

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Гнатюк Ірини Сергіївни «Застосування прийомів генетичної інженерії для отримання біотехнологічних рослин та редагування геному ріпаку озимого *Brassica napus* L.», представлену на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» з галузі знань 09 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційного дослідження. Дисертаційна робота Гнатюк Ірини Сергіївни присвячена розробці біотехнологічних підходів отримання рослин комерційної лінії озимого ріпаку *Brassica napus* L. вітчизняної селекції та створенню платформи для редагування геному цієї рослини з використанням системи CRISPR/Cas9. Озимий ріпак культивують як олійну культуру в помірних широтах Європи, Північної Америки, Азії. Його насіння містить від 38 до 50% олії, 16-29% білка та цілий ряд важливих вторинних метаболітів. Зі збільшенням попиту на насіння ріпаку, а також продукти його переробки, актуальним завданням стає отримання нових високопродуктивних, стійких до біотичних та абіотичних стресорів сортів, з якісно новими корисними ознаками. В Україні близько 95% від загальної посівної площі ріпаку займає озимий ріпак. Кліматичні умови України сприятливі для вирощування саме цього різновиду ріпаку. Однак, на сьогодні більшість біотехнологічних досліджень проведено на сортах ярого ріпаку. Отже, створення біотехнологічних рослин озимого ріпаку вітчизняної селекції з новими ознаками належить до своєчасних актуальних завдань.

Наукова новизна отриманих результатів.

Дисертантом уперше розроблено платформу для редагування геному озимого ріпаку вітчизняної селекції. Представлено ефективну систему регенерації лінії Vn1, яка дозволяє отримати насіння нульового покоління через рік після початку експериментів і за якої відсутня соматична мінливість *in vitro*. Оптимізовані умови *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації озимого ріпаку лінії Vn1 вітчизняної селекції та створені стійкі до гербіциду фосфінотрицину біотехнологічні рослини. У результаті генетичної трансформації конструкціями pCB133, pCB135 та

pSPG2254 отримані стійкі до гербіциду гліфосату трансгенні рослини озимого ріпаку лінії Bn1. Створений генетичний вектор pSPE2053, який містить ген синтезу бактеріальної ендонуклеази Cas9; за використання цього вектора отримані трансгенні лінії озимого ріпаку, які в подальшому можуть бути використані в селекційних програмах із редагування геному. Створено генетичну конструкцію pSPE2058, яка несе ген бактеріальної ендонуклеази Cas9, направляючі послідовності Aa1 та Aa2 для редагування геному ріпаку з метою накопичення олеїнової кислоти; а також селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази *bar*, яка може бути використана для створення високо олійних ліній озимого ріпаку української селекції.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень.

Основні положення дисертації та її висновки є обґрунтованими та достовірними, базуються на результатах значного обсягу досліджень, проведених із використанням фізіологічних, біохімічних, цитологічних та біоінформаційних методів. Значний обсяг отриманого експериментального матеріалу та використання методів статистичного аналізу суттєво зменшує ймовірність помилкової інтерпретації даних. Детальний аналіз значного масиву літературних джерел (151 посилань) з тематики дисертації дозволив Ірині Гнатюк провести обговорення отриманих результатів та запропонувати вдосконалену систему регенерації та яровизації озимого ріпаку лінії Bn1, яка дозволяє отримати насіння нульового покоління через рік після початку експериментів та не призводить до появи соматональної варіабельності в культурі *in vitro*.

Дисертаційне дослідження було виконано в рамках бюджетних тем: «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (0115U000025, 2015–2019) та «Цілеспрямовані зміни геному та плейотропні ефекти у генетично трансформованих рослинних системах» (0120U100849, 2020–2024). Результати теоретичних та практичних досліджень викладені в дисертації знайшли застосовуються в практичній

діяльності ТОВ «БЕТА НК» при створенні біотехнологічних рослин ріпаку озимого з якісно новими ознаками (акт впровадження результатів науково-дослідної роботи подано у Додатку Б).

Висвітлення результатів у наукових публікаціях. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 11 наукових праць, у тому числі 5 статей у фахових виданнях, з них 3 у журналах, які індексуються в наукометричних базах даних "Scopus" та "Web of Science" та 6 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях. Зміст та обсяг публікацій відповідають темі дисертації, відображають основні отримані положення та наукові результати, свідчать про їх новизну.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з переліку умовних позначень і скорочень, вступу, п'яти розділів (огляд літератури, опис методів досліджень та використаних об'єктів, три експериментальні розділи), висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота викладена на 143 сторінках, містить 37 рисунків і 6 таблиць.

Вступ написаний відповідно до чинних вимог. У ньому обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та завдання роботи, а також наведено основні положення наукової новизни і практичного значення отриманих результатів.

У першому розділі (Огляд літератури), охарактеризовано біологію *Brassica napus*, проаналізовано технологію вирощування та наведені відомості щодо вмісту олеїнової кислоти та вторинних метаболітів у сортах та гібридах ріпаку озимого, що культивуються в Україні. Наведені відомості про особливості регенерації і генетичної трансформації *in vitro* ріпаку озимого, проаналізовані фактори впливу на морфогенез і генетичну трансформацію ріпаку озимого *in vitro* та обґрунтовано необхідність використання як платформи для редагування жирно-кислотного складу насіння озимого ріпаку генетичної конструкції на основі системи CRISPR/Cas9.

У другому розділі (методичному) охарактеризовано об'єкти і умови досліджень, дизайн експериментів, наведені методи визначення досліджуваних показників і обробки результатів.

У третьому розділі представлені результати досліджень з оптимізації системи регенерації озимого ріпаку. Показано, що система регенерації є економічною (вимагає використання невеликої кількості доступних регуляторів росту) та ефективною (забезпечує високу частоту регенерації та отримання насіння нульового покоління вже через рік після початку експериментів). Наведено модифікований протокол *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації озимого ріпаку.

У четвертому розділі подані результати генетичної трансформації рослин конструкціями pCB133 та pCB135, Т-ДНК яких містить ген *CP4 epsps*, що забезпечує стійкість рослин до гербіциду гліфосату, а також конструкцією pSPG2254, яка несе мутантний ген *Bn epsps*. Показано, що мутантний ген *Bn epsps*, який входить до складу конструкції pSPG2254, забезпечує стійкість трансгенних рослин озимого ріпаку до гліфосату на такому ж рівні, як і ген *CP4 epsps* з *A. tumefaciens* CP4, що входить до складу конструкцій pCB133 та pCB135.

У п'ятому розділі описано розробку платформи для редагування геному озимого ріпаку. Важливо, що створена генетична конструкція може бути використана для редагування геному рослин як при стабільній, так і при транзійтній генетичній трансформації для накопичення рекомбінантного білка Cas9. До таких рослин у подальшому можуть бути перенесені послідовності гідових РНК використовуючи стабільну/транзійтну генетичну трансформацію або традиційні методи гібридизації.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. Аналіз тексту дисертації свідчить про відсутність порушення автором вимог академічної доброчесності. Використані ідеї і результати інших авторів мають посилання на відповідне джерело, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право. У роботі не виявлено ознак академічного

плагіату, фабрикації, фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві чітко зазначено особистий внесок дисертанта. Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи. Вона не містить положень чи ідей, що не наведені в основному тексті.

Пропозиції та зауваження до дисертаційної роботи. Принципових недоліків у дисертаційній роботі Гнатюк І. С. не виявлено. Однак, є деякі запитання та зауваження, зокрема:

1. В огляді літератури досить детально наведені фактори, які впливають на морфогенез та генетичну трансформацію *in vitro* озимого ріпаку *B. napus*, однак, відсутні пояснення власне механізму *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації, який покладено в основу проведеного дослідження. Доцільно було навести відомості про методи молекулярного клонування, зокрема, метод Golden Gate, за використання якого здобувачкою було створено дві генетичні конструкції.
2. У розділі "Матеріали і методи дослідження" не вказані джерела штамів бактеріальних клітин кишкової палички *E. coli* та агробактерій *A. tumefaciens*.
3. За використання методу ПЛР здобувачкою показана інтеграція гену *Cas9* у озимого ріпаку. Проте факт експресії не був засвідчений. Відомо, що після вставки окремі гени можуть замовчуватись, або можуть бути неактивними їхні продукти. Хотілось почути, яким чином можна визначити, чи відбулась експресія окремого трансгену? Чому такі дослідження не були проведені?
4. У дисертації наведений перелік модульних елементів, які були використані для конструювання генетичних векторів – pSPE2053 та pSPE2058. Однак, вибір регуляторних послідовностей (промоторів, термінаторів) дисертанткою практично не обґрунтований. Доцільно було б вказати, чому саме для кожної з касет обирали ті чи інші регуляторні елементи.

Разом із тим, наведені вище зауваження не знижують наукову цінність дисертації Гнатюк І.С. і не впливають на її позитивну оцінку.

Висновок. В цілому, за актуальністю, обсягом експериментального матеріалу, його новизною, науковим і практичним значенням, рівнем

застосованих експериментальних підходів дисертаційна робота «Застосування прийомів генетичної інженерії для отримання біотехнологічних рослин та редагування геному ріпаку озимого *Brassica napus* L.» повністю відповідає вимогам «Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 06.03.2019р., а її автор Гнатюк Ірина Сергіївна заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 – «Біологія» (галузь знань – 09 «Біологія»).

Офіційний опонент
к.б.н., с.н.с. відділу фітогормонології
Інституту ботаніки
імені М.Г. Холодного НАН України



Бабенко Л.М.

" 4 " січня 2022 року



Підпис: Бабенко Л.М.
Засвідчую
Відділ кадрів

