

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Бойчук Юлії Миколаївни

«Відбір та введення в культуру *in vitro* високопродуктивних генотипів ярого рижю (*Camelina sativa* L.) з їх подальшою генетичною трансформацією», що подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

091 – Біологія

Дисертаційна робота «Відбір та введення в культуру *in vitro* високопродуктивних генотипів ярого рижю (*Camelina sativa* L.) з їх подальшою генетичною трансформацією» була виконана у ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України».

Тема дисертаційної роботи є актуальною, оскільки стосується оптимізації технології вирощування у стерильних умовах та генетичної трансформації рослин рижю посівного (*Camelina sativa*). Такі рослини можуть стати альтернативою для отримання біодизелю. Автором було визначено ряд морфометричних та фізіологічних характеристик рижю дванадцяти генотипів. Зокрема, порівняно тривалість вегетаційного періоду, вплив умов вегетації, фази розвитку, строків та способів сівби на ріст рослин різних генотипів.

При дослідженні фізіологічних характеристик 12 генотипів рижю посівного було встановлено найбільш сприятливий період сівби. Визначено тривалість вегетаційного періоду. Вивчення морфологічних особливостей *C. sativa* показали залежність основних морфометричних показників від ряду параметрів. Визначено також ряд біохімічних параметрів, у тому числі проведено порівняльний аналіз зразків за вмістом олії та жирнокислотним складом. Встановлено, що два сорти, Перемога та Євро-12, є найкращими за досліджуваними показниками.

Біотехнологічні дослідження було спрямовано на визначення умов регенерації пагонів рослин рижю та впливу умов культивування

експлантів, складу живильних середовищ, освітлення, температури, а також віку експлантів на процес регенерації. Оптимізовано склад живильного середовища, визначено вплив регуляторів росту на процес формування пагонів рослин рижію. Зокрема, встановлено, що за використання БАП у концентрації 1-2 мг/л та НОК (0,1 мг/л) частота регенерації пагонів становила майже 70 % за використання у якості вихідного матеріалу сім'ядольних листків та сягала 45 % при використанні гіпокотилів у якості експлантів. Доведено, що збільшення вмісту сахарози сприяє інтенсивному процесу формування калюсу, однак не має істотного впливу на процес пагоноутворення. Визначено сортозалежність частоти регенерації. Так, сорти Перемога, Міраж, Євро-12 та зразок ФЕОРЖЯФ-5 характеризувалися достатньо високим морфогенетичним потенціалом.

Оптимізовано методику генетичної трансформації досліджуваних рослин, визначено умови селекційного відбору трансгенних ліній, а також фактори, що сприяють підвищенню ефективності процесу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

У результаті трансформації методом *in planta* рижію посівного були отримані рослини, трансгенну природу яких було підтверджено за допомогою молекулярно-генетичного аналізу за використання полімеразної ланцюгової реакції.

Здійснено порівняння ефективності використання двох методів для генетичної трансформації рослин — *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів, проведеної в умовах *in vitro*, та трансформації методом *in planta*. Визначено більшу ефективність останнього методу, оскільки за його використання вдається уникнути етапів регенерації та укорінення пагонів, таким чином спростивши процес отримання трансгенних рослин.

Основний текст дисертації викладено на 128 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, трьох розділів з викладенням результатів власних

експериментальних досліджень, узагальнень, висновків, списку використаних джерел. Список використаних джерел включає 314 найменувань. Основна частина дисертаційної роботи містить 21 таблицю і 33 рисунки.

У «Переліку умовних позначень, скорочень і термінів» наведено основні скорочення понять та назв, які зустрічаються у тексті.

У розділі «Огляд літератури» автором подано інформацію щодо сучасного стану досліджень стосовно обраних рослин, розглянуто їх біологічні особливості та використання біотехнологічних методів для мікророзмноження і отримання трансгенних рослин.

Розділ «Матеріали і методи досліджень» містить відомості щодо основних методів, які було використано при виконанні роботи, а саме стандарти морфометричні, біохімічні методи, молекулярно-біологічні методи досліджень.

У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» подано отримані автором результати. Розділ містить детальний опис отриманих даних щодо вирощування рослин рижію різних варіантів (сортів), порівняно їх характеристики, визначено біохімічний склад, у тому числі вміст олій, викладено результати генетичної трансформації рослин.

Автореферат відповідає змісту роботи.

Водночас, до дисертаційної роботи можна висловити ряд зауважень.

1. Зустрічаються лінгво-стилістичні недоречності. Наприклад, на стор. 17 написано щодо рижію: «він практично не заселяється шкідниками». Очевидно, малося на увазі «не ушкоджується». На стор 30 написано, що «Рижій також володіє стійкістю до грибів». Очевидно, не «володіє», а «виявляє» або «має» стійкість.
2. У переліку скорочень наявні не всі скорочення, які є у тексті. Наприклад, відсутня розшифровка скорочення «Застосовували ізократичний елюент складу IPA:CAN», стор. 53.
3. Не наведено методику визначення «енергетичної цінності зразків», вказано лише марку приладу (стор. 54). Так само не

деталізовано і іншу використану методику («Ліпіди одержували з подрібненого насіння екстракцією петролейним ефіром», стор 53).

4. Є питання методологічне. Авторка пише (стор.58), що «... експланти переносили на агаризоване середовище МС для ко-культивування, попередньо видаливши залишки агробактерії за допомогою стерильного фільтрувального паперу. Після чого трансформовані експланти переносили на середовище МС, що містило фітогормони (БАП та НОК) для регенерації пагонів і 350 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії», тобто, одразу після припинення безпосереднього етапу кокультивування з бактеріями експланти переносили на середовище з цефотаксимом. Чи достатньо такого короткого терміну кокультивування для інфікування рослин та перенесення відповідної плазміни з клітин бактерій до клітин рослин? У той же час на стор 103 написано, що «Після етапу інокуляції експланти переносили на агаризоване середовище на 1-3 доби для їх подальшого ко-культивування з агробактерією, а потім - на середовище для регенерації пагонів без селективного тиску, однак середовища містили 350 мг/л цефотаксиму для елімінації залишків агробактерії». То ж скільки днів експланти культивували на живильному середовищі без цефотаксиму?
5. Хотілося би отримати роз'яснення щодо ствердження автора стосовно найкращих морфометричних показників у декількох сортів, зокрема, у сорту Євро-12. Це питання виникло тому, що на рис. 3.5, стор. 69, видно, що розмір суцвіття рослин цього сорту значно менший, ніж, наприклад, у зразків Міраж та Клондайк. Вірогідно, оцінювання відбувалося за комплексом показників? Було б добре це підкреслити.

6. Питання є також стосовно рис. 3.5 та зразка № 12, сорт Євро-12. Видима кількість «стручків» на рисунку не перевищує 20, а у таблиці 3.4 на стор. 70 наведено іншу кількість - $50,4 \pm 1,21$.
7. У табл. 3.5 на стор. 71 вказано діаметр стручків на бічних пагонах у сантиметрах. Зокрема, для сортів Перемога та Міраж цей розмір становить $4,90 \pm 0,10$ та $3,70 \pm 0,17$ відповідно, в той час як розмір стручків у інших зразків коливається у межах $0,34 \pm 0,01$ - $0,40 \pm 0,01$. З чим можуть бути пов'язані більш ніж десятикратні відмінності у діаметрі?

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

Підсумовуючи викладене, слід визначити, що дисертаційна робота Бойчук Юлії Миколаївни «Відбір та введення в культуру *in vitro* високопродуктивних генотипів ярого рижю (*Camelina sativa* L.) з їх подальшою генетичною трансформацією» є завершеним науковим дослідженням, яке містить постановку завдань, їх вирішення, аналіз отриманих результатів та подання відповідних обґрунтованих висновків. Вважаю, що за актуальністю теми, методичним рівнем, новизною результатів і практичним значенням, кількістю друкованих праць, повнотою відображень у цих працях основних положень вказана робота відповідає «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 для кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Зав. лабораторії адаптаційної біотехнології
Інституту клітинної біології
та генетичної інженерії НАН України
д.б.н., с.н.с.



Н.А. Матвеева

Подпись Матвеевой Н.А.
Удостоверяю Евдокимова Т.В.
отдел кадров