

ВІДГУК

на дисертаційну роботу **Дробот Катерини Олександрівни** «Культура трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* як джерело біологічно активних сполук», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

У суспільстві не спадає інтерес до природних сполук рослинного походження. Скоріше навпаки, поскільки їх альтернатива – сполуки хімічного походження – викликають усе більш насторожене ставлення у силу різних побічних ефектів при їх застосуванні у харчовій, косметичній і фармакологічній промисловості. Разом з тим, існує гострий дефіцит природної сировини для виробництва таких сполук. Наразі серед перспективних напрямів, що дають можливість вирішити цю проблему, є отримання біологічно активних сполук (БАС) із біомаси культивованих *in vitro* клітин, тканин чи органів рослин. Проте такі технології є все ще недосконалими і дороговартісними, що стримує їх широке впровадження у промислове виробництво. Здешевити такі технології може отримання і подальше використання культури ізольованих коренів, трансформованих агробактерією. Трансгенні корені здатні рости на живильному середовищі без регуляторів росту і можуть синтезувати сполуки, притаманні нетрансформованим рослинам, а також рекомбінантні сполуки відповідно до перенесених генів. Це дозволяє використовувати культуру «бородатих» коренів для продукування БАС, у тому числі і медичного призначення. Проте подібних досліджень, які б завершилися успішно, проведено все ще недостатньо. У цій галузі все ще більше питань, ніж відповідей.

Саме тому роботу К.О. Дробот «Культура трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* як джерело біологічно активних сполук», метою якої було отримання культури трансгенних коренів рослин *Artemisia annua* L., *A. vulgaris* L. та *A. dracunculus* L., а також визначення вмісту біологічно

активних сполук (артемізиніну, флавоноїдів та цукрів) і біологічної активності (антиоксидантної та противірусної) в отриманих коренях слід визнати важливою та актуальною як з практичного боку, так і для подальшої розробки генетичних основ сучасної біотехнології лікарських рослин і фітопрепаратів.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із переліку умовних скорочень; вступу; трьох розділів, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку літератури. На початку роботи наведено анотацію українською та англійською мовами. Текст зі списком літератури (459 джерел), ілюстраціями (21 рисунок, 8 таблиць) викладено на 182 сторінках машинопису.

У вступі коротко обґрунтовується актуальність теми; наведено мету і завдання дослідження; дано коротке визначення використаних об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації та публікації, обсяг та структуру дисертації. Слід відмітити, що я не знайшов у вступній частині дисертації відомостей про зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, які, до речі наведено в авторефераті.

Розділ 1 «Огляд літератури» складається з п'яти підрозділів. Тут проаналізовано результати досліджень та наявні у літературі відомості про особливості біотехнологічного використання культур «бородатих» коренів рослин полину, а також рослин інших родів. Розглянуто особливості досліджень з генетичної трансформації дводольних, зокрема зроблено акцент на використанні *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації як інструмента впливу на метаболічні характеристики рослин. Підсумовуючи та узагальнюючи аналіз літературних даних, автор робить цілком слушні і обґрунтовані положення про те, що її власне дослідження є новим і важливим з точки зору вивчення перспективи застосування «бородатих» коренів різних видів полину як джерела БАС. У цілому огляд літератури є

аналітичним, містить науково обґрунтовані узагальнення. В ньому достатньо висвітлено останні експериментальні дані з питань, що мають відношення до теми дисертації. Огляд свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в даній галузі досліджень, чітко викласти стан та перспективи досліджень, а також коротко і зрозуміло обґрунтувати актуальність, роль та значення власного дослідження у контексті накопичених світовою наукою знань та сучасних викликів.

Розділ 2 “Матеріали і методи досліджень” складається з дев'ятнадцяти коротких підрозділів, де коротко, чітко та ясно охарактеризовано використаний матеріал (три види полину) та широкий спектр сучасних культуральних, генно-інженерних, молекулярно-генетичних, біохімічних, статистичних методів і підходів та їх модифікацій, розроблених автором. У цілому було використано сучасні методи, за допомогою яких отримано коректні результати, адекватні стосовно поставлених задач дослідження.

Розділ 3 «Результати досліджень та їх обговорення» складається з чотирьох підрозділів. Тут наведено і обговорено наступні дані, отримані автором дисертаційного дослідження.

Розділ 3.1. «Культивування рослин *Artemisia* spp. *in vitro* та ініціювання культури «бородатих» коренів» присвячено викладу і аналізу результатів власного дослідження, які свідчать про те, що автор вперше розробила технологію генетичної трансформації та отримала культуру «бородатих» коренів полину *A. dracuncululus* L. за допомогою дикого штаму *A. rhizogenes* A4. Вона встановила, що важливим чинником, який впливає на частоту трансформації, є час кокультивування експлантів з *Agrobacterium*. Уперше отримала «бородаті» корені полину з використанням *A. rhizogenes* з геном синтезу інтерферону людини ifn- α 2b.

У розділі 3.2 «Дослідження впливу генетичної трансформації на морфологічні параметри «бородатих» коренів» наведено результати, які свідчать, що отримані автором лінії «бородатих» коренів відрізнялися за низкою ознак, зокрема за морфологією, приростом біомаси, забарвленням,

ступенем обводнення, ступенем галуження та ін. Встановлено, що індолілоцтова та індоділмасляна кислоти пришвидшують ріст усіх ліній «бородатих» коренів у 1,2 - 3,6 рази.

Ключовим у дисертаційній роботі є, на нашу думку, розділ 3.3 «Визначення вмісту біологічно активних сполук та біологічної активності у «бородатих» коренях *Artemisia*». Автор встановила, що корені нетрансформованих рослин та «бородаті» корені *A. vulgaris*, *A. annua* та *A. dracunculus* накопичують фруктани. Вміст фруктанів у нетрансформованих коренях коливався у межах 62 – 264 мг/г сухої речовини. Найвищий вміст фруктанів було зафіксовано у коренях *A. vulgaris*, а найменший — у коренях *A. dracunculus*. А у трансгенних коренів найвищий вміст фруктанів був у трансгенних лініях *A. dracunculus* та *A. annua*, а найменший — у трансгенних коренях *A. vulgaris*. У трансгенних коренях *A. vulgaris* фруктозовмісних сполук накопичувалося значно менше за таку у коренях контрольних нетрансформованих рослин, а у трансгенних лініях *A. annua* та *A. dracunculus* вміст фруктанів перевищував такий у коренях нетрансформованих рослин. Зокрема, у «бородатих» коренях *A. annua* вміст фруктанів знаходився у діапазоні 128 – 161 мг/г сухої речовини та був дещо вищим, ніж у нетрансформованих коренях цього виду (в 1,05–1,32 рази). У «бородатих» коренях *A. dracunculus* фруктани накопичувались у кількості в 1,4 – 2,2 рази вищій, ніж у контрольних коренях, вміст цих сполук коливався у межах 86,6 – 183,1 мг/г сухої речовини. Автор також встановила зміни вмісту цукрів у трансгенних коренях *A. vulgaris* та *A. dracunculus*. Відмінності проявлялися у наявності сполук, які не були притаманні нетрансформованим кореням. Наприклад, в трансгенних коренях *A. vulgaris* відбувався синтез манітолу, а в трансгенних коренях *A. dracunculus* – синтез галактози. Також було виявлено і кількісні зміни у накопиченні «бородатими» коренями різних сполук. Наприклад, кількість фруктози в деяких трансгенних лініях *A. vulgaris* перевищувала таку у контрольних коренях в 3,4 рази, а сахарози — в 1,3-1,6 рази.

Наведені результати визначення вмісту артемізиніну свідчать, що деякі лінії трансгенних коренів *A. vulgaris* накопичували артемізинін у більшій кількості, ніж корені нетрансформованих рослин (до 1 мг/г сухої речовини): у 40% ліній *A. vulgaris* вміст артемізиніну був більший, ніж у контролі, у 40% — на рівні контролю, та у 20% — менше, ніж у контролі. Вміст артемізиніну у трансгенних коренях *A. dracunculus* варіював у діапазоні 0,6 – 1,1 мг/г сухої речовини і поступався вмісту цієї сполуки у контрольних коренях. У нетрансформованих коренях *A. annua* вміст артемізиніну був значно вищим, ніж у лініях «бородатих» коренів: до 6,5 мг/г сухої речовини у контролі проти 0,4–1,6 мг/г у коренях, отриманих після генетичної трансформації.

Визначення вмісту флавоноїдів показало, що трансгенні корені *A. annua* та *A. vulgaris* накопичували флавоноїди у більшій кількості порівняно з контролем, а корені *A. dracunculus* переважно мали нижчий вміст цих сполук, ніж корені нетрансформованих рослин.

Дослідження антиоксидантної активності показало, що екстракти, отримані з коренів різних видів *Artemisia*, відрізнялися за здатністю відновлювати DPPH^+ радикал. Найменшу активність проявляли екстракти, отримані з нетрансформованих коренів *A. annua*, а найвищу — екстракти з *A. dracunculus*. Екстракти з нетрансформованих коренів *A. vulgaris* проявляли дещо нижчу активність — на рівні 66%. Здатність екстрактів з трансгенних коренів відновлювати DPPH^+ радикал коливалась у широкому діапазоні 22 – 93%. Найнижчу протирадикальну активність було виявлено у екстрактах, отриманих з трансгенних коренів *A. dracunculus*, а найвищу — у екстрактах з *A. annua*. У деяких екстрактів, отриманих з трансгенних ліній, рівень активності виявився вищим у порівнянні з таким у екстрактах з контрольних нетрансформованих коренів відповідних видів.

Автор також вивчила протівірусну активність екстрактів з коренів досліджених рослин, які було отримано шляхом генетичної трансформації з використанням гена інтерферону *ifn- α 2b* людини. Встановила, що лінії «бородатих» коренів *A. vulgaris* та *A. annua* значно відрізнялися за рівнем

інтерфероноподібної активності, яка варіювала в межах 642 – 1414 МО/г маси. Високу активність мали екстракти з двох ліній трансгенних коренів *A. vulgaris* та двох ліній *A. annua* — на рівні 1414 та 1212 МО/г маси відповідно. Такі суттєві відмінності дослідниця пояснює видоспецифічністю та можливістю впливу місця вбудовування та активності перенесеного гена інтерферону. Автор підкреслює, що екстракти з контрольних рослин протівірусної активності в її дослідках не мали.

У наступному короткому розділі 3.4. «Відбір ліній-продуцентів біологічно активних сполук» наведено дані, які свідчать, що за результатами досліджень було відібрано по одній лінії трансформованих коренів кожного з вивчених видів полину. Так, відібрана лінія *A. vulgaris* накопичувала фруктани у кількості 111 мг/г, флавоноїди та артемізинін у кількості 45,3 мг/г та 1 мг/г відповідно. Лінія *A. annua* містила фруктани у кількості 160,8 мг/г, флавоноїди у кількості 35,6 мг/г, а вміст артемізиніну був на рівні 1,6 мг/г. У відібраній лінії *A. dracunculus* вміст фруктанів сягав 132,7 мг/г, флавоноїдів – 15,6 мг/г та артемізиніну – 1 мг/г. Серед цих ліній найвищий темп росту був у *A. vulgaris*. Екстракти з відібраних ліній трансформованих коренів проявляли антиоксидантну та протівірусну активності.

У короткому за об'ємом, але насиченому за змістом заключному розділі «Аналіз і узагальнення результатів досліджень» проведено чітке та коректне обговорення найважливіших результатів дослідження.

Таким чином, автор дисертаційної роботи дійсно, як вона пише в узагальнюючому висновку, оптимізувала методику *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації рослин *Artemisia annua*, *A. dracunculus* та *A. vulgaris*, отримала «бородаті» корені цих рослин, визначила вміст природних для рослин цих видів біологічно активних сполук (фруктанів, цукрів, інуліну, флавоноїдів). Довела, що генетична трансформація за допомогою *A. rhizogenes* може бути використана для підвищення вмісту таких сполук як фруктани (*A. annua* та *A. dracunculus*), артемізинін (*A. vulgaris*) та флавоноїди (*A. annua* та *A. vulgaris*).

У цілому експериментальний матеріал викладено доступною мовою, чітко, лаконічно і логічно, основні результати достатньо підтверджено оригінальними та якісними ілюстраціями, зокрема, унікальними фотографіями та схемами. У процесі викладу автор ретельно і критично аналізує власні результати, робить у процесі опису коректні заключення та підсумки. Обговорення та узагальнення проведено чітко, на високому професійному рівні, із залученням літературних даних по всьому тексту дисертації, воно свідчить про те, що автор своїм дослідженням зробив істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі біотехнології рослин.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно впливають з експериментальних даних. Вони викладені у цілому достатньо чітко, лаконічно та ясно.

Зауважень щодо наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. Хочу звернути увагу лише на наступні дискусійні моменти і упущення.

Автор проаналізувала 459 літературних джерел, що мають пряме і навіть дотичне відношення до теми дисертації. Проте у мене склалося враження певної вибіркості цього аналізу. Наприклад, зовсім не згадуються роботи про біотехнологічні дослідження тирличів, внаслідок яких отримано високопродуктивні культури коренів – джерела БАС, зокрема флавоноїдів. Нагадаю, що за матеріалами цих досліджень, проведених в нашому Інституті сумісно з Тернопільським національним педагогічним університетом захищено кілька кандидатських і докторська дисертації, отримано низку патентів України. Ці наші роботи опубліковано як в Україні, так за кордоном і вони цитуються дослідниками.

Далі. Не можу погодитися з твердженням автора «Альтернативою культурі клітин є культура органів, серед переваг якої є більш висока генетична стабільність..., що не є притаманною культурі клітин. Це дозволяє виробництву не залежати від генетичної мінливості культури і робить процес

більш ефективним». Це твердження побутувало десь у 1970-х роках. Подальші дослідження показали, що сформовані клітинні (калюсні і суспензійні) штами-продуценти у стабільних умовах навіть у промислових масштабах вирощування є стабільними протягом багатьох років. Це, зокрема, такі культури продуценти як раувольфія зміїна, арнебія барвна, родіола рожева, женьшень тощо, продуктивність яких є стабільною вже близько 40 років. І ці результати описано у низці статей і навіть монографій як в Україні, так і в закордонних, зокрема, англомовних виданнях.

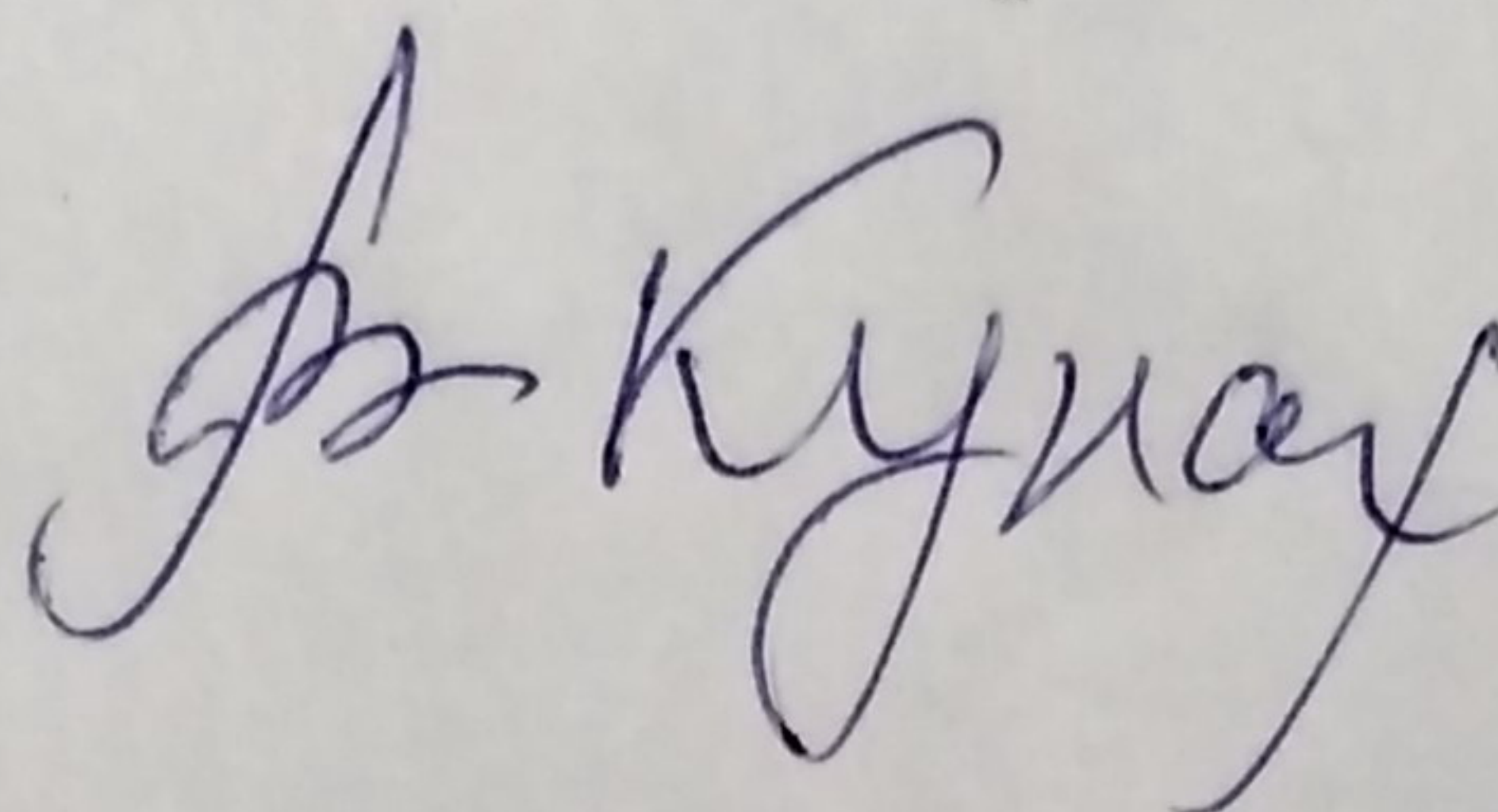
Не позбавлена дисертація і деяких граматичних, орфографічних і стилістичних помилок, які, хоч і не часто, проте трапляються у тексті рецензованої дисертаційної роботи. Наприклад, не збігаються номери сторінок, зазначені у змісті і самому тексті дисертації; у списку літератури, навіть власних робіт, неправильно названо журнал - «Фізіологія рослин і генетика» (треба «Физиология растений и генетика») тощо.

Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота **«Культура трансгенних коренів рослин роду Artemisia як джерело біологічно активних сполук»** заслуговує позитивної оцінки. Вона відповідає сучасному рівню біологічних, зокрема – біотехнологічних, досліджень і вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №657 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор — **Дробот Катерина Олександрівна** заслуговує на присудження їй пошукового наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді

16 наукових праць, з них - 9 статей, у тому числі закордоном, 6 матеріалів і тез доповідей Міжнародних наукових конференцій, а також 1 деклараційний патент України.

Зав. відділом генетики клітинних популяцій
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор біол. наук, професор



В.А. Кунах

