

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени  
кандидат биологических наук Хао Цзинжао  
на тему: «Исследование молекулярных механизмов действия пестицидов  
на фотосинтетический аппарат высших растений»  
по специальности 1.5.2 – Биофизика**

**Актуальность избранной темы.**

Актуальность темы диссертации определяется широким использованием неоникотиноидных инсектицидов (НИ), таких как тиаметоксам (ТМХ) и клотианидин (КЛ), в сельском хозяйстве для защиты растений от вредителей. Принцип их действия основан на взаимодействии с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR) насекомых, что приводит к блокировке нервной системы вредителей и их гибели. Однако, помимо целевого действия на насекомых, НИ оказывают сложное и многогранное влияние на растения. Это влияние варьируется от положительных эффектов, таких как повышение устойчивости к засухе, рост корней, улучшение фотосинтеза, до негативных последствий, включающих нарушение фотосинтетических процессов, изменение морфологии клеток и активацию окислительного стресса.

Несмотря на известные общие эффекты НИ на растения, детальные молекулярные механизмы их действия, особенно в контексте влияния на фотосинтетический аппарат и мембранные структуры, остаются недостаточно изученными. Изменения в параметрах фотосинтеза, таких как функциональная активность фотосистем II и I, содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилл, каротиноиды) и состояние мембран хлоропластов, требуют более глубокого исследования.

Особую значимость изучение воздействия НИ приобретает в условиях интенсификации сельскохозяйственного производства, когда на первый план выходят вопросы экологической безопасности и устойчивости растений. Применение НИ, способных накапливаться в растительных тканях, может также иметь долгосрочные последствия, влияя на продуктивность и здоровье



растений, что делает эту проблему крайне важной для фундаментальной науки и прикладной агрономии.

Данная работа сосредоточена на изучении механизмов влияния ТМХ и его метаболита КЛ на фотосинтетический аппарат у различных генотипов кукурузы (инбредная линия zprl 225 и гибрид зр 341). Исследование охватывает анализ изменений фотосинтетических параметров, содержание и конформацию пигментов, функциональность фотосистем и структурные характеристики мембран хлоропластов. Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых селекционных подходов, направленных на повышение устойчивости сельскохозяйственных культур, а также для создания методов диагностики воздействия инсектицидов на растения.

#### **Степень обоснованности положений, выносимых на защиту.**

Положения, выносимые на защиту, базируются на результатах комплексного и многоуровневого исследования, проведенного с применением современных экспериментальных подходов и методов анализа. В работе использован широкий спектр методов, включая спектроскопию комбинационного рассеяния (КР), инфракрасную (ИК) спектроскопию, атомно-силовую микроскопию (АСМ), спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), флуоресцентный анализ хлорофилла (OJIP-тест), амперометрию с использованием электрода Кларка, а также биохимические методы для оценки содержания малонового диальдегида и пигментов. Применение этих методов позволило детально изучить функциональное состояние фотосистем, молекулярную структуру пигментов, процессы электронного транспорта в хлоропластах и структурные изменения тилакоидных мембран.

Результаты основаны на тщательно спланированных экспериментах, проведенных на двух генетически различных линиях кукурузы (инбредная линия zprl 225 и гибрид зр 341), что позволяет объективно оценить различия в реакциях растений на воздействие неоникотиноидных инсектицидов



(тиаметоксама и клотианидина). Эксперименты включали обработку растений различными способами (опрыскивание и прикорневой полив), а также исследование действия пестицидов *in vitro* на изолированные хлоропласты. Анализ проводился с учётом стандартов репрезентативности данных, включая статистическую обработку результатов с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) и теста Тьюки для проверки достоверности различий.

Положения, выносимые на защиту, подтверждаются достоверными и воспроизводимыми данными, полученными с применением как интегральных методов оценки функциональной активности фотосистем (например, параметров  $PI_{ABS}$  и  $F_v/F_m$ ), так и анализа молекулярных процессов, таких как перенос электронов между  $Q_A$  и  $Q_B$ , конформационные изменения пигментов, изменения морфологии хлоропластов и снижение вязкости мембран. Все наблюдаемые эффекты подтверждены многократными экспериментами, проведёнными при контролируемых условиях, что исключает влияние случайных факторов.

Таким образом, обоснованность положений обеспечивается высокой точностью и воспроизводимостью экспериментов, разнообразием применённых методов исследования, а также строгим анализом полученных данных, что делает выводы диссертационной работы научно обоснованными и достоверными.

### **Степень обоснованности научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.**

Научные выводы и рекомендации, представленные в диссертации, основаны на результатах комплексных исследований, выполненных с использованием современных и точных методов анализа, включая спектроскопические, микроскопические и биохимические подходы. Применение этих методов позволило подробно изучить влияние неоникотиноидных инсектицидов (тиаметоксама и клотианидина) на



функциональную активность фотосинтетического аппарата, молекулярную структуру пигментов и состояние мембран хлоропластов.

Достоверность выводов обеспечивается строгим экспериментальным дизайном, включающим исследование генетически различных линий кукурузы (инбредная линия zrp1 225 и гибрид zр 341) и применение статистической обработки данных, включая дисперсионный анализ (ANOVA) и тест Тьюки. Многократное повторение экспериментов и соблюдение контролируемых условий позволили получить высоконадежные и воспроизводимые результаты. Установленные зависимости между концентрацией пестицидов и изменениями в параметрах фотосинтеза, морфологии хлоропластов и содержании маркеров окислительного стресса подтверждают научную обоснованность выводов.

Новизна работы заключается в выявлении генотип-зависимого действия инсектицидов на фотосистемы растений. Впервые установлено, что тиаметоксам снижает функциональную активность фотосистемы II ( $PI_{ABS}$ ) и вызывает изменения в конформации молекул каротиноидов и мембранной структуре хлоропластов. Показано, что клотианидин оказывает ингибирующее действие на электронный транспорт между  $Q_A$  и  $Q_B$  в фотосистеме II, сопровождающееся повышением уровня МДА и нарушением морфологии хлоропластов. Предложен новый механизм действия клотианидина, связанный с конкуренцией за сайт связывания  $Q_B$ .

Сформулированные рекомендации обладают значительной практической ценностью. Они включают использование предложенных методов для оценки устойчивости сельскохозяйственных культур к инсектицидам и мониторинга их состояния при применении пестицидов. Это позволяет оптимизировать использование пестицидов и снижать их негативное воздействие на растения и окружающую среду, что особенно важно в условиях интенсивного сельского хозяйства.



## **Замечания к диссертации**

### **1. Взаимодействие клотианидина с $Q_B$ -сайтом ФСЦ.**

В работе выдвинуто предположение, что клотианидин может связываться с  $Q_B$ -сайтом белка D1 и блокировать перенос электронов от  $Q_A$ . Эта гипотеза подкреплена литературными данными (Battaglino et al., 2021), однако собственные экспериментальные подтверждения — структурные или моделирующие — в диссертации отсутствуют. Целесообразно указать, что данный механизм носит предположительный характер и требует дальнейшего подтверждения.

### **2. Образование активных форм кислорода.**

В диссертации описано повышение уровня активных форм кислорода (АФК) в хлоропластах, однако отсутствует количественная характеристика их накопления во времени, а также сравнительный анализ между генотипами. Повышенное содержание малонового диальдегида трактуется как признак окислительного стресса, однако конкретные пути образования АФК — например, синглетного кислорода или супероксида — не обсуждаются. Использование дополнительных методов, таких как флуоресцентная окраска DCFH-DA или определение специфических биомаркеров АФК, могло бы подтвердить полученные данные и углубить интерпретацию наблюдаемых эффектов.

### **3. Нарушения электронного транспорта в ФСЦ.**

Изменения параметров JIP-теста и кинетики флуоресценции свидетельствуют о нарушении переноса электронов между  $Q_A$  и  $Q_B$ . Однако остается неясным, связано ли это с прямым действием пестицида на белковый комплекс или с изменением микросреды  $Q_B$ -сайта вследствие изменений в свойствах мембран. Учитывая зафиксированное снижение вязкости мембран и изменения морфологии хлоропластов, представляется обоснованным



рассмотреть возможность опосредованного мембранного механизма действия.

#### **4. Конформационные изменения каротиноидов.**

Различия в спектрах комбинационного рассеяния интерпретируются как изменения конформации каротиноидов у различных генотипов кукурузы. Однако связь этих изменений с фотозащитной функцией каротиноидов в PSII остаётся не раскрытой. Следовало бы пояснить, каким образом изменения конформации могут влиять на эффективность дезактивации возбуждённых состояний хлорофилла и предотвращение фотодеструктивных процессов.

#### **5. Морфология хлоропластов.**

АСМ выявила изменение формы хлоропластов и сглаживание рельефа их мембранной поверхности. Однако в отсутствие данных, полученных с использованием методов более высокой разрешающей способности (например, трансмиссионной электронной микроскопии), выводы о разрушении тилакоидных мембран следует формулировать осторожно — как рабочую гипотезу.

#### **6. Сравнение генотипов кукурузы.**

В работе показаны различия между гибридной и инбредной линиями кукурузы в реакции на инсектицид, подтверждённые спектроскопическими и физиологическими данными. Однако не обсуждаются возможные внутренние причины этих различий. В дискуссии уместно было бы хотя бы кратко обозначить потенциальные механизмы — например, различия в составе мембран или в активности антиоксидантной системы.



В диссертации указано, что тиаметоксам при корневом внесении улучшает функциональные параметры  $PI_{ABS}$ , тогда как при опрыскивании приводит к их снижению. Однако механизмы, объясняющие эти различия, не обсуждаются. Возможно, стоит рассмотреть влияние способа внесения на метаболизм инсектицида и пути его трансформации в растении.

#### **8. Недостаточное внимание к физиологическим параметрам.**

Несмотря на подробный анализ фотосистем, влияние инсектицидов на общий метаболизм растения — в частности, на интенсивность дыхания или синтез вторичных метаболитов — не рассматривается. Включение таких данных могло бы существенно дополнить общую картину действия пестицидов на растения.

#### **9. Недостаток количественной визуализации данных о морфологии хлоропластов.**

Атомно-силовая микроскопия выявила изменения формы и рельефа хлоропластов под действием клотианидина, однако в диссертации отсутствует количественная оценка этих изменений (например, соотношение площади гранальных структур до и после обработки). Введение таких параметров сделало бы выводы более обоснованными и воспроизводимыми.

#### **10. Отсутствие контроля побочных эффектов используемых методик.**

Применение DCBQ и других искусственных акцепторов электронов может оказывать влияние на результаты измерений скорости электронного транспорта. В диссертации не рассматривается, каким образом использование этих веществ может исказить интерпретацию полученных данных. Уточнение этого аспекта помогло бы повысить надёжность выводов.



## Заключение.

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 **Хао Цзинжао** на тему: «Исследование молекулярных механизмов действия пестицидов на фотосинтетический аппарат высших растений» соответствует специальности **1.5.2 – Биофизика (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 **Хао Цзинжао** заслуживает присуждения ученой степени кандидат биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник.

Лаборатория физиологических и молекулярных механизмов адаптации,

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии Наук,

Пашковский Павел Павлович

Контактные данные:

тел.: \_\_\_\_\_, e-mail: \_\_\_\_\_

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

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