ОТЗЫВ

на диссертационную работу Флореса Каро Орландо де Хесуса «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.

Диссертационная работа Флореса Каро Орландо де Хесуса посвящена исследованию свойств крайне интересного объекта – фермента – сукцинатдегидрогеназы. Сукцинатдегидогеназа (СДГ, КФ 1.3.5.1) - один из ключевых ферментов метаболизма, который является частью как цикла Кребса, так и электрон-транспортной цепи, то есть участвует в реакциях клеточного синтеза и энергетического обмена.В диссертации проводилось исследование влияния солевого стресса на СДГ С3 и С4 растений - *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L.* Исследования реакции растений на солевой стресс носит очень актуальный характер. В России площадь засолённых почв разной степени засолённости занимает порядка 25% от почв сельскохозяйственного назначения. И эта цифра продолжает увеличиваться в результате деятельности человека, а именно за счёт поступления солей с оросительной водой, при утилизации или сбросе сточных вод, солевых и буровых растворов и прочих промышленных вод, с вносимыми удобрениями. Поэтому важно исследовать реакцию растений сельскохозяйственного назначения на повышенную концентрацию солей. Изучение биохимических и молекулярно-генетических механизмов реакции растений на солевой стресс является важной задачей, позволяющей понять адаптивные механизмы растений, позволяющие им расти в условиях солевого стресса. Поэтому изучение свойств СДГ растений в условиях солевого стресса, регуляции этого ферментаотносится к фундаментальным проблемам, что определяет ценность проведенного исследования для общей биохимии, молекулярной биологии, актуальность и важность выполненной работы.Задачи, сформулированные в диссертации,

соответствуют цели исследований, вполне конкретны и логичны в последовательности их решений.

Оформление диссертации соответствует установленным требованиям, она состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и примененных методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы, приложения. В целом диссертация содержит 137 страниц, которые включают помимо текста 28 рисунков и 6 таблиц. Список литературы насчитывает 202 ссылки.

Во введении диссертантом представлена общая характеристика поставленной при выполнении диссертационной работы проблемы, обоснована актуальность, сформулированы цели и задачи исследования.

Обзор литературы основан на большом количестве источников, содержит большой объём информации об исследуемом объекте, в том числе новейшие данные. Обзор написан сжато, ёмко, даёт прекрасное представление о влиянии солевого стресса на растения, о распространении СДГ среди живых организмов, структуре фермента, его молекулярных и каталитических свойствах, регуляции фермента. Обзор демонстрирует прекрасную осведомлённость автора обо всех последних находках в исследуемой им области. Полно изложены основные сведения обэпигенетической регуляции метаболизма растений в условиях солевого стресса, роли метилирования промоторов в экспрессии генов, кодирующих СДГ.

Материалы и методы исследования описаны в достаточно объеме и обеспечивают получение качественных результатов в проведённой работе. Диссертант владеет современными методами биохимии, молекулярной биологии, что обеспечивает высокий уровень проведённых исследований и достоверность полученных результатов. Широта спектра методов, примененных в ходе выполнения диссертационной работы, свидетельствует о высоком уровне подготовки диссертанта.

Результаты исследования и их обсуждение изложены в 16 разделах третьей главы диссертационной работы. В ходе проведения исследований Флорес Каро Орландо де Хесус использовал методически различные подходы, однако, все полученные им результаты логически связаны в единую концепцию и хорошо согласуются между собой. Диссертант проводит исследование по схеме «исследование активности СДГ на уровне митохондрий – получение препаратов СДГ и их характеристика – исследование регуляции продукции СДГ в условиях солевого стресса».

Автором диссертации проведено исследование по влиянию различных концентраций NaCl в изолированных митохондриях на активность СДГ и обнаружено, что активность этого фермента может увеличиваться в присутствии определённых концентраций соли, но при высоких концентрациях снижается. Были получены высокоочищенные ферментные препараты изоформ СДГ из листьев проростков *Z. mays L.* и *T. aestivum L.*. Показано, что кинетические параметры СДГ различаются у растений, выращенных в условиях солевого стресса и без него, что указывает на гибкость реакции метаболизма растительной клетки на стрессовые факторы.Проведена большая работа по изучению регуляции транскрипции генов, кодирующих субъединицы СДГ при влиянии солевого стресса на изучаемые в работе растения. Были выявлены изменения относительного уровня транскрипции генов СДГ и показано увеличение мРНК генов, кодирующих гидрофильные субъединицы СДГ. Особенно впечатляет проведённая работа по исследованию механизмов эпигенетической регуляции активности генов СДГ. Установлено, что активности генов СДГ в значительной степени зависела от метилирования CG-динуклеотидов в их промоторах. При этом метильный статус промоторов изменялся при воздействии хлорида натрия. Были идентифицированы сайты связывания разных семейств транскрипционных факторов в нуклеотидных последовательностях регуляторной области генов СДГ.

Таким образом, представленные Флоресом Каро Орландо де Хесусом данные содержат новые сведения об участии СДГ в реакции растений на солевой стресс. Предложенная схема логично вытекает из полученных результатов.

Полученные экспериментальные и теоретические результаты резюмированы в разделе «Заключение» и представлены в пяти выводах, полностью соответствующих поставленным задачам и цели исследования. В ходе выполнения диссертационной работы на основании анализа роли СДГ в отклике растений на солевой стресс автором создана уточнённая схема. Данная модель крайне интересна и хорошо согласуется с существующими представлениями о механизме функционирования метаболизма растительной клетки. Диссертация изложена четким и ясным языком и не вызывает вопросов по излагаемым методам, результатам и их трактовке.

Хотелось бы выразить некоторые пожелания/замечания к выполненной работе.

1. В диссертации используются тривиальные названия растений: «канола», «арабидопсис». Необходимо указывать латинские названия, хотя бы при первом упоминании.

2. Было бы интересно узнать молекулярную массу изоформ. Это помогло бы при расчёте кинетической константы – k_{kat}.

3. Какова природа происхождения изоформ СДГ – это продукты различных генов или последствия вторичной модификации? В чём причина различной электрофоретической подвижности изоформ СДГ?

4. В оформлении некоторых таблиц и рисунков допущены некоторые неточности, несколько затрудняющие их понимание. В Таблице 1 не указано, что означают значки «+» и «-»; в Таблице 6 неверно указана размерность V_{max}, которая является удельной величиной; в подписях к рисункам 1-4 Приложения указано, что на графиках проводится определение константы Михаэлиса-Ментен, хотя график Лайнувера-Берка используют для определения так же и V_{max}.

Тем не менее, указанные замечания не умоляют научной ценности проделанной работы и не затрудняют понимания изложенного материала.

Диссертационная работа Флореса Каро Орландо де Хесуса «Молекулярно-биохимические способы регуляции метаболизма сукцината в листьях *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L.* при адаптивной реакции на солевой стресс», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений, представляет законченное, оригинальное научное исследование, выполненное автором лично. Диссертация является завершенной научно-квалификационной работой, которая вносит ценный вклад в современную биохимию и физиологию растений. Она написана хорошим литературным языком, прекрасно оформлена и иллюстрирована. Выводы сделанные на основе экспериментальных данных диссертанта логичны и вполне соответствуют поставленной цели и задачам исследования, их достоверность не вызывает сомнений. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные материалы диссертации Флореса Каро Орландо де Хесуса адекватно представлены в научных публикациях, в том числе в 5 статьях в научных журналах, входящих в перечень ВАК и в базу Web of Science. Ключевые данные представлены диссертантом также на международных и всероссийских конференциях, что подтверждает её личный вклад в выполнение всего объёма диссертационного исследования, в получении всего массива экспериментальных результатов и в подготовку статей по теме.

Диссертационная работа Флореса Каро Орландо де Хесуса производит исключительно благоприятное впечатление своим фундаментальным характером, широким спектром задействованных методов и подходов, тщательностью выполненных поисковых работ и анализа, а также новизной полученных результатов. Диссертация, несомненно, должна быть квалифицирована как законченное научное исследование, в котором соискатель решены все поставленные задачи. По своей актуальности, научной

новизне и значимости полученных результатов диссертация, представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой и полностью отвечает требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года с изменением Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 года № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор Флорес Каро Орландо де Хесус достоен присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент Лисов Александр Викторович

кандидат биологических наук (специальность - 03.01.04 Биохимия)

Заместитель директора по научной работе

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина Российской академии наукИБФМ РАН (структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Почтовый адрес: 142290, Россия, г. Пущино, пр-т Науки, 5

E-mail: ssl208@rambler.ru

Тел.: 8 (4967) 73-26-77

Подпись Лисова Александра Викторовича заверяю

Отдел кадров

Подпись Лисова А.В.

УДОСТОВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров ИБФМ РАН

Зав. отдела кадров ИБФМ РАН Бороздина Л.В.

28.11.2024 «» 2024 г.