

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Деркач Катерини Вікторівни

«Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер», що подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Дисертаційна робота «Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми ланкастер» була виконана у Державній установі Інститут зернових культур НААН України.

Тема дисертаційної роботи є актуальною, оскільки стосується вивчення біотехнологічного потенціалу кукурудзи, цінної зернової культури. У роботі здійснена комплексна біотехнологічна характеристика філогенетично споріднених груп генотипів культурних рослин, зокрема зародкової плазми Ланкастер кукурудзи, за молекулярно-генетичними маркерами, клітинно- і генетично-інженерним потенціалом. Автором було проведено генотипування ліній плазми Ланкастер та ліній інших типів зародкової плазми кукурудзи за маркерами одонуклеотидного поліморфізму ДНК; зроблено порівняльний аналіз результатів SNP-генотипування представників різних типів зародкової плазми кукурудзи та ідентифіковано алельні варіанти SNP-маркерів, специфічні для ліній плазми Ланкастер; здійснено оцінку генетичного різноманіття ліній кукурудзи усередині плазми Ланкастер; визначено здатність ліній і гібридів кукурудзи плазми Ланкастер до утворення калусної тканини та регенерації пагонів; здійснено генетичну трансформацію рослин кукурудзи методом біобалістики, описано особливості рослин-трансформантів кукурудзи та отримано трансгенні гербіцидостійкі інбредні лінії кукурудзи на основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер.

Віднесення того чи іншого генотипу кукурудзи до певного типу зародкової плазми відбувається, як правило, за родоводом. Але ці дані щодо сучасних гібридів та сортів часто є суб'єктивними, а інколи і втраченими. Разом з тим, внутрішньовидова класифікація та систематизація генофонду

культурних рослин є можлива за використання молекулярно-генетичних маркерів, оскільки враховує спорідненість та варіювання на рівні геномів, а не за фенотиповими ознаками. Важливим також є дослідження з розроблення технологій генетичної трансформації основних видів сільськогосподарських культур саме вітчизняних генотипів, у тому числі кукурудзи, однак це неможливо без попереднього аналізу регенераційної здатності та отримання повноцінних рослин.

Новизна дисертаційної роботи та поставлених завдань полягає у тому, що автором уперше проведено порівняння різних типів зародкової плазми кукурудзи за маркерами однонуклеотидного поліморфізму ДНК та ідентифіковано набір алелів SNP-маркерів, характерний для плазми Ланкастер; показано можливість підвищення тотипотентності слабкочутливих комерційних плазм за використання їх як компонентів гібридів з модельними лініями інших плазм з високим калусогенним та регенераційним потенціалом; здійснено генетичну трансформацію кукурудзи вітчизняних генотипів методом біобалістики з використанням генів *uidA* та *bar* та отримано трансгенні лінії кукурудзи, стійкі до гербіциду «Баста»TM.

Основний текст дисертації викладено на 161 сторінці комп'ютерного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, трьох розділів з викладенням результатів експериментальних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел включає 395 найменувань, серед них 242 іноземними мовами. Основна частина дисертаційної роботи вміщує 35 таблиць і 20 рисунків.

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 класифікації генофонду кукурудзи, приділено увагу походженню генотипів зародкової плазми Ланкастер та використанню молекулярно-генетичних маркерів для дослідження поліморфізму геному

кукурудзи, розглянуто дослідження щодо здатності рослин до регенерації пагонів *in vitro*, а також результати і перспективи застосування методів генетичної інженерії.

Розділ «*Матеріали і методи досліджень*» містить відомості щодо основних методів, які було використано при виконанні роботи, а саме метод культури клітин, тканин, молекулярно-біологічний метод, метод генетичної трансформації рослин з використанням біогармати тощо.

У розділі «*Результати досліджень та їх обговорення*» подано отримані автором результати. Розділ містить детальний опис даних стосовно характеристики генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за алельним станом маркерів одонуклеотидного поліморфізму ДНК, SNP-генотипування ліній кукурудзи, складання SNP-паспортів ліній Ланкастер та інших плазм. З метою ідентифікації алельного стану SNP-маркерів, специфічного для ліній плазми Ланкастер, було проаналізовано різницю між частотами мажорних алелів SNP-маркерів у вихідній групі неланкастерівських ліній та частотами однойменних алелів у похідній групі Ланкастер. На основі найбільших значень такої різниці складено формулу алельного стану десяти маркерів, характерного для Ланкастер. Проведено порівняльну характеристику калусогенезу у гібридів між лініями плазми Ланкастер, гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами та їхніх батьківських ліній та виявлено значний вплив генотипу на здатність утворювати калусні тканини. Визначено вплив сахарози та цефотаксиму на можливість ініціювання росту калусної тканини. Встановлено, що регенераційна здатність кукурудзи визначається генотипом, віком та типом калусної тканини, а також складом живильних середовищ. Шляхом біолістичної трансформації калусної тканини вектором pANC25 з генами *uidA* та *bar* були отримані трансгенні калуси та рослини-регенеранти. На основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер отримано 8 трансгенних гербіцидостійких інбредних ліній.

Отже, дисертантом надано комплексну характеристику кукурудзи генотипів зародкової плазми Ланкастер за молекулярно-генетичними

маркерами, здатністю до ініціювання калуєної тканини і регенерації пагонів, а також щодо можливості використання методу бомбардменту для отримання трансформованих рослин з генами стійкості до гербіцидів.

Автореферат відповідає змісту роботи.

Водночас, до дисертаційної роботи можна висловити ряд зауважень.

1. У табл.4.1, стор. 130, подано дані щодо «середніх багаторічних значень показників калуєогенезу». Для чого автором уведено такий показник та чим можна пояснити коливання частоти калуєогенезу у різні роки, адже культивування в умовах *in vitro* за визначенням передбачає стандартизовані та незмінні умови вирощування зразків?

2.Підпис до рисунку 5.2, стор. 172, рис. 5.5, стор 190, краще було би сформулювати як «Електрофореграма...», а не «Електрофоретичний аналіз...» або «Електрофорез...» (див. автореферат дисертації), адже аналіз – це дія, а фотографія – фіксація результатів цієї дії.

3. Підписи верхньої частини таблиць не завжди є достатньо зрозумілими, що заважає сприйняттю інформації, зокрема, на стор. 76, 174, 176, 179, 183.

4. Незрозумілим є використаний автором термін «морфобіологічні особливості» (5.2.1. Морфобіологічні особливості рослин-трансформантів в поколіннях T_2 - T_3 , стор. 181). Чому саме такий термін авторка використала для опису результатів досліджень щодо проростання насіння та кількості рослин, які вижили у присутності гербіциду.

5. Зустрічаються стилістично некоректні формулювання, наприклад, «Серед рослин покоління T_1 для двох вихідних генотипів ампліфікований фрагмент знайдено у 89,5% проаналізованих рослин», стор. 190. Мабуть, не «для генотипів», а «у рослин двох генотипів».

6. Рисунки 5.5а та 5.5б дистанційовані на різних сторінках. Можливо, їх краще було би розташувати поруч.

7. У табл. 5.8, стор.192, подано дані щодо кількості *bar*-позитивних рослин. Чи авторка вважає достовірною наведену різницю у відсотках кількості

bar-позитивних рослин, якщо було проаналізовано у трьох варіантах лише 1-2 рослини?

8. Зустрічаються деякі недоречності у розділі з переліком посилань. Так, при цитуванні №389 не вказано рік видання; усі посилання оформлено не за єдиним шаблоном. Наприклад, порівняймо довільно обрані посилання № 15, № 39, № 394, № 384. Якого саме стандарту притримувалася авторка?

9. Висновок №7 сформульовано не як саме висновок, а як наведення результатів, отриманих при дослідженні.

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

Підсумовуючи викладене, слід визначити, що дисертаційна робота Деркач Катерини Вікторівни «Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер» 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

Н.А. Матвеева



Матвеевой Н.А.
Свистової Т.В.