

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Онеле Алфреда Обинна
«Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium*
Hedw.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

Диссертация Онеле А.О. посвящена оценке окислительно-восстановительного метаболизма листостебельного мха дикранума метловидного. Особое место мхов в филогении высших растений делает их уникальными объектами для изучения эволюции автотрофов в период колонизации Земли. Впервые были идентифицированы гены пероксидаз класса III и аскорбатпероксидаз для мха *Dicranum scoparium*, и показана роль их молекулярных ферментативных продуктов в нейтрализации стресс-реакций, сопряженных с выработкой АФК.

Обоснованность выводов и достоверность результатов исследований подтверждается большим объемом экспериментальных материалов, полученных с помощью современных методик исследований. Особой похвалы достоин комбинированный подход, используются как *in vivo* анализ, так и техники *in silico*.

Основные положения работы прошли апробацию на конференциях различного уровня. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в авторитетных рецензируемых журналах.

Научная новизна работы определяется новыми экспериментальными результатами, отмеченными выше.

Однако, несмотря на высокий уровень работы, в процессе ознакомления с авторефератом Онеле А.О. возникает ряд вопросов, а именно:

- Несмотря на то, что введение декларирует связь антиоксидантных ферментов мхов и сосудистых растений, в описании полученных результатов филогенетический анализ обсуждается очень кратко.
- В тексте отсутствует расшифровка понятия «пероксидазы класса III». Несмотря на то, что это выглядит самоочевидным для большинства исследователей из этой области физиологии растений, уточнение не было бы лишним.
- В тексте неоднократно упоминается, что *Dicranum scoparium* является высокоустойчивым видом по отношению к действию факторов среды. Чем был обусловлен выбор действующих концентраций (100 мкМ CdCl₂ и 100 мкМ параквата)? Из автореферата не понятно, были ли проведены предварительные тесты по установлению токсического порога концентраций данных веществ по отношению к выбранному виду.

Стоит отметить, что замечания носят скорее уточняющий характер, и несколько не умаляют достоинства работы. Считаю, что диссертационная работа Онеле А.О. соответствует требованиям ВАК предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Онеле Алфред Обинна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

24.02.2022 г.

Отзыв предоставил:

Павел Владимирович Федуряев

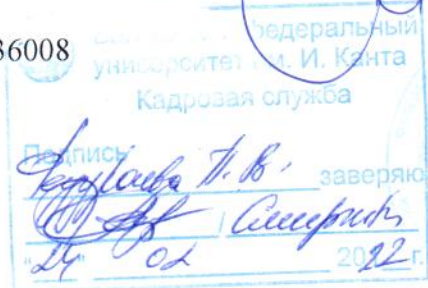
к.б.н., доцент, 03.01.05- физиология и биохимия растений.

Институт живых систем, ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта»

Россия, Калининград, ул. Невского, 14, 236008

Тел. +7 (4012) 595570 (доб. 5022)

e-mail: pfeduraev@kantiana.ru



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Онеле Алфреда Обинна** «Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений

Изучению влияния неблагоприятных факторов окружающей среды на образование активных форм кислорода (АФК) и функционирование компонентов антиоксидантной системы, защищающих клетки от негативного действия АФК, в настоящее время уделяется большое внимание. Несмотря на многолетние исследования в этой области, особенности активности одних из ключевых антиоксидантных ферментов – пероксидаз мало изучены у бриофитов. В связи с этим, актуальность и новизна работы А.О. Онеле, направленной на исследование биохимических и молекулярных характеристик пероксидаз мха дикранума метловидного, не вызывают сомнений.

Объектами исследования служили побеги мхов *Dicranum scoparium* Hedw., *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt., *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. Автором изучено влияние обезвоживания и регидратации побегов *D. scoparium* на образование в клетках растений АФК и показано, что в генерации супероксидного анион-радикала принимают участие пероксидазы III класса. Анализ активности пероксидазы в побегах представителей из нескольких родов совместно произрастающих лесных мхов позволил установить, что *D. scoparium* обладает наивысшей пероксидазной активностью.

Диссертантом выявлено, что пероксидазы III класса и аскорбатпероксидаза участвуют в ответной реакции мха дикранума на обезвоживание, регидратацию и действие низких и высоких температур. Кроме того, А.О. Онеле получены данные не только о повышении активности антиоксидантных ферментов под влиянием различных стресс-факторов, но и об усилении экспрессии генов, кодирующих эти ферменты.

На мой взгляд, одним из важных результатов диссертационной работы является идентификация 22 генов пероксидаз III класса (*DsPOD*) дикранума и демонстрация эволюционной взаимосвязи между пероксидазами *D. scoparium* и других видов растений на основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей. Кроме того, автором впервые идентифицирован ген аскорбатпероксидазы (*DsAPX*) дикранума и проведен биоинформатический анализ первичной, вторичной и третичной структуры белка *DsAPX*.

Диссертационная работа Онеле А.О. представляет собой законченное, комплексное и хорошо спланированное исследование, проведенное на высоком методическом уровне с применением современных методов исследования. Научная новизна работы диссертанта подтверждена достаточным числом подходов к рассмотрению изучаемых задач и количеством проведенных исследований.

Данные, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, позволяют расширить представления об особенностях функционирования высокомолекулярных антиоксидантов и свидетельствуют о важной роли пероксидаз в поддержании окислительно-восстановительного статуса растений. Результаты имеют несомненное научно-практическое значение и в дальнейшем могут быть использованы при экологическом мониторинге и мероприятиях, направленных на повышение устойчивости сельскохозяйственных растений.

Автореферат написан хорошим литературным языком, структурирован, прекрасно иллюстрирован. Выводы, сделанные в работе, соответствуют сформулированным цели и задачам, в полной мере отражают результаты проводившихся исследований.

Материалы диссертации апробированы на Международных и Всероссийских научных конференциях. Результаты исследования отражены в 17 публикациях, из которых 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

В ходе ознакомления с авторефератом диссертанта возник вопрос. Как полагает автор, чем может объясняться такая высокая устойчивость пероксидазы III класса, активность которой способна восстанавливаться и даже превышать исходный уровень (точка 0) уже спустя 30 мин или 2 ч после быстрого и медленного обезвоживания, соответственно? (рис. 3), а также повышаться при пусть и кратковременном (2 ч), но существенном понижении и повышении температур? (рис. 8). В связи с этим интересно, возможно ли восстановление активности POD в побегах дикранума до исходного уровня при возвращении растений в оптимальные температурные условия или растения погибали после суточного воздействия низкой (-20°C) и высокой (+50°C) температур? Проводились ли такие исследования?

В целом, судя по автореферату, диссертационная работа **Онеле Алфреда Обинна** на тему «Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор – **Онеле Алфред Обинна** – заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

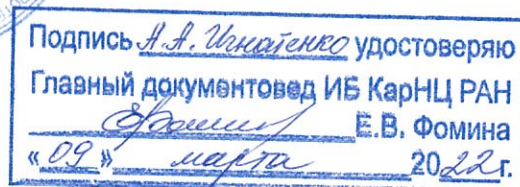
Кандидат биологических наук (03.01.05 – физиология и биохимия растений),
научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений
Института биологии – обособленного подразделения Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
«Карельский научный центр Российской академии наук»

Игнатенко Анна Анатольевна

185910, г. Петрозаводск,
ул. Пушкинская, 11; т. +7(8142)76-27-12,
E-mail: angelina911@ya.ru



9 марта 2022 года



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Онеде Алфред Обина «Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium Hedw.*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

В диссертационной работе Онеде Алфред Обина получены результаты, детально описывающие биохимические и молекулярные характеристики пероксидаз и аскорбатпероксидазы одного из видов мха. Это исследование имеет важное значение не только как описание свойств ключевых ферментов, обеспечивающих контроль содержания активных форм кислорода (АФК) в еще одном виде растений, но и, учитывая положение мхов в филогении растений, как вносящее существенный вклад в развитие представлений об эволюционном развитии адаптационных механизмов в растениях.

К безусловным достижениям работы относится идентификация генов пероксидаз III класса, что позволило с помощью биоинформационного анализа белков получить сведения об их свойствах, в частности, о первичной и вторичной структуре, предсказать их положение в клетке. Последнее в значительной степени совпадает с экспериментальными результатами автора.

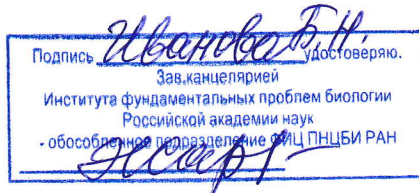
Получены убедительные свидетельства участия пероксидаз и аскорбатпероксидазы этого вида мха в реакции растения на обезвоживание/регидратацию и изменения температуры среды. Важно, что в работе также исследовано изменение уровня экспрессии некоторых идентифицированных генов пероксидаз и гена аскорбатпероксидазы как в ответ на действие этих стрессоров, так и на действие тяжелого металла и парахвата. Данные о реакции биохимической системы мха на действие неблагоприятных факторов среды имеют очевидное практическое значение для экологического мониторинга.

Следует заметить, что пероксидазы и аскорбатпероксидаза рассматривается автором, в основном, как играющие «защитную роль для предотвращения окислительных повреждений при стрессе». Однако АФК, как известно, играют роль первичных и вторичных мессенджеров в большинстве сигнальных путей, обеспечивающих адаптационный ответ растений на неблагоприятные воздействия факторов внешней среды, и роль ферментов, контролирующих уровень АФК, важна, прежде всего, в этом аспекте.

В целом, результаты, полученные Онеде Алфред Обина в ходе проведенного исследования, анализ этих результатов, их значение для понимания роли пероксидаз и аскорбатпероксидазы в растениях позволяют заключить, что представленная диссертация соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.21. – Физиология и биохимия растений.

Иванов Борис Николаевич,
д.б.н., главный научный сотрудник
Института фундаментальных проблем биологии
обособленного структурного подразделения ФГБУН ФИЦ
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
142290, Россия, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 2
эл. почта: ivboni@rambler.ru

04. 03. 2022 г.



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Онеде Алфред Обинна: «Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Диссертационная работа Онеде Алфред Обинна посвящена исследованию биохимических и молекулярных характеристик пероксидаз мха дискариума метловидного. Проведение исследований в данном направлении важно и актуально, поскольку биохимические свойства пероксидаз и гены, их кодирующие, у мохообразных изучены крайне недостаточно.

В задачу исследований Онеде Алфред Обинна входила оценка интенсивности образования анион радикала перекиси водорода и гидроксильного радикала у дискариума метловидного в норме и при стрессе, определение вклада пероксидаз в детоксикации и образовании АФК; определение изоферментного состава и активности при абиотическом стрессе, индуцированном обезвоживанием/регидратацией и действием положительных и отрицательных температур, пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы; идентификация генов и проведение биоинформатического анализа физико-химических свойств и структуры белков пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы мха; анализ уровня экспрессии генов, кодирующих пероксидазы (*DsPOD*) и аскорбатпероксидазу (*DsARX*) при действии различных стрессовых факторов.

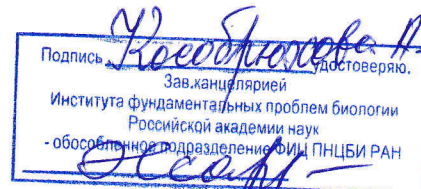
Автором впервые идентифицированы 22 гена пероксидаз III класса у дискариума метловидного с использованием базы данных архива чтений последовательностей; выявлены консервативные мотивы и домены, сайты пост-трансляционных модификаций, субклеточная локализация белков. Проанализированы вторичная и третичная структуры пероксидаз. На основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей показана эволюционная взаимосвязь между пероксидазами мха и других видов растений. Впервые идентифицирован ген аскорбатпероксидазы. В результате клонирования и секвенирования последовательностей гена *DsARX* выявлена высокая степень гомологии с *ARX* других мхов. Проведен биоинформативный анализ первичной, вторичной и третичной структуры белка, а также сравнение со структурой белка других мхов. Показано вовлечение ферментов пероксидазы и аскорбатпероксидазы в ответ на действие на побеги мха $CdCl_2$, параквата, неблагоприятных температур и обезвоживания/регидратации. Полученные данные способствуют углублению и расширению знаний о механизме ответной реакции мха на действие неблагоприятных факторов.

Полученные результаты статистически достоверны, отличаются новизной и научно-практической значимостью. Выводы и положения, выносимые на защиту, соответствуют полученным автором результатам. Основные результаты работы опубликованы в статьях в рецензируемых научных журналах и обсуждены на научных конференциях. Объем, качество и актуальность выполненных исследований соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а Онеде Алфред Обинна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

Кособрюхов Анатолий Александрович
доктор биологических наук (03.00.12) -
физиология и биохимия растений,
старший научный сотрудник,
руководитель группы экологии и физиологии фототрофных организмов
Института фундаментальных проблем
биологии Российской академии наук,
ФИЦ НЦБИ РАН
142290 г. Пущино, Московская обл.,
ул. Институтская, дом 2.
Тел.: 8(4967)73-36-01 E-mail: ifpb@issp.serpukhov.su
09. 03. 2022



Кособрюхов



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Онеле Алфреда Обинна

«Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. «Физиология и биохимия растений».

Стресс-физиология растений является одной из самых широко исследуемых областей физиологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики растений, поскольку кроме академического значения эти работы чрезвычайно важны и в прикладном аспекте. Человечество ежегодно недополучает миллионы растительной продукции сельского хозяйства вследствие стрессовых условий произрастания растений. Поэтому исследования механизмов устойчивости растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, их формирования, регуляции и взаимодействию были, есть и еще длительное время будут весьма актуальными.

Бриофиты являются древнейшими наземными растениями и имели огромное значение в формировании современного облика Земли. Мхи обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям среды вследствие выработки в процессе эволюции разнообразных механизмов. Одним из самых распространенных и самых жестоких повреждающих факторов при стрессе является окислительный стресс, которому противостоит антиоксидантная система, которая включает в себя как ряд низкомолекулярных антиоксидантов, так и ферментативные системы, которые направлены на нейтрализацию активных форм кислорода (АФК). Одним из таких классов ферментов являются различные пероксидазы, исследованию биохимических и молекулярных особенностей которых в мхе *Dicranum scoparium* Hedw. и посвящена работа А.О. Онеле.

Прежде всего, в этой работе привлекает выбор объекта. Действительно, имеется множество работ по изучению окислительного стресса в сосудистых растениях, тогда как подобных с несосудистыми растениями несравнимо меньше.

В представленной работе впервые идентифицированы 22 гена пероксидаз класса III (*DsPOD*) ген аскорбатпероксидазы (*DsAPX*) дикранума. Исследованы биохимические свойства пероксидаз и аскорбатпероксидазы, проведена их биохимическая идентификация. Проведен биоинформатический анализ белков, кодируемых этими генами.

На мой взгляд, одним из важных достижений диссертационной работы А.О. Онеле – это определение взаимосвязи исследованных ферментов мхов с другими классами растений, что очень важно в эволюционном аспекте.

Работа выполнена на стандартном методическом уровне, полностью соответствующем поставленным целям и задачам. Результаты работы

ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

диссертации Онеле Алфреда Обинна «Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – Физиология и биохимия растений

Диссертационная работа А.О. Онеле посвящена исследованию биохимических и молекулярных свойств пероксидаз из мха *Dicranum scoparium*. Мохообразные являются древнейшими высшими несосудистыми растениями и потомками ранних линий эмбриофитов, которые участвовали в колонизации наземной среды обитания. Таким образом, бриофиты являются оптимальной моделью для изучения эволюционных изменений и становления механизмов устойчивости растений. Эволюционное развитие процессов фотосинтеза и дыхания привело к образованию токсичных для биомолекул активных форм кислорода (АФК). Это привело к необходимости формирования эффективных механизмов контроля содержания АФК и регуляции окислительно-восстановительного метаболизма в клетках, в особенности, при действии различных неблагоприятных факторов среды. Основным механизмом обезвреживания АФК – эффективная работа антиоксидантной системы, одним из ключевых ферментативных компонентов которой являются пероксидазы. Благодаря древней природе мохообразные обладают высокой устойчивостью к действию неблагоприятных условий среды и все чаще становятся модельными объектами для изучения ответных на стресс реакций. Однако роль антиоксидантной системы в целом и пероксидаз в частности в формировании устойчивости мхов изучена крайне недостаточно. Полученные в ходе выполнения работы результаты вносят существенный вклад в фундаментальную науку в области исследований формирования и развития устойчивости растений, а также могут быть применены в ближайшем будущем для решения проблем выведения устойчивых и хозяйственно полезных сортов растений с применением современных методов молекулярной биологии, генетики и биотехнологии. Поэтому актуальность исследования не оставляет сомнений.

Диссертационная работа А.О. Онеле представляет собой законченное комплексное исследование. Применение самых современных методов биохимии и молекулярной биологии в сочетании с использованием биоинформационного анализа позволили диссертанту получить и обосновать достоверные новые ценные экспериментальные данные. В экспериментах с побегами мха дикранума метловидного, подверженных гидратации, медленному и быстрому обезвоживанию и регидратации, краткосрочному и продолжительному воздействию отрицательных и высоких положительных температур, кадмия и параквата показано повышение активности пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы в ответ на большинство исследованных стрессоров. Это указывает на значительную роль пероксидаз в формировании устойчивости мха к различным абиотическим факторам среды и окислительному стрессу. Установлено, что пероксидазы из мха могут выполнять роль антиоксидантов, а также проявлять прооксидантную активность и участвовать в образовании супероксидного анион-радикала. С применением различных электрофоретических методов разделения белков были детально охарактеризованы изоформы пероксидаз. Впервые идентифицированы 22 гена пероксидаз III класса и ген аскорбатпероксидазы *D. scoparium*. С применением биоинформатического анализа были предсказаны вторичная и третичная структуры пероксидаз и их субклеточная локализация. Анализ построенного филогенетического древа показал, что дивергентность изопероксидаз III класса могла произойти до разделения растений на несосудистые и сосудистые. А аскорбатпероксидаза дикранума, напротив, находится в группе с другими видами мхов с общим предком, от которого произошли аскорбатпероксидазы сосудистых растений. В экспериментах по влиянию различных стресс-факторов на экспрессию генов пероксидаз дикранума установлено, что различные

неблагоприятные факторы среды влияют не только на активность ферментов, но и изменяют экспрессию генов, кодирующих пероксидазы. Диссертанту удалось выявить гены, экспрессия которых конститутивна, а также гены раннего и позднего ответа на стресс факторы. В целом, проделана огромная комплексная научная работа. Полученные результаты вносят существенный вклад в исследования биохимических и молекулярных особенностей важных антиоксидантных ферментов – пероксидаз, указывают на их важную физиологическую роль в формировании толерантности эволюционно древних несосудистых растительных организмов к различным стресс факторам. Результаты диссертационной работы открывают большие перспективы для исследования роли пероксидаз и других антиоксидантных ферментов в формировании устойчивости высших растений с точки зрения системной биологии и эволюции, а также дальнейшего применения полученных знаний в прикладном аспекте.

При прочтении автореферата возникли вопросы и замечания, которые в основном касаются исследований пероксидазной активности мха под действием стресс факторов и особенностей постановки эксперимента:

1) В автореферате указано, что активность пероксидаз повышалась как при быстром, так и при медленном обезвоживании побегов дикранума. Однако, результаты, представленные на рис. 3Б показывают, что при быстром обезвоживании пероксидазная активность возрастала только после гидратации, затем в первые сутки обезвоживания значимо не изменялась, и снижалась на третьи сутки дегидратации. При этом экспрессия большинства исследованных генов пероксидаз при быстром обезвоживании также не усиливалась (рис. 11В). То есть, скорость обезвоживания по-разному влияет на активность пероксидаз мха.

2) При какой температуре находились побеги мха контрольной группы в экспериментах с воздействием отрицательных и высоких положительных температур?

3) Корректно ли температуру + 30°C называть умеренной положительной, как это указано в конце стр. 13 автореферата? Если учитывать, что образцы мха были отобраны в окрестностях г. Казань.

4) Поддерживали ли образцы мха в контроле и термостате в гидратированном состоянии на протяжении 24 ч воздействия высокими температурами? Если нет, то снижение пероксидазной активности при длительном воздействии высоких температур на побеги мха могло быть связано не только с действием высокой температуры, но и являться следствием более быстрого высыхания побегов. Тем более что снижение пероксидазной активности происходило при быстром высушивании побегов мха на силикагеле. Возможно, сохранение относительно высокой активности пероксидаз III класса в побегах мха после длительного воздействия высокой температуры также связано с тем, что образцы к концу эксперимента были уже сухими?

5) В пункте 1.2. раздела Материалы и методы исследования указано, что медленное обезвоживание побегов проводили на протяжении 168 ч, однако на рис. 12 А видно, что при изучении изменения активности аскорбатпероксидазы побеги мха подвергались обезвоживанию на протяжении более 300 ч. Также видно, что при измерении активности пероксидаз в побегах мха относительное содержание воды снижалось ниже 50% уже через 144 ч дегидратации (врезка к рис. 3А), тогда как при измерении активности аскорбатпероксидазы относительное содержание воды в побегах мха было более 50% даже спустя 288 ч. С чем связана более быстрая потеря воды побегами мха в первом эксперименте?

6) В результатах показано, что наибольшая активность пероксидаз была выявлена во внутриклеточной фракции. При этом предсказания субклеточной локализации показали, что большинство белков, которые кодируют DsPOD гены, являются экстраклеточными. Таким образом, можно понять, что большинство пероксидаз мха не проявляют активность? С чем это может быть связано?

7) Присутствует путаница в обозначениях единиц измерения активности пероксидаз. Например, на рис. 3А активность пероксидазы указана в микрокаталах, а 3Б – в микрокаталах, а на рис. 4А – снова в микрокаталах. А активность аскорбат пероксидазы указана в нанокаталах (рис. 12).

Приведенные выше замечания и вопросы не снижают качество и актуальность проделанной работы. Большинство из них носят уточняющий и рекомендательный характер.

Автореферат написан грамотным литературным языком, логично выстроен, хорошо оформлен. Выводы, сделанные соискателем, полностью соответствуют поставленным цели и задачам. Результаты работы опубликованы в российских и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные базы цитирования WoS и Scopus, апробированы на всероссийских и международных конференциях.

Считаю, что диссертационная работа Онеге Алфреда Обинна соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – Физиология и биохимия растений.

Кандидат биологических наук (1.5.21.),
научный сотрудник лаборатории экологической
физиологии растений Института биологии
Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук

Шелякин Михаил Анатольевич

14.03.2022

167982, г. Сыктывкар, ГСП-2,
ул. Коммунистическая, 28
Телефон: +7(8212)24-96-87
E-mail: shelyakin@ib.komisc.ru



ОТЗЫВ

на автореферат кандидатской диссертации Онеле Алфред Обинна
«Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз
мха *Dicranum scoparium* Hedw».

Известно, что мхи обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам среды, что позволяет использовать их как модель, для изучения ответных реакций растений на стрессовые воздействия. В ходе эволюции растения выработали различные механизмы защиты от окислительного стресса. Однако вопрос о работе антиоксидантной системы у различных систематических групп растений в стрессовых условиях не до конца исследован. В связи с этим работа Онеле Алфред Обинна, посвященная исследованию биохимических и молекулярных характеристик ферментов пероксидаз, как представителей антиоксидантных ферментов, является несомненной актуальной.

При выполнении работы автором использовались разнообразные методы физиолого-биохимического анализа растений, такие как, методы спектрофотометрического анализа содержания разных типов АФК, активности ферментов, электрофоретический анализ изоферментного состава, очистка ферментов методом ионообменной хроматографии, определение кинетических параметров K_m и V_{max} , а так же методы молекулярной биологии при выделении разных типов нуклеиновых кислот, идентификации и определения экспрессии генов с помощью ПЦР, с привлечением методов биоинформатики были смоделированы пространственная структура изучаемых ферментов и проведен филогенетический анализ расположения отдельных групп изоферментов пероксидаз у различных видов и классов растений.

В результате проведенных исследований было отмечено сходство функций и свойств пероксидаз высших сосудистых и несосудистых растений. Показано, что пероксидазы мха *Dicranum scoparium*, представлены как растворимыми, так и связанными с клеточными стенками формами, которые участвуют в образовании и нейтрализации супероксида. Впервые идентифицированы гены пероксидаз III класса, и показано наличие консервативных доменов, свидетельствующих о эволюционной взаимосвязи с сосудистым растениям. Установлено, что гены пероксидаз в разной степени вовлечены в ответные процессы на стрессовые воздействия, такие как обезвоживание, действие парахвата и $CdCl_2$. Впервые выявлен ген аскорбатпероксидазы и показано, что у мха он кодирует цитоплазматическую форму этого фермента.

В качестве замечания можно ответить;

1. Встречаются неудачные выражения, например с.13- «Повышение активности POD во мхе *D. scoparium* в условиях водного и температурного стрессов может быть обусловлено как регуляцией активности белков, так и регуляцией активности генов». Вероятно, речь идет о регуляции активности белков – ферментов у мха.
2. Из текста не очень понятно, как определялась экспрессия генов пероксидаз при действии стрессов. Если это делалось не за счет увеличения содержания соответствующих м-РНК, то нужно расписать эту методику.
3. Непонятно, почему после установления наличия изоферментов пероксидаз, изменения экспрессии их генов при стрессе, молекулярной массы, локализации, далее определялась общая активность POD при действии

стрессов, устойчивость при разных температурах и, с использованием методов биоинформатики, особенности вторичной и третичной структуры. Известно, что изоферменты различной локализации имеют и разные физико-химические свойства, включая устойчивость к температурам, субстратную специфичность и, соответственно, кинетические параметры и даже активность в стрессовых условиях. Логичнее было провести исследование в этом плане.

Однако данные замечания не носят принципиального характера и не снижают качества работы.

На основании материалов автореферата и публикаций можно заключить, что диссертационная работа Онеде Алфред Обинна соответствует требованиям п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г., №842 (с изменениями, внесенными постановлениями Правительства РФ на 11.09.2021г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5. 21- физиология и биохимия растений.

Профессор кафедры биологии растений и животных
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
педагогический университет»
доктор биологических наук, профессор
(1.5.21.(03.00.12) - физиология и биохимия растений).
394043, Воронеж, ул. Ленина, 86.
Тел.(4732)53-29-86
e-mail: profershova@mail.ru

17.03.2022

Антонина Николаевна Ершова



Подпись *Ершовой А.Н.* заверяю
Начальник управления кадров
ФГБОУ ВО «ВГБИУ»
И.С. Полякова
7 - марта 2022 года

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Онеле Алфреда Обинна на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений «Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.»

Диссертационная работа Онеле Алфреда Обинна лежит в русле важного направления физиологии растений – изучения стрессовых реакций и механизмов устойчивости растений. Удачно выбран объект исследования – бриофиты, толерантные к действию засухи и колебаниям температуры среды в силу своего происхождения и положения на эволюционном древе растений. Внимание диссертанта было сосредоточено на изучении пероксидаз как важных ферментов антиоксидантной защиты растений, индуцируемой при стрессе. Постановка экспериментов предполагала характеристику пероксидаз у дегидратированных и регидратированных побегов мха, в том числе, подвергнутых действию таких стрессоров, как хлорид кадмия, паракват или низкие и высокие температуры. Для выполнения поставленных задач были использованы современные биохимические и молекулярно-генетические методы. Было показано, что пероксидазы III класса мха дикранум проявляют как антиоксидантную, так и прооксидантную активность и вовлечены в стрессовые ответы. Впервые идентифицированы гены пероксидаз III класса и ген аскорбатпероксидазы у этого мха. Проведен биоинформатический анализ, показавший наличие консервативных доменов, типичных для пероксидаз.

Автореферат диссертационной работы Онеле А.О. демонстрирует целостность исследования, его новизну и теоретическую значимость.

Тем не менее, к автореферату есть некоторые замечания:

1. Недостаточно объяснен эффект роста содержания АФК при гидратации исходно сухих побегов мха. Не вполне убедительным выглядит заключение о генерации АФК пероксидазами III класса. Очевидно, что при гидратации сухого побега активируются процессы фотосинтеза и дыхания, которые являются источниками АФК.
2. Приведенные в автореферате данные об экспрессии генов пероксидаз POD и APX при действии хлорида кобальта и параквата не сопоставлены с их тотальной активностью (нет данных об активности ферментов при действии этих стрессоров).
3. Характер изменения уровня экспрессии генов пероксидаз не дает основания в полной мере утверждать, какие из них вовлечены в краткосрочные, а какие в долгосрочные ответы на стрессоры.

Комплексность подходов к постановке эксперимента, объем данных, их обсуждение и сформулированные выводы позволяют считать представленную работу актуальным исследованием, цель которого выполнена.

Заключение:

Диссертация Онеле А.О. является завершенной научно-квалификационной работой, имеющей научную и практическую значимость. Диссертационная работа Онеле А.О. в полной мере соответствует специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки)», а также требованиям пп. 9–14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», установленного правительством РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями), а ее автор, Онеле Алфред Обинна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки).

Сведения о составителе отзыва:

Кандидат биологических наук, специальность 03.00.12 – физиология и биохимия растений, доцент по кафедре физиологии и биохимии растений, заведующий кафедрой экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

620002, г. Екатеринбург,
ул. Мира, 19, т. 8(343) 3899728,
E-mail: irina.kiseleva@urfu.ru

Киселева Ирина Сергеевна

Подпись Киселевой И.С. заверяю

Начальник отдела организации образовательной деятельности
Института естественных наук и математики УрФУ

Фалько Н.В.

21.03.2022

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Онеле Альфреда Обинны "Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.", представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. - Физиология и биохимия растений

Изучение механизмов, лежащих в основе метаболизма активных форм кислорода (АФК), а также их эволюции в ходе становления наземных растений, представляет собой весьма актуальную задачу современной физиологии растений. Экстраклеточные пероксидазы представляют собой обширную группу ферментов, выполняющих как антиоксидантные, так и прооксидантные функции в клеточной стенке растений, а их изучение имеет потенциал для применения в прикладных исследованиях биосинтеза лигнина. Поэтому изучение пероксидаз у представителей эволюционно древних таксонов наземных растений, в частности, моховидных, имеет большое значение. Таким образом, диссертационная работа А.О. Онеле, посвященная исследованию молекулярных и биохимических особенностей пероксидаз класса III и аскорбатпероксидазы мха *Dicranum scoparium*, имеет высокую актуальность. В работе была поставлена задача исследования динамики образования АФК в *D. scoparium* в ходе водного, окислительного и температурного стрессов, выявления и биохимической характеристики изоформ пероксидаз класса III и аскорбатпероксидазы, а также идентификации генов соответствующих ферментов с использованием транскриптомных данных, и характеристике их регуляции при стрессах.

В работе получены убедительные доказательства участия пероксидаз класса III и аскорбатпероксидазы в метаболизме АФК *D. scoparium*. Использованный комплекс молекулярных, биохимических и биоинформатических подходов обеспечивает достоверность сделанных в работе выводов. Результаты работы представляют интерес для физиологов растений, изучающих метаболизм АФК, а также могут быть использованы при разработке учебных курсов для студентов и аспирантов. Автореферат проиллюстрирован рядом рисунков, оформлен аккуратно и грамотно. Вместе с тем имеются некоторые замечания к изложению полученных результатов. Так, на стр. 19 автореферата, автор сообщает: «При низкотемпературном воздействии (-20°C) экспрессия *DsAPX* недостоверно снижалась к 12 ч воздействия (рис. 16Б). Можно предположить, что снижение экспрессии гена *DsAPX* при действии отрицательных температур может приводить и к снижению активности АРХ (рис.13) и, соответственно, к усилению образования АФК». Хотелось бы обратить внимание автора на то, что «недостоверное снижение» означает отсутствие достоверных различий между уровнями экспрессии в контрольном и опытном вариантах, а отсутствие различий едва ли может повлечь за собой снижение активности ферментов или образование АФК в опытном варианте. Это касается и обсуждения результатов, представленных на Рис. 16А, 16Б. Возможно, высказанные автором предположения подтвердятся при увеличении биологической повторности. Однако, указанные неточности в интерпретации полученных данных не повлияли на достоверность сделанных в работе выводов.

Диссертационная работа "Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw." полностью соответствует критериям ВАК, опубликованным в "Положении о порядке присуждения учёных степеней", а её автор,

Онеле Альфред Обинна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. - физиология и биохимия растений.

Кандидат биологических наук (03.01.05– Физиология и биохимия растений);
зав. лабораторией молекулярной и экологической физиологии
федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ботанический институт им. В.Л. Комарова» Российской академии наук (БИН РАН)
197376, г. Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, д. 2
e-mail: ovoitse@binran.ru
тел.: 8(812) 372-54-16

25.12.2021

Войцеховская Ольга
Владимировна


Подпись руки 
ЗАВЕРЯЮ ч.о. 
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации ОНЕЛЕ АЛФРЕДА ОБИННА на тему:
«Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21–Физиология и биохимия растений

Диссертационная работа А.О. Онеле посвящена изучению окислительно-восстановительного метаболизма мха *Dicranum scoparium* Hedw. Данный вид является удобной моделью для изучения роли пероксидаз в ответах высших растений на абиотические стрессы. Исследования механизмов стрессоустойчивости различных таксонов актуальны в условиях изменения климата и усиления антропогенной нагрузки на биоценозы. В ходе исследований автором была оценена интенсивность образования различных активных форм кислорода (АФК) в тканях мха *D. scoparium* в нормальных и стрессовых условиях, а также определен изоферментный состав и активность пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы. Идентифицированы гены и проведен биоинформатический анализ свойств и структуры белков пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы. Проанализирован уровень экспрессии генов, кодирующих данные белки в различных стрессовых условиях.

Научная новизна работы связана с тем, установлена про/ и антиоксидантная активность изоферментов пероксидаз III класса *D. scoparium*. Идентифицированы 22 гена пероксидаз III класса, с помощью биоинформатического анализа охарактеризованы их свойства, консервативные мотивы и домены, сайты пост-трансляционных изменений, локализация в клетке. Показана эволюционная связь между пероксидазами дикранума и других видов растений. Впервые идентифицирован ген аскорбатпероксидазы вида, проведено его клонирование, секвенирование, анализ структуры продуктов, изучено изменение экспрессии гена аскорбатпероксидазы при стрессах.

Научно-практическая значимость связана с тем, что полученные результаты могут служить основой для фундаментальных исследований механизмов устойчивости растений к стрессовым факторам, а также могут быть применены в работах по экологическому мониторингу и мероприятиях по повышению стрессоустойчивости культурных растений.

Достоинством работы является ее высокий методический уровень. Исследования проведены с применением современных биохимических методов определения содержания АФК, активности окислительно-восстановительных ферментов. Автором была выделена тотальная РНК и синтезирована двуцепочечная к-ДНК. Проведено клонирование и секвенирование генов пероксидаз и аскорбатпероксидазы, анализ их экспрессии. Для идентификации генов ферментов и изучения структуры их белков были использованы современные базы данных, биоинформатические методы и специализированное программное обеспечение. Комплекс представленных результатов свидетельствует о том, что соискатель является сложившимся высококвалифицированным исследователем в области физиологии и биохимии растений.

К достоинствам работы также можно отнести большой набор использованных источников информации (417 источников, из них 395 иностранных).

Апробация работы была проведена на 11 Всероссийских и Международных конференциях, а также региональной конференции и трех итоговых конференциях КИБ ФИЦ КазНЦ РАН. По результатам работы было опубликовано 17 работ, из них 3 - в реферируемых журналах.

Приведенные в автореферате результаты исследований не вызывают сомнений, выводы соответствуют изложенному материалу. Автореферат оформлен в соответствии с действующими правилами оформления авторефератов и содержит необходимые сведения для оценки уровня диссертации.

В целом считаю, что диссертация А.О. Онеле соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.21– Физиология и биохимия растений.

Профессор кафедры агрономии,
селекции и семеноводства
ФГБОУ ВО Омский ГАУ,
д-р биол. наук, профессор

Плотникова Людмила Яковлевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Омский государственный аграрный университет
имени П.А. Столыпина» (Омский ГАУ)
644008, РФ, г. Омск, Институтская пл.-1, ОмГАУ.
Тел. (3812)65-12-66 (сл.). E-mail lya.plotnikova@omgau.org

14.03.2022 г.

Подпись Л.Я. Плотниковой удостоверяю:

*Магальский Олег УИ
Чернушова И.А. Зупи*

