

ВІДГУК

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

Актуальність рецензованої дисертаційної роботи Б.В. Моргуна «Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції», не викликає жодних сумнівів. Вона 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. Робота є практично значимою, оскільки вона надає цінний матеріал як для подальшого розвитку спеціальної генетики злакових культур, так і для практичного використання у селекції.

Дисертацію побудовано за класичним зразком. Вона складається із переліку умовних скорочень, вступу, 8 розділів, узагальнення, висновків, та списку посилань. Роботу викладено на 508 сторінках машинописного тексту, вона містить 172 рисунки, 58 таблиць. Список посилань налічує 422 джерела.

У розділі 1 «Огляд літератури» представлено сучасний стан та 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 *in vitro* та *in planta* і основні чинники, що впливають на цей процес. Узагальнено практичні результати впровадження корисних ознак у геном пшениці і кукурудзи шляхом генетичної інженерії. Розглянуто основні

принципи, напрями, можливості та проблеми 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 цілому огляд літератури представляє собою сучасний, достатньо повний і ретельний аналіз стану і перспектив досліджень у вибраному автором дисертації науковому напрямку.

У розділі 2 «Матеріали та методи досліджень» коротко, чітко та ясно описано рослинний матеріал, використаний у дослідженні, а саме 160 сортів пшениці м'якої озимої, сорти ячменю і зразки спельти, мутантні лінії тритикале, селекційні гібриди, лінії білозерної пшениці та синтетичні лінії пшениці. Досліджено також щучник антарктичний *Deschampsia antarctica* і шість видів антарктичних мохів. Для генетичної трансформації використано два сорти м'якої пшениці. У дослідах з генетичної трансформації кукурудзи використано 8 інбредних ліній, 10 гібридів F_1 та 3 соматоклональні варіанти на основі гібридів F_1 . Описано бактеріальні штами та векторні конструкції для проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та протокол трансформації для отримання трансгенних рослин пшениці м'якої, стійких до фосфінотрицину, а також методи аналізу трансформованих генотипів. Наведено використані молекулярно-генетичні методи, зокрема, особливості виділення загальної ДНК; спектрофотометричного та електрофоретичного дослідження ДНК; підготовку ДНК для проведення полімеразної ланцюгової реакції на референтні та цільові гени; проведення електрофорезу ДНК в агарозному гелі. Охарактеризовано використані праймери для аналізу генетичного поліморфізму й алельного складу локусів генів господарсько-цінних ознак. Описано методи визначення господарсько-корисних генів, пшенично-житніх транслокацій, глютенінової та гліадінової фракцій запасних білків пшениці, активності поліфенолоксидаз, а також методи статистичного аналізу.

У розділі 3 «Принципи конструювання векторів та добір послідовностей ДНК для генетичної трансформації рослин» автор представив результати власних досліджень. Зокрема, наведено і проаналізовано результати з розробки векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі антарктичного моху *Physcomitrella patens* та антарктичного злаку *D. antarctica* для можливого застосування у генетичній інженерії рослин. Визначено структуру гена *shp1* моху *P. patens* та підтверджено факт наявності подібних послідовностей в різних таксонах рослин. Виділено кодувальну послідовність генів малих гідрофобних білків SHP та проведено її клонування у вектор pUC19. Сиквеновано послідовності кДНК білків SHP1 та SHP2 *Warnstorfia fontinaliopsis*. Виділено ДНК генів НАД-Н дегідрогенази *D. antarctica*, деякі їхні послідовності клоновано у вектор pUC19. Створено бібліотеку рекомбінантних клонів. Сиквеновано і проведено аналіз нуклеотидних фрагментів мітохондріального геному *D. antarctica*. Встановлено наявність в мітохондріальній ДНК генів 1-ої та 5-ої субодиниць NADH дегідрогенази, 26S рРНК. Проведено біоінформативний аналіз послідовностей мтДНК *D. antarctica*. Показана висока (понад 90 %) гомологія з мітохондріальними геномами інших представників родини Злакових (*Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Bambusa oldhamii* та ін.).

У розділі 4 «*Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці м'якої» викладено результати розробки протоколу та проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої для отримання рослин, стійких до гербіцидів. Автор вперше вивчив вплив синтетичних регуляторів росту – піклораму та дикамби – на частоту регенерації з калусної культури пшениці. Дослідив вплив β -лактамного антибіотика тиметину на морфогенетичні процеси у пшениці м'якої та показав, що він має властивості регулятора росту. Оптимізував методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. У результаті проведених дослідів показано залежність частоти отримання трансгенних рослин методом *in planta* від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму. Вперше

отримано рослини пшениці сортів Подолянка та Зимоярка, стійкі до фосфінотрицину (гербіцид Баста®). Трансгенна природа рослин підтверджена методами ПЛР, ЗТ-ПЛР. У трансгенних калюсних ліній пшениці, отриманих шляхом біолістичної трансформації, методом IRAP-аналізу проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозону SIRE 1, та виявлено їх відмінності від нетрансгенних форм за генетичною структурою. У спектрах продуктів ампліфікації ДНК автор встановив появу нових ампліконів, що свідчить про активацію та транспозицію даного МГЕ. Підтверджено, що саме інсерція чужинної ДНК здатна індукувати транспозицію МГЕ. У генетично-модифікованих рослин пшениці, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, у спектрах продуктів ампліфікації ДНК не відмічено появи нових ампліконів, що свідчить про відсутність активації транспозиційної активності МГЕ. Відсутність поліморфізму ДНК у трансгенних рослин, на думку автора, можливо може бути пов'язана з явищем РНК-інтерференції, яка пригнічує активність ретротранспозонів.

У розділі 5 «Генетична трансформація кукурудзи *in vitro*» узагальнено результати власних досліджень автора з отримання рослин кукурудзи, стійких до гербіцидів. Зокрема, оптимізовано окремі етапи протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи в умовах *in vitro*. Виділено гібрид R₂PLS61×PLS61 з високою регенераційною здатністю. Отримано трансгенні рослини кукурудзи, які несуть цільовий ген *CP4 epsps*, продукт якого надає стійкості до гліфосату. Методом біолістичної трансформації вектором рАНС25 отримано стійкі до фосфінотрицину рослини-регенеранти, у яких виявляли активність ферменту β-глюкуронідази. Встановлено кореляцію між рівнями транз'єнтної експресії β-глюкуронідази для різних генотипів кукурудзи і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору компетентних для трансформації генотипів кукурудзи. Трансгенну природу отриманих рослин підтверджено за допомогою ПЛР.

Проведено морфобіологічну оцінку трансформантів, які несуть чужинний ген *bar* у поколіннях T₀-T₆, що дозволила охарактеризувати стійкість рослин за виживаністю, основними показниками росту і розвитку. Дослідження морфобіологічних показників у рослин-нащадків трансформантів показало, що вони мають деяке відставання у розвитку, зокрема, за термінами цвітіння чоловічих і жіночих суцвіть, за висотою рослини, що автор вважає звичайною реакцією на дію стресового чинника. Частота виживаності рослин T₆ за обробки гербіцидом становила 100 %, висота трансформантів без обробки та за умов обробки гербіцидом достовірно не різнилась, що вказує, на думку автора, на вірогідне накопичення трансгена в геномі рослин у п'яти циклах самозапилення та успішний добір на селективному фоні, а також стабілізацію рослинного геному в ряду поколінь після введення трансгенів.

У розділі 6 «Моніторинг розповсюдження генетично модифікованих рослин на полях та у торгівельній мережі України» автор представив результати вивчення розповсюдження трансгенних рослин, зокрема кукурудзи, ріпаку та сої, на полях України. Також визначив наявність продуктів переробки трансгенної сої у харчових продуктах торгівельної мережі. Для цього автором розроблено нову методику детекції трансформаційних подій на основі ПЛР. Дослідження кукурудзи з Київської області на присутність трансформаційних подій MON810, GA21 та NK603 показало, що середня частота їх зустрічальності станом на весну 2009 року становить близько 4 %. Перевірка зразків насіння кукурудзи з Дніпропетровської області засвідчила наявність трансформаційних подій NK603 та Vt176 з частотою 5–10 %. Автор розробив також мультиплексну реакцію для детекції трансформаційної події GA21 з одночасною ампліфікацією гена зеїну кукурудзи та мультиплексні реакції для детекції трансформаційних подій MON810 та NK603. Вивчення стійкого до гербіциду ріпаку на території Київської області підтвердило присутність у декількох рослинах глюфосинату амонію та гліфосату, трансгена *bar* і трансформаційної події GT73 з трансгеном CP4 *epsps*. Вивчення вмісту ГМ сої у харчових продуктах показало, що з 45 опрацьованих зразків 29 містять у

своєму складі ген *lectin* специфічний для сої, серед них 23 харчові продукти, що відповідно вказує на присутність добавок сої в них. З 29 зразків 6 дали позитивну реакцію на трансформаційну подію GTS 40-3-2, серед них 5 зразків сої (Київська, Черкаська та Кіровоградські області) 1 зразок харчового продукту, що представлений соєвим білком для спортсменів іноземного виробництва. Цей факт, як обгрунтовано вважає автор, є прямим свідченням того, що на території цих областей вирощується трансгенна (ГМО) соя.

У розділі 7 «Використання молекулярних маркерів у селекції злаків» наведено результати досліджень автора з використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки генетичного поліморфізму зернових культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. Автор розробив дев'ять систем на основі IRAP, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами різних злакових культур. У результаті досліджено генетичне різноманіття генотипів м'якої пшениці і спельти за IRAP-маркерами та показано рівень генетичної відмінності між вивченими сортами цих видів. Виявлено високу ефективність ПЛР на основі праймерів до ретротранспозону *Sukkula* як за окремого використання, так і у комбінаціях з праймерами до ретротранспозонів *Wilma07* і *Nikita* у дослідженнях геному ячменю. Встановлено, що найефективнішими для дослідження генетичного різноманіття пшениці є розроблені системи REMAP *Sukkula+A17898* та *Sukkula+HB10* для яких відсоток виявленого поліморфізму становить 50 % та 23 %, відповідно. Автор здійснив хімічний мутагенез тритикале з метою відбору рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*. Провів дослідження мутантних рослин з використанням IRAP-маркерів, в результаті якого підтверджено зміни у геномі тритикале під дією мутагенів. Розробив системи ДНК-маркерів для виявлення низки генів і локусів від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* у рослинах м'якої озимої пшениці. Проведений автором аналіз рослин F₄ і F₅ на вміст біологічно важливих елементів методом ICP-MS виявив, що присутність гена *Gpc-B1* зумовлює статистично достовірне підвищення рівня накопичення у зернівках заліза,

цинку, марганцю, міді, селену та магнію. Проведений комплексний аналіз вмісту загального білка зернівок у рослин F₅ покоління показав, що ген *Gpc-B1* зумовлює підвищення вмісту білка на 14 % у порівнянні з вихідним сортом. Вважаю, що проведені дослідження генетичних ефектів гена *Gpc-B1*, інтродукованого з *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, дозволили авторів започаткувати технологію добору ліній м'якої озимої пшениці з поліпшеною якістю зерна. Методом ПЛР автор визначив алельний склад генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які детермінують консистенцію ендосперму зернівки пшениці. У багатофакторному дисперсійному аналізі впливу різних алелей генів *Pinb-D1*, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* та їх комбінацій на текстуру зерна гібридів пшениці виявлено спільний вплив ($p < 0,01$) комбінацій алелей генів *Wx-A1* та *Wx-D1*. Для детекції гібридів м'якої пшениці F₁ та F₂ створено та використано маркерну систему для визначення перенесення модифікованого локусу із геном *SBEIIa*, який викликає збільшення накопичення амілози в зерні. Відібрано перспективні для залучення в селекційний процес зразки. За допомогою системи ДНК-маркерів визначено алельний склад генів *Psy1*, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні злакових культур у 162 сортів та гібридів пшениці. Відібрано зразки пшениці з очікуваною високою концентрацією каротиноїдів. Показано, що використання молекулярно-генетичних маркерів може бути ефективним для аналізу геномів пшениці на наявність алелей генів PPO, що відповідають за активність поліфенолоксидази. Автор обґрунтовано вважає, що підібрані маркерні системи (молекулярно-генетичний аналіз ДНК та електрофоретичне визначення білків) є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє ідентифікувати пшенично-житні транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації. Цитогенетичним аналізом встановлено, що сорти з пшенично-житніми транслокаціями диференціюються за кількістю аномалій у мейозі.

У розділі 8 «Прикладні результати створення вихідного матеріалу та сортів злакових культур» представлено практичну придатність розроблених автором ДНК-технологій для добору та генотипування зернових культур і їх впровадження у селекційний процес. Автор обгрунтовано вважає, що він з колегами по суті започаткував програму створення цінного селекційного матеріалу пшениці за ознаками стійкості до хвороб, посухостійкості та якості зерна на основі використання генетичної плазми егілопсів – дикорослих співродичів м'якої пшениці. За цілеспрямованих схрещувань у геном даної культури перенесено низку алелей глютенін- та гліадинкодувальних локусів та ген, який викликає екстрам'який тип консистенції ендосперму. Цим створено генетичну базу для селекції екстра-сильних за хлібопекарською якістю сортів пшениці. Доведено ефективність використання гена *Gpc-B1*, перенесеного від дикорослої пшениці емер, у селекційних програмах пшениці з метою підвищення вмісту білка і ключових мікроелементів у зерні, поліпшення його технологічної і споживчої цінності. Отримано агрономічно цінні селекційні лінії озимої пшениці з підвищеним вмістом протеїну і заліза, марганцю, цинку та селену. Автор розпочав дослідження генетичних систем, що контролюють колір зерна, та отримав зразки пшениці з білим, чорним та голубим кольором зерна з високою антиоксидантною активністю. Це створює основи для нового напрямку селекції пшениці круп'яного використання з поліпшеною харчовою цінністю зерна.

У розділі «Узагальнення» стисло і чітко обговорено і узагальнено результати експериментальної роботи, які підтверджують обгрунтованість робочої гіпотези автора.

У цілому експериментальний матеріал викладено доступною мовою, чітко і логічно, основні результати достатньо підтверджено власними експериментальними даними, представленими, зокрема, у вигляді таблиць, оригінальними та якісними ілюстраціями, зокрема, унікальними фотографіями та схемами. У процесі викладу автор ретельно і критично аналізує власні результати, робить у процесі опису коректні заключення та підсумки.

Обговорення та узагальнення проведено чітко, на високому професійному рівні, із залученням літературних даних по всьому тексту дисертації, воно свідчить про те, що автор своїм дослідженням зробив істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі молекулярної генетики та генетичних основ селекції рослин, зокрема кукурудзи і пшениці м'якої.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно випливають з експериментальних даних. І хоча їх, на мою думку, забагато (20 пунктів), вони викладені досить чітко та ясно.

Хочу звернути увагу на те, що дисертаційна робота містить надзвичайно великий експериментальний матеріал, якого з надлишком вистачило б не на одну дисертацію. І хоча дисертація читається легко, наведений експериментальний матеріал створює для читача труднощі у тому плані, щоби «не втопитись» у величезній кількості наведеного матеріалу і не загубити головну провідну наукову лінію роботи, упевнитися, що це дійсно є докторська дисертація, а не нагромадження величезної кількості експериментальних даних. Мені, як опонентові, це, здається, вдалося, хоч і було нелегко.

Зауважень до наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. Проте хочу звернути увагу на деякі, виявлені мною помилки, упущення і недоречності.

Так, в огляді літератури і, відповідно, у списку посилань вітчизняна наукова література представлена переважно посиланнями на власні дослідження і лише на деякі роботи, виконані іншими дослідниками. Зокрема, відсутні посилання на проведені раніше роботи з біотехнологічних досліджень з кукурудзою, проведені Т.М. Чеченєвою, В.А. Кунахом, В.В. Моргуном, Д.М. Майданюком та іншими співробітниками ІМБГ НАНУ та ІФРГ НАНУ. Немає посилань на молекулярно-генетичні дослідження щучника антарктичного, виконані іншими дослідниками, переважно в ІМБГ НАНУ. Не процитована монографія В.А. Кунаха «Мобільні генетичні елементи і пластичність геному

рослин», К., Логос, 2013 р. Згадані дослідження мають пряме відношення до теми дисертації.

У розділі «Матеріали і методи», на мою думку надто детально викладено деякі методи, зокрема молекулярно-генетичні (див., наприклад, розділ 2.3.5), у низці випадків можна було б зробити посилання на відповідні роботи, де ці методи описано. З іншого боку, деякі з використаних методів і їх подробиці викладено в розділах експериментальної частини (див., наприклад, розділ 3.1 «Вивчення послідовності гена...у мохів Антарктики» та розділ 3.2 «Клонування і молекулярно-генетична характеристика...»), або й зовсім не описано, наприклад методи цитогенетичного аналізу. Ці дані мали б бути викладено у розділі «Матеріали і методи». У цьому розділі є й інші недоліки. Зокрема, в табл. 2.2 у складі використаних середовищ неправильно вказано вміст сахарози – замість правильного 20 г/л, вказано 20 мг/л. Не наведено інтенсивність освітлення, на якому вирощували дослідний матеріал.

У підписах до рис. 6.5, рис. 6.9, рис. 6.29, табл. 6.2 не вказано об'єкт досліджень. Те саме стосується і частини таблиць і рисунків, наведених у розділі 7 (див., зокрема, табл. 7.7, 7.9, 7.17 та ін.; рис.7.2, 7.13, 7.15, 7.21 та ін.). На рис. 8.1 немає позначень і розшифрування представленого колосся.

Є невдалі, а то й неправильні вирази. У молекулярній генетиці замість терміну «відпал» (прямий переклад російського «отжиг») правильно застосовувати термін «гібридизація». Замість «генетична схожість» краще писати і говорити «генетична подібність», щоб не плутати з терміном «схожість» стосовно насіння рослин. Замість «інгібуюча активність» чи «кодуєчі послідовності» правильно буде «інгібувальна» та «кодуювальні», краще застосовувати термін «чужинна» замість використаного автором «чужорідна ДНК», тощо. Замість «рідке явище» (с.310) треба писати «рідкісне». На с. 403 автор пише «...що вказує на наявність в каріотипах цих сортів анеуплоїдних клітин чи телосоміків». Як це «наявність в каріотипах...»? В передостанньому пункту задач автор пише як завдання «...створити біотехнологію селекційного процесу». У мене питання – а що, раніше такої

біотехнології не було? Може краще було б писати «оптимізувати», чи «удосконалити», чи «поліпшити»? В анотації зазначено, що «Вперше вивчено вплив біологічно активних речовин на морфогенетичні процеси у пшениці м'якої». Фактично ж вперше вивчено дію деяких синтетичних регуляторів.

Висловлені критичні зауваження не знижують загалом надзвичайно позитивного враження від дисертації. Вважаю, що її, після певної модифікації, потрібно опублікувати у вигляді монографії, що, безумовно, буде важливою подією для генетиків і селекціонерів.

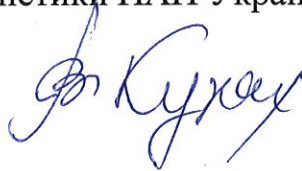
Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота «Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції» заслуговує високої позитивної оцінки. Слід особливо підкреслити, що одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів молекулярної генетики рослин. Вони вже широко впроваджені, зокрема, у вигляді нових високопродуктивних сортів пшениці як в Україні, так і за кордоном. Результати роботи Б.В. Моргуна можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках закладів, які також вирішують проблеми генетичного поліпшення рослин, а також в курсах лекцій з генетики та молекулярної біології.

Дисертація «Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції», представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук відповідає сучасному рівню генетичних досліджень і вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №657 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор – Моргун Богдан Володимирович

заслуговує присудження йому пошукового наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді трьох монографій (у співавторстві), 67 наукових праць, з них 54 статей у фахових виданнях, 28 тез матеріалів наукових конференцій та з'їздів, 7 патентів, 29 авторських свідоцтв України, 1 авторського свідоцтва Російської Федерації та одного авторського свідоцтва Республіки Молдова.

Зав. відділом генетики клітинних популяцій
Інституту молекулярної біології та генетики НАН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор біол. наук, професор



В.А. Кунах

Підпис Кунах В.А.
посвідчується

Зав. катед. М. Мейсєва

