

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА  
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

**МОРГУН БОГДАН ВОЛОДИМИРОВИЧ**



УДК 575.2+602.6:577.21:582.542.1

**ПОЛІПШЕННЯ КУЛЬТУРНИХ ЗЛАКІВ МЕТОДАМИ  
ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ ТА МАРКЕР-ДОПОМІЖНОЇ  
СЕЛЕКЦІЇ**

03.00.22 – молекулярна генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України.

**Науковий консультант:** доктор біологічних наук, професор,  
академік НАН України  
**Кучук Микола Вікторович,**  
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії  
НАН України, директор

**Офіційні опоненти:** член-кореспондент НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
**Кунах Віктор Анатолійович,**  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
завідувач відділу генетики клітинних популяцій

доктор біологічних наук, професор  
**Волков Роман Анатолійович,**  
Чернівецький національний університет  
імені Юрія Федковича, завідувач кафедри молекулярної  
генетики та біотехнології

доктор біологічних наук, професор  
**Косаківська Ірина Василівна,**  
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,  
завідувач відділу фітогормонології

Захист дисертації відбудеться 16 вересня 2021 року об 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.  
Тел/факс: (044) 463 05 32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а та на сайті <http://ifbg.org.ua/uk/pidgotovka-kadriv/specializovana-vchena-rada>

Автореферат розіслано 16 серпня 2021 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми досліджень.** Генетичне поліпшення рослин і створення сортів нового покоління – один із головних засобів прогресу в сучасному рослинництві. Головним його завданням на даний час є створення сортів і гібридів з високим генетично детермінованим потенціалом продуктивності та якості, стабільною стійкістю до хвороб, шкідників, дії несприятливих чинників навколишнього середовища. Успішне вирішення цього завдання пов'язане з постійним удосконаленням селекційного процесу, його інтенсифікацією через розширення генетичного різноманіття і впровадження в селекційний процес новітніх досягнень геноміки, протеоміки і метаболоміки, технологій цілеспрямованих мутацій, генетичної інженерії та редагування геномів, різних систем молекулярних маркерів (Hsu et al., 2014; Моргун, Рибалка, 2017).

В Україні злакові культури (пшениця, кукурудза, ячмінь) є стратегічним продуктом, оскільки більш як половина населення країни отримує 80 % вуглеводів виключно з хлібних і круп'яних продуктів. Нарощування виробництва високоякісного зерна – основа для розвитку харчової та переробної промисловості, а також підвищення експортного потенціалу країни (Моргун, 2015). Переважна більшість сортів та гібридів злакових культур створена традиційними методами селекції, на основі використання генетичного різноманіття вихідних видів. У сучасних умовах традиційні методи селекції, що ґрунтуються на тривалих емпіричних дослідженнях, комбінативній мінливості та схрещуваннях з носіями бажаних генів, не можуть повною мірою задовольнити потреби селекціонерів. Тому дедалі більшого значення набуває впровадження досягнень біотехнології в генетико-селекційний процес. Це насамперед – розроблення нових технологій селекційного процесу на основі вдалого поєднання класичних методів селекції і досягнень генної інженерії та маркер-допоміжної селекції (Hiei et al., 2014; Jasdeep and Avijit, 2015; Anwar et al., 2018; Aadel et al., 2021).

Останніми десятиріччями значно поширилися дослідження з використанням методів генетичної інженерії для створення модифікованих рослин злакових культур (Решетников и др., 2014; Borisjuk et al., 2019; Anwar et al., 2020). Слід зазначити, що родина Злаків є найбільш господарсько важливою і водночас дуже складною для застосування генно-інженерних технологій. Незважаючи на досягнуті успіхи, перспективи реального покращення злаків засобами генетичної інженерії поки обмежені через складність функціонування і недостатню вивченість їх геномів та багатьох інших клітинних процесів. Тому на сьогодні не існує достатньо ефективних протоколів їх генетичної трансформації. У зв'язку з цим, активно розробляються більш досконалі технології, які б сприяли отриманню генотипів, що мають покращені агрономічні якості. Отримання власних біотехнологічних рослин на основі перспективних сортів вітчизняної селекції зі стійкістю до найбільш поширених гербіцидів є актуальним, оскільки зробить вирощування сільськогосподарських рослин, і злаків зокрема, рентабельнішим та екологічно чистим (Green, 2012; Vencill et al., 2012), а також незалежним від імпорту посівного матеріалу. Успішному технологічному вирішенню цих питань сприяє прогрес, досягнутий в останні десятиріччя в галузі фундаментальних досліджень структурно-

функціональної геноміки, теоретичних і практичних аспектів генетичної трансформації ряду культурних рослин (Shrawat, Armstrong, 2018). Біотехнологічні підходи дозволяють передавати бажані гени з будь-якого організму і тим самим збільшувати доступний генофонд для їх поліпшення.

Створення високоврожайних пластичних сортів рослин, з комплексом цінних технологічних властивостей, значною мірою залежить від ефективності оцінки селекційного матеріалу. Найефективнішим методом оцінки є ДНК-технології на основі молекулярних маркерів (Xu et al., 2013; Yabe, Iwata, 2020; Моргун та ін., 2021). Методи молекулярної селекції, засновані на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), вже сьогодні дозволяють підійти до аналізу генетичного поліморфізму на рівні нуклеотидних послідовностей генів та розширити можливості створення сортів з певними технологічними ознаками. Інформація про алельний стан генів може бути отримана на ранніх етапах розвитку до цвітіння рослини, що дозволяє відбирати потрібні генотипи, не очікуючи на аналіз зерна, що значно прискорює селекційний процес. Зважаючи на це, пошук нових, більш ефективних і зручних ДНК-маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу, продовжує бути вкрай актуальним.

Економічна ефективність генетико-селекційної роботи виявляється не тільки у виведенні поліпшеного сорту, а й у термінах його створення й освоєння виробництвом. Застосування біотехнологічних підходів та ДНК-маркерів у 2–3 рази прискорює отримання нових сортів, сприяє зменшенню масштабів і скороченню термінів селекційних програм, що зумовлює доцільність їх використання у селекційному процесі.

Слід зазначити, що в Україні комплексні програми генетичного поліпшення рослин із застосуванням методів молекулярної селекції та біотехнологічних підходів тільки починають розроблятися. Відсутність сукупності оптимізованих методів, які надали б можливість контролювано добирати генотипи на різних етапах селекції, сповільнює процес створення вітчизняних конкурентоспроможних сортів. Розробка таких технологій сприяє проведенню цілеспрямованого добору вихідного матеріалу та розширює можливості щодо прискорення селекції сортів з певними технологічними ознаками, зокрема й з поліпшеною якістю зерна, стійких до екологічних стресових впливів. Це зумовлює актуальність, новизну та практичну значимість запропонованої теми досліджень.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалась у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії за темами НДР: «Моніторинг селекційних зразків кукурудзи на наявність спонтанно занесених трансгенних подій, які зареєстровані у Європейському союзі» (№ держреєстрації 0110U004025, 2010 р.); «Виявлення генетичних послідовностей, які детермінують якісні характеристики зерна та стійкість до стресових факторів у кукурудзи» (№ держреєстрації 0112U002802, 2012 р.); «Вивчення молекулярно-генетичних основ та фізіологічних особливостей адаптації до абіотичних стресів на прикладі рослин Антарктики» (№ держреєстрації 0112U002937, 2012–2013 рр.); «Отримання та вивчення молекулярно-біологічних і генетичних особливостей стійких до гербіцидів сільськогосподарсько важливих культур» (№ держреєстрації 0110U006082, 2010–2014 рр.); «Впровадження

молекулярних систем визначення генетичного й епігенетичного поліморфізму озимої пшениці для отримання високопродуктивних спеціалізованих сортів» (№ держреєстрації 0114U002736, 2014 р.); «Розробка систем молекулярних маркерів для відбору корисних ознак у зернових культур» (№ держреєстрації 0113U003101, 2013–2015 рр.); «Дослідження функціонування та адаптації рослин в умовах біотичних та абіотичних стресів за допомогою молекулярних маркерів» (№ держреєстрації 0112U001735, 2012–2016 рр.); «Вивчення молекулярно-генетичних особливостей генетично модифікованих культурних рослин та встановлення закономірностей функціонування трансгенів» (№ держреєстрації 0113U003100, 2013–2017 рр.); «Розробка систем генотипування та маркування цінних біологічних ознак сільськогосподарських культур» (№ держреєстрації 0116U000173, 2016–2018 рр.); «Використання молекулярних та клітинних технологій для отримання біотехнологічних рослин пшениці та кукурудзи, стійких до гербіциду гліфосату» (№ держреєстрації 0115U004187, 2015–2019 рр.); «Дослідження цінних генетичних детермінант і нових алельних ефектів генів для поліпшення хлібних злаків в умовах негативного впливу глобальних кліматичних змін» (№ держреєстрації 0117U000385, 2017–2021 рр.); «Дослідження молекулярно-біологічних і фенотипових проявів функціонування перенесених генів та особливостей їх успадкування у біотехнологічних рослин» (№ держреєстрації 0118U003663, 2018–2022 рр.); «Створення молекулярно-генетичної платформи для проведення маркер-допоміжної селекції» (№ держреєстрації 0119U100597, 2019–2021 рр.); «Розробка біотехнологій рослин роду *Triticum* для підвищення їх врожайності» (№ держреєстрації 0120U103770, 2020–2024 рр.).

**Мета та завдання досліджень.** Мета роботи полягала у створенні 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 генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні задачі:

- розробити принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*;
- визначити оптимальні умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці в культурі *in vitro* та методом *in planta*, отримати генетично модифіковані рослини, стійкі до фосфіотрицину, та підтвердити інтеграцію перенесених генів;
- оптимізувати окремі параметри біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* кукурудзи, отримати та проаналізувати трансгенні рослини, стійкі до гліфосату та фосфіотрицину;
- провести моніторинг розповсюдження зареєстрованих трансформаційних подій кукурудзи на території України;
- розробити методичні основи та практичні засади використання ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових

культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки;

- проаналізувати сорти, лінії та селекційні зразки озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації та охарактеризувати їх цитологічні та господарські особливості;
- виявити генотипи озимої пшениці з алелями генів високої якості зерна та іншими цінними генами та дослідити їх на можливість використання як донорів господарсько-корисних ознак;
- обґрунтувати новий для України напрям селекції злакових культур з кольоровим зерном з метою підвищення харчової цінності зерна;
- розробити теоретичні основи і практичні методи використання та контролю досліджених генів і генетичних систем у селекції пшениці за комплексом господарсько-цінних ознак;
- на основі поєднання можливостей класичної і молекулярної генетики та комплексного використання нових мутантних генів, молекулярних маркерів, хромосомних транслокацій і штучних генетичних конструкцій створити біотехнологію селекційного процесу;
- створити цінний вихідний селекційний матеріал та сорти пшениці м'якої озимої, придатні для використання в генетичних дослідженнях та аграрному виробництві.

**Об'єкт дослідження:** поліпшення злакових культур методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції.

**Предмет дослідження:** створення і аналіз трансгенних рослин пшениці та кукурудзи, стійких до гербіцидів, в умовах *in vitro* і методом *in planta*; застосування ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму та генотипування зернових культур за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

**Методи дослідження.** Біоінформатичні, біотехнологічні (методи культури тканин і органів рослин *in vitro*; біолістична та *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in vitro* та *in planta*); молекулярно-генетичні методи (клонування послідовностей ДНК; виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу; спектрофотометричне вимірювання загальної рослинної ДНК; полімеразна ланцюгова реакція; проведення електрофорезу ДНК в агарозному та поліакриламідному гелях; біохімічні (визначення вмісту білка); фізичні (інфрачервоної спектрометрії); методи статистичної обробки експериментальних даних.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Розроблено принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії рослин. На основі біоінформатичного аналізу послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica* показана висока (понад 90 %) гомологія з мітохондріальними геномами представників родини Злакових (*Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Bambusa oldhamii* та ін.). Сиквеновано і проведено аналіз нуклеотидних фрагментів мітохондріального геному *D. antarctica*.

Вперше вивчено вплив синтетичних регуляторів росту піклорама 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 фосфіотрицину. Удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин кукурудзи в культурі *in vitro* методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та отримано трансгенні рослини, стійкі до гліфосату та фосфіотрицину.

Досліджено рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR-повторами різних ретротранспозонів, у трансгенних калюсних культур та рослин-регенерантів пшениці та виявлено їх відмінності від нетрансгенних форм за генетичною структурою. Одержані дані свідчать, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію мобільних генетичних елементів.

Розроблено нову вдосконалену методику детекції трансформаційних подій на основі мультиплексної ПЛР та проведено моніторинг розповсюдження трансгенних рослин кукурудзи на території України, який засвідчив їх наявність з частотою від 4 до 10 %.

Створено 9 систем на основі IRAP та 5 систем на основі REMAP-маркерів, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами різних видів злакових культур. Встановлено, що кожен з вивчених сортів злаків має свій певний спектр ампліфікованих IRAP та REMAP-продуктів, що відрізняється від інших за їх кількістю, розміром і ступенем вираженості. На основі отриманих даних показано відмінності досліджених сортів за геномною варіабельністю та визначено рівень їх філогенетичного споріднення. Показано ефективність застосування IRAP-маркерів для підтвердження змін у геномі тритикале під дією мутагенів та для добору мутантних рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*.

На підставі застосування різних взаємодоповнюючих молекулярно-генетичних маркерних систем, їх адаптації для проведення мультиплексних ПЛР, обґрунтовано наукові основи молекулярної селекції пшениці на високі продуктивність та хлібопекарську якість. Розроблено і оптимізовано систему ДНК-маркерів для добору та генотипування сортів пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. Проведено скринінг нових, елітних та стародавніх сортів м'якої та твердої пшениці на розповсюдження алельних варіантів господарсько-корисних генів та відібрано перспективні для залучення в селекційний процес зразки.

Отримала подальший розвиток концепція про роль генів дикорослих співродичів у генетичному поліпшенні якості зерна культурної пшениці. Розроблено домінуючу та кодомінуючу молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах м'якої озимої пшениці та чотири кодомінуючі молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm193*, *Xgwm219*, *Xgwm508*, *Xgwm626*. Виконані комплексні дослідження генетичних ефектів гена *Gpc-B1* дозволили започаткувати технологію добору ліній м'якої озимої пшениці з поліпшеною якістю зерна.

Проведено моделювання праймерів та перевірено їх ефективність для визначення трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1* пшениці методом ПЛР. Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці, а

максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення. На основі отриманих даних опрацьовано теоретичну концепцію використання та контролю досліджених генів і генетичних систем у селекції пшениці за комплексом господарсько-цінних ознак.

Виявлено, що підібрані маркерні системи є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Встановлено, що комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє проводити ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації. На підставі цитогенетичного аналізу виявлено, що сорти з пшенично-житніми транслокаціями диференціюються за кількістю аномалій у мейозі.

Науково обґрунтовано новий для України напрям селекції злакових культур з кольоровим зерном з метою підвищення харчової цінності зерна, що є основою для появи на продовольчому ринку нашої держави нових продуктів функціонального харчування.

Вперше в Україні розроблено біотехнологію селекційного процесу, яка базується на поєднанні можливостей класичної і молекулярної генетики, з активним використанням нових мутантних генів, молекулярних маркерів, хромосомних транслокацій і штучних генетичних конструкцій. На основі найсучасніших досягнень інтрогресивної селекції, молекулярної генетики й біотехнології розроблено теоретичні основи і методи створення високопродуктивних сортів озимої пшениці, яким властиві висока якість зерна та стійкість до стресових чинників довкілля.

**Практичне значення.** Отримані трансгенні рослини м'якої пшениці та кукурудзи, стійкі до гербіцидів, придатні 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 біотехнологічних рослин з іншими 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. Підібрані системи ДНК-маркерів придатні для дослідження генетичного різноманіття злаків у селекційних дослідженнях для їх генетичного поліпшення.

Серед проаналізованих генотипів пшениці виявлено потенційні донори цінних алелів, зокрема *Glu-B1a1*, який позитивно впливає на хлібопекарську якість борошна; *Gpc-B1*, що детермінує підвищення вмісту білка і мікроелементів; *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які детермінують консистенцію ендосперму зернівки; *Psu*, що відповідає за накопичення каротиноїдів у зерні; *Pro*, який контролює низьку активність поліфенолоксидазних ферментів зернівки; *Wx*, який зумовлює знижений вміст амілози в зерні. Результати вивчення міжсортового та внутрішньосортового поліморфізму за дослідженими цільовими генами, впроваджені у практичні селекційні програми Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та



Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення НААН України, спрямовані на усунення гетерогенності та підвищення генетичної чистоти (гомогенності) сортів зернових злаків та їх поліпшення за головними технологічними характеристиками якості зерна.

У результаті багаторічних наукових досліджень створено цінний вихідний селекційний матеріал та нові сорти-інновації різного напрямку використання. До Державних реєстрів сортів рослин, придатних для поширення в Україні, Російській Федерації та Республіці Молдова занесено 31 сорт пшениці м'якої озимої, в тому числі в Україні – 29 сортів ('Астарта', 'Софія Київська', 'Донор Київський' та інші), в Російській Федерації – сорт 'Астарта', в Республіці Молдова – сорт 'Сотниця'. Дані сорти на державному рівні визнані селекційним досягненням, а їх новизна закріплена авторськими свідоцтвами України, Російської Федерації та Республіки Молдова. Нові сорти стійкі до несприятливих чинників довкілля, забезпечують отримання високих урожаїв зерна високої якості. Кваліфікаційну експертизу в Державному сортовивченні України, Республіці Казахстан та Республіці Туреччина проходять 13 сортів пшениці м'якої озимої, в тому числі: в Україні – 9 сортів ('Альта', 'Степова криниця', 'Нагорода', 'Довіра', 'Вежа Київська', 'Благовіщенська', 'Трояна', 'Благодатна', 'Синтетик 240'), в Республіці Казахстан – сорт 'Снігурка', в Республіці Туреччина – 3 сорти пшениці м'якої озимої ('Бужанка', 'Новосмуглянка', 'Соломія').

Нові сорти пшениці м'якої озимої, створені методом хромосомної інженерії ('Смуглянка', 'Золотоколоса', 'Фаворитка', 'Астарта' та інші), забезпечили отримання рекордних урожаїв зерна – 124–140 ц/га, успішно конкурують із зарубіжними аналогами і займають великі посівні площі. Вони мають комплексний імунітет до основних хвороб і придатні для вирощування в органічному землеробстві та на зрошенні. Сорти пшениці м'якої озимої ('Здоба Київська', 'Софія Київська', 'Городниця', 'Аміна', 'Джамала', 'Донор Київський' та інші), які відносяться до сильних пшениць, мають високу якість зерна. Серед них унікальний сорт 'Донор Київський', котрий за якістю відноситься до екстрасильних пшениць, має високий вміст білка (18–20 %) та його якість (показник сили борошна W 450–900 о.а.).

Наукові розробки дисертації використані здобувачем в лекційному курсі при навчанні аспірантів та студентів за дисципліною «Генетика рослин, біоінженерія» в Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» та в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка. Результати дисертаційних досліджень висвітлено в монографії «Ячмінь як продукт функціонального харчування», яка відзначена премією Національної академії аграрних наук України «За видатні досягнення в аграрній науці».

**Особистий внесок здобувача.** Результати досліджень, що представлені у дисертації, одержано автором роботи у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, у якій висвітлено власні результати досліджень автора. Безпосередньо автором розроблено концепцію і структуру роботи, здійснено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації, лабораторні і польові дослідження, розробку ДНК-технологій,

ідентифікацію алелів маркерних локусів, аналіз даних, формулювання узагальнень та висновків. Співавторами наукових праць є науковий консультант та науковці, спільно з якими проведено дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантові належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. Усі наукові узагальнення, положення, результати та висновки, викладені у дисертації, сформульовано автором особисто.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені та доповідались на міжнародних конференціях «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Алушта, 20-24 вересня 2013; Умань, 22-24 вересня 2014; Чернівці, 14-19 вересня 2015; Одеса, 12-16 вересня 2016; Яремче, 17-21 вересня 2018, Київ, 15-20 вересня 2019); XI, X з'їздах Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова (Алушта, 24-28 вересня 2012; Умань, 16-20 вересня 2017); «Plant-Based Vaccine and Antibody Conference», Verona, Italy, June 18 2007; «Генетично модифіковані (біотехнологічні) рослини: перспективи використання та проблеми біобезпеки», Київ, 6-8 жовтня 2009; «Modern biotechnology of agricultural plants and biosafety (plant genome VI)», Odesa, September 7-10 2010); «Современные аспекты генетической инженерии растений» Киев, 30 мая-1 июня, 2011; «Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи», Київ, 2011; «World Congress on In Vitro Biology», Washington, USA, June 3-7 2012; «Новітні досягнення біотехнології», Київ, 24-25 жовтня 2013; «Plant Genomics and Biotechnology», Kiev, December 23 2013; «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти», Харків, 11-13 листопада 2014; «Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges» Sofia, Bulgaria, 24-26 September 2014; «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», Минск, 13-16 октября 2015; «57th Annual Maize Genetics Conference», Charles, Illinois, USA, March 12-15, 2015; «Advances in Cell Biology and Biotechnology», Lviv, October 11-13 2015; «Сучасні напрями селекційного удосконалення пшениці», Одеса, 1-3 червня 2016), «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин», Одеса, 12 вересня 2017; «Біотехнологія – інноваційний шлях розвитку селекції рослин», Одеса, 8-10 жовтня 2018; 3rd IPFS International Symposium, Fuzhou, China, December 15-18 2018; «SmartBio», Kaunas, Lithuania, 2-4 May 2019; «Agrobiodiversity for improve the Nutrition, Health and Quality of Human and Bees Life», Nitra, Slovakia, September 11-13 2019; «Plant and Animal Genome Conference», USA, January 2019; 5th International ICDRA conference on Duckweed Research and Applications, Rehovot, Israel, September 9-12, 2019; «Plant genome stability and change», Leiden, Netherlands, 7-10 June 2020; «The 45 th FEBS Congress», Liubliana, Slovenia, 3-8 July 2021. Основні результати наукових досліджень також висвітлювалися на щорічних заходах Міжнародної науково-практичної конференції «День поля», яка проводилася в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України (2007–2020 рр.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації 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.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, 8 розділів (огляд літератури; матеріали і методи досліджень; 6 експериментальних розділів), висновків, узагальнення, списку посилань, додатків. Основний текст дисертаційної роботи викладено на 508 сторінках машинописного тексту, містить 172 рисунки, 58 таблиць. Список посилань налічує 422 джерела.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі 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. 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.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Рослинний матеріал.** В якості матеріалу для проведення досліджень було використано: 160 сортів пшениці м'якої озимої вітчизняного та зарубіжного походження, які були отримані в рамках договорів про співробітництво з Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ НАН України, м. Київ), Селекційно-генетичним інститутом – Національним центром насіннезнавства та сортовивчення НААН України (СГІ-НЦНС НААН України, м. Одеса) та Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (м. Харків); 7 сортів ячменю, які були отримані в рамках договорів про співробітництво з ІФРГ НАН України, СГІ-НЦНС НААН України та Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України. Дослідження генетичного різноманіття *T. spelta* за допомогою IRAP-маркерів проводили на 10 різних зразках. Також досліджували 15 мутантних ліній тритикале зі зміненим складом крохмалю в зерні. Для впровадження маркерних систем для виявлення пшенично-житніх транслокацій та алелів високомолекулярних глютенінів були використані вибірки (від 100 до 200 зразків) селекційних гібридів з ІФРГ НАН України та СГІ-НЦНС НААН України. Для впровадження маркерних систем для алелів генів активності поліфенолоксидази були використані 38 ліній білозерної

озимої м'якої пшениці та 64 синтетичні лінії пшениці, одержані у СГІ-НЦНС НААН України.

Матеріалом дослідження у даній роботі також були представники антарктичної флори: щучник антарктичний *Deschampsia antarctica* родини Злакові (*Poaceae*), а також ряд представників класу мохів: *Physcomitrella patens*, *Warnstorfia fontinaliopsis*, *Bryum pseudotriquetrum*, *Bryum argenteum*, *Pohlia nutans*, *Polytrichum juniperinum*. Зразки рослин були отримані у 15-тій антарктичній експедиції на українській дослідній станції «Академік Вернадський», яка розташована на мисі Марина острова Галіндез за 7 км від західного узбережжя Антарктичного півострова.

Матеріалом досліджень з генетичної трансформації пшениці були сорти м'якої пшениці вітчизняної селекції 'Зимоярка' та 'Подольнка', надані ІФРГ НАН України. Матеріалом досліджень з генетичної трансформації кукурудзи були 8 інбредних ліній, 10 гібридів  $F_1$  та 3 соматоклональні варіанти на основі гібридів  $F_1$ .

**Генетична трансформація пшениці.** В якості первинних експлантів використовували апікальні меристеми та незрілі зародки пшениці сортів 'Зимоярка' та 'Подольнка'. Апікальні меристеми виділяли з 3-добових асептичних проростків і розміщували на модифікованому середовищі МСК, яке містило 2 мг/л 2,4-Д і 10 мг/л  $AgNO_3$ , вітаміни за Гамборгом (Gamborg *et al.*, 1968) та 20 г/л сахарози. Експланти культивували за температури 26 °С у темряві впродовж 18 діб до отримання калюсу. Сформований 18-добовий калюс переносили на живильне середовище МС для регенерації, доповнене вітамінами за Гамборгом і регуляторами росту. Культивування проводили за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду. Незрілі зародки розміром 1,0-1,2 мм виділяли з насіння на 13–14 добу після запилення (Тао *et al.*, 2011), поміщали щитками вгору у чашки Петрі (50 шт.) на модифіковане живильне середовище МСК. Культивування проводили в темряві протягом 4–6 діб за температури 26 °С до отримання первинного калюсу.

Визначення особливостей регенерації пагонів проводили на зразках калюсу на середовищах, доповнених дикамбою (Duchefa Biochemie, 3,6-dichloro-2-methoxy benzoic acid), піклорамом (Duchefa Biochemie, 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid) та БАП (6-бензиламінопурином) («Sigma»). Кількість зразків морфогенного калюсу визначали на 15-ту добу культивування. Підрахунок утворених регенерантів проводили з 20-ї до 35-ї доби з інтервалом у 5 діб. Відсоток пагоноутворення визначали як відношення числа експлантів, які утворили пагони, до загального числа експлантів. Регенеранти відокремлювали від калюсу і для ініціації ризогенезу висаджували на живильне середовище MCR1, яке містило 0,1 мг/л НОК. Укорінення тривало протягом 2 тижнів за температури 24 °С та 16-годинного фотоперіоду. Адаптацію регенерантів з добре розвиненою кореневою системою проводили за наступною схемою: 1) сфагновий мох – первинний адаптаційний субстрат, 2) ґрунтосуміш – торф, дернова земля та пісок (2:1:1).

У роботі використовували нопалінові штами *Agrobacterium tumefaciens* C58 та GV3101. Штам C58 містив вектор p014 (рис. 1), до складу Т-ДНК якого входять селективний ген *nptII* та маркерний – *sgfp*. Векторна конструкція pCB203 у штамі GV3101 містить репортерний ген  $\beta$ -глюкуронідази (*uidA*), а також селективний ген фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*), що надає стійкості клітинам рослин до

гербіциду Баста® (активна речовина L-фосфінотрицин). Для досягнення високого рівня експресії цих генів у векторі були використані поліубіквітин-1 (Ubi1) промотори та інтрони кукурудзи (Christensen, 1996) (рис. 2).

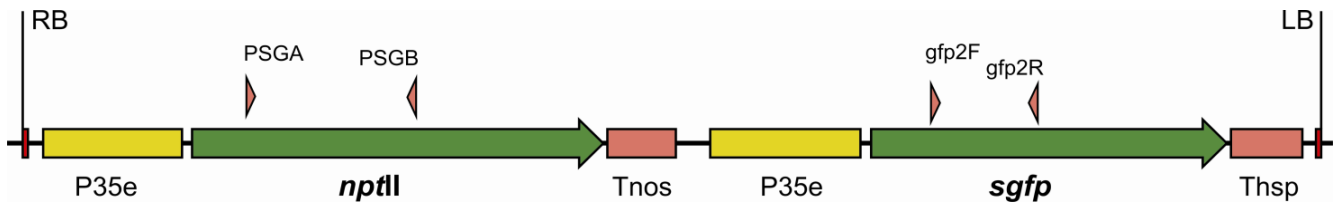


Рис. 1. Схематичне зображення генетичної конструкції p014



Рис. 2. Схематичне зображення T-ДНК вектора pCB203 (Christensen, 1996)

З метою отримання трансгенних рослин пшениці використовували 18-добовий калюс, отриманий з апікальних меристем, та 4–6-добовий калюс, одержаний з незрілих зародків пшениці сортів ‘Зимоярка’ та ‘Подольнка’. Калюс обробляли бактеріальною суспензією протягом 15 хв, потім просушували на фільтрувальному папері та переносили у чашки Петрі на живильне середовище для кокультивування (Sidorov, Duncan, 2009). Кокультивування здійснювали протягом 48 год у термостаті за температури 27 °С, після чого експланти поміщали на модифіковане живильне середовище для регенерації MСР4, яке містило 100 мг/л паромоміцину (штам С58) або 5 мг/л фосфінотрицину (штам GV3101) в якості селективних агентів для попереднього відбору трансформантів. Культивування здійснювали за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду протягом 28 діб. Кожні 14 діб проводили пасажування на свіже регенераційне середовище. Отримані регенеранти після первинної селекції переносили на безгормональне живильне середовище для вкорінення. Рослини з достатньо розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов, переносили в посудини з ґрунтом і культивували в умовах теплиці за температури 22–28 °С, вологості 70 % та природного освітлення.

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* сортів ‘Подольнка’ та ‘Зимоярка’ проводили в умовах вегетаційного дослідження. Для проведення трансформації обирали колоси довжиною 5–7 см, які ще не повністю вийшли з піхви прапорцевого листка (Agarwal *et al.*, 2009; Zale *et al.*, 2009). До початку цвітіння проводили кастрування, залишаючи по 12–14 колосків на колос. Після цього на кожний колос вдягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу та проводили етикетування. Через три доби проводили інокуляцію суспензією культури агробактерій, яку наносили на приймочки маточок за допомогою автоматичного дозатора. Після нанесення суспензії колоси знову ізолювали. Після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилком, отриманим з інтактного колоса тієї ж рослини.

Частину листків покоління T<sub>1</sub> аналізували на присутність послідовностей генів *nptII*, *sgfp* і вірулентності (*VirC*) за використання полімеразної ланцюгової реакції.

Реакційні суміші включали: специфічні праймери, по 2 мкл буфера для ПЛР 10x DreamTaq™ Green Buffer (Thermo Fisher Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфату (Thermo Fisher Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 30 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q™.

**Генетична трансформація кукурудзи.** Для трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101, який містив вектори pCB133 та pCB135. До складу векторів входили гени *CP4 epsps* під контролем промотора гена 35S вірусу мозаїки цвітної капусти та гени – *bar*, продукт якого надає стійкість до фосфінотрицину, або *nptII*, продукт якого забезпечує стійкість до канаміцину, паромоміцину та інших аміноглікозидних антибіотиків, під контролем промотора нопалінсинтази, залежно від вектора (pCB133 містив ген *bar*, а pCB135 – ген *nptII*). *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію калюсу кукурудзи виконували за методикою (Sidorov, Duncan, 2009). Після трансформації калюси переносили на модифіковане середовище N6, яке містило 5 мг/л фосфінотрицину, якщо використовували вектор pCB133, або 0,1 мМ гліфосату після трансформації вектором pCB135, та культивували у темряві при 27 °C. За два тижні калюси висаджували на свіжі середовища із фосфінотрицином і гліфосатом, де концентрація гліфосату була збільшена до 0,25 мМ, та вирощували за тих самих умов. Відібрані стійкі до гербіциду калюси пересаджували на регенераційне середовище MSGR (Sidorov, Duncan, 2009), яке містило 0,25 мг/л БАП, 500 мг/л цефотаксиму та 5 мг/л фосфінотрицину при використанні вектора pCB133 або 0,01 мМ гліфосату, якщо використовували вектор pCB135 і культивували в умовах освітлення при температурі 24–26 °C та 14-годинному фотоперіоді. Через 6 тижнів культивування калюси переносили на регенераційні середовища з антибіотиком цефотаксимом. Індуковані пагони для укорінення були висаджені на безгормональне середовище MS, яке містило 500 мг/л цефотаксиму. Пагони, які утворили корені, переносили в горщики з ґрунтом та вирощували в умовах теплиці.

**Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи.** Донорні рослини вирощували у польових умовах. Незрілі зародки через 10–12 діб після запилення ізолювали з донорних рослин, стерилізували та експлантували на живильне середовище для калюсогенезу *in vitro* (Нітовська та ін., 2012). Через 2–16 діб культивування зародки, на щитках яких почали розвиватися калюси, піддавали біолістичній трансформації. В експериментах використовували вектор pANC25, який містить ген  $\beta$ -глюкуронідази *uidA* та ген фосфінотрицинацетилтрансферази *bar*, обидва під контролем промотора убіквітину кукурудзи. Пагони регенованих рослин відокремлювали від калюсу та висаджували на селективне середовище. Паралельно проводили гістохімічний аналіз на наявність експресії гена *uidA*. Рослинну ДНК аналізували методом ПЛР на наявність послідовності трансгена *bar*.

**Моніторинг розповсюдження генетично модифікованих рослин.** Розповсюдження трансгенних ліній кукурудзи (Mon810, Bt176, GA21, NK603) на теренах України визначали методом класичної ПЛР, яка використовується для детекції цих трансформаційних подій, та її модифікацій. Розроблено мультиплексну реакцію для детекції трансформаційної події GA21 з одночасною ампліфікацією

гена зеїну кукурудзи та трансформаційних подій MON810 та NK603. Досліджували 250 зразків насіння харчової кукурудзи, зібрані у торгівельній мережі міста Києва та селекційних колекціях. Вибірка харчових продуктів для моніторингу ГМ-сої включала в себе: ковбаси, сосиски, фарш соєвий, харчові добавки, халву, соєве молоко, дитяче харчування, білий шоколад, крабові палички, соєвий білок, каші.

**Молекулярно-генетичні методи.** Нами створено колекцію загальної ДНК 143 сортів пшениці та 99 сортів ячменю. Окрім того, виділяли загальну ДНК селекційних ліній пшениці, на яких проводили апробацію та впровадження розроблених методичних підходів. ДНК виділяли ЦТАБ методом та ЦТАБ-експрес методом, що передбачають використання лізуючого буфера, який забезпечує якісне переведення ДНК в розчин з мінімальними втратами. Після виділення за допомогою ЦТАБ методу проводили спектрофотометричне та електрофоретичне дослідження загальної рослинної ДНК. Концентрацію ДНК у зразках визначали спектрофотометрично. Згідно з отриманими результатами готували розведення ДНК з концентрацією 30 нг/мкл для проведення полімеразної ланцюгової реакції на референтні та цільові гени. По завершенню проводили електрофоретичне дослідження виділеної ДНК в 0,8 % агарозному гелі. При цьому визначали наявність високомолекулярних фракцій ДНК, які є необхідними для ПЛР. Виділення загальної ДНК ЦТАБ-експрес методом проводили згідно з методикою Stewart and Via (Stewart and Via, 1993).

Використовували праймери для аналізу алельного складу локусів генів господарсько-цінних ознак згідно з рекомендаціями виробника. Праймери синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Робочі розчини праймерів зберігали у концентрації 10 мМ у стерильному ТЕ буфері рН 8,0 при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Контроль наявності достатньої кількості ДНК здійснювали за допомогою референтних генів пшениці або ячменю, відповідно. Для контролю якості виділеної ДНК колекційних сортів пшениці використовували ПЛР на референтні гени *actin* (Genbank accession AB181991), *TaTM20* (Genbank accession DQ323065) та *ga3pd* (Genbank accession FN429985). В якості негативного контролю використовували ТЕ буфер. Продукти реакції визначали за допомогою електрофорезу розчинних препаратів ДНК у 1,2 % агарозному гелі. При проведенні полімеразної ланцюгової реакції використовували склад стандартної реакційної суміші. Для оптимізації ряду реакцій використовували техніку низхідної ПЛР (Rubie et al., 1999). Розділення продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу у 1,2–2,5 % агарозних гелях (Brody and Kern, 2004). Візуалізацію продуктів ампліфікації здійснювали в ультрафіолетовому світлі та фіксували за допомогою фотосистеми Canon EOS 600D.

Виділення та розділення глютенінової фракції білків зерна пшениці здійснювали згідно (Рибалка та ін., 2007), що передбачає екстрагування глютенінової фракції етанолом з наступним розділенням білкових субодиниць шляхом ДСН ПААГ.

Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу (Sokal, Rohlf, 1981; Лакин, 1990; Ihaka, Gentleman, 1996; Чумак та ін., 2009).

## ПРИНЦИПИ КОНСТРУЮВАННЯ ВЕКТОРІВ ТА ДОБІР ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДНК ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН

**Вивчення послідовності гена *SHP1* у мохів Антарктики.** Мохи Антарктики є перспективними для вивчення генів стійкості, які кодують малі гідрофобні білки і активуються при впливі більшості стресових чинників – зневодненні, надмірному засоленні, зниженій температурі. Метою роботи було дослідження колекції зразків антарктичних мохів на наявність гомологічних генетичних послідовностей гена малого гідрофобного білка *shp1*. Для ґрунтового проведення дослідження було здійснено пошук доступних у генетичному банку даних National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank послідовностей цільового гена *shp1*. Як модельний організм було обрано мох *Physcomitrella patens* через його всебічну вивченість та вже здійснене повне секвенування геному. Зібрано інформацію про кодуючу послідовність гена, наявність інтронів, доменну структуру, його оточення. Також був проведений пошук гена інтересу серед рослин різних таксонів, який показав не лише значне поширення шуканих послідовностей, а й подібність кодуючої частини досліджуваного гена навіть у віддалених видів, таких як мох, плаунок, ялина канадська, рис, кукурудза. На рис. 3 схематично показано ділянки збігу генетичних послідовностей з високою вагою вирівнювання.

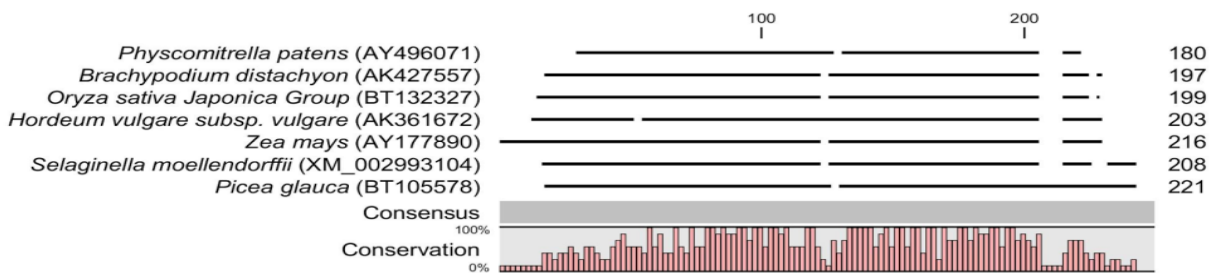


Рис. 3. Результати вирівнювання кодуючої послідовності мРНК гена *shp1* моху *P. patens* з найбільш гомологічними послідовностями інших організмів

Аналіз трансльованої послідовності мРНК гена *shp1* також показує високу консервативність амінокислотного складу відповідного білка навіть у віддалених видів (рис. 4).

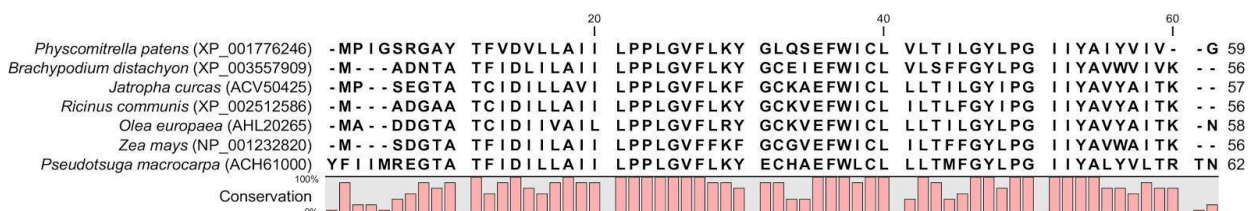


Рис. 4. Вирівнювання амінокислотної послідовності білка SHP1 моху *P. patens* з гомологічними послідовностями інших рослин

На основі аналізу структури гена *shp1* моху *P. patens* було підібрано кілька пар праймерів. Пара SHP1F1–SHP1R1 (відповідно 5'-GGT TCA CGA GGC GCT TAC ACG-3' та 5'-CCC AGG ATT GTC AGC ACG AG-3') підбиралася комплементарною до консервативного домена нуклеотидної послідовності гена, що збільшує



ймовірність виявлення саме гена інтересу через його низьку варіабельність у різних видах. На противагу пара праймерів SHP1F3–SHP1R3 (5'-TGT CCA GTG CTC TGC TTG TT-3' та 5'-TCA CTC CGA TGA GGC TAA GGA-3') має місце посадки в околі кодуючої послідовності гена, забезпечуючи покриття обох екзонів та інтрону і відзначається хорошими термодинамічними характеристиками, що може покращити ампліфікацію фрагмента. Праймери для синтезу ДНК та кДНК генів *shp* конструювали за допомогою програми Primer-BLAST (NCBI).

Нами були проаналізовані ДНК-послідовності різних видів антарктичних мохів на наявність гена *shp1* та подібність його структури і послідовності до таких у *P. patens*. При дослідженні кодуючої послідовності гена *shp1* у геномній ДНК *P. patens* виявлено фрагмент довжиною близько 350 п.н., що відповідає очікуваному (рис. 5).

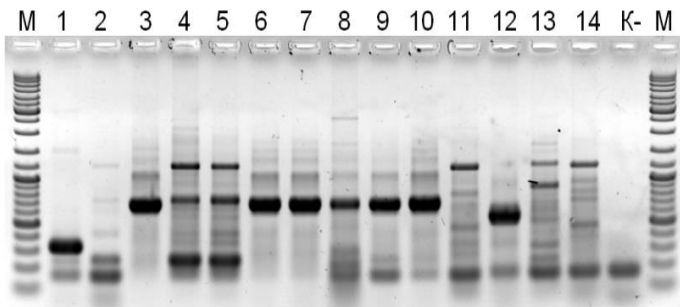


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами SHP1F1-SHP1R1 на матриці геномної ДНК. Доріжки: 1 – *P. patens* (референт), 1–13 – досліджувані зразки, К – негативний контроль, М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Найбільшу відповідність сигналів ПЛР до референту показав вид *Warnstorfia fontinaliopsis*, що дозволяє стверджувати про наявність та високу гомологічність гена *shp1* в його геномі. Такий висновок також підтверджується стійкістю цього виду до різноманітних стресових чинників (Backert *et al.*, 1997), а тому саме він був залучений до наступної стадії роботи – отримання кДНК цільового гена. Для перевірки активності гена *shp1*, а саме його транскрибування, виділяли загальну РНК. Для здійснення зворотної транскрипції матричної РНК у реакційну суміш для синтезу першого ланцюга кДНК на матриці мРНК додавали праймери Oligo(dT)<sub>18</sub>, dNTP Mix, RiboLock RNase inhibitor та зворотну транскриптазу RevertAid згідно з рекомендаціями виробника Thermo Fisher Scientific.

Серед перевірених зразків на матриці отриманої кДНК було проведено ПЛР із ген-специфічними праймерами SHP1F1–SHP1R1. Виявлено, що ампліфікація відбувається не на всіх зразках, а лише на *Physcomitrella patens* та *Warnstorfia fontinaliopsis*. Були отримані фрагменти очікуваної довжини 180 п.н., що підтверджується також біоінформатичним аналізом. Це може свідчити про експресію в цих видів гена *shp1* та його високу гомологічність у геномі.

Після виділення амплікону проводили його лігування з попередньо розлінієним по сайту SmaI у полілінкері вектором pUC19. Даний вектор був обраний через його багатокопійність, невелику довжину (усього 2686 п.н.), наявність декількох близькорозміщених унікальних сайтів рестрикції (полілінкер) та зручний селективний ген стійкості до антибіотику ампіциліну. Отриманою векторною конструкцією здійснювалася трансформація *E. coli* хімічним методом, включно з тепловим шоком. Проводили скринінг отриманих можливих трансформантів на

селективному середовищі з ампіциліном та X-Gal + IPTG. Відбирали колонії білого кольору (рис. 6) у кількості 20–40 штук для кожного отриманого фрагменту, який залучався до лігування.

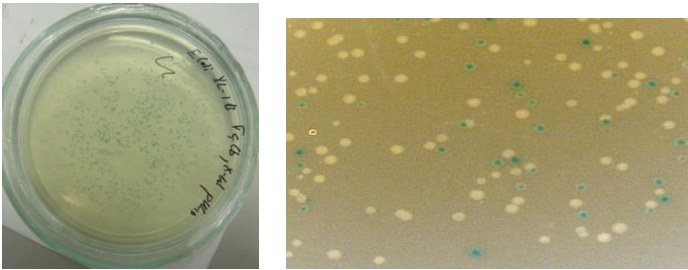


Рис. 6. Відбір трансформованих клітин на селективному середовищі з ампіциліном, барвником X-GAL та IPTG

На основі результатів рестрикції відбирали клони, які містили плазмиду зі вставкою, відповідною гену інтересу. Такі клони готувалися до сиквенування (рис. 7).

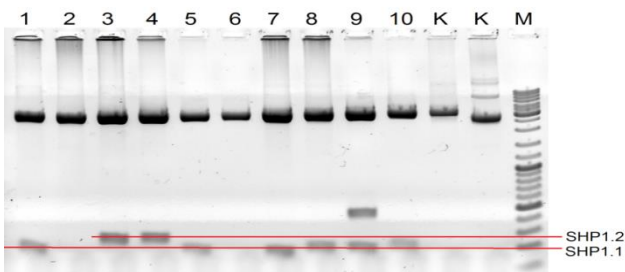


Рис. 7. Типова електрофореграма продуктів рестрикції EcoRI/HindIII для скринінгу клонів з рекомбінантними плазмідами

Для сиквенування плазмідної ДНК використовували праймери M13For і M13Rev, специфічні до плазмиди в околі полілінкеру, захоплюючи його і вставку, інтегровану в плазмиду. Клоні A2.6 та A2.13 відповідали ділянці кДНК гена *shp1* *Warnstorfia fontinaliopsis*. При вирівнюванні на геном *Physcomitrella patens* виявлено, що досліджувана ділянка відповідає консервативному домену білка Pmp3 дріжджів, який, як припускається, бере участь у транспортуванні іонів крізь мембрану (рис. 8). Аналіз показав наявність 4-х нуклеотидних замін, з яких одна є значимою (заміна серину на аргінін).

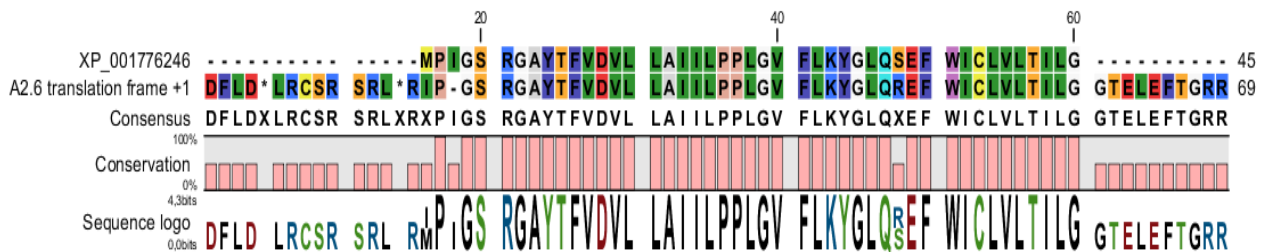


Рис. 8. Вирівнювання гіпотетичної послідовності частини білка SHP1 *Warnstorfia fontinaliopsis* на референтну послідовність *Physcomitrella patens* (XP\_001776246)

Ми припускаємо, що дана заміна відіграє ключову роль у функціонуванні білка SHP1 в якості фактора захисту рослини від абіотичних чинників у моху *W. fontinaliopsis* і є його відмінною характерною рисою. Клон A2.10 відповідав кДНК гена *shp2* моху *W. fontinaliopsis* при вирівнюванні на референтну

послідовність *P. patens*. Для клону A2.10 було показано наявність дев'яти нуклеотидних замін, однак жодна з них не є значимою і не призводить до змін у білковій послідовності.

**Клонування і молекулярно-генетична характеристика послідовностей ДНК мітохондрій *Deschampsia antarctica*.** Метою роботи було виділення та аналіз мітохондріальної ДНК представника антарктичної флори *Deschampsia antarctica*. Для отримання комплементарної ДНК спершу проводили зворотну транскрипцію пулу матричної РНК, виділеної з рослинного матеріалу, а потім ПЛР на основі ген-специфічних праймерів. Для реакції зворотної транскрипції використовували специфічний до сайту поліаденілювання РНК праймер Oligo(dT). Для клонування отриманих фрагментів ДНК в якості вектора використовували плазмиду pUC19. Для проведення реакції лігування вектор pUC19 та мтДНК попередньо піддавали обробці ендонуклеазою HindIII (для переведення в лінійну форму) та лужною фосфатазою (для вилучення 5'-фосфатних груп). Для відбору колоній зі вставками фрагментів мтДНК до середовища додавали X-gal, що дозволяло візуально виявити трансформовані клітини. Клітини, що містили рекомбінантні плазмиди, були білого кольору, оскільки в них була відсутня активна  $\beta$ -галактозидаза.

Підготовлені компетентні клітини *E. coli* трансформували методом електропорації. Розділення вставки та плазмиди проводили в 1,2 % агарозному гелі, попередньо обробивши плазмиду рестриктазою другого типу HindIII. Сиквенування послідовностей мітохондріальної ДНК проводили у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за допомогою ДНК аналізатора Applied Biosystems моделі 3130 за методом Сенгера. Біоінформатичний аналіз сиквенованих послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica* проводили застосовуючи алгоритм BLAST NCBI (BLAST – basic local alignment search tool). Створено бібліотеку рекомбінантних клонів. Величина клонуваних послідовностей коливалася в межах від 200 до 4000 п.н. При цьому зустрічалися фрагменти однакової довжини, для розділення яких використовували три суміші різних ендонуклеаз рестрикції (рис. 9). В першій суміші використовували ферменти HindIII, EcoRI, PstI, в другій – HindIII, EcoRI, Sall, в третій – HindIII, EcoRI, PstI, Sall.

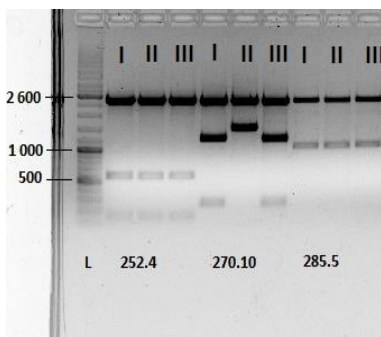


Рис. 9. Електрофореграма рекомбінантних клонів pDac: L – Ladder Mix (маркер молекулярної маси); арабськими числами позначено номер клону; римськими числами позначено рестрикційну суміш, яку використовували для аналізу I – HindIII, EcoRI, PstI; II – HindIII, EcoRI, Sall; III – HindIII, EcoRI, PstI, Sall

На другому етапі проводили сиквенування відібраних фрагментів з праймера M13REV. Дві із шести сиквенованих послідовностей (клони pDac15 та pDac22) дали незадовільний результат при сиквенуванні, що може бути пояснено забрудненням чужорідною ДНК, або недостатньою очисткою компонентів суміші. Довжина

сиквенованого фрагмента клону рDac.270.4 була 948 п.н., клону рDac.270.10 – 944 п.н., рDac.283.5 – 935 п.н., рDac.295.3 – 936 п.н.

На третьому етапі аналізували сиквеновані послідовності і порівнювали їх із вже відомими мітохондріальними геномами. Порівняльний аналіз генетичних послідовностей вставок вказав на наявність наступних генів: рDac.270.4 – 1-ша та 5-та субдиниці NADH-дегідрогенази; рDac.270.10 – рибосомальна РНК 26S та відкрита рамка зчитування; рDac.283.5 – 1-а субдиниця NADH-дегідрогенази; рDac.295.3 – 1-ша та 5-та субдиниці NADH-дегідрогенази.

Була виявлена гомологія до представників родини Злакових (Poaceae). Найбільша гомологія спостерігалася до ділянок мітохондріальних геномів пшениці (*T. aestivum*), рису (*O. sativa*), бамбуку (*B. oldhamii*): рDac.270.4 – *Triticum aestivum* (98 %); рDac.270.10 – *Oryza sativa Indica Group* (91 %); рDac.283.5 – *Bambusa oldhamii* (98 %), *Triticum aestivum* (97 %); рDac.295.3 – *Bambusa oldhamii* (99 %), *Triticum aestivum* (98 %). Також спорідненість спостерігалась до видів *Sorghum bicolor*, *Zea mays* та ін. Наявність варіабельності у послідовностях дають підстави припускати, що саме ці варіабельні ділянки можуть відповідати за унікальні властивості щучника антарктичного.

## **AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ**

**Оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*.** Процес добору оптимального живильного середовища – основа біотехнології рослин, і зокрема пшениці, тому нами була проведена його оптимізація шляхом варіювання синтетичних регуляторів росту. Вивчено вплив БАП у різних концентраціях (0,5–1,0 мг/л) при сталому вмісті дикамби (0,2 мг/л) або піклораму (0,15 мг/л) на частоту регенераційних процесів. Як базове використовували середовище МС доповнене вітамінами за Гамборгом та 10 мг/л AgNO<sub>3</sub>. При внесенні 1 мг/л БАП у регенераційне середовище МС, доповнене дикамбою (0,2 мг/л), на 35-ту добу культивування спостерігали найвищу частоту регенерації. Калюс відзначався високим відсотком морфогенезу (81,3 %) та задовільним фізіологічним станом. При зниженні вмісту досліджуваного регулятора росту до 0,75 мг/л кількість утворених пагонів помітно зменшувалася.

При внесенні 0,5 мг/л БАП у живильне середовище МС, доповнене піклорамом (0,15 мг/л), спостерігали максимальне пагоноутворення порівняно з контролем та відсотком регенерації на середовищах, які містили інші концентрації БАП. Підвищення вмісту БАП спричиняло зниження регенераційної активності. Виявлено, що за наявності у живильному середовищі дикамби спостерігається нижчий відсоток пагоноутворення порівняно із середовищами з піклорамом.

Нами вперше вивчено вплив синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту – піклораму та дикамби – на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. Для цього визначали вплив різних концентрацій дикамби (0,2–0,6 мг/л) або піклораму (0,15–0,5 мг/л) при сталій концентрації БАП. Показано, що найбільш ефективним є використання у середовищі 0,2 мг/л дикамби за якого спостерігалось швидке утворення морфогенних ділянок та найбільшої кількості

пагонів. При додаванні в живильне середовище більших концентрацій дикамби (0,4–0,6 мг/л) відбувається сповільнення росту калюсу, зниження частоти утворення морфогенних зон і регенерації. При додаванні в регенераційне середовище піклораму у низьких концентраціях відбувається стимуляція морфогенетичних процесів. За найнижчої дослідженої його концентрації (0,15 мг/л) утворювалась найбільша кількість морфогенних осередків (до 70 %), а також пагонів на 30–35-ту добу культивування. Збільшення концентрації піклораму до 0,25–0,5 мг/л зумовило зменшення кількості морфогенних калюсів на 10 % та 36,4 %, відповідно.

**Розробка протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*.** Для розробки протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* використовували бактеріальні штами C58 та GV3101, генетичні вектори p014 (ген інтересу *nptII*, та маркерний – *sgfp*) та pCB203 (ген інтересу *bar*, маркерний – *uidA*) та 18-добовий калюс пшениці сортів 'Зимоярка' та 'Подольнка'. Використовували методику (Sidorov, Duncan, 2009) з певними модифікаціями: окремі колонії агробактерій переносили з агаризованого середовища LB у 25 мл рідкого живильного середовища LB, доповненого 100 мг/л канаміцину та спектиноміцину (C58); 100 мг/л карбеніциліну, 25 мг/л гентоміцину, 50 мг/л ріфампіцину (GV3101). Отриману суспензію культивували протягом ночі на ротаційному шейкері за 200 об/хв і температурі 26 °С. Наступного ранку бактеріальну суспензію розводили 1:5 свіжим середовищем LB та центрифугували за 4000 об/хв протягом 15 хв. Зливши супернатант, клітини ресуспендували в 10 мл індукційного середовища, яке містило 200 мкМ ацетосирінгону та відповідні антибіотики. Оптичну щільність доводили до  $OD_{600} = 0,2$  оп.од. Отриману суспензію *A. tumefaciens* повторно культивували протягом ночі на ротаційному шейкері за 200 об/хв і температурі 26 °С. Нічну культуру агробактерій осаджували центрифугуванням за 5000 об/хв і ресуспендували в 6–10 мл інокуляційного середовища, доповненого 200 мкМ ацетосирінгону. Оптичну щільність бактеріальної суспензії доводили до  $OD_{600} = 0,4$  оп.од.

В якості селективного агента для ефективного відбору трансформантів за використання генетичної конструкції p014 використовували антибіотики канаміцин та паромоміцин у концентрації 100 мг/л, а для pCB203 – фосфіотрицин (5 мг/л). Частота утворення морфогенного калюсу на середовищі з канаміцином в середньому становила  $44,9 \pm 2,9$  % – у сорту 'Зимоярка' та  $40,3 \pm 1,3$  % – у сорту 'Подольнка', а частота регенерації становила  $18,8 \pm 0,8$  % та  $16,5 \pm 1,4$  %, відповідно. За використання паромоміцину в якості селективного агента поява меристематичних осередків розпочиналася значно раніше (5–10-й день культивування), ніж у випадку використання канаміцину. Частота утворення морфогенного калюсу також була вищою –  $48,5 \pm 2,1$  % ('Подольнка') та  $51,3 \pm 2,5$  % ('Зимоярка'). З метою підтвердження наявності послідовності трансгена *nptII* в регенерованих пагонах проводили ПЛР-аналіз. За його результатами позитивний сигнал наявності послідовності гена *nptII* – амплікон довжиною 647 п.н. – виявлено у 20 рослин-регенерантів пшениці сорту 'Подольнка' та 23 – сорту 'Зимоярка', що становить 2,7 % та 2,4 % від загальної кількості трансформованих експлантів, відповідно.

**Отримання трансгенних рослин пшениці м'якої, стійких до фосфіотрицину (гербіцид Баста®).** Для трансформації, опосередкованої

*A. tumefaciens*, використовували генетичний вектор pCB203. Бактеріальною суспензією було оброблено 960 шт. 4–6-добових калюсів. Калюс отримували з незрілих зародків пшениці сорту ‘Зимоярка’. Після трансформації формування первинних меристематичних осередків розпочиналося на 5-й день. Відсоток утворення морфогенного калюсу в середньому становив  $68,9 \pm 2,5$  %. На 10-ту добу культивування починали з’являтися пагони. Після первинної селекції було отримано 174 пагони, які переносили на середовище для вкорінення. Частота регенерації становила  $18,1 \pm 0,6$  %. З метою підтвердження наявності послідовності трансгена *bar* проводили аналіз за допомогою ПЛР. За його результатами позитивний сигнал присутності послідовності гена *bar* – амплікон довжиною 405 п.н. (рис. 10) – виявлено у 12 рослин-регенерантів пшениці, що становить 1,2 % від загальної кількості оброблених бактеріальною суспензією експлантів. Для виключення можливості бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності, а саме *VirC*. Результати ПЛР-аналізу свідчать про відсутність бактерії в рослинних зразках та дозволяють стверджувати, що відбулася інтеграція трансгена в рослинний геном.

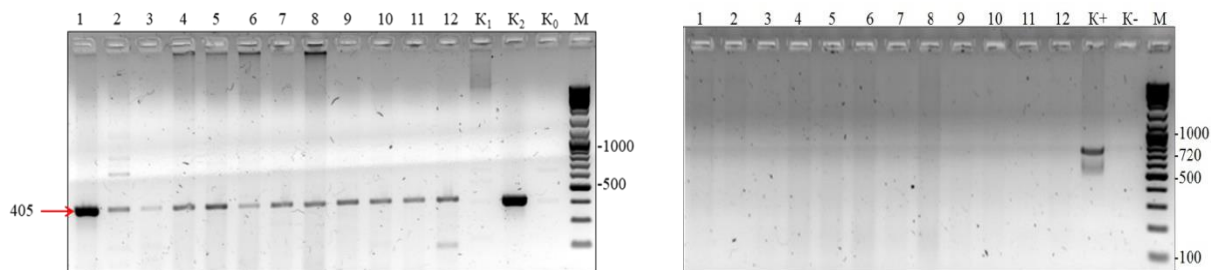


Рис. 10. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до генів *bar* (ліворуч) та *VirC* (праворуч)

Також була проведена трансформація 18-добового калюсу апікального походження обох сортів. У дослідження було залучено 1750 шт. калюсів сорту ‘Подільянка’ та 2145 шт. – сорту ‘Зимоярка’. Частота трансформації калюсу пшениці апікального походження за використання *A. tumefaciens* штамів C58 та GV3101 у сорту ‘Зимоярка’ становила, відповідно, 2,7 та 1,6 %, а у сорту ‘Подільянка’ – 1,6 та 1,8 %.

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці м’якої методом *in planta*.** Для досліджень використовували штам C58 *A. tumefaciens* з генетичною конструкцією p014, до складу Т-ДНК якої входять гени *nptII* і *sgfp*. Бактерію нарощували у рідкому середовищі Himedia M002 (Supartana *et al.*, 2006) з відповідними антибіотиками (спектиноміцин 50 мг/л та канаміцин 100 мг/л) на шейкері протягом 16 год. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням за 5000 об/хв протягом 10 хв і ресуспендували у стерильній дистильованій воді до оптичної щільності  $OD_{600} = 1,0$  оп.од. До суспензії бактерій додавали 100 мкМ ацетосирінгону та 0,05 % Silvet L77, рН доводили до 4,0. Колоси сорту ‘Подільянка’ кастрували та обробляли агробактеріальною суспензією. Запилення проводили пилком, отриманим з іншого колоса тієї ж рослини. Середня зав’язуваність насіння для оброблених бактеріальною суспензією колосів становила  $46,4 \pm 2,4$  %. Серед проаналізованих 175 рослин  $T_1$  тільки у дев’яти (5,1 %) виявлено позитивний сигнал наявності послідовності гена *nptII* – амплікон довжиною 647 п.н. У досліджуваних

9-ти зразків наявність послідовності гена *sgfp* – амплікон довжиною 311 п.н. – виявлений тільки у 4-х, що становить 2,3 % від протестованих 175 рослин.

Для досліджень також використовували штам GV3101 *A. tumefaciens* з генетичною конструкцією pCB203, Т-ДНК якої включає послідовності генів *uidA* та *bar*. Бактеріальну суспензію для генетичної трансформації *in planta* отримували за методикою (Sidorov, Duncan, 2009) з певними модифікаціями: з інокуляційного середовища повністю виключали сахарозу. Оптична щільність використаної суспензії була  $OD_{600} = 1,0$  оп.од. За допомогою методу *in planta* одержано 9 рослин пшениці сорту ‘Подольнка’, трансгенних за обома генами – *nptII* та *sgfp*. Частота трансформації становила 2,3 %.

**Отримання біотехнологічних рослин пшениці м'якої сорту ‘Подольнка’, стійких до фосфінотрицину, методом *in planta*.** У дослідженні використовували *A. tumefaciens* штаму GV3101, який містив генетичну конструкцію pCB203. Отримані нами дані свідчать, що температурний режим  $t \approx 24^\circ\text{C}$  та помірна вологість повітря (44 %) забезпечує отримання максимальної кількості (7,3 %) трансформантів. За тієї ж температури, проте вищої вологості, отримано меншу їх кількість (5,5 %). При зниженні температури до  $16\text{--}18^\circ\text{C}$  відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном. Використовуючи методику генетичної трансформації з певними модифікаціями (відсутність в середовищі для інокуляції сахарози) отримано трансформанти з частотою за генами *bar* (15,6 %) та *nptII* (20,7 %). Наявності послідовності трансгена *sgfp* у відібраних зразках не виявлено, що свідчить про неповне вбудовування генетичної конструкції.

**Дослідження експресії трансгенів у рослинах пшениці *T. aestivum*.** Дослідження експресії трансгенів *nptII* та *bar* у рослинах пшениці сорту ‘Подольнка’ здійснювали на рівні транскрипції. Для цього проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). ПЛР-аналіз синтезованої в ході реакції зворотної транскрипції кДНК показав наявність експресії гена *nptII* у всіх зразках, а гена *bar* у 50 % відібраних зразків (рис. 11).

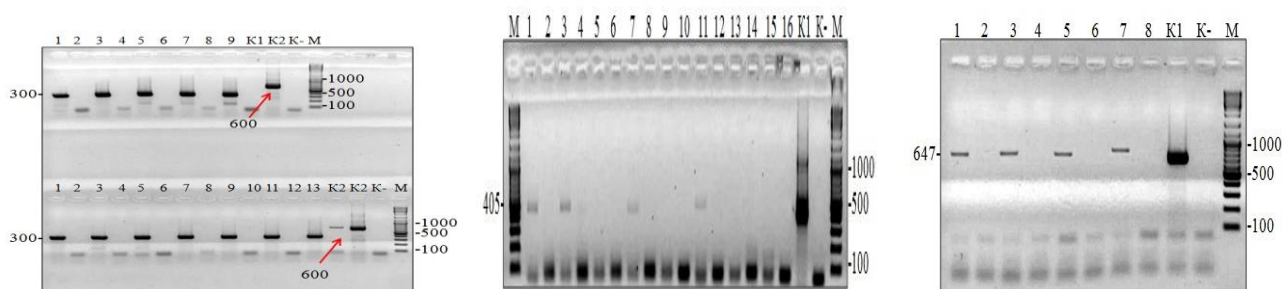


Рис. 11. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена TaG3PDH (кДНК, синтезована за допомогою реверсивної транскриптази з РНК трансгенних рослин пшениці) (ліворуч); гена *nptII* (посередині); гена *bar* (праворуч)

Рослини пшениці, які за результатами ПЛР-аналізу містять ген *bar*, досліджували на стійкість до гербіциду Баста® (активна речовина L-фосфінотрицин). Для цього їх обробляли розчином гербіциду, рекомендованою виробником концентрацією 1,5 мг/мл. За результатами фізіологічного тесту стійкість проявили 25 % від загальної кількості проаналізованих рослин.

**Аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній та рослин-регенерантів м'якої пшениці.** Методом біолістичної трансформації нами були отримані трансформовані клітинні лінії м'якої пшениці та підтверджений їх трансгенний статус. За використання IRAP-ПЛР з праймером до LTR послідовностей ретротранспозону SIRE1, у трьох трансформованих ліній – LT2, LT6 та LT7 виявлено появу нових, відносно високомолекулярних (довжиною більше 1000 п.н.) ампліконів, що свідчить про транспозицію даного мобільного елемента. Оскільки нові фрагменти ДНК виявлені у трьох із семи досліджуваних ліній та були відсутні у контрольному калюсі, це може свідчити, що індукція транспозиції SIRE1 можливо зумовлена геномним стресом, спричиненим вбудовуванням чужорідної ДНК, або стресом, безпосередньо пов'язаним з процесом трансформації. Нами також проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами різних ретротранспозонів, у генетично-модифікованих рослин пшениці, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази (рис. 12). За використання вискоефективних праймерів до ретротранспозонів Sukkula, Sabrina, Wham, Nikita та Wilma1, а також підібраних пар цих IRAP-праймерів, у трансгенних рослин не виявлено поліморфізму ДНК, що свідчить про відсутність активації транспозиційної активності МГЕ у досліджених трансгенних рослин.

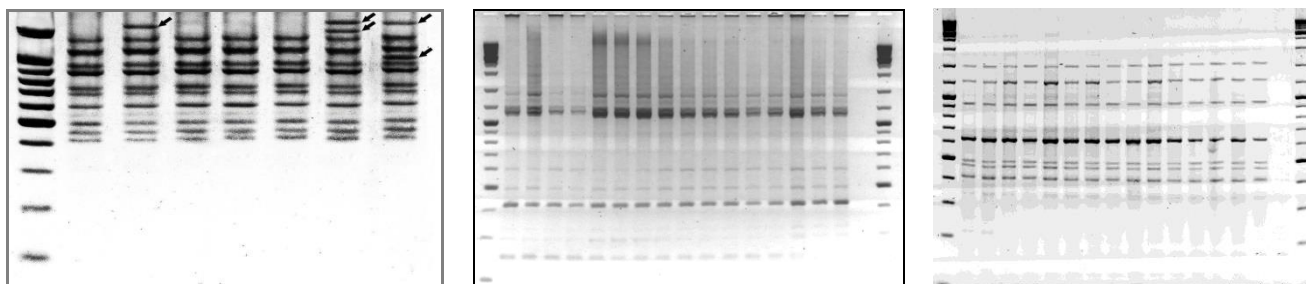


Рис. 12. *Ліворуч* – спектр продуктів ампліфікації ДНК: М – маркер молекулярних мас (100 bp DNA Ladder); 1 – клітинна лінія LT1; 2 – клітинна лінія LT2; 3 – клітинна лінія LT3; 4 – клітинна лінія LT4, 5 – клітинна лінія LT5; 6 – клітинна лінія LT6; 7 – клітинна лінія LT7. Стрілками показано нові амплікони. *Посередині* – спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків на прикладі використання праймера до ретротранспозону Sukkula. *Праворуч* – спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за використання пари праймерів Sukkula/Nikita.

## ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ КУКУРУДЗИ *IN VITRO*

**Оптимізація умов трансформації.** Для перенесення гена *CP4 epsps* в геном кукурудзи нами застосована схема селекції на етапі регенерації, яка передбачає 2–3 пасажі калюсу на середовищі з 0,01 мМ гліфосату, а потім культивування без нього на завершальних етапах добору трансгенних рослин. Встановлено, що гліфосат у концентрації 0,01 мМ не чинить жорсткого незворотного впливу на регенераційний потенціал калюсу, а має більш позитивну дію порівняно з фосфінотрицином. Нами був виокремлений гібрид R<sub>2</sub>PLS61×PLS61, надзвичайно



перспективний для досліджень з генетичної трансформації кукурудзи у зв'язку з його високим регенераційним потенціалом, який зберігається протягом тривалого культивування.

**Agrobacterium-опосередкована трансформація морфогенного калюсу кукурудзи гібрида  $R_2PLS61 \times PLS61$ .** Для генетичної трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101, який містив вектори pCB133 та pCB135. Загалом було оброблено 392 калюси гібрида  $R_2PLS61 \times PLS61$  вектором pCB133 та 408 калюсів вектором pCB135. На середовищі із гліфосатом спостерігали множинну регенерацію пагонів. Її частота після трансформації вектором pCB133 становила 3,3 % та 11,5 % – після трансформації вектором pCB135. 26 пагонів, отриманих після трансформації вектором pCB133, та 129 регенерантів кукурудзи, отриманих після трансформації вектором pCB135, для укорінення були висаджені в банки з безгормональним середовищем MS, яке містило 500 мг/л цефотаксиму. Пагони, які утворили корені, переносили в горщики з ґрунтом та вирощували в умовах теплиці. Загалом у ґрунт було висаджено 7 рослин, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB133, що становило майже 27 % від висаджених в банки регенерантів, та 25 рослин після трансформації вектором pCB135, що становило 19,4 % від усіх висаджених в банки регенерантів.

Регенеранти досліджували методом ПЛР на наявність трансгенів *CP4 epsps*, *nptII* та *bar*. Після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсу кукурудзи гібрида  $R_2PLS61 \times PLS61$  було отримано 5 рослин-регенерантів, які містили трансген *CP4 epsps*, продукт якого надає стійкості до гліфосату, та 1 регенерант, що мав у своїй ДНК цільовий ген, був отриманий після трансформації вектором pCB133 та селекції на середовищах із фосфінотрицином. Частота трансформації (відношення кількості «позитивних» зразків до загальної кількості проаналізованих зразків) становила 6,2 % після трансформації вектором pCB135 та 5,0 % – після трансформації вектором pCB133. 17,4 % проаналізованих калюсних ліній, відібраних на середовищах із гліфосатом після трансформації вектором pCB135, утворили трансгенні рослини, та одна лінія із п'яти проаналізованих (20 %), відібраних на середовищах із фосфінотрицином після трансформації вектором pCB133, дала початок трансгенній рослині. Нами виявлено, що кількість рослин-регенерантів гібрида  $R_2PLS61 \times PLS61$ , отриманих на селективних середовищах із гліфосатом, була більшою після використання агробактеріальної суспензії щільністю 0,3 оп.од. порівняно з 0,4 оп.од.

**Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи.** Для трансформації використовували незрілі зародки кукурудзи 21 генотипу: 8 інбредних ліній, 10 гібридів  $F_1$  та 3 соматоклональні варіанти на основі гібридів  $F_1$ . В експериментах використовували вектор pANC25, який містить ген  $\beta$ -глюкуронідази *uidA* та ген фосфінотрицинацетилтрансферази *bar*, обидва під контролем промотора убіквітину кукурудзи. Через 4 доби після обстрілу проводили гістохімічний аналіз транз'єнтної експресії гена  $\beta$ -глюкуронідази в калюсних тканинах. За інтенсивністю блакитного забарвлення найкраще в експериментах себе показали такі генотипи кукурудзи: інбредні лінії PLS61 і KC277 та гібриди  $F_1$  ДК959 $\times$ PLS61, PLS61 $\times$ ДК959, PLS61 $\times$ ПРЖ5, PLS61 $\times$ КП7 (рис. 13).

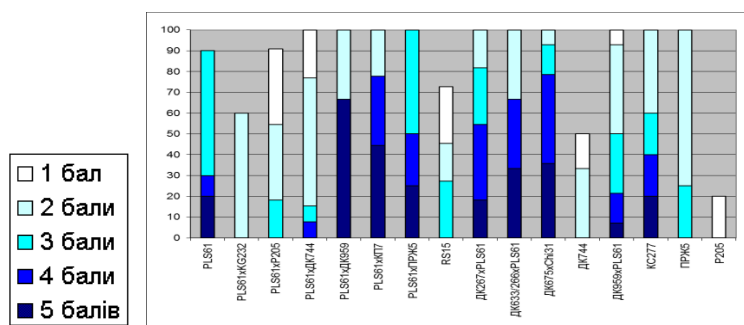


Рис. 13. Оцінка транз'єнтної експресії гена *uidA* після білістичної трансформації для різних генотипів кукурудзи

Рослинну ДНК аналізували методом ПЛР на наявність послідовності трансгена *bar* (рис. 14). Аналіз методом ПЛР показав наявність гена *bar* в рослинній ДНК стійкого до фосфінотрицину калюсу кукурудзи, який виявляв блакитне забарвлення при гістохімічному аналізі, а також для 6 ліній рослин-регенерантів.

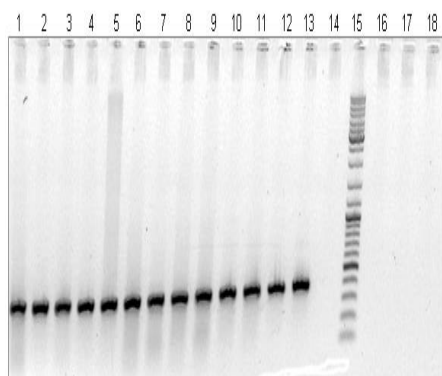


Рис. 14. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК калюсу та регенерантів кукурудзи з праймерами до гена *bar*. Доріжка 1 – ДК959♀×PLS61♂ (к., л. 3); 2 – PLS61♀×ДК959♂ (к., л. 6); 3 – ДК959♀×PLS61♂ (к., л. 1); 4 – PLS61 (р., л. 17); 5 – PLS61♀×ДК744♂ (р., л. 2); 6 – PLS61♀×ПЖ5♂ (к., л. 1); 7 – PLS61 (р., л. 2); 8 – PLS61 (к., л. 3); 9 – PLS61 (к., л. 7); 10 – PLS61 (р., л. 1); 11 – PLS61♀×ДК304♂ (р., л. 7); 12 – PLS61♀×ДК304♂ (р., л. 6); 13 – позитивний контроль; 14 – без ДНК; 15 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

Виявлено певну кореляцію між рівнями транз'єнтної експресії  $\beta$ -глюкуронідази для різних генотипів і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору компетентних для трансформації генотипів кукурудзи. В експериментах ми використовували незрілі зародки кукурудзи, які до обстрілу перебували на середовищі для калюсогенезу від 2 до 16 діб. Найкращим для трансформації рослинним матеріалом були незрілі зародки з калюсами, які до обстрілу культивувалися 9 діб. У проведених експериментах з отримання стабільних трансформантів кукурудзи методом білістичної трансформації найкраще себе показали: інбредна лінія PLS61 та гібриди F<sub>1</sub> PLS61♀×ДК744♂, PLS61♀×ДК304♂ і ДК959♀×PLS61♂. Серед 21 генотипу кукурудзи, які створені та вирощуються на території України, були відібрані 4 найбільш компетентні для білістичної трансформації. Для двох регенерантів отримано T<sub>1</sub> та T<sub>2</sub> насіннєве покоління. Методом ПЛР підтверджено наявність гена *bar* у T<sub>2</sub> нащадків трансгенної кукурудзи.

**Морфобіологічні особливості рослин-трансформантів кукурудзи.** Проведена морфобіологічна оцінка трансформантів, які несуть чужорідний ген *bar* у поколіннях T<sub>0</sub>-T<sub>6</sub> дозволила охарактеризувати стійкість рослин за виживаністю,

основними показниками росту і розвитку. Нащадки трансформантів мають знижену схожість як в поколінні  $T_2$ , так і в  $T_3$ . Дослідження морфобіологічних показників у рослин-нащадків трансформантів показало, що вони мають деяке відставання в розвитку, зокрема, за термінами цвітіння чоловічих і жіночих суцвіть, за висотою рослини, що може розглядатися як звичайна реакція на дію стресового чинника, або як наслідок вбудовування трансгена в рослинний геном. Між рослинами серед сімей  $T_2$  та  $T_3$  спостерігається більша варіабельність за дослідженими ознаками, ніж в контролі. Це дозволяє припустити наявність рослин з різним ступенем стійкості до гербіциду. Частота виживаності рослин  $T_6$  за обробки гербіцидом становила 100 %, висота трансформантів без обробки та за умов обробки гербіцидом достовірно не різнилась, що вказує 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.

## МОНІТОРИНГ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН НА ПОЛЯХ ТА У ТОРГІВЕЛЬНІЙ МЕРЕЖІ УКРАЇНИ

*Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційної події MON810.* Ступінь розповсюдження трансгенних ліній кукурудзи (Mon810, Bt176, GA21, NK603) на теренах України визначали методом класичної ПЛР. Стійкість до комах детермінується інсектицидним токсином Cry1Ab ґрунтової бактерії *Bacillus thuringiensis*. Одним із запатентованих носіїв цієї ознаки є трансгенна лінія компанії Монсанта, так звана трансформаційна подія MON810. Досліджували 50 зразків насіння харчової кукурудзи, зібрані у торгівельній мережі міста Києва та селекційних колекціях. Для точного визначення наявності MON810-специфічних послідовностей у загальній ДНК зразків застосовували ампліфікацію ПЛР з двома парами гніздових праймерів. Використовували такі пари праймерів: *mg1-mg2* та *mg3-mg4*. Вони були сконструйовані для специфічного виявлення касети, що містить *E35S* промотор/*hsp70* екзон-інтрон за допомогою гніздового метода ПЛР. Дана генна конструкція є специфічною для лінії кукурудзи MON810 (рис. 15).

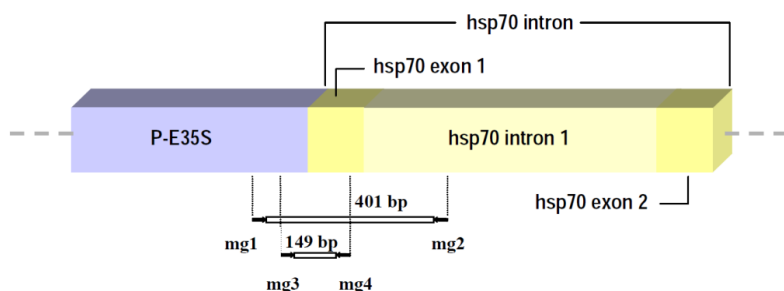


Рис. 15. Схематичне зображення частини ДНК-касети кукурудзи лінії MON810 (включає підсилений *CaMV 35S* промотор та *hsp70* інтрон кукурудзи) та відносне розміщення праймерів *mg1, mg2, mg3, mg4*

Спочатку проводили ампліфікацію з першою парою праймерів *mg1* та *mg2*. З усіх досліджуваних зразків потенційно позитивні сигнали були виявлені лише в двох. На рис. 16 ліворуч наведена електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК

кукурудзи з праймерами *mg1* та *mg2*. За наявності специфічної смуги після першої ПЛР використовували «гніздовий» варіант ПЛР з парою внутрішніх праймерів *mg3* та *mg4* (рис. 16, праворуч). Обидва зразки було сиквененовано. Послідовності співпали на 99 %. В майбутньому достатньо подвійної гніздової ампліфікації, що швидше і простіше здійснити.

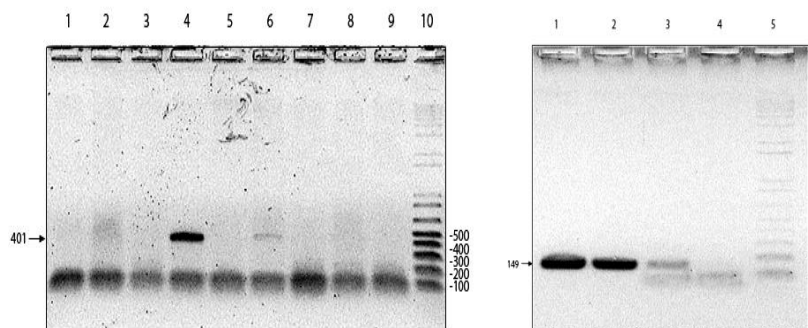


Рис. 16. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи з праймерами *mg1* та *mg2* (ліворуч); електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи з праймерами *mg3* та *mg4* («гніздовий» ПЛР) (праворуч)

Нами встановлена мінімальна кількість ДНК (3 нг), достатня для одержання достовірних результатів ПЛР. Проте, оптимальною є концентрація 10 нг/мкл. Проведений сиквенс трансгенного зразка з використанням програми BLAST на 99 % ідентичний відомій синтетичній конструкції, що відповідає трансформаційній події MON810. Це дослідження було першим повідомленням про знаходження відновлюваного джерела, тобто насіння генетично модифікованої кукурудзи зарубіжного походження на теренах України. Отримані результати уможливають підрахунок орієнтовної частоти трансгенної кукурудзи лінії MON810 в Україні. За нашими оцінками станом на весну 2009 року, вона становить приблизно 4 %.

**Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційних подій *GA21* та *NK603*.** Для дослідження було обрано 150 зразків різноманітного походження. Всі зразки були висіяні на ділянці селекційної станції м. Сміла. Зійшло близько 35 тис. рослин. Рослини були обприскані гербіцидом УРАГАН® ФОРТЕ, основною діючою речовиною якого є гліфосат. Вижило понад 400 рослин. Для підтвердження наявності трансформаційної події *GA21* провели ампліфікацію з праймерами *GA21* 3-5' та *GA21* 3-3'. Дана пара праймерів є специфічною до конструкції. Форвардний праймер *GA21* 3-5' сідає на послідовність оптимізованого хлоропластного транзитного пептиду (ОТР), а реверсний праймер *GA21* 3-3' специфічно зв'язується з послідовністю (*m*)-*EPSPS* гена (рис. 17).

Також нами було проведено аналіз цих самих зразків на наявність трансформаційної події *NK603*. Для аналізу були обрані дві пари гніздових праймерів *NK603 FR* та *No13-14*. Результати, одержані в обох дослідках, не були позитивними. Тому ми припустили, що стійкість рослин до гліфосату забезпечується саме трансформаційною подією *GA21*. Середня частота зустрічальності трансформаційної події *GA21* в Україні становить приблизно 4 % (6 позитивних сигналів на 150 досліджуваних зразків).

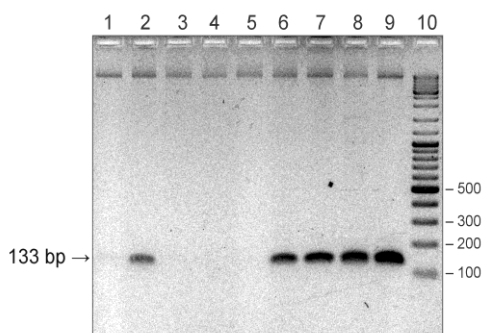


Рис. 17. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи для детекції трансформаційної події GA21: доріжки 1–8 – зразки 130–137; доріжки 9 – позитивний контроль, доріжка 10 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

**Перевірка зразків насіння кукурудзи Дніпропетровської області на присутність занесених трансгенних форм.** В результаті аналізу 40 зразків кукурудзи, зібраних у Дніпропетровській області, було виявлено один позитивний зразок, що містив трансформаційну подію Vt176, і п'ять зразків, що, імовірно, містили трансформаційну подію NK603. Отже, можна зробити висновок, що в Дніпропетровській області є генетично модифікована кукурудза, а саме трансформаційні події NK603 та Vt176. Частота зустрічальності становить 5–10 %.

**Розробка мультиплексної реакції для детекції трансформаційної події GA21 з одночасною ампліфікацією гена зеїну кукурудзи.** Розроблено умови для проведення мультиплексної реакції визначення трансформаційних подій GA21 з одночасною ампліфікацією гена *ze1* як контролю: підібрано праймери таким чином, щоб амплікони чітко розділялися методом електрофорезу – ZEIN34 (277 п.н.), GA21 FR (112 п.н.); оптимальна концентрація праймерів становить 0,5 мкМ; температура гібридизації, що забезпечує максимальний рівномірний вихід продуктів ампліфікації, становить 51 °С; застосовано режим “touchdown” з максимальною температурою 65 °С і поступовим зниженням за 15 циклів.

**Розробка мультиплексної реакції для детекції трансформаційних подій MON810 та NK603.** Розроблено умови для постановки мультиплексної реакції визначення трансформаційних подій MON810 та NK603: як праймери обрано пари mg1-2 (амплікон 401 п.н.) та NK603F-R (амплікон 108 п.н.), оптимальна температура гібридизації праймерів має становити 52 °С, кількість праймерів у реакційній суміші має бути по 0,5 мкл кожного. Застосування удосконаленої методики мультиплексної ПЛР для проведення аналізу дослідницькими лабораторіями дає змогу: знизити витрати на реактиви для ПЛР та електрофорезу; заощаджувати трудовитрати на постановку реакції; зменшити завантаження устаткування і збільшити швидкість проведення експерименту.

**Вивчення вмісту ГМ-сої у харчових продуктах.** Для аналізу зразків харчових продуктів нами була розроблена мультиплексна ПЛР, що дозволяє одночасно проводити ампліфікацію референтного гена *lectin* та трансформаційної події GTS 40-3-2. 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 лише 6 дали позитивну реакцію на трансформаційну подію GTS 40-3-2, серед них 5 зразків сої та 1 зразок харчового продукту.

## ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ У СЕЛЕКЦІЇ ЗЛАКІВ

**Розробка систем маркерів на основі ретротранспозонів для оцінки генетичного поліморфізму злакових культур.** Проведено розробку систем оцінки генетичного поліморфізму сортів пшениці та спельти на основі аналізу ділянок ДНК між ретроелементами. Розроблено дев'ять систем на основі IRAP, які дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами. Досліджено генетичне різноманіття генотипів м'якої пшениці і спельти за IRAP-маркерами, та показано рівень генетичної відмінності між досліджуваними сортами цих видів. При обробці отриманих електрофореграм було встановлено загальну кількість ампліфікованих фрагментів, кількість поліморфних фрагментів, кількість мономорфних фрагментів, а також відсоток поліморфізму окремої маркерної системи. Найбільш інформативними виявились системи Sukkula+Wisma 2 (35,7 %), Sukkula+Nikita (28,6 %) та Sukkula (27,3 %) (табл. 1).

Таблиця 1

### Характеристика різних маркерних систем за IRAP-аналізу генотипів пшениці та спельти

Маркерна система	Загальна кількість ампліфікованих фрагментів, шт.	Кількість поліморфних фрагментів, шт.	Кількість мономорфних фрагментів, шт.	% поліморфізму
Sabrina+Wham	10	2	8	20,0
Stowaway+Wilma	22	5	18	22,7
Sukkula	11	3	8	27,3
Sukkula+Nikita	14	4	10	28,6
Sukkula+Sabrina	12	2	10	16,7
Sukkula+Stowaway	16	3	13	18,8
Sukkula+Wham	22	4	18	18,2
Sukkula+Wilma	20	2	18	10,0
Sukkula+Wisma2	14	5	9	35,7

У результаті проведення експериментальної роботи показано ефективність визначення поліморфізму міжретротранспозонних ділянок ячменю з використанням праймерів до його ретротранспозонів. Праймери до ретротранспозону Sukkula дозволяють детектувати достатню кількість мономорфних та поліморфних ампліконів. Комбінування праймерів до ретротранспозону Sukkula з праймерами до інших ретротранспозонів (Wilma07, Nikita) дозволяє отримувати нові поліморфні амплікони. Це свідчить про достатню ефективність цих трьох реакцій для визначення генетичного поліморфізму ячменю.

Для підтвердження змін в геномі тритикале під дією хімічних мутагенів був проведений аналіз зеленої маси отриманих можливих мутантних рослин з використанням IRAP-маркерів. Ряд апробованих праймерів дозволив чітко відрізнити окремі рослини, геном яких зазнав істотних змін після обробки нітрозометилсечовиною та нітрозоетилсечовиною (рис. 18).

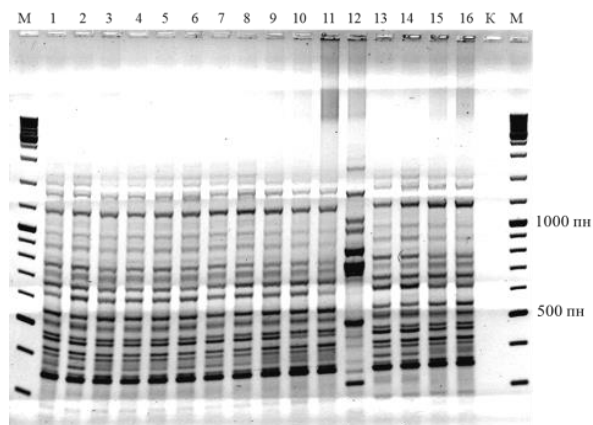


Рис. 18. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК мутантних рослин тритикале з праймерами до ретро-транспозону *Sukkula*. Доріжки 1–12 – досліджувані мутантні рослини тритикале; 13–16 – вихідний сорт тритикале, який піддавався обробці хімічними мутагенами; К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

**Визначення поліморфізму ДНК різних сортів пшениці з використанням REMAP-маркерів.** Показано ефективність визначення поліморфізму ДНК різних сортів пшениці з використанням REMAP-маркерів. Виявлено, що найефективнішими розробленими системами є *Sukkula+A17898* та *Sukkula+HB10* (табл. 2).

Таблиця 2

**Кількість фрагментів, які були отримані в ході розділення продуктів ампліфікації ДНК в системах REMAP**

Маркерна система	Загальна кількість ампліфікованих фрагментів, шт.	Кількість поліморфних фрагментів, шт.	Кількість монорфних фрагментів, шт.	% поліморфізму
<i>Sukkula+HB10</i>	10	5	5	50,00
<i>Sukkula+A17898</i>	13	3	10	23,07
<i>Sukkula+B17899</i>	12	3	9	25,00
<i>Sukkula+IS-05</i>	8	2	6	25,00
<i>Sukkula+UBC890</i>	11	2	9	18,18

Підібрані нами маркерні системи і праймери дозволяють ефективно виявляти внутрішньовидову мінливість у сортів різних злакових культур і можуть бути використані в подальших селекційних дослідженнях для їх поліпшення із застосуванням методів молекулярних маркерів.

**Розробка способів маркування функціонального алеля *Gpc-B1*.** Особливий інтерес у селекції пшениці являє ген дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* *Gpc-B1*, який збільшує накопичення у зерні білка та важливих мікроелементів, таких як цинк, магній, залізо (Рибалка, 2012). Розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* у рослинах м'якої озимої пшениці та чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm193*, *Xgwm219*, *Xgwm508*, *Xgwm626*, що розташовані на 6В хромосомі (рис. 19). Обраховано частоту рекомбінації локусів, яка становить для *Xgwm508* –  $2,94 \pm 1,28$  %, *Xgwm193* –  $3,96 \pm 1,51$  %, *Xgwm626* –  $2,98 \pm 1,29$  %, *Xgwm219* –  $6,77 \pm 2,08$  %.

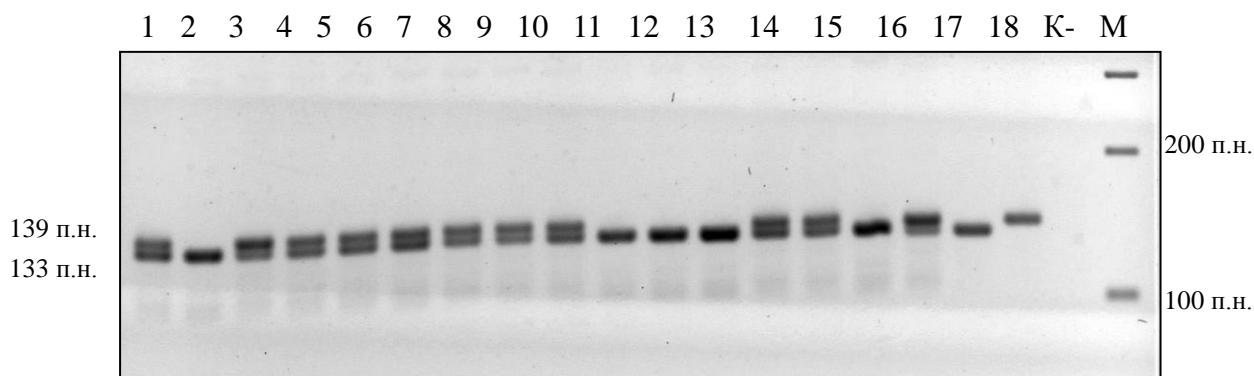


Рис. 19. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до локусу *Xgwm508*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – лінія пшениці, що має 6В хромосому *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця, носій 6В хромосоми *T. aestivum* L.; К- – негативний контроль (без ДНК); М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Розробленими системами були перевірені сім'ї покоління F<sub>5</sub>–F<sub>6</sub> та відібрано гомозиготні і позитивні за геном *Gpc-B1*. Аналіз сімей F<sub>5</sub> покоління, проведений методом ICP-MS детектування, встановив, що наявність гена *Gpc-B1* зумовлює статистично (на рівні 0,05) значуще підвищення рівня накопичення у зернівках заліза, цинку, марганцю, міді, селену та магнію (табл. 3).

Таблиця 3

**Вміст мікро- та мезоелементів у зернівках пшениці на початкових стадіях дозрівання (мг/кг сухої речовини)**

Варіант, лінія	Мікроелементи					Мезоелементи
	Zn	Fe	Mn	Cu	Se	Mg
Контроль (сорт 'Куяльник')	21 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>	49 <sup>a</sup>	4,2 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>	1665 <sup>a</sup>
18.2	24 <sup>b</sup>	29 <sup>a</sup>	63 <sup>b</sup>	5,0 <sup>b</sup>	0,41 <sup>b</sup>	1682 <sup>a</sup>
51.5	27 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	5,0 <sup>b</sup>	0,23 <sup>b</sup>	1631 <sup>a</sup>
94.4	26 <sup>b</sup>	28 <sup>a</sup>	59 <sup>b</sup>	5,2 <sup>b</sup>	0,03 <sup>a</sup>	1681 <sup>a</sup>
98.3	33 <sup>г</sup>	29 <sup>b</sup>	63 <sup>b</sup>	6,0 <sup>b</sup>	0,14 <sup>a</sup>	1853 <sup>b</sup>
104.5	24 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>	65 <sup>b</sup>	5,8 <sup>b</sup>	0,11 <sup>a</sup>	1648 <sup>a</sup>
125.5	31 <sup>г</sup>	30 <sup>b</sup>	77 <sup>г</sup>	7,2 <sup>г</sup>	0,26 <sup>b</sup>	1960 <sup>b</sup>

Аналіз вмісту загального білка в зернівках рослин F<sub>5</sub> покоління методом К'ельдаля показав, що в середньому спостерігався приріст на 14 % відносно сорту 'Куяльник'. Сучасна експрес-методика вимірювання якісних показників зерна, одним із яких є визначення масової частки білка за допомогою інфрачервоної спектроскопії (NIR), також засвідчила, що в середньому серед гібридних ліній спостерігається приріст білка на 14 % порівняно із сортом 'Куяльник'. Таким чином, комплексний аналіз вмісту загального білка зернівок засвідчив, що ген *Gpc-B1* зумовлює істотне підвищення цього показника.

**Розробка підходів до детектування трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1*.** Для визначення алельних варіантів локусу *Glu-A1* було розроблено ряд маркерів, які дозволяють виявляти алелі *a* і *b* (Ma *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). Проте



кількість методів для визначення трансгенних копій гена *Glu-A1* наразі обмежена. Для визначення екстракопій гена *Glu-A1* нами було змодельовано дві пари праймерів (табл. 4).

Таблиця 4

### Характеристика змодельованих праймерів

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність	Очікуваний розмір фрагмента	Опис
GluAF1	5-AACTACAGTGTGAGCGCGAG-3	207 п.н.	Праймери до 1 ексона
GluAR1	5-TCTGTTGGAGTTGCTGTGGT-3		
GluAF2	5-GAGACGTTAGCCCCGAGTG-3	870 п.н.	Праймери до 1 і 2 екзонів
GluAR2	5-СТАATTGCTGCTCTTGTGTTGA-3		

Ефективність роботи даних праймерів було перевірено на зразках трансгенної та нетрансгенної пшениці методом ПЛР. Обидві пари праймерів дозволили отримати очікувані амплікони розмірами 207 і 870 п.н., відповідно.

**Аналіз алельного складу генів *Glu-1* системою молекулярно-генетичних маркерів у сім'ях-носіях гена *Gpc-B1*.** Проведено оцінку 44 сімей F<sub>5</sub> покоління на наявність алельних субодиноць генів *Glu-1* запасних білків. По трьох локусах *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16 найбільш цінних сімей. Вони містять оптимальну для хлібопекарської якості алельну складову локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*). Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці, а максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення.

**Виявлення алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які детермінують консистенцію ендосперму зернівки пшениці.** Проведено градієнтні ПЛР з метою підбору оптимальної температури ренатурації праймерів та виявлення різних алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*. Алельний склад гена *Pina-D1* було визначено для 162 сортів та гібридів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції, проте досліджена вибірка не виявила поліморфізму гена. Всі зразки були представлені алелем дикого типу *Pina-D1a*, який відповідає за м'язозерний тип ендосперму. Оскільки продукти ампліфікації гена *Pinb-D1* неістотно різняться за розміром, то для кращої візуалізації результатів було проведено гідроліз продуктів ампліфікації за допомогою ендонуклеази рестрикції MbiI. Після обробки рестриктазою на електрофореграмі дикий тип, який відповідає за м'язозерний тип ендосперму, представлений ампліконом розміром 320 п.н., а нуль-алель, який визначає твердозерний тип ендосперму – ампліконом розміром 200 п.н. (рис. 20).

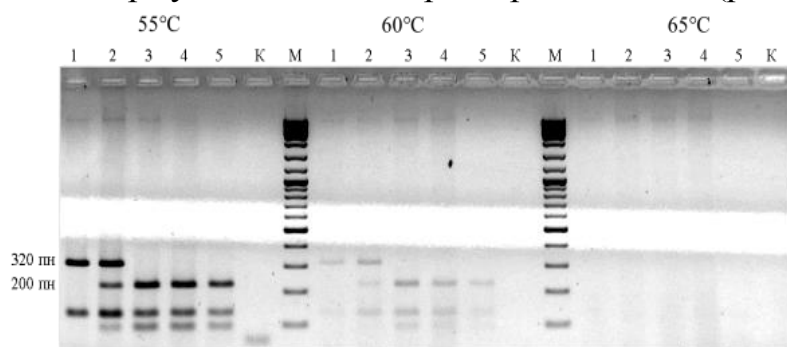


Рис. 20. Електрофореграма градієнтної ПЛР гена *Pinb-D1*. Доріжки 1–5 – дослідні зразки за різної температури ренатурації праймерів; К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

**Дослідження алельного складу пуринолінових генів у сім'ях пшениці м'якої, носіях гена *Gpc-B1*.** Амплікон розміром 290 п.н., свідчить про наявність алеля *Pina-D1a*, тоді як відсутність даного амплікону вказує на наявність алеля *Pina-D1b* (рис. 21). Амплікон референтного гена *TaTM20* розміром 934 п.н. вказує на адекватний перебіг реакції. Аналіз зернівок показав, що серед 44 ліній – 32 мали алель *Pina-D1a*, а 12 – *Pina-D1b*. Переважна більшість сортів української селекції несуть алель *Pina-D1a* (Чеботар та ін., 2012), тому привнесення нового алеля *Pina-D1b* позитивно вплине на подальшу селекцію українських сортів. Аналіз алельного складу пуринолінових генів виявив їх широке різноманіття серед отриманих ліній.

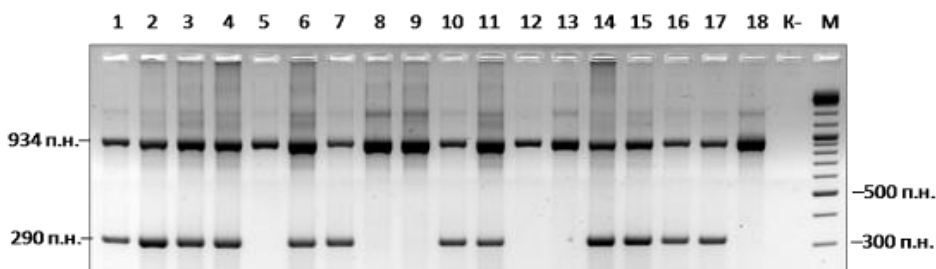


Рис. 21. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до гена *Pina-D1*

Метод інфрачервоної спектрометрії показав, що всі сім'ї і батьківські компоненти мають не більше 45 одиниць твердозерності, що відповідає групі м'якозерних сортів пшениці. Статистична обробка даних вказує, що значення твердозерності для ліній, які мали алель *Pina-D1b* гена *Pina-D1*, були вищими ніж для ліній, які мали алель *Pina-D1a* ( $p < 0,05$ ). В той же час різниця між медіанами за цим параметром для різних комбінацій алелів гена *Pinb-D1* знаходилася в межах статистичної похибки. Крім того, лінії, в яких було виявлено комбінацію алелів *Pina-D1b Pinb-D1a* (медіана = 37), мали статистично достовірно вищу твердозерність ( $p < 0,05$ ) ніж лінії, в яких було виявлено комбінацію алелів *Pina-D1a Pinb-D1b* (медіана = 14), що добре узгоджується з літературними даними, отриманими на північноамериканських пшеницях (Matus-Cádiz *et al.*, 2008). З'ясовано, що комбінація алелів *Pina-D1b Pinb-D1a* є більш бажаною для підвищення твердозерності зерна, що перевищує за своїм значенням навіть показники такого високоякісного стандарту як сорт 'Куяльник'.

**Вплив різних алелів гена *Pin-D1* на технологічні показники зерна і консистенцію ендосперму зернівки комерційних сортів пшениці.** Проведено скринінг колекції сортів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції, а також її співродичів з метою відбору перспективних генотипів. Проаналізували 156 зразків сортів пшениці, серед яких 136 української та 20 зарубіжної селекції, 1 зразок *Aegilops cylindrica*, 2 зразки *Aegilops tauschii*, 2 пшеничних амфіплоїди та 3 зразки полби від різних оригінаторів, а також 33 цінних гібриди частково ваксі пшениці. Серед досліджених зразків лише сорт пшениці 'Bobwhite' виявив нуль-алель гена *Pina-D1*, решта ж несла алель дикого типу *Pina-D1a*, який визначає м'яку текстуру зерна. Для гена *Pinb-D1* алель дикого типу *a* має меншу частоту зустрічальності, яка становить серед українських сортів 5,9 %, а серед зарубіжних – 45 %; нуль-алель становить відповідно 93,1 % для українських сортів та 65 % для зарубіжних. Впливу різних алелів гена *Pinb-D1* на текстуру зерна та кількість білка і клейковини не виявлено. На відміну від гібридів, де було показано сильний вплив ( $p < 0,001$ ) на

текстуру зерна наявності тих чи інших алелів гена *Pinb-D1*, у комерційних сортів української селекції такого впливу не виявлено, що свідчить про те, що імовірно дія гена *Pinb-D1* залежить від генетичного оточення. Крім того, було встановлено, що комбінація алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1* можливо також впливає на тверду текстуру зерна.

**Вивчення генів, які детермінують склад крохмалю в ендоспермі зернівок.** Молекулярно-генетичний аналіз зразків пшениці з підвищеним вмістом амілози був спрямований на відбір ліній, які несли цільний локус із геном *SBEIIa* та зберігали D субгеном при проведенні селекційних схрещувань. Для проведення успішного добору було попередньо розроблено та оптимізовано ПЛР для визначення наявності синтетичного гена *SBEIIa* та маркерного гена. Виявлення цільового гена розгалуження амілопектину *SBEIIa* проводили з використанням пари праймерів, змодельованих на основі послідовності гена у програмі CLC Main Workbench (QIAGEN) version 6.9.2. Змодельована пара праймерів визначає три екзони гена *SBEIIa* в геномі пшениці. Тому, на електрофореграмі у разі детекції рослини з донорним локусом будуть наявні два амплікони розміром 210 та 483 п.н., а в разі відсутності вставки – тільки один 483 п.н., оскільки між екзонами наявні інтронні ділянки геному. Розроблені методики дозволили провести аналіз гібридів F<sub>2</sub> для відбору генотипів із заданими властивостями. Серед досліджених 40 гібридних популяцій другого покоління було виявлено 30 зразків, які несуть цільовий ген *SBEIIa*, що підтверджує наявність донорного локусу, який приводить до збільшення накопичення амілози. У 25 із досліджених ліній було підтверджено наявність D геному.

**Ідентифікація алелів генів *Psy* пшениці м'якої.** Методом ПЛР проведено ідентифікацію алелів генів *Psy1* пшениці, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні. Аналізували 165 зразків пшениці та її співродичів для визначення алельного складу генів *Psy-1*, які кодують синтез ферменту фітоїнсинтази. Серед дослідженої вибірки зразків було виявлено два сорти ('Glenlea' та 'Антонівка') з алелем *Psy-A1b*, який згідно з літературними даними відповідає за низький вміст каротиноїдів у зернівці. Два сорти 'Зимоярка' і 'Недра' не виявили наявності жодного із очікуваних алелів. Алель *Psy-A1c* не був виявлений серед зразків. Решта зразків вибірки несли алель *Psy-A1a*, який визначає високий вміст каротиноїдів. Маркерна система для ідентифікації алелів *Psy-B1a* та *Psy-B1b* виявилася недостатньо ефективною і складною в реалізації, оскільки різниця між ампліконами становила лише 4 п.н., і жодна із використаних систем розділення ампліконів не забезпечила достовірного результату. Для оптимізації проведення аналізу було розроблено мультиплексні ПЛР для виявлення алелів *Psy-B1d*, *Psy-B1c* та *Psy-B1e* разом із референтним геном *TaTM20*. Серед проаналізованої вибірки було виявлено 62 зразки, які несуть алель *Psy-B1d*, 14 – зразків із алелем *Psy-B1c* та 1 зразок 242/59 Амф 4 із алелем *Psy-B1e*. У деяких зразках із алелем *Psy-B1c* спостерігався додатковий неочікуваний амплікон на рівні 900 п.н., що свідчить про додатковий поліморфізм цього гена. Оскільки, за літературними даними, алель *Psy-B1c* відповідає за високий вміст каротиноїдів у зерні, то дана інформація може бути перспективною для проведення подальших досліджень. Ген *Psy-D1* серед досліджуваної вибірки був представлений лише алелем *Psy-D1a*. В цілому, серед

проаналізованої вибірки зразків було виявлено сорти і лінії з різним алельним складом генів *Psy-A1* та *Psy-B1*. Частоти алелів вивченого гена для українських сортів були такими: 97,8 % – для *Psy-A1a*, 0,8 % – для *Psy-A1b*, 1,4 % – для зразків, які не виявили ніяких очікуваних алелів; 47 % – для обох алелів *Psy-B1a* і *Psy-B1b* разом, 43,3 % – для *Psy-B1d*, 9,7 % – для *Psy-B1c*.

**Розробка системи ДНК-маркерів для виявлення алелів генів пшениці, які зумовлюють активність поліфенолоксидазних ферментів.** Слід зазначити, що вивчення алельного складу генів *PPO* у сортах пшениці української селекції раніше не проводилось. Для ефективної детекції усіх можливих відомих алелів генів поліфенолоксидазної активності були обрані маркери *PPO33* (кодомінантний тип, ген *Pro-A1*) та *PPO29* і *PPO16* (домінантні типи, ген *Pro-D1*). Для отримання маркерних систем, які будуть ефективними для впровадження у прикладну селекцію, було запропоновано ввести в реакцію праймери до референтного гена *TaTM20*. Оптимізація умов ПЛР здійснювалася шляхом градієнтної ПЛР, за результатами якої були виявлені оптимальні параметри процесу для маркера *PPO33*. Для маркера *PPO29* було запропоновано використання техніки низхідної ПЛР. Для маркера *PPO16* не спостерігали очікуваних ампліконів, а наявні мінорні не відповідали очікуваним результатам (порівняно з маркером *PPO29*). Отже, для впровадження було запропоновано використовувати дві ПЛР-системи на основі маркерів *PPO33* та *PPO29*.

Скринінг вибірки із 143 сортів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції здійснювали за допомогою розроблених мультиплексних ПЛР. Відомо, що за низьку поліфенолоксидазну активність відповідають алелі *Pro-A1b* та *Pro-D1a*. В результаті дослідження алель *Pro-A1b* виявлено лише у сортах ‘Єдність’ та ‘Білява’, що становить 2,4 % загальної вибірки. У 26 сортів (18,2 % разом) спостерігали гетерогенність матеріалу, тобто наявність одночасно обох алелів гена, що свідчить про наявність алеля низькоактивної поліфенолоксидази у сортах з різних селекційних центрів. Окрім того, гетерогенність виявлена як в старовинних (наприклад ‘Миронівська 808’), так і в сучасних сортах. В інших сортах наявний алель *Pro-A1a*, який визначає високий рівень активності поліфенолоксидаз. У 49 сортах (34,3 %) був визначений алель *Pro-D1a*, який зумовлює низьку активність поліфенолоксидазних ферментів, у решти – алель *Pro-D1b*.

З використанням розроблених підходів були проаналізовані лінії білозерної пшениці. Із 39 зразків – 32 містили алель *Pro-A1a* (82,1 %). У геномах інших ліній були виявлені алелі низької активності поліфенолоксидази *Pro-A1b* (17,9 %). Стосовно геному D, то фрагмент довжиною у 490 п.н., який відповідає алелю *Pro-D1b*, зустрічався серед аналізованого матеріалу із частотою 46,6 %. Тобто, розподіл алелів високої і низької активності поліфенолоксидази виявився приблизно рівним.

Аналіз амфідиплоїдів показав, що із 64 проаналізованих зразків у 59 (92,2 %) наявний алель *Pro-A1a*. Серед всіх генотипів визначено лише один зразок, який був носієм алеля високої активності *Pro-D1b*. Це означає, що всі інші зразки досліджуваних амфідиплоїдів містили алель *Pro-D1a* низької активності ферменту.

**Розробка системи ДНК-маркерів для ідентифікації центричних пшенично-житніх транслокацій *1AL.1RS* та *1BL.1RS*.** У дослідженнях використовували понад 100 сортів пшениці української та зарубіжної селекції. Застосовували

мультиплексні ПЛР до гена *TaTM20* та локусу *Xrems 1303*, а також до гена *TaTM20* та локусу *ω-secalin*. Локус *Xrems 1303* виявляється у сортів, що несуть як звичайну пшенично-житню транслокацію, так і у генотипів з модифікованою пшенично-житньою конструкцією 1RSm.1BL. Для розділення сортів за наявністю транслокацій у різних хромосомах пшениці були підібрані умови реакції ампліфікації для виявлення у геномах мікросателітного локусу жита *SCM9*, який за наявності амплікона у 226 п.н. вказує на транслокацію 1AL.1RS, а амплікона у 206 п.н. – 1BL.1RS. Проведені молекулярно-генетичні дослідження показали, що комплексне використання двох пар цільових праймерів *SCM9* та *PAWS5/S6* до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє ідентифікувати пшенично-житню транслокацію та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від її походження. В результаті проведеного аналізу виявлено 20 сортів з транслокацією 1AL.1RS та 10 сортів з транслокацією 1BL.1RS.

### ПРИКЛАДНІ РЕЗУЛЬТАТИ СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ТА СОРТІВ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР

Практична придатність розроблених ДНК-технологій для добору та генотипування найбільш поширених в Україні зернових культур була перевірена шляхом їх впровадження у селекційний процес та отримання нового вихідного матеріалу злакових культур, зокрема озимої пшениці. Залучення маркер-допоміжної селекції у процес створення нових сортів дозволило нам проаналізувати сотні селекційних номерів пшениці на наявність пшенично-житніх транслокацій та генів, що детермінують господарсько-корисні ознаки і відібрати найбільш перспективні генотипи для подальшої роботи. На основі практичного застосування маркер-допоміжної селекції створено та включено до Державних реєстрів рослин України, Російської Федерації та Молдови 31 сорт-інновація озимої пшениці. Новизна нових сортів підтверджена авторськими свідоцтвами цих країн.

У результаті плідної творчої співпраці між фахівцями Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення НААН України закладені наукові підвалини і теоретично обґрунтовані докорінно нові для України напрями селекції озимої пшениці, озимого і ярого ячменю (харчового голозерного) та озимого тритикале.

З використанням дикорослих егілопсів-донорів геному D у схрещуваннях з культурною пшеницею отримано інтрогресивні селекційні лінії пшениці з екзотичними *Gli/Glu* алелями, урожаєм на рівні 10 т/га, відмінною хлібопекарською якістю зерна, стійкістю до хвороб та високою посухостійкістю. Перспективні селекційні лінії, похідні від віддалених схрещувань, були передані до державного сортовипробування, і в результаті два сорти озимої пшениці ‘Аміна’ і ‘Джамала’, придатні до розповсюдження на Півдні України, були занесені до Державного реєстру сортів рослин України.

Від схрещувань з *Ae. tauschii* в геном пшениці перенесено унікальний чужинний алель гена *Ha(ts)*, що детермінує екстраекспресію білків крохмальних гранул фріабілінів і відповідно екстрам’який тип консистенції ендосперму пшениці.

Алель гена *Ha(ts)* є унікальним і не зустрічається у жодного із відомих сортів пшениці. Інтрогресований від егілопсу алель *Ha(ts)* став генетичною основою для створення нового для України класу сортів пшениці (extra-soft) з екстрим'яким ендоспермом бісквітного (кондитерського) напряму використання.

Створено цілий ряд ліній з оригінальними алелями *Gli/Glu*-локусів з сильним позитивним впливом на реологічні властивості тіста. Так, від егілопсів *Ae. tauschii* та *Ae. cylindrica* в геном пшениці були інтрогресовані відповідно два алеля *Gli-D1ts* і *Gli-D1cyl* з позитивним ефектом на реологію тіста, вищим ніж в інших алелів локусу *Gli-D1*, що розповсюджені серед сортів пшениці української селекції. Алелі *Gli-D1ts* і *Gli-D1cyl* є також оригінальними і не зустрічаються у сортів пшениці української селекції.

У наших селекційних програмах було використано три унікальні алелі локусу *Glu-1*, що кодує біосинтез високомолекулярних глютенінів: 1) алель *Glu-B1a1* (77+8) (з екстраекспресією субодиниці 7 високомолекулярних глютенінів), який виник в результаті спонтанної тандемної дуплікації гена, що контролює біосинтез субодиниці 7; 2) алель *Glu-D1x5* зі штучно індукованою екстраекспресією субодиниці 5 високомолекулярних глютенінів; 3) алель *Glu-A1x2\** зі штучно індукованою екстраекспресією субодиниці 2\* високомолекулярних глютенінів, що дозволяє створювати селекційний матеріал пшениці із запрограмованою екстрависокою хлібопекарською якістю борошна.

Проведені нами багаторічні дослідження підтверджують дані про те, що пшенично-житні транслокації 1AL.1RS та 1BL.1RS, які несуть комплекс генів стійкості до хвороб (*Lr26*, *Sr31*, *Yr9*, *Pm8*), позитивно впливають на урожай сортів, які несуть ці транслокації, та їх стійкість до хвороб. Із використанням цих хромосомних транслокацій створено серію сортів озимої пшениці 'Смуглянка', 'Золотоколоса', 'Фаворитка', 'Астарта' та інші, які забезпечили отримання рекордних урожаїв зерна – 124–140 ц/га. Дані сорти успішно конкурують із зарубіжними аналогами і займають в Україні великі посівні площі. Вони мають комплексний імунітет до основних хвороб і придатні для вирощування в органічному землеробстві та на зрошуваних площах.

Експериментально доведено, що генотипи з геном *Gpc-B1* порівняно з генотипами без нього мали вміст протеїну в зерні в середньому вище на 2,1 % і переважали останніх за індексом SDS-30K седиментації в середньому на 20 мл. Наразі отримані перспективні селекційні лінії з геном *Gpc-B1*, які не поступаються за урожаєм кращим сортам-стандартам, мають задовільну виповненість зерна і вміст білка на 1,5-2,0 % вище стандартів. Оскільки вміст білка в зерні є ознакою стратегічного значення для культури пшениці, ми вважаємо що ген *Gpc-B1* має бути присутнім в усіх селекційних програмах створення в Україні сортів пшениці високої хлібопекарської якості, з високим вмістом у зерні білка і ключових мікроелементів.

Крохмаль пшениці є основним інгредієнтом хліба і хлібопродуктів. Комбінуванням в одному генотипі трьох рецесивних алелів генів *Wx-A1* (хромосома 7AS) *Wx-D1* (хромосома 7DS) і *Wx-B1* (хромосома 7AL) вперше в Україні створено пшеницю ваксі, у якої практично повністю відсутня амілоза у крохмалі. Пшениця ваксі розглядається як основа для створення сортів кормового використання, оскільки крохмаль цієї пшениці практично повністю, на відміну від звичайної,

метаболізується у шлунково-кишковому тракті тварин, забезпечуючи високу метаболічно засвоювану енергію. Також вона має перспективу використання у спирто-дистилятній промисловості.

Високоамілозна пшениця порівняно зі звичайною пшеницею має істотно поліпшений харчовий статус за рахунок підвищеного вмісту у зерні резистентного до ферментів шлунково-кишкового травлення крохмалю, подібного за властивостями до дієтичної клітковини. Отримано перспективний селекційний матеріал, який досліджується за агрономічними характеристиками та вмістом амілози у крохмалі.

Нами ініційована програма селекції сортів м'якої пшениці круп'яного напрямку використання (крупя, пластівці), яка в Україні взагалі відсутня. Генетичною основою для створення сортів пшениці круп'яного використання мають бути такі характеристики зерна, як його колір та консистенція ендосперму (твердість). Нами вперше в Україні започаткований напрям селекції білозерної хлібопекарської пшениці. Наразі вже створений перспективний матеріал білозерної твердозерної пшениці з високою хлібопекарською якістю. Розпочато дослідження генетичних систем, що контролюють колір зерна, та отримано генотипи пшениці з різним кольором зерна (рис. 22), з високою антиоксидантною активністю, як основи для нового напрямку селекції пшениці круп'яного використання з поліпшеною харчовою цінністю зерна.



Рис. 22. Зразки зерна пшениці зліва направо: червоний, фіолетовий, білий і синій кольори (червоний і фіолетовий пігменти локалізовані в оболонці, а синій – в алейроновому шарі зернівки).

## ВИСНОВКИ

У результаті проведеної роботи розроблено теоретичні основи та технології створення високопродуктивних сортів озимої пшениці та інших злакових культур, яким властиві висока якість зерна та стійкість до несприятливих чинників довкілля. Оптимізовано технології генетичної трансформації пшениці і кукурудзи в культурі *in vitro* та методом *in planta* для отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів. Розроблено методичні основи та практичні засади використання ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. На підставі застосування різних взаємодоповнюючих молекулярно-генетичних маркерних систем, їх адаптації для проведення мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій, обґрунтовано наукові основи молекулярної селекції пшениці. На основі розроблених методів молекулярної селекції створено новий оригінальний матеріал та сорти пшениці м'якої озимої, які внесені до Державних реєстрів сортів рослин, придатних для поширення в Україні, Республіці Молдова та Російській Федерації. Це підтверджує актуальність

проведених фундаментальних досліджень та їх цінність для біологічної науки й аграрного виробництва.

1. Розроблено принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії рослин.
2. Визначено структуру гена *shp1* моху *Physcomitrella patens* та підтверджено факт наявності подібних послідовностей в різних таксонах рослин. Найбільша подібність виявлена у *P. patens* та *Warnstorfia fontinaliopsis*. На основі біоінформатичного аналізу послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica* показана висока (понад 90 %) гомологія з мітохондріальними геномами представників родини Злакових (*Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Bambusa oldhamii* та ін.).
3. Вперше вивчено вплив синтетичних регуляторів росту – піклораму та дикамби – на частоту регенерації з калусної культури пшениці апікального походження. Показано, що найбільш ефективним є використання у середовищі 0,15 мг/л піклораму у поєднанні з 0,5 мг/л БАП, за якого спостерігається швидке утворення морфогенних ділянок і найбільша кількість пагонів.
4. Оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* і методом *in planta*, та вперше отримано рослини пшениці вітчизняних сортів 'Подолька' та 'Зимоярка', стійкі до фосфіотрицину (гербіцид Баста®).
5. У трансгенних калусних 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. В спектрах продуктів ампліфікації ДНК відмічено появу нових ампліконів, що свідчить про активацію та транспозицію даного МГЕ. Підтверджено, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію мобільних генетичних елементів.
6. 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, що імовірно може бути пов'язано з явищем РНК-інтерференції, яка пригнічує активність ретротранспозонів.
7. Удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин кукурудзи в культурі *in vitro* методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Отримано трансгенні рослини кукурудзи, стійкі до гліфосату та фосфіотрицину. Встановлено певну 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. Морфобіологічна оцінка трансформантів кукурудзи, які несуть чужорідний ген



*bar*, в поколіннях T<sub>0</sub>-T<sub>6</sub> дозволила охарактеризувати стійкість рослин за виживаністю, основними показниками росту і розвитку.

8. Розроблено нову вдосконалену методику детекції трансформаційних подій на основі мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції та проведено моніторинг розповсюдження трансгенних рослин кукурудзи на території України, який засвідчив їх присутність з частотою від 4 до 10 %.
9. Розроблено 9 систем на основі IRAP та 5 систем на основі REMAP-маркерів, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами різних злакових культур, зокрема пшениці, тритикале, спельти й ячменю. Встановлено, що кожен з вивчених сортів різних культур має свій певний спектр ампліфікованих IRAP і REMAP продуктів, що відрізняється від інших за їх кількістю, розміром і ступенем вираженості. Проаналізовано міжвидову спорідненість, яка важлива для вирішення питань селекції, що базується на методах віддаленої гібридизації.
10. Встановлено, що найефективнішими для дослідження генетичного різноманіття пшениці є розроблені системи REMAP Sukkula+A17898 та Sukkula+HB10. 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. Показано ефективність застосування IRAP-маркерів для підтвердження змін у геномі тритикале під дією мутагенів та для добору мутантних рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*.
11. Проведено моделювання праймерів та перевірено їх ефективність для визначення трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1* пшениці методом ПЛР. Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці.
12. Вперше з використанням різних молекулярних маркерів проведено комплексний аналіз сучасних сортів пшениці, що вирощуються в різних ґрунтово-кліматичних умовах України. На основі отриманих даних показано їх відмінності за геномною варіабельністю, визначено рівні внутрішньовидового поліморфізму сортів та їх філогенетичного споріднення. Результати вивчення міжсортowego та внутрішньосортowego поліморфізму за дослідженими цільовими генами впроваджено у практичні селекційні програми Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення НААН України, спрямовані на усунення гетерогенності та підвищення генетичної чистоти (гомогенності) сортів зернових злаків та їх поліпшення за головними технологічними характеристиками якості зерна.
13. Розроблено й оптимізовано систему ДНК-маркерів для добору та генотипування сортів пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. Проведено скринінг нових, елітних і стародавніх сортів м'якої та твердої пшениці на розповсюдження алельних варіантів господарсько-корисних генів. Серед проаналізованих генотипів пшениці виявлено донори цінних алелів. На основі отриманих даних опрацьовано теоретичну концепцію використання та

контролю досліджених генів і генетичних систем у селекції пшениці за комплексом господарсько-цінних ознак. Положення концепції впроваджено у практичні селекційні програми Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннізнавства та сортовивчення НААН України. Перспективний селекційний матеріал з цільовими генами переданий у Державне сортовипробування.

14. Методами маркер-допоміжної селекції підтверджено, що нові сорти-інновації, створені в ІФРГ НАН України, є носіями оригінальних алелів глютенін- та гліадинкодуєчих локусів, які не зустрічаються у відомих каталогах і раніше не спостерігались в українських сортах. Отримано ряд унікальних генотипів за алельним складом генів запасних білків, які можуть бути використані для створення принципово нових для України сортів пшениць хлібопекарського та кондитерського напрямів використання.
15. Розроблено домінуючу та кодомінуючу молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах пшениці м'якої озимої та чотири кодомінуючі молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm193*, *Xgwm219*, *Xgwm508*, *Xgwm626*.
16. Вперше в Україні впроваджено у практичну селекцію пшениці в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннізнавства та сортовивчення НААН України унікальний ген *Gpc-B1* та маркерну систему його контролю у селекційних популяціях. Впровадження гена *Gpc-B1* у практичну селекцію започатковує нову для української селекції стратегію контрольованого генетичного поліпшення сортів пшениці за вмістом білка в зерні та ключових мікроелементів. На основі цього впровадження створено перспективний селекційний матеріал пшениці, готовий до передачі в Державне сортовипробування.
17. Показано, що підібрані маркерні системи є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах пшениці м'якої озимої. Встановлено, що комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє проводити ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації.
18. Вперше в Україні розроблено біотехнологію селекційного процесу, яка базується на поєднанні можливостей класичної і молекулярної генетики, з активним використанням нових мутантних генів, молекулярних маркерів, хромосомних транслокацій і штучних генетичних конструкцій. На основі найсучасніших досягнень інтрогресивної селекції, молекулярної генетики та біотехнології розроблено теоретичні основи і методи створення високопродуктивних сортів пшениці м'якої озимої, яким властиві висока якість зерна та толерантність до стресових чинників довкілля.
19. Науково обґрунтовано новий для України напрям селекції злакових культур з кольоровим зерном з метою підвищення харчової цінності зерна, що є основою для появи на продовольчому ринку нашої держави нових продуктів функціонального харчування. Для цього успішно здійснюється біофортificaція

зерна шляхом селекційного привнесення в генотип рослини унікальних мутантних генів дикорослих співродичів або біотехнологічних генетичних конструкцій, спроможних радикально змінювати співвідношення компонентів крохмалю, збільшувати вміст білка і мінералів, покращувати антиоксидантну активність.

20. В результаті тривалих наукових досліджень (2006–2021 рр.) створено цінний вихідний селекційний матеріал та нові сорти-інновації різного напрямку використання. До Державних реєстрів сортів рослин, придатних для поширення в Україні, Російській Федерації та Республіці Молдова занесено 31 сорт пшениці м'якої озимої, в тому числі в Україні 29 сортів, в Російській Федерації – сорт 'Астарта', в Республіці Молдова – сорт 'Сотниця'. Дані сорти на державному рівні визнані селекційним досягненням, а їх новизна закріплена 31 авторським свідоцтвом України, Російської Федерації та Республіки Молдова.

## СПИСОК ОСНОВНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у фахових та іноземних наукових виданнях

1. Lakhneko, O., Danchenko, M., **Morgun, B.**, Kováč, A., Majerová, P. & Škultéty, L., 2020. Comprehensive comparison of clinically relevant grain proteins in modern and traditional bread wheat cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), pp. 3445(1-21). DOI: 10.3390/ijms21103445 (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
2. Рибалка, О.І., Моргун, В.В. та **Моргун, Б.В.**, 2020. Кольорове зерно пшениці і ячменю – нова стратегія селекції зернових культур із високою біологічною цінністю зерна. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(2), с. 95–127. DOI: 10.15407/frg2020.02.095 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
3. Nitovska, I.O., Abraimova, O.Y., Duplij, V.P., Derkach, K.V., Satarova, T.M., Rudas, V.A., Cherchel, V.Yu., Dziubetskyi, B.V. & **Morgun, B.V.**, 2019. Application of beta-glucuronidase transient expression for selection of maize genotypes competent for genetic transformation. *Cytology and Genetics*, 53(6), pp. 451–458. DOI: 10.3103/S0095452719060082. (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
4. **Morgun, B.V.** & Dubrovna, O.V., 2019. IRAP analysis of transgenic wheat plants with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*, 53(5), pp. 384–391. DOI: 10.3103/S0095452719050116. (60 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
5. Рибалка, О.І., Моргун, В.В., **Моргун, Б.В.** та Поліщук, С.С., 2019. Генетичні основи нового напрямку селекції оригінальних за якістю зерна класів пшениці (*Triticum aestivum* L.) і тритикале ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack). *Фізіологія рослин і генетика*, 51(3), с. 207–240. DOI:10.15407/frg2019.03.207 (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
6. Рибалка, О.І., Швартау, В.В., Поліщук, С.С. та **Моргун, Б.В.**, 2019. Зниження вмісту фітатів як засіб біофортифікації ячменю за мінеральним складом зерна. *Фізіологія рослин і генетика*, 51(2), с. 95–113. DOI: 10.15407/frg2019.02.095 (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
7. Nitovska, I.O., Vasylenko, M.Yu. & **Morgun, B.V.**, 2018. Investigation of monocotyledon introns influence on the expression of transgenes in dicotyledonous plants in the genus *Nicotiana*. *Biotechnology Acta*, 11(4), pp. 73–83. DOI: 10.15407/biotech11.04.073 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
8. Лялько, І.І., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2018. Аналіз мейозу в сортів пшениці озимої м'якої – носіїв пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS. *Вісник Українського*

- товариства генетиків і селекціонерів, 16(2), с. 174–182, DOI: 10.7124/visnyk.utgis.16.2.1055 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
9. Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Поліщук, С.С., 2018. *Gpc-B1 (NAM-B1)* ген як новий генетичний ресурс у селекції пшениці на підвищення вмісту білка в зерні та мікроелементів. *Фізіологія рослин і генетика*, 50(4), с. 279–298. DOI: 10.15407/frg2018.04.279 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
  10. Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2018. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 50(3), с. 187–217. DOI: 10.15407/frg2018.03.187 (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
  11. Stepanenko, O.V., Stepanenko, A.I., Kuzminskiy, Ye.V. & **Morgun, B.V.**, 2017. Identification of *Psy1* genes alleles responsible for carotenoid accumulation in wheat grains. *Biotechnologia Acta*, 10(2), pp. 57–66. DOI: 10.15407/biotech10.02.057 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
  12. Михальська, Л.М., Похилько, С.Ю., Швартау, В.В., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Дослідження вмісту білка в гібридних лініях пшениці – носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Біологічні студії / Studia Biologica*, 11(3–4), с. 34–35, DOI: 10.30970/sbi.1103.563 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
  13. Похилько, С.Ю., Швартау, В.В., Починок, В.М., Михальська, Л.М., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 15(1), с. 52–57. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.15.1.712 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
  14. Степаненко, О.В., Музафарова, В.А., Степаненко, А.І., Кузьмінський, С.В., Рябчун, В.К. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Комплексна молекулярно-генетична оцінка генофонду ячменю ярого за напрямками використання. *Фізіологія рослин і генетика*, 49(4), с. 328–338. DOI: 10.15407/frg2017.04.328 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
  15. **Моргун, Б.В.**, Похилько, С.Ю., Починок, В.М., Дуплій, В.П., Дуган, О.М., Христан, О.О. та Степаненко, А.І., 2017. Генетичне різноманіття пуринолінових генів серед ліній пшениці м'якої, носіїв *Gpc-B1* із *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фізіологія рослин і генетика*, 49(3), с. 229–236. DOI: 10.15407/frg2017.03.229 (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
  16. Похилько, С.Ю., Степаненко, А.І., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Визначення алельного стану генів *Glu-1* в гібридних сім'ях, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 21, с. 168–173. DOI: 10.7124/FEEO.v21.829 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
  17. Нітовська, І.О., Комарницький, І.К. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Селекція на гліфосаті трансгенних калюсних ліній кукурудзи генотипів, районованих в Україні. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 20, с. 237–242. DOI: 10.7124/FEEO.v20.771 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
  18. Степаненко, Е.В., Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.**, Рыбалка, А.И. и Кузьминский, Е.В., 2016. Маркер-опосредованная селекция *Wx*-тритикале. *Вестник «ЮКГФА» (Республиканский научный журнал «Вестник Южно-Казахстанской государственной фармацевтической академии»*. Республика Казахстан, г. Шымкент. 4(77), с. 29–31. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
  19. Lakhneko, O.R., **Morgun, B.V.**, Kalendar, R.M., Stepanenko, A.I., Troianovska, A.V. & Rybalka, O.I., 2016. SSR analysis in the study of genetic diversity and similarity of barley cultivars. *Biotechnologia Acta*, 9(3), pp. 61–68. <https://doi.org/10.15407/biotech9.03.061> (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)

20. Pokhylko, S.Yu., Schwartau, V.V., Mykhalska, L.M., Dugan, O.M. & **Morgun, B.V.**, 2016. ICP-MS analysis of bread wheat carrying the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Biotechnologia Acta*, 9(5), pp. 64–69. DOI: 10.15407/biotech9.05.064 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
21. **Моргун, Б.В.**, 2016. Стан та перспективи використання пшенично-житніх транслокацій у селекції озимої м'якої пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(4), с. 324–343. DOI: 10.15407/frg2016.04.324
22. Моргун, В.В., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(3), с. 196–214. DOI: 10.15407/frg2016.03.196 (30 % авторства: аналіз результатів, написання статті).
23. Горбатюк, І.Р., Щербак, Н.Л., Банникова, М.О., Великожон, Л.Г., Кучук, М.В. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Отримання стійких до гербіциду фосфіотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro*. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(1), с. 65–74. DOI: 10.15407/frg2016.01.065 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
24. **Моргун, Б.В.**, Лялько, І.І., Степаненко, А.І., Бавол, А.В. та Великожон, Л.Г., 2016. Цитологічна та молекулярно-генетична характеристика сортів озимої м'якої пшениці, отриманих за інтрогресивної селекції та мутагенезу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 19, с. 167–171. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
25. Похилько, С.Ю., Трояновська, А.В., Степаненко, А.І., Урбанович, О.Ю., Дуган, О.М., Рибалка, О.І. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 18, с. 132–136. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
26. Polishchuk, S.S., Kyrdohlo, E.K., Mykhalska, L.M., **Morgun, B.V.**, Pokhylko, S.Yu., Rybalka, O.I. & Schwartau, V.V., 2016. Quantification of trace elements Fe, Zn, Mn, Se in barley grain. *Agricultural Science and Practice*, 3(1), pp. 49–54. <https://doi.org/10.15407/agrisp3.01.049> (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
27. Gorbatyuk, I.R., Bovol, A.V., Holubenko, A.V. & **Morgun, B.V.**, 2015. Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat cv. Zymoyarka. *Biotechnologia Acta*, 8(1), pp. 56–62. doi: 10.15407/biotech8.01.056 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
28. Taranenko, A.M., Sakhno, L.O., **Morgun, B.V.** & Kuchuk M.V. Comparative molecular genetic analysis between Ukrainian and EU registered glyphosate-tolerant rapeseed transgenic plants. *Biotechnologia Acta*. 2015, 8(2), pp. 52–57. doi: 10.15407/biotech8.02.052 (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
29. Горбатюк, І.Р., Бавол, А.В., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* пшениці м'якої озимого сорту Подолянка. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*, 24(1153), с. 47–53. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
30. Горбатюк, І.Р., Гнатюк, І.С., Тараненко, А.М., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(6), с. 514–525. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
31. Тищенко, Е.Н. и **Моргун, Б.В.**, 2015. Генетическая инженерия по повышению осмотолерантности культурных злаковых растений с использованием генов транскрипционных факторов DREB и AREB/ABF. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(5), с. 371–392. (40 % авторства: аналіз результатів, написання статті).

32. Рибалка, О.І., Моргун, В.В., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2015. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(2), с. 95–111. (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
33. **Моргун, Б.В.**, Степаненко, О.В., Степаненко, А.І. та Рибалка, О.І., 2015. Молекулярно-генетична ідентифікація поліморфізму генів *Wx* у гібридах м'якої пшениці за допомогою мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(1), с. 25–35. (60 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
34. Степаненко, А.І., Степаненко, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Поліморфізм генів пшениці, які визначають якісні ознаки, у харчових продуктах. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 16, с. 161–165. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
35. Горбатюк, І.Р., Гнатюк, І.С., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Позитивний вплив антибіотика тиментину на елімінацію *Agrobacterium tumefaciens* та регенерацію *in vitro* пшениці м'якої *Triticum aestivum*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 17, с. 136–140. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
36. **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Лялько, І.І., Великожон, Л.Г. та Степаненко, А.І., 2014. Молекулярно-генетична ідентифікація та цитологічні особливості сортів озимої м'якої пшениці з пшенично-житньою транслокацією. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 15, с. 220–223. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
37. Степаненко, А.І., Благодарова, О.М., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В. та Рибалка, О.І., 2014. Детекція пшенично-житніх транслокацій за допомогою ДНК-маркерів та електрофорезу білків. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 12(1), с. 78–83. (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
38. Степаненко, А.І., Трояновська, А.В., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Великожон, Л.Г., Рибалка, О.І. та Поліщук, С.С., 2014. Маркерний аналіз генів поліфенолоксидази (РРО) у сортах м'якої пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(6), с. 490–497. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
39. **Моргун, Б.В.**, Степаненко, А.І., Чугункова, Т.В., Лялько, І.І., Степаненко, О.В. та Великожон, Л.Г., 2014. Молекулярне визначення локалізації житніх транслокацій у сортах м'якої пшениці та їх цитологічна характеристика. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(4), с. 319–324. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
40. Степаненко, О.В., **Моргун, Б.В.**, Рибалка, О.І., Степаненко, А.І. та Кузьмінський, Є.В., 2014. Виявлення алельних варіантів гена *wax* серед вітчизняних і зарубіжних сортів ячменю. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*, 3(95), с. 78–83. (25 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
41. Топчій, Т.В., Починок, В.М. та **Моргун, Б.В.**, 2014. Стійкість ліній озимої пшениці, створених способом віддаленої гібридизації, до комплексу хвороб та шкідників. *Фізіологія рослин і генетика*, 46(3), с. 230–235. (25 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
42. Бавол, А.В., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Одержання та аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній м'якої пшениці. *Biotechnologia Acta*, 6(6), с. 113–119. (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
43. Makarenko, R., Savchuk, O., Rumianceva, A., Ivashchuk, B., Cherep, M., Gorobec, S. & **Morgun, B.**, 2013. Cloning and molecular-genetic analysis *Deschampsia antarctica* mitochondrial sequences. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*, 2(64), pp. 45–47. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
44. Марковський, О.В., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Виявлення *scu* генів, які детермінують стійкість до комах, за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової

- реакції у трансгенної кукурудзи. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 12, с. 276–280. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
45. **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Рибалка, О.І., Починок, В.М., Тарасюк, О.І. та Степаненко, А.І., 2013. Молекулярна ідентифікація алеля *Glu-B1a1* у сортах і лініях пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(4), с. 290–295. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
46. Рибалка, О. І., Поліщук, С. С., Кірдогло, Є. К. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Генетичні та селекційні критерії створення сортів голозерного ячменю харчового напрямку. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*, 45(3), с. 187–205. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
47. Рибалка, О.І., Червоніс, М.В., **Моргун, Б.В.**, Починок, В.М. та Поліщук, С.С., 2013. Генетичні та селекційні критерії створення сортів зернових культур спирто-дистильного напрямку технологічного використання зерна. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*, 45(1), с. 3–19. (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
48. Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2012. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: генетика, біотехнологія та харчова цінність запасних білків. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*, 44(1), с. 3–22. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
49. Степаненко, А.І., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Адаменко, Н.І. та Великожон, Л.Г., 2012. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК-маркерами. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 10(2), с. 311–318. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
50. Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2011. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: біосинтез та накопичення запасних білків, структура, агрегація і реологія у зв'язку з технологією зернопродуктів. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*, 43(6), с. 463–477. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, обробка літератури, аналіз результатів, написання статті).
51. Ларченко, К.А. та **Моргун, Б.В.**, 2010. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*, 42(6), с. 463–474. (40 % авторства: опрацювання літератури, аналіз результатів, написання статті).
52. Матвеева, А.Ю., Корж, Л.П., Христан, О.О., **Моргун, Б.В.** и Тищенко, Е.Н., 2010. Анализ компетенции *Agrobacterium*-опосредованной трансформации морфогенного каллуса инбредных линий кукурузы. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 9, с. 308–313. (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
53. Villani, M.E., **Morgun, B.**, Brunetti, P., Marusic, S., Lombardi, R., Pisoni, I., Bacci, C., Desiderio, A., Benvenuto, E. & Donini, M., 2009. Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), pp. 59–72. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00371> (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
54. Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2009. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*, 41(6), с. 463–475. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

### Монографії

1. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Поліщук С.С. *Ячмінь як продукт функціонального харчування*. К.: Логос, 2016. – 670 с. ISBN 978-617-7442-06-5 (40 % авторства: аналіз результатів, написання 4, 9–12 розділів).

2. **Моргун Б.В.**, Тищенко Е.Н. *Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам*. К.: Логос, 2014. – 221 с. ISBN 978-966-171-887-5 (60 % авторства: узагальнення матеріалів та укладання, написання монографії).
3. Дубровна О.В., **Моргун Б.В.**, Бавол А.В. *Биотехнологии пшеницы: клетинна селекція та генетична інженерія*. К.: Логос, 2014. – 375 с. ISBN 978-966-171-883-7 (30 % авторства: узагальнення матеріалів та укладання, написання монографії).

### Патенти на винахід та корисні моделі

1. Патент України на винахід № 117974. Спосіб трансформації та селекції кукурудзи /Абраїмова О.Є., Нітовська І.О., **Моргун Б.В.**, Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Деркач К.В., Сатарова Т.М. / Заявники та патентовласники Державна установа Інститут зернових культур НААН України й Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Бюл. № 20, 2018 р. (20 % авторства: участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).
2. Патент України на корисну модель № 115633. Спосіб отримання трансформованих рослин м'якої пшениці методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур апікального походження / Волч І.Р., Банникова М.О., Гнатюк І.С., **Моргун Б.В.** Заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. 19.10.2016. (30 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).
3. Патент України на корисну модель № 104264. Сніданок академіка Рибалки. /Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Починок В.М. заявник та патентовласник Інститут фізіології рослин та генетики НАН України. Опубліковано: 25.01.2016, Бюл. № 2. (30 % авторства: участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).
4. Патент України на корисну модель № 77331. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*/ Матвеева О.Ю., Тищенко О.М., **Моргун Б.В.** Власник Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. Бюл. № 3, 2013 (30 % авторства: участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).
5. Патент України на корисну модель № 77768. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи NK603 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / **Моргун Б.В.**, Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.02.2013, Бюл. № 4. (40 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).
6. Патент України на корисну модель № 77769. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи MON810 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції/ **Моргун Б.В.**, Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.02.2013, Бюл. № 4. (40 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).
7. Патент України на корисну модель № 61602 Спосіб визначення трансгенної лінії GA21 кукурудзи за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / **Моргун Б.В.**, Банникова М.О., Сатарова Т.М., Борисова В.В., Кучук М.В. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.07.2011, Бюл. № 14. (40 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).

### Авторські свідоцтва на сорти рослин

1. А.с. № 120154 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Сотниця**. Автори: Артемчук І.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Братущак С.П., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 3. 2014. С. 423. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).



2. А.с. № 120157 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Орійка**. Автори: Артемчук І.П., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Братушак С.П., Моргун В.В., Скрипльов В.О. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 3. 2014. С. 417. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
3. А.с. №140640 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Придніпровська**. Автори: Братушак С.П., Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Долежан Я. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2014. С. 242. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
4. А.с. № 140639 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Астарта**. Автори: **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Моргун В.В., Скрипльов В.О. (Україна). –Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2014. С. 12. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
5. А.с. № 141024 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Покрова**. Автори: **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 254. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
6. А.с. № 141023 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Софія Київська**. Автори: **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Моргун В.В. (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 260. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
7. А.с. №141028 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Здоба Київська**. Автори: **Моргун Б.В.**, Оксьом Л.Л., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 236. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).
8. А.с. № 141112 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Коляда**. Автори: Артемчук І.П., Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2015. С. 374. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
9. А.с. №160548 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Золото України**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О., **Моргун Б.В.** (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 502. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
10. А.с. № 160512 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Новосмуглянка**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О., Оксьом Л.Л., **Моргун Б.В.** (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 504. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
11. А.с. № 160543 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Соломія**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 511. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
12. А.с. № 170768 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Бужанка**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Катеринчук О.М., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 371. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).
13. А.с. № 170769 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Бондарівна**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 370. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).
14. А.с. № 170770 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Зореслава**. Автори : Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 385. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).
15. А.с. № 171137 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Стрітенська**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Катеринчук О.М., Оксьом В.П. (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 343. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
16. А.с. № 180225 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світогляд**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Катеринчук О.М., Оксьом В.П. (Україна). – Опубліковано в

- Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 341. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
17. А.с. № 171142 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Городниця**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.** (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 325. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
  18. А.с. № 171140 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Перлина Поділля**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.** (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 335. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
  19. А.с. № 171138 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Боровиця**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 321. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
  20. А.с. № 180874 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світоч**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Гаврилюк М.М. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2019. С. 485. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
  21. А.с. № 180873 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Порадниця**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Гаврилюк М.М. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2019. С. 479. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
  22. А.с. № 200479 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Січеслава**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 101. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
  23. А.с. № 200483 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Плеяда**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Гаврилюк М.М. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 100. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
  24. А.с. № 200488 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Донор Київський**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Починок В.М. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 104. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
  25. А.с. № 200482 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Аміна**. Автори: Моргун В.В., Починок В.М., **Моргун Б.В.**, Рибалка О.І., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 92. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
  26. А.с. № 200481 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Джамала**. Автори: Моргун В.В., Починок В.М., **Моргун Б.В.**, Рибалка О.І., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 94. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
  27. А.с. № 200788 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Академічна 100**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 250. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
  28. А.с. № 200790 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Ювілейна Патона**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 295. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
  29. А.с. № 200789 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світязь**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 286. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
  30. А.с. № 72491 Російської Федерації. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Астарта**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Скрипльов В.О. (Російська Федерація). –

Зареєстровано в Державному реєстрі охоронних селекційних досягнень Російської Федерації, 2018. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

31. А.с. № 730(3) Республіки Молдова. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Сотниця**. Автори: Моргун В.В., Артемчук І.П., Братушак С.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Республіка Молдова). – Опубліковано *Soiul este inclus in Catalogul Soiurilor de Plante al Republicii Moldova in anul 2018. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).*

### Основні тези наукових конференцій

1. Гав'яз, В.О., Салашний, Т.А., Великожон, Л.Г. та **Моргун, Б.В.** Генотипування синтетичних ліній пшениці за генами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* запасних білків глютенінів. XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «*Біотехнологія XXI століття*», присвячена 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (для студентів, аспірантів і молодих учених) 20.05.2020, Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського. С. 22.
2. Chen, G., Michael, T., Stepanenko, A., Zhou, Yu., Peterson, A., Kishchenko, O., Cui, D., Zhu, H., Lakhneko, O., **Morgun, B.**, Lam, E. & Borisjuk, N. Special arrangement of 5S rDNA in great duckweed, *Spirodela polyrhiza*: unusually low gene copy number, sequence divergence and precise chromosomal arrangement. *5th International ICDRA Conference on Duckweed Research and Applications*. Weizmann Institute of Science. Rehovot, Israel. September 9-12, 2019. P. 59.
3. Chen, G., Michael, T., Zhou, Yu., Stepanenko, A., Peterson, A., Kishchenko, O., Lakhneko, O., **Morgun, B.**, Lam, E. & Borisjuk, N. Duckweed rDNA organization and evolution. *PAG XXVII - Plant & Animal Genome Conference*. San Diego, USA, January 2019. P.232.
4. Borisjuk, N., Shi, J., Bi, H., Peterson, A., Chen, C., Shavrukov, Y., Stepanenko, A., **Morgun, B.**, Utebayev, M., Hrmova, M. & Lopato, S. Diversity of grain and leaf surface aliphatic components in wheat. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, July 03-06, 2018 P. 25.
5. Lakhneko, O., **Morgun, B.**, Skultety, L. & Danchenko, M. Comparative proteomics of grain allergens from several wheat varieties. *The 3rd International Plant Proteomic Organization (INPPO) World Congress*, Padova, Italy, September 9-12, 2018. P. 62.
6. Lakhneko, O., Stepanenko, A., Borysyuk, M., Stasik, O., Kuzminskiy, Ye. & **Morgun, B.** Sequence diversity of the gene coding for drought related transcription factor WRKY in selected Ukrainian wheat cultivars. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, July 03–06, 2018, P. 395.
7. Lakhneko, O., Stepanenko, A., Borysyuk, M., Stasik, O. & **Morgun, B.** Sequence Polymorphism of the Gene Coding for Drought Related Wheat Transcription Factor WRKY2. *Resurrection plants: Hope for crop drought tolerance (ReHOPE)*, University of Plovdiv, Bulgaria, September 20-22, 2018, P. 45.
8. Stepanenko, A., Lakhneko, O., **Morgun, B.** & Borisjuk, N. Isolation and characterization of rye *SbeIIa* and *SbeIIb* genes. *The 3rd International Symposium on Innovations in Plant and Food Sciences (3rd IPFS International Symposium)*, Fuzhou, China, December 15-18, 2018, P. 37.
9. Zhou, Y., Chen, C., Peterson, A., Stepanenko, A., Kishchenko, O., Lakhneko, O., **Morgun, B.** & Borisjuk N. Comparative biodiversity of duckweeds in Central Ukraine and Eastern China and their potential for remediation of wastewater. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, July 03-06, 2018. P.108.
10. Pokhylko, S., Schwartau, V., Pochinok, V., Mykhalska, L., Dugan, O. & **Morgun, B.** Influence of *Gpc-B1* of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* on grain protein content in bread wheat. *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (05–08 July 2017, Minsk, Belarus, 2017, P. 417.*
11. Горбатюк, І.Р., Гнатюк, І.С., Трояновська, Л.В., Жалій, Н.А., Банникова, М.О. & **Моргун Б.В.** Визначення наявності та експресії трансгенів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *Triticum aestivum* L. сортів Подолянка та Зимоярка. *Biotechnology for Agriculture and Environmental Protection: XII International Scientific-Applied Conference*. Odesa, Ukraine, September 7–10, 2016, P. 74–77.

12. Степаненко, Е.В., Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.**, Рыбалка, А.И. & Кузьминский, Е.В. Маркер-опосредованная селекция Wx-тритикале. *IV международная научная конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» 9-10 ноября 2016 года (г. Шымкент, Республика Казахстан)*. С.134-135.
13. Abraimova, O.E., Satarova, T.M., **Morgun, B.V.**, Nitovska I.O., Derkach, K.V., & Cherenkov, A.V. Effect of genetic transformation procedure on callus tissues of different maize genotypes. *Proceeding of 57th Annual Maize Genetics Conference*, March 12–15, 2015, Pheasant Run, St. Charles, Illinois, USA, P. 140.
14. Nitovska, I., Komarnytsky, I., Abraimova, O., Satarova, T. & **Morgun, B.** *Agrobacterium*-mediated transformation of maize of Ukrainian breeding genotypes. Abstracts of International Conference on *Advances in Cell Biology and Biotechnology*, Lviv, Ukraine, October 11-13, 2015, P. 44.
15. Трояновская, А.В., Похилько, С.Ю. & **Моргун, Б.В.**, Степаненко, А.И., Рыбалка, А.И., Полищук, С.С. & Починок, В.М. Определение ценных аллелей гена *Gpc-B1* в генотипах мягкой пшеницы. Материалы II международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» г. Минск, 13-16 октября 2015 года. С. 128.
16. Макаренко, Р.А. & **Моргун, Б.В.** Клонирование и биоинформатический анализ последовательностей кДНК генов SHP малых гидрофобных белков антарктических мхов. *Вторая летняя школа по биоинформатике* (Санкт-Петербург, 27 июля – 1 августа 2014 года). Тезисы докладов. Санкт-Петербург: Свое издательство, 2014. С. 33–34.
17. Нитовская, И.А., Абраимова, О.Е., Сатарова, Т.Н. & **Моргун, Б.В.** Морфология растений кукурузы, выращенных в условиях теплицы, после регенерации *in vitro*. VI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта, Украина, 12–17 октября 2014 года, С. 44.
18. Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.** & Рыбалка, А.И. Молекулярные маркеры для детектирования в пшенице QTL *Gpc-B1*, перенесенного от *T. dicoccoides*. Сборник тезисов XIV Молодёжной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», Москва, РФ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 16 апреля 2014 года, С. 50–52.
19. Степаненко, О.В., Рыбалка, О.И., Степаненко, А.И. & **Моргун, Б.В.** Розробка нисхідної ПЛР для визначення алельних варіантів гену Wx ячменю. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Проблеми і перспективи досліджень растительного мира», Нікітський ботанічний сад – ННЦ НААН України, Ялта, Україна, 13-16 травня 2014 року, С. 67–68.
20. Makarenko, R.O., Savchuk, O.P., Cherep, M.N., **Morgun, B.V.** Cloning and molecular genetic analyses of *Deschampsia antarctica* mitochondrial DNA sequences. *Conference Proceedings. Cell Technology Week*. Kiev, Ukraine, 14-17 May 2013, P. 52.
21. **Моргун, Б.В.** Молекулярні маркери як засіб вільного вибору. Abstracts of the 1st International Online Conference on “*Plant Genomics and Biotechnology*”, ІХБІГ НАН України, Kiev, Ukraine, December 23, 2013, С. 21.
22. Fedorenko, T., Markovskiy, O., Vlasova, O., Bannikova, M., Kuchuk, M. & **Morgun, B.** Detection of Resistant to Glyphosate Maize Transformation Events GA21, MON88017 and NK603 among Ukrainian Market Samples. *World Congress on In Vitro Biology*, Washington, USA, June 3-7, 2012, P.2057.
23. Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.** & Починок, В.М. Скрининг селекционных образцов пшеницы на наличие аллеля *al* локуса *Glu-B1*. Сборник тезисов XII Молодёжной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», Москва, РФ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 11 апреля 2012 года, С. 64–65.
24. Михальская, Л.Н., **Моргун, Б.В.**, Швартау, В.В., Волков, К.С., Холодова, В.П. & Кузнецов, Вл.В. Ионика – инновационный комплексный подход к изучению ионного гомеостаза //

Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Растение и стресс», 9-12 ноября 2010 года, Москва, РФ, С. 244–245.

25. Опанасенко, Т.Г., Смірнова, О.М., Порецька, О.І., Жолнер, Л.Г., Рудас, В.А. & **Моргун, Б.В.**, Кучук М.В. Моніторинг насіння кукурудзи зібраного в Україні на присутність трансформаційної події MON810. Друга міжнародна наукова конференція «Генетично модифіковані (біотехнологічні) рослини: перспективи використання та проблеми біобезпеки», 6-8 жовтня 2009 р., Київ, Україна. С. 94.

## АНОТАЦІЯ

**Моргун Б.В. Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», м. Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена створенню методами генетичної інженерії рослин пшениці і кукурудзи, стійких до гербіцидів, а також розробці методичних та практичних засад використання молекулярно-генетичних маркерів для селекції та генотипування злакових культур за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

У результаті виконання роботи розроблено принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії рослин. Вперше вивчено вплив біологічно активних речовин на морфогенетичні процеси у пшениці м'якої. Оптимізовано технології генетичної трансформації пшениці і кукурудзи в культурі *in vitro* та методом *in planta* для отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів. Проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами різних ретротранспозонів, та виявлено їх відмінності від нетрансгенних форм за генетичною структурою. Створена нова вдосконалена методика детекції трансформаційних подій на основі мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції та проведено моніторинг розповсюдження трансгенних рослин. Розроблено методичні основи та практичні засади використання ДНК-маркерів для селекції та генотипування найбільш поширених в Україні зернових культур за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. Створено цінний вихідний селекційний матеріал та нові сорти-інновації різного напрямку використання.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum*, *Zea mays*, генетична інженерія, трансгенні рослини, моніторинг, молекулярно-генетичні маркери, гени, алелі, мутації, інтрогресія, різноманітність, транслокації 1BL.1RS, 1AL.1RS, сорти-інновації.

## SUMMARY

### ***Morgun B.V. Improvement of cultivated cereals by methods of genetic engineering and marker-associated selection. – Manuscript.***

Thesis for the scientific degree of the Doctor of Sciences in Biology, the speciality 03.00.22 – molecular genetics. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The thesis is devoted to the creation of herbicide resistant wheat and corn plants by genetic engineering methods, as well as to the development of methodological and practical principles of using molecular genetic markers for selection and genotyping of cereals by genes that determine important economic traits.

As a result of the work, the principles of vector construction and DNA sequence selection were developed on the example of a model species *Physcomitrella patens* and an Antarctic plant *Deschampsia antarctica*, which can be used for plant genetic engineering. The influence of biologically active substances on morphogenetic processes in bread wheat was studied for the first time. The technologies of genetic transformation of wheat and corn in *in vitro* culture and *in planta* method to obtain transgenic plants resistant to herbicides were optimized. The level of polymorphism of DNA regions flanked by inverted LTR repeats of different retrotransposons was analyzed, and their differences from non-transgenic forms in genetic structure were revealed. A new improved technique for detecting transformation events based on multiplex polymerase chain reaction has been developed and the distribution of transgenic plants has been monitored. Methodical and practical bases of DNA markers use for selection and genotyping of the most widespread in Ukraine grain crops on genes which determine important economic and valuable traits are developed. Valuable source selection material and new varieties-innovations of different directions of use have been created.

**Key words:** *Triticum aestivum*, *Zea mays*, genetic engineering, transgenic plants, monitoring, molecular genetic markers, genes, alleles, mutations, introgression, diversity, 1BL.1RS, 1AL.1RS translocations, varieties-innovations.