскопия.** Для картирования внутриклеточных АФК использовали два красителя:  $O_2^{\bullet-}$ , локализованный в митохондриях, выявляли с помощью MitoSOXred. Пероксид водорода выявляли путем окрашивания PFBS. Особенностью данного красителя, разработанного японскими учеными, является его высокая специфичность к  $H_2O_2$ , а также неокислительный механизм перехода во флуоресцентную форму (Maeda et al. 2004). Картирование АФК для получения четкой картины проводили на конфокальном флуоресцентном микроскопе Nikon A1.

**Электрофизиология.** В настоящей работе изучение трансмембранных ионных токов проводили методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» («whole cell»). Для записи тока использовали установку кафедры Физиологии человека и животных МГУ. При записи тока компенсировали ёмкость пипетки, протопластов и сопротивление контакта. Все записи токов нормализовали к ёмкости протопластов. Все записи тока выполняли при комнатной температуре ( $24 \pm 1$  °C).

Выходящий  $K^+$  ток возбуждали деполяризующими импульсами продолжительностью 3 с, с интервалом 15 с (Fan et al. 2003). Для

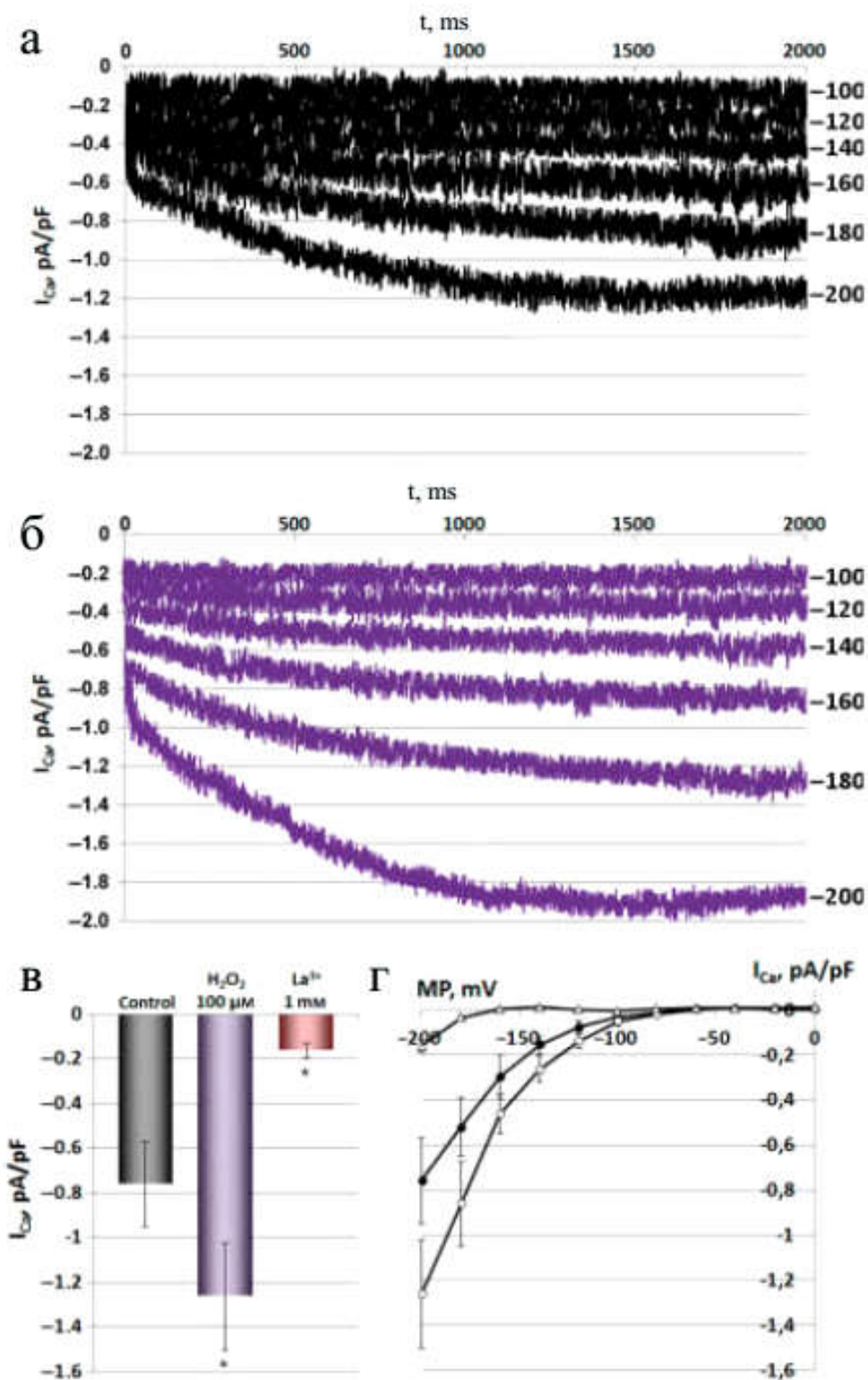
подтверждения  $K^+$  природы ионного тока использовали ингибитор  $K^+$ -проводящих каналов TEA (10 и 100 мМ). Входящий  $Ca^{2+}$  ток возбуждали гиперполяризующими импульсами продолжительностью 2 с, с интервалом 10 с, (Shang et al. 2005). Для подтверждения  $Ca^{2+}$  природы ионного тока использовали ингибитор  $Ca^{2+}$ -проводящих каналов  $LaCl_3$  10 и 100 мМ. Выходящий  $H^+$  ток возбуждали деполяризующими пилообразными импульсами продолжительностью 5 с, с интервалом 15 с, с пиками -100 и +100 мВ (Taylor and Assmann 2001). Для подтверждения  $H^+$  природы тока использовали ингибитор  $H^+$ -АТФазы  $Na_3VO_4$  3 мМ.

**Статистическая обработка данных.** Все опыты проводили не менее чем в трёх биологических повторностях. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости 0.05 и 0.01. При обработке пэтч-кламп экспериментов использовали статистические критерии для малых выборок (критерии Вилкоксона и Манна-Уитни).

### Глава 3. Результаты и обсуждение

#### $H_2O_2$ -индуцированный $Ca^{2+}$ ток в протопластах лилии

Измерения трансмембранного  $Ca^{2+}$  тока в протопластах из пыльцевых зёрен лилии проводили методом пэтч-кламп. Из *рис.1* видно, что каналы, через которые осуществляется ток, потенциал-зависимые и активируются при гиперполяризации плазматической мембраны. При добавлении 100  $\mu M$   $H_2O_2$  происходит усиление тока  $Ca^{2+}$  в 1.5–2 раза. Ток обладает высокой чувствительностью к  $La^{3+}$ , что характерно для ранее описанных  $Ca^{2+}$  токов.



**Рисунок 1.** Входящий  $\text{Ca}^{2+}$  ток в протопластах лилии. Представлены репрезентативные оригинальные записи ионных токов при различных значениях потенциала в контроле (а) и после инкубации в течение 5 минут в среде, содержащей  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (б). (в) Сравнение средних пиков  $\text{Ca}^{2+}$  тока (г) Средние вольт-амперные характеристики пикового входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока, записанного в контрольных условиях (●), при действии  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (○) и в присутствии  $1 \text{ mM}$   $\text{La}^{3+}$  (Δ).

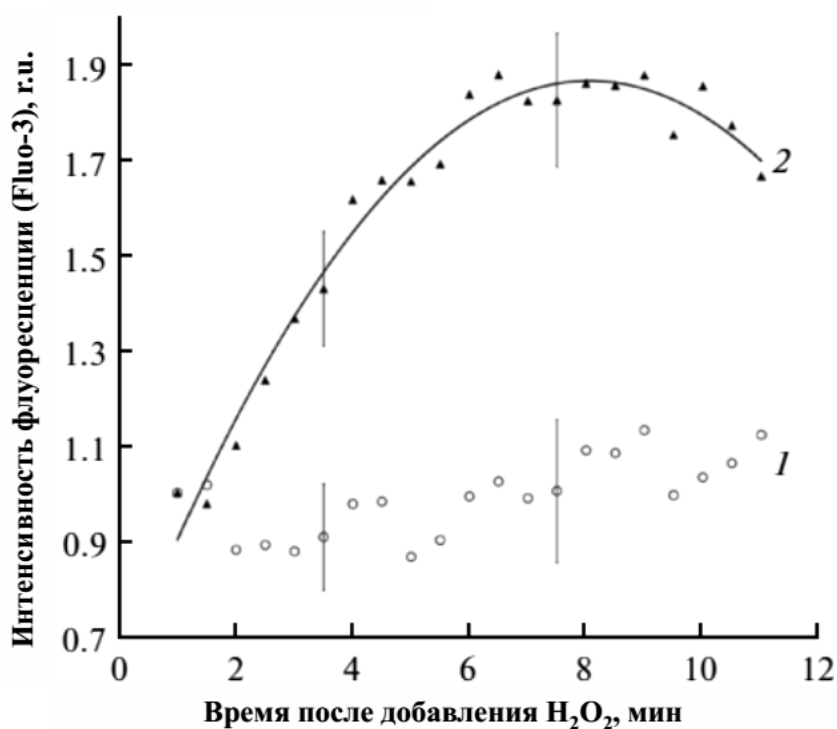
Обнаружив яркий эффект пероксида водорода, мы должны были проверить, какие концентрации действующего вещества не снижают жизнеспособность, то есть могут называться физиологическими. Для этого нами был проведен тест на жизнеспособность при различных концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  от 0,1 до 10 мМ. При действии 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  жизнеспособность на уровне контроля. При повышении концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  до 10 мМ происходит падение жизнеспособности клетки. Такие концентрации нами не использовались.

Можно предположить несколько не исключаящих друг друга функций обнаруженного  $\text{H}_2\text{O}_2$ -чувствительного входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока. Известно, что АФК (главным образом  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) накапливаются в рецептивных спорофитных тканях рыльца у целого ряда видов (Hiscock et al. 2007). Соответственно, на стадии прорастания пыльцевого зерна *in vivo* данный ток может обеспечивать описанное ранее в ряде работ увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в области функциональной апертуры, с последующим увеличением  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  по всей цитоплазме вегетативной клетки (Iwano et al. 2004; Diao et al. 2018). Таким образом, АФК-индуцированная активация входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока – один из ключевых регуляторных механизмов в ходе прорастания. С другой стороны, наличие  $\text{H}_2\text{O}_2$ -чувствительного входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока подтверждает, что продуцируемые НАДФН-оксидазой (то есть, эндогенные) АФК могут активировать каналы, через которые осуществляется  $\text{Ca}^{2+}$  ток, поддерживающий градиент  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ .

#### $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$

Значение  $\text{H}_2\text{O}_2$  в контроле гомеостаза  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  подтверждают эксперименты, проведенные на субпротопластах из пыльцевых трубок табака. На **рис.2** представлена динамика интенсивности флуоресценции красителя в клетках, обработанных  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ), нормированная к интенсивности флуоресценции контрольных клеток. Видно, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) индуцирует увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в субпротопластах; показатель достигает максимальной величины приблизительно к 6-ой минуте после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В присутствии ингибитора – нифедипина (100  $\mu\text{M}$ ) не происходит  $\text{H}_2\text{O}_2$ -

индуцированного увеличения  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ , т.е., нифедипин полностью снимает эффект пероксида водорода в данной модели. При этом динамика  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  в присутствии нифедипина (100  $\mu\text{M}$ ) без пероксида не отличалась от контроля. Рассматривая полученный результат в совокупности с данными пЭТЧ-кламп, можно говорить об универсальности регуляторной схемы:  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$  вход  $\text{Ca}^{2+}$  через катионные каналы  $\rightarrow$  повышение  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ , для двух стадий прорастания мужского гаметофита, а также и для двух групп растений (однодольные и двудольные).



**Рисунок 2.** Динамика интенсивности флуоресценции Fiuo-3, отражающая изменения  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  под действием  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ). 1 - предобработка субпротопластов нифедипином (100  $\mu\text{M}$ ) снимает эффект  $\text{H}_2\text{O}_2$ , что подтверждает  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированный вход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму через нифедипин-чувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы плазмалеммы. Уровень флуоресценции нормализован по отношению к контролю. Приводятся стандартные ошибки среднего.

#### Регуляторная роль $\text{H}_2\text{O}_2$ в контроле $\text{K}^+$ тока

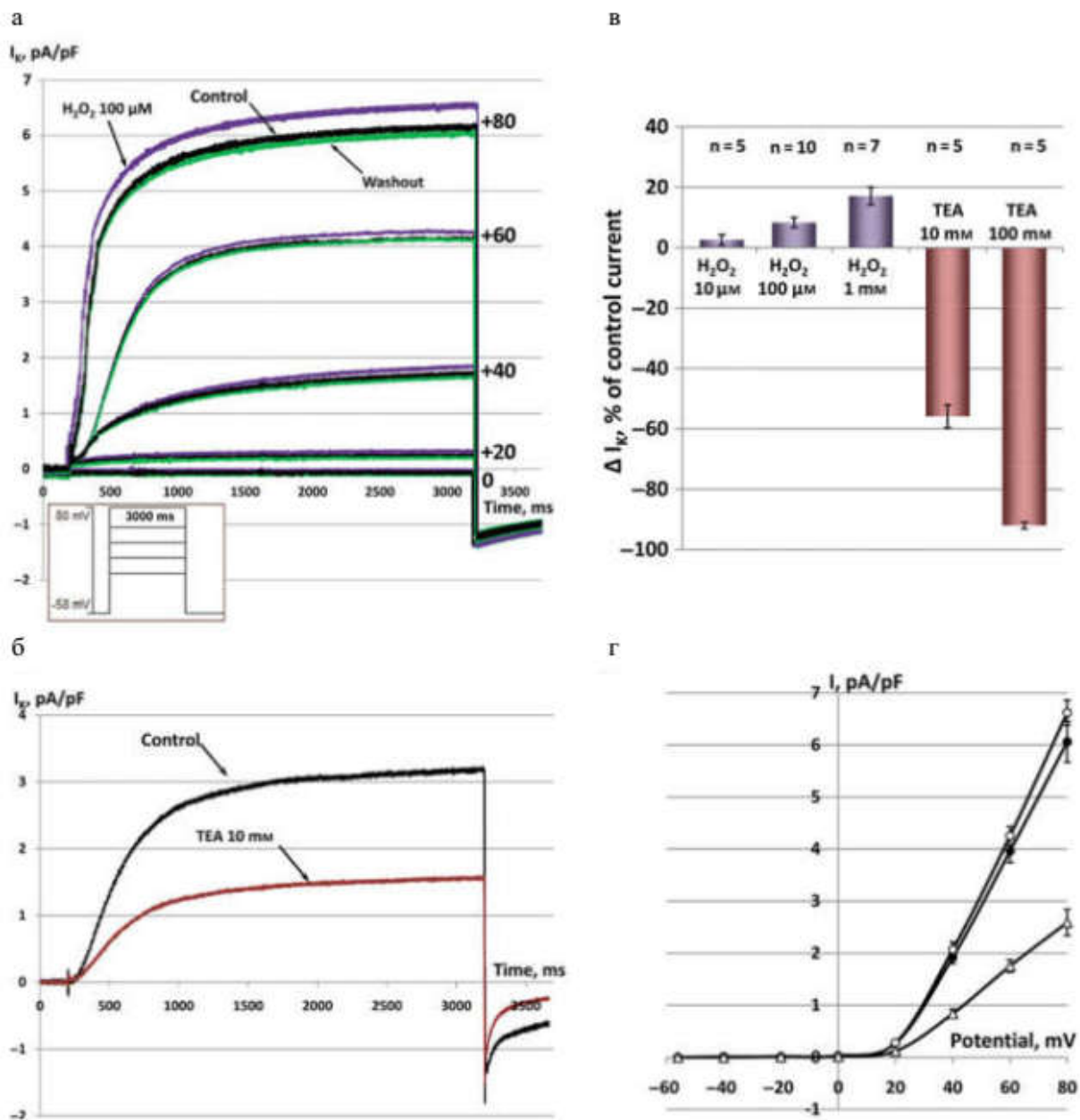
Нами была впервые показана возможность  $\text{H}_2\text{O}_2$ -активации выходящего  $\text{K}^+$  токов протопластах из пыльцы (рис.3). При концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  было зарегистрировано небольшое по величине (около 10% от контроля), но статистически значимое усиление выходящего  $\text{K}^+$  тока. Дальнейшее увеличение

концентрации  $H_2O_2$  до 1мМ усиливало эффект (сила тока возрастала примерно на 20% от контроля) (рис.3в).

Обнаруженная активация выходящего  $K^+$  тока под действием  $H_2O_2$  согласуется с тем, что в пыльцевых трубках мутанта *Arabidopsis* с потерей функции НАДФН-оксидаз (*rboh-1 rbohj-1*) происходит снижение интенсивности выходящего  $K^+$  тока (Lassig et al. 2014). Кроме того, в пыльцевых трубках *Arabidopsis* показано уменьшение как входящего, так и выходящего токов при ингибировании НАДФН-оксидаз DPI (100  $\mu$ M). Физиологическое значение активации выходящего  $K^+$  тока  $H_2O_2$  может заключаться в поднятии уровня метаболизма пыльцевого зерна во время прорастания. Также следует указать, что проницаемость мембраны для  $K^+$  играет в растительных клетках ключевую роль в определении мембранного потенциала (Опритов и др. 1991; Nobel 2009). Ранее была показана гиперполяризация плазматической мембраны вегетативной клетки при подготовке к прорастанию (Брейгина и др. 2009). Таким образом, существенную роль в постепенной гиперполяризации может играть  $H_2O_2$ -активируемый выходящий  $K^+$  ток.

#### Гиперполяризация субпротопластов, индуцированная $H_2O_2$

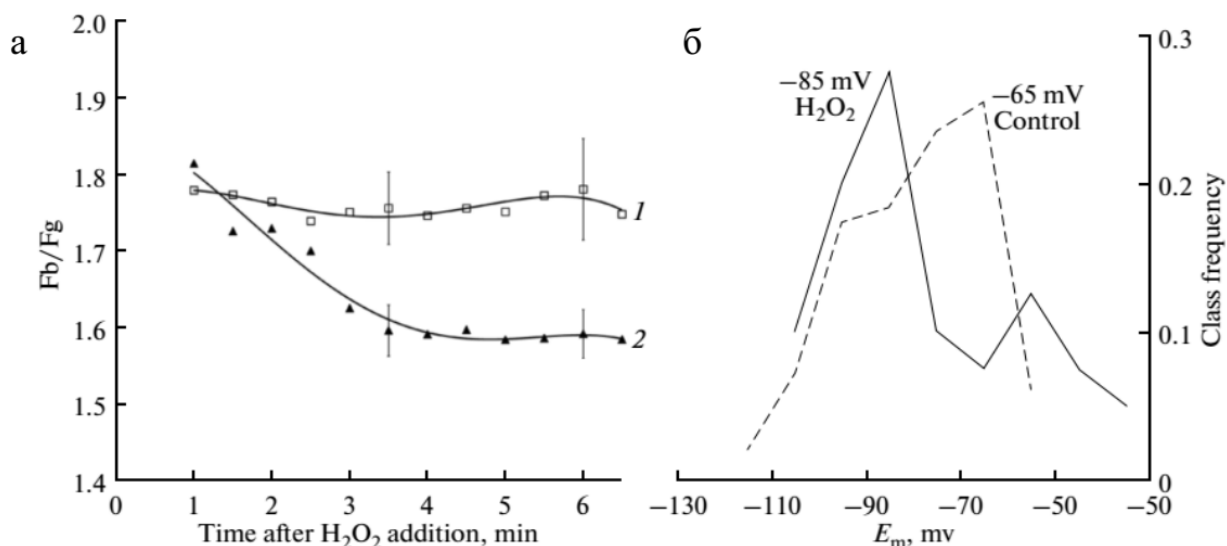
При регистрации динамики мембранного потенциала с помощью быстрого флуоресцентного красителя di-4-ANEPPS в подавляющем большинстве протопластов происходила гиперполяризация плазмалеммы (достоверные различия проявлялись в среднем через 3,5 минуты с момента добавления  $H_2O_2$ ) (рис.4а).



**Рисунок 3.** Выходящий  $K^+$  ток. (а) Оригинальные репрезентативные записи  $K^+$  тока в контрольных условиях (черные), при действии  $100 \mu M H_2O_2$  (фиолетовые) и после 5 минут отмывки от  $H_2O_2$  (зелёные). (б) Оригинальные записи  $K^+$  тока в контроле (черная кривая) и при добавлении  $10 mM TEA$ . (в) Максимальные изменения в плотности  $K^+$  тока, вызванные  $H_2O_2$  и  $TEA$ . (г) Средние вольтамперные кривые для выходящего  $K^+$  тока, записанные в контроле (●), с  $100 \mu M H_2O_2$  (○) и  $10 mM TEA$  (Δ).

Для определения абсолютных величин мембранного потенциала был использован медленный краситель DiBAC<sub>4</sub>(3). Распределение популяции субпротопластов по величине мембранного потенциала представлено на *рис.4б*. Обе гистограммы демонстрируют физиологическую гетерогенность популяции

клеток, однако, при воздействии  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  мода распределения смещается в более отрицательную область, что указывает на гиперполяризацию большей части протопластов.



**Рисунок 4.** Изменение мембранного потенциала субпротопластов табака при действии  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ ). (а) Динамика МП в контроле (1) и при действии  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2) по окрашиванию di-4-ANEPPS. Падение показателя  $F_g/F_b$  свидетельствует о гиперполяризации; (б) Распределение субпротопластов по значению  $E_m$  в контроле (штриховая линия) и к 10-й минуте после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  (сплошная линия) на основании окрашивания DiBAC<sub>4</sub>(3).

Таким образом, сдвиг потенциала в сторону более отрицательных значений был обнаружен двумя независимыми методами, что делает этот результат вполне убедительным. Средняя величина мембранного потенциала, полученная в наших опытах (-78 мВ), практически совпадает со значением потенциала в пыльцевых трубках табака (Брейгина и др., 2009). Влияние  $\text{H}_2\text{O}_2$  на мембранный потенциал в мужском гаметофите ранее не изучалось. Однако, эффекты АФК, подобные обнаруженному нами, были ранее описаны в клетках животных.

#### Латеральный градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели и его модуляция при сдвиге редокс-баланса

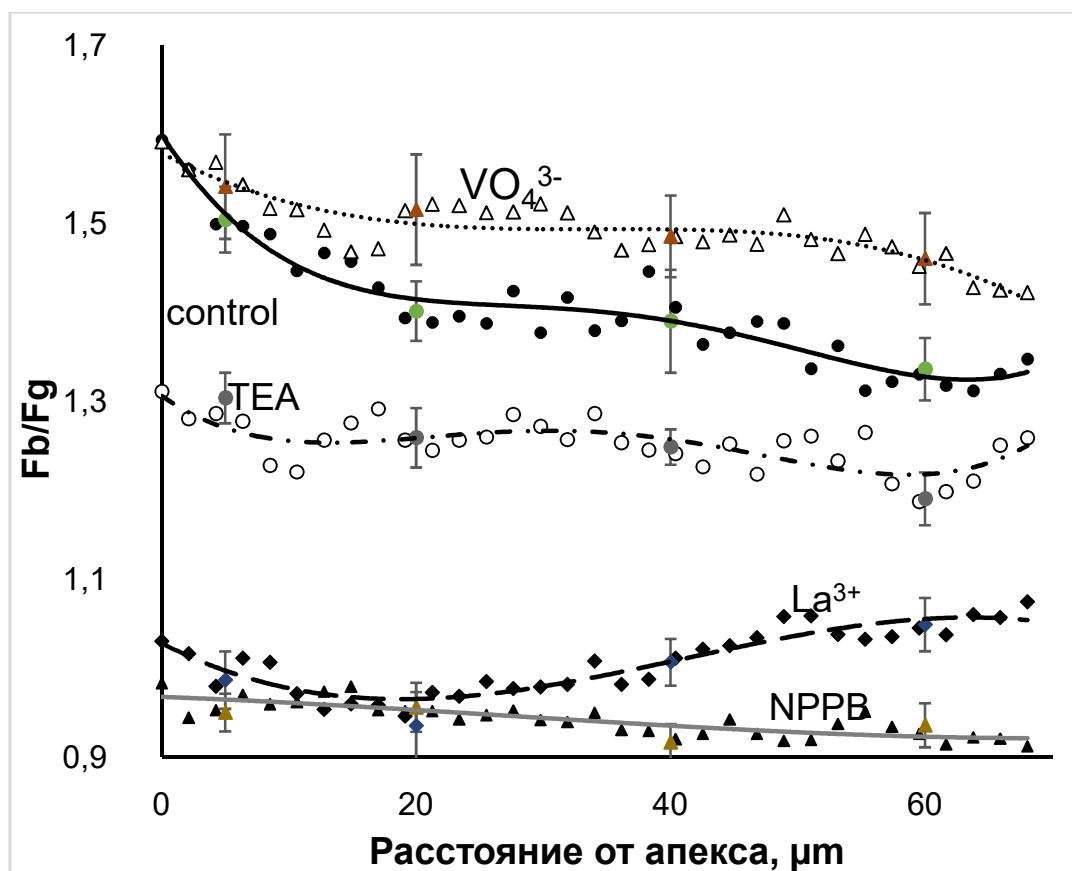
Сотрудниками нашей лаборатории в 2009 был впервые обнаружен латеральный градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках табака



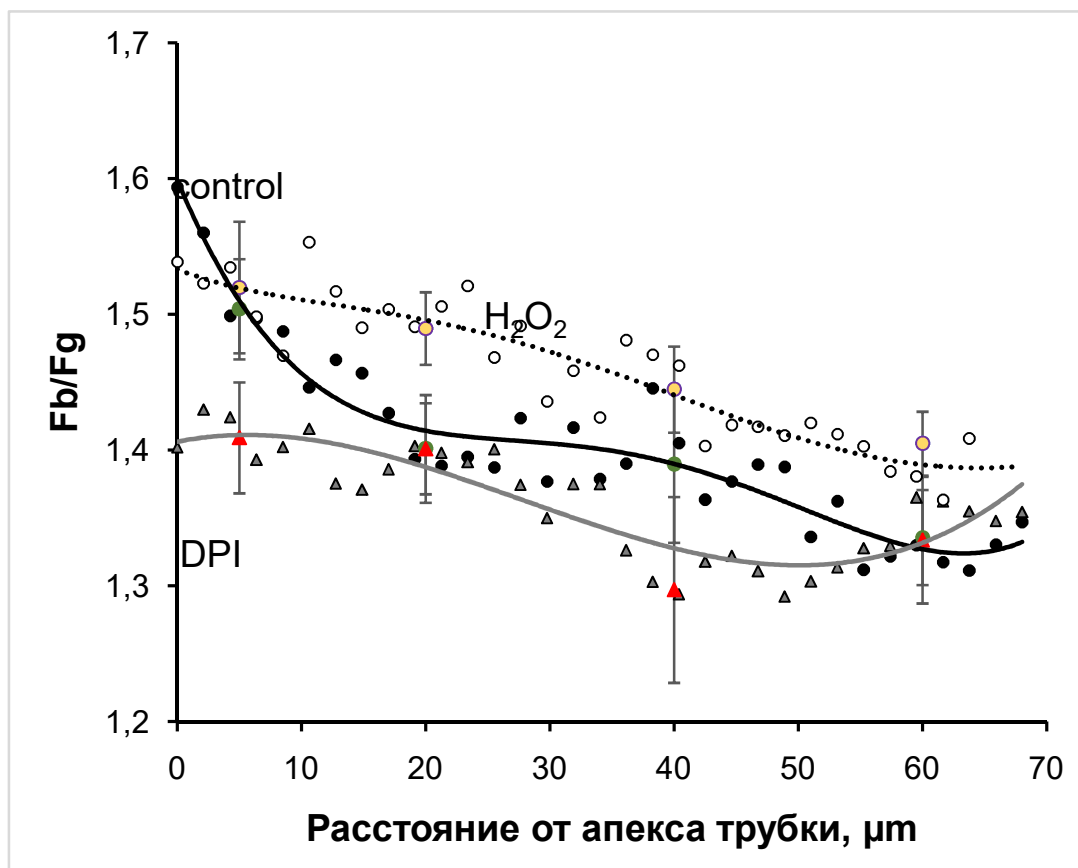
(Брейгина et al. 2009): кончик (субапикальный домен) трубки деполяризован относительно более дистальной части, что вполне согласовывалось с представлениями о неравномерном распределении ионных токов и каналов, а также  $H^+$ -АТФазы в плазмалемме растущей трубки (Holdaway-Clarke and Hepler 2003). Мы исследовали полярный рост на эволюционно более древнем объекте – пыльцевой трубке ели. Оказалось, что градиент присутствует, и он значительно менее резкий, чем у табака (*рис. 5*). Мы протестировали ряд общепринятых ингибиторов, которые ранее использовались в работах на пыльце. Все они в той или иной мере сдвигали уровень потенциала, причем практически все они снимали градиент (*рис. 5*). Ортованадат натрия вызывал деполяризацию в суапикальной части и дистальной зоне трубки (что вполне ожидаемо, если предположить, что в пыльцевых трубках голосеменных, как и цветковых растений,  $H^+$ -АТФаза локализована и работает как раз в этих зонах); ТЕА,  $LaCl_3$  и NPPВ, наоборот, вызывали гиперполяризацию. Это также укладывается в существующие представления: блокирование входных калиевых каналов и выходных анионных каналов сдвигает потенциал в сторону более отрицательных значений.

Обнаружив градиент, мы проверили, может ли он участвовать в передаче сигнала от экзогенных АФК и/или быть зависимым от уровня эндогенных АФК. Чтобы смоделировать экзогенные АФК, которые, возможно, содержатся в опылительной капле, использовали пероксид водорода (100  $\mu M$ ). Чтобы смоделировать изменение внутреннего баланса АФК, использовали ингибитор НАДФН-оксидазы (DPI). На *рис. 6* видно, что DPI вызывает диссипацию градиента за счёт гиперполяризации в апикальной зоне. Это вполне согласуется с предположением о том, что производство АФК с помощью этого фермента максимально в апикальной зоне пыльцевой трубки, которое неоднократно высказывалось в литературе (Wudick and Feijo 2014). Добавление  $H_2O_2$  не влияло на мембранный потенциал в апикальной области трубки, а, напротив, вызывало деполяризацию в дистальной области. Вопрос о посредниках данного

эффекта в настоящий момент трудно обсуждать, т.к. мишени для АФК у голосеменных ещё совершенно не изучены.



**Рисунок 5.** Распределение мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели, определенное путём оптического картирования с Di-4-ANEPPS. Величина мембранного потенциала пропорциональна отношению интенсивностей флуоресценции красителя (Fb/Fg). Градиент присутствует в контрольных трубках: в апикальной зоне (5 мкм от кончика) мембрана достоверно деполаризована относительно остальных частей трубки (20, 40 и 60 мкм от кончика,  $P < 0.01$ ). 100 мкМ  $Na_3VO_4$  вызывает деполаризацию в суапикальной части и дистальной зоне трубки (20 мкм, 60 мкм от кончика,  $P < 0.05$ ) и диссипацию градиента; 10 мМ TEA, 100 мкМ  $LaCl_3$  и 0.4 мМ NPPB вызывают гиперполяризацию по всей длине трубки и диссипацию градиента ( $P < 0.01$ ).

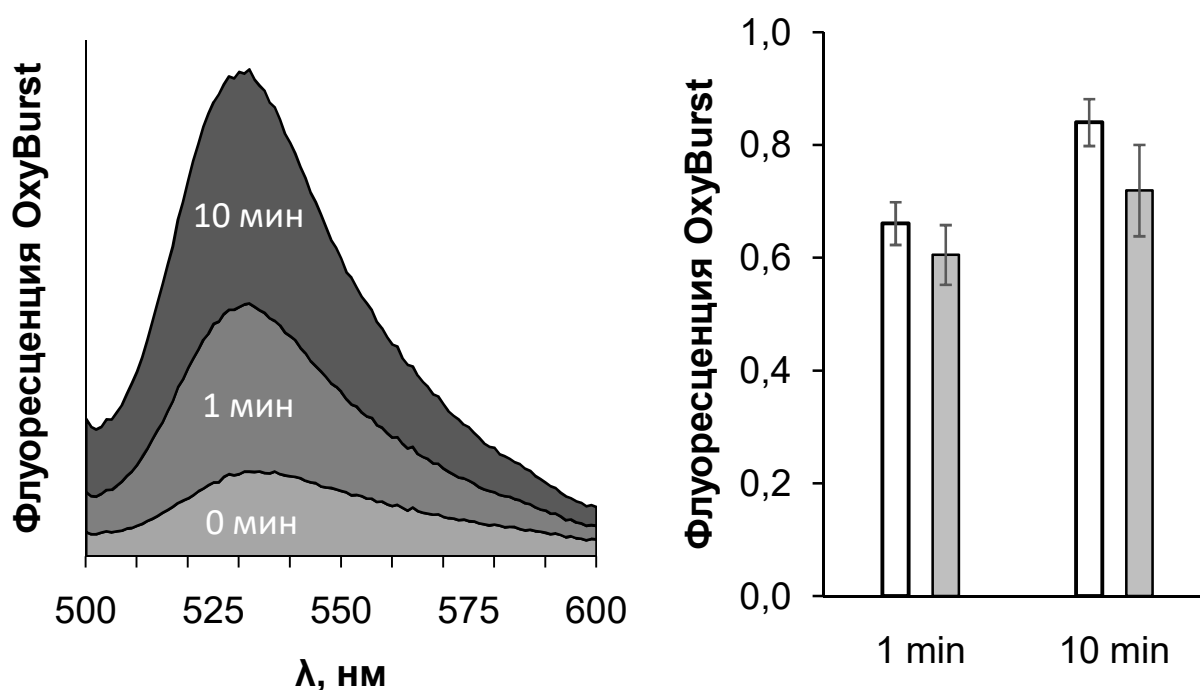


**Рисунок 6.** Действие  $H_2O_2$  и DPI на распределение мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели (оптическое картирование с Di-4-ANEPPS). 100  $\mu M$  DPI вызывает гиперполяризацию в апикальной части трубки (5  $\mu m$  от кончика,  $P < 0.05$ ),  $H_2O_2$  вызывает деполяризацию в субапикальной части трубки (20  $\mu m$  от кончика,  $P < 0.05$ ).

#### Выделение АФК во внеклеточную среду пылью ели

Основной массив работ по изучению полярного роста относится к исследованию пыльцевых трубок и корневых волосков покрытосеменных растений. Однако в нашей работе мы также использовали эволюционно более древний объект с полярным ростом, который характеризуется рядом особенностей, в том числе, низкой скоростью роста. Фундаментальный интерес представляли особенности АФК-регуляции данного типа полярного роста. Мы исследовали распределение внутриклеточных АФК в пыльцевой трубке ели, выделение АФК в окружающую среду и значение различных АФК для прорастания. Редокс-регуляция мембранного потенциала была рассмотрена выше. Мы использовали непроникающий в клетки краситель OxyBurst, чтобы регистрировать уровень внеклеточных АФК в среде прорастания. Оказалось,

что в среде, кондиционированной пыльцевыми зёрнами в течение 1 минуты, уже содержатся заметные количества АФК по сравнению с чистой средой (*рис. 7а*). Количество АФК продолжило увеличиваться в течение последующей инкубации пыльцы в контрольной суспензии (*рис. 7*). Для определения возможного источника внеклеточных АФК использовался ингибитор НАДФН-оксидазы DPI. 0.1 мМ DPI не оказывал влияния на количество АФК в среде после 1 минуты инкубации, однако он блокировал дальнейшее повышение уровня АФК. Таким образом, АФК, выделяемые из пыльцевых зёрен в первую минуту инкубации, не связаны с активностью НАДФН-оксидазы и, судя по всему, вымываются из цитоплазмы или стенки пыльцы в процессе гидратации. Дальнейшее выделение АФК, по всей видимости, в основном обеспечивается НАДФН-оксидазой.



**Рисунок 7.** Внеклеточные АФК, выделяемые пыльцой на ранней стадии прорастания. (а) репрезентативная запись спектра флуоресценции АФК-сенсора ОхуВурст до (0 мин) и после 1 и 10 минут инкубации пыльцы. (б) эффект DPI на выделение АФК. В контрольной суспензии (белые столбики) флуоресценция существенно выросла в интервале от 1 до 10 минут ( $P < 0.01$ ), а в суспензии с DPI (серые столбики) статистически значимого возрастания не наблюдалось.

Ранее в нашей лаборатории был обнаружен выход АФК из пыльцевых зёрен табака, который также подавлялся DPI (Smirnova et al. 2009). Позднее был

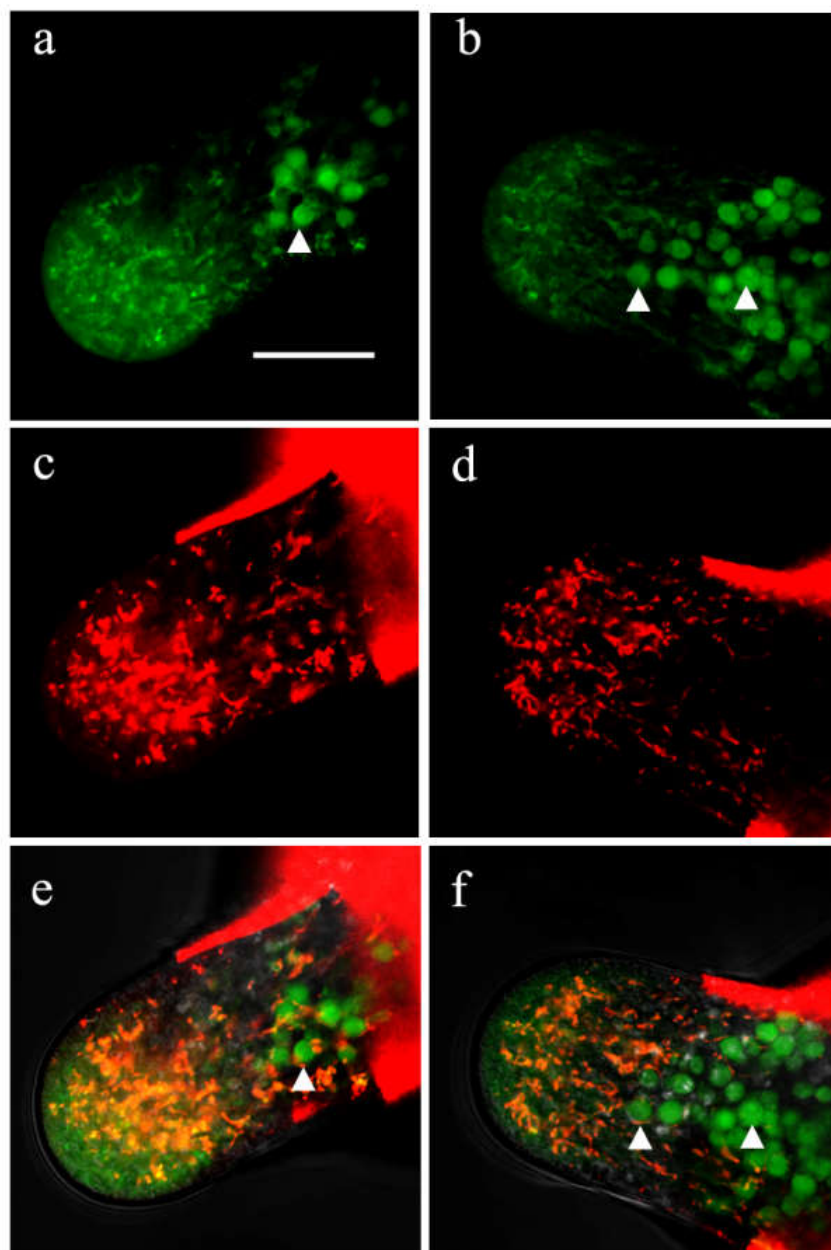
обнаружен выход  $H_2O_2$  в среду инкубации из пыльцевых зёрен киви (Speranza et al. 2011). Мы можем заключить, что активация НАДФН-оксидазы, приводящая к массивной продукции АФК на ранней стадии прорастания пыльцы, характерна как для цветковых, так и для голосеменных растений.

### Картирование внутриклеточных АФК в пыльце ели

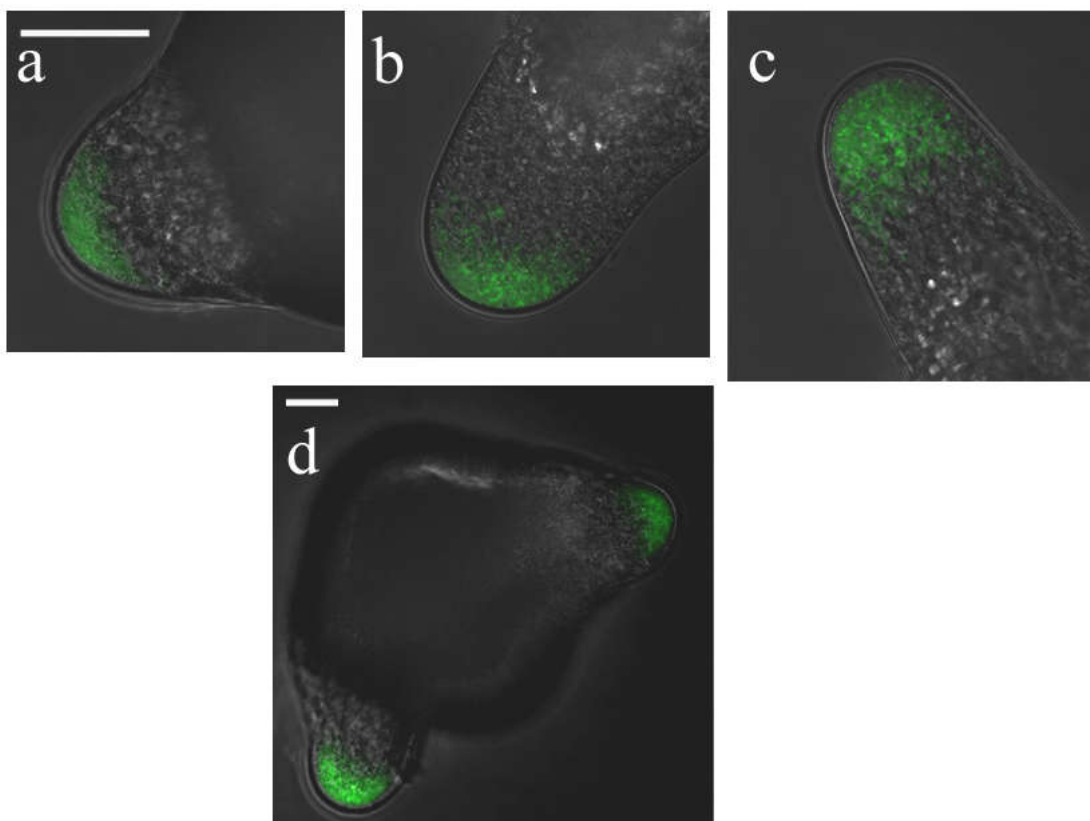
Субклеточную локализацию АФК мы изучали методом конфокальной микроскопии с помощью двух красителей: высокоспецифичный PFBSF использовали для визуализации  $H_2O_2$  (Maeda et al. 2004), а MitoSOX для супероксид-радикала, локализованного в митохондриях (Robinson et al. 2008). Митохондрии, продуцирующие  $O_2^{\cdot-}$  (красный краситель), были локализованы вдоль всей трубки, за исключением апикального домена и зоны, занятой амилопластами (*рис.8*). Мы обнаружили, что в пыльцевых трубках  $H_2O_2$  (зелёный краситель) частично колокализуется с  $O_2^{\cdot-}$ , что указывает на митохондрии как один из важных источников цитоплазматических АФК (*рис.8*). Но мы можем видеть  $H_2O_2$  и снаружи митохондрий, в том числе, в высокой концентрации в апексе трубки. Амилопласты также содержат значимые количества  $H_2O_2$ .

Мы также окрашивали зёрна PFBSF, чтобы выяснить, происходит ли накопление  $H_2O_2$  в апикальной зоне на этапе запуска полярного роста, или оно проявляется на более поздней стадии. Оказалось, что в инициалах пыльцевых трубок и очень коротких трубках накопление красителя в апикальной зоне прекрасно видно, что указывает на ранне становление градиента  $H_2O_2$  (*рис.9*). В случаях биполярного прорастания (которое типично для ели и происходит примерно в 25% пыльцевых зёрен), накопление можно видеть в обеих инициалах.

Локализация  $H_2O_2$  в апексе пыльцевых трубок, а  $O_2^{\cdot-}$  митохондриального происхождения в субапикальной части хорошо согласуется с ранее показанным суммарным накоплением АФК в трубках ели Мейера (Liu et al. 2009), однако, проясняет и уточняет эти данные, показывая, что разные активные формы распределены по-разному.



**Рисунок 8.** Локализация  $\text{H}_2\text{O}_2$  и митохондриального  $\text{O}_2^-$  в пыльцевых трубках ели. Две случайно выбранные пыльцевые трубки после 18 часов инкубации, окрашенные PFBSF (a, b) и MitoSOX (c, d). *e, f* представляют собой наложение двух каналов. Митохондрии, производящие  $\text{O}_2^-$ , накапливаются в субапикальной части,  $\text{H}_2\text{O}_2$  частично колокализуется с митохондриями, но значительный уровень также виден в апикальном домене и в амилопластах (крупные органеллы, маркированные стрелочками). Масштабная линейка – 20  $\mu\text{m}$ .



**Рисунок 9.** Локализация  $H_2O_2$  в инициалах и коротких пыльцевых трубках ели. Инициали пыльцевых трубок в процессе униполярного (а) и биполярного (d) прорастания (13 часов инкубации), окрашенные PFBSF. Аналогичное распределение пероксида в двух случайно выбранных пыльцевых трубках (15 часов инкубации) (b, c). Масштабная линейка – 20  $\mu m$ .

Ранее по поводу пыльцевых трубок покрытосеменных высказывались различные предположения: накопление АФК в апексе (Potocký et al. 2012) или их колокализация с митохондриями в субапикальной зоне (Cárdenas et al. 2006). Полученные этими авторами данные противоречили друг другу. В настоящей работе мы показали, что, по крайней мере, для ели обе точки зрения верны, однако речь идет о разных АФК: колокализация  $H_2O_2$  и  $O_2^{\cdot -}$  в митохондриях указывают на то, что эти органеллы являются источником АФК в процессе роста трубки, как и НАДФН-оксидаза плазмалеммы.

#### Значение АФК для прорастания пыльцевых зёрен ели

Чтобы проверить, являются ли эндогенные АФК необходимыми для прорастания пыльцевого зерна ели, мы использовали различные вещества, сдвигающие баланс образования/ликвидации АФК: супероксиддисмутазу (СОД),

убирающую  $O_2^{\cdot-}$ , Mn-TMPP, разлагающий как  $O_2^{\cdot-}$ , так и  $H_2O_2$ , POBN/EtOH, избирательный тушитель  $\bullet OH$ . Антиоксиданты присутствовали в среде на протяжении всего периода инкубации. Были обнаружены различные эффекты, представленные на *рис. 10*. СОД (100 units/ml) снижала процент прорастания, а аскорбиновая кислота (0.1 или 1 mM) и POBN-EtOH не оказывали влияния на этот показатель. Прорастание ингибировалось Mn-TMPP, причем наблюдалась четкая концентрационная зависимость. Мы можем заключить, что  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  являются наиболее значимыми АФК для прорастания пыльцы *Picea pungens*: СОД дисмутирует внеклеточный  $O_2^{\cdot-}$ , но не снижает концентрации  $H_2O_2$ , при этом прорастание поддерживается на невысоком уровне. В отсутствие обеих АФК (высокие концентрации Mn-TMPP), прорастание полностью подавляется.  $\bullet OH$ , по-видимому, не является необходимым для прорастания.

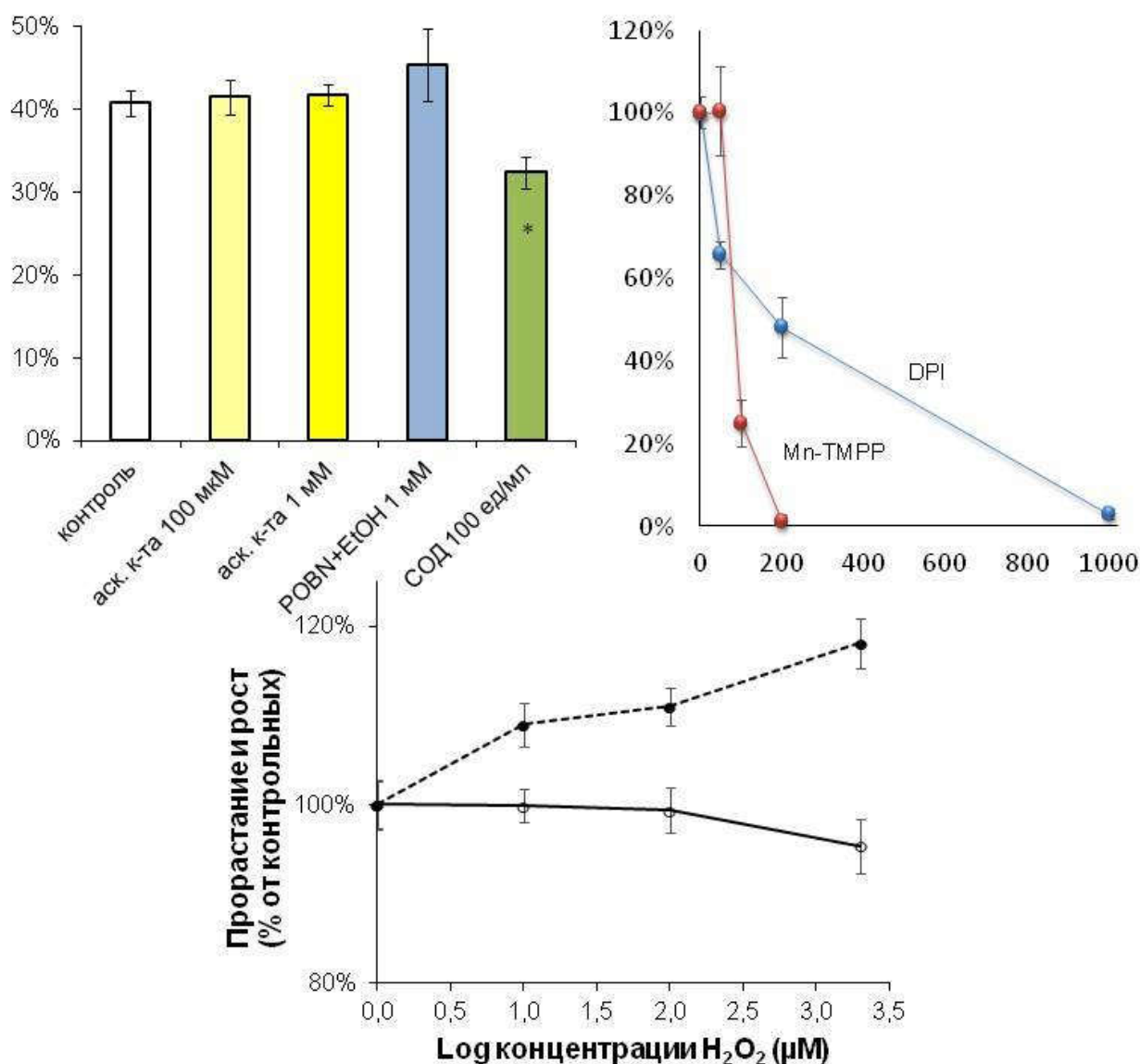
Важность АФК, продуцируемых НАДФН-оксидазой, для прорастания пыльцы ели была продемонстрирована в опытах с DPI. Все концентрации ингибитора, кроме самой низкой (0.05 mM) сильно подавляли прорастание (*рис. 10*). Этот факт хорошо согласуется с выявленным эффектом Mn-TMPP на прорастание и с действием DPI на продукцию экстраклеточных АФК.

Поскольку некоторые из тестированных веществ снижали процент прорастания, но ни одно из них не оказывало положительного воздействия, мы предположили, что прорастание может стимулироваться экзогенными АФК. Мы протестировали несколько концентраций  $H_2O_2$ , но ни одна из них, включая низкую (0.1 mM) и высокую (2 mM) не оказывала какого-либо действия на эффективность прорастания (*рис. 10*). Однако все исследованные концентрации  $H_2O_2$  стимулировали рост пыльцевых трубок. В пробах с высокой концентрацией  $H_2O_2$  трубки были на 20% длиннее, чем в контроле.

В отличие от ели, на табаке эффекты практически всех веществ, сдвигающих баланс образования/ликвидации АФК, на прорастание были разнонаправленными в зависимости от концентрации. Так, у табака низкие концентрации антиоксидантов, включая аскорбиновую кислоту, Mn-TMPP и



СОД, стимулировали прорастание пыльцы. У ели стимуляция не обнаруживалась.



**Рисунок 10.** Эффекты антиоксидантов, DPI и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на прорастание пыльцевых зёрен ели. (а) эффективность прорастания после 13 часов инкубации. Аскорбиновая кислота и РОВN не оказывают эффекта, СОД достоверно (P < 0.01), но не сильно снижает эффективность прорастания. (б) эффективность прорастания в суспензиях с DPI и MnTMPP (нормализовано к контролю). Оба вещества блокируют прорастание, наблюдается концентрационная зависимость. (в) экзогенный H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не оказывает эффекта на прорастание (сплошная линия), но стимулирует рост пыльцевых трубок (пунктирная линия, P < 0.01).

Простейшее объяснение заключается в том, что уровень эндогенных АФК в пыльце покрытосеменных значительно выше, чем у голосеменных. Можно

предположить, что женские ткани у покрытосеменных активно участвуют в поддержании АФК-баланса пыльцы, продуцируя АФК и/или антиоксиданты на разных этапах прогамной фазы оплодотворения. Поэтому когда пыльца таких растения культивируется *in vitro*, уровень эндогенных АФК может быть избыточным по отношению к оптимальному. У голосеменных, напротив, скорее всего, баланс эндогенных АФК до стадии полярного роста поддерживается самим гаметофитом, и поэтому их уровень в суспензии *in vitro* является необходимым для оптимального прорастания.

Отсутствие эффекта  $H_2O_2$  в широком диапазоне концентраций также послужило важным отличием пыльцы ели от табака (Smirnova et al. 2013). Отсутствие влияний  $H_2O_2$  поддерживает гипотезу об относительной независимости пыльцы голосеменных от экзогенных АФК на стадии активации и запуска полярного роста. Следующая стадия развития, растущая пыльцевая трубка, напротив, продемонстрировала чувствительность к  $H_2O_2$ , что сближает ее с табаком и указывает на древнее происхождение данной регуляторной связи и ее универсальность среди семенных растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляторный модуль «АФК-ионный транспорт» успешно функционирует в клетках и тканях в ключевые моменты онтогенеза растений, обеспечивая тонкий и многоплановый контроль клеточной физиологии и морфогенеза. Важная роль этого модуля проявляется как при восприятии сигналов внешней среды (в частности, его компоненты сами могут быть сигналом), так и в процессах, для которых характерна относительная автономность и самоорганизация.

Мужской гаметофит демонстрирует в этом смысле двоякую природу. В системе *in vitro* мы можем наблюдать самоорганизацию, т.е. полярный рост, контролируемый внутренними системами. Мы хотели показать, что такая самоорганизация для представителя голосеменных растений – голубой ели – включает в себя модуль «АФК-ионный транспорт», т.е. что эндогенные АФК

важны для запуска полярного роста и поддержания ионного гомеостаза в гаплоидном организме. С применением целого ряда подходов нам это удалось: было показано, что АФК синтезируются пыльцой, что они необходимы для ее прорастания, что они поддерживают показатель нормального ионного статуса растущей клетки – градиент мембранного потенциала. Кроме того, мы выяснили, какие именно АФК находятся в кончике клетки и где они накапливаются.

С другой стороны, мужской гаметофит для выполнения своих основных функций (доставка гамет и оплодотворение) должен обладать способностью чутко реагировать на внешние сигналы, в первую очередь, те, которые продуцирует спорофит и женский гаметофит после его гидратации. На данный момент было установлено, что этот сигнал в значительной мере является редокс-сигналом. Используя в качестве объектов растения из разных групп, мы показали, что на плазмалемме вегетативной клетки находятся чувствительные сенсоры редокс-статуса – ионные каналы, которые активируются в ответ на пероксид водорода, изменяя как внутриклеточный гомеостаз, так и свойства самой мембраны (в частности, ее потенциал). Таким образом, мы показали, насколько важен регуляторный модуль «АФК-ионный транспорт» в жизни мужского гаметофита, и как он работает.

## **ВЫВОДЫ**

1. В комплексном исследовании, с применением методов пэтч-кламп и флуоресцентной микроскопии, было показано, что  $H_2O_2$  в протопластах вегетативных клеток пыльцевого зерна у исследованных покрытосеменных растений активирует  $Ca^{2+}$  токи и вызывает увеличение  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ . Ингибирование входа  $Ca^{2+}$  блокирует регенерацию клеточной оболочки. Таким образом, одной из ключевых мишеней для  $H_2O_2$  в пыльце покрытосеменных растений являются кальций-проводящие каналы.
2. С применением метода пэтч-кламп показано, что  $H_2O_2$  активирует выходящий  $K^+$  ток из протопластов пыльцевых зёрен. Таким образом,

калиевые каналы также являются мишенями для  $H_2O_2$  на плазмалемме вегетативной клетки.

3. С применением количественной флуоресцентной микроскопии обнаружен латеральный градиент мембранного потенциала в пыльцевых трубках ели, в регуляции которого участвуют, по данным ингибиторного анализа, все протестированные ион-транспортные системы.  $H_2O_2$  воздействует на мембранный потенциал в субпротопластах из пыльцевых трубок табака, а также в интактных пыльцевых трубках ели. Таким образом, мембранный потенциал, являясь комплексным показателем ионного гомеостаза, проявляет чувствительность к экзогенному  $H_2O_2$  в мужском гаметофите как табака, так и ели.
4. Обнаружены мишени для двух тяжелых металлов на мембране протопластов:  $Cu^{2+}$ , способствуя образованию АФК в протопластах, активирует  $H^+$ -АТФазу плазмалеммы, а  $Ni^{2+}$ , не влияя на редокс-статус пыльцевых зёрен, блокирует ток  $K^+$ .
5. Пыльцевые зёрна ели генерируют экстраклеточные АФК на раннем этапе прорастания, при активном участии НАДФН-оксидазы.
6. С применением конфокальной микроскопии показано распределение  $O_2^{\cdot -}$  и  $H_2O_2$  в растущей пыльцевой трубке ели: обнаружено два ключевые места скопления АФК: митохондрии, где присутствуют обе формы, амилопласты и апикальное скопление  $H_2O_2$ , которое присутствует как в трубках, так и в инициалах трубок на начальном этапе прорастания.
7. С использованием ряда антиоксидантов (тушителей) и ингибиторного анализа продемонстрирована необходимость эндогенных АФК, а именно,  $O_2^{\cdot -}$  продуцируемого НАДФН-оксидазой, и  $H_2O_2$  для эффективного прорастания пыльцевых зёрен ели.

### Публикации по теме диссертации:

Статьи в журналах, индексируемых в базах данных *Web of Science* и *Scopus*

1. Breygina M. A., Abramochkin D. V., **Maksimov N. M.**, Yermakov I. P. 2016 Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts, *Plant Biology*, 18(5): 761 – 767. <https://doi.org/10.1111/plb.12470> (IF = 2.156)
2. Breygina M., Abramochkin D. V., **Maksimov N.**, Yermakov I. 2017 Effects of Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> currents in lily pollen protoplasts, *Functional Plant Biology*, 44: 171-177. <https://doi.org/10.1071/FP17033> (IF = 2.327)
3. **Maksimov N.**, Evmenyeva A., Breygina M., Yermakov I. 2018 The role of ROS in pollen germination in *Picea pungens* (blue spruce), *Plant Reproduction*, 31(4):357–365. <https://doi.org/10.1007/s00497-018-0335-4> (IF = 2.976)
4. Breygina M. A., **Maksimov N. M.**, Polevova S. V., Evmenyeva A. A. 2019 Bipolar pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*), *Protoplasma*. 256 (4): 941 – 949. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-01333-3> (IF = 2.633)

Статья в журнале, индексируемом в базе данных *Scopus*

5. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А., Ермаков И. П. 2015 Регуляция ионного транспорта на плазмалемме пыльцевых трубок пероксидом водорода, *Цитология*, 57(10), 720-726. **Maksimov N. M.**, Breygina M. A., Yermakov I. P. 2016 Regulation of ion transport across the pollen tube plasmalemma by hydrogen peroxide, *Cell and Tissue Biology*, 10: 69-75. <https://doi.org/10.1134/S1990519X16010077>

### Тезисы конференций:

6. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А. Действие экзогенного пероксида водорода на субпротопласты из пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum* L. // Тезисы докладов XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014». Секция «Биология». Подсекция «Физиология растений», стр. 305.
7. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А., Ермаков И. П. Мембранные эффекты пероксида водорода в субпротопластах из пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum* L. // Международная научная конференция и школа молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий»: материалы в 2-х ч. / под ред. Е.С. Роньжиной. – Калининград: Аксиос, 2014. – ч. I, стр. 81-83.
8. Breygina M. A., **Maksimov N. M.**, Yermakov I. P. The effects of hydrogen peroxide on *Nicotiana tabacum* L. pollen tube protoplasts XXIII International Congress on Sexual Plant Reproduction, Porto, Portugal.
9. **Максимов Н. М.** Регуляция ионных токов в протопластах из пыльцевых зерен *Lilium longiflorum* Thumb. пероксидом водорода // Тезисы докладов XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015». Секция «Биология». Подсекция «Физиология растений», 2015 г., стр. 344.
10. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А., Ермаков И. П. Редокс-регуляция трансмембранного ионного транспорта в мужском гаметофите // Растения в

условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых. Россия, Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015 г., стр. 327.

11. **Максимов Н. М.** Редокс-регуляция прогамной фазы оплодотворения // V Международная Школа для молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», посвященная памяти члена-корреспондента РАН, профессора Татьяны Борисовны Батыгиной. Россия, Санкт-Петербург, 9-14 октября 2016 г., стр. 205.

12. **Максимов Н. М.**, Абрамочкин Д. В., Брейгина М. А. Участие АФК в регуляции прорастания пыльцевого зерна голосеменных и покрытосеменных растений // II Международный симпозиум молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений. Россия, Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.

13. **Максимов Н. М.**, Брейгина М. А. Редокс-регуляция ионного транспорта в растущей пыльцевой трубке // Тезисы докладов XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». Беларусь, Минск, 23 - 27 сентября 2018 г.

14. **Максимов Н. М.**, Евменьева А. А., Брейгина М. А., Ермаков И. П. Роль активных форм кислорода в прорастании пыльцевых зёрен ели (*Picea pungens*) // X Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего». Россия, Казань, 19 – 24 сентября 2019 г.