

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Никушина Олега Витальевича**  
**на тему: «Влияние лигандов на поглощение ионов меди клеточными**  
**стенками растений вики (*Vicia sativa* L.)»**  
**по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений**

Проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) не ослабевает уже на протяжении нескольких десятков лет. И в настоящее время продолжается активное изучение эффектов их воздействия на растения, а также механизмов металлоустойчивости растений, действующих на разных уровнях организации. На клеточном уровне, как известно, ключевую роль в повышении устойчивости играет клеточная стенка. Еще в конце 70-х годов прошлого столетия было установлено, что клеточные оболочки растений и их катионообменная способность играют важную роль в связывании ТМ, что предотвращает их проникновение в цитозоль. Более того, некоторые авторы считают, что вклад клеточной стенки в детоксикацию ТМ может быть значительно выше, чем других клеточных компартментов. Вследствие этого изучение роли клеточной стенки в адаптации растений к ТМ крайне важно. В этой связи актуальность темы диссертационной работы О.В. Никушина не вызывает сомнений. Результаты, полученные автором в ходе исследования, способствуют углублению представлений об устойчивости и адаптации растений к высоким концентрациям ТМ в окружающей среде, а также имеют большую практическую значимость с точки зрения возможного использования некоторых видов растений в очистке и стабилизации загрязненных ТМ почв.

О.В. Никушиным выполнено исследование, позволяющее оценить способность клеточных стенок растений вики посевной (*Vicia sativa* L.) к связыванию меди, как одного из наименее изученных металлов. В ходе работы было впервые выявлено влияние двух аминокислот (гистидина и глутамина), участвующих в хелатировании ТМ, на адсорбцию ионов меди

клеточными стенками корней и побегов. Новыми являются также данные о модификации клеточных стенок корней и побегов вики в ответ на поступление в растение избытка ионов меди. Кроме того, автором впервые показано выделение тритерпеновых гликозидов корнями растений вики посевной в ответ на присутствие в среде ионов этого металла.

Достоверность полученных данных доказана результатами статистической обработки. Идея работы, выдвинутые в ней цель и задачи базируются на обобщении имеющихся в литературе сведений по обсуждаемой проблеме. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 4 научных конференциях разного уровня и опубликованы в 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК для кандидатских диссертаций и входящих в базы данных Web of Science и Scopus.

Диссертация О.В. Никушина имеет традиционную структуру. Она состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, их обсуждение, заключение, выводы и список использованных источников. Материалы диссертации изложены на 111 страницах и содержат 12 таблиц и 16 рисунков. Список цитируемой литературы включает 140 наименований, из которых 134 – на иностранном языке.

Во введении автор доказывает актуальность темы исследований, указывает цели и задачи работы, ее новизну, обозначает научную и практическую значимость исследования, обосновывает положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен литературный обзор, отражающий современные представления о механизмах поступления тяжелых металлов в растения с участием транспортеров, обсуждаются внутриклеточные механизмы детоксикации металлов, в том числе роль фитохелатинов и металлотионеинов в этом процессе. Подробно описано строение клеточной стенки, указана ее роль в защите растений от ТМ, описана роль органических лигандов в поглощении и транспорте ТМ. Автор более подробно

останавливается на описании низкомолекулярных лигандов, участвующих в связывании ТМ в растении, что в контексте данной работы вполне оправдано. В обзоре также представлены современные данные, касающиеся роли корневых экссудатов в механизмах металлоустойчивости растений, что особенно важно при выборе видов для использования в фиторемедиации загрязненных металлами почв. Указана недостаточность знаний о роли корневых экссудатов в поглощении металлов растением как при их дефиците в почве, так и при избытке.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования, указан метод статистической обработки полученных результатов.

В третьей главе описываются полученные в ходе исследования результаты. В подглаве 3.1. представлены данные, касающиеся влияния двух концентраций меди на биомассу и оводненность корня и побега растений вики, а также воздействия гистидина и глутамина на эти показатели при их добавлении в среду роста. Помимо этого О.В. Никушиным изучено влияние состава среды инкубации растений на массовую долю клеточной стенки корней и побегов в общей массе органа. Автор обнаружил, что в ответ на избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде роста, в корнях и побегах растений вики увеличивается массовая доля клеточных стенок. На основании полученных результатов высказано правильное, на мой взгляд, предположение, что в присутствии меди увеличение массовой доли клеточных стенок корней обеспечивается интенсификацией биосинтеза лигнина. Вторая подглава посвящен описанию анализа состава ионообменных групп в матриксе клеточных стенок корней и побегов растений вики. Автор получил интересные данные о том, что внесение гистидина и глутамина в раствор, содержащий  $10 \text{ мкМ } \text{Cu}^{2+}$ , приводит к формированию клеточных стенок корней с более низким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, чем в варианте без добавления лигандов. Это коррелируется с данными по содержанию этого металла в корнях растений, указанными в подглаве 3.3 диссертации. Помимо этого, О.В. Ни-

кушиным при изучении влияния гистидина и глутамина на содержание меди в органах растений, сделан справедливый вывод, что ограничение поглощения меди корнями в присутствии этих аминокислот может быть связано с уменьшением активности ее ионов при формировании комплекса с лигандом. В подглаве 3.4. описываются результаты изучения способности клеточных стенок, изолированных из корней и побегов растений, к связыванию меди. Обнаружен важный факт, что при высокой концентрации меди эта способность снижается, однако обработка глутамином приводит к повышению адсорбционной способности клеточных стенок корней. В побегах модификация состава клеточной стенки происходит только в случае добавления аминокислот в среду выращивания с более низкой концентрацией металла. Автор заключает, что при обработке растений комплексами медь-лиганд происходит смена стратегии защиты растений вики с депонирования ионов меди в клеточной стенке, наблюдаемой в отсутствие гистидина и глутамина, на ограничение адсорбции  $\text{Cu}^{2+}$  в присутствии этих соединений. Интересны также результаты, полученные диссертантом при изучении потенциальной адсорбционной способности клеточных стенок корней в отношении ионов меди, которые представлены в подглаве 3.5. Обнаружен факт, что она во много раз превосходит эндогенное содержание металла в корнях интактных растений, а внесение гистидина и глутамина в среду, содержащую  $\text{Cu}^{2+}$ , только увеличивает разницу между потенциальной адсорбционной способностью клеточных стенок корней и содержанием металла в тканях корня. Использование в работе масс-спектрометрического анализа экссудатов корней позволило О.В. Никушину впервые обнаружить (подглава 3.6), что в присутствии ионов меди в среде корни растений вики выделяют тритерпеновые гликозиды, и преобладающим является сапонит. При этом концентрация выделяемых сапонинов прямо пропорциональна концентрации ионов меди в среде. По мнению диссертанта, это может свидетельствовать об участии данного гликозида в снижении

токсического действия  $\text{Cu}^{2+}$  на растения вики, возможно, за счет хелатирования токсичных ионов.

В четвертой главе диссертации обсуждаются полученные результаты. Сравнивая собственные данные с работами других исследователей в этой области, обсуждая возможные механизмы обнаруженных эффектов воздействия ионов меди на растения вики и роль лигандов в адаптации растений к избытку этого металла, Олег Витальевич, делает логичные выводы по каждому разделу.

В разделах «Заключение» и «Выводы» диссертант в лаконичной форме подытоживает результаты своих исследований, выделяет основные механизмы устойчивости растений вики к избытку меди, связанные с функционированием клеточной стенки, еще раз подчеркивает новизну полученных результатов.

В целом, необходимо отметить общее положительное впечатление от работы. Однако к диссертации имеются некоторые замечания и вопросы, в большинстве носящие рекомендательный характер.

1. При формулировке первой задачи исследований более корректно говорить о влиянии гистидина и глутамина на накопление ионов меди в органах растений, а не в тканях, что и изучалось диссертантом.

2. В обзоре литературы не хватает известных на сегодняшний день сведений относительно накопления и транслокации меди именно в растениях *Vicia sativa* или других представителей семейства Бобовых.

3. При первом упоминании белков необходимо давать расшифровку аббревиатуры (напр., СОРТ – *copper transporter*).

4. При описании методики выращивания растений не указан полный состав питательного раствора. Если в него входили только перечисленные автором ионы:  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , то растения испытывали дефицит целого ряда необходимых микроэлементов, что могло отразиться на их росте и развитии.

5. Название раздела 3.1. «Токсическое действие ионов меди на растения вики посевной», на мой взгляд, слишком обширно и не согласуется с его содержанием.

6. В таблице 3.6. диссертации в столбце «массовая доля клеточной стенки побегов ( $D_{\text{поб}}$ ) в общей массе органа» стоят прочерки. Что они означают?

7. Судя по рис. 3.2 диссертации и 3В автореферата, в варианте опыта с концентрацией меди 10 мкМ добавление гистидина не приводило к достоверному снижению (по отношению к варианту без добавления лигандов) содержания меди в побегах растений вики, как пишет автор. Вероятно, в данном случае лучше говорить о тенденции к снижению.

8. Раздел 3.5. Обнаруженный автором факт, что в растениях вики Си-связывающая способность клеточных стенок корней не реализуется в полной мере, может свидетельствовать также о том, что и при более высокой концентрации металла растение будет способно противостоять металлическому стрессу. Это важный момент с точки зрения возможного использования данного вида в фиторемедиации загрязненных медью почв.

Необходимо также обратить внимание на некоторые неудачные выражения, встречающиеся в работе, такие, например, как побеговая система.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Положения, выносимые на защиту, а также выводы, сделанные в ходе работы, обоснованы. Автореферат соответствует диссертации. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.21 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. Диссертационная работа оформлена согласно

требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Никушин Олег Витальевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений (по биологическим наукам).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений Института биологии – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ИБ КарНЦ РАН)

Казнина Наталья Мстиславовна

11.04.2024 г.

Контактные данные:

тел.: \_\_\_\_\_, e-mail: \_\_\_\_\_  
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:  
03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11;  
тел. \_\_\_\_\_, e-mail: \_\_\_\_\_