

Відгук отримано 13.11.2021р.
Голова спеціалізованої
ради ДФ 26.261.001

Жаботинська (Матвеева Н.В.)

Відгук

офіційного опонента доктора біологічних наук, доцента кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Шевченко Тетяни Петрівни на дисертаційну роботу Варченко Оксани Іванівни «Вивчення гетерологічної експресії репортерного гена *gfp* в рослинах *Nicotiana rustica* L.», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи

Створення рослин стійких до гербіцидів, біотичних та абіотичних факторів, отримання нових сортів та гібридів, які задовольняють агропромисловий сектор, залишається актуальним завданням. Успішне виконання такого завдання пов'язане з ефективною та контрольованою експресією перенесених генів. Експресія генів залежить від вибору видів-хазяїв, регуляторних елементів, що забезпечують функціонування гетерологічних генів, феномену «сайленсингу» генів. Рослини у порівнянні з культурами клітин ссавців є більш економічними та безпечними системами для масштабної продукції білків. Транз'єнтна експресія генів вірусними векторами дозволяє швидко та у великих кількостях виробляти рекомбінантні білки в тканинах рослин, оскільки не потребує тривалого процесу скринінгу генів. Використання транз'єнтної експресії генів, дозволило досліджувати фундаментальні питання молекулярної біології та прикладної генетичної інженерії. На сьогодні, використовується мала різноманітність регуляторних елементів, що не дозволяє оцінити діапазон експресійних можливостей генів з використанням тих чи інших елементів генетичної конструкції.

З огляду на це, робота Варченко Оксани Іванівни на тему «Вивчення гетерологічної експресії репортерного гена *gfp* в рослинах *Nicotiana rustica* L.», мета якої полягає у комплексному вивченні механізмів регуляції

транзійентної гетерологічної експресії гена *gfp* в рослинах *Nicotiana rustica* L., є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами та темами

Дисертаційне дослідження за своєю темою та змістом пов'язане з науковими програмами та виконане в межах науково-дослідної роботи відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України в рамках наукових проектів НАН України III-5-16 «Розробка біотехнологій отримання природних та гетерологічних сполук в рослинних системах» та 1230/3 «Вивчення впливу стресових факторів біотичного і абіотичного походження на накопичення вторинних метаболітів та рекомбінантних сполук в генетично змінених та нативних рослинних системах».

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Аналіз матеріалів, викладених в дисертації, демонструє чітке формулювання автором мети роботи і задач дослідження, і підкреслює наукову новизну отриманих результатів. Завдання, визначені автором для виконання роботи, логічно витікають із сформульованої мети дослідження та сприяють її досягненню. Об'єкт і предмет дослідження відповідають меті і завданням роботи.

Дисертація має чітку та зрозумілу структуру. У першому розділі роботи автором детально проаналізовано різноманіття сучасних технологій молекулярного клонування, охарактеризовано переваги та недоліки кожного різновиду.

У другому розділі описано об'єкти і методи дослідження. Опис застосованих методів проведений ґрунтовно, містить детальну інформацію про етапи досліджень, адекватно реферований. Дисертанткою використана достатня кількість методів досліджень, що є необхідним для розв'язання поставленої мети і задач дослідження.

Опис власних досліджень включає вивчення впливу оптичної густини агробактеріальної суспензії на транзйентну експресію гена *gfp* в тканинах *Nicotiana rustica* L., порівняння рівнів експресії гена *gfp* при *Agrobacterium*-опосередкованій транзйентній трансформації *Nicotiana rustica* L. конструкціями з різними промоторними послідовностями. Крім того, проведено порівняння рівнів експресії гена *gfp* при *Agrobacterium*-опосередкованій транзйентній трансформації *Nicotiana rustica* L. в позаклітинному середовищі та різних клітинних компартментах. Визначено рівні експресії гена *gfp* при *Agrobacterium*-опосередкованій транзйентній трансформації *Nicotiana rustica* L. конструкціями з різними нетрансльованими 5'-послідовностями, а також рівні експресії гена *gfp* при *Agrobacterium*-опосередкованій транзйентній трансформації рослин *Nicotiana rustica* L. генетичними конструкціями з різними термінаторами. Досліджено вплив білка-супресора сайленсингу Р19 на рівень експресії гена *gfp* при *Agrobacterium*-опосередкованій транзйентній трансформації *Nicotiana rustica* L.

Послідовність викладення матеріалу свідчить про те, що розділи дисертаційної роботи взаємопов'язані між собою. Найважливіші результати дослідження відображені у висновках дисертації, що відповідають поставленим завданням. Наукові дослідження, висновки та рекомендації дисертаційної роботи представлені та обґрунтовані із застосуванням відповідних посилань на літературні джерела. Усе це дозволяє зробити висновок про достатню обґрунтованість представлених у дисертаційній роботі наукових положень, висновків і рекомендацій.

Наукова новизна одержаних результатів

Уперше проведено порівняльний аналіз експресії репортерного гена *gfp* при транзйентній генетичній трансформації рослин виду *Nicotiana rustica* L. за використання різних регуляторних елементів: промоторів, сигнальних пептидів, нетрансльованих 5'-послідовностей та термінаторів. Показано, що рівні експресії гетерологічного гена *gfp* відрізняються в залежності від використаних регуляторних елементів у генетичному векторі. Вперше

підтверджено вплив білка-супресора пост-транскрипційного сайленсингу генів P19 вірусу карликової кущистості томатів на експресію гетерологічного гена *gfp* при транзієнтній генетичній трансформації рослин виду *Nicotiana rustica* L. та удосконалено систему її транзієнтної трансформації рослин за рахунок визначення оптимальної густини агробактеріальної суспензії.

Практичне значення отриманих результатів

Результати дисертаційної роботи можуть слугувати важливим підґрунтям при створенні генетичних векторів для транзієнтної трансформації рослин. Надані практичні рекомендації є доцільними та впроваджені у практичній діяльності ТОВ «БЕТА НК» при створенні генетичних конструкцій для трансформації рослин.

Повнота викладу основних наукових положень, висновків в опублікованих роботах автора

Основні положення дисертації викладено в 11 наукових працях, серед них 5 статей, у тому числі дві статті, які індексуються у наукометричній базі даних «Scopus», одна стаття у періодичному науковому виданні іншої держави, яка входить до країн-членів Європейського Союзу, дві статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України (усі включені до міжнародних наукометричних баз даних) і шести тезах матеріалів міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференцій.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності

У дисертаційній роботі Варченко Оксани Іванівни відсутні ознаки порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Загалом, дисертація демонструє високу кваліфікацію дисертантки та її обізнаність у проведенні експериментів, інтерпретації та узагальненні даних, але хотілося б висловити ряд запитань та зауважень:

Зауваження щодо змісту дисертації та дискусійні питання

1. Зазвичай використовують або україномовні назви вірусів, або міжнародні, але не дублюють їх в тексті.

2. Українська назва вірусу «*Cucumber Mosaic Virus*» звучить як «вірус огіркової мозаїки», а не «вірус мозаїчності огірка».
3. На рис.3.4, де представлені діаграми спектрофлуориметричного аналізу рівнів флуоресценції GFP в тканинах махорки, на нашу думку, невдало розміщені контролі у середині діапазону концентрацій.
4. Методики створення генетичних конструкцій у роботі викладені досить повно, але не зазначено, чому саме ці промотори та термінатори були використані у дослідженні.
5. Чому обрали саме такий діапазон розведення суспензії з оптичною густиною 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 при довжині хвилі 600 нм (OD600)?
6. Який механізм залежності рівня експресії гетерологічного гена *gfp* від оптичної густини бактеріальної суспензії?
7. Як пояснити нижчий рівень експресії рекомбінантного білка GFP у цитозолі при використанні апопластного сигнального пептида в конструкції?
8. Чому використання в генетичній конструкції послідовності, що кодує білок-інгібітор пост-транскрипційного сайленсингу генів P19 вірусу куцистої карликовості томатів, підвищує рівень експресії гена *gfp*?

Однак, ці зауваження не впливають на теоретичну і практичну цінність дисертації, а окремі запитання мають дискусійний характер.

Висновок

Оцінюючи роботу в цілому, можна зробити висновок, що розглянута дисертація Варченко Оксани Іванівни на тему «Вивчення гетерологічної експресії репортерного гена *gfp* в рослинах *Nicotiana rustica* L.» є актуальним, завершеним комплексним дослідженням, яке дозволило сформулювати, обґрунтувати та розв'язати актуальне науково-практичне завдання, а саме дослідження впливу різних експериментальних факторів на ефективність експресії репортерного гена *gfp*. Враховуючи викладене вище, вважаю, що за

актуальністю, ступенем новизни, обґрунтованістю, науковою та практичною цінністю здобутих результатів дисертація Варченко Оксани Іванівни на тему «Вивчення гетерологічної експресії репортерного гена *gfp* в рослинах *Nicotiana rustica* L.» відповідає вимогам «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії» затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 06 березня 2019 р. № 167 спеціальності 091 «Біологія», а її автор Варченко Оксана Іванівна заслуговує присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент –

доктор біологічних наук, доцент кафедри вірусології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

Тетяна ШЕВЧЕНКО

Згідно з завізую
Заст. директора
ННЦ «Інститут біології
та медицини»



Оксана Коваленко