

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Сайфуддинова Ахлиддина Қиёмовича на тему: «Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растения» на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Актуальность темы. Тема диссертационной работы Сайфуддинова А.К. актуальна, поскольку посвящена изучению влияния фитогормона кинетина на активность мультиферментного комплекса ключевых ферментов темновой фазы фотосинтеза (цикла Кальвина) в онтогенезе растений. Особый акцент автором в работе сделан на использование современных биотехнологических методов и впервые проведены сравнительные кинетические исследования рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфат-карбоксилазной реакций мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и хлопчатника сорта 108-Ф.

Обнаружена зависимость от стадии развития растений скорости рибозофосфатизомеразной реакции мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм. Установлена зависимость от возраста растений, активирующего влияние кинетина на скорость фосфорибулокиназной реакции мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника.

Научная новизна и практическая значимость исследований. Автором впервые проведено сравнительное изучение зависимости от генотипа растений кинетического поведения ключевых ферментов фотосинтеза рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника. Выявлены кинетические параметры каждой из ферментативных реакций, катализируемых мультиферментным комплексом из листьев хлопчатника и арабидопсиса.

Максимальная скорость реакции V_{max} , ферментов из листьев хлопчатника имеет более высокие значения в сравнении с комплексом из листьев арабидопсиса.

Это обусловлено тем, что для мультиферментного комплекса из листьев хлопчатника характерны более сложные и быстрые положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц ферментов. В результате этого за более короткое время достигаются высокие каталитические активности, значительно превышающие максимальные скорости реакций мультиферментного комплекса из листьев арабидопсиса.

Установлено, что из трех испытанных способов добавления экзогенного кинетина: в процессе гомогенизации листьев, в реакционную среду или и в процессе гомогенизации листьев, и в реакционную среду, оптимальным для активации ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса независимо от возраста растений оказалось добавление его в реакционную среду. Изучена зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев исходной расы Энкхайм и его низко продуктивного мутанта 58/15. Наибольшее активирующее действие на ферментативные активности независимо от объекта, кинетин оказывал в концентрации 2 мкмоль/мл реакционной среды. Наиболее активирующее действие 300% или в три раза кинетин оказал на рибулозобисфосфаткарбоксилазную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.

Обнаружена онтогенетическая зависимость активирующего действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса исходной расы Энкхайм и его мутантов - высокопродуктивного - триплекс и низкопродуктивного - 58/15.

Наибольшая степень активирующего действия кинетина проявлялась или у очень молодых - шестнадцатидневных растений, или у очень старых - тридцати восьмидневных. Это связано, по-видимому, с недостаточным

содержанием эндогенных цитокининов как в листьях очень молодых растений, так и в листьях старых растений.

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

Полученные результаты дают основание полагать, что гормон кинетин выполнял в данном случае роль аллостерического эффектора, вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости рибозофосфатизомеразной, фосфорилбулокиназной и рибулозобисфосфаткарбоксилазной реакции. Механизм действия других фитогормонов может быть иным, чем у кинетина. В будущем необходимо провести дальнейшие специальные исследования. Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты проведенных экспериментальных исследований Сайфудинова А.К. имеют важное значение для фито техники при разработке методов обработки растений экзогенными цитокининами или их аналогами в те фазы развития растений, когда им недостаточно содержания собственных эндогенных фитогормонов, вследствие чего они становятся стресс-чувствительными или стресс-неустойчивыми при неблагоприятных экологических факторах (засуха, засоленность, затопление и т.д.).

У хлопчатника сорта 108-Ф установлено, что наиболее чувствительными для действия кинетина являются экстракты из растений в фазах и особенно цветения. Также это важно для биотехнологических и селекционных работ по созданию растений с направленными изменениями систем гормональной

регуляции и хорошей защитной реакцией, для понимания и дальнейшего изучения механизмов регуляции цитокининами функционирования фотосинтетического аппарата высших растений

Рекомендации по использованию и апробации результатов исследования.

Полученные данные можно рекомендовать для чтения лекций по общим курсам биохимии, физиологии и биотехнологии растений, спецкурсов по фотосинтезу, фитогормонам, энзимологии на биологических факультетах ВУЗ-ов.

Результаты проведённых исследований были доложены на ежегодных апрельских научно-практических конференциях профессорско-преподавательского состава Таджикского национального университета (Душанбе 2013-2021), материалах научной конференции, посвященной 60-летию образования Академии наук РТ «Физиология растений и проблемы развития растениеводства в Таджикистане» (Душанбе, 2011); на 5-той международной конференции «Экологические проблемы и рациональное использование природных ресурсов» (Душанбе 2012); «Экологические особенности биологического разнообразия» (Худжанд, 2013); в материалах Республиканской конференции «Достижения современной биохимии, теоретические и прикладные аспекты» (Душанбе, 2016); материалах республиканской научно теоретической конференции кафедры ботаники ТНУ «Проблемы таксономии растительности Таджикистана» (Душанбе, 2017); в материалах республиканской конференции «Достижения современной биологии в Таджикистане» (Душанбе, 2017), республиканской научно теоретической конференции «Влияние глобального изменения климата на продуктивность агроэкологических систем в Республике Таджикистан», посвященной Международному десятилетию «Вода для устойчивого развития на 2018-2028 гг.», в конференции, посвященной 70-летию Таджикского Государственного национального университета (Душанбе, 2018), материалы VIII-ой международной конференции «Экологические особенности

биологического разнообразия» (Таджикистан, г. Худжанд, 3- 4 октября 2019 г.), республиканской 26 конференции «Достижения современной биохимии в Таджикистане» (Душанбе, 2020), материалы международной научной конференции «Становление и развитие экспериментальной биологии в Таджикистане» (Душанбе, 2022), Международной научной конференции «Становление и развитие экспериментальной биологии в Таджикистане» Душанбе 2022.

Краткая характеристика основного содержания диссертации. Диссертация Сайфуддинова Ахлиддина Киёмовича состоит из введения, 6 глав заключения, выводов, списка цитируемой литературы.

Во введении обосновывается актуальность диссертационного исследования; формулируется цель и основные задачи работы; описывается предлагаемый автором подход к решению поставленных задач; характеризуется степень новизны полученных результатов и их апробация. Кроме того, дается краткое изложение содержания диссертации.

В первой главе автор рассматривает вопросы изученности фитогормонов, и она охватывает 63 страницах. Данная глава хорошо иллюстрирована рисунками и схемами.

Вторая глава посвящена материалам и методике проведения эксперимента. А.К. Сайфуддинов в этой главе раскрывает основные методы исследования и характеризует объекты исследования. Изложен подход проведения экспериментов. Автором проводится краткая характеристика объектов. Как выяснилось автором в рамках настоящего исследования, использованы такие объекты, как листья хлопчатника средневолокнистого (латинское обозначение - *Gossypium hirsutum* L., Malvaceae), относящиеся к сорту 108-Ф. Кроме того, в процессе проведения исследования использовался арабидопсис (латинское обозначение - *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Cruciferae)) вместе с мутантами (триплекс, 58/15). данная глава также хорошо иллюстрированы таблицами и рисунками.

В третьей главе автором приведены результаты исследования влияния длительности реакции, количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде на активность рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы и карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса. Подобраны оптимальные условия реакционной среды для проявления рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм. Кинетические исследования показали, что для проявления максимальной активности каждого из трех ферментов мультиферментного комплекса достаточна длительность реакции 1 минута. Кривые зависимости всех трёх ферментативных активностей мультиферментного комплекса от количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде имели самые разнообразные сложные сигмовидные формы, отражающие характер взаимодействий между собой активных центров субъединиц ферментов.

Установлено, что для проявления максимальной рибозофосфатизомеразной фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультифер- 126 ментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм оптимальными в 1 мл реакционной среды являлись 10 мкг белка, 10 мкмоль рибозо-5-фосфата, 10 мкмоль АТФ и 50 мкмоль углекислоты (NaHCO_3).

Четвертая глава работы освещает результаты исследования о влиянии продолжительности реакции, количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную, фосфорибулокиназную и рибулозобисфосфаткарбоксилазную активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.

Кинетические исследования автора показали, что для проявления максимальной активности каждого из трех ферментов мультиферментного комплекса достаточна длительность реакции 0.5-1 минута. Кинетические кривые зависимости всех трех ферментативных активностей мультиферментного комплекса от количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде имели очень сложные сигмовидной образные формы с несколькими точками загибов, отражающих сложные конформационные изменения в молекулах ферментов.

При проявлении активности ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина характерны положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц ферментов.

Автором установлено, что для проявления максимальной рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозо-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф оптимальными в 1 мл реакционной среды являлись 5 мкг белка, 10 мкмоль рибозо-5-фосфата, 10 мкмоль АТФ, 50 мкмоль углекислоты и длительность реакции 0,5-1 минута.

Пятая глава диссертации раскрывает, вопросы сравнительного исследования о влияния различных способов добавления кинетина в процессе гомогенизации листьев, в реакционную среду, или и в процессе гомогенизации листьев, и в реакционную среду на проявление рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев различного возраста растений арабидопсиса расы Энкхайм. Из трех способов наибольшее активирующее действия кинетина проявлялось при добавлении его в реакционную среду. Автор установил, что активация кинетином рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса не зависела от возраста растений.

Опыты автора показал, что у шестнадцатидневных и двадцати восьмидневных растений арабидопсиса расы Энкхайм добавление кинетина в процессе гомогенизации листьев вызывало незначительное – на 15%

возрастание рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина, а у тридцати восьмидневных значительную активацию фермента – на 38%.

Полученные результаты дают основание предполагать, что кинетин без посредников оказывает прямое активирующее действие на фермент мультиферментного комплекса. Установлена онтогенетическая зависимость от возраста растений активности рибозофосфатизомеразы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.

Изучение влияния концентрации кинетина в реакционной среде на активность фосфорибулокиназы мультиферментного комплекса показало, что наибольшее активирующее действие на фермент оказывало 2 мкмоль/мл и в экстрактах из листьев арабидопсиса исходной расы Энкхайм, и его низкопродуктивного мутанта 58/15. Степень же активации фермента кинетином была разной: у исходной расы – 78%, у мутанта – 59%.

Установлена общая закономерность для трёх ферментов мультиферментного комплекса: наибольшее активирующее действие кинетин оказывал в концентрации 2 мкмоль в 1 мл реакционной среды.

Шестая глава диссертации посвящено исследованию действия кинетина *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника.

В данной главе приведены результаты изучения влияния кинетина при его добавлении в реакционную среду на скорость фосфорибулокиназной и карбоксилазной реакций в ферментных препаратах различной степени очистки, которые были выделены из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в возрасте растений 4-5 настоящих листьев.

В экстрактах из листьев растений хлопчатника сорта 108-Ф различного возраста (5-6 настоящих листьев, бутонизации и цветения) было определено влияние добавления кинетина в реакционную среду на скорость фосфорибулокиназной и карбоксилазной реакций.

Дважды определялась каждая ферментативная активность в присутствии собственных специфических субстратов ферментов – для фосфорибулокиназы – рибулозо-5-фосфата+АТФ и для рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы-рибулозо - 1,5-бисфосфата и при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ.

В рамках настоящего исследования определено, как изменяется фосфорибулокиназная активность поли ферментного образования, изготовленного из хлопчатниковых листьев, в зависимости от увеличения или уменьшения количества кинетина. В ходе экспериментальных исследований использовались как рибулозо-5-фосфат, так и рибозо-5-фосфат. Автором было выявлено, что при применении рибозо-5-фосфата кинетин оказывал значительно более существенное активирующее влияние. Из этого следует, что кинетин выполняет в данном случае роль эффектора, вызывающего координированные конформационные изменение в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости и рибозофосфатизомеразной, и фосфорибулокиназной реакций.

Кроме того, научные разработки позволили определить существование онтогенетической зависимости активирующего влияния, оказываемого кинетином на фосфорибулокиназную активность, демонстрируемую полиферментным комплексом. Для значительной (80%) активации фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в фазе цветения растений в сравнении с фазой 5-6 настоящих листьев и бутонизации необходимы были более высокие концентрации кинетина.

В целом положительно оценивая диссертационную работу Сайфуддинова Ахлиддина Қиёмовича в месте с тем, следует указать некоторые недостатки и упущения, которые встречается в работе:

1. Список литературы приведён не в хронологической, последовательности, надо бы для одного автора список трудов привести с раннего к более поздней публикации.

2. Обзор литературы частично посвящено вопросам исторического характера исследования, фитогормонами и к теме диссертации оно не имеет непосредственного отношения;

3. Выбор оптимального варианта эксперимента с использованием экзогенного кинетина, проводилось только для одного из объектов надо было провести для двух видов;

4. В тексте диссертации и автореферата имеется большое количество ошибок и опечаток (до 5-6 на одну страницу текста).

5. При оформлении текста также следовало бы соблюдать правила технического редактирования. Погрешности в оформлении затрудняют чтение и понимание работы.

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования.

В целом диссертация Сайфуддинова Ахлиддина Қиёмовича на тему: «Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений» является законченным научным исследованием, представляет решение актуальных задач в области физиологии и биохимии растений. Автореферат диссертации изложен, доступно, отражает основные этапы работы, основывается на содержании диссертации, по содержанию и объему соответствует требованиям, предъявляемым к оформлению автореферата.

Материалы диссертации нашли полное отражение на 30 работ, 14 из них входят в перечень ВАК при Президенте Республики Таджикистан, а также автором опубликована одна монография и одна методическая разработка. Получено 1- авторских свидетельства, два внедрения.

Диссертация написана на русском языке, на 220 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 6 глав заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающей в себя 171 источника, приложения, содержит 14 таблиц и 52 рисунка.

Диссертационная работа выполнено автором самостоятельно на достаточном научном уровне. Доля личного участия автора в получении результатов исследований очень высокая и составляет более 79.9 %.

Общее заключение. Рассматриваемая диссертационная работа Сайфудинова А.К. является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на хорошем научном уровне. Считаю, что диссертационная работа Сайфудинова соответствует требованиям ВАК при Президенте Республики Таджикистан к докторским диссертациям согласно «Типового положения о диссертационном совете» и порядок присуждения ученых степеней и присвоения ученых званий и утвержденных постановлением правительства РТ от 26 ноября 2016 г. № 505, и ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05- Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент: Абдурахманов Нуритдин Атакузиевич, заведующий кафедрой медицинской биологии с основами генетики Медико - социальный института Таджикистана, доктор биологических наук (специальность - 03. 00. 12 - Физиологий растений и 06. 01.11-Защита растений). Телефон 918985646 (моб). Email: Dtit082020@gmail.com

 Н.А. Абдурахманов
Медико - социальный институт Таджикистана. Адрес: 734025, Республика Таджикистан, г. Душанбе, улица Клары Цеткина- 2.Тел: (+992) 918 67 74 48

Подпись Абдурахманова Н.А. заверяю:
Начальник отдела кадров


« 08 / 09 2023 г

Муминзода С.Р.