

**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**

**Актуальность темы диссертационной работы.** Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) является одной из наиболее актуальных проблем в биологии растений, экологии и сельском хозяйстве. Медь относится к числу эссенциальных микроэлементов, однако при повышении её содержания в корнеобитаемой среде и избыточном поступлении и аккумуляции в растениях медь проявляет токсические свойства тяжелого металла, вызывая нарушения ионного, водного и редокс гомеостаза, а также функционирования ферментных систем и метаболических процессов в растениях. Следствием аккумуляции меди в растениях становится ее последующий перенос по пищевым цепям, что может представлять серьезную угрозу для здоровья человека. Клеточная стенка (КС) клеток корней растений первой вступает в контакт с ионами ТМ, в почвенном растворе, включая ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , и известна как важный барьер на пути их проникновения в симпласт и дальнейшей транспорт по растению. Однако, несмотря на данный факт, внимание исследователей уделяется преимущественно механизмам трансмембранного переноса ионов ТМ и их внутриклеточной детоксикации, тогда как роль клеточных стенок в связывании ионов ТМ и защите растений от их негативного действия во многом остается недооцененной. Мало информации имеется также о сорбционной способности различных типов катионообменных групп клеточных стенок корней хозяйственно значимых видов растений в отношении ионов ТМ, в том числе, ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , а также о возможном влиянии корневых эксудатов и иных органических лигандов на поглощение ионов ТМ и медь-связывающую способность клеточных стенок.

В этой связи актуальность избранной диссертантом темы исследования не вызывает сомнения.

**Научная новизна исследования** состоит в том, что **впервые** с использованием оригинальной методики выделения клеточных стенок, исследована медь-связывающая способность клеточных стенок корней и побегов растений вики посевной (*Vicia sativa L.*). Показано, что избыток ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в среде приводит к модификации структуры клеточных стенок корней и увеличению степени их лигнификации при 100 мкМ Cu в среде.

**Впервые** изучено влияние гистидина и глутамина на адсорбцию ионов меди клеточными стенками корней и побегов растений. Показано, что присутствие этих лигандов в среде выращивания приводит к снижению медь-связывающей способности КС корней и побегов, тем самым дополнительно ограничивая поступление  $\text{Cu}^{2+}$  в растение.

**Впервые** показано присутствие тритерпеновых гликозидов в составе корневых эксудатов корней растений вики посевной в ответ на присутствие ионов меди в среде.

**Теоретическая значимость** диссертационной работы не вызывает сомнения и состоит в расширении и углублении современных представлений о роли клеточных стенок корней растений в сорбции ионов ТМ при их поступлении из окружающей среды. Материалы диссертационного исследования расширяют и углубляют современное понимание роли лигандов в защите растений от токсического действия ионов  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Практическая значимость** работы очевидна. Она определяется выбором в качестве объекта исследования хозяйственно важной сельскохозяйственной культуры вики посевной и возможностью использования полученных результатов как в практике растениеводства при выращивании растений на территориях с высоким содержанием ТМ в почве, так и в учебном процессе, при разработке курсов лекций по физиологии минерального питания и экологической физиологии растений для студентов биологических и экологических специальностей. Рекомендации,

сформулированные в работе, обоснованы, их достоверность и новизна не вызывают сомнения

**Цель и задачи** исследования сформулированы ясно.

**Научные положения**, выносимые автором на защиту, обоснованы разносторонними экспериментальными исследованиями и полностью раскрыты в соответствующих главах диссертации. Достоверность научных данных и научных выводов доказана результатами статистической обработки.

**Структура и содержание диссертации.** Диссертационная работа построена по традиционному плану и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 111 страницах и содержит 12 таблиц и 16 рисунков. Список цитируемой литературы включает 140 источников, из которых 12- на русском и 128- на иностранном языке.

В разделе **«Введение»** сформулированы актуальность темы исследования, цель и задачи работы, рассмотрены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология диссертационного исследования, представлены положения, выносимые на защиту, сведения об апробации работы и список публикаций по теме диссертации.

**В Обзоре литературы** на 25 страницах дается развернутый анализ работ, посвященных вопросам, имеющим непосредственное отношение к теме диссертации, а именно: 1) токсическому действию ТМ на клетки растений, особенностям их аккумуляции у разных групп растений и специфике структурных и функциональных нарушений в органах растений; 2) механизмам поступления ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и других ТМ в растительные клетки и их внутриклеточной детоксикации; 3) роли КС в защите растений от действия ТМ, особенностям строения и химического состава КС, участию различных ионообменных групп КС в связывании ТМ; 4) возможностям модификаций состава КС как стратегии устойчивости растений к действию ТМ; 5) роли

органических лигандов в поглощении, транспорте и хелатировании ионов ТМ; б) выделению корневых эксудатов как механизму защиты растений от действия ТМ. При этом отмечено, что данные о влиянии гистидина и глутамина на поглощение меди у бобовых растений, в частности, у вики, в литературе отсутствуют. Большинство цитированных в обзоре работ использованы диссертантом при обсуждении полученных результатов.

Глава **Материалы и методы** состоит из нескольких подразделов, включающих: описание приемов выращивания экспериментальных растений; описание оригинальной методики выделения полимерного матрикса КС из побегов и корней растений, разработанной Н.Р.Мейчик с соавт.: описание методики экспериментов по оценке поглощения ионов меди целыми растениями и изолированными КС, а также описание использованных современных физико-химических и хроматографических методов анализа, включая потенциометрический метод определения ионообменных групп в составе КС и расчеты ионообменной способности КС; колориметрический метод определения концентрации ионов меди в экспериментальных растворах (купризонный метод) и хроматографический метод анализа сапонинов в эксудатах растений.

В главе приводятся сведения о методах статистической обработки результатов, а также представлена детальная общая схема проведения исследования.

**Результаты исследования и их обсуждение** описаны автором отдельно, в двух самостоятельных главах, имеющих, однако, идентичные подзаголовки. В этих главах, включающих 6 разделов каждая, последовательно излагаются и обсуждаются результаты большой серии экспериментов, выполненных на двух объектах - интактных 9-дневных растениях вики посевной и изолированных клеточных стенках, выделенных из корней и побегов 10-дневных растений с использованием приема их 24 час экспонирования на растворах с разными концентрациями ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (0,10, 50,

100 мкМ) при отсутствии или в присутствии разных концентраций лигандов - гистидина и глутамина.

В разделе 1 Результаты, посвященном изучению воздействия меди и эффекту присутствия лигандов на физиологические параметры растений вики, автор приводит убедительные данные, свидетельствующие о том, что обработка растений *V. sativa* растворами  $\text{Cu}^{2+}$  в диапазоне концентраций 0-10-50-100 мкМ вызывала снижение сухой биомассы как корней, так и побегов, а также оводненности корней. При этом внесение в среду культивирования гистидина и глутамина способствовало ослаблению токсического действия повышенных концентраций ионов  $\text{Cu}^{2+}$  на формирование сухой биомассы растений, но не оказывало явного действия на их оводненность. С другой стороны, достоверно установлено что избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде приводит к увеличению массовой доли КС в корнях и побегах растений *V. sativa*, тогда как в случае одновременного внесения в медьсодержащий раствор гистидина или глутамина этот показатель снижается по сравнению с вариантом без лигандов, как для корней, так и для побегов

Несомненно принципиально важными для решения поставленных в работе задач являются результаты анализов состава катионообменных групп в клеточных стенках корней и побегов вики, выполненных с использованием метода потенциометрического титрования, позволившие охарактеризовать 3 типа ионообменных групп (карбоксильные группы полигалактуроновой и гидроксикоричных кислот и фенольные ОН-группы) в КС обоих органов с оценкой их количественных изменений под влиянием ионов меди и присутствия лигандов. Существенно, что внесение лигандов на фоне 10 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  снижало содержание в КС карбоксильных групп ПГК, но увеличивало содержание в них фенольных групп, тогда как на фоне 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  присутствие лигандов не влияло на содержание карбоксильных групп, вызывая, однако, существенное снижение содержания фенольных групп в составе КС и, как следствие, общего содержания катионообменных групп в КС.

Значительная часть диссертационного исследования выполнена на препаратах клеточной стенки, изолированных из корней и побегов растений, что позволило автору получить большой объем данных по адсорбционной способности КС корней и побегов в зависимости от состава сред инкубации и предобработки с применением различных концентраций  $\text{Cu}^{2+}$  и лигандов, и выявить потенциальную  $\text{Cu}^{2+}$ - связывающую способность КС. Особого внимания заслуживают полученные при этом данные о влиянии лигандов на медь-связывающую способность КС корней. На основании экспериментов с изолированными КС автору удалось установить, что эндогенные содержания металла, выявленные в корнях интактных растений, оказались намного ниже потенциальной медь-связывающей способности КС в отношении ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , и эта разница увеличивалась при внесении лигандов. Принципиально значимым в этом плане представляется высказанное предположение о том, что действие лигандов может быть направлено на ограничение поглощения ионов  $\text{Cu}^{2+}$  корнем растения и осуществляться как путем снижения активности ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в комплексе с лигандом, так и за счет более высокой константы устойчивости комплексов меди с гистидином и глутамином, чем с карбоксильными группами ПГК. В качестве доказательства хелатирования ионов  $\text{Cu}^{2+}$  лигандами в среде культивирования автор приводит данные материального баланса, а именно, показатели убыли ионов  $\text{Cu}^{2+}$  из среды инкубации в сравнении с показателями ее накопления в корнях растений, которые оказались существенно ниже. К сожалению, при сопоставлении этих данных не было четко указано, что в растворе анализировали содержание исключительно ионной формы меди, в то время как ее значительная часть перешла в хелатированную форму.

В заключительном разделе главы Результаты представлены данные хроматографического анализа эксудатов корней в растворах, собранных после экспонирования растений, что позволило впервые для *V. sativa* установить секрецию сапонинов корнями растений в ответ на избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде. По мнению автора, это может являться одним из факторов, ограничивающих  $\text{Cu}$ -

связывающую способность КС корней вследствие более высокой специфичности сапонинов к  $\text{Cu}^{2+}$  по сравнению с карбоксильными группами ПГК.

Достаточно развернутое Обсуждение полученных результатов представлено в диссертации в виде отдельной главы, разделы которой отвечают разделам главы Результаты. Одним из базовых положений при обсуждении явился установленный в работе факт накопления меди преимущественно в корнях опытного растения, что позволило автору отнести *Vicia sativa L* к группе растений-исключателей, основной стратегией которых является депонирование ионов ТМ в клеточных стенках. Отмеченное при этом ограничение поступления и последующего дальнего транспорта  $\text{Cu}^{2+}$  в растениях вики при внесении хелаторов, а также данные о секреции их корнями тритерпеновых гликозидов, роль которых связывают с экзогенным хелатированием ионов ТМ для ограничения их поступления в корень, не противоречит основному постулату автора.

Детальный анализ результатов экспериментов на изолированных клеточных стенках корней и побегов растений вики, проведенный в соответствующем разделе Обсуждения, позволил автору сформулировать представление о различных защитных стратегиях растений вики и их реализации в ответ на возрастание Си стресса и внесение лигандов. Согласно этому представлению, при меньших концентрациях Си (10-50 мкМ) в растении реализуется стратегия увеличения массовой доли КС в корнях и увеличения содержания  $\text{Cu}^{2+}$  в корне ввиду усиления биосинтеза компонентов КС, включая пектины, без изменения степени метилирования их карбоксильных групп. При максимальной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  (100 мкМ) в отсутствии лигандов, а также в вариантах обработки *Vicia. sativa* комплексами медь-лиганд, имеет место другая стратегия, заключающаяся в снижении Си-связывающей способности КС ввиду усиления их лигнификации, либо ограничения адсорбции ими  $\text{Cu}^{2+}$  вследствие образования прочных комплексов этих лигандов с ионами меди. В итоге диссертант убедительно

резюмирует, что при обработке растений комплексами медь-лиганд происходит смена стратегии защиты растений *V. sativa* с депонирования ионов меди в КС, наблюдаемой в отсутствие лигандов, на ограничение адсорбции  $\text{Cu}^{2+}$  в присутствии этих соединений

В **Заключении** автор обобщает все полученные в диссертационном исследовании данные и выделяет принципиальные, наиболее значимые результаты работы.

**Научные выводы**, сформулированные в диссертации, обоснованы репрезентативным фактическим материалом, адекватны использованным методикам и вытекают из результатов исследования.

Диссертация является законченным оригинальным научным исследованием, выполнена на высоком теоретическом и методическом уровне. Написана хорошим языком, тщательно выверена, и адекватно проиллюстрирована. Все результаты статистически обработаны, их достоверность базируется на большом количестве выполненных исследований

В **автореферате** отражены основные положения диссертационной работы, его содержание соответствует тексту самой диссертации.

По материалам диссертации автором опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI и 1 - в сборнике материалов Международного научно-исследовательского конкурса. Результаты исследования опробованы и представлены в виде 4 тезисов в материалах научных конференций.

#### **Замечания и вопросы по работе:**

1. Обзор литературы достаточно обширен и включает большой перечень источников. Однако в нем излишне много цитируемых работ 1980-1990 х гг

2. К сожалению, в обзоре не цитируются работы таких отечественных исследователей в области структуры и функций КС, как Т. А. Горшкова и Е.И. Шарова

3. Описание методики выращивания растений и некоторых методов анализа вызывает ряд вопросов:

1) Некорректно представление состава питательного раствора, а именно, что означает «концентрации ионов  $K^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Na^+$ ,  $PO_4^{3-} \sim 0,01$  г/л»? Концентрации ионов принято выражать в ммоль/л и указывать, в форме каких солей они вносятся в раствор. Были ли в составе раствора ионы других необходимых макроэлементов-  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $SO_4^{2-}$  ?

2) Купризоновый метод анализа содержания ионов меди несомненно достоин применения, но ссылка на Марченко, 1971 несколько архаична и не позволяет охарактеризовать метод анализа как современный

3) Что подразумевается под термином «экссудаты растений»? В разделе 2.8.1. «Подготовка проб» говорится о высушивании экссудатов без упоминания методики их сбора и количеств.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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, а также 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 О.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук, ДОЦЕНТ кафедры физиологии и биохимии растений Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

ОСМОЛОВСКАЯ Наталия Глебовна

15.04.2024

Контактные данные:

тел.: \_\_\_\_\_, e-mail: \_\_\_\_\_

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.12 – Физиология растений

Адрес места работы:

199034, (РФ) г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д.7/9,  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»  
Биологический факультет, каф. физиологии и биохимии растений

Тел.: \_\_\_\_\_; e-mail: \_\_\_\_\_

Подпись сотрудника ..... 

ОРГАНИЗАЦИИ И.О. Фамилия удостоверяю;

руководитель/кадровый работник.

И.О. Фамилия