

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Деркач Катерини Вікторівни "Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер", представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Створення нових гібридів кукурудзи, що поєднують високу продуктивність, технологічні якості, а також стійкість до абіотичних та біотичних стресових чинників докільля ґрунтується на поглибленні фундаментальних знань та використанні новітніх практичних розробок для покращення селекційних матеріалів цієї культури. Останнім часом для вирішення даного питання поряд із традиційними методами селекції застосовуються і біотехнологічні підходи, які дозволяють отримати в більш коротші терміни новий вихідний матеріал з бажаними властивостями.

Широке використання біотехнологічних підходів створення нових генотипів кукурудзи обмежується відсутністю добре відтворюваних методик, їх трудомісткістю, а також недостатньою вивченістю морфогенетичного потенціалу її тканин та органів. Біотехнологічні особливості основних типів зародкової плазми кукурудзи, що є найбільш вживаними в селекційних програмах світу і зокрема, України, на сьогоднішній день є мало дослідженими, практично відсутня їх комплексна біотехнологічна характеристика. Тому для даної культури є важливим диференціальна характеристика біотехнологічного потенціалу різних генотипів залежно від генетичної спорідненості, в тому числі за молекулярно-генетичними маркерами, ступенем тотипотентності і здатності до регенерації в культурі *in vitro* та за компетентністю до генетичної трансформації.

Слід зазначити, що більшість біотехнологічних досліджень ведуться на модельних генотипах кукурудзи, тоді як сучасні селекційно перспективні генотипи через слабку тотипотентність комерційних зародкових плазм лишаються поза увагою дослідників, оскільки детальне вивчення морфогенетичного потенціалу сучасних зародкових плазм кукурудзи досі не проводилося. Також не визначена компетентність до біолістичної трансформації окремих типів зародкової плазми у кукурудзи, а також ліній і гібридів, створених в Україні. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Деркач К.В., присвячена біотехнологічній характеристиці генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за молекулярно-генетичними маркерами, клітинно-інженерним та генетично-інженерним потенціалом є безумовно актуальною і

практично значимою, оскільки такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал для внутрішньовидової класифікації та систематизації генофонду культурних рослин; для поглиблення наших знань про процеси морфогенезу *in vitro*; подальшого розвитку та вдосконалення методів розмноження *in vitro*, як одного із фундаментальних напрямів біотехнології рослин, а також для розробки практичних аспектів застосування біотехнологічних підходів у селекції сільськогосподарських культур.

У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, трьох розділів експериментальних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який включає 395 найменувань, та додатків. Основна частина дисертаційної роботи вміщує 35 таблиць і 20 рисунків.

У розділі 1 «Огляд літератури» представлено аналіз результатів біотехнологічних досліджень кукурудзи та їх практичного використання в селекції, розглянуто основні закономірності впливу генотипу на морфогенетичні процеси *in vitro*. Проаналізовано сучасний стан класифікації генофонду кукурудзи, приділено увагу походженню генотипів зародкової плазми Ланкастер. Узагальнено наявну інформацію про використання молекулярно-генетичних маркерів для дослідження поліморфізму геному кукурудзи, тотипотентність та здатність до регенерації рослин *in vitro*, результати і перспективи генетично-інженерних досліджень даної культури. При цьому відзначено недостатнє вивчення низки питань індукції морфогенезу і відсутність розробок з багатьох клітинних технологій створення генетично різноманітного рослинного матеріалу, що зумовило необхідність постановки і проведення досліджень у цьому напрямку. Викладений в літературному огляді матеріал свідчить про володіння дисертантом інформацією про сучасний стан проблеми, що дозволило їй вибрати адекватні методичні підходи для вирішення основної мети та завдань, які поставлені в роботі.

У розділі 2 «Матеріали та методи досліджень» детально описано матеріал досліджень - лінії та гібриди кукурудзи; умови проведення експериментів: проведення молекулярно-генетичного аналізу генотипів плазми Ланкастер за алельним станом маркерів одонуклеотидного поліморфізму ДНК (SNP-маркерів); отримання та культивування клітинних культур, живильні середовища, методики укорінення та адаптації рослин до ґрунтових умов, а

також умови проведення біолістичної трансформації калюсів.

У розділі 3 «Молекулярно-генетична характеристика ліній кукурудзи плазми Ланкастер за SNP-маркерами» автором наведено молекулярно-генетичні особливості ліній кукурудзи, проаналізованих на основі SNP-генотипування, серед яких 29 сучасних, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер, а також 60 ліній інших типів зародкової плазми. SNP-генотипування проведено за панеллю маркерів BDI-III. Показано, що результати принципового компонентного аналізу, аналізу генетичної структури ліній за програмою Structure, якісного кластерного аналізу за методом повного зв'язку та дисперсійного аналізу співпадають і підтверджують наявність серед проаналізованого масиву окремої групи ліній, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер. Встановлено специфічний набір алелів плазми Ланкастер, визначений за частотами мажорних алелів десяти *top*-SNP-маркерів порівняно з групою ліній інших типів зародкової плазми.

Автором встановлено, що середнє значення розміру генетичних SNP-дистанцій між лініями Ланкастер становить $0,3377 \pm 0,0099$ і свідчить про значне генетичне різноманіття усередині даної плазми за алельним станом маркерів одонуклеотидного поліморфізму. Усередині плазми Ланкастер за допомогою кластерного аналізу підтверджено наявність двох підкластерів, до одного з яких входить типовий представник підплазми *Mo17* – лінія *Mo17*, а до іншого – типовий представник підплазми *Oh43* – лінія *Oh43*.

За результатами SNP-генотипування встановлено, що лінії кукурудзи ДК633, ДК267, ДК212, ДК6080, ДК633266, ДК298, ДК3070, ДК236 та ДК633325, обрані як представники плазми Ланкастер для подальших біотехнологічних досліджень в культурі *in vitro*, належать до обох підплазм даної плазми і можуть розглядатися як базові для клітинно- і генетично-інженерної характеристики даного типу зародкової плазми.

У розділі 4 «Клітинно-інженерна характеристика зародкової плазми Ланкастер у кукурудзи» представлено результати досліджень морфогенного потенціалу ліній зародкової плазми Ланкастер та простих гібридів, отриманих за їх участі. Біотехнологічні дослідження показали, що генотипи даної плазми мають специфічні якісні та кількісні характеристики калюсогенезу та регенераційного потенціалу, які відрізняють їх від представників інших плазм кукурудзи. Встановлено, що всередині плазми Ланкастер спостерігається значне варіювання за здатністю до утворення калюсу. Виявлено, що середні рівні загальної частоти калюсогенезу, частоти утворення морфогенних

калюсів, зокрема I та II типів, пропорційно збільшувалися в досліджених підплазмах і групах у напрямку *Mo17*→*Mo17mix*→*Oh43*→*Mo17/Oh43* разом з насиченням неспорідненим генетичним матеріалом. Показано, що лінії плазми Ланкастер, стабільні за роками стосовно утворення калюсів II типу, є нестабільними за утворенням калюсів I типу.

Експериментально доведено, що лінії A188, Chi31 та PLS61 не тільки володіють високою калюсогенною та регенераційною здатністю, але й виступають як донори даних ознак в гібридах з лініями кукурудзи плазми Ланкастер. Зокрема, вони значно підвищують потенціал утворення калюсної тканини I типу у гібридів F₁. Відзначено, що модифікація складу живильних середовищ для індукції калюсу і регенерації призводить до варіювання залежно від генотипу інтенсивності утворення калюсів і рослин-регенерантів. Виявлено, що сахароза в середовищі для індукції калюсу при підвищенні концентрації з 30 до 60 г/л для ліній плазми Ланкастер і ліній-стандартів в цілому стимулює калюсогенез I типу та інгібує калюсогенез II типу. Цефотаксим у концентраціях 150 і 300 мг/л в середовищі для індукції калюсу пригнічує утворення калюсної тканини I типу та стимулює утворення калюсної тканини II типу.

Виявлено, що кількість рослин-регенерантів, отриманих на 100 калюсів, у ліній плазми Ланкастер для 30-добової калюсної тканини I типу знаходилася в межах 0-51,3 шт., а у гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами – 8,3-138,5 шт. Для 60-добової калюсної тканини цей показник був у межах 0-8,0 шт., а у їхніх гібридів з лініями-стандартами – 8,9-428,6 шт. Кількість рослин-регенерантів на 100 калюсів, які вдалося отримати з 90-добової калюсної тканини II типу, у ліній Ланкастер була низькою 0-12,1 шт.

Встановлено, що приживаність та адаптація рослин-регенерантів покоління R₀ після перенесення з умов *in vitro* у ґрунт суттєво покращуються за зволоження ґрунту водним розчином біогумату – продуктом переробки соняшникового лушпиння культурою черв'яків *Eisenia foetida*. Запроваджений комплекс заходів дорощування рослин-регенерантів дозволив підвищити загальну виживаність рослин з 20,7% до 58,5%.

У розділі 5 «Генетично-інженерна характеристика зародкової плазми Ланкастер у кукурудзи» представлено результати дослідів з генетичної трансформації кукурудзи за використання методу біобалістики. Проведено біолістичну трансформацію калюсів різних генотипів зародкової плазми Ланкастер векторною конструкцією pANC25, яка містить репортерний ген *uidA* та цільовий – *bar*, що обумовлює стійкість до фосфіотрицину – діючої

5
речовини гербіциду «Баста». Охарактеризовано особливості та ефективність генетичної трансформації, отримано трансгенні калюси, рослини-регенеранти покоління T_0 і потомство рослин-трансформантів поколінь T_1 - T_6 від самозапилення.

Показано, що у ліній зародкової плазми Ланкастер ДК633266 і ДК267 частота транзійентної експресії гена *uidA* склала відповідно 40% і 20% з рівнем експресії в 1 бал з п'яти можливих. У гібрида з лінією Ланкастер PLS61×ДК633266 і його зворотної комбінації рівень транзійентної експресії гена *uidA* в 4-5 балів мали відповідно 78,6 і 66,6% калюсів. Відмічено, що фосфінотрицин як селективний агент у середовищах для калюсоутворення та регенерації має пролонговану дію, а його вплив суттєво блокує життєдатність калюсної тканини кукурудзи в період регенерації рослин.

Лінії плазми Ланкастер у гібридах з лінією PLS61 показали високу частоту трансформації. Так, для PLS61×ДК633266 та його зворотної комбінації частота *bar*-позитивних калюсів досягала 100%. Для ДК267×PLS61 частота фосфінотрицинстійких калюсів склала $87,2 \pm 3,6\%$, а частота фосфінотрицинстійких рослин-регенерантів T_0 – $52,5 \pm 5,4$ рослин/100 калусів.

Успадкування гена *bar* наступними поколіннями T_1 - T_2 підтверджено молекулярно-генетичним аналізом. Ген *bar* в поколінні T_2 було виявлено за ПЛР як після селекції на гербіцидному фоні, так і в рослинах, які вирощувалися без впливу селективного фактора. В пізніх поколіннях від самозапилення зафіксовано зростання виживаності рослин після обробки гербіцидом до 100%.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано у лабораторії біотехнології Державної установи Інститут зернових культур Національної академії аграрних наук України відповідно до тематичного плану за завданням 23.01.03.02Ф «Розробити новітні біотехнології створення генотипів кукурудзи, адаптованих до зональних агрокліматичних умов, із заданими споживчими властивостями» Програми наукових досліджень 23 «Сільськогосподарська біотехнологія 2011-2015 рр.», № держреєстрації 0111U004712 та за завданням 23.00.01.06Ф «Розробити фундаментальні основи молекулярно-генетичних і клітинних біотехнологій для селекційного поліпшення кукурудзи» Програми наукових досліджень 23 «Біотехнологія і генетика в рослинництві 2016-2020 рр.», № держреєстрації 0116U001246.

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором вперше

проведено порівняння різних типів зародкової плазми кукурудзи за маркерами однонуклеотидного поліморфізму ДНК та ідентифіковано набір алелів SNP-маркерів, характерний для плазми Ланкастер. Вперше досліджено здатність до калюсогенезу та регенерації у 10 ліній кукурудзи плазми Ланкастер та 53 гібридів F_1 за їхньою участю. На прикладі плазми Ланкастер показано можливість підвищення тотипотентності слабкочутливих комерційних плазм за використання їх як компонентів гібридів з модельними лініями інших плазм з високим калюсогенним та регенераційним потенціалом. Оптимізовано комплекс умов культивування *in vitro* генотипів кукурудзи, розроблено біотехнологічні схеми індукції калюсогенезу, субкультивування калюсної тканини та регенерації рослин з урахуванням вимог сучасних ліній плазми Ланкастер.

Вперше в Україні проведено генетичну трансформацію вітчизняних генотипів кукурудзи методом біолістики з використанням гетерологічних генів *uidA* та *bar* з отриманням п'яти поколінь рослин-трансформантів від самозапилення. Вперше в Україні на прикладі зародкової плазми Ланкастер отримано трансгенні лінії кукурудзи, стійкі до гербіциду «Баста». Розроблено ефективну генно-інженерну стратегію для комерційних плазм на базі генетичної трансформації гібридів F_1 між перспективними у селекційному відношенні лініями певної плазми та високототипотентними модельними лініями з наступними відборами на селективному фоні та інбридингом.

На прикладі плазми Ланкастер вперше складено комплексну біотехнологічну характеристику типу зародкової плазми – внутрішньовидової категорії культурних рослин, що об'єднує філогенетично споріднені генотипи.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що автором складені SNP-паспорти ліній кукурудзи плазми Ланкастер та інших плазм, що має важливе значення для ідентифікації ліній та у захисті авторських прав. Методичні принципи маркування приналежності ліній кукурудзи до плазми Ланкастер за зміною співвідношення частот алелів SNP-маркерів рекомендовано використовувати у розподілі селекційного генофонду кукурудзи по типах зародкової плазми. Встановлена за аналізом однонуклеотидного поліморфізму генетична структура ліній кукурудзи, результати їхньої кластеризації та розраховані попарні генетичні SNP-дистанції представляють інтерес в селекційному процесі на етапі створення вихідних популяцій для інбридингу, а також для розробки гетерозисних моделей і прогнозування рівня гетерозису при визначення батьківських компонентів гібридів F_1 .

Ідентифіковано лінії кукурудзи плазми Ланкастер, стабільні за здатністю до калюсогенезу та регенерації незалежно від варіювання умов оточуючого середовища. Виділено генотипи кукурудзи, які можуть слугувати донорами високої здатності для індукції калюсогенезу та регенерації у дослідженнях з клітинної селекції, генно-інженерних технологіях. Запропоновано до використання в біотехнологічному та селекційному процесі гібриди за участю ліній даної плазми з підвищеною здатністю до утворення калюсів різних типів та регенерації рослин. Рослини-регенеранти передано для використання в селекції як вихідний матеріал.

Отримано вісім нових трансгенних ліній кукурудзи на основі вітчизняних генотипів плазми Ланкастер, стійких до діючої речовини гербіциду «Баста» - фосфінотрицину. Дані лінії рекомендовано використовувати в селекційному процесі як батьківські форми гібридів, стійких до гербіцидів на основі фосфінотрицину, а також як донори гена *bar* для поширення серед ліній плазми Ланкастер та інших плазм шляхом схрещувань. За результатами SNP-аналізу створено в співавторстві і зареєстровано в Державному реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні, гібрид кукурудзи Корунд.

Теоретичне значення результатів досліджень. Дослідження молекулярно-генетичних особливостей ліній кукурудзи, проаналізованих на основі SNP-генотипування вносить вклад у внутрішньовидову класифікацію та систематизацію генофонду культурних рослин; вивчення особливостей процесів калюсогенезу та регенерації рослин кукурудзи поглиблюють та розширюють уявлення: про морфогенез рослин в культурі *in vitro*; екзогенні та ендогенні чинники, які лімітують формування мікроклонів і пошуки шляхів підвищення частоти індукції регенерації; мінливість та нестабільність геному при культивуванні; генетичні та фізіологічні основи детермінованості процесів морфогенезу в умовах *in vitro*. можливості генетичної інженерії рослин.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант опрацював значний масив даних літератури в галузі використання молекулярно-генетичних маркерів, розмноження рослин *in vitro*, їх закономірності та особливості, принципів та методів генетичної інженерії рослин. Проаналізовано ефективність дії трофічних, гормональних і фізичних факторів культивування на проходження окремих етапів вирощування рослин в умовах *in vitro*. Понад 80 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати великий обсяг експериментального матеріалу, який чітко та послідовно викладений у розділах власних результатів. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме молекулярно-генетичні методи, метод культури клітин, тканин та органів *in vitro*, методи генетичної інженерії, метод польових досліджень, методи статистичного аналізу даних.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу великого фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням методів досліджень. Тому, вважаю, що 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. Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на міжнародних наукових форумах. Зокрема, за матеріалами роботи опубліковано 43 наукові праці, з яких 17 – наукові статті, зокрема 7 статей у фахових виданнях України у галузі біологічних наук (в т.ч. 2 – у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних), 3 статті – в закордонних виданнях, 20 матеріалів та тез доповідей наукових конференцій, 2 патенти на корисну модель, 1 авторське свідоцтво на сорт рослин, 3 методичні видання. Автореферат адекватно відображує зміст дисертації.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.

Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Проте слід зазначити деякі слабкі місця представленої роботи:

1. Текст дисертації містить певну кількість орфографічних та стилістичних помилок, зокрема «калус» (с.5), замість калюс; «генотип експланта» (с.5, 54) замість генотип рослини; «генотип калюсної лінії» (с.170), хоча калюс - це неорганізовано зростаюча маса клітин різного рівня плідності, які можуть мати різний генотип; «агробактеріальна трансформація» замість *Agrobacterium* – опосередкована трансформація (с.160); «експресія білка» (с.63), хоча тільки гени мають експресію; «встроювання» (с.63) замість вбудовування; «публічна лінія» (с.91); «утворення рослин у вигляді пагонів» (с.147); «речовини провокували утворення» (с.161); «геном ліній та гібридів» (с.167), оскільки геном є у

- конкретного виду, зокрема і кукурудзи, а у ліній і гібридів – є генотип; «фосліни, представлені на доріжках» (с.188), хоча мова йде про ДНК і т.і.
2. Не ясно чому автор метод трансформації *in planta* виділяє в окремий тип генетичної трансформації (с.61), хоча це один із способів *Agrobacterium* – опосередкованої трансформації.
 3. Автор часто використовує термін «морфогенний калюсогенез», хоча калюсогенез – це процес і він не може бути морфогенним або неморфогенним. Морфогенним може бути утворений калюс.
 4. Не зрозуміло, який це незрілий зародок розміром 11 мм (с.53) Це вже зріле насіння.
 5. Назва таблиць 4.7 та 4.8 «Характеристика процесу індукції регенерації» не зовсім коректна, оскільки тут наведено лише частоту отриманих рослин-регенерантів, а не сам процес. Назва табл. 4.10 «Регенерація тривало культивованої калюсної тканини» теж некоректна, оскільки тут також наведено лише частоту отриманих рослин-регенерантів. Це ж відноситься і до назви табл. 5.2 «Калусогенез у кукурудзи за дії біолістичної трансформації», оскільки не дається характеристика процесу, а лише наводиться частота утворення калюсу.
 6. Не зрозуміло навіщо до розділу 4 давати аж 23 проміжних висновки, які в низці випадків повторюють один одного.
 7. Не зрозуміло яким чином визначали стійкість калюсів до фосфінотрицину. Чи можна вважати рослину, регенеровану із стійкого калюсу, теж стійкою до фосфінотрицину?
 8. На підставі чого автор вважає, що відбулося вбудовування лише 1 копії гена та моногібридне успадкування не провівши генетичного аналізу. Особливістю та основним недоліком біобалістичної трансформації якраз вважається одночасне вбудовування 5-8 копій трансгена.
 9. Не зовсім коректно робити висновок про високу частоту трансформації, проаналізувавши лише малу вибірку (від 1 до 19) рослин одного генотипу.
- Проте вказані зауваження не носять принципового характеру і не знижують наукової цінності дисертації.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів біотехнології. Результати роботи Деркач К.В. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках інститутів, що займаються

біотехнологіями рослин, проблемами збереження та відтворення генофонду цінних сільськогосподарських культур, а також в курсах лекцій з клітинної біології та фізіології рослин Київського національного університету ім. Т. Шевченка, Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Вважаю, що дисертаційна робота Деркач Катерини Вікторівни "Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер" за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів відповідає вимогам п.11 «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.

Офіційний опонент,
пров. н. сп. відділу генетичного
поліпшення рослин
Інституту фізіології рослин і
генетики НАН України,
доктор біол. наук

Дуґ

О.В.Дубровна

