

ВІДЗИВ

офіційного опонента **Дробик Надії Михайлівни** про дисертаційну роботу **Кирпи-Несміян Тетяни Миколаївни** «Дослідження гетерологічної експресії генів десатураз ціанобактерій у вищих рослинах», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність теми. Робота Кирпи-Несміян Т.М. присвячена важливій проблемі – розробці підходу до покращення адаптації рослин до стресу, який залежить, насамперед, від властивостей мембран. Відомо, що із збільшенням частки ненасичених жирних кислот (ЖК) у складі мембранних ліпідів підвищується в'язкість мембран, збільшується їх пластичність, що дозволяє запобігати механічним пошкодженням під час впливу стресів. Перетворення жирних кислот із насичених в ненасичені каталізують ферменти десатурази. У рослин функціонують два види десатураз – ацил-АПБ та ацил-ліпідні десатурази.

У роботі автором використано гени ацил-ліпідних десатураз організмів з високим адаптаційним потенціалом – ціанобактерій; ці гени каталізують утворення подвійних зв'язків у положеннях $\Delta 9$ (ген *desC*) та $\Delta 12$ (ген *desA*). Експресію перенесених генів ціанобактерій автор досліджувала у рослинах модельного об'єкта – *Nicotiana tabacum*. Реалізація автором зазначених у роботі завдань дозволить у майбутньому створювати стійкі сорти цінних сільськогосподарських культур, які містять даний ген. Тому представленою робота є актуальною.

Дисертаційне дослідження виконане в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії (ІКБГІ) НАН України у рамках низки проектів, зокрема: Ш-1-15 «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах», П –І-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.

Достовірність і обґрунтованість результатів наукових положень і висновків. Наукові положення та висновки логічно випливають з фактичного матеріалу і носять об'єктивний характер, оскільки обґрунтовані результатами експериментальних досліджень. У дисертаційній роботі Кирпи-Несміян Т.М.

використано генетичні конструкції та трансгенні рослини, отримані співробітниками ІКБГІ НАН України.

Для дослідження цього матеріалу автором застосовано сучасні методи: культивування в умовах *in vitro* та *in vivo*, *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої генетичної трансформації, молекулярно-біологічні; метод якісного та кількісного ліхеназного тесту, визначення активності ферменту супероксиддисмутази (СОД), визначення накопичення малонового диальдегіду (МДА), дослідження рівня втрати електролітів; аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії; статистики.

Новизна отриманих результатів. За матеріалами наукових досліджень автором *вперше*: отримано трансгенні рослини тютюну *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують ген *desA* під контролем холодоіндукованого промотора CBF1, а також лінії тютюну, що містять у своєму геномі та експресують одночасно гени десатураз *desA* та *desC*; досліджено вплив експресії гена $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази у рослин орхідей *Dendrobium linguella* на адаптацію їх до знижених температур; показано адаптацію рослин картоплі *Solanum tuberosum* сортів української селекції (Лугівська, Слов'янка, Серпанок), що експресують ген *desA*, до дії умов осмотичного стресу.

Практичне значення отриманих результатів. Автором запропоновано новий біотехнологічний підхід до одержання ліній рослин, стійких до абіотичних стресів. Отримані Кирпою-Несміян Т.М. трансгенні рослини тютюну *N. tabacum*, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, характеризуються підвищеною стійкістю до впливу високих температур, холодогового та осмотичного стресів.

Ці результати можуть послужити основою для створення сортів цінних сільськогосподарських рослин, потенційно стійких до температурних коливань.

Одержані дисертантом лінії рослин орхідей *D. linguella* характеризуються стійкістю до знижених температур, що дозволить ширше використовувати їх як декор для оформлення інтер'єрів та екстер'єрів.

Лінії картоплі, що містять у своєму геномі та експресують перенесені додаткові гени десатураз, показали кращі адаптивні властивості порівняно з контрольними, нетрансгенними лініями. Тому їх можна рекомендувати для використання у технічних цілях у південних областях України, що потерпають від посухи та дії сильних вітрів у період, який припадає на дозрівання бульб картоплі.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів роботи та доцільність продовження і розвитку відповідних досліджень.

Автором встановлено, що шляхом зміни спектру жирних кислот вищих рослин можна підвищити їх адаптацію до абіотичних стресів. Було досліджено адаптацію рослин *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *D. linguella* з гетерологічною експресією генів ацил-ліпідних десатураз до абіотичних стресів. Отримані позитивні результати з використанням модельного об'єкта, декоративної та важливої сільськогосподарської рослин дозволяють прогнозувати ефективність застосування такого підходу і підтверджують доцільність проведення та поглиблення досліджень у цьому напрямку.

Повнота використання в роботі наукової літератури у даній галузі. Список використаних літературних джерел включає 223 посилання, із них більшість – в іноземних виданнях, що дозволяє повністю охарактеризувати сучасний стан розробки проблеми в світі.

Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації та автореферату. Дисертація і автореферат *Кирпи-Несміян Тетяни Миколаївни* написані у традиційній формі, оформлені відповідно до вимог ДАК МОН України. Дисертація викладена на 148 сторінках комп'ютерного друку і складається із переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів та їх обговорення, які включають сім підрозділів, висновків, списку використаних джерел. Робота добре ілюстрована – містить 62 рисунки і 6 таблиць, які допомагають кращому сприйняттю отриманих автором результатів.

У **вступі** дисертант вказує на актуальність дослідження механізмів стійкості рослин до абіотичних стресів. Вивчення нових напрямків в адаптації рослин до абіотичних стресів важливе у зв'язку зі змінами клімату та різкими температурними перепадами, пов'язаними, у тому числі, з інтенсифікацією антропогенної діяльності.

Огляд літератури включає **п'ять підрозділи**, у яких Кирпою-Несміян Т.М. розглянуто механізми адаптації рослин до абіотичних стресів; властивості десатураз ціанобактерій; наведено характеристику антиоксидантного ферменту СОД та малонового діальдегіду, приділено увагу участі електролітів в обміні речовин. Огляд літератури написаний ґрунтовно із залученням значної кількості сучасних вітчизняних та іноземних наукових

джерел з досліджуваної тематики. Слід зазначити, що кожен із розділів огляду є своєрідною теоретичною основою для експериментальних підрозділів, що наводяться автором у дисертаційній роботі. Однак, наприкінці «Огляду літератури» потрібно було б зробити короткий підсумок і обґрунтувати необхідність проведення досліджень, яким присвячена дисертаційна робота. Це, на наш погляд, дозволило б краще зрозуміти представлений у роботі експериментальний матеріал та підкреслити новизну виконаних досліджень.

У **розділі 2** названому автором «Експериментальна частина» (правильна назва «Матеріали і методи досліджень») наведено відомості щодо вихідного рослинного матеріалу та генетичних конструкцій, що використовувалися, культивування рослин *in vitro* та *in vivo* за нормальних умов і за дії абіотичних стресів (висока та низька температури; осмотичний стрес); охарактеризовано отримання трансгенних рослин з використанням методу *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої генетичної трансформації; отримання рослин *N. tabacum*, що містять в своєму геномі та експресують одночасно гени $\Delta 9$ - та $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз; описано полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), що використовувалася для виявлення рекомбінантних генів; охарактеризовано якісне та кількісне визначення активності термостабільної ліхенази, визначення активності СОД; рівня втрати електролітів; накопичення МДА; подано статистичний аналіз і аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії

Слід зазначити, що саме раціональний підбір методичних підходів забезпечив успішну реалізацію основних завдань дисертаційної роботи.

Наведені у дисертаційній роботі «Результати дослідження та їх обговорення» включають сім підрозділів (**підозділи 3.1–3.7**).

У межах **підрозділу 3.1** «Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licVM3* або *ats1A::desC::licVM3*» автором наведено результати дослідження рослин *N. tabacum*, що експресують зазначені гени в умовах знижених температур і заморозків, в умовах підвищених температур та за осмотичного стресу. Встановлено, що ці рослини характеризуються кращою адаптацією до дії високих і знижених температур, а також заморозків та осмотичного стресу за показниками рівня накопичення МДА, активності СОД, втрати електролітів.

У підрозділі 3.2 «Аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гени десатураз, вирощених в умовах *in vivo*» автором подано результати дослідження культивованих в умовах ґрунту трьох ліній *N. tabacum*, що містять в своєму геномі та експресують ген *ats1A::desC::licVM3*, та двох ліній, що містять в своєму геномі та експресують ген *desA::licVM3*. Рослини, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, показали нижчий рівень виходу електролітів. У рослин тютюну з гетерологічною експресією генів десатураз виявлено підвищення активності СОД порівняно з контролем, зниження рівня накопичення МДА. Встановлено збільшення активності ліхенази у трансгенних рослин, що експресують ген *desA* або *desC*, після дії заморозків. Підсумовуючи отримані результати, автор робить висновок, що рослини *N. tabacum*, трансформовані генами ацил-ліпідних десатураз, мають кращі показники адаптації до заморозків порівняно з контрольними рослинами.

У підрозділі 3.3 «Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licVM3* або *desC::licVM3*, Т1 покоління» автором представлено результати аналізу 30 рослин покоління Т1, що містять в своєму геномі ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази та 30 рослин покоління Т1, що містять в своєму геномі ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази. Досліджено, що у 20% рослин, що мають успадкувати ген *ats1A::desC::licVM3* спостерігали успадкування гена *desC* або *licVM3*. У 40% рослин, що мають успадкувати ген *desA::licVM3* спостерігали успадкування гена *desA* або *licVM3*. Перевірка експресії генів показала, що ліхеназна активність була відмічена у тих рослин, які успадкували злиті гени *desA::licVM3* або *ats1A::desC::licVM3*.

Підрозділ 3.4 «Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридний ген *desA::licVM3* під холодоіндукованим промотором СBF1» присвячено розгляду результатів дослідження трансгенних рослин тютюну, які експресують ген $\Delta 12$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 під контролем холодоіндукованого промотора СBF1. У результаті виявлено, що ці рослини характеризувалися підвищеною стійкістю до холододового стресу порівняно з контрольними рослинами за показниками рівня накопичення малонового діальдегіду, активності ферменту супероксиддисмутаза, втрати електролітів.

У підрозділі 3.5 «Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що одночасно експресують гібридні гени *desA::licVM3* та *ats1A::desC::licVM3*» подано результати отримання та аналізу ліній рослин *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують одночасно два гени

ацил-ліпідних десатураз *desC* ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та *desA* *Synechocystis* sp.PCC 6803. Виявлено, що ці подвійні трансформанти рослин тютюну *N. tabacum* характеризуються збільшенням частки ненасичених жирних кислот порівняно з трансформантами, які містять у своєму геномі та експресують лише ген *desA* або ген *desC*.

При дослідженні реакції рослин на дію холодового стресу, виявили менший ступінь пошкоджень та кращу адаптацію трансгенних рослин порівняно з контрольними

У підрозділі 3.6 «Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Solanum tuberosum*, що експресують гібридний ген *desA::licVM3*» подано результати отримання трансгенних рослин картоплі сортів української селекції, що містять трансген (*desC::licVM3*). Дослідження цих рослин показали, що збільшення частки ненасичених ЖК у них сприяє кращій адаптації до дії осмотичного стресу порівняно з контрольними рослинами.

У підрозділі 3.7 «Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Dendrobium linguella*, що експресують гібридний ген *ats1A::desC::licVM3*» автор вказує на актуальність створення методами генетичної трансформації стійких до низьких температур та заморозків орхідей; подає результати отримання та аналізу трансгенних рослин рослини *D. linguella*, що містять у своєму геномі та експресують ген $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *S. vulcanus*. Дисертантом виявлено, що отримані трансгенні рослини характеризуються збільшенням частки ненасичених жирних кислот та підвищеною стійкістю до стресу знижених температур за показниками рівня накопичення МДА диальдегіду, активності СОД, рівня втрати електролітів.

Висновки, які зроблені здобувачем, у цілому відповідають меті і завданням дисертації та обґрунтовані експериментальним матеріалом.

Автореферат у цілому відповідає змісту дисертації.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових виданнях, затверджених ДАК МОН України. Основні положення дисертаційної роботи відображені у 17 публікаціях, що включають 4 статті у провідних фахових виданнях України, 3 статті у зарубіжних виданнях та 10 публікацій – у матеріалах та тезах міжнародних конференцій.

Водночас, до дисертаційної роботи можна висловити низку *побажань і зауважень*.

1) У змісті роботи наявні повтори, а саме у підрозділах розділу «Результати та обговорення» повністю наводиться характеристика рослин, які

досліджуються, аналогічна інформація дублюється у пунктах цього підрозділу. Це стосується підрозділів 3.1, 3.3, 3.4, 3.6, 3.7. У такому вигляді зміст громіздкий і складний для сприйняття.

2) Для кращого сприйняття структури роботи і великого масиву отриманих автором результатів, що стосуються різних генетичних конструкцій та рослин, у роботі потрібно було б подати схему досліджень і обґрунтувати доцільність проведення кожного етапу роботи.

3) Доцільним було б після подачі результатів дослідження провести їхнє узагальнення в окремому розділі, що дозволило б виокремити найважливіші теоретичні та практичні результати дисертаційної роботи. Тим більше, що у кінці підрозділів розділу «Результати та обговорення» такі висновки (підсумки) відсутні. Завдяки наявності такого розділу багата експериментальними дослідженнями та цікавими результатами робота сприймалася б цілісніше.

4) Непотрібно у кожному пункті підрозділу «Результати та обговорення» обґрунтовувати доцільність визначення активності супероксиддисмутази, рівня накопичення малонового діальдегіду, рівня втрат електроліту тощо, тим самим дублюючи одну й ту ж інформацію. Тим більше, що в «Огляді літератури» окремі підрозділи, що стосуються характеристики цих параметрів, їх важливості та необхідності для такого роду досліджень.

5) У загальному висновку роботи слід було б зазначити не лише теоретичне, а й практичне значення отриманих результатів. Шостий висновок потрібно було б пояснити, оскільки в такому вигляді він носить декларативний характер.

6) У роботі дисертант наводить результати, що стосуються аналізу спектру жирних кислот різних ліній ослин *N. tabacum*, *S. tuberosum* та *D. linguella* методом газової хроматографії та мас-спектрометрії. Для кращого сприйняття отриманих результатів доцільно було б проілюструвати їх хроматограмами.

7) Незрозуміло чому автор подає активність супероксиддисмутази у різних одиницях: рис. 3.5 – U/mg, рис. 3.12, рис. 3.19, рис. 3.39, рис. 3.48 – акт./мг білка, рис. 3.24 – акт. U/mg, рис. 3.60 – мкМ/мг. Доцільно було б використати єдиний загальноприйнятий підхід, за яким непрямо активність ферменту визначають у одиницях активності на міліграм (або 1 г) білка.

8) У роботі неправильно вживаються вирази, терміни, зокрема: для рослин тютюну було проведено аналіз газової хроматографії та мас-спектроскопії, тоді як правильно – рослини були проаналізовані з

використанням методів газової хроматографії та мас-спектроскопії; проведена мультиплексна ПЛР з екстрактами рослин тютюну – замість мультиплексна ПЛР з ДНК рослин тютюну; експресія десатураз – замість експресія генів десатураз, зважаючи на те, що ні білки, ні ферменти не можуть експресуватися, а є результатом експресії генів; замість терміну листя доцільно вживати листки, замість призводити – приводити (термін призводити можна вживати у випадку негативних наслідків) і т.п.

9) Є зауваження, що стосуються рисунків. Зокрема, на рис. 3.9. подано не культивування рослин в умовах гіпотермічного стресу, а загальний вигляд рослин *N. tabacum*, культивованих за гіпотермічного стресу. Такі ж корективи слід було б внести у підписи до рис. 3.10, 3.15, 3.17, 3.27. На рис. 3.57 автор наводить рослини, що використовувались у роботі, у чотирьох чашках Петрі. Однак, ніяких суттєвих відмінностей між цими лініями рослин не видно, очевидно, через нечіткість фото, і тоді незрозуміло смислове навантаження цих фото. Аналогічне можна зазначити і для рисунків 3.9, 3.10, 3.15, 3.17, 3.43 та 3.49. На рис. 3.28 наведено не пророщування рослин, а пророщування насіння або ж проростання рослин з насіння. На рисунках 3.2, 3.29, 3.30, 3.37, 3.44, 3.50 подано електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК з відповідними праймерами, а не аналіз трансгенних ліній або мультиплексну ПЛР з ДНК рослин і т.п.

10) У роботі є орфографічні та стилістичні помилки, русизми, але особливо багато пунктуаційних помилок. Автором часто використовуються складносурядні речення (наприклад, «Аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гібридні гени *desA::licVM3* або *ats1A::desC::licVM3*, в умовах знижених температур та заморозків»), дієприкметникові звороти, а відповідні знаки пунктуації відсутні, і тому текст складний для сприйняття, або зміст речення не відповідає тому, який дисертант хотів у нього вкласти.

Однак, зазначені зауваження і побажання не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Даючи оцінку дисертаційної роботи Кирпи-Несміян Т.М. у цілому, слід зазначити, що вона є завершеним науковим дослідженням, яке містить вирішення завдання – вивчення впливу експресії генів десатураз, перенесених із ціанобактерій у вищі рослини, на стійкість рослин до абіотичних

стресів і впливу зміни спектру жирних кислот на адаптацію рослин до температурних стресів та умов зневоднення. Для вирішення цих завдань автором використано комплекс сучасних методів.

Вважаю, що робота «Дослідження гетерологічної експресії генів десатураз ціанобактерій у вищих рослинах» за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, їхнім теоретичним і практичним значенням, відповідає вимогам пунктів 9, 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор, Кирпа-Несміян Тетяна Миколаївна, заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,
 доктор біологічних наук, професор,
 декан хіміко-біологічного факультету,
 завідувач лабораторії екології та біотехнології
 Тернопільського національного педагогічного
 університету імені Володимира Гнатюка

 Н. М. Дробик




 підписую:
 Начальник лабораторії екології та біотехнології