ВІДЗИВ

офіційного опонента про дисертаційну роботу

**Федорчук Вероніки Веніамінівни** «Використання інгібіторів протеїнкіназ та протеїн фосфатаз для підвищення ефективності методу трансформації рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*», подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Генетична трансформація рослин вже протягом трьох десятиріч є предметом не тільки суто наукових досліджень, але й використовується для комерційного отримання сільскогосподарських рослин з важливими ознаками (стійкість до гербіцидів, комах тощо). Наявність таких практичних підходів як *Agrobacterіum*-опосередкована трансформація та низка методів прямої трансформації дозволяє не тільки здійснити перенесення генів інтересу в клітини з подальшою регенерацією рослин з бажаними ознаками, але і розширити число видів, для яких такі маніпуляції стають можливими.

З даних літератури відомо, що у відповідь на агробактеріальну інвазію рослинна клітина запускає каскад біохімічних реакцій, спрямованих на активацію захисних білків, які пригнічують активність патогена і перешкоджають перенесенню бактеріальної ДНК. Показано, що фітогормони, такі як ІОК, етилен та саліцилова кислота, відіграють визначальну роль в цих сигнальних каскадах, і що в опосередкуванні регуляторної дії фітогормонів беруть участь різні групи протеїнкіназ та протеїнфосфатаз. Є дані, що ці ферменти можуть бути залучені як до регуляції проникнення Т-ДНК агробактерій в рослинну клітину, так і її внутрішньоклітинного транспорту, в тому числі за участю цитоскелету. Цілком логічно, що застосування інгібіторів протеїнкіназ і протеїнфосфатаз в дослідах з генетичної трансформації дозволило б прояснити питання про можливу роль цих ферментів в інтеграції та експресії перенесеної ДНК в рослинному геномі, а також, вірогідно, надати можливості збільшення ефективності процесу трансформації рослинних клітин. З огляду на це дисертаційна робота Федорчук В.В. є, безумовно, актуальною.

 Дисертаційна робота виконана в Державній Установі «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» у рамках конкурсного проекту «Покращення ефективності трансформації рослинних клітин, опосередкованої *A.tumefaciens*, за допомогою інгібіторів протеїнкіназ» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (2010–2014 рр.).

Дисертаційна робота побудована за традиційною схемою. Вона містить: вступ; огляд літератури, що має три розділи; опис матеріалів і методів досліджень; викладення результатів власних досліджень та їх обговорення, представлене двома розділами; аналіз та узагальнення результатів роботи; висновки; список літератури. Робота добре ілюстрована (31 рисунок, 3 таблиці). Текст дисертації з ілюстраціями та переліком літератури (243 джерела, з них переважна більшість – в іноземних виданнях) викладено на 132 сторінках.

У вступі обґрунтовується актуальність теми; зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами; мета та завдання досліджень; дано визначення об’єкта, предмета та методів дослідження, викладені наукова новизна одержаних результатів та їх практичне значення; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації та наявні публікації.

В огляді літератури викладено сучасний стан досліджень і проведено аналіз наявних публікацій в галузі генетичної трансформації рослин, біохімічних та молекулярних аспектів регуляції перенесення та інтеграції Т-ДНК агробактерії в рослинні клітини, а також класифікації та функцій протеїнкіназ та протеїнфосфатаз. Огляд літератури написаний із залученням значної кількості сучасних наукових джерел з тематики досліджень, проведених автором, і свідчить про глибокі знання сучасного стану відповідної наукової проблематики.

В розділі “Матеріали та методи досліджень” описано вихідний рослинний матеріал, реактиви, використані в роботі; надано схему генетичної конструкції, яку застосовували в дослідах з трансформації; охарактеризовано процедури поверхневої стерилізації рослинного матеріалу для введення в асептичну культуру, *Agrobacterіum*-опосередкованої генетичної трансформації, в тому числі з використанням інгібіторів протеїнкіназ та протеїнфосфатаз, методи гістохімічного та молекулярно-біологічного аналізу отриманих трансгенних ліній *Nicotiana tabacum*. Спектр застосованих методів є адекватним щодо поставленої мети і завдань роботи.

Результати власних досліджень автора та їх обговорення представлено у двох розділах.

Розділ 5 присвячено вивченню дії інгібіторів протеїнкіназ (трифлюоперазину, геністеїну і W7) на частоту *Agrobacterіum*-опосередкованої генетичної трансформації тютюну. Спочатку автор наводить власні експериментальні дані щодо впливу різних концентрацій селективного агенту (гігроміцину) на частоту регенерації пагонів в листкових експлантах *Nicotiana tabacum*, а також щодо визначення умов *Agrobacterіum*-опосередкованої генетичної трансформації з урахуванням впливу оптичної густини суспензії агробактерій та тривалості кокультивування. На основі отриманих даних в проведених автором експериментах підібрано оптимальні умови генетичної трансформації експлантів *N.tabacum*, які були використані як контрольні в подальших дослідах. В цьому ж розділі наводяться отримані В.В.Федорчук експериментальні дані щодо впливу досліджених інгібіторів протеїнкіназ на частоту регенерації пагонів *N.tabacum*. Підібрано концентрації цих речовин, які не призводять до некрозу експлантів і можуть бути використані в дослідженнях з генетичної трансформації. Далі автор детально описує вплив інгібіторів протеїнкіназ на частоту генетичної трансформації листкових експлантів тютюну. Вперше встановлено, що кожна з досліджених речовин впливає на цей показник; при цьому ефективні концентрації кожної речовини різняться. Крім того, автором проведено гістохімічний аналіз листкових експлантів на gus-активність в дослідах з транзієнтної експресії та молекулярно-біологічний аналіз регенерованих після кокультивування з агробактерією рослин за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції. Результати цих аналізів підтверджують трансгенну природу отриманого рослинного матеріалу.

Розділ 6 містить отримані автором експериментальні дані щодо впливу двох інгібіторів протеїнфосфатаз (ортованадату натрію і кантаридину) на частоту регенерації рослин з листкових експлантів *N.tabacum* та частоту їх генетичної трансформації. Автором вперше встановлено достовірний вплив цих речовин в певних досліджених концентраціях на обидва процеси. Трансгенна природа отриманого рослинного матеріалу підтверджена аналізом на gus-активність та результатами полімеразно-ланцюгової реакції.

Після Розділів 5 та 6 в дисертаційній роботі окремо подається аналіз та узагальнення експериментальних даних, отриманих автором. Наявність такого розділу дозволяє коротко підсумувати основні результати роботи, оцінити їхню наукову новизну та практичне значення, визначити перспективи подальших досліджень у започаткованому автором напрямі.

Висновки, зроблені здобувачем, є обґрунтованими, відповідають меті та завданням роботи та логічно випливають із отриманих результатів.

Автореферат в цілому відповідає змісту дисертації.

Водночас, до дисертаційної роботи виникла низка зауважень, запитань і побажань.

1. В розділі «Матеріали і методи» бажано було б вказати сорт *Nicotiana tabacum*, який було використано в дослідженнях.
2. В цьому ж розділі зазначено, що статистичну обробку даних проводили «згідно методики Лакіна». Треба було б конкретизувати, який саме з методів статистичного аналізу, наведених в посібнику Лакіна, мається на увазі.
3. Що стосується гістохімічного аналізу експресії гена *gus*, наведена методика за Jefferson (1987) є якісним, а не кількісним аналізом. Варто було б замість візуальної оцінки кількості забарвлених зон та інтенсивності забарвлення застосувати методи спектрофотометрії, які описані в низці публікацій. Це дозволило б виключити елемент суб’єктивності в обробці експериментальних даних.
4. Оцінку регенераційної здатності експлантів в різних варіантах експериментів було здійснено, відповідно до «Матеріалів і методів», за співвідношенням кількості експлантів, в яких відбувається регенерація, до загальної кількості експлантів. Було б доцільно враховувати також такий важливий показник як середня кількість пагонів, що сформувалися на один експлант. Якщо такі підрахунки проводилися, ці показники недостатньо чітко відображені в тексті.
5. За результатами попередніх експериментів, проведених автором, метою яких було відпрацювання оптимальних методик регенерації з листкових дисків та генетичної трансформації, встановлено, що в контролі середня частота регенерації в експлантах тютюну становила близько 97%. Не зрозуміло, чому в експериментах з W7 середньою контрольною частотою регенерації є 78%. Так само є розбіжності в контрольних значеннях в дослідах з генетичної трансформації (на рівні 73-75% в одних випадках і 47-50% - в інших), адже значення контролю (без застосування інгібіторів) мали б розрізнятися лише на рівні статистичної похибки.
6. Надзвичайно цікавими є отримані В.В.Федорчук експериментальні дані стосовно впливу інгібіторів протеїнкіназ та інгібіторів протеїнфосфатаз на частоту регенерації та генетичної трансформації *N.tabacum*, які свідчать про можливість використання цих речовин в певних концентраціях для підвищення ефективності цих процесів. В той же час не наведено жодного пояснення або припущення, чому вплив зростаючих концентрацій трифлюоперазину, W7 та кантаридину різниться від ефектів, обумовлених зростаючими концентраціями геністеїну та ортованадату натрію. Які можна зробити припущення стосовно того, чому низькі концентрації геністеїну та ортованадату натрію викликають різке зменшення частоти регенерації та трансформації порівняно з контролем, а при збільшенні концентрацій ці показники зростають, на відміну від дії інших інгібіторів, що вивчалися?
7. Так само в обговоренні результатів роботи бажано було б надати можливі припущення, чому інгібітор тирозинкіназ (геністеїн) та інгібітор тирозинфосфатаз (ортованадат натрію) мають схожу дію на регенерацію та *Agrobacterium*–опосередковану трансформацію листкових експлантів тютюну, незважаючи на протилежну дію ферментів, інгібіторами яких вони є.
8. Для кращого сприйняття результатів роботи варто було б використовувати в діаграмах та фотографіях однакову подачу даних: вказувати концентрацію інгібіторів від меншої до більшої, а не навпаки, як це зроблено на деяких рисунках (5.12; 6.3; 6.5; 6.12).
9. Дані, представлені в Таблиці 3, не співпадають з їх описанням у тексті. В тексті зазначається, що в присутності кантаридину спостерігається регенерація пагонів, але не коренів, тоді як в таблиці ця інформація є прямо протилежною.
10. В тексті дисертації зустрічаються стилістичні вади, друкарські та пунктуаційні помилки, неточності.

Наприклад, як у «Змісті», так і у «Результатах та їх обговоренні» Розділи 5 і 6 мають однакову назву – «Дослідження впливу інгібіторів протеїнкіназ на частоту *Agrobacterіum*-опосередкованої трансформації», хоча Розділ 6 стосується впливу протеїнфосфатаз.

У пунктах 2.6 та 2.7 огляду літератури (сторінки 30-32) міститься однакова інформація. Незрозуміло, навіщо було формувати ці два підрозділи.

Не всі посилання із списку літератури (№ 75, 88-97, 124, 125, 127) процитовані в тексті роботи. Посилання № 217 відсутнє в списку літератури.

В тексті дисертації порушена нумерація рисунків, відсутні номери 6.6; 6.12; 6.14.

Разом з тим, зазначені недоліки не зменшують наукового значення проведеної В.В.Федорчук роботи. Автором вперше отримано великий обсяг експериментальних даних стосовно впливу речовин різного походження та різної хімічної природи, одним із проявів дії яких на клітини є інгібування протеїнкіназ або протеїнфосфатаз, на частоту регенерації *in vitro* та частоту

