

## Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу Присяжнюк Л.М. «Особливості прояву та способи оцінки генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків» на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво

**Актуальність теми.** З бурхливим розвитком молекулярних методів дослідження структурно-функціональної організації генетичного матеріалу в сучасній біології виникли ДНК-технології.

ДНК-технології охоплюють методи клонування, ідентифікації генів, секвенування і синтез олігонуклеотидів, технологію рекомбінантних ДНК і способи введення їх в генотипи живих організмів. В останні десятиріччя все ширше використовуються ці методи в селекції рослин. Саме поєднання новітніх методів з класичними виводить селекцію на новий рівень управління потоком генетичної інформації при підборі компонентів гібридизації та створення генетично модифікованих сортів.

Виходячи з вищевикладеного є підстави стверджувати, що актуальність теми дисертаційної роботи не викликає сумніву.

Актуальність теми дисертаційної роботи підтверджується й тим, що дослідження за темою виконувалися у рамках завдання 13.00.01.06 Ф «Удосконалити методи досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків» згідно плану наукових досліджень 13. «Цукрові буряки. Високопродуктивні гібриди цукрових буряків та ресурсощадні технології їх вирощування» Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України.

**Наукова новизна одержаних результатів** полягає в тому, що вперше в Україні розроблено метод оцінювання та відбору селекційного матеріалу цукрових буряків з ознаками толерантності до дії гліфосату з застосуванням індивідуального аналізу вихідних компонентів та гібридів при створенні трансгенних рослин цукрових буряків шляхом запилення лінійного матеріалу запилювачем, який містить генетичну конструкцію з геном толерантності до дії гліфосату.

Вперше встановлено взаємозв'язок між наявністю регуляторних елементів генетичної конструкції та гена інтересу, а також ефективністю його прояву в трансгенних рослинах буряків.

Розроблено мультиплексну систему ПЛР-аналізу на основі ідентифікації ключових елементів генетичної конструкції, що зумовлює толерантність до дії гліфосату для оцінки активності трансгену на основі виявлених взаємозалежностей між елементами трансгенної конструкції.

**Практичне значення отриманих результатів.** За результатами досліджень розроблено метод оцінки активності гена, що зумовлює толерантність до дії гліфосату за методом полімеразної ланцюгової реакції в поєднанні із зворотною транскрипцією та мультиплексний підхід до ідентифікації структурних елементів інтродукованої генетичної конструкції. Видані методичні рекомендації «Індивідуальна оцінка та добір генотипів трансгенних рослин цукрових буряків».

**Аналіз основних положень дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 147 сторінках комп'ютерного набору, містить п'ять розділів, висновки та рекомендації для селекційної практики. Список літератури налічує 285 найменування, у тому числі 99 латиницею. Демонстраційний матеріал в експериментальній частині поданий у вигляді таблиць (15 шт) та рисунків (18 шт).

У першому розділі (стор. 10-35) здобувач подає детальний аналіз наукових публікацій щодо теми дисертаційної роботи, викладений на достатньому фаховому рівні. Зокрема, детально проаналізовано актуальність створення сортів цукрових буряків стійких до дії гербіцидів, описані відомі на теперішній час вектори для перенесення цільового гена та методи введення чужорідної ДНК в клітини рослин-реципієнтів.

Вважаю за доцільне підкреслити, що на підставі зробленого аналізу Лариса Михайлівна переконливо обґрунтувала альтернативний підхід щодо перенесення цільового гена толерантності до дії раундапу порівняно з методами класичної генної інженерії. Тобто, шляхом запилення звичайного сорту або гібрида цукрового буряка пилом генетично модифікованої форми

стійкої до дії раундапу можливо отримати ГМ-гібрид, толерантний до дії гербіциду. Саме у цьому, є новизна даної роботи. Обґрунтувавши поставлену проблему, здобувач вірно вибрала для реалізації програми досліджень сучасні методи, які детально описані в другому розділі дисертації (стор.36-49).

Важливе теоретичне й практичне значення у створенні толерантних до дії гербіцидів форм цукрового буряка мають результати досліджень, викладені в третьому розділі «Ідентифікація цільових послідовностей генетичної конструкції цукрових буряків толерантних до дії гліфосату» (стор.50-79).

Для ідентифікації цільового гена EPSPs, що зумовлює стійкість рослин до дії гліфосату, здобувач проводила ПЛР-аналіз та кластерний аналіз. В результаті ідентифіковано 35S промотор, NOS термінатор та цільовий ген EPSPs в гібридах і запилювачі12-216. У ряду гібридів виявлено найбільшу стабільність генетичної конструкції 20% і 23% (стор.80, четвертий абзац).

Мабуть тут автору варто було прокоментувати надійність використання в гібридизації запилювачів, з такою низькою стабільністю генетичної конструкції, для перенесення цільового гена EPSPs.

У четвертому розділі «Визначення активності генів в трансгенних рослинах цукрових буряків» (стор.80-97) викладені цінні в теоретичному й практичному аспектах результати досліджень, які доповнюють методи практичного створення генетично модифікованих форм.

Розділ включає три підрозділи, які спрямовані на удосконалення методів визначення активності інтродукованого гена в трансгенних рослинах.

Підрозділ 4.1. «Отримання сумарної РНК в трансгенних рослинах цукрових буряків» містить результати виділення сумарної РНК, її чистоти та концентрації залежно від способу екстракції та температури інкубації. За результатами аналізу автор робить висновок: «Для отримання сумарної РНК з трансгенних рослинах цукрових буряків доцільно застосування *Trizol* реагенту, що містить гуанідинтіюнат і фенол, з інкубацією при температурі 60° С та екстракцію ізопропіловим спиртом, оскільки такий підхід дозволяє отримувати висококонцентровану та очищену РНК з рослинного матеріалу для виявлення активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату та добору

генотипів, в яких цей ген експресується» (стор.97, третій абзац). Неможна не погодитися з автором з вірністю та обґрунтованістю першої частини цього висновку. Дійсно автор рекомендує для виділення сумарної РНК більш ефективний порівняно з іншими метод отримання висококонцентрованої та очищеної РНК з рослинного матеріалу. Але друга частина цього висновку, на мій погляд, дискусійна. А саме, автор стверджує: «...оскільки такий підхід дозволяє отримувати висококонцентровану та очищену РНК з рослинного матеріалу для виявлення активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату та добору генотипів, в яких цей ген експресується». Виділена РНК вказує на наявність цільового гена EPSPs, який зумовлює стійкість рослин до дії гліфосату. А чи він забезпечує цю стійкість – це екстраполяція автора. Цих даних недостатньо для такого ствердження.

До речі, у другому підрозділі четвертого розділу «Оцінка результатів проведення реакції зворотної транскрипції» (стор. 84, перший абзац другого підрозділу) автор підтверджує, що недостатньо лише виділеної РНК: «При визначенні активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату, основним етапом (*в роботі автора*) було отримання кДНК, оскільки за наявності специфічних фрагментів ампліфікації кДНК робили (*автор робив*) висновок про наявність експресії гена інтересу». І далі (стор. 86 – 87): «Відомо, що основними етапами отримання білкового продукту є транскрипція, пост транскрипційний процесінг, трансляція та посттрансляційні модифікації. Зміна швидкості проходження кожного з цих етапів супроводжується зміною ...функціонально активного продукту експресії гена». Тут автор, по суті, підтверджує мій сумнів, що недостатньо виділення сумарної РНК для ствердження про експресію гена інтересу.

І далі, у третьому підрозділі четвертого розділу (стор. 88 – 97) автор вказує, що «на активність перенесеного гена впливають не тільки кількість незалежних вбудованих копій конструкцій, а й характер їх інтеграції в рослинний геном (у вигляді однієї або декількох копій), а також особливості локусу хромосом, в який вбудувався перенесений ген». І це є підтвердженням,

що недостатньо виділення сумарної РНК для ствердження про експресію гена інтересу.

Щодо висновків по третьому підрозділу четвертого розділу (стор. 97, пункт четвертий), то на мій погляд, варто було чітко сформулювати, що єдино надійний метод перевірки експресії гена толерантності рослин до дії раундапу є обробка їх розчином гербіциду. Тобто, чи працює ген толерантності, чи ні варто перевіряти прямою реакцією рослин на обробку їх раундапом. Це самий вірний метод перевірки функціонує цільовий ген чи ні.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали досліджень з дисертаційної роботи доповідалися на щорічних засіданнях методичної та Вченої ради Інституту біоенергетичних культур та цукрових буряків НААНУ (2011-2015 рр.), I та II Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Новітні технології вирощування сільськогосподарських культур» (Київ, 2012 р., 2013 р.), на II та IV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, спірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, Україна, 2013) та ін. та в семи наукових працях основні положення дисертації висвітлені достатньо.

Дисертаційна робота добре ілюстрована табличним матеріалом та рисунками. Основні положення дисертації та автореферату є ідентичними.

**Обґрунтованість і достовірність наукових результатів, висновків, рекомендацій.** Наукові положення, висновки, рекомендації для селекційної практики, сформульовані в дисертації базуються на експериментальному матеріалі. Всі дослідження виконані відповідно до загальноприйнятих сучасних методик в роботах з використанням ДНК-технологій в селекції. Висновки та зроблені на їх основі рекомендації селекційній практиці підтверджуються відповідними статистичними показниками.

Висловлені у відзиві зауваження не порушують концептуальних положень, наукової новизни, практичного значення та методики виконання досліджень, а тому не знижують її оцінки, а є предметом дискусії.

**Висновки про відповідність дисертації встановленим вимогам.** Аналіз дисертації, автореферату й наукових публікацій автора показує, що за

змістом і обсягом науково обґрунтованих результатів дисертаційна робота Присяжнюк Л. М. «Особливості прояву та способи оцінки генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків» є самостійно завершеною науковою працею, що відповідає вимогам МОН України (п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів...»), що ставляться до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук, а її автор, Присяжнюк Лариса Михайлівна., заслуговує присудження наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво.

Доктор с.-г. наук, професор, завідувач  
кафедри генетики, селекції і насінництва  
Білоцерківського національного аграрного  
університету

С.П. Васильківський

Підпис С.П. Васильківського засвідчую  
Начальник відділу кадрів

Д.В. Ромасишин

