

## О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу

Онеле Алфреда Обинна

**«Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

1.5.21 – физиология и биохимия растений

Мохообразные представляют собой семейство эволюционно древних наземных растений, обладающих высоким адаптивным потенциалом в отношении различных стрессовых факторов абиотического направления, что делает эту группу растений относительно удобным объектом для экспериментальных работ в физиологии растений. Удивительно то, что представители этой группы растений выживают даже в условиях супер обезвоживания (до 20%). Несомненно, в этих условиях в растительных клетках должны эффективно регулироваться уровень различных метаболитов, например, активных форм кислорода и образование свободно-радикальных форм органических соединений, с чем успешно справляется про-/антиоксидантная система, где основными регуляторами (генераторами и утилизаторами АФК и гасителями свободно-радикального состояния, например фенольных соединений) являются пероксидазы, в том числе аскорбат-пероксидазы и пероксидазы III класса. В связи с этим, диссертационная работа Онеле Алфреда Обинна, посвященная оценке роли пероксидаз и аскорбат-пероксидаз мха *Dicranum scoparium* в формировании адаптивного потенциала к абиотическим стрессовым факторам среды, в первую очередь к обезвоживанию, характеризуется новизной и актуальностью.

Диссертационная работа Онеле Алфреда Обинна изложена на 136 страницах машинописного текста, включающем список сокращений (2 стр.), введение (5 стр.), обзор литературы (26 стр.), экспериментальную часть, состоящую из описания материалов и методов (11 стр.), результатов и обсуждения (50 стр.), заключения (1 стр.), выводов, списка литературы, включающего 417 источников, из которых 395 изданы в зарубежной печати. Результативная часть работы содержит 7 таблиц и проиллюстрирована 42 рисунками. Материалы диссертации апробированы на научных конференциях различного уровня и изложены в 17-х печатных работах, из которых 3 опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ, и соответствующих защищаемой специальности.

**Содержание автореферата** соответствует материалам диссертации. В автореферате полученные автором результаты и выводы приведены полностью.

**Научная новизна исследований и полученных результатов** заключается в следующем:

1. Убедительно показано активное вовлечение пероксидаз III класса в функционирование про-/антиоксидантной системы и, в частности, в генерации  $O_2^-$  в растениях мха *D. scoparium*.

2. В геноме мха *D. scoparium* впервые с использованием данных архива чтений нуклеиновых последовательностей идентифицировано 22 гена пероксидаз III класса (*DsPOD*), а также ген аскорбат-пероксидазы (*DsAPX*). Такое разнообразие генов пероксидаз, часть из которых активно вовлечена в систему адаптации эволюционно-древних мхов к различным абиотическим стрессовым факторам среды, предполагает важность этой группы ферментов в физиологии этой группы растений.

3. С использованием полу-нативного градиентного геля электрофореза в растворимой фракции белков обнаружено наличие 2-х изоформ аскорбат-пероксидазы и показано их вовлечение в стресс-индуцируемую устойчивость растений.

**Связь диссертационной работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства.**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с перечнем приоритетных направлений фундаментальных и поисковых научных исследований Российской Федерации на 2021 - 2030 годы по направлению 1.6. Биологические науки, разделу 1.6.7. Экспериментальная биология растений (подразделы 1.6.7.1. Молекулярные механизмы регуляции физиологических процессов и стресс-физиология растений и 1.6.7.6. Глобальная экология и эволюционная физиология растений), утвержденному распоряжением Правительства Российской Федерации № 3684-рот 31 декабря 2020 г., и поддержана рядом грантов РФФИ.

**Значимость полученных результатов для науки и практики.** Полученные автором результаты позволяют обсуждать возможность их использования в прикладных целях для экологического мониторинга и применения пероксидаз как маркеров развития стрессового состояния в ценозах. Кроме того, полученные результаты раскрывают особенности эволюции пероксидаз в царстве растений. Основные результаты работы могут быть использованы в учебно-исследовательской работе в сфере физиологии растений и молекулярной биологии.

При рассмотрении диссертационной работы возникли некоторые **замечания и вопросы**, на которые хотелось бы получить ответ:

1. В подразделе 2.2.1. указано, что ферменты «экстрагировали холодным (+4С) Трис-НСI (рН-8,0)» и для определения активности ферментов использовали супернатант. Затем в под-

разделе 2.2.2. показано, что осадок ресуспендировали в 0.05M буфере Соренсена рН 7, отбирали супернатант белков, связанных с компонентами клетки водородными связями, а затем осадок снова ресуспендировали с добавлением детергента дигитонина и отбирали фракцию, связанную гидрофобными взаимодействиями. И наконец, следующая фракция была выделена при помощи 2 М NaCl (ионосвязанная фракция). К последовательностям процедуры выделения фракций вопросов нет. Есть вопросы, связанные с межфракционной пробоподготовкой. Производился ли контроль наличия ферментов после каждой процедуры отмычки растительных образцов для исключения контаминации между изученными фракциями? В методической части диссертации это не описано.

2. Почему для определения активности ферментов экстракцию из растительного материала производили холодным (+4°C) Трис-HCl (рН 8.0) (пункт 2.2.1), а для выделения и частичной очистки белков образцы гомогенизировали в 0.05 М фосфатном буфере рН 7.0 (пункт 2.8.1)? Нельзя ли было использовать в том и другом случае одни и те же реактивы?

3. Судя по фотографиям ПААГ после электрофореза и проявки на пероксидазную и аскорбатпероксидазную активности автор владеет методом оценки изоферментного состава выделенных белков. Интересно знать, наблюдал ли автор изменения в изоферментном составе пероксидаз в растениях мха *D. scoparium* в условиях изменения внешних стрессовых факторов среды.

4. При анализе наличия генов, кодирующих аскорбат-пероксидазы, и оценке активности продуктов этих генов автор несколько раз в работе обсуждает цитоплазматическую и пластидную локализацию фермента. Действительно, на электрофоретических треках, оцененных на аскорбат-пероксидазную активность, обнаруживаются две изоформы 31 и 43 кДа, разделенные автором диссертационной работы на цитоплазматическую и пластидную (рис. 34). На основании каких особенностей фермента автор считает, что мажорная является цитоплазматической, а минорная пластидной? Разный размер изоферментов предполагает определенные различия и в геномной структуре генов, кодирующих их. Вместе с тем, диссертант в 4-м выводе своей работы показывает, что у мха *D. scoparium* наблюдается один ген, как предполагает автор кодирующий цитоплазматическую аскорбат-пероксидазу. Что диссертант может сказать об аскорбатпероксидазе, локализованной в пластидах? Насколько она консервативна и какова степень гомологии гена, кодирующего этот фермент, с соответствующей из цитоплазмы?

4. Диссертант убедительно доказал, что пероксидазы III класса, выделяемые из побегов мха *D. scoparium*, обладают свойством генерировать  $O_2^-$  в присутствии 0.1 mM NADH. Было бы интересно знать о механизме генерации  $O_2^-$  пероксидазами. Связано ли эта активность с

гемовым центром фермента или может процесс генерации  $O_2^-$  происходит независимо от пероксидазного процесса?

5. При анализе экспрессии генов, кодирующих пероксидазы и аскорбат-пероксидазу APX, автор использовал 4 референсных гена. На рис. 29 и 42 диссертации (11 и 16 рис автореферата) приведены результаты соответствующих расчетов. Возникает вопрос. Почему автор для сравнительного анализа использовал именно эти гены «домашнего» хозяйства и какие гены конкретно были использованы при сравнительном расчете изменения уровня транскриптов *DsPOD* и *APX* представленных на рис. 29 и 42, так как у разных генов различен и экспрессионный статус, хоть они и референсные?

6. В выводе 2 автор утверждает, что растения мха «*D. scoparium* обладают наивысшей пероксидазной активностью среди совместно произрастающих лесных мхов». Я считаю, что такой категоричный вывод выносить не совсем корректно, так как про-/антиоксидантный статус разных видов растений, включая и изученные автором, различен и зависит не только от внешних факторов среды, но и от генетического статуса организма. Тем более различия в активности пероксидазы мха *D. scoparium* превышают другие испытанные виды не более чем 2 раза.

7. Мне кажется, что в обзорной части диссертационной работы фраза «Синглетный кислород образуется из хлорофиллов (стр. 21)» не очень удачная. Вероятно, автор предполагал, что «Синглетный кислород образуется с участием хлорофиллов». Но если автор все-таки прав, и хлорофилл является источником синглетного кислорода, то необходимо привести ссылку, где такое утверждение имеется.

8. В подразделе 2.11 Молекулярное клонирование автор показывает, что «Плазмиды, содержащие целевые вставки, были трансформированы в компетентные клетки». Но в этом абзаце не показаны вид и штамм организма, клетки которых использованы в качестве компетентных. Только в следующем абзаце мы находим, что это были клетки штамма *Escherichia coli* Nova Blue. При приведении информации необходимо соблюдать последовательность.

9. В автореферате, в рисунке 9 фигурирует фраза «надсемейство пероксидазоподобных растений». По всей видимости автор не удачно перевел фразу «plant-peroxidase like superfamily». В рисунке 24 диссертации все корректно.

Приведенные замечания не снижают новаторский характер исследований Онеле А.О., а сама работа позволяет в полной мере оценить биохимические и физиологические особенности пероксидаз относительно эволюционно древней группы наземных растений – мхов на примере *D. scoparium*.

**Выводы**, приведенные в диссертационной работе, на мой взгляд, обоснованы и логично вытекают из представленных экспериментальных данных. Работа хорошо

оформлена, иллюстративный материал вполне достаточен для того, чтобы помочь читателю оперативно ознакомиться с ее содержанием.

### **Заключение**

Заключая рассмотрение работы, можно констатировать, что в целом диссертация Онеле Алфреда Обинна «Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.» представляет собой законченный научно-исследовательский труд, выполненный на актуальную тему, имеющую важное значение для физиологии и биохимии растений. По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа удовлетворяет требованиям п. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г., №842 (с изменениями, внесенными постановлениями Правительства РФ на 11.09.2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Онеле Алфред Обинна заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

### **Отзыв предоставил:**

Заведующий лабораторией биохимии иммунитета растений  
Института биохимии и генетики – обособленного структурного  
подразделения Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения Уфимского федерального  
исследовательского центра Российской академии наук,  
доктор биологических наук, профессор,

(1.5.21 (03.01.05) - физиология и биохимия растений).

450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, 8(347)235-60-88

E-mail: igor.mak2011@yandex.ru

25.02.2022 г.

Игорь Владимирович Максимов

Подпись И.В. Максимова заверяю:

Заместитель директора ИВГ УФИЦ РАН

по научной работе, д.б.н.



А.С. Карунас