

## ВІДГУК

**офіційного опонента на дисертаційну роботу  
Кваско Анни Юрїївни  
«Створення посухостійких ліній пшениці  
з дріжджовими генами біосинтезу трегалози»,**

**представленої на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія**

**Актуальність теми дисертаційної роботи.** Дисертаційна робота Кваско Анни Юрїївни присвячена дослідженню надекспресії дріжджових генів біосинтезу трегалози *TPS1* і *TPS2* у трансгенних рослинах. Інтерес до вивчення метаболізму та функціонування трегалози у рослинах почав стрімко зростати з кінця 90-х років минулого століття. З цією метою відповідно пошукачкою було сконструйовано генетичні вектори та проведено *Agrobacterium*-опосередковану генетичну трансформацію рослин тютюну та пшениці м'якої в умовах *in vitro* та *in planta*. Отримані лінії рослин мають потенційну цінність не лише для теоретичного розуміння ще недостатньо вивчених шляхів метаболізму трегалози у рослин, особливо злаків, а і ймовірну практичну користь у вигляді рослин пшениці з підвищеною стійкістю до посухи. Поза сумнівом, даний напрямок синтезу, перетворень та регуляції метаболізму рослин за допомогою цукрів є однією з найактуальніших у сучасній біотехнології. Анна Юрїївна провела комплекс досліджень, спрямованих на отримання векторних конструкцій з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*, підтвердження їх перенесення та інтеграцію до геномів рослин *Nicotiana tabacum* (як модельного об'єкту), потім пшениці м'якої на декількох сортах української селекції з використанням методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta*. Надалі проведений аналіз отриманих рослинних ліній вказував на підвищене накопичення трегалози у тканинах та підвищену стійкість рослин до умов посухи.

**Повнота викладу та структура дисертації.** Анна Юрїївна чітко і ясно сформулювала мету дисертаційної роботи та конкретні задачі досліджень,

необхідних для досягнення поставленої мети. Усі поставлені наукові завдання були виконані повністю. Для цього здобувачем було застосовано цілий арсенал сучасних методів клітинної та молекулярної біології, біохімії, фізіології рослин, серед яких отримання рекомбінантних ДНК, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин, полімеразна ланцюгова реакція, статистичний аналіз отриманих результатів та інші.

Дисертаційна робота викладена на 170 сторінках друкованого тексту, містить усі необхідні для даної роботи розділи та ілюстрована 29 рисунками. У розділі «Огляд літератури» здобувачка ґрунтовно викладає й аналізує сучасний стан досліджуваної теми на основі 290 літературних джерел.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Новизна отриманих Анною Юрїівною результатів у тому, що вперше створено дві генетичні векторні конструкції з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* термофільних дріжджів під контролем конститутивного промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S) для генетичної трансформації дводольних, та два аналогічних вектори з цими ж генами, але вже під контролем сильного конститутивного промотору убікітину кукурудзи (PUbi), придатних для генетичної трансформації однодольних рослин, безпосередньо злаків. Також не менш важливо і те, що вперше введено в асептичну культуру шість сортів пшениці м'якої української селекції та вивчено їх морфогенетичний потенціал. Поєднуючи обидва підходи методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* вдалося перенести гетерологічні гени *TPS1* та *TPS2* в геном рослин пшениці та виявити їх експресію і фізіологічну дію. Одержані Анною Юрїівною експериментальні дані є статистично достовірними, викладені у дисертації логічно і детально обговорені. Наукові положення та висновки, які сформульовані у дисертації, досить повно викладені в 11 публікаціях у фахових наукових виданнях. Результати роботи були неодноразово представлені й обговорювалися на міжнародних та вітчизняних наукових зібраннях. Основні положення дисертаційної роботи повністю відображені у авторефераті.

## **Недоліки дисертації щодо змісту та оформлення, зауваження та побажання.**

Ознайомлюючись з дисертаційною роботою виникли наступні критичні зауваження та запитання, стосовно яких у форматі дискусії хотілося б почути думку автора. Як у дисертації роботі так і в авторефераті є орфографічні помилки. Окрім того, спостерігається невірне використання термінів: наприклад, «стійкість до посухи» краще було б вживати термін толерантність до посухи; «полімеразно-ланцюгова реакція» – полімеразна ланцюгова реакція; електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному гелі – електрофорез ДНК в агарозному гелі; «на сьогоднішній день» – на сьогодні, тепер; «відпал праймерів» – гібридизація праймерів; «ген *virD*» – ген *virD1*; «середовище для регенерації пагонів, що містило 5%-ну сахарозу» – середовище містило 5 % сахарози. Напевно «спектрофотометричний метод кількісного визначення вмісту трегалози» краще було б віднести до біохімічних методів. Бажано вказувати кінцеву концентрацію праймерів у реакції. Розділ 2.2. «В роботі використовували реактиви наступних фірм-виробників: «Макрохім», «Sigma»» – ці компанії радше постачальники, а не виробники. Розділ 2. Матеріали та методи дослідження. Сторінка 72 Підпункт «3.0. Визначення вмісту трегалози у створених лініях пшениці» краще нумерувати 2.10. Відповідно наступний «3.1. Статистична обробка даних» як 2.11. Статистична обробка даних. На рисунках, де зображуються електрофореграми, бажано вказувати ідентифікаційний номер лінії, яка аналізується і демонструється. Назви генів, які входять у назву вектора, непотрібно виділяти курсивом. Варто було б акуратніше оформити рисунки – чіткіше підписати маркери, точніше виставити стрілки, одноманітно відкоригувати контрастність електрофореграм, належним чином підписати доріжки і зразки в них. Аналізуючи толерантність трансгенних рослин пшениці до посухи краще було б провести структурний аналіз продуктивності рослин, а не обмежуватися виміром декількох окремих морфологічних показників. Деякі положення у висновки 4, 5, 6 і 7 частково повторюються – можливо варто було б їх прискіпливіше відредагувати.

Скажіть будь ласка чому вибрано конститутивні промотори як для трансформації дводольних рослин (P35S) так і для генетичної модифікації однодольних рослин (промотор убіквітину кукурудзи), якщо з попередніх наукових робіт по даному напрямку відомо, що занадто сильна експресія трансгена може призводити до аномального розвитку трансгенних рослин. На противагу, індукований стресом промотор для контролю надекспресії генів метаболізму міг би краще направляти експресію трансгенів?

Для успішної експресії трансгенів часто-густо проводиться оптимізація генетичного коду. У своїй практичній роботі Ви такої операції не проводили. Що Вам відомо про це з наукової літератури і як би Ви здійснили оптимізацію у випадку її необхідності? Чи не надійніше було б скористатися генами біосинтезу трегалози клонованими з ризушки Таля?

Як Ви вважаєте де, у якому компартменті клітини накопичуються експресовані Вами гетерологічні білки?

Як Ви вважаєте скільки відбулося вставок кожного трансгена в отриманих Вами лініях? Яке успадкування трансгенів у ряду поколінь?

Зрештою, хотілося б особливо наголосити на виключній важливості здійснення контрольного аналізу на вміст агробактерій у трансформантах після генетичної трансформації *in planta*. Коли елімінуючий антибіотик не застосовується і відсутня цілестрамована пряма селекція виникає підвищений ризик отримання хибно позитивних результатів.

Не дивлячись на зауваження, ми чітко бачимо, що результати наукових досліджень Кваско Анни Юріївни, представлені у дисертаційній роботі, пропонують зручний інструмент та відпрацьовану технологію отримання генетично модифікованих рослин пшениці, розширюють сучасні уявлення щодо механізмів біосинтезу трегалози. Кількість проведених наукових досліджень та високий методичний рівень їх виконання, статистична обробка результатів є адекватною базою для обґрунтування висновків цієї дисертаційної роботи.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.** Вважаю, що дисертаційна робота Кваско Анни Юріївни «Створення

посухостійких ліній пшениці з дріжджовими генами біосинтезу трегалози», за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів, можливістю їх практичного використання, коректністю та достовірністю зроблених висновків повністю відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор Кваско Анна Юріївна заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,

заступник директора з наукової роботи

Інституту клітинної біології та генетичної інженерії

Національної академії наук України,

кандидат біологічних наук, PhD

Б.В. Моргун

