

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **Моргуна Богдана Володимировича**
«Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-
допоміжної селекції»,
представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за
спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Питання продовольчої безпеки критично важливе для усього людства. Входячи у першу світову десятку виробників зерна, Україна займає провідні позиції на світовому ринку збіжжя із суттєвим потенціалом експорту. Злакові культури мають стратегічне значення, оскільки більше половини населення країни отримує дві третини вуглеводів виключно з хлібних і круп'яних продуктів. Тому державним пріоритетом є підвищення продуктивності ключових для національного землеробства сільськогосподарських культур, зокрема пшениці і поліпшення її якості. У здійсненні цього завдання вирішальну роль відіграватимуть сорти, створені шляхом селекції, генетики, біотехнології. Головним завданням поліпшення рослин на сучасному етапі є створення сортів з високим генетично детермінованим потенціалом продуктивності і якості та підвищеним адаптивним потенціалом до стресових факторів довкілля. Успішне вирішення цього завдання пов'язане з постійним удосконаленням селекційного процесу, його інтенсифікацією за рахунок впровадження новітніх досягнень біології.

Важливим та актуальним завданням є розробка більш досконалих технологій генетичної трансформації злакових культур, що дозволить отримувати нові генотипи, які мають покращені агрономічні якості. Пошук нових, більш ефективних і зручних ДНК-маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу селекційного матеріалу також залишається актуальним. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Моргуна Б.В., присвячена створенню методами генетичної інженерії рослин пшениці і кукурудзи, стійких

до гербіцидів, а також розробці методичних та практичних засад використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур та генотипуванню пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки є актуальною і практично значимою.

Дисертаційна робота має традиційну структуру та складається із вступу, 8 розділів (огляд літератури; матеріали і методи досліджень; 6 експериментальних розділів), висновків, узагальнення та списку посилань. Основний текст дисертаційної роботи викладено на 508 сторінках машинописного тексту, містить 172 рисунки, 58 таблиць. Список посилань налічує 422 джерела.

У розділі «Огляд літератури» представлено сучасні основні напрями генетичного поліпшення сільськогосподарських рослин. Розглянуто роль біотехнології у підвищенні ефективності селекційного процесу та її внесок у створення нового покоління сортів злакових культур. Детально висвітлено сучасні досягнення генетичної трансформації злаків, зокрема кукурудзи і пшениці, методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації і основні чинники, які впливають на цей процес. Узагальнено практичні результати перенесення корисних ознак у геном пшениці і кукурудзи методами генетичної інженерії. Приділено увагу основним принципам, напрямам, можливостям та проблемам використання ДНК-маркерів у генотипуванні та селекції злакових рослин. Представлено сучасні дані про гени і генетичні системи, які контролюють якість зерна м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. та методи їх виявлення. Проаналізовано сучасні результати досліджень з ідентифікації та особливості передачі пшенично-житніх транслокацій.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» описано рослинний матеріал, залучений для проведення досліджень, зокрема 160 сортів пшениці м'якої озимої вітчизняного та зарубіжного походження; сорти та зразки ячменю;

спельти; мутантні лінії тритикале; вибірки селекційних гібридів; лінії білозерної озимої м'якої пшениці та синтетичні лінії пшениці. Детально висвітлено методи молекулярно-генетичних досліджень. Охарактеризовано низку праймерів, використаних для проведення генетичного аналізу.

У розділі «Принципи конструювання векторів та добір послідовностей ДНК для генетичної трансформації рослин» на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica* представлено результати добору ділянок геному, які, на думку дисертанта, перспективні для використання у генетичній інженерії рослин. Отримано дані про структуру гена *shp1* моху *Physcomitrella patens* та підтверджено факт наявності подібних послідовностей у представників різних таксонів рослин.

У розділі «Agrobacterium-опосередкована трансформація пшениці м'якої» викладено результати досліджень стосовно розробки протоколу та проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* та методом *in planta* для отримання рослин, стійких до гербіцидів. Проведена оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*. Вперше вивчено вплив регуляторів росту - піклораму та дикамби - на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. У трансгенних калюсних ліній пшениці методом IRAP-аналізу проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозону SIRE 1, та виявлені їх відмінності від нетрансгенних форм за генетичною структурою.

У розділі «Генетична трансформація кукурудзи *in vitro*» узагальнено результати досліджень автора з отримання методами *Agrobacterium*-опосередкованої та біолістичної трансформації рослин кукурудзи, стійких до гербіцидів. Оптимізовані окремі етапи протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи в умовах *in vitro*. За допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* отримано трансгенні рослини кукурудзи, стійкі до гліфосату. Отримані стійкі до

фосфіотрицину рослини-регенеранти, у яких виявляли активність ферменту β -глюкуронідази та проведено їх вивчення.

У розділі «Моніторинг розповсюдження генетично модифікованих рослин на полях та у торгівельній мережі України» представлено результати вивчення розповсюдження трансгенних рослин на сільськогосподарських полях України. Визначено наявність продуктів переробки трансгенної сої в харчових продуктах торгівельної мережі України. Перевірка зразків насіння на присутність трансгенних форм засвідчила їх наявність з частотою у декілька відсотків. Розроблено мультиплексні ПЛР для детекції трансформаційних події кукурудзи та сої.

У розділі «Використання молекулярних маркерів у селекції злаків» узагальнено результати досліджень автора з розробки методичних та практичних засад використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур і генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. Розроблено ряд систем на основі нуклеотидних послідовностей ретротранспозонів та мікросателітів, які дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси у геномах різних злакових культур. З їх допомогою вивчено генетичне різноманіття генотипів м'якої пшениці, спельти та ячменю. Показана висока ефективність ПЛР з маркерами до ретротранспозонів Sukkula, Wilma07 і Nikita.

Розроблено декілька системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах культурної м'якої пшениці, обраховано частоти рекомбінації у 4-х локусах та підтверджено її проходження по всій довжині чужинної ДНК. Аналіз ліній F₄-F₅ поколінь носіїв гена *Gpc-B1* показав підвищення рівня накопичення білка та ключових біологічно активних елементів (Fe, Zn, Se, Mg) у зернівках на 10–30 %. Вивчення локусів запасних білків зернівки дозволило відібрати найцінніші сім'ї для випічки хліба.

Методом ПЛР охарактеризовано алельний склад генів, які контролюють важливі споживчі властивості – консистенцію ендосперму зернівки, якісний склад крохмалю, вміст каротиноїдів та активність поліфенолоксидази. Встановлено, що маркерні системи на основі послідовностей ДНК та спектрів запасних білків зернівок є ефективними інструментами для ідентифікації у сортах озимої м'якої пшениці пшенично-житніх транслокацій, присутність яких посилює абіотичну та біотичну стійкість рослин та останнім часом набуває масового поширення у сучасних сортах пшениці.

У розділі «Прикладні результати створення вихідного матеріалу та сортів злакових культур» представлено практична придатність розроблених ДНК-технологій для генотипування найбільш поширених в Україні зернових культур, їх впровадження у селекційний процес та отримання нового вихідного матеріалу. Ініційовано кілька нових напрямів селекції озимої пшениці, яких раніше не було в Україні. Доведено ефективність використання гена *Gpc-B1*, перенесеного від дикорослої пшениці, у селекційних програмах культурної м'якої озимої пшениці з метою підвищення вмісту білка та мікроелементів у зерні. Отримано агрономічно цінні селекційні лінії озимої пшениці з підвищеним вмістом протеїну, заліза, марганцю, цинку та селену тощо.

У розділі «Узагальнення результатів досліджень» стисло і чітко підсумовано результати експериментальної роботи, які підтверджують обґрунтованість робочої гіпотези автора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконувалась у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за 14-ма темами науково-дослідних робіт, які виконувалися починаючи з 2010 року, а деякі тривають і дотепер.

Новизна дослідження та одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням, у якому автором досліджено

нуклеотидні послідовності мітохондріальної ДНК *Deschampsia antarctica*; вперше вивчено вплив синтетичних регуляторів росту піклораму та дикамби на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження; оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* та методом *in planta* та отримано рослини, стійкі до фосфінотрицину; удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин кукурудзи та отримано рослини, стійкі до гліфосату та фосфінотрицину.

Оригінальним є вивчення рівня поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR-повторами різних ретротранспозонів, у трансгенних калюсних культур та рослин-регенерантів пшениці. Одержані дані свідчать, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію мобільних генетичних елементів. Проведено моніторинг розповсюдження трансгенних рослин кукурудзи на території України за вдосконаленими методиками ПЛР. Створено 9 систем на основі IRAP та 5 систем на основі REMAP-маркерів, які дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами. За допомогою цих маркерів вивчено генетичні особливості різних видів злакових культур.

Обґрунтовано наукові основи маркер-допоміжної селекції пшениці на ознаки високої продуктивності, хлібопекарську якість, склад крохмалю, вміст мікроелементів тощо. Проведено скринінг сортів пшениці різного походження та відібрано перспективні зразки для селекційної роботи. Вперше в Україні запропоновано технологію селекційного процесу, яка базується на поєднанні класичної і молекулярної генетики, з активним використанням нових мутантних генів, молекулярних маркерів, хромосомних транслокацій і штучних генетичних конструкцій. Створено високопродуктивні сорти озимої пшениці з показниками високої якості зерна та стійкості до стресових чинників довкілля.

Практичне значення отриманих результатів полягає в отриманні трансгенних рослин м'якої пшениці та кукурудзи, стійких до гербіцидів,

придатних для використання в селекційних програмах з генетичного поліпшення даних культур. Розроблені способи створення генетично модифікованих рослин можуть застосовуватися як елементи біотехнологічних, молекулярно-генетичних та селекційних програм, а також використовуватися для створення нових форм рослин з цільовими генами різного походження. Запропоновано до практичного використання способи детекції трансформаційних подій, які дозволяють прискорити процес їх аналізу.

Розроблені маркерні системи можуть бути застосовані для генотипування різних генотипів, сортів і популяцій злакових культур. Запропоновані системи ДНК-маркерів придатні для дослідження генетичного різноманіття злаків у селекційних дослідженнях для їх генетичного поліпшення. Серед проаналізованих генотипів пшениці виявлено донори цінних алелів, які впроваджені у практичні селекційні програми Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення НААН України. У результаті виконання дисертаційного дослідження отримано нові сорти пшениці, які успішно пройшовши конкурентне сортовипробування та були занесені до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні, Російській Федерації та Республіці Молдова. Нові сорти м'якої озимої пшениці, створені методом хромосомної інженерії (такі як 'Смуглянка', 'Золотоколоса', 'Фаворитка', 'Астарта' тощо), забезпечили отримання рекордних урожаїв зерна – 124–140 ц/га, успішно конкурують із зарубіжними аналогами, висіваються по всій території України.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант проаналізував значну кількість літературних джерел з основних напрямів поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції. Автором доведена важливість вивчення методів та способів отримання генетично модифікованих рослин, а також використання молекулярно-генетичних маркерів

у селекції злакових культур. Залучення наукових літературних джерел останніх років дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для виконання поставлених завдань. При виконанні дисертаційної роботи пошукачем було застосовано сучасні методики досліджень та обробки отриманих даних. Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу дуже великої кількості фактичного матеріалу, а достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. З огляду на це, 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 висвітлені у публікаціях та наукових форумах. Зокрема, за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 3 монографії у співавторстві, 54 статті у провідних фахових виданнях України і зарубіжних виданнях, 25 тез у матеріалах всеукраїнських та міжнародних конференцій і з'їздів, 7 патентів (1 – на винахід, 6 – на корисну модель), 29 авторських свідоцтв України, 1 авторське свідоцтво Російської Федерації, 1 авторське свідоцтво Республіки Молдова.

Матеріал дисертації в цілому логічно оформлено, викладено науковою мовою, доцільно підкріплено ілюстративними засобами. Автореферат адекватно відображує зміст дисертації.

Проте, незважаючи на високий науковий рівень проведених досліджень, робота містить і деякі **недоліки та упущення:**

1. У розділі «Матеріали і методи досліджень» занадто детально описані широковідомі стандартні методики, як от виділення загальної ДНК або проведення електрофорезу у агарозному гелі. Водночас, більш специфічні протоколи, напр., «Аналіз запасних білків пшениці методом електрофорезу у поліакриламідному гелі», наведені дуже лаконічно.

2. Третій розділ роботи присвячено характеристиці деяких генів мохів та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*. На думку опонента, цей розділ дещо «відірваний» від решта дисертації і його можна було взагалі не включати до роботи, адже дисертація і без нього містить достатньо результатів.

3. У роботі на с. 167-169 описано використання ПЛР для характеристики гена *shp1* та його дивергенції у різних видів мохів. Зокрема автор вказує: «Найбільшу відповідність сигналів ПЛР до референту показав мох *Warnstorfia fontinaliopsis*, що дозволяє стверджувати про наявність та високу гомологічність гена *shp1* в його геномі». Опонент вважає, що про гомологічність генів у різних видів можна говорити лише за результатами сиквенування.

4. На с. 176 дисертант стверджує, що амінокислотна заміна, виявлена у білку SHP1 моху *W. fontinaliopsis* «відіграє ключову роль у функціонуванні білка в якості фактора захисту рослини від абіотичних чинників». Цей висновок видається передчасним і недостатньо обґрунтованим наявним матеріалом.

5. На с. 381 вказано: «У деяких зразках з алелем *Psy-B1c* спостерігався додатковий неочікуваний амплікон розміром 900 п.н., що свідчить про додатковий поліморфізм цього гена». Чи не варто було просиквенувати цей «неочікуваний амплікон», що б прояснити його природу?

6. Розділи дисертації, де представлено отримані результати, переобтяжені матеріалом, який варто було б перенести у «Огляд літератури» та «Матеріали і методи досліджень».

7. До зауважень варто віднести нечіткість у термінології, яка стосується ПЛР. Правильніше було б вживати «гібридизація праймерів» замість кальки з російської «відпал».

В цілому вказані недоліки не знижують загальної позитивної оцінки дисертаційної роботи.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів молекулярної генетики рослин. Результати роботи Моргуна Богдана Володимировича можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках науково-селекційних установ, які займаються питаннями генетичного поліпшення злаків, а також при викладанні навчальних курсів з молекулярної генетики, селекції та біотехнології рослин.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора біологічних наук. Вважаю, що за обсягом зібраного матеріалу, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень рецензована дисертація «Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції» є завершеною науковою роботою, яка цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор Моргун Богдан Володимирович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
заступник директора з наукової роботи
Інституту біології, хімії та біоресурсів,
завідувач кафедри молекулярної
генетики та біотехнології
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича
доктор біологічних наук, професор
заслужений діяч науки і техніки України



Р.А. Волков

Підпис *Волкова Р.А.*
Начальник відділу науки Чернівецького
національного університету
імені Юрія Федьковича
Р.А. Волков
"03" "09" 2024