

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію **Сахно Людмили Олександрівни** «Отримання рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) з гетерологічними генами різного походження та аналіз їх толерантності до абіотичних стресів» представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Актуальність теми. Розвиток та удосконалення методів генетичної інженерії надають унікальні можливості для покращення існуючих сортів, ліній та гібридів, які є основою сучасного сільськогосподарського виробництва. Ріпак (*Brassica napus* L.) відноситься до головних олійних культур у світі і має значний інтерес для України. Насіння ріпаку на сьогодні є одним із найважливіших джерел для отримання рослинної олії як для потреб харчування, так і технічного призначення, а також кормів з високим вмістом білка. Створення нових генотипів, що поєднують високу продуктивність, технологічні якості, а також стійкість до абіотичних та біотичних стресових чинників доквілля ґрунтується на використанні новітніх практичних розробок для покращення селекційних матеріалів цієї культури. Останнім часом для вирішення даного питання поряд із традиційними методами селекції застосовуються і біотехнологічні підходи, які дозволяють отримати в більш коротші терміни новий вихідний матеріал з бажаними властивостями.

Отримання біотехнологічних рослин ріпаку на основі перспективних сортів вітчизняної селекції, стійких як до окремих гербіцидів, так і до декількох гербіцидів одночасно, є актуальною задачею, оскільки зробить вирощування даної культури більш рентабельним і екологічно чистим, незалежним від імпорту посівного матеріалу та зменшить ризик виникнення спонтанно стійких бур'янів. Не менш важливим питанням є отримання нових трансгенних рослин ріпаку з підвищеною адаптивною здатністю до абіотичних стресових чинників доквілля.

Незважаючи на те, що біотехнологічні рослини сільськогосподарських культур, і зокрема ріпаку, останні два десятиліття вирощуються у

промислових масштабах, питання щодо можливих непередбачуваних змін у трансгенних форм залишається до кінця нез'ясованим. Тому вивчення біохімічних і фізіологічних особливостей створених рослин має фундаментальний і практичний інтерес, оскільки може дати відповідь не тільки на питання їх адаптивної пластичності за стресових умов, але й спрогнозувати вплив конкретних генетично модифікованих форм на здоров'я тварин і людей, які споживатимуть такі рослини і продукти їх переробки. Разом з тим, досі комплексно та системно не вивчалися фізіолого-біохімічні характеристики трансформантів ріпаку в порівнянні з вихідними рослинами, хоча це питання є дуже важливим з огляду на те, що висловлюються припущення про небезпеку генетично-модифікованих рослин для навколишнього середовища та здоров'я людини. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Сахно Л.О., присвячена отриманню та аналізу біотехнологічних рослин ріпаку з гетерологічними генами різного походження та вивченню їх фізіологічних, молекулярно-біологічних і біохімічних характеристик є безумовно актуальною і практично значимою, оскільки такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал як для подальшого розвитку генетичної інженерії, як одного із фундаментальних напрямів біотехнології рослин, так і для практичного використання у сільському господарстві.

У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», чотирьох експериментальних розділів, а також переліку скорочень, розділу «Узагальнення» і висновків. Робота проілюстрована 22 таблицями та 114 рисунками. Повний обсяг дисертації – 327 стор. комп'ютерного друку, обсяг основного тексту – 263 стор. Список використаних джерел налічує 509 публікацій, з них 460 англомовні.

У розділі «Огляд літератури» висвітлено останні досягнення біотехнології у створенні трансгенних рослин з підвищеною продуктивністю за рахунок експресії гетерологічних генів. Особлива увага приділена питанням збільшення біомаси рослин за сприятливих і стресових умов росту.

Обговорюється важливість змін у антиоксидантній системі рослин, зокрема у активності першого ферменту системи захисту від надмірного вмісту активних форм кисню (АФК) – супероксиддисмутази (СОД), для підвищення здатності рослин протидіяти впливу несприятливих умов зростання.

У розділі «*Матеріали і методи*» детально описано умови проведення експериментів: рослинний матеріал, представлений сучасними сортами ріпаку української та зарубіжної селекції; методи досліджень, зокрема вирощування рослин в асептичних умовах та за умов водного дефіциту, низьких позитивних та високих температур; тестування на толерантність до фосфіотрицину і гліфосату в асептичних умовах та в умовах теплиці; вивчення впливу екзогенного інтерферону на ріст рослин ріпаку; генетичні конструкції, використані в експериментах з трансформації та аналіз трансформованих рослин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); визначення антиоксидантної активності тканин листків, вмісту загального розчинного білка, активності СОД, аскорбінової кислоти, фотосинтетичних пігментів, газова хроматографія метилових ефірів жирних кислот; вивчення загальної антирадикальної активності рослинних екстрактів; аналіз ліхеназної та антивірусної активності рослинних екстрактів, а також методи статистичної обробки даних.

У розділі «*Генетична трансформація ріпаку*» представлено результати розробки протоколу трансформації з використанням в якості експлантів листків 3–4–тижневих рослин, вирощених в асептичних умовах. Запропонована методика запатентована в Україні. Детально описано отримання трансгенних рослин ріпаку, які характеризувались наявністю в своєму геномі гена *nptII* і лише кодуючої послідовності гена *bar*. Показано, що інтегровані гени зберігали свою активність у наступних поколіннях.

Автором отримано 17 незалежних фосфіотрицинстійких ліній ріпаку, що несуть в своєму ядерному геномі синтетичний ген енолпируватшикіматфосфатсинтази (*epsps*). Ці рослини характеризувались стійкістю одночасно до двох гербіцидів – BASTA і Roundup. Експресія гетерологічних генів зберігалась у поколіннях T₁-T₂.

Створено рослини ріпаку з геном *desC* ціанобактерії. Показано, що у разі одночасного введення чотирьох генів у двох незалежних векторах вдалося отримати рослини, у яких гетерологічні гени були функціональними. Прослідковано успадкування інтегрованих генів та їхня експресія в першому поколінні. Показано, що введення гена *desC* *Synechococcus vulcanus* в рослини ріпаку приводило до зменшення вмісту насичених і збільшення вмісту триєнових жирних кислот, підвищення вмісту жирних кислот і індекса ненасиченості в листках деяких трансгенних ліній.

Дисертантом отримано рослини ріпаку з геном альфа-2b інтерферону людини та показано, що біотехнологічні лінії мають різну інтерфероноподібну активність, визначену як здатність листкових екстрактів пригнічувати цитопатичну дію вірусу везикулярного стоматиту в культурі тестикул поросят. Створені лінії ріпаку мали підвищену антиоксидантну активність тканин листків за умов вирощування *in vitro* та *in vivo*.

Отримано трансгенні рослини ріпаку з геном тваринного походження *cup11A1*, які експресують також ген *bar*. Рослини характеризувались підвищеним до 30% вмістом білка у листках, підвищеною антиоксидантною активністю, незмінним вмістом аскорбінової кислоти. У трансгенному насінні вміст олеїнової кислоти підвищувався максимально на 6% і вміст ліноленої кислоти зменшувався майже вдвічі.

У розділі «Активність супероксиддисмути в трансгенних рослинах ріпаку» показано відмінності за активністю СОД серед сортів ріпаку, задіяних у експериментах з трансформації та відсутність достовірних відмінностей за активністю цього ферменту в листках рослин ріпаку з трансгенами *bar*, *nptII*, *epsps*, *desC::licBM3* у порівнянні з нетрансформованими за сприятливих умов росту. Встановлено, що експресія гена *bar* не супроводжується продукуванням супероксид-радикалів; експресія EPSPS, не створює передумов для продукування O_2^- і змін у активності СОД; за нормальних умов активність СОД у рослинах ріпаку з геном *desC* не відрізнялась від такої в контрольних.

За тих же умов у рослин з генами *cup11A1* і *HuInf-α2b* активність СОД була підвищеною порівняно з контролем. Показано, що активність СОД у

рослин ріпаку з геном *sup11A1* може зростати за рахунок експресії гетерологічного білка P450_{SCC}. У рослин ріпаку з геном *HuInf-α2b* активність СОД зростала максимально у 1,33 рази.

У розділі «Вплив екзогенного інтерферону на ріст рослин ріпаку» продемонстровано вплив обробки насіння ріпаку розчином інтерферону людини на фізіологічні і біохімічні параметри проростків. Встановлено, що обробка насіння ріпаку розчинами рекомбінантного *альфа-2b* інтерферону людини приводила до збільшення біомаси 7-добових проростків, культивованих *in vitro*. Крім того, виявлено позитивну кореляцію між приростом сирої біомаси і активністю СОД. Показано, що інтерферон альфа-2b людини позитивно впливає на ростові і біохімічні характеристики (сира біомаса, вміст сумарного розчинного білка і фотосинтетичних пігментів) рослин ріпаку, оброблених розчином інтерферону як за нормальних умов росту, так і за осмотичного стресу в асептичних умовах. Автор висуває гіпотезу, що особливості проаналізованих проростків і рослин ріпаку залежать від підвищення продукування в них супероксиду під впливом екзогенного інтерферону, ймовірно, за рахунок активації НАДФН-оксидаз, що, в свою чергу, веде до росту активності СОД.

У розділі «Трансгенні рослини в умовах абіотичних стресів» представлено результати досліджень особливостей генетично модифікованих рослин ріпаку, які зростали за дії різних абіотичних стресорів. Показано, що рослини ріпаку з *lox*-залежною експресією гена *bar* зберігали стійкість до фосфіотрицину і достовірно не відрізнялись від нетрансформованих за сирією біомасою, вмістом сумарного розчинного білка (СРБ), активністю СОД і загальною антирадикальною активністю в умовах росту без гербіциду. Трансгенні рослини, які експресують гени *bar* та *epsps* одночасно, у другому поколінні не відрізнялися від нетрансформованих рослин за антиоксидантною активністю і вмістом СРБ.

Рослини ріпаку з цільовим геном *desC* за дії низьких позитивних температур не відрізнялись за накопиченням біомаси, вмістом СРБ і активністю СОД від контрольних рослин при рості за температури 22 °С, після переходу на 4 °С і за умов наступного повернення до вихідної

температури. Гетерологічна експресія гена *desC* за умов короткотривалого високотемпературного стресу не впливала на такі показники як вміст фотосинтетичних пігментів і співвідношення хлорофілів, вміст СРБ, активність СОД, не змінювала якісного і кількісного складу жирних кислот у листі та індекс ненасиченості мембранних ліпідів. Показано, що рослини ріпаку з геном *desC*, які крім цього гена мають та експресують гени *bar*, *epsps*, *nptII* і *licVM3*, не відрізнялись від нетрансформованих за накопиченням біомаси, вмістом СРБ і активністю СОД за умов осмотичного стресу, індукованого манітолом. Встановлено позитивний вплив трансгенного інтерферону альфа-2b людини на ріст рослин ріпаку в умовах осмотичного стресу. Дві трансгенні лінії з найвищою інтерфероподібною активністю характеризувались здатністю до формування більшої біомаси в умовах осмотичного стресу; не знижували накопичення СРБ; мали більший вміст фотосинтетичних пігментів і характеризувались підвищеною активністю СОД.

Показано, що за умов підвищеної температури насіння двох з чотирьох аналізованих трансгенних рослин з геном *sup11A1* проростало краще, ніж насіння нетрансформованих рослин. Деякі лінії з трансгеном *sup11A1* були здатні накопичувати біомасу за умов сильного осмотичного стресу. Трансгенні рослини цієї групи характеризувались підвищеною активністю СОД (до 58%) за відсутності осмотичного стресу. У трансгенній лінії T₂1a спостерігали ріст активності СОД за умов сильного осмотичного стресу, що поєднувалось зі здатністю формувати більшу біомасу за цих умов у порівнянні з контролем.

Конститутивна експресія гена *sup11A1* забезпечувала більш високий відносний вміст води у листі у порівнянні з контрольними рослинами під час високотемпературного стресу. За температури 42 °С загальна кількість жирних кислот у трансгенних рослинах на 20–25% перевищувала показник контролю. Для біотехнологічних рослин з трансгеном *sup11A1* характерно зниження вмісту пальмітолеїнової кислоти у листках і індекса ненасиченості разом зі збільшенням вмісту пальмітинової кислоти. Активність СОД у трансгенних листках була на 76% вищою, ніж у нетрансформованих рослин, і

не змінювалась за високої температури, також збільшувався вміст хлорофілу *a* і каротиноїдів. Рослини *sup11A1* виявляють себе більш витривалими за умов високотемпературного стресу.

У розділі «Узагальнення» стисло і чітко узагальнені результати експериментальної роботи, які підтверджують обґрунтованість робочої гіпотези автора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проводились у рамках бюджетних тем відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ «Вивчення поведінки перенесених генетичних маркерів у трансгенних рослин з цінними агрономічними та фармацевтичними властивостями» (2007–2011 р.р., № держреєстрації 0107U002734), «Вивчення функціонування рослинних систем, які містять гетерологічний генетичний матеріал» (2010–2014 р.р., № держреєстрації 0110U002445), «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (2015 р., № держреєстрації 0115U000025), а також при виконанні проектів цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біомаса як паливна сировина. Біопалива» – «Отримання генетично змінених рослин ріпаку з підвищеною продуктивністю, стійкістю до гербіцидів та зміненим складом олії як сировини для виробництва біодизеля» (2007–2010 р.р., № держреєстрації 0107U008096) та «Біотехнологічні рослини ріпаку з підвищеною продуктивністю за рахунок експресії гетерологічних генів як сировина для виробництва біодизеля» (2010–2012 р.р., № держреєстрації 0111U004455); проектів «Дослідження фізіологічної ролі генів, що кодують десатурази з різною субстратною специфічністю, в життєдіяльності рослин в нормі та під впливом абіотичних стресових факторів середовища» та «Розробка біоінженерної платформи нового покоління для високоефективної експресії генів фармацевтичних білків в рослинах і створення їстівних вакцин» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (2010–2014 р.р., №№ держреєстрації 0110U006062 і 0110U006061, відповідно),

проектів НАНУ-РФФД «Дослідження механізмів стійкості вищих рослин до абіотичних стресів завдяки гетерологічній експресії генів ціанобактерій» (2008–2009 р.р., № 0108U003265), ДФФД - РФФД "Молекулярний дизайн системи для гетерологічної експресії білків з використанням термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum* як репортера та носія" (2011 р., № держреєстрації № 0111U004979) та «Створення їстівних та кормових рослин, які містять білки з протитуберкульозними та антивірусними властивостями» (ДЗ/489 – 2011).

Новизна дослідження та одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором оптимізовано умови генетичної трансформації рослин ріпаку з використанням як експлантів листових дисків асептично вирощуваних рослин, підбрано склад середовищ для регенерації. Вперше отримано трансгенні рослини ріпаку зі стійкістю до гербіцидів на основі фосфінотрицину за рахунок експресії безпромоторного гена *bar* при використанні векторної конструкції з елементами *Cre-lox* системи рекомбінації фага P₁. Вперше отримано рослини ріпаку з трансгенами *bar* і *epsps*, стійкі до двох груп гербіцидів (фосфінотрицину і фосфонометилгліцину). Вперше за рахунок одночасного введення двох генетичних конструкцій в складі двох різних векторів отримано рослини ріпаку з генами *bar*, *epsps*, *nptII*, *desC* та *licBM3* та показано наявність і активність перенесених генів. Вперше отримано рослини ріпаку з геном інтерферону альфа-2b людини, показано біологічну активність гетерологічного білка, підвищення антиоксидантної активності тканин листків за рахунок зростання активності СОД. Виявлено здатність до накопичення більшої біомаси у порівнянні з вихідними рослинами як за сприятливих умов культивування, так і в умовах осмотичного стресу, індукованого манітолом *in vitro*. Вперше показано поліпшення росту рослин ріпаку за обробки насіння або верхівок асептичних рослин розчинами рекомбінантного альфа-2b інтерферону людини, продукованого бактерією *Escherichia coli*, і виявлено підвищення активності СОД у нормальних умовах

і за умов водного дефіциту, спричиненого додаванням манітолу до культурального середовища.

Вперше отримано рослини ріпаку з геном *cup11A1*, що кодує цитохром P450_{SCC} тваринного походження. Виявлено здатність рослин до накопичення підвищеної біомаси зі збільшеним вмістом сумарного розчинного білка (СРБ) за умов культивування *in vitro* і у кліматичній камері. Виявлено підвищену антиоксидантну активність тканин листків за рахунок збільшення активності СОД. Показано зміни у складі жирних кислот ліпідів листя і насіння, підвищену толерантність отриманих рослин до осмотичного стресу *in vitro*, високої температури при пророщуванні насіння, високотемпературного стресу за умов кліматичної камери.

Теоретичне значення результатів досліджень. Дослідження, проведені автором, вносять суттєвий вклад в розвиток нового напрямку – метаболічної інженерії рослин, надають нові перспективи для вирішення фундаментальних питань молекулярних біотехнологій та трансмісійної генетики. Результати, наведені у дисертації, поглиблюють та розширюють уявлення: про генетичні та фізіолого-біохімічні основи детермінованості процесів трансгенезу в умовах *in vitro* та *in vivo*; *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію та експресію генів; потенціал різних векторних систем; екзогенні та ендогенні чинники, які впливають на процес трансформації та можливі шляхи підвищення її ефективності; здатності рослин протистояти стресам.

Практичне значення роботи полягає в тому, що отримані трансгенні рослини можуть бути використані для вирощування сировини з метою виробництва біодизелю завдяки їх стійкості до гербіцидів, здатності протистояти стресам, накопичувати більшу біомасу, розвиватись і давати врожай швидше за нетрансформовані. Вирощування гербіцид-стійких рослин є більш рентабельним та екологічно чистим у порівнянні з культивуванням гербіцид-нестійких сортів. Методика визначення активності СОД може використовуватись для первинного скринінгу рослин на толерантність до умов водного дефіциту. Методика отримання трансгенних рослин ріпаку з використанням як експлантів для трансформації листків асептичних рослин,

використовується для створення нових біотехнологічних рослин з іншими цільовими генами різного походження.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант проаналізував значний масив даних літератури з останніх досягнень біотехнології у створенні трансгенних рослин з підвищеною продуктивністю за рахунок експресії гетерологічних генів, особливості експресії трансгенів, а також вплив різних чинників на результативність даної біотехнології. Автором доведена важливість вивчення трансгенних рослин та виявлення різних змін їх фізіологічних та біохімічних параметрів.

Понад 90 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати значний обсяг експериментального матеріалу. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: методики культивування рослин *in vitro* та *in vivo* за нормальних умов і за дії абіотичних стресів; метод *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої генетичної трансформації; молекулярно-біологічні (полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) та полімеразно-ланцюгова реакція зворотніх транскриптів (ЗТ-ПЛР)); сучасні методи генетичного, біохімічного, мікробіологічного та фізіологічного аналізу, а також статистичні методи.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу чималого фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням методів досліджень. Достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. Тому, вважаю, що наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на міжнародних наукових форумах. Зокрема,

за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 48 праць, що включають 31 статтю, з них 25 статей у провідних фахових виданнях, 1 патент на корисну модель, 16 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та закордонних з'їздів та конференцій. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на понад 20 наукових конференціях.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.

Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Проте слід зазначити деякі слабкі місця представленої роботи:

1. Текст дисертації містить певну кількість орфографічних та стилістичних помилок, зокрема «стійоких» (с.9) замість стійких; «підвищення стебел і коріння» (с.10) замість збільшення розмірів стебел і коріння; «поживний» (с.24) замість живильний; «термостійкість фотосинтезу» (с.29). «многоклітинний» (с.45) замість багатоклітинний; «дигаплоїдна» (с.47) замість подвоєних гаплоїдів; «експресія білків» (с.48,165) замість експресія генів; «агробактеріальна трансформація» (с.83,102,203) замість *Agrobacterium*-опосередкована трансформація; «листових» (с.85), замість листкових; «текучість» (с.101) ; «наблюдалась» (с.108) замість спостерігалась, «встроювання» (с.108) замість вбудовування»; «растения» (с.117) замість рослини і таке інше.
2. У огляді літератури інколи наведено тільки аббревіатуру, наприклад ген АОС, без розшифрування.
3. Автором ніде не вказана вибірка експлантів та частота регенерації при розробці протоколу трансформації, не вказано яким шляхом йшла регенерація пагонів – шляхом соматичного ембріогенезу або прямого органогенезу?
4. Замість частоти використовується термін ефективність (с.85). У табл. 3.2. частота регенерації наведена у різних розмірних одиницях.
5. У підпису до рис.3.19 відсутнє пояснення фрагменту розміром 351 п.н. Хіба актин використовується в якості маркера якості виділеної ДНК ?

6. Не зрозуміло, чому індекс ненасиченості мембранних ліпідів автор визначає в одних випадках у відсотках (рис.3.27, 6.19), в інших - у цілих одиницях, хоча формула передбачає цілі одиниці.
7. На рис. 3.34 у деяких ліній виявлено фрагмент розміром 432 п.н. - доріжки 3,5,6,7 – хоча автор стверджує про їх відсутність (відсутність гена *virD1*, що підтверджує їх агробактеріальну чистоту).
8. Підпис до рис. 3.39 некоректний: «Аналіз сумарного розчинного білка в листках», оскільки на рис. наведено його кількість, а не склад.
9. Підписи до рисунків 5.1; 5.3; 6.17; 6.23 та 6.43 некоректні: «Похибка представляє значення \pm стандартне відхилення», оскільки похибка не може представляти значення, а лише середнє стандартне відхилення.
10. Підпис до рисунків 5.4; 6.3; 6.13; 6.37 та назва таблиці 6.1 «Сумарний розчинний білок» некоректні, оскільки на рисунках представлено не сам білок, а його вміст у конкретних органах рослини. Це ж стосується підписів до рис 5.6; 6.9; 6.20; 6.23 «Сира маса...», оскільки на рисунках представлена не сама біомаса, а її кількість!
11. Не зрозуміло, чому у трансгенній рослині ріпаку 18b накопичувалося в середньому у 1000 разів більше сирої біомаси порівняно з іншими (с.198) $0,628 \pm 0,09$; **$615 \pm 0,04$** ; $0,627 \pm 0,05$ і $0,596 \pm 0,07$ г? Чи це технічна помилка?
12. Висновки 8 та 9 логічно було б об'єднати, оскільки вони стосуються підвищеної активності одного і того ж ферменту – супероксиддисмутази.

Проте вказані зауваження не носять принципового характеру і не знижують наукової цінності дисертації.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів біотехнології. Результати роботи Сахно Л.О. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках інститутів, що займаються питаннями генетичної інженерії рослин, а також курсах лекцій з генетичної інженерії, клітинної біології, фізіології та генетики рослин Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Дніпропетровського,

Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора біологічних наук.
Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, рецензована дисертаційна робота «Отримання рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) з гетерологічними генами різного походження та аналіз їх толерантності до абіотичних стресів» є завершеною науковою роботою, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Сахно Людмила Олександрівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,
ст. н. сп. відділу генетичної інженерії
Інституту фізіології рослин і генетики
НАН України, доктор біол. наук

Дуб

О.В. Дубровна

Підпис тов. О.В. Дубровна
ПОСВІДЧУЮ
Учений секретар інституту фізіології
рослин і генетики АН Укр
Підпис Мамин
«15» лютого 2016

