

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор Таджикского аграрного  
университета им. Ш. Шотемура доктор  
сельскохозяйственных наук, профессор  
Махмадёрзода У.М.



2023г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации – Таджикского аграрного университета им. Ш. Шотемура на диссертационную работу Сайфудинова Ахлиддина Киёмовича "Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растения " на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений

**Актуальность исследования.** Тема диссертационной работы Сайфудинова А.К. актуальна, поскольку посвящена изучению влияния 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 рибулозобисфосфаткарбоксилазной реакций мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и хлопчатника сорта 108-Ф.

Автором 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.

Представленная диссертационная работа Сайфудинова А.К. является актуальной и представляет теоретическую и практическую значимость, так как имеет оригинальные материалы, в области физиологии и биохимии растений.

**Достоверность и обоснованность научных положений и выводов диссертации.** Достоверность экспериментальных данных, полученных современными физиолого – биохимическими методами исследований с использованием сертифицированного оборудования подтверждается достаточной повторностью, воспроизводимостью и статистической обработкой результатов.

Научная новизна исследования. Впервые проведено сравнительное изучение зависимости от генотипа растений кинетического поведения ключевых ферментов фотосинтеза рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника.

- Величины максимальной скорости реакции  $V_{max}$ , каждой из ферментативных реакций, катализируемых мультиферментным комплексом из листьев хлопчатника имеют 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 низкопродуктивного мутанта 58/15.

- 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 – тридцативосьмидневных. 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 застревание (задержка) рецептора кинетина, или (и) «вторичного» мессенджера (усилителя сигнала), имеющих белковую природу, молекулярная масса которых намного меньше 500 кДа.

- Установлена онтогенетическая зависимость активирующего действия кинетина на фосфорибулокиназную активность мультиферментных комплексов цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф. Показано, что для значительной активации (80%) фосфорибулокиназной активности мультиферментных комплексов

в фазе цветения растений в сравнении с фазой 5-6 настоящих листьев и бутонизации необходимы более высокие концентрации кинетина. Полученные данные свидетельствуют о том, что в фазе бутонизации и цветения растения хлопчатника необходимо дополнительное количество кинетина.

#### **Значимость результатов исследования для науки и практики.**

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

Онтогенетические исследования ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина имеют важное значение для понимания и дальнейшего изучения механизмов регуляции физиолого-биохимических процессов в течение жизни растения и его адаптации к постоянно меняющимся внешним факторам.

Полученные экспериментальные данные о зависимости влияния экзогенного кинетина от генотипа, фазы развития растений, от его концентрации, степени очистки ферментных препаратов необходимы для решения ряда теоретических и прикладных задач физиологии и биохимии продукционного процесса растений, при разработке тестов в биотехнологической и селекционной работе для оценки продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений. Совокупность полученных результатов экспериментальных исследований имеют важное значение для развития теории ферментативного катализа.

Практическая ценность исследования. Результаты проведенных экспериментальных исследований имеют важное значение для фитотехники 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.). 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.

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, а также использовать при проведении различных лабораторных практикумов, выполнении дипломных, магистерских и диссертационных работ.

#### **Оценка содержания диссертации и её завершённости:**

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.

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. Сайфудинов 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 иллюстрирована 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 Энхайм. 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 сигмоидные формы, отражающие характер взаимодействий между собой активных центров субъединиц ферментов.

Установлено, что для проявления максимальной рибозофосфатизомеразной фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультифер-

ментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм оптимальными в 1 мл реакционной среды являлись 10 мкг белка, 10 мк моль рибозо-5-фосфата, 10 мк моль АТФ и 50 мк моль углекислоты ( $\text{NaHCO}_3$ ).

**Четвертая глава работы освещает** результаты исследования о влиянии продолжительности реакции, количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную, фосфорibuлокиназную и рибулозо**бис**фосфаткарбоксилазную 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 сигмоиднообразные 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 рибозофосфати-зомеразной, фосфорibuлокиназной и карбоксилазной активности рибулозо-**бис**фосфаткарбоксилазы /оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф оптимальными в 1 мл реакционной среды являлись 5 мкг белка, 10 мк моль рибозо-5-фосфата, 10 мк моль АТФ, 50 мк моль углекислоты и длительность реакции 0,5-1 минута.

**Пятая глава диссертации** раскрывает, вопросы сравнительного исследования о влиянии 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 тридцативосьмидневных значительную активацию фермента – на 38%.

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 посвящена 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 полиферментного 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 изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости и рибозофосфатизомеразной, и фосфорибулокиназной реакций.

**Соответствие диссертации и автореферата требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.**

Диссертант в целом полностью справился с решением поставленных перед ним задач. В разработке методологии, проведении научных исследований, в получении, анализе и разработке поставленных проблем, автор имеет весомый вклад. Анализ полученных материалов, адекватность и полнота использованных методов научного исследования характеризуется высоким уровнем и не вызывает сомнений.

Объем и методы исследования изложены в соответствии с поставленными задачами. Соискателем использованы общепринятые апробированные методы исследований, что позволяет, говорит о достоверности полученных результатов.

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

Результаты исследования широко апробированы на различных симпозиумах, конференциях и семинарах.

Содержание автореферата полностью соответствует научным материалам, представленным в диссертационной работе

**Диссертационная работа А.К. Сайфудинова оценена положительно, но необходимо отметить некоторые замечания:**

1. Научную новизну и практическую значимость работы можно было представить еще в более доступном виде.

2. В конце лит обзора можно было бы одним предложением сформулировать итог этого раздела и переход к следующему.

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

4. Некоторые энзимологические понятия и термины требуют более ясного объяснения.

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, диссертационная работа Сайфудинова Ахлиддина Киёмовича представляет собой завершённый научный труд, выполненный на высоком методическом уровне. Основные научные результаты и рекомендации отражают содержание работы, и характеризуются обоснованностью.

## Заключение

Диссертация Сайфудинова Ахлиддина Киёмовича на тему: «Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растения» по актуальности темы, научной новизне, практической значимости, содержанию и объему, творческому подходу, достоверности и обоснованности научных положений соответствует требованиям «Типового положения о диссертационных советах» ВАК при Президенте Республики Таджикистан от 26 ноября 2016 г., №505, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений.

Отзыв диссертации обсужден на заседании Учёного совета Таджикского аграрного университета им. Ш. Шотемура, протокол № 1 от «26» августа 2023 г.,

Председатель, заведующий кафедрой  
физиологии растений, биотехнологии и шелководства  
ТАУ им. Ш. Шотемура, кандидат  
сельскохозяйственных наук, доцент

Кадиров Ф.Т.

Эксперт  
Доктор биологических наук,  
профессор кафедры физиологии растений,  
биотехнологии и шелководства  
ТАУ им. Ш. Шотемура

Каримов М.К.

Секретарь

Мирзоева С.К.

Подписи Кадирова Ф.Т., Каримова М.К. и  
Мирзоевой С.К., Заверяют  
Заведующий отделом правового обеспечения  
и кадров ТАУ им. Ш. Шотемура



28.08.2023  
Абдухалимзода Н.А.

Адрес организации: Адрес: 734003, Республика Таджикистан, г. Душанбе,  
пр. Рудаки 146. Таджикский аграрный университет им. Ш. Шотемура  
Тел.: (+99237) 224-72-07, E-mail: rectortau31@mail.ru, www.tajagroun.tj.