

В диссертационный совет 6D.KOA-038
при Таджикском национальном
университете Адрес :734061, Республика
Таджикистан г. Душанбе, улица Буни-
Хисорак, корпус 16. E- mail: sayram75@
mail.ru

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Сайфудинова Ахлиддин Киёмовича «Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений.

Актуальность темы. Исследования Сайфудинова Ахлиддин Киёмовича направлены на исследование механизма действия цитокининов на молекулярном уровне, которые в последние годы успешно развиваются. Известно, что кинетин - это тип цитокинина, класс растений гормона, который способствует делению клеток.

Цитокинины способствуют превращению этиопластов в хлоропласты, формированию системы внутренних мембран и сборке компонентов электрон – транспортной цепи хлоропластов, активации циклического фотофосфорилирования, возрастанию синтеза хлорофилла, синтеза многих ферментов, особенно ключевого фермента фотосинтеза - рибулозобисфосфат карбоксилазы/оксигенезы. Особенно успешно цитокинины находят практическое применение в агропроизводстве. Их используют для усиления кущения растений, для активной всхожести семян, проявление устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым ситуациям, различным заболеваниям. Цитокинины совместно с ауксинами применяют в биотехнологии при выращивании клеточных и каллусных линий при получении трансгенных растений. Поэтому исследования по влиянию

кинетина на активность ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина в листьях арабидопсиса и хлопчатника являются актуальными.

Целью исследования явилось сравнительное изучение кинетики каждой в отдельности ферментативной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника.

Изучение влияния кинетина (6-БАП) *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса в онтогенезе растений арабидопсиса и хлопчатника и определение фаз развития растений, наиболее чувствительных к недостатку содержания цитокининов в листьях: выявление механизма действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса.

Для решения поставленной цели Диссертант решил следующие задачи:

Задачи исследования:

1. провести кинетические исследования рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника при использовании различных субстратов;
2. изучить в онтогенезе растений влияние различных концентраций и способов добавления кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и его мутантов, а также хлопчатника;
3. изучить зависимость от фазы развития растений влияния различных концентраций кинетина *in vitro* на ферментативные

активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника при использовании различных субстратов;

4. определить действие экзогенного кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в препаратах различной степени очистки из листьев хлопчатника;

5. исследовать механизм действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина.

Научная новизна полученных результатов диссертационной работы состоит в том, что впервые проведено сравнительное изучение кинетического поведения ключевых ферментов фотосинтеза - рибозофосфатизомеразы, фосфорibuлокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы/ оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника в зависимости от генотипа растений.

Выявлено, что ферментативные реакции, катализируемые мультиферментным комплексом из листьев хлопчатника имеют более высокие значения в сравнении с комплексом из листьев арабидопсиса. Это связано с тем, что для мультиферментного комплекса из листьев хлопчатника характерны более сложные и быстрые положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц ферментов. Поэтому, за более короткое время достигаются высокие каталитические активности, значительно превышающие максимальные скорости реакций мультиферментного комплекса из листьев арабидопсиса.

Автором установлено, что при трёх испытанных способах добавления экзогенного кинетина в процессе гомогенизации листьев, в реакционную среду, или в процессе гомогенизации листьев, и в реакционную среду, оптимальным для активации ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса независимо от возраста растений оказались добавление его в реакционную среду.

Показано, что наибольшее активирующее действие на ферментативные активности независимо от объекта, кинетин оказывал в концентрации 2 мкмоль/мл реакционной среды. Наибольшее активирующее действие – 300% или в три раза больше кинетин оказал на рибозобисфосфаткарбоксилазную активность мультиферментного комплекса в экстрактах листьев арабидопсиса расы Энхайм и в 2.5 раза в экстрактах листьев хлопчатника.

Выявлена онтогенетическая зависимость активирующего действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса исходной расы – Энхайм и 59/15. Высокая степень активного действия кинетина проявлялась или у очень молодых – шестнадцатидневных растений, или у очень старых – тридцативосьмидневных. Автор считает, что это связано с недостаточным содержанием эндогенных цитокининов, как в листьях очень молодых растений, так и в листьях старых растений.

При очистке экстрактов из листьев хлопчатника на стадии гель-хроматографии из листьев хлопчатника на стадии гель-хроматографии на колонке с Сефадекс G-200, установленная способность ферментов мультиферментного комплекса активироваться кинетином полностью терялась. Данные результаты показывают (свидетельствуют о том, что при гель-хроматографии на Сефадексе-200 происходит застревание (накопление) рецептора кинетина, или вторичного мессенджера (усилителя сигнала), имеющих белковую природу, молекулярная масса, которых намного меньше 500 кДа.

При изучении влияния кинетина разной концентрации в реакционную среду на фосфорибулокиназную и рибубисфосфаткарбоксилазную активность в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в присутствии собственных специфических субстратов и при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата обнаружено, что степень активирующего действия кинетина на ферменты была значительно выше при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата, а не в присутствии рибулозо – 5-

фосфата или рибулозо – 1,5 – бисфосфата. Механизм действия кинетина заключается в том, что, возможно он выполнял роль аллостерического эффектора вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости реакции этих трёх ферментов. Полученные результаты интересны и поэтому следует провести дальнейшие исследования.

Автором установлена зависимость активности кинетина на фосфорибулокиназную активность в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в процессе вегетации. Для высокой активности (80%) фосфорибулокиназной активности мультиферментных комплексов в фазе цветения растений при сравнении с фазой 5-6 настоящих листьев и бутонизации, необходимы более высокие концентрации кинетина, т. е. необходимо дополнительное количество кинетина.

Теоретическая ценность исследования Результаты исследований показали важность и необходимость изучения зависимости от генотипа растений кинетического поведения ключевых ферментов темновой фазы фотосинтеза – рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы и рибозобисфосфаткарбоксилазы/ оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина.

Исследования ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина в процессе вегетации имеют важное значение для понимания и дальнейшего изучения механизмов регуляции физиолого – биохимических процессов в процессе жизни растений, их адаптация к постоянно меняющимся внешним факторам.

Данные о зависимости влияния экзогенного кинетина от генотипа, фазы развития растений, от его концентрации и степени очистки ферментных препаратов необходимы для решения ряда теоретических и прикладных задач физиологии и биохимии продукционного процесса растений, при разработке тестов и биотехнологической и селекционной работе для оценки продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений.

Практическая значимость работы состоит в том, что полученные результаты подтвердили важность изучения для фитотехники для выявления фаз развития растений, когда им недостаточно содержание собственных эндогенных фитогормонов, поэтому они становятся стресс – чувствительными или стресс неустойчивыми в зависимости от влияния эколого – климатических условий (засуха, засоленность, затопление и т.д.).

Создание растений с определёнными изменениями систем гормональной регуляции и хорошей защитной реакцией, а также для понимания и дальнейшего изучения механизмов регуляции цитокининами функционирования фотосинтетического аппарата высших растений, необходимы для биотехнологических и селекционных работ.

Автором показано, что для сохранения завязей и получения высоких урожаев необходимо листья хлопчатника, обрабатывать раствором кинетина, в фазе цветения растений.

В процессе проведения исследования Автором получен патент РТ (Способ повышения активности ключевых ферментов фотосинтеза листьев хлопчатника, патент № 1329, 26.04.2023г.). Получен АКТ внедрения результатов научно – исследовательской работы по теме «Влияние стрессорных факторов на различные физиолого-биохимические процессы результатов научно- исследовательской работы в учебный процесс».

Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций по биохимии, физиологии и биотехнологии растений, при спецкурсах по фотосинтезу, фитогормонам, энзимологии на биологических факультетах ВУЗ-ов, а также можно использовать при проведении различных лабораторных практикумов, выполнении дипломных, магистерских и диссертационных работ.

Достоверность полученных результатов подтверждается в исследовательской работе, в результатах и выводах, обеспечивается чёткой постановкой задач исследования, обоснованные выбором объектов и современных методов изучения, достаточным объёмом полученных данных

для диссертации и их статистическим анализом. Приборы, на которых проводили измерения все эксперименты подвергались регулярным проверкам, повторностью проведенных экспериментов.

Результаты и основные положения диссертации обсуждались на международных и республиканских конференциях. По материалам диссертации опубликовано 30 научных статей, из них 14 в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК РФ и Российской Федерации, 1 монография, 1 патент и 1 внедрение.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Исходя из этого, полученные результаты, выводы и рекомендации следует считать достоверными.

Оценка содержания диссертации

Представленная диссертация изложена на 220 страницах, состоит из введения, 6-ти глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (427 наименований), приложения, содержит 14 таблиц и 52 рисунка.

В введении рассматривается актуальность исследований, формулируется цель и задачи работы. Обоснована научная новизна и научно-практическая значимость работы. Представлены положения, выносимые на защиту, указано соответствие паспорту научной специальности, апробация, опубликование результатов и структура диссертации.

В обзоре литературы (27-87) автор систематизирует данные опубликованных работ, посвященных свойствам фитогормонов и специфических функций цитокининов и их практическим различным аспектам исследований фенольных соединений – классификации, строению и свойствам, накоплению в растениях, физиолого-биохимическим функциям и т.д.

Во второй главе, в экспериментальной части представлены объекты и методы исследования (стр.85-104).

Автором дана характеристика выбранных объектов исследования, подробно представлены методы исследований по выделению, проведению

очистки многоферментного комплекса из листьев хлопчатника и арабидопсиса, приведены определения активностей изученных ферментов.

Проведена статистическая обработка результатов.

Диссертантом в третьей-шестой главах описаны результаты и обсуждения кинетических исследований ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина из листьев арабидопсиса и хлопчатника (глава 3-105-126; глава 4 -127-145; глава 5 -145-159; глава 6 -160-174).

Диссертантом проведены кинетические исследования ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и хлопчатнике сорта 108-Ф. Выявлены оптимальные условия реакционной среды для проявления ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника. У хлопчатника кинетические кривые имели более сложную сигмоидную форму на графике. Показано, что активность фермента из листьев хлопчатника значительно превосходит активность фермента из листьев арабидопсиса. В последующих опытах Диссертант использовал 10мкг белка в 1мл реакционной среды.

Диссертантом доказано, что рибозо-5-фосфат является аллостерическим эффектором фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы, что подтверждено результатами, полученными при изучении зависимости скоростей фосфорибулокиназной и карбоксилазной реакций мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника от концентрации собственных специфических субстратов.

Сайфудиновым получены интересные данные о более эффективной и быстрой активации кинетином фосфорибулокиназной и карбоксилазной реакций при использовании первого субстрата метаболической цепи, что свидетельствует о большей чувствительности к кинетину мультиферментного комплекса. Более эффективная или высокая активация

кинетином рибулозобисфосфаткарбоксилазной реакции указывает на проявление в мультиферментном комплексе координированной регуляции активности ферментов, когда конформационные изменения, вызванные активатором или ингибитором с одного фермента комплекса фосфорибулокиназы передаются с помощью различных контактов на другой фермент комплекса – рибулозобисфосфаткарбоксилазу.

Таким образом, совокупность полученных Диссертантом результатов свидетельствует о том, что для кинетина характерны общие для всех фитогормонов свойства, а именно поливалентность и полифункциональность действия.

Даны заключение и выводы по результатам диссертации.

Выводы соответствуют целям и задачам исследования, отличаются корректностью и полностью отражают полученные результаты.

Диссертантом даны рекомендации по практическому применению, которые вполне отражают, полученные в ходе исследований результаты.

Получен патент № ТЈ 1329 – Способ повышения активности ключевых ферментов фотосинтеза листьев хлопчатника. 26.04.2022

Все источники, использованные в работе указаны в списке литературы.

Диссертация изложена последовательно, в логичном стиле, доступным научным языком. Структура диссертации соответствует излагаемому материалу.

Автореферат диссертации полностью соответствует диссертации

Тем не менее, считаю необходимым отметить отдельные недостатки работы:

1. В разделе – обзор литературы изложен на 60(стр.27-87) страницах, подробно приведены обзоры многих литературных источников. Где приведены, рисунки и формулы, схемы очистки ферментов и т.д., что составило очень большой текст.
2. В экспериментальной части приведены фото арабидопсиса(стр92-93), очень похожие на фото, приведённые в Атласе «Генетическая

коллекция арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* Heynh) 2010г Усмановой О.В., если эти фото из Атласа, нужно подписать фамилию автора

3. В таблице 1, 4. диссертации (стр.94,141), где приведены результаты по интенсивности фотосинтеза, неправильно написана формула углекислого газа $^{14}\text{CO}_2$,
4. График №52 неправильны обозначения оси ординат и абсцисс $^{14}\text{CO}_2$, нет надписи, в диссертации – стр.190, в автореферате – стр. 27
- 5.В таблице 2 – слово Энххайм-написан на латинском яз.-стр. 94.
6. В выводах №4; № 8 требуются исправления стилистического характера,
7. В текстах диссертации и автореферата имеются опечатки и некоторые стилистические ошибки: стр.95- написано – поля института, на которых производился хлопчатник относится Институту Ботаники и т.д., но нет полного названия института.

Следует отметить, диссертация выполнена на высоком научном уровне и представляет собой законченное исследование, изложена грамотно, но имеются стилистические и орфографические упущения. Эти указанные замечания можно считать несущественными, вполне устранимы и не снижают достоинство работы. Полученные результаты вносят важный вклад в определения механизма биохимии ключевых ферментов фотосинтеза и имеют высокую научную новизну и практическую значимость.

Заключение по диссертационной работе

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Сайфудинова Ахлиддин Киёмовича «Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия является законченным научным исследованием, выполненным на актуальную тему, на высоком методическом уровне, имеющим научную новизну и практическую значимость.

Диссертационная работа отвечает всем требованиям Высшей аттестационной комиссии при Президенте Таджикистана, предъявляемым к докторским диссертациям в соответствии с положением о присвоении ученых званий, утвержденного Правительством РТ 30 июня 2021 г. №267, а ее автор Сайфудинов Ахлиддин Киёмович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент,
Главный научный сотрудник
лаборатории генетики и
селекции растений, д.б.н.,
Профессор



Ниязм
Ниязмухамедова М. Б.

Ниязмухамедова Мукадам Бабаджанова научная, специальность: 03.00.12
– «Физиология и биохимия растений»

Адрес: 734017, г. Душанбе, ул. Каримова, 27
(734063, г. Душанбе, ул. Айни 299/2)
ibfgr@bk.rue-mail: Mukadam.44@mail.ru

Подпись Ниязмухамедова М.Б. заверяю:

Начальник отдела кадров

«04» 09 2023г.



Подпись _____
ЗАВЕРЯЮ
инспектор О: _____
04 " 09 2023