ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Орландо де Хесуса Флореса Каро «МОЛЕКУЛЯРНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА СУКЦИНАТА В ЛИСТЬЯХ *Zea mays L.* И *Triticum aestivum L.* ПРИ АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ НА СОЛЕВОЙ СТРЕСС», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Одним из ключевых направлений исследований в области биохимии и физиологии растений является изучение механизмов адаптации растительных организмов к стрессовым воздействиям. В частности, засоление, как стрессовый фактор, способно негативно влиять на большинство растений, снижая их продуктивность и качество урожая по всему миру. Понимание молекулярных основ устойчивости растений к засолению поможет не только выращиванию культур на непригодных для этого почвах, но и создаст основы для возможности ремедиации этих территорий. Представленной теме уделяется большое внимание в мировой литературе, в то же время многие аспекты адаптивной реакции растений на солевой стресс остаются неисследованными. Таким образом, рассматриваемая в диссертации «Молекулярно-биохимические способы регуляции метаболизма сукцината в листьях *Zea mays* L. и *Triticum aestivum* L. при адаптивной реакции на солевой стресс», несомненно, является актуальной.

Диссертантом был поставлен широкий набор задач, которые, в целом, были успешно решены.

Структура диссертации традиционна. Она и включает в себя 137 страниц и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы (202 ссылки).

Введение отражает основные пункты диссертации.

Глава 1. Обзор литературы. В первой части, соискатель затронул тему функционирования, строения и регуляции сукцинатдегидрогеназы, как метаболона, который участвует в различных метаболических процессах, таких как цикл трикарбоновых кислот и электрон-транспортная цепь. Автор изучает и обобщает не только классическую функцию сукцинатдегидрогеназы, но также освещает новейшие исследования и научные результаты, связанные с биохимической регуляцией этого фермента. Рассмотрены молекулярно-эпигенетические аспекты, регулирующие работу исследуемого фермента. В этом разделе уделяется большое внимание роли метилирования в регуляции экспрессии генов в условиях абиотического стресса. Третья часть посвящена влиянию засоления на физиологические функции растений и, в частности, влиянию на функционирование цикла трикарбоновых кислот и ЭТЦ. Автор проводит сравнение последних исследований зарубежных и отечественных ученых и их результатов, связанных с абиотическим стрессом у растений и изменением функционирования различных ферментов, участвующих в указанных метаболических

процессах. В четвертой части рассматриваются теоретические основы и роль некоторых семейств транскрипционных факторов, которые могут непосредственно участвовать в регуляции экспрессии генов при различных типах абиотического стресса.

В целом, обзор литературы хорошо структурирован, логичен и понятен. Орландо де Хесус Флорес Каро обращается к большому количеству актуальной цитируемой литературы. Автор анализирует роль СДГ во всех метаболических путях, сопряженных с ответом на солевой стресс, что показывает глубокое понимание биохимических и физиологических процессов, протекающих в растениях.

Глава 2 посвящена описанию экспериментальной части. Цель работы заключалась в изучении изменения биохимических и молекулярных аспектов функционирования фермента сукцинатдегидрогеназы и сукцинат-оксидазной системы в листьях растений С3 и С4 типа при кратковременом солевом стрессе.

В работе были выделены следующие задачи: 1. Получить высокоочищенные препараты СДГ из листьев кукурузы и пшеницы и изучить влияние солевого стресса на некоторые кинетические свойства очищенных изоферментов; 2. Оценить работу сукцинат-оксидазной системы в митохондриальном дыхании и ее зависимость от окисления сукцината в условиях солевого стресса; 3. Определить биохимические аспекты функционирования СДГ в растениях (*Zea mays* L., *Triticum aestivum* L.) *in vivo* в условиях действия солевого стресса; 4. Выявить зависимость активности СДГ и уровня транскриптов генов, кодирующих ее субъединицы, в листьях кукурузы и пшеницы при засолении; 5. Проанализировать промоторную область генов СДГ и определить наличие сайтов связывания факторов транскрипции, регулирующих их при засолении; 6. Исследовать роль метилирования CG-динуклеотидов промотора в регуляции транскрипции генов СДГ в условиях засоления в листьях кукурузы.

В разделе 2.2. описаны объекты и методы. Автор использовал современные методы исследования, такие как ПЦР в режиме реального времени и метил-специфичная ПЦР. Диссертантом использовалось довольно большое количество различных молекулярно-биохимических методов и подходов к исследованию. Тем не менее было бы уместно расширить данный раздел и описать некоторые методы подробнее. В частности, автор не приводит полный и развернутый протокол выделения митохондрий, а также не указал модификации используемого метода, что может затруднить воспроизводство результатов другими исследователями.

В главе 3 представлены результаты и обсуждение. В первой части этой главы рассмотрено влияние солевого стресса на функционирование СДГ. Вторая часть посвящена регуляции экспрессии генов сукцинатдегидрогеназы при данном стрессовом факторе. В третьей части автор исследует механизмы регуляции активности генов, кодирующих СДГ при действии засоления.

Материалы диссертации представляют теоретическую ценность и содержат новые результаты. Так, Орландо де Хесус Флорес Каро доказал, что солевой стресс не изменяет изоферментный состав сукцинатдегидрогеназы как в листьях кукурузы, так и

пшеницы. При анализе кинетических свойств очищенных изоформ, автор указывает, что существует определенные различия в их кинетических свойствах при воздействии стрессового фактора и в нормальных условиях. А именно, при засолении меняется оптимальное значение pH и сродство к сукцинату, который является субстратом для изучаемого фермента.

Новизной исследования является то, солевой стресс стимулирует каталитическую активность СДГ как *in vivo*, так и при изучении влияния различных концентраций экзогенного хлорида натрия на изолированные митохондрии (подразделы 3.1.1 и 3.1.4), что позволяет делать определенные предположения о механизме действия засоления. Ключевым моментом в первой части исследования (подраздел 3.1.3) является оценка работы сукцинатоксидазной системы в листьях исследуемых растений. Автор продемонстрировал, что существуют различия в скорости активации сукцинатдегидрогеназы и митохондриального дыхания (зависящего от окисления сукцината) у растений с разными типами метаболизма в одних и тех же условиях стресса. Кроме того, автор, анализируя скорость работы СДГ и процент участия альтернативного оксидазного пути, доказал, что С4 растения более чувствительны к действию солевого стресса по сравнению с растениями С3 типа.

Орландо де Хесус Флорес Каро показал, что засоление увеличивает уровень транскриптов генов, кодирующих каталитический димер СДГ в листьях кукурузы и пшеницы. Данный факт является важным показателем способа регуляции активности сукцинатдегидрогеназы. Автором показано, что повышение активности димера СДГ1-СДГ2, обусловлено необходимостью формирования большего числа молекул СДГ для быстрого окисления сукцината, накапливаемого за счет активации ГАМК-шунта и таким образом поддержать митохондриальное дыхание и синтеза АТФ на необходимом уровне, несомненно, является важным для понимания роли СДГ при адаптации растения к солевому стрессу.

С помощью биоинформатического анализа автор установил, что в промоторной области генов СДГ находятся сайты связывания транскрипционных факторов WRKY и NAC. Автор предполагает, что присутствие данных сайтов может объяснить наблюдаемые изменения в уровнях экспрессии генов *ZmSDH1-2, ZmSDH3-1, TaSDH1, TaSDH3-2, TaSDH4*. Автор установил, что есть определённая зависимость интенсивности активности генов СДГ кукурузы от статуса метилирования CG-динуклеотидов в промоторах генов *ZmSDH2-3, ZmSDH3-1, ZmSDH4* при солевом стрессе. Также проанализированы промоторные области генов СДГ у пшеницы и, на основании ранее обнаруженного сходства в изученных биохимических и молекулярных механизмах, регулирующих СДГ в кукурузе и пшенице, предположено наличие идентичных эпигенетических механизмов контроля активности генов СДГ в исследуемых растениях.

Таким образом, представлен большой объем тщательно выполненных экспериментов, которые показывают роль сукцинатдегидрогеназы в адаптивном ответе

на засоление и способы его регуляции, что проиллюстрировано в виде гипотетической схемы и наглядно иллюстрирует сделанные автором выводы.

Несмотря на очевидные достоинства работы, хотелось бы также отметить и некоторые замечания:

1. Это уже отмеченное ранее неполное описание некоторых методик в разделе материалы и методы;
2. В рамках исследования были проанализированы промоторные области исследуемых генов СДГ и идентифицированы сайты связывания для разных семейств транскрипционных факторов. Автор на основе анализа литературных данных предлагает определенные транскрипционные факторы как ключевые в регуляции генов СДГ. Однако в работе не было проведено исследование взаимодействия этих факторов транскрипции с выявленными сайтами связывания, которое позволило бы более глубоко понять механизм, с помощью которого они регулируют гены СДГ во время солевого стресса;
3. В диссертации автор уделяет важное внимание анализу уровней транскрипции генов, кодирующих субъединицы каталитического димера. Хотя автор также анализирует уровни транскрипции генов, кодирующих мембраносвязанные субъединицы, остается неясной роль, которую играют эти связанные субъединицы во время солевого стресса.

Представленные выше замечания не снижают научной значимости работы и не влияют на общую положительную оценку диссертации.

Автореферат диссертации Орландо де Хесуса Флореса Каро полностью отражает суть работы, данные апробированы на Всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации было опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и статья в журнале Q1 Web of Science.

Таким образом, можно сделать вывод, что диссертационная работа Флореса Каро Орландо де Хесуса на тему: «Молекулярно-биохимические способы регуляции метаболизма сукцината в листьях Zea mays L. и Triticum aestivum L. при адаптивной реакции на солевой стресс» представляет собой законченное и полное исследование и соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент:
Заместитель директора по научной работе
Сибирского института физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения РАН
(СИФИБР СО РАН),
доктор биологических наук, профессор
(03.00.12 - Физиология и биохимия растений, 2003)

Боровский Геннадий Борисович

«29» ноября 2024 года

Подпись Г.Б. Боровского
ЗАВЕРЯЮ
Начальник отдела кадров
29.11.2024

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН), 664033, г. Иркутск, Лермонтова 132, СИФИБР СО РАН
Тел: +7 (3952) 425951
E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Я, Боровский Геннадий Борисович даю согласие на обработку моих персональных данных, связанную с защитой аттестации и оформлением аттестационного дела Флореса Каро Орландо де Хесуса.

_____ Боровский Геннадий Борисович

«29» ноября 2024 года

Подпись Г.Б. Боровский
ЗАВЕРЯЮ
Начальник отдела кадров
Волконова М.Р.
29.11.2024