

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор Таджикского национального
университета д.т.н. профессор,
Хушвахтзода К.Х.

« 5 » _____ 2022



ЗАКЛЮЧЕНИЕ УЧЕНОГО СОВЕТА БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА ТНУ

Диссертационная работа Сайфудинова Ахлиддина Киёмовича на тему: «Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений» выполнена на кафедре физиологии растений Таджикского национального университета в Институте ботаники физиологии и генетики растений Национальной Академии наук Таджикистана.

Научные консультанты: доктор биологических наук, профессор кафедры физиология растений Таджикского национального университета, Заслуженный работник Таджикистана **Бабаджанова Мухаббат Абдурахмоновна.**

Тема диссертации было утверждена на заседании кафедры физиология растений Таджикского национального Университет протокол №3 от «16» 10 2016 г.

По материалам диссертации опубликовано 28 работ, из них 14 работ в журналах, рекомендуемых ВАК Российской Федерации и ВАК Республики Таджикистан. Одна монография и один патент, два внедрения.

Диссертационная работа Сайфудинова Ахлиддина Киёмовича на тему: «Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений» была обсуждена на меж кафедральном расширенном заседании кафедры биохимии, физиология растений, ботаники и кафедры биотехнологии биологического факультета ТНУ и рекомендованы к публичной защите протокол №9 от 20. 04. 2022 г.

Диссертант Сайфудинов А.К. в 1995 году окончил биологический факультет Таджикского государственного университета им. В.И. Ленина (ныне Таджикский национальный университет) по специальности биолог. Кандидатскую диссертацию на тему «**Исследование содержания желчных кислот в желчи и сыворотке крови методом газожидкостной хроматографии**» защитил в 2004 г. по специальности 03.00.04-биохимия.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Обсуждаемая диссертационная работа является самостоятельно выполненной, законченной научно-исследовательской работой, которая посвящена изучению механизмов прямого действия экзогенного кинетина (6-БАП) на ферментативные активности мультиферментного комплекса ключевых ферментов темновой фазы фотосинтеза (цикла Кальвина) листьев высших растений различного возраста.

В работе использовали кинетин, который наряду с другими фитогормонами, участвуют в регуляции множества физиолого-биохимических процессов, включая и регулируя целые физиологические и морфогенетические программы на протяжении всего онтогенеза растений (Куласва, 1973; Полевой, Саламатова, 2004; Haberer, Kieber, 2002).

Цитокинины стимулируют деление и рост клеток, дифференцировку пластид, формирование митохондриального аппарата и шероховатого эндоплазматического ретикулума, задерживают старение листьев, активируют приток метаболитов, а также образование побегов из каллусов в культуре, участвуют в адаптации растений к внешним условиям, определяют общую архитектуру растения, поддерживая оптимальный баланс между объемом надземной и подземной частей растения, регулируют клубенькообразование у бобовых культур, имеют большие возможности и перспективы применения в биотехнологии, сельском хозяйстве, медицине и даже в косметике.

Главной мишенью цитокининов в растительной клетке являются пластиды. 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/оксигеназы.

Такое многообразное влияние цитокининов на хлоропласты обусловлено их участием в регуляции экспрессии генов пластидных белков, кодируемых как ядерными, так и пластидными генами.

Большинство генов пластома кодируют продукты, прямо или косвенно связанные с функционированием фотосинтетического аппарата. Гены напрямую активирующиеся цитокинином были обнаружены у арабидопсиса и кукурузы в 1998 году в лабораториях Дж. Кибера (США) и Т.Сугиямы (Brendstatter, Kieber, 1998; Taniguchi et. al., 1998).

У арабидопсиса обнаружено три рецептора цитокинина. Романову А.Г. (2009; 2011) удалось расшифровать структуру этих рецепторов, даже рассчитать константы сродства различных цитокининов к рецепторам. Исследуются свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов, определяется транскрипционная скорость функционально различных групп генов пластома *Arabidopsis Thaliana*.

Вышеизложенное показывает, что в последнее десятилетие исследования механизма действия цитокининов на молекулярном уровне успешно развиваются.

Очень успешно цитокинины находят и практическое применение. В агропроизводстве их используют для усиления кущения растений, изменения формы и увеличения размеров ряда плодов, повышения доли женских цветков (огурцы и др.), всхожести семян, устойчивости к абиотическим стрессом и болезням, предуборочной дефолиации (хлопчатник и др.) и т.д. Совместно с ауксинами цитокинины применяют в биотехнологии при выращивании клеточных и каллусных линий в стерильной культуре и при получении трансгенных растений.

Исследования проводились Сайфуддинова А.К. выполнены на кафедре физиология растений и биотехнологии Таджикского национального Университета. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 28 работах, 14 из них входят в перечень ВАК при Президенте Республики

Таджикистан, а также опубликована одна монография и одна методическая разработка. Получены 1- авторское свидетельство и два внедрения в учебный процесс и научно-исследовательскую работу.

Цель и задачи исследования. Сравнительные кинетические исследования 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 цикла Кальвина в онтогенезе растений арабидопсиса и хлопчатника и определение стадии развития растений, наиболее чувствительных к недостатку содержания цитокининов в листьях; выявление механизма действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса.

Для достижения поставленной цели были выполнены следующие задачи:

- провести кинетические исследования рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника при использовании различных субстратов;

- 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;

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

- 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;

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

Степень научной новизны результатов. 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.

- Кинетические параметры каждой из ферментативных реакций, катализируемых мультиферментным комплексом из листьев хлопчатника – максимальная скорость реакции V_{max} , сродство к субстрату K_M (константа Михаэлиса) - 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 высокое сродство к субстрату, 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 пизкопродуктивного мутанта 58/15. 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 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 – 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) или (и) рецептора кинетина, или (и) «вторичного» мессенджера (усилителя сигнала), имеющих белковую природу, молекулярная масса которых намного меньше 500 кДа.

- При определении влияния различных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорибулокиназную и рибулозобисфосфаткарбоксилазную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина 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 фермент была значительно выше при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата, а не в присутствии рибулозо – 5 – фосфата или рибулозо – 1,5 – бисфосфата. Полученные результаты дают основание полагать, что кинетин выполнял в данном случае роль аллостерического эффектора, вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфаткарбоксилазной реакции. Механизм действия других фитогормонов может быть другим, чем у кинетина. В будущем необходимо провести дальнейшие специальные исследования.

- 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 цветения растения нуждаются в дополнительном количестве кинетина.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты полученных экспериментальных исследований показали важность и необходимость изучения зависимости от генотипа растений кинетического поведения ключевых ферментов темновой фазы фотосинтеза – рибозофосфатизомеразы, фосфорилбулокиназы 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.

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.

Общие выводы и рекомендации диссертации к защите. Участники заседания ученого совета биологического факультета Таджикского национального университета по предварительной защите диссертационной работы считают, что диссертация Сайфудинова Ахлиддина Киёмовича является самостоятельным фундаментально-прикладным научным трудом и внесет определенный вклад в области физиологии и биохимии растений. Она полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям по специальности 03.01.05–Физиология и биохимия растений соответствует пункту 31-35 требованию ВАК при Президенте Республике Таджикистан от 30 июня 2021г. утвержден под №267. ученый совет на основании положительных отзывов рецензентов и выступивших профессоров (Юлдашев Х., Сатторов Р.Б. и Каримзода А.И.) рекомендует данную работу к защите в диссертационном совете 6D.KOA-038 при Таджикского национального университета

Заключение принято на заседании ученого совета биологического факультета Таджикского национального университета.

Присутствовали на заседании 20 человек

Результаты открытого голосования:

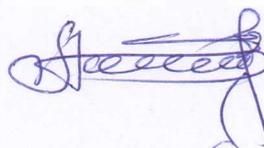
За-20

Против» -нет,

Воздержавшихся» - нет

Протокол № 5 от « 30 » 11.2022

Председатель
учёного совета
д.б.н., профессор



Каримзода А.И.

Ученый секретарь
учёного совета, к.б.н.



Хамидов Х.Н.

Заверяю подпись,
нач. УК и СЧ



Тавкиев Э.Ш.

Адрес: 734025, Республики Таджикистан,
город Душанбе, проспект Рудаки 17
Телефон: (+992 -37) 221 62 25; факс: 227-15-10.
E- mail: info@ tnu.tj