

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию Максимова Никиты Михайловича,  
представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук,  
на тему «Регуляторная роль активных форм кислорода в прорастании  
мужского гаметофита семенных растений»  
по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений**

**Актуальность избранной темы.** В диссертационной работе Н.М. Максимова поставлена задача выявить регуляторную роль активных форм кислорода (АФК) в процессе прорастания мужского гаметофита, и эта задача решается на примере пыльцы трех модельных растений – лилии (*Lilium longiflorum*), табака (*Nicotiana tabacum*), ели (*Picea pungens*). О том, что АФК могут выполнять сигнальные и регуляторные функции в растительной клетке, уже достаточно хорошо установлено. Было также показано, что всплески продукции АФК происходят на нескольких этапах репродукционного процесса у цветковых растений, однако оставалось невыясненным, какие же механизмы обеспечивают ответ на АФК в растущем мужском гаметофите. Последнее и обуславливает актуальность предложенного соискателем исследования.

Работа объемом 168 с. построена по традиционному плану, иллюстрирована 22-мя рисунками и одной таблицей. Следует отметить прекрасно написанный обзор литературы. Обзор литературы обширен и содержит все необходимые сведения для понимания дальнейшего изложения. Список цитированных статей включает 269 работ на русском и английском языках (большая часть – на английском языке), причем почти все цитированные работы современные, опубликованы в последние годы. Обзор литературы показывает, что диссертант хорошо ориентируется в изучаемых вопросах. В обзоре описаны современные представления об общих закономерностях прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки,

регуляции этих процессов, особое внимание уделяется описанию ионной регуляции. Диссертант приводит имеющиеся сведения о роли в прорастании пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ , калия и калиевых каналов, активных форм кислорода, т.п. Обзор представляет собой самостоятельную ценность, так как хорошо отражает состояние рассматриваемого в работе вопроса в мировой науке и является базой для постановки цели и задач данного исследования. Обзор хорошо написан и читается с большим интересом.

В разделе «Материалы и методы» очень детально описаны применяемые автором методы исследования, которые не оставляют сомнений в качестве полученного экспериментального материала. В работе применяются высокотехнологичные современные методы исследования пыльцы: флуоресцентная микроскопия (в т.ч., конфокальная), пэтч-кламп. Разнообразны используемые автором методические подходы с применением большого набора различных флуоресцентных оптических зондов (определение цитоплазматического рН протопластов, определение мембранного потенциала, определение цитоплазматических концентраций  $\text{Ca}^{2+}$ , АФК, проч.) Применяемые в работе методы и подходы выбраны корректно и позволяют считать, что главные положения и выводы работы имеют надежную фактическую основу. Следует особенно отметить использованный в работе пэтч-кламп метод, применяемый автором для исследования токов через ионные каналы протопластов пыльцевых зерен.

Работа хорошо спланирована, что позволило четко решить задачи, которые поставлены для достижения общей цели. Изложение полученных в работе результатов сопровождается хорошим иллюстративным материалом.

### **Научная новизна работы.**

В результате выполнения работы получены принципиально новые данные. К главным достижениям соискателя следует отнести то, что впервые (на примере двух модельных объектов – протопластах из пыльцевых зерен лилии

и субпротопластах из пыльцевой трубки табака) показана  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированная активация входящего  $\text{Ca}^{2+}$ -тока (иона, выполняющего сигнальные функции в растительной клетке), а также увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме, продемонстрирована  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированная гиперполяризация субпротопластов из пыльцевых трубок табака, картирован градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке ели, продемонстрирован выход АФК из пыльцевых зерен ели, и проч. Полученные соискателем результаты открывают, в том числе, неизученную область – редокс-регуляцию прогамной фазы у хвойных растений и вносят существенный вклад в изучение цитофизиологических особенностей роста мужского гаметофита у хвойных. В качестве сенсоров редокс-сигналов на плазматической мембране растущего мужского гаметофита авторы предложили ионные каналы ( $\text{K}^+$ -каналы,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы).

**Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.** Грамотная постановка экспериментов, использование в работе комплекса высокотехнологичных методов исследования, отвечающих современному научно-техническому уровню, всесторонний анализ полученных данных обуславливают обоснованность и достоверность научных положений и выводов. Обоснованность и достоверность выводов диссертационной работы подтверждается также тем фактом, что результаты работы опубликованы в престижных международных журналах с высоким рейтингом.

На основании анализа полученных экспериментальных данных и сопоставления их с имеющимися в литературе публикациями автором сформулированы выводы, которые подводят итоги данной работы. Выводы обоснованы и соответствуют полученным автором диссертации экспериментальным данным.

**Автореферат диссертации** соответствует всем требованиям и в полной мере отражает ее содержание.

### **Вопросы и замечания.**

Диссертационная работа Н.М.Максимова производит хорошее впечатление и заслуживает высокой оценки. Необходимо, однако, сделать ряд замечаний.

1. Список используемых сокращений написан то на русском языке, то на английском. По-видимому, оптимальным было бы привести расшифровку сокращений на русском языке, и в скобках – на английском.
2. Раздел «Материалы и методы» содержит большие фрагменты текста (например «Протопласты как модельная система» или описание принципов метода «пэтч кламп»), которые являются, фактически, обзором литературы, и лучше было бы поместить их в соответствующий раздел.
3. Одним из объектов исследования была пыльца ели, однако нигде не описано, в каких средах осуществляли манипуляции с этим объектом, как и в каких условиях получали пыльцевые трубки из пыльцы ели.
4. На Рис. 1 (с. 79) отсутствует обозначение осей.
5. Почему в опытах по исследованию влияния пероксида водорода на мембранный потенциал субпротопластов табака использовали 10 мкМ  $H_2O_2$  - концентрацию, которая очень мало влияет на ток  $K^+$  (Рис. 13в диссертации). Ведь более существенно на этот ток влияет пероксид водорода, взятый в более высоких концентрациях (100 мкМ или 1мМ  $H_2O_2$ ) (там же).
6. В опытах по исследованию влияния пероксида водорода на ток  $K^+$  через мембрану протопластов пыльцевых зерен показано, что стимулирующий эффект пероксида обратим (Рис. 13а диссертации). В связи с этим, каков

может быть механизм действия пероксида водорода на калиевые каналы как мишени?

7. На Рис. 17в (с. 123) и в подписи к этому рисунку указаны разные концентрации  $Ni^{2+}$  (соответственно, 10мМ и 1 мМ). Чему верить? На этом же Рис. отсутствует панель «г», на которую есть ссылка в подписи к Рис. 17
8. Дискуссионным представляется вопрос о том, что протонный ток, измеряемый в экспериментах, описанных на с. 126 -128 диссертации, обеспечен проводимостью  $H^+$ -АТФазы.  $H^+$ -АТФаза плазматической мембраны растительной клетки по своей природе не является просто каналом, и для того, чтобы осуществлять перенос протона через мембрану, этому ферменту необходимо претерпевать конформационные изменения, которые требуют наличия АТФ и ионов  $Mg^{2+}$ . Даже если наблюдаемый диссертантом в экспериментах ток протонов и был обусловлен наличием АТФазного белка, то это был ток в не физиологичных условиях (неопределенная конформация АТФазного белка), и поэтому сложно говорить о значимости наблюдаемых эффектов. Для подтверждения того, что наблюдаемый ток обусловлен движением протонов через АТФазу, был использован специфический ингибитор АТФаз Р-типа ортованадат. В связи с этим, следует отметить, что применяемые в описанных экспериментах концентрации ортованадата чрезвычайно высоки (мМ диапазон), тогда как  $H^+$ -АТФаза плазматической мембраны ингибируется обычно существенно более низкими концентрациями этого ингибитора (50 – 100 мкМ).
9. В Табл. 1 (с. 130) в первом столбце следовало бы привести названия измеряемых величин, а не обозначения применяемых зондов (касается обозначения ВСЕСФ).
10. На рис. 23,б диссертации и таком же рис. в автореферате (рис. 10,б) обозначения кривых различаются противоположным образом.

11. В ряде случаев, в подписи к рисункам отсутствует указание на объект, на котором был получен данный результат (например, в автореферате рис. 2, 3, 7), что затрудняет понимание иллюстративного материала.

Указанные замечания, в основном, носят частный характер и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова для работ на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Н.М.Максимов заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник лаборатории

транспорта ионов и солеустойчивости,

ФГБУН Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева

Российской Академии Наук

Попова Лариса Геннадьевна

03.12.2019

Контактные данные:

тел.: +7(926)6482087; e-mail: lora\_gp@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

03.00.12.– «Физиология и биохимия растений»

Адрес места работы:

Россия, 127276 Москва, ул. Ботаническая, д. 35.

ФГБУН Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева

Российской Академии Наук.

Лаборатория транспорта ионов и солеустойчивости

Тел.: 8 (499) 678-54-00; e-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru)

Подпись Поповой Ларисы Геннадьевны удостоверяю:

Начальник отдела кадров ИФР РАН

Е.Г. Базанова

03.12.2019