

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію **Кирпи-Несміян Тетяни Миколаївни** «Дослідження гетерологічної експресії генів десатураз ціанобактерій у вищих рослинах», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Актуальність теми. Зростаючі загрози глобальних змін клімату та збільшення частоти екстремальних погодних явищ вимагають розробки нових стратегій в адаптації рослин до стресів та застосування для свого вирішення нових ефективних підходів. На даний час одним із таких перспективних напрямів, які дають можливість підвищити ефективність створення нових форм культурних рослин, стійких до абіотичних стресових чинників, є використання методів біотехнології, і зокрема генетичної інженерії. Введення невеликого числа генів за допомогою методів генної інженерії є швидким підходом до поліпшення толерантності рослин. Сьогоднішні інженерні стратегії полягають у передачі одного або декількох генів, які кодують або біохімічні шляхи, або кінцеві точки сигнальних шляхів. Ці генні продукти забезпечують певний захист до екологічних стресів або безпосередньо, або опосередковано. Актуальним питанням є розробка уніфікованих підходів, що дозволяють скоротити час отримання рослин із заданими властивостями та підвищити ефективність біотехнологічних досліджень.

Незважаючи на те, що біотехнологічні рослини сільськогосподарських культур вже вирощуються у промислових масштабах, питання щодо можливих непередбачуваних змін у трансгенних форм залишається до кінця нез'ясованим. Тому вивчення фізіолого-біохімічних особливостей створених рослин має фундаментальний і практичний інтерес, оскільки може дати відповідь не тільки на питання їх адаптивної пластичності за стресових умов, але й спрогнозувати вплив конкретних генетично модифікованих форм на здоров'я тварин і людей, які споживатимуть такі рослини і продукти їх переробки.

Разом з тим, досі комплексно та системно не вивчалися фізіолого-біохімічні характеристики трансформантів у порівнянні з вихідними рослинами, хоча це питання є дуже важливим з огляду на те, що висловлюються припущення про небезпеку генетично-модифікованих рослин для навколишнього середовища та здоров'я людини. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Кирпи-Несміян Т. М., присвячена дослідженню впливу експресії генів десатураз ціанобактерій, перенесених у вищі рослини, на їх стійкість до абіотичних стресів та впливу зміни спектру жирних кислот на адаптацію рослин до температурних стресів та умов зневоднення, є безумовно актуальною і практично значимою, оскільки такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал як для подальшого розвитку генетичної інженерії, як одного із фундаментальних напрямів біотехнології рослин, так і для практичного використання у сільському господарстві.

У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається зі вступу, 3 розділів (огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результатів досліджень та їх обговорення), висновків, списку літератури, який включає 223 джерела. Робота містить 6 таблиць та 62 рисунки.

У розділі «Огляд літератури» розглянуто механізми адаптації рослин до абіотичних стресів та наведено сучасні уявлення про генетичну регуляцію стійкості рослин. Представлено сучасну класифікацію та дано характеристику ферментів десатураз живих організмів, в тому числі рослинних. Приділено увагу методам оцінки деструкції клітин та їх компартментів. Проте в огляді літератури бажано було б навести відомості про вплив експресії гетерологічних генів на стійкість рослин до абіотичних стресів.

У розділі «Матеріали і методи» детально описано умови проведення експериментів: рослинний матеріал, використаний у роботі; гетерологічні гени та векторні конструкції, застосовані в експериментах з генетичної

трансформації; умови культивування та вирощування рослин в асептичних умовах та за водного дефіциту, низьких та високих температур; аналіз трансформованих рослин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції; методи якісного та кількісного визначення активності термостабільної ліхенази; методи визначення: активності супероксиддисмутази, рівня втрати електролітів та накопичення малонового діальдегіду; аналіз спектру жирних кіслот методом газової хроматографії та мас-спектроскопії, а також методи статистичної обробки даних.

У розділі «Результати та обговорення» представлено результати досліджень рослин тютюну (*Nicotiana tabacum*), що містять у своєму геномі та експресують гетерологічні гени десатураз ціанобактерій. Дана фізіолого-біохімічна характеристика рослин, що містять та експресують гібридні гени *desA::licBM3* ціанобактерії *S. sp.* PCC 6803 або *ats1A::desC::licBM3* ціанобактерії *S. vulcanus*. Показано, що експресія гена, що кодує рекомбінантну $\Delta 12$ десатуразу (*desA::licBM3*), в рослинах призвела до достовірного збільшення частки C (18:2) і зменшення рівня C(18:3). За дії низьких температур зареєстровано збільшення активності СОД на 30-50% в екстрактах всіх рослин, які експресують гібридні гени десатураз, в той час як в екстрактах нетрансформованих і контрольних трансгенних рослин активність СОД знижувалася за цих же температурних умов. У трансгенних форм виявлено тенденцію до зменшення рівня втрати електролітів на 20-30% у порівнянні з контрольними рослинами та зменшення рівня накопичення малонового діальдегіду на 15-25%.

Аналіз рослин тютюну, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* в умовах підвищених температур не виявив достовірної різниці між трансгенними та контрольними зразками за рівнем виходу електролітів та активністю СОД. Показано, що через 12 год рівень накопичення малонового діальдегіду був меншим у рослин, що експресують гени десатураз, порівняно з контрольними нетрансгенними рослинами на 80-90%, а трансгенним контролем на 7-20%.

Дослідження рослин *N. tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3* в умовах осмотичного стресу (100 мМ манітолу) виявило підвищення активності СОД у дослідних рослин порівняно з нетрансформованими рослинами на 3-15% та рослинами *N. tabacum*, що експресують ген *gfp::licBM3* на 7-21%. Під час культивування рослин з додаванням 200 мМ манітолу було виявлено зменшення накопичення малонового діальдегіду у рослин, що експресують гени десатураз, порівняно як з рослинами дикого типу (на 2-19%), так і з трансгенним контролем (на 20-45%).

Проведений фізіолого-біохімічний аналіз рослин покоління T1, що містять та експресують гібридні гени *desA::licBM3* або *ats1A::desC::licBM3*. Виявлено, що у 20% рослин, що мають успадкувати ген *ats1A::desC::licBM3* спостерігали успадкування гена *desC* або *licBM3*. У 40% рослин, що мають успадкувати ген *desA::licBM3* спостерігали успадкування гена *desA* або *licBM3*. У рослин, що містять в своєму геномі та експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази було відмічено збільшення частки ліноленової кислоти, а в рослин, що експресують ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази – лінолевої кислоти. За дії холодового стресу виявили найменшу втрату іонів у тютюнів, що містять та експресують додаткові гени десатураз та збільшення активності СОД.

Дана фізіолого-біохімічна характеристика рослин, що містять та експресують ген *desA* під холодоіндукованим промотором CBF1. Виявлено збільшення частки лінолевої кислоти у рослин тютюну, що експресують ген ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії та незначне підвищення ліноленової кислоти. Показано збільшення активності СОД після дії стресору у рослин, що експресують ген десатурази, порівняно з контрольними рослинами на 20-30%. Виявлено зменшення накопичення МДА порівняно з контрольними рослинами тютюну дикого типу та трансгенним контролем на 50-70% та зменшення рівня втрати електролітів на 35-70%, порівняно з контрольними рослинами тютюну.

Проведена фізіолого-біохімічна оцінка рослин, що одночасно експресують гібридні гени *desA* та *desC*. Аналіз рослин *N. tabacum* в умовах знижених температур та заморозків виявив підвищення активності білків ферменту ліхенази порівняно з трансгенним контролем на 23-51%, менший рівень втрати електролітів та підвищення активності СОД після дії холодового стресу на 43-78%.

Фізіолого-біохімічна характеристика рослин картоплі, що експресують ген *desA* показала, що разом зі збільшенням частки лінолевої кислоти було відмічено зменшення частки пальмітинової та пальмітоолеїнових кислот. В умовах осмотичного стресу (200 мМ манітолу) виявлено підвищення активності СОД на 2-11% порівняно з контрольними рослинами. Рівень накопичення малонового діальдегіду показав зниження даної речовини у рослин, що експресують гени десатураз за винятком лінії сорту "Слов'янка 1". При культивуванні рослин на середовищі MS з додаванням 200 мМ манітолу виявили збільшення активності десатураз за ферментативною активністю репортерного білка ліхенази у ліній сортів "Серпанок 2", "Лугівська 2", "Незабудка 7".

Згідно результатів фізіолого-біохімічного аналізу рослин орхідей, що експресують ген *desA* у двох трансгенних лініях (№1 та №2) було відмічено зниження частки двоненасиченої жирної кислоти (ЖК) та збільшення частки триненасиченої ЖК. Також в цих лініях було помічено появу в складі мембранних ліпідів частки C19:0. В умовах зижених температур виявлено збільшення активності ферменту СОД у рослин, які мали відмінності у спектрі ЖК. У рослин, в яких не було виявлено збільшення частки триненасиченої лінолевої кислоти, спостерігалась активність СОД нижче контролю. Було виявлено менший вміст малонового альдегіду, у всіх трансгенних рослин, що експресують ген десатурази порівняно з контролем протягом усього періоду експерименту. Дослідження активності десатураз за ферментативною активністю репортерного білка термостабільної ліхенази показало підвищення експресії на 4 та 14 дні, що вказує на процеси аклімації

даних рослин. За знижених температур було виявлено підвищення активності супероксиддисмутази, менший рівень накопичення малонового діальдегіду у рослин, що експресують перенесений ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази порівняно з контрольними рослинами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота була виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за темами НДР: III-1-15 "Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах", II -I-17 "Вивчення функціонування гетерологічних генів та їх впливу на адаптаційні характеристики рослинних систем в умовах біотичних та абіотичних стресів" та за підтримки гранту НАНУ УкрІНТЕІ № 0115U004171.

Новизна дослідження та одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором вперше отримано трансгенні рослини тютюну, що містять та експресують ген *desA* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1, тютюну *N. tabacum*, що містять та експресують одночасно гібридні гени десатураз *desA* та *desC*. Досліджено вплив експресії гена $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази у рослин орхідей *D. linguella* в умовах знижених температур. Показано адаптацію рослин картоплі *S. tuberosum* сортів української селекції (Лугівська, Слов'янка, Серпанок), що експресують ген *desA*, до дії осмотичного стресу.

Теоретичне значення результатів досліджень. Дослідження, проведені автором, вносять суттєвий вклад в розвиток нового напрямку – метаболічної інженерії рослин, надають нові перспективи для вирішення фундаментальних питань молекулярних біотехнологій та трансмісійної генетики. Результати, наведені у дисертації, поглиблюють та розширюють уявлення: про генетичні та фізіолого-біохімічні основи детермінованості процесів трансгенезу в умовах *in vitro* та *in vivo*; *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію та експресію генів; потенціал різних векторних систем; екзогенні та ендогенні чинники, які впливають на процес трансформації та

можливі шляхи підвищення її ефективності; здатності рослин протистояти стресам.

Практичне значення роботи полягає в тому, що отримані лінії рослин тютюну, що містять гетерологічні гени десатураз ціанобактерій, які були проаналізовані на стійкість до знижених температур та заморозків, а також протестовані на чутливість до впливу високих температур. Дані дослідження є підґрунтям для створення сортів цінних сільськогосподарських рослин, які будуть стійкими до температурних коливань. Отримані та протестовані на стійкість до знижених температур лінії орхідей *D. linguella* можуть використовуватись в якості декору для оформлення інтер'єрів та екстер'єрів. Отримано лінії картоплі, що містять та експресують додаткові гени десатураз, з підвищеними адаптивними властивості, які можна рекомендувати для використання у технічних цілях. Отримані результати вносять вклад у розробку новітніх біотехнологічних прийомів для створення ліній та сортів рослин, стійких до абіотичних стресів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант проаналізував значний масив даних літератури з останніх досягнень біотехнології у створенні трансгенних рослин, а також вплив різних чинників на результативність даної біотехнології. Автором доведена важливість вивчення трансгенних рослин та виявлення різних змін їх фізіологічних та біохімічних параметрів. Понад 80 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати значний обсяг експериментального матеріалу. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: методики культивування рослин *in vitro* за нормальних умов та за дії абіотичних стресів; метод *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої генетичної трансформації; молекулярно-біологічні

(полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР); сучасні методи біохімічного та фізіологічного аналізу, а також статистичні методи.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу чималого фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням методів досліджень. Достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. Тому, вважаю, що наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на міжнародних наукових форумах. Зокрема, за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 17 наукових праць. З них: 4 статті у провідних фахових виданнях України, 3 статті у зарубіжних виданнях та 10 публікацій – у матеріалах та тезах міжнародних конференцій. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на 10 наукових конференціях.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.

Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Проте слід зазначити деякі слабкі місця представленої роботи:

1. Текст дисертації містить певну кількість орфографічних та стилістичних помилок, зокрема чомусь по всьому тексту дисертації не відмінюється назва ферменту супероксиддисмутази; навіть у назві розділів автор пише «гібридний гени» (с.19); ацетелтрансферази (с.33) замість ацетилтрансферази; текучість замість плинність (с.38); нітроголубий (с.54) замість нітроблакитний; сира вага (с.55) замість сира маса; за допомогою довжини хвилі (с.55); маркер розміру ДНК замість маркер молекулярної маси»; краща відповідь антиоксидатного ферменту (с.74); успадкування перенесених генів на стійкість до стресових чинників (83); пророщування рослин (с.84) замість пророщування насіння; утворювалися пагони, з яких розвивались трансгенні рослини (91), а хіба пагони самі нетрансгенні ?; місять (с.101) замість містять; удикий тип (с.101) замість дикий тип;

трансформати (с.102) замість трансформанти; солоність ґрунту (110) замість засолення ґрунту; диальдегід (с.113) замість діальдегід і т.і.

2. По тексті роботи дисертант використовує низку некоректних виразів, зокрема «наявність ампліконів *desC*, *desA*, *licBM3*» (с.99) замість наявності ампліконів ДНК розміром у парах нуклеотидів; «рівень експресії ферменту» (101), хоча ні білки, ні ферменти не можуть експресуватися, а експресія є лише у генів; «методом листкових дисків», хоча такого методу не існує, як і методів «черешків», коренів» і т.і, а є метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням як експлантів листкових дисків; як селективний агент використовували ген *nptII* (91) ?, хіба ген можна використовувати як селективний агент? Як селективний агент зазвичай використовуються антибіотики, в даному випадку канаміцин, а експресія гена *nptII* надає стійкості до цього антибіотика.

3. У розділі «Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами» повністю відсутні роки виконання зазначених тем. Перелік праць дисертанта, опублікованих за темою дисертації, чомусь наведений двічі - на стор.13-17 та стор. 27-32. У змісті спочатку йде «Огляд літератури», а потім розділ 1, замість Розділ 1. «Огляд літератури», Розділ 2 чомусь названий «Експериментальна частина» замість розділ 2 «Матеріали і методи».

4. Назви таблиць 3.2.- 3.6. «Аналіз спектру жирних кислот...» некоректні, оскільки аналіз спектру можливо здійснити методом газової хроматографії та мас-спектрометрії, а у таблицях наведений спектр виявлених кислот та їх вміст у відсотках. У таблиці 3.2. похибка перевершує саме значення ($0,6 \pm 0,7$) ? Крім того, необхідно було привести хоч би одну хроматограму.

5. Підписи до рис. 3.2; 3.29; 3.30; 3.50 «Аналіз трансгенних ліній *N. tabacum*...» некоректні, оскільки на рисунках представлені електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до певних генів. Підпис до рис. 3.37. «Мультиплексна ПЛР з екстрактами рослин тютюну...» також неправильний, оскільки метод ПЛР базується на аналізі ДНК, а не на аналізі екстрактів.

6. Активність супероксиддисмутази (СОД) на всіх рисунках – 3.5; 3.12; 3.19; 3.24; 3.34; 3.48 дана чомусь у різних одиницях: U/mg , акт. U/mg ; акт/мг білка, а на рис.3.60 чомусь взагалі у мкМ/мг, хоча активність СОД виражають у одиницях активності на міліграм білка.

7. Рис. 3.4; 3.8; 3.14; 3.52 має підпис «Аналіз активності ліхенази» або «Кількісна ліхеназна реакція», хоча кількісний аналіз активності ліхенази можливо провести лише біохімічним методом, а на рисунках представлено результати визначення активності цього ферменту. У розділі 2.8. відсутня формула кількісного визначення активності термостабільної ліхенази. Автор пише, що за одиницю активності брали кількість ферменту, що утворює 1 мкМ відновлювальних цукрів за 1 хв (в перерахунку на 1 мг білка), а на всіх графіках активність ферменту представлена у різних одиницях різними мовами і чомусь у грамах і секундах. Якщо це секунди, то повинні бути мікрограми, тоді звідки цілі числа?

Проте вказані зауваження не носять принципового характеру і не знижують наукової цінності дисертації.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів біотехнології. Результати роботи Кирпи-Несміян Т.М. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках інститутів, що займаються питаннями генетичної інженерії рослин, а також курсах лекцій з генетичної інженерії, клітинної біології, фізіології рослин Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук. Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, рецензована дисертаційна робота «Дослідження гетерологічної експресії генів десатураз ціанобактерій у вищих рослинах», є

завершеною науковою роботою, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Кирпа-Несміян Тетяна Миколаївна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,

ст. н. сп. відділу генетичного поліпшення рослин

Інституту фізіології рослин і генетики

НАН України, доктор біол. наук

О.В. Дубровна

