

ВІДГУК

офіційного опонента **Циганкової Вікторії Анатоліївни**
на дисертаційну роботу **Бузіашвілі Анастасії Юріївни**

«Отримання генетично модифікованих ліній рослин родини Solanaceae з геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів»,
подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність теми дисертаційної роботи. Томати та картопля є одними з найбільш важливих овочевих культур по всьому світі та в Україні. Україна входить до 10 найбільших країн-виробників картоплі та двадцятки світових лідерів по виробництву томатів. Однак, низька стійкість даних культур до захворювань, спричинених фітопатогенними мікроорганізмами, може призвести до значних втрат врожаю (до 30-80%). За даними літературних джерел, в Україні в період за 2014-2017 рр. найбільш поширеними хворобами картоплі були фітофтороз, спричинений збудником *Phytophthora infestans*, альтернаріоз, збудником якого є різні види *Alternaria* sp., фузаріоз, викликаний різними видами *Fusarium* sp, зокрема, і *F. sambucinum*, та кільцева гниль, спричинена *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Серед бактеріальних хвороб томатів, найбільш поширеними в Україні були бактеріальна плямистість (збудник – *Xanthomonas vesicatoria*), бактеріальна крапчастість (збудник *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) та бактеріальний рак (збудник *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), а серед грибних хвороб томатів, як і картоплі - фітофтороз (збудник *Phytophthora infestans*) та альтернаріоз (збудник *Alternaria alternata* і *Alternaria solani*). Відомо, що *Ralstonia solanacearum* є надзвичайно небезпечним фітопатогенною бактерією, що уражує різні види культур, зокрема, томати та картоплю. За даними фітосанітарного стану цей фітопатоген є карантинним мікроорганізмом в багатьох країнах, в тому числі і в Україні, що й пояснює обумовленість вибору фітопатогенних мікроорганізмів, які були використані у дисертаційній роботі Бузіашвілі А.Ю.: *C. michiganensis*

subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *R. solanacearum*, *P. infestans*, *F. sambucinum*.

Серед різних підходів до боротьби із хворобами рослин, найбільш перспективним є використання методу генетичної інженерії рослин, який дозволяє переносити гени стійкості до фітопатогенних мікроорганізмів, зокрема, ген лактоферину людини (*hLf*), до геному цінних сортів культурних рослин. Лактоферин – це білок із родини трансферинів, який здатний зв'язувати та переносити йони Fe^{2+} , Fe^{3+} ; він є також компонентом неспецифічного природного імунітету людини. Цей білок виявляє антибактеріальні, фунгістатичні, противірусні, антипротозойні, протиракові та ін. захисні властивості. Таким чином, перенесення гена *hLf* та його експресія в геномах цінних сортів томатів та картоплі може підвищити їх стійкість до фітопатогенів, а отже, знизити контамінацію врожаю продуктами життєдіяльності фітопатогенів, зокрема, мікотоксинами, та покращити якість продуктів харчування.

Отже, дисертаційна робота Бузіашвілі Анастасії Юріївни «Отримання генетично модифікованих ліній рослин родини Solanaceae з геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів» присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами. Дисертаційне дослідження було виконано у відділі клітинної біології і біотехнології ДУ «Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України» за фінансової підтримки проекту «Застосування гена лактоферину для створення стійких до фітопатогенів ліній рослин родини Solanaceae» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (номер державної реєстрації – 0115U005021, 2015- 2019 рр.).

Новизна дослідження та одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням, у якому дисертанткою вперше:

1) досліджено морфогенетичний потенціал економічно важливих культур томатів *L. esculentum* українських сортів Лагідний та Перлина, розроблено методики їх культивування в умовах *in vitro*, а також проведено аналіз впливу різних комбінацій фітогормонів у складі живильних середовищ на морфогенетичний потенціал їх експлантів;

2) за допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було проведено трансформацію геном *hLf* томатів *L. esculentum* сортів Лагідний та Мані Мейкер, та картоплі *S. tuberosum* сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево;

3) за використання молекулярно-генетичного ПЛР-аналізу було підтверджено інтеграцію гена *hLf* в геном трансгенних ліній;

4) із застосуванням біохімічного аналізу Вестерн-блот гібридизації було підтверджено експресію лактоферину людини у пагонах трансгенних ліній;

5) за використання методу дифузії в агар було показано антибактеріальний та фунгістатичний ефект зразків, отриманих із трансгенних ліній *S. tuberosum* та *L. esculentum*. Зокрема, було встановлено, що зразки, ізольовані із ліній картоплі, інгібують ріст фітопатогених бактерій *S. michiganensis* subsp. *sepedonicus* та *R. solanacearum*, а також фітопатогених грибів *P. infestans* та *F. sambucinum*. Встановлено також антибактеріальний ефект зразків, ізольованих із трансгенних ліній томатів, проти *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* та *R. solanacearum*, а також фунгістатичний ефект проти *P. infestans*;

6) в умовах штучного зараження *in vitro* показано підвищення стійкості трансгенних ліній томатів, що експресують ген лактоферину людини, до фітопатогених грибів *P. infestans*, та трансгенних ліній картоплі до фітопатогених грибів *P. infestans* та до *F. sambucinum*.

Практичне значення результатів досліджень. В результаті виконання дисертаційної роботи Бузіашвілі А.Ю. було отримано трансгенні лінії українських сортів картоплі Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, а також лінії томатів українського сорту Лагідний та індетермінатного

високорослого сорту Мані Мейкер, що містять ген лактоферину людини. За використання біотестів *in vitro* підтверджено стійкість даних сортів картоплі та томатів до фітопатогенних бактерій (*C. michiganensis*, *R. solanaceum*) та фітопатогенних грибів (*P. infestans*, *F. sambucinum*). Отже, результати даної роботи свідчать про перспективність використання методу генетичної трансформації економічно важливих культур геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів. Крім того, трансгенні лінії рослин, отримані дисертанткою, можуть бути використані у подальшій селекційній роботі та біотехнологічних дослідженнях.

Обґрунтованість та достовірність одержаних результатів дослідження та висновків, сформульованих у дисертації, визначається використанням сучасних методів досліджень: методів культури ізольованих клітин та тканин рослин *in vitro*, методів вирощування на середовищах фітопатогенних бактерій та грибів, методів генетичної інженерії, методів молекулярно генетичного (ПЛР) та біохімічного аналізу (Вестерн-блот гібридизація), фітопатологічного методу штучного зараження та біотесту на перевірку стійкості трансгенних ліній рослин до фітопатогенів в умовах *in vitro*, а також методів математично-статистичного аналізу.

Цитовані в дисертації літературні джерела дали змогу обґрунтувати основні положення наукової роботи та методичні підходи для реалізації поставлених завдань.

Логічне та чітке планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати великий обсяг експериментального матеріалу.

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. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, в тому числі 2 статті у міжнародних наукових журналах, що індексуються у базах даних Scopus та Web of Science та мають рейтинг Q2

та Q4, 3 статті у вітчизняних фахових виданнях, а також 10 тез доповідей на міжнародних і всеукраїнських конференціях, симпозіумах та з'їздах. Отже, експериментальні дані дисертаційної роботи повною мірою викладені у публікаціях та авторефераті, які повністю відображають зміст дисертації та основну її суть.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота написана у науковому стилі, логічно побудована, викладена грамотною українською мовою та оформлена у відповідності до вимог МОН України. Дисертація викладена на 170 сторінках комп'ютерного тексту, містить 25 рисунків та 2 таблиці. Робота має класичну структуру та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів та їх обговорення, списку використаних джерел та додатку. Бузіавшілі А.Ю. було використано 291 літературне джерело, з яких 49 – україномовних. Більшість процитованих джерел було опубліковано протягом останніх 5-10 років, тому використання даних джерел дозволило всебічно проаналізувати та окреслити наукову новизну отриманих результатів.

У розділі «Вступ» дисертаційної роботи чітко сформульовано актуальність роботи, її мету та завдання, визначено предмет та об'єкт досліджень, окреслено новизну та практичне значення роботи, вказано перелік наукових конференцій, симпозіумів та з'їздів, на яких пройшли апробацію результати дисертаційної роботи.

У розділі «Огляд літератури» представлено аналіз сучасної наукової літератури (автором процитовано 291 літературне джерело), присвяченої детальному опису біотехнологічних підходів для покращення агрономічних характеристик картоплі та томатів. Зокрема, представлено біотехнологічні підходи для культивування ізольованих клітин та тканин рослин картоплі та томатів та їх мікроклонального розмноження в умовах *in vitro*; розглянуто сучасні методи генетичної трансформації томатів та картоплі, а також широкі можливості, які розкриває генетична інженерія цих культур. Також, описано найбільш розповсюджені на території України протягом останніх 10 років

хвороби томатів та картоплі. Крім того, охарактеризовано збудники найбільш шкочочинних хвороб томатів та картоплі, зокрема, фітопатогенні бактерії *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* та гриби *Phytophthora infestans* та *Fusarium sambucinum*, та окреслено основні підходи до контролю над хворобами, які вони викликають, та стратегії щодо створення стійких до них рослин. Особливу увагу зосереджено на методах генетичної інженерії. Одним із перспективних генів, який використовують для підвищення стійкості рослин до хвороб, є ген лактоферину людини. У розділі охарактеризовано структуру та біологічну активність лактоферину по відношенню до патогенів людини та рослин, проаналізовано попередні дослідження інших авторів з перенесення генів лактоферину у геноми різних видів рослин та сформульовано новизну даної роботи у порівнянні з дослідженнями, проведеними іншими авторами.

У розділі «**Матеріали та методи досліджень**» наведена детальна характеристика сортів томатів та картоплі, штамів та ізолятів мікроорганізмів, використаних у дослідженні, описано методики їх культивування, наведено склад живильних середовищ, застосованих для дослідження морфогенетичних процесів в культурах ізольованих клітин та тканин картоплі та томатів *in vitro*, представлено методи вирощування на середовищах фітопатогенних бактерій та грибів, методи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин картоплі та томатів, методи ПЛР-аналізу та Вестерн-блот аналізу геному трансгенних ліній рослин, методи визначення бактерицидної та фунгістатичної активності зразків, отриманих з трансгенних рослин картоплі та томату, методи штучного зараження та перевірки стійкості трансгенних ліній рослин до фітопатогенів за використання біотеста в умовах *in vitro*.

У розділі «**Отримання та аналіз трансгенних рослин *S. tuberosum***» представлено результати *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин картоплі геном лактоферину людини, ПЛР-аналізу та Вестерн-блот аналізу геному трансгенних ліній, а також результати досліджень щодо перевірки стійкості трансгенних ліній картоплі до фітопатогенів. Методом ПЛР аналізу підтверджено інтеграцію гена *hLf* в геном ліній всіх досліджуваних сортів

картоплі, визначено частоту та ефективність трансформації цих сортів. Встановлено, що частота трансформації картоплі за результатами селекції для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево становила 24,2, 30,2, 24,5 та 18,5%, відповідно. Показано, що ефективність трансформації картоплі становила 6,8, 3,8, 4 та 6,25% для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, відповідно.

За допомогою Вестерн блоттингу було ідентифіковано білок молекулярної маси близько 80 кДа в трансгенних рослинах картоплі як і в позитивному контролі, що підтверджує експресію лактоферину.

За використання денситометричного аналізу, експресію білка лактоферину було виявлено у всіх досліджуваних трансгенних ліній картоплі, встановлено вміст лактоферину на рівні 0,04-0,05% від тотального розчинного білка (ТРБ).

За результатами біотесту дифузії в агар показано, що зразки, ізольовані із трансгенних рослин картоплі, виявляють антибактеріальний та фунгістатичний вплив на бактерії *S. michiganensis* subsp. *sepedonicus* і *R. solanacearum*, та на гриби *F. sambucinum* та *P. infestans*, що ймовірно є результатом впливу лактоферину, що міститься у зразках трансгенних рослин.

Підтвердженням висловленого автором припущення є результати біотеста в умовах *in vitro*, які показали підвищення стійкості трансгенних ліній картоплі до *P. infestans* - від 1 до 7 балів та до *F. sambucinum* – від 2 до 7 балів за 9-бальною шкалою.

У розділі «Введення в культуру *in vitro* та аналіз регенераційного потенціалу різних експлантів томатів сортів Перлина, Лагідний та Money Maker» наведено результати вибору оптимальних умов для культивування *in vitro* та отримання вищої частоти регенерації пагонів на експлантах томатів сортів Мані Мейкер, Перлина та Лагідний, а також результати *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин томатів та їх подальшого аналізу за використання методів ПЛР та Вестерн блоттингу, та результати перевірки стійкості трансгенних ліній томатів до фітопатогенів. Було встановлено, що

найбільш сприятливим для культивування в умовах *in vitro* томатів сортів Мані Мейкер, Перлина та Лагідний є середовище МСТ, а для отримання високої частоти прямої регенерації – середовище МСТ, доповнене 1 мг/л ІОК та 1 мг/л зеатину.

У розділі «Отримання та аналіз трансгенних рослин *L. esculentum*» представлено результати *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин томатів геном лактоферину людини, ПЛР-аналізу та Вестерн-блот аналізу геному трансгенних ліній, а також результати досліджень щодо перевірки стійкості трансгенних ліній томатів до фітопатогенів.

За допомогою ПЛР-аналізу підтверджено інтеграцію гена *hLf* в геноми рослин томатів сортів Мані Мейкер та Лагідний, визначено частоту та ефективність трансформації. Встановлено, що частота трансформації за результатами селекції для томатів сортів Мані Мейкер та Лагідний становила 8.1 та 2.5%, тоді як ефективність трансформації для сорту Лагідний становила 3.7 % і була дещо вищою, ніж для сорту Мані Мейкер - 2,8 %.

Експресію білка лактоферину людини молекулярної маси близько 80 кДа в трансгенних лініях обох сортів томатів було підтверджено за використання Вестерн блот аналізу.

За використання денситометричного аналізу визначено вміст рекомбінантного лактоферину у фракції тотального розчинного білка (ТРБ), ізолюваного із пагонів трансгенних рослин томатів, який становив 0,02% від ТРБ у томатів сорту Мані Мейкер та 0,04% від ТРБ у сорту Лагідний.

За використання методу дифузії в агар підтверджено антибактеріальну активність зразків, ізолюваних із пагонів трансгенних ліній томатів проти *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* та *R. Solanacearum*. Радіус зон затримки росту для зразків із трансгенних ліній томатів був аналогічного розміру до радіусу зон затримки росту для зразків із комерційного лактоферину, застосованого в концентраціях аналогічних у зразках із трансгенних рослин. За використання методу штучного зараження в умовах *in vitro* було показано

підвищення стійкості трансгенних ліній томатів сортів Мані Мейкер та Лагідний до *P. infestans* – від 1 до 7 балів за 9-бальною шкалою.

Результати біотесту на стійкість відокремлених листків томатів до *P. infestans* в умовах *in vitro* також свідчать про підвищення стійкості трансгенних ліній томатів до фітофторозу, яка становила 43% та 69% для сорту Лагідний, 55% та 75% – для сорту Мані Мейкер, відповідно, порівняно до контролю.

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

Отже, результати дисертаційної роботи вказують на перспективність застосування методів генетичної трансформації геном лактоферину людини економічно важливих культур, зокрема, томатів та картоплі, для підвищення їх стійкості до фітопатогенів.

Зауваження до дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

В цілому, матеріал дисертаційної роботи викладено чітко, логічно, з використанням наукової термінології та доцільно проілюстровано рисунками. Проте слід зазначити деякі уточнюючі запитання та незначні зауваження до представленої роботи:

1) У розділі 2.3.1. «Дослідження впливу різних факторів на регенерацію *L. esculentum* в умовах *in vitro*» відсутня інформація щодо досліджень частоти регенерації пагонів на листових дисках томатів сортів Лагідний та Перлина, тому виникає запитання: чи проводили такі дослідження на зазначених сортах, або ці дослідження були проведені лише на сорту томатів Мані Мейкер?

2) У тому ж розділі 2.3.1. основну увагу приділено підбору компонентів живильних середовищ для підвищення регенерації рослин. З цією метою досліджено вплив 10 різних концентрацій ауксину (ІОК) та цитокінінів (зеатину, та БАП) як складових компонентів живильного середовища МСТ на частоту регенерації пагонів на експлантах томатів. Виникає запитання: чи

досліджували вплив комбінацій фітогормонів, які застосовувались у складі середовищ МСТ7-МСТ10, на частоту регенерації пагонів на експлантах томатів сортів Мані Мейкер та Лагідний, або ці комбінації було використано для аналогічних досліджень, проведених лише на експлантах томатів сорту Перлина?

3) У розділі 2.5.3. «Методика *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів» представлено дані щодо застосованих методів трансформації томатів. Виникає запитання: як можна пояснити вибір у якості експлантів саме сім'ядольних листків, а не гіпокотилів, на яких отримано найбільшу частоту регенерації?

4) У розділі 2.7. дисертаційної роботи застосовано метод ізолювання геномної ДНК з рослин за допомогою цетилтриметил амоній броміду (метод ЦТАБ). Виникає запитання: чим пояснюється вибір саме цього методу, а не наприклад, методу виділення нуклеїнових кислот з використанням 2-метоксіетанола або цетавлона, який широко використовується поряд з іншими методами для отримання високоочищених від полісахаридів препаратів ДНК і РНК не тільки з клітин рослин, але також з клітин тварин і бактерій (Naktinis V.I., Maleeva N.E., San'ko D.F., Mirzabekov A.D. Two simple methods for isolation of DNA from various sources using cetavlon. *Biokhimiia*. 1977. 42(10):1783-90)? Чи можливо отримати із застосуванням обраного в даній роботі методу препарати ДНК, високоочищені від полісахаридів, які як відомо є мажорними компонентами клітинних стінок, або цей метод має якісь переваги?

5) У розділі 2.10. «Біотести на стійкість до фітопатогенів трансгенних ліній» не наведено даних відносно досліджень стійкості трансгенних ліній картоплі до широко розповсюдженого грибного фітопатогену – *Alternaria* sp., адже в дисертаційній роботі зазначено, що цей патоген є не менш небезпечним для цієї економічно важливої культури, ніж *P. infestans*. Виникає запитання: чи проводились такі дослідження?

6) У розділі 2.10.2. зазначено, що визначення стійкості трансгенних ліній томатів та картоплі до фітопатогенів проводились методом штучного

зараження *in vitro*. Виникає 2 запитання, які мають вагоме значення для практичного впровадження результатів дисертаційної роботи:

- а) чи проводилась подальша перевірка стійкості отриманих трансгенних ліній томатів та картоплі до фітопатогенів в умовах закритого ґрунту?
- б) чи проводилась перевірка успадкованості стійкості рослин 2-го покоління, отриманих з насіння трансгенних ліній томатів та картоплі до фітопатогенів в умовах штучного зараження *in vitro*, або в умовах закритого ґрунту?

Проте вказані вище запитання та зауваження не є принциповими і не знижують наукової цінності дисертації та загального позитивного сприйняття отриманих дисертанткою результатів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до здобувача наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертаційна робота Бузіашвілі Анастасії Юріївни «Отримання генетично модифікованих ліній рослин родини Solanaceae з геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів» виконана на сучасному науковому рівні, характеризується новизною і актуальністю обраної теми, достовірністю і практичним значенням одержаних експериментальних даних, лаконічністю висновків. Результати досліджень, основні наукові положення та зроблені дисертанткою висновки обґрунтовані достатнім об'ємом молекулярно-генетичних та біотехнологічних досліджень. Застосовані методи наукових досліджень відповідають меті та поставленим завданням. Зроблені автором висновки, що логічно випливають з одержаного фактичного матеріалу, відображають головні досягнення проведеної роботи та перспективи використання отриманих результатів.

Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, їх фундаментальністю і практичним спрямуванням, оформленням фактичним та ілюстративним матеріалом дисертаційна робота

Бузіашвілі Анастасії Юріївни «Отримання генетично модифікованих ліній рослин родини Solanaceae з геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів» є завершеною науковою роботою, що цілком відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20. – біотехнологія.

доктор біол. наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник відділу
хімії біоактивних азотовмісних гетероциклічних основ
Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В.П. Кухаря НАН України
лауреат Державної премії України
в галузі науки і техніки 2018 р.

Циганкова В.А.

Підпис Циганкової В.А.
ЗАСВІДЧУЮ
Учений секретар [підпис]
ІБОНХ ім. В.П. Кухаря НАН України
" 25 " 03 20 21 р.

