

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Присяжнюк Лариси Михайлівни на тему: «Особливості прояву та способи оцінки генетичних конструкцій в трансгенних рослин цукрових буряків», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 26.360.01 у Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво.

Актуальність теми. Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню ефективності прояву та розробці методів оцінки трансгенів в селекційних матеріалах цукрових буряків, оскільки проблема варіабельності експресії трансгенів має велике практичне значення в селекційній роботі при отриманні гібридних форм рослин, зокрема генетично модифікованих рослин ЧС гібридів цукрових буряків. За останнє десятиліття в провідних біотехнологічних центрах світу інтенсивно ведуться роботи з модифікації ядерного геному вищих рослин (Mulwa et al., 2006; Чекалін та ін., 2009; Левенко, 2011) із застосуванням методів генної інженерії. При створенні трансгенних рослин та їх впровадженні в сільське господарство найбільш важливим моментом є досягнення високого і стабільного рівня експресії перенесених цільових генів. Проте вже за кілька років після отримання перших трансформантів дослідники зіткнулися з явищем варіабельності експресії чужорідних генів, пов'язаного з явищем «мовчання генів» (*gene silencing*). Проблема «замовкання генів» має велике практичне значення в селекційній роботі при отриманні гібридних форм рослин, оскільки використання трансгенних сільськогосподарських культур передбачає стабільну роботу трансгену.

1. Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. В основу роботи покладено дослідження, виконані у рамках завдання 13.00.01.06 Ф «Удосконалити методи дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків» (номер державної реєстрації РК 0111U003186) згідно плану наукових досліджень 13. «Цукрові буряки. Високопродуктивні гібриди цукрових буряків та ресурсоощадні технології їх вирощування» Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 147 сторінках комп'ютерного тексту, складається із вступу, 5 розділів, висновків, рекомендацій для селекційної практики та додатка. Список використаних

літературних джерел налічує 285 джерела, у тому числі 99 латиницею. Фактичний матеріал дисертації подано у вигляді 18 рисунків та 15 таблиць.

Аналіз основного змісту дисертаційної роботи.

У **Вступі** обґрунтовано актуальність дисертаційної роботи, сформульовано мету та завдання досліджень, наукову новизну, практичне значення отриманих результатів. Задекларований особистий внесок здобувача, відомості про апробацію роботи, наведені дані про публікації, структуру, обсяг дисертації.

У **першому розділі** автором проаналізовано стан та проблеми розвитку генетичної інженерії в селекції цукрових буряків у вітчизняних і зарубіжних наукових виданнях. Встановлено, що варіабельність експресії трансгенів зумовлена різними механізмами їх інактивації в рослинному геномі. З метою контролю за активністю трансгенів в рослинах, особливо, в селекційному матеріалі, визначені підходи, які зумовлюють стабільну експресію в компонентах та гібридах. За результатами вивчення літературних джерел автором зроблено висновок про необхідність застосування сучасних методів ідентифікації та оцінки активності перенесених генів в рослинах толерантних до дії гербіцидів, зокрема, дослідження активності генів в генетичних конструкціях селекційного матеріалу цукрових буряків із застосуванням індивідуального підходу.

У **другому розділі** охарактеризовано рослинний матеріал, що використовувався в дослідженнях. Визначено об'єкт, методи та методика досліджень. Дослідження проводили за загальноприйнятими методиками. При математичній обробці результатів і побудові графіків використані стандартні пакети прикладних програм.

Третій розділ присвячений експериментальній роботі по ідентифікації елементів трансгенної конструкції в рослинах цукрових буряків толерантних до дії гліфосату за допомогою ПЛР та оцінці досліджуваних матеріалів за показниками посівних якостей, а також груповій оцінці толерантності до дії гербіциду.

Встановлено, що досліджувані гібриди мають певні відмінності за показниками одноростковості, схожості та енергії проростання насіння, масою 1000 насінин та показником цукристості, що свідчить про гетерогенність вихідних матеріалів. Різний рівень толерантності при груповій оцінці гібридів і запилювача вказує на варіабельність активності гена EPSPs, що свідчить про доцільність проведення індивідуальної оцінки генотипів гібридів цукрових буряків. Для здійснення таких досліджень був застосований метод культивування *in vitro*, який дозволив отримати генетично ідентичний

матеріал для досліджень. Живильне середовище для отримання мікроклонів рослин трансгенних цукрових буряків включало зменшені концентрації макросолей, регуляторів росту, сахарози та агару.

Для ідентифікації елементів трансгенної конструкції тотальну ДНК отримано за допомогою методики модифікованої автором на основі ЦТАБ, який передбачає екстракцію ДНК із високим ступенем очистки та з концентрацією достатньою для проведення ПЛР із невеликої кількості рослинного матеріалу.

За результатами ПЛР ідентифіковано 35S промотор, NOS термінатор та ген EPSPs в досліджуваних гібридах та запилювачі 12-216. Виявлено, що ген інтересу був ідентифікований лише у генотипів з встановленою наявністю промоторної, термінаторної або обох регуляторних послідовностей одночасно. Визначено, що наявність гену інтересу знаходиться в тісній залежності з регуляторними елементами конструкції при індивідуальній оцінці генотипів.

За результатами проведеного кластерного аналізу встановлено, що при ідентифікації складових частин інтродукованої генетичної конструкції з метою добору селекційного матеріалу толерантного до дії гліфосату, зокрема, при оцінці запилювача, доцільно першочергово визначати регуляторні послідовності, а потім ген інтересу.

У четвертому розділі проаналізовано принципово різні методики екстракції сумарної РНК з рослинного матеріалу, а також їх модифікації відповідно до мети дослідження. В результаті експериментальних робіт, встановлено, що для отримання сумарної РНК з трансгенних рослин цукрових буряків доцільно застосування *Trizol* реагенту, який містить гуанідинтіюнат і фенол, з інкубацією при температурі 60°C та подальшою екстракцією ізопропіловим спиртом. Такий підхід підтверджений та обґрунтований дослідженнями автора, оскільки дозволив отримати високонцентровану та очищену РНК з рослинного матеріалу для виявлення активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату та добору генотипів, в яких цей ген експресується.

На основі оцінки ефективності реакції зворотної транскрипції за визначенням активності гена внутрішнього контролю, встановлено, що для визначення активності гена, який обумовлює толерантність до гліфосату, придатним є застосування системи зворотної транскрипції на основі праймерів *Oligo(dT)*.

Визначено активність гену EPSPs в рослинах цукрових буряків, в яких були ідентифіковані елементи генетичної конструкції. Згідно отриманим даним, активність гена інтересу спостерігалась частіше за присутності

промотора, ніж термінатора. Виявлено залежність між наявністю гена інтересу, його активністю та складом трансгенної конструкції.

У п'ятому розділі охарактеризовані основні підходи до створення мультиплексної системи для ідентифікації елементів трансгенної конструкції в рослинах цукрових буряків толерантних до дії гліфосату. На основі встановлених в роботі залежностей, підібрано оптимальні параметри розробленої тест-системи: визначено температуру гібридизації праймерів гомологічних до цільових послідовностей, а саме до 35S промотору та гена інтересу; підібрані концентрації компонентів ПЛР-суміші (кількість праймерів, дНТФ, іонів Mg^{2+}) та кількість ДНК-матриці, застосовуючи в якості контролю ген ацелактатсинтази цукрових буряків.

В результаті проведених досліджень автором запропонована схема проведення аналізу трансгенних рослин цукрових буряків при визначенні активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату на основі ПЛР та зворотної транскрипції для добору гібридів та селекційних матеріалів з експресією трансгена.

Висновки дисертаційної роботи сформульовані відповідно до мети та завдань і відображають основні результати досліджень. Автором запропоновано оцінювання ознаки толерантності до дії гліфосату за показниками експресії гену EPSPs в компонентах та гібридах з метою створення толерантних гібридів цукрових буряків. Індивідуальний добір серед перспективних генотипів багатонасінних запилювачів та інших селекційних форм слід проводити за результатами ПЛР за наявністю всіх складових елементів генетичної конструкції та активності гена інтересу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено метод оцінювання та відбору селекційного матеріалу рослин цукрових буряків з новими генетичними ознаками (толерантність до дії гліфосату) із застосуванням індивідуального підходу до оцінки вихідних компонентів та гібридів цукрових буряків. Встановлено взаємозв'язок між наявністю регуляторних елементів генетичної конструкції та гена інтересу, а також ефективністю його прояву в трансгенних рослинах цукрових буряків. Розроблено мультиплексну систему ПЛР-аналізу на основі ідентифікації ключових елементів генетичної конструкції, що обумовлює толерантність до дії гліфосату на основі виявлених взаємозалежностей між елементами трансгенної конструкції.

Рівень новизни результатів дисертаційної роботи. Новизна наукових результатів підтверджується аналізом літератури з даної проблеми, проведенням досліджень з ідентифікації елементів трансгенної конструкції,

що обумовлює толерантність до дії гліфосату в селекційному матеріалі цукрових буряків, а також з визначення активності гена інтересу на основі реакції зворотної транскрипції, розробкою системи мультиплексної ПЛР для визначення ключових елементів трансгенної конструкції, публікаціями і впровадженнями.

Практичне значення результатів полягає в розробці методу оцінки активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату на основі ПЛР в поєднанні із зворотною транскрипцією. Використання даного методу у селекційній практиці дозволить значно прискорити та підвищити ефективність проведення добору серед різних генотипів цукрових буряків з метою створення гібридів з новими ознаками. Методичні рекомендації **«Індивідуальна оцінка та добір генотипів трансгенних рослин цукрових буряків»** впроваджені у навчальний процес Національного університету біоресурсів та природокористування України для проведення лабораторно-практичних робіт очної і заочної форми навчання зі спеціальностей «Біотехнологія» та «Селекція і генетика сільськогосподарських культур» на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи доповідались та оговорювались на I та II Міжнародній конференції молодих вчених «Новітні технології вирощування сільськогосподарських культур» (Київ, Україна, 2012 р., 2013 р.), II та VI Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, Україна, 2013 р., 2015 р.), Міжнародній науково-практичній конференції присвяченій 84-річчю з дня народження д. с.-г. наук, професора Гончарова Миколи Дем'яновича (м. Суми, Україна, 2013 р.), X Всеукраїнській науковій конференції студентів, магістрів та аспірантів «Сучасні проблеми екології та геотехнологій» (м. Житомир, Україна, 2013 р.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації, їх достовірність і новизна, повнота викладення в опублікованих працях.

Слід зазначити, що обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій висока, не викликає сумнівів і підтверджується достатньо опрацьованими статистичними матеріалами. Автором проведено значний обсяг лабораторних досліджень, особисто та за її участі отримано достатню кількість експериментальних даних. Матеріали дисертації досить повно висвітлені в опублікованих працях. За матеріалами дисертації опубліковано 7 наукових праць у фахових виданнях, 4 тези доповідей за матеріалами конференцій, 1 методичні рекомендації.

Зміст автореферату відображає основні положення дисертації.

Недоліки та зауваження. В цілому, позитивно оцінюючи дисертаційну роботу, слід звернути увагу на недоліки, зауваження і побажання.

1. В тексті дисертації зустрічаються як комерційна назва гербіциду (Roudup), так і назва його діючої речовини (гліфосат). Також наводяться різні визначення стосовно гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату: «ген інтересу», «цільова послідовність гена» тощо. Для кращого сприйняття матеріалу доцільніше буде дотримуватись однієї номенклатури.

2. Вважаю, що посилання на авторів в розділах власних досліджень, а також в аналізі та узагальненні отриманих результатів є некоректним, оскільки така інформація повинна наводитись в огляді літератури.

3. В **розділі 3** у підписах до рисунків 3.5, 3.7, 3.8 та у **розділі 4 – 4.5** та 4.6 вказано, що представлено розподіл гібридів за наявністю складових конструкції чи активністю гена, проте на рисунках також відображені і показники запилювача.

4. У **підрозділі 4.1. Отримання сумарної РНК з трансгенних рослин цукрових буряків** на рисунках 4.1 і 4.2 слід вказати $HP_{0,05}$, оскільки на них показано як змінюються показники концентрації та чистоти РНК в залежності від методу екстракції.

5. У **розділі 4** при перевірці толерантності до дії гліфосату гібридів, які були відібрані на основі аналізу активності гена інтересу за результатами ПЛР доцільно подати ілюстраційний матеріал, який демонструє роботу трансгена після обробки гербіцидом.

6. В дисертаційній роботі сформульовано забагато пунктів висновків. Кількість оформлених висновків має відповідати кількості поставлених завдань.

7. У тексті дисертації зустрічаються недоліки редакційного, технічного та стилістичного характеру.

Приведені зауваження та побажання істотно не впливають на загальну оцінку дисертації, яка виконана на високому науковому та методичному рівні, написана логічно, доступним для сприйняття науковим стилем, грамотно.

Висновок. Не зважаючи на вказані зауваження та недоліки, дисертаційна робота Присяжнюк Лариси Михайлівни на тему: «Особливості прояву та способи оцінки генетичних конструкцій в трансгенних рослин цукрових буряків» є завершеною науковою працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані теоретичні та практичні результати, що в сукупності є суттєвим для ідентифікації трансгенних конструкцій та оцінки активності генів в

трансгенних рослинах цукрових буряків з метою здійснення добору селекційних матеріалів.

За обсягом проведених досліджень, актуальністю, змістом і структурою, науковою новизною, практичною цінністю кандидатська дисертація Присяжнюк Лариси Михайлівни відповідає вимогам п. п. 9, 11, 13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» від 24 липня 2013 р., №567, що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво.

Офіційний опонент

кандидат біологічних наук, доцент,
завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття
Національного університету
біоресурсів і природокористування
України

О. Л. Кляченко
О. Л. Кляченко



О. Л. Кляченко
ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ
Начальник відділу кадрів
М.В. Михайленко
2013 р.