

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
доктора биологических наук Брейгиной Марии Александровны
на тему: «Активные формы кислорода как регуляторы взаимодействия
между мужским гаметофитом и спорофитом семенных растений»
по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений**

Взаимодействие между мужским гаметофитом и женскими тканями спорофита в прогамной фазе оплодотворения обусловлено как анатомией, так и физиологией данного процесса. И если анатомия этих процессов у разных групп растений в значительной мере изучена, то физиология данного этапа представляет собой актуальную проблему. Известно, что важными сигнальными агентами являются некоторые низкомолекулярные вещества, из которых наиболее универсальными считаются активные формы кислорода (АФК). АФК обладают возможностями передачи сигнала между клетками. В межклеточном сигналинге ионные каналы плазмалеммы представляют одну из основных мишеней для АФК. Взаимодействуя с ионными каналами, АФК транслируют внутрь клетки сигнал в виде токов неорганических ионов. Эти процессы охарактеризованы для соматических клеток, но вопрос о том, в какой мере данные представления применимы к репродуктивным процессам у растений, ранее не изучали. Усилия диссертанта были направлены на решение этой проблемы.

К началу работы диссертанта из немногочисленных сведений, представленных в литературе о генерации активных форм кислорода на рыльцах цветковых растений и эндогенной продукции АФК в пыльцевой трубке, можно было сделать определенный вывод о том, что АФК синтезируются как в пыльцевом зерне, так и на рыльце пестика, и что они могут влиять на прорастание пыльцевых зёрен. Однако, оставались неизученными такие моменты, как баланс, динамика и физиологическое значение продукции АФК на рыльцах, а также наличие или отсутствие аналогичного процесса у голосеменных растений. Кроме того, не был раскрыт механизм восприятия пыльцой сигнала АФК от женских тканей и не

установлена роль АФК, синтезируемых самим мужским гаметофитом, во взаимодействии между мужским гаметофитом и женскими тканями спорофита.

Эти вопросы и определили цель настоящей работы – установить функциональную роль АФК во взаимодействии пыльцевого зерна и спорофита в прогамной фазе оплодотворения. Диссертанту предстояло исследовать (с использованием упрощенных модельных систем) влияние АФК на прорастание и рост мужского гаметофита, выявить природу АФК-чувствительных ион-транспортных систем в растущем мужском гаметофите, а также доказать присутствие определенных АФК на рыльце и их значимость для прорастания. В работе были использованы многочисленные объекты исследования, однако в качестве основных выступали пестики и пыльцевые зерна табака (*Nicotiana tabacum*) и лилии (*Lilium longiflorum* Thunb.), а также пыльца и опылительные капли ели (*Picea pungens* Engelm.).

Диссертация М.А. Брейгиной объемом 238с. (включая 80 рисунков и 10 таблиц) построена по традиционному плану и состоит из Введения, 6-ти глав (Глава I. Обзор литературы, Глава II. Объекты и методы исследования, Глава III. Роль АФК в регуляции прорастания пыльцевого зерна, Глава IV. Роль ионного транспорта в регуляции прорастания мужского гаметофита, Глава V. Влияние АФК на ионный транспорт в мужском гаметофите, Глава VI. АФК в рецептивных жидкостях покрытосеменных и хвойных растений), Заключения, Выводов, Списка цитированной литературы (последний содержит 499 цитированных работ).

В разделе «Обзор литературы», объемом 52 с., состоящем из двух частей, автор приводит имеющуюся в мировой литературе информацию о начальных этапах прорастания пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки. Отражены основные этапы этих процессов (гидратация и активация пыльцевого зерна, протеом, изменение ионного статуса зерна при прорастании и значение активных форм кислорода для этих процессов, цитологические и физиологические основы полярного роста, прочее).

Описаны цитологические основы полярного роста у цветковых растений и хвойных. В разделе «Физиологические основы полярного роста» подробно рассмотрена регуляторная роль ионов Ca^{2+} и роль H^+ -АТФазы плазматической мембраны в ходе полярного роста пыльцевой трубки, регуляторная роль ионов K^+ , роль анионов и активных форм кислорода. Раздел «Обзор литературы» информативен и содержит всю информацию, необходимую для дальнейшего понимания материала диссертации.

В работе представлен большой объем экспериментальных данных, полученных с применением разнообразных методов и подходов, описанных в разделе «Глава II. Объекты и методы исследования». Этот раздел показывает, что автор владеет широким спектром современных методик исследования в области биохимии, биофизики, флуоресцентной и электронной микроскопии. Использованные автором методические подходы адекватны поставленным задачам.

Последующие главы посвящены изложению полученных автором результатов. В Главе III выясняется роль активных форм кислорода (АФК) в прорастании пыльцевого зерна. Ранее основная масса исследований редокс-регуляции проводилась на пыльце модельных цветковых растений. Автор посвятил свои усилия исследованию пыльцы менее изученных голосеменных растений на примере ели. Описано также исследование механизма действия экзогенных АФК на начальных этапах прорастания пыльцевого зерна табака, и эффекты различных АФК на рост пыльцевых трубок ели и лилии.

Ион-транспортные системы являются одними из основных мишеней АФК на плазмалемме соматических клеток. Для того, чтобы выяснить возможную роль ионных каналов в мужском гаметофите в восприятии сигнала АФК, необходимо было сначала выяснить значение ионных каналов для активации пыльцевого зерна. Глава IV посвящена выяснению этого вопроса на примере пыльцевых зерен табака и ели. Автор показал, что еще до начала прорастания пыльцевого зерна как у табака, так и у ели наблюдается выход анионов из зерна. Автор обнаружил также, что как у табака, так и у

ели существует градиент мембранного потенциала по длине пыльцевых трубок и сделал заключение, что градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке является консервативной особенностью полярно растущих клеток. Полученные автором данные показывают, что ингибирование входных K^+ и выходных анионных каналов приводит к гиперполяризации мембраны растущей пыльцевой трубки, из чего можно сделать вывод, что потенциал на мембране определяется ионами K^+ и сопутствующим анионом. Представленные данные также свидетельствуют, что активность как калиевых, так и анионных каналов необходима для эффективной осморегуляции и перехода пыльцевых зерен из состояния покоя к активному метаболизму и полярному росту. Кроме того, эксперименты, в которых исследовали роль H^+ -АТФазы плазматической мембраны в регуляции полярного роста в мужском гаметофите ели, выявили важные различия между механизмами поддержания этого процесса у цветковых и хвойных растений.

Глава V посвящена исследованию участия ион-транспортных систем плазматической мембраны мужского гаметофита в восприятии сигнала АФК, а также исследованы эффекты тяжелых металлов (последние используются как модель стрессового воздействия) на мужской гаметофит, причем особое внимание уделялось ионному статусу пыльцевого зерна и ионным токам как потенциальным мишеням для АФК-опосредованного и АФК-независимого действия тяжелых металлов (на примере никеля и меди).

Результаты исследований, описанных в данной главе, показывают, что действующими агентами при прорастании пыльцы являются различные АФК, и их воздействие на мужской гаметофит реализуется с участием ион-транспортных систем, включая кальций-проводящие и калиевые каналы, и, возможно, H^+ -АТФазу плазмалеммы. Также впервые для растительных клеток описана чувствительность K^+ -проводящих каналов плазмалеммы к никелю.

Глава VI посвящена исследованию продукции АФК в рецептивных жидкостях как покрытосеменных, так и хвойных растений. Здесь следует отметить несомненные достижения автора в разработке экспериментального подхода, позволяющего количественно оценивать продукцию АФК в рецептивных жидкостях, которые собираются с женских тканей на разных стадиях развития до и после опыления. Данный подход позволяет преодолеть ограничения для цветковых растений с влажным рыльцем и большинства хвойных растений, которые в этом отношении были абсолютно не изучены. Для анализа АФК в рецептивных жидкостях применяли ЭПР спектроскопию как самый чувствительный метод их детекции (наряду со спектрофотометрией и спектрофлуориметрией).

На примере табака была продемонстрирована значимость экссудата рыльца и АФК в его составе в качестве возможного регулятора ионного гомеостаза в пыльцевой трубке, что привело к необходимости оценить содержание тех или иных АФК в экссудате рыльца и исследовать динамику их продукции. Было показано, что на влажных рыльцах суммарная продукция АФК всегда увеличивается в процессе созревания, однако баланс различных АФК для разных видов имеет серьезные различия.

Эксперименты с опылительными каплями хвойных особо интригуют и, в целом, представляет собой высокий уровень аналитической работы (особенно это касается мелких опылительных капель сосны и ели). Автор анализировал опылительные капли четырех видов хвойных растений (туя, тис, сосна, ель). АФК были найдены во всех исследуемых образцах, однако, в зависимости от вида растения, основной АФК в опылительной капле мог быть как пероксид водорода (туя), так и супероксид радикал (ель, сосна, тис).

На основании полученных данных автор делает вывод, что воздействие женских тканей на прорастающую пыльцу с помощью АФК является универсальным свойством семенных растений. Также автор предполагает эволюционную тенденцию по переходу от регуляции прорастания супероксид радикалом к возрастанию роли пероксида водорода, и от

единственной активной формы кислорода к более сложному балансу между ними.

Новизна и актуальность полученных М.А.Брейгиной данных не вызывает сомнений. К числу наиболее значимых результатов, определяющих новизну диссертационной работы, относятся следующие: впервые картированы АФК в растущих пыльцевых трубках голосеменных и покрытосеменных растений, выявлена чувствительность пыльцевых трубок к пероксиду водорода и другим АФК, обнаружены мишени для АФК на плазмалемме вегетативной клетки пыльцевого зерна, комплексом методов продемонстрирована связь редокс-метаболизма и ионного транспорта на пыльцевых трубках и протопластах, полученных из них; выявлена зависимость прорастания у голосеменных и цветковых растений от ионного транспорта и мембранного потенциала на плазматической мембране вегетативной клетки пыльцевого зерна. Впервые изучена динамика продукции АФК на рыльцах растений из разных систематических групп до и после опыления, оценена активность ферментов редокс-метаболизма на рыльцах и выявлено значение взаимопревращения АФК для эффективности опыления. Впервые обнаружена продукция АФК в опылительных каплях хвойных растений. Открыт феномен биполярного прорастания у голосеменных растений и выявлена связь этого явления с генерацией АФК. Нельзя не отметить также и то, что ряд изящных экспериментальных подходов был разработан самим соискателем.

Выводы диссертации научно обоснованы и достоверны, т.к. сделаны автором на основе результатов, полученных в многочисленных хорошо спланированных экспериментах. Результаты исследования апробированы на многих научных конференциях. По теме диссертации М.А. Брейгиной опубликовано 24 статьи в журналах из списка ВАК и в журналах, индексируемых в Web of Science и/или Scopus.

По прочтении работы у меня возник ряд вопросов и замечаний.

1. На Рис. 30 и 34 представлены эффекты ингибитора анионных каналов NPPV на мембранный потенциал в пыльцевой трубке табака в процессе активации и прорастания пыльцевых зерен. Результаты на Рис. 30 показывают, что NPPV оказывает деполяризующее действие на мембранный потенциал, тогда как на Рис. 34 мы видим, что в присутствии NPPV мембрана в определенной области пыльцевой трубки гиперполяризована. Также и в опытах на пыльцевых трубках ели в присутствии NPPV мембрана более гиперполяризована, чем в контрольных вариантах (Рис. 35). Как объясняется это противоречие?
2. На с. 125 приводятся данные из литературы о том, что гидратированные пыльцевые зерна табака содержат до 50 мМ Cl⁻. Какое может быть объяснение такому высокому содержанию хлорида в пыльце растения – гликофита?
3. Высокие концентрации Cl⁻ в наружной среде (100mM, 200mM) (с. 126) подавляли прорастание пыльцевых зерен табака, и диссертант связывает этот факт с подавлением выхода Cl⁻ из пыльцевых зерен. Возможно ли, что объяснение не так однозначно? Ведь такие высокие концентрации Cl⁻ в наружной среде существенно нарушают осмотический баланс и подавляют поглощение важного питательного аниона NO₃⁻, поскольку транспорт нитрата и хлорид-иона осуществляется, по крайней мере, частично, через одни и те же транспортеры. Осталось также неизвестным, в виде какой соли был использован Cl⁻.
4. Диссертант пишет: «... поскольку гиперполяризация необходима для активации пыльцевого зерна и его прорастания, активация тока K⁺ с помощью АФК может стимулировать эти процессы...» (с. 151). Что, с точки зрения диссертанта, является движущей силой для выхода ионов K⁺ из пыльцевого зерна? Как правило, K⁺ находится в состоянии электрохимического равновесия на растительной мембране и следует за изменениями потенциала, т.е. первичным является изменение потенциала, за которым следует ток K⁺.

5. В диссертации представлен значительный объем данных, отражающий большую работу, проделанную соискателем, однако объем Заключения явно не соответствует объему и значимости полученных автором результатов. Говоря об анионном транспорте, сопровождающем активацию пыльцевого зерна как у голосеменных, так и у покрытосеменных растений, хотелось бы узнать представления автора о том, о каких анионах идет речь – только о хлорид-ионах или в этом процессе участвуют еще какие-нибудь анионы?
6. В работе описаны эксперименты с применением различных ингибиторов, флуоресцентных зондов и т.п., названия которых представляют собой аббревиатуры. Однако список применяемых сокращений и обозначений в диссертации отсутствует, что несколько затрудняет восприятие материала
7. С моей точки зрения, в Оглавление, в раздел «Объекты и методы исследования» следовало бы включить более мелкие подразделы этой главы, названия которых есть в самом тексте этого раздела и которые отражают, что именно определяли с применением данного метода. В качестве примера: в оглавлении есть раздел, который называется «Флуоресцентная широкополосная микроскопия», однако для чего она была использована, остается неизвестным, пока не обратишься к тексту соответствующего раздела.
8. Диссертация написана хорошим языком, легко и с интересом читается. Материал изложен логично и проиллюстрирован хорошо выполненными рисунками. Вместе с тем, нельзя не отметить многочисленные несогласования и опечатки, включая, видимо, фрагмент черновика, задержавшегося в финальной версии текста диссертации (с. 96). Рисунок 29 повторяется 3 раза, на ряде рисунков отсутствуют буквенные обозначения панелей (а, б) (Рис. 33).
9. К сожалению, встречаются неудачные выражения. Например, «частота дыхания...» в применении к пыльце (с. 11), «анионные токи Ca^{2+} ...» (с. 52), «белки....., транслируемые и транскрибируемые (с. 104) (термин

«трансляция» применяется, скорее, по отношению к мРНК, а «транскрипция» - по отношению к генам; ниже на этой же странице данные термины употребляются вполне корректно), «вторичные антитела против кролика...» (с. 141), «окрашивание протопластов на мембранный потенциал...» (с. 172) .

10. На с. 107 и с.108 встречается термин «маленькие ГТФазы». В русскоязычной литературе принят термин «малые ГТФазы».

11. При электрофорезе белков по Лэммли применяется SDS, что является основной характеристикой данного вида белкового электрофореза. Белки в присутствии SDS денатурированы и теряют свою нативную конформацию. Диссертант в своей работе применял нативный электрофорез белков, однако тут же назвал его электрофорезом по Лэммли (с. 73).

Сделанные замечания не умаляют значимости полученных автором в диссертационном исследовании результатов. 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 именно следующему направлению: «Онтогенетические программы роста и морфогенеза растений, включая эмбриогенез, вегетативный рост, генеративное развитие, плодоношение и старение», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертация 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. Содержание автореферата соответствует основным положениям и выводам диссертации.

Таким образом, соискатель Брейгина Мария Александровна несомненно заслуживает присуждения ученой степени доктора

биологических наук по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории транспорта ионов и
солеустойчивости,
ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН

ПОПОВА Лариса Геннадьевна

16.05.2024

Контактные данные:

тел.: , e-mail

Специальность, по которой официальным оппонентом
защита диссертация:

03.00.12 – физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35,
Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН (ИФР РАН)
Лаборатория транспорта ионов и солеустойчивости
Тел.: , ;

Подпись сотрудника
ИФР РАН
Л.Г.Поповой
удостоверяю:

Начальник отдела кадров

Т.А.Тимонина

16.05.2024