

ВІДГУК

офіційного опонента Коломієць Юлії Василівни

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. Дисертаційна робота Бузіашвілі А.Ю. присвячена отриманню генетично модифікованих рослин родини Solanaceae, а саме, томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill., або *Solanum lycopersicum* L.) та картоплі (*Solanum tuberosum* L.) з геном лактоферину людини, їх молекулярно-генетичному та біохімічному аналізу та дослідженню стійкості трансгенних рослин до небезпечних фітопатогенів, зокрема, до бактерій *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (що викликає бактеріальний рак томатів), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (що є збудником кільцевої гнилі картоплі), *Ralstonia solanacearum* (що спричиняє бактеріальне в'янення томатів та буру гниль картоплі) та грибів *Phytophthora infestans* (збудник фітофторозу томатів та картоплі) і *Fusarium sambucinum* (збудник сухої гнилі бульб картоплі).

В Україні, протягом останніх 10 років спостерігають тенденції до загальносвітових змін клімату – підвищення середньорічних температур та вологості у зимовий період, що сприяє накопиченню фітопатогенів та збільшенню їх вірулентності. Крім того, за результатами нещодавніх досліджень більшість сортів томатів, що вирощують в Україні, є нестійкими до бактеріальних та грибних хвороб, а насінневі бульби картоплі в результаті багаторічних репродукцій контаміновані бактеріальними, грибними та вірусними хворобами. Отже, створення нових сортів томатів та картоплі, стійких до бактеріальних та грибних хвороб, безперечно, є актуальною темою дисертаційної роботи.

Вирішення даного завдання дисертантка пропонує шляхом застосування методу генетичної інженерії, як альтернативи до селекції на стійкість та використання хімікатів. Такий підхід є більш сприятливим для навколишнього середовища, ніж обробка рослин пестицидами, та більш швидкий, ніж селекція на стійкість сортів до фітопатогенів.

Запропонований підхід щодо підвищення стійкості рослин томатів та картоплі до фітопатогенів оснований на використанні гена лактоферину людини (*hLf*), що кодує білок із родини трансферинів, який міститься у молоці, слині, сльозах, та ін. секреторних рідинах. Окрім функції зв'язування та транспорту йонів заліза, лактоферин є також компонентом неспецифічного природного імунітету людини. Отже, трансгенні рослини томатів на картоплі із геном лактоферину людини, отримані в даному дослідженні, є не лише більш стійкими до фітопатогенів, але й потенційно безпечними для споживача, про що свідчать також результати попередніх досліджень, процитовані у даній роботі.

Дисертаційна робота виконана у відділі клітинної біології і біотехнології ДУ «Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України» у рамках 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.).

Достовірність і обґрунтованість результатів і наукових положень. Результати експериментальної роботи, отримані дисертанткою, є достовірними та взаємодоповнюючими, а висновки – обґрунтованими та послідовними, що логічно пов'язані із метою та завданням роботи. Для виконання завдань даної роботи було обрано оптимальні методики, обґрунтовані аналізом літературних джерел. Зокрема, за використання методів ПЛР-аналізу та біохімічного аналізу (Вестерн блоттингу) було

підтверджено трансгенну природу рослин та експресію рекомбінантного лактоферину, а результати подальших біотестів показали підвищення стійкості трансгенних ліній до фітопатогенних грибів та бактерій у порівнянні з контрольними. Результати, отримані дисертанткою, статистично достовірні та докладно обговорені у 3 та 4 розділах дисертації.

Наукова новизна результатів дослідження. У представленій роботі отримано результати, які мають наукову новизну. Зокрема, дисертанткою було вперше:

- розроблено методику культивування *in vitro* цінних українських сортів томатів (Перлина та Лагідний) та досліджено їх морфогенетичний потенціал,
- здійснено трансформацію геном *hLf* рослини томатів сортів Money Maker та Лагідний та картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево,
- за використання ПЛР-аналізу підтверджено інтеграцію гена *hLf* в геном трансгенних ліній томатів та картоплі,
- за допомогою Вестерн блоттингу встановлено експресію лактоферину та визначено вміст цього білка в пагонах трансгенних рослин,
- із застосуванням біотестів *in vitro* показано антибактеріальну активність зразків, отриманих із трансгенних рослин томатів та картоплі, проти *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* та *R. solanacearum*,
- також, встановлено фунгістатичну активність проти *Phytophthora infestans* зразків із трансгенних рослин картоплі та томатів, та зразків із трансгенних ліній картоплі - проти *Fusarium sambucinum*,
- в умовах зараження *in vitro* було встановлено підвищення стійкості трансгенних рослин томатів та картоплі до *P. infestans*, та трансгенних рослин картоплі – до *F. sambucinum*.

Дисертаційна робота оформлена відповідно до вимог МОН України і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень,

результатів досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаних джерел, який містить 291 посилання, додатку. Дисертаційна робота викладена на 170 сторінках друкованого тексту та містить 25 рисунків, 2 таблиці. Авторкою опрацьовано великий об'єм літературних джерел, опублікованих протягом останніх 5-10 років, більшість з яких (242) є англомовними, що дозволило у повному обсязі розкрити сучасний стан наукових розробок у галузі біотехнології томатів та картоплі та підвищення їх стійкості до фітопатогенів за використання генетичної інженерії. Мова дисертації – логічна, зрозуміла та легка для сприйняття.

Практичне значення даної роботи полягає у тому, що трансгенні лінії томатів та картоплі, що експресують лактоферин людини, є стійкими до небезпечних фітопатогенів. Зокрема, трансгенні лінії томатів сортів Лагідний та Money Maker є стійкими до фітопатогенних бактерій *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *R. solanacearum*, та гриба *P. infestans*, а трансгенні лінії картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево є резистентними до бактерій *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *R. solanacearum*, а також до грибів *P. infestans* та *F. sambucinum*. Отже, ці лінії можуть бути використані у подальшій селекційній роботі та фундаментальних дослідженнях.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових виданнях. Матеріали роботи пройшли апробацію на 10 міжнародних наукових конференціях, симпозіумах та з'їздах. Отримані результати та висновки повністю висвітлені в наукових працях, серед яких 2 статті у міжнародних наукових журналах (які мають рейтинг Q2 та Q4), 3 статті у вітчизняних фахових виданнях, та 10 тез у матеріалах наукових конференцій, симпозіумів та з'їздів.

Характеристика структури дисертації.

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми роботи, сформульовано мету та завдання, визначено предмет та об'єкт дослідження, охарактеризовано новизну та практичне значення роботи, наведено перелік вітчизняних та міжнародних наукових конференцій, симпозіумів та з'їздів, на яких

апробовано результати роботи..

У першому розділі «Огляд літератури» повно та широко охарактеризовано особливості культивування *in vitro* та основні стратегії щодо покращення цінних властивостей томатів та картоплі за використання генетичної інженерії, описано найбільш відомі генетично модифіковані сорти томатів та картоплі. Авторкою окреслено сучасний фітосанітарний стан на території України, наведено найбільш розповсюджені хвороби томатів та картоплі, що завдають найбільшої шкоди даним культурам на території України. Також, детально охарактеризовано особливості збудників найбільш небезпечних хвороб томатів та картоплі (*Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium sambucinum*) та різноманітні підходи до боротьби із ними. Крім того, авторкою окреслено різні стратегії щодо покращення стійкості томатів та картоплі до фітопатогенів, у тому числі, і за використання методів генетичної інженерії, і, зокрема, за використання геа лактоферину людини для цієї мети. Далі дисертанткою охарактеризовано структуру та біологічну активність лактоферину людини та проаналізовано результати попередніх досліджень із генетичної трансформації рослин геном лактоферину людини. На основі даного аналізу сформульовано висновок щодо новизни даної роботи у порівнянні із попередніми дослідженнями.

У другому розділі «Матеріали і методи» охарактеризовано сорти томатів та картоплі, використані в даній роботі, а саме, сорти томатів Money Maker, Лагідний та Перлина, та сорти картоплі (Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево), та обґрунтовано їх вибір. Також, охарактеризовано штами фітопатогенних бактерій та грибів (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* Ac-1996, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1995, *R. solanacearum* ATCC 11696, *F. sambucinum* F 52211) та ізолят *P. infestans*, використані в дослідженні. Описано методики культивування рослинних об'єктів, бактерій та грибів. Окреслено методики дослідження морфогенетичного потенціалу сортів томатів, використаних у роботі (Money Maker,

Лагідний, Перлина), охарактеризовано штам *A. tumefaciens* та плазмідну конструкцію pBin35Lf, які використовували для трансформації рослин томатів та картоплі, описано методики *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів та картоплі, селекції трансформованих ліній, їх молекулярно-генетичного та біохімічного аналізу (ПЛР-аналізу та Вестерн блоттинг гібридизації), а також, описано методики біотестів *in vitro*, а саме, метод «дифузії в агар» і метод зараження *in vitro* рослин та тканин. Методики, що було застосовано в даній роботі, основані на результатах аналізу літературних джерел. Ці методики було адаптовано дисертанткою до умов досліджень, вміло та доречно застосовані для реалізації мети та завдань дисертаційної роботи.

У третьому розділі «Отримання та аналіз трансгенних рослин *S. tuberosum* з геном *hLf*» описано послідовні етапи трансформації, селекції трансгенних ліній картоплі, молекулярно-генетичного аналізу, в результаті якого було підтверджено інтеграцію гена *hLf* в геном рослин. Було визначено частоту трансформації досліджуваних сортів картоплі на рівні 18,5-30,2% та ефективність трансформації на рівні 3,8-6,8%, і ці значення відповідали результатам інших досліджень із генетичної трансформації картоплі. Також, було проведено біохімічний аналіз за використання методу Вестерн блоттинг гібридизації для підтвердження експресії лактоферину в трансгенних лініях. В результаті даного аналізу встановлено, що вміст лактоферину був у межах приблизно 0,04-0,05% від тотального розчинного білка, і такий вміст рекомбінантного лактоферину був аналогічний до рівня, встановленого іншими авторами в роботі по трансформації геном *hLf* деяких видів рослин. Далі у розділі наведено результати біотестів «дифузії в агар», в яких встановлено антибактеріальну та фунгістатичну активність зразків із трансгенних ліній картоплі на *R. solanacearum*, *C. michiganensis*, *P. infestans* та *F. sambucinum*. На фотографіях, які ілюструють результати біотестів, помітні зони затримки росту зазначених фітопатогенів в результаті дії зразків, отриманих із трансгенних рослин. Далі наведено результати зараження *in vitro*

трансгенних та нетрансформованих рослин картоплі конідіями *P. infestans* та *F. sambucinum*. В результаті даного біотесту через 8 днів після зараження було показано підвищення стійкості трансгенних ліній картоплі у порівнянні із контрольними до *P. infestans* та до *F. sambucinum*.

У четвертому розділі «Отримання та аналіз трансгенних рослин *L. esculentum* з геном *hLf*» спочатку наведено результати дослідження морфогенетичного потенціалу українських сортів томатів (Лагідний та Перлина) та модельного сорту Money Maker. Оскільки зазначені українські сорти було вперше введено в культуру *in vitro*, перед проведенням їх трансформації було необхідно визначити умови, за яких ефективність регенерації пагонів на експлантах томатів даних сортів є найвищою. Такими умовами була комбінація фітогормонів ІОК у концентрації 1 мг/л та зеатину у такій же концентрації 1 мг/л у складі живильного середовища МСТ. Однак, у результаті проведених досліджень було виявлено низький морфогенетичний потенціал томату сорту Перлина, і тому його не використовували у подальших дослідженнях з агробактеріальної трансформації. Далі, як і для картоплі, у розділі наведено результати трансформації, селекції та молекулярно-генетичного аналізу трансгенних ліній томатів. Частота трансформації ліній томатів становила 2,5-8,1%, ефективність трансформації – 2,8-3,7%, і за даними літературних джерел такі значення аналогічні до результатів інших досліджень з генетичної трансформації томатів. В результаті подальшого Вестерн блот аналізу було підтверджено експресію лактоферину у трансгенних лініях та виявлено, що вміст лактоферину був на рівні 0,02% та 0,04% від тотального розчинного білка. У результаті подальшого тесту «дифузії в агар» було показано антибактеріальний вплив зразків із ліній томатів на бактерії *S. michiganensis* та *R. solanacearum*. При цьому, радіус зон затримки росту бактерій в результаті впливу зразків із трансгенних ліній був такий же, як і радіус зон затримки росту для зразків комерційного лактоферину у концентраціях, аналогічних до обрахованої концентрації лактоферину у зразках соку, ізольованих із пагонів трансгенних

рослин. Також, було показано фунгістатичний вплив зразків із трансгенних ліній томатів на культуру *P. infestans*, який проявлявся у затримці росту міцелію та утворенню конідій. У результаті зараження *in vitro* трансгенних рослин та відокремлених листків томатів сортів Money Maker та Лагідний конідіями *P. infestans* було також показано підвищення стійкості трансгенних рослин у порівнянні із контрольними. Оскільки за даними літератури результати біотестів *in vitro* відповідають результатам польових досліджень, можна припустити, що і в польових умовах трансгенні рослини картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево та томатів сортів Money Maker та Лагідний, що містять ген *hLf*, будуть більш стійкими до зазначених фітопатогенів, ніж нетрансгенні.

Отже, дисертанткою було встановлено, що трансформація геном *hLf* томатів сортів Money Maker та Лагідний та картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево підвищує їх стійкість до бактеріальних та грибних фітопатогенів. Отримані трансгенні лінії можуть бути використані у подальшій селекційній роботі або наукових дослідженнях.

Висновки із дисертаційної роботи відповідають меті та поставленим завданням і повністю обґрунтовані експериментальними даними.

Однак, не зважаючи на загальне позитивне враження від дисертації, виникли наступні **зауваження та дискусійні питання**:

1) Чим можна пояснити значну різницю радіусів зон затримки росту бактерій при нанесенні зразків трансгенних рослин томатів та картоплі сорту Зарево, якщо вміст лактоферину за наведеними оцінками був приблизно на одному рівні - для томатів 0.02 та 0.04% від ТРБ, для картоплі – 0.05% ТРБ?

2) Чому не проводили зараження листків картоплі конідіями *P. infestans*, заражали лише відокремлені листки томатів?

3) Чому не проводили аналіз стійкості до бактеріальних патогенів за штучного ураження рослин томатів?

4) Як саме ізолювали культуру *P. infestans*? Чи не містив ізолят домішок інших видів грибів або бактерій?

Зазначені зауваження не знижують загальної наукової цінності роботи.

Загальний висновок. У результаті аналізу актуальності, практичного значення та новизни результатів, висвітлених у роботі можна зазначити, що дисертаційна робота А. Ю. Бузіашвілі на тему: «Отримання рослин родини Solanaceae з геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів» є завершеним науковим дослідженням, яке виконано на сучасному науковому та методичному рівнях. Дисертаційна робота відповідає усім вимогам МОН України, що висуваються до дисертаційних робіт, та паспорту спеціальності «Біотехнологія», а здобувачка Бузіашвілі А. Ю. заслуговує на присудження їй наукового ступеню кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

**Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології
Національного університету біоресурсів
і природокористування України,
доктор сільськогосподарських наук, доцент**

Ю. В. Коломієць

