

## ВІДГУК

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

Зернові належать до найважливіших аграрних культур, виробництво яких у світі в 2020 році сягало 2 817 млн. тонн (FAO, 2021). За рахунок зростання чисельності населення до 2030 року попит на пшеницю, як очікується, збільшиться на 40% (Dixon et al., 2009). Для задоволення харчових потреб необхідне щорічне збільшення врожайності на 2%. Проте середньорічні темпи виробництва зерна пшениці значно відстають від темпів росту населення планети. Зростаючий дисбаланс можливо скоротити збільшенням виробництва зерна як за рахунок розширення посівних площ, так і шляхом підвищення врожайності. Перевага віддається саме підвищенню врожайності, оскільки посівні площі у багатьох регіонах Землі досягли або перевищили межі екологічної безпеки (Reynolds et al., 2001). Україна є провідною країною на світовому ринку зерна з потенціалом експорту, що перевищує 40 млн тонн. У нас 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. З огляду на це стратегічним державним завданням є підвищення продуктивності ключових для національного землеробства сільськогосподарських культур, зокрема пшениці і поліпшення якості зернової продукції. У здійсненні цього завдання вирішальну роль відіграватимуть новітні сорти і гібриди, створені шляхом селекції на основі сучасних методів генетичного поліпшення рослин. Головним завданням поліпшення рослин на сучасному етапі є створення сортів з високим

генетично детермінованим потенціалом продуктивності й якості та підвищеним адаптивним потенціалом до стресових факторів довкілля. Успішне вирішення цього завдання пов'язане з постійним удосконаленням селекційного процесу, його інтенсифікацією за рахунок впровадження новітніх досягнень біології.

Створення високопродуктивних сортів злакових культур вимагає комплексного підходу та мобілізації новітніх досягнень в галузі генетики, геноміки, біотехнології, молекулярної біології та селекції. В Україні комплексні програми генетичного поліпшення злаків із застосуванням методів класичної, молекулярної та інтрогресивної селекції, а також біотехнологічних досліджень 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 буде сприяти проведенню цілеспрямованого добору вихідного матеріалу та розширить можливості щодо прискорення селекції сортів з певними технологічними ознаками, зокрема й з поліпшеною якістю зерна, стійких до екологічних стресів.

Дедалі більшого значення набуває впровадження досягнень біотехнології в генетико-селекційний процес. У поєднанні з традиційною селекцією рослин, вона вносить вклад у розвиток нових методів генетичних змін розвитку рослин та їх продуктивності. В останній час інтенсивно почали розроблятися новітні молекулярні біотехнології з використанням різноманітних стратегій, в тому числі спрямованих на отримання стійких генотипів шляхом інтеграції в геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси адаптації/стійкості. 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, зокрема кукурудзи, рису, пшениці й ячменю.

Найефективнішим методом оцінки є розробка ДНК-технологій на основі молекулярних маркерів. Сьогодні у світі селекційні дослідження повністю перейшли на новий молекулярний рівень, що у 2-3 рази прискорює селекційний процес. Застосування молекулярно-генетичних маркерів у цій галузі сприяє зменшенню масштабів і скороченню термінів селекційних програм, а також формуванню сучасного уявлення про особливості організації та еволюції організмів. Методи молекулярної селекції, засновані на полімеразній ланцюговій реакції, вже сьогодні дозволяють підійти до аналізу генетичного поліморфізму на рівні нуклеотидних послідовностей генів та розширити можливості щодо прискорення селекції сортів з певними технологічними ознаками.

Перспективним підходом підвищення стійкості і врожайності злаків є генетичне поліпшення рослин, створення сортів і гібридів з високим потенціалом продуктивності та якості, стійких до біотичних та абіотичних стресорів. Застосування методів молекулярної селекції та біотехнологічних підходів привертає особливу увагу генетиків і селекціонерів. Проте на сьогодні не існує достатньо ефективних протоколів генетичної трансформації злакових культур, тому активно розробляються більш досконалі технології, які б сприяли отриманню генотипів, що мають покращені агрономічні якості. Пошук нових, більш ефективних і зручних ДНК-маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу селекційного матеріалу продовжує бути актуальним. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Моргуна Б.В., присвячена створенню методами генетичної інженерії рослин пшениці і кукурудзи, стійких до гербіцидів, а також розробці методичних та практичних засад використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур та генотипуванню пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки є актуальною і практично значимою.

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

*У розділі «Огляд літератури»* представлено сучасні основні напрями генетичного поліпшення сільськогосподарських рослин. Розглянуто роль біотехнології у підвищенні ефективності селекційного процесу та її внесок у створення нового покоління сортів злакових культур. Детально висвітлено сучасні досягнення генетичної трансформації злаків, зокрема кукурудзи і пшениці, методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *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.

*У розділі «Матеріали та методи досліджень»* описано рослинний матеріал, залучений для проведення досліджень, зокрема 160 сортів пшениці м'якої озимої вітчизняного та зарубіжного походження; сорти та зразки ячменю; спельти; мутантні лінії тритикале; вибірки селекційних гібридів; лінії білозерної озимої м'якої пшениці та синтетичні лінії пшениці. Матеріалом дослідження також були: 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*. Для генетичної трансформації пшениці були використані сорти м'якої пшениці вітчизняної



селекції «Зимоярка» та «Подольянка». З генетичної трансформації кукурудзи матеріалом досліджень були 8 інбредних ліній, 10 гібридів F<sub>1</sub> та 3 соматоклональні варіанти на основі гібридів F<sub>1</sub>.

Описані бактеріальні штами та векторні конструкції для проведення генетичної трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* та методом *in planta*; протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації для отримання трансгенних рослин пшениці, стійких до фосфінотрицину, а також методи аналізу трансформованих генотипів. Представлено умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої та біолістичної трансформації різних генотипів кукурудзи для отримання рослин, стійких до гербіцидів.

Детально висвітлено молекулярно-генетичні дослідження, зокрема, виділення загальної ДНК ЦТАБ та ЦТАБ-експрес методами; спектрофотометричного та електрофоретичного дослідження загальної рослинної ДНК; розведення ДНК для проведення полімеразної ланцюгової реакції на референтні та цільові гени; проведення електрофорезу ДНК у агарозному гелі. Охарактеризовано низку використаних праймерів для аналізу генетичного поліморфізму та алельного складу локусів генів господарсько-цінних ознак.

Представлено методи визначення: господарсько-корисних генів; пшенично-житніх транслокацій; глютенінової та гліадинової фракцій запасних білків пшениці методом електрофорезу у поліакриламідному гелі; активності поліфенолоксидаз, а також методи статистичного аналізу результатів досліджень.

**У розділі «Принципи конструювання векторів та добір послідовностей ДНК для генетичної трансформації рослин»** представлено результати досліджень з розробки принципів конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії культурних рослин. Визначено структуру гена *shp1* моху *P. patens* та підтверджено факт наявності подібних

послідовностей в різних таксонах рослин. Для виявлення досліджуваної генетичної послідовності в зразках мохів підібрано дві пари праймерів: SHP1F1–SHP1R1 та SHP1F3–SHP1R3. Показано, що у деяких видів спостерігається виражена варіабельність довжини отриманих фрагментів, що можна пояснити поліморфізмом даного гена через видову віддаленість. Найбільша подібність отриманих фрагментів виявлена у *P. patens* та *Warnstorfia fontinaliopsis*. Встановлено, що для аналізу кДНК бажано використовувати пару праймерів SHP1F1–SHP1R1, які гібридизуються з консервативними ділянками гена. Виділено кодуєчу послідовність ДНК генів малих гідрофобних білків SHP та проведено її клонування у вектор pUC19. Порівняльний аналіз отриманої нуклеотидної послідовності з референтним геномом *Physcomitrella patens* виявив одну значиму заміну в амінокислотній послідовності білка SHP1.

Виділено ДНК генів НАД-Н дегідрогенази щучника антарктичного та певні їх послідовності клоновано у вектор pUC19. Сиквеновано і проведено аналіз нуклеотидних фрагментів мітохондріального геному *D. antarctica*. Встановлено наявність в мітохондріальній ДНК генів 1-ої та 5-ої субодиниць NADH дегідрогенази, 26S рибосомальної РНК. Показана висока гомологія з мітохондріальними геномами представників родини Злакових (*T. aestivum*, *O. sativa*, *B. oldhamii* та ін.).

**У розділі «*Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці м'якої»** викладено результати досліджень стосовно розробки протоколу та проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* та методом *in planta* для отримання рослин, стійких до гербіцидів.

Проведена оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*. Вперше вивчено вплив регуляторів росту - піклораму та дикамби - на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. 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 та найбільша кількість пагонів. Досліджено вплив  $\beta$ -лактамічного антибіотика тиметину на морфогенетичні процеси у пшениці м'якої та показано, що він має властивості регулятора росту.

Розроблено протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*. Використовуючи оптимізований протокол проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур пшениці. Частота трансформації калюсів, отриманих з незрілих зародків, вектором p014 сорту Подолянка склала 2,7%, а сорту Зимоярка - 2,4%. Після використання вектора pCB203 частота трансформації калюсу сорту Зимоярка, склала 1,2%, а з калюсу апікального походження – 1,6% (сорт Зимоярка) та 1,8% (сорт Подолянка), що свідчить про однакову ефективність використання калюсу пшениці м'якої різного походження для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*.

Оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, в результаті чого частота трансформації пшениці зросла до 20,7%. Показано залежність частоти отримання трансгенних рослин *T. aestivum* методом *in planta* від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму. Температурний режим  $t \approx 24^\circ\text{C}$  і помірна вологість повітря сприяють максимальній ефективності зав'язування насіння ( $40,6 \pm 1,5\%$ ) у сорту Подолянка та отриманню трансформантів (7,3%). При зниженні температури нижче  $16^\circ\text{C}$  відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном. Вперше отримано рослини пшениці сортів Подолянка та Зимоярка, стійкі до фосфіотрицину. Трансгенна природа рослин підтверджена методами ПЛР, ЗТ-ПЛР.

У трансгенних калюсних ліній пшениці методом IRAP-аналізу проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозону SIRE 1, та виявлені їх відмінності від нетрансгенних форм за генетичною структурою. В спектрах продуктів ампліфікації ДНК відмічено появу нових ампліконів, що свідчить про

активацію та транспозицію даного МГЕ. У генетично-модифікованих рослин пшениці, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази у спектрах продуктів ампліфікації ДНК не відмічено появи нових ампліконів, що свідчить про відсутність активації транспозиційної активності МГЕ.

У розділі «Генетична трансформація кукурудзи *in vitro*» узагальнено результати досліджень автора з отримання методами *Agrobacterium*-опосередкованої та біолістичної трансформації рослин кукурудзи, стійких до гербіцидів. Оптимізовані окремі етапи протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи в умовах *in vitro*. Встановлено позитивний ефект антибіотика цефотаксиму на регенераційну здатність калюсів кукурудзи, отриманих з незрілих зародків. Виділений гібрид R<sub>2</sub>PLS61×PLS61 з високою та тривалою регенераційною здатністю. Показано перспективність використання гліфосату у концентрації 0,01 мМ для добору трансгенних форм кукурудзи. Встановлено, що найкращим для біолістичної трансформації кукурудзи є незрілі зародки з калюсами, які до обстрілу культивувалися 9 діб та відібрані генотипи найбільш компетентні до даного способу трансформації.

За допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* отримано трансгенні рослини кукурудзи, стійкі до гліфосату. Отримані стійкі до фосфінотрицину рослини-регенеранти, у яких виявляли активність ферменту β-глюкуронідази. Встановлена певна кореляція 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. Трансгенна природа отриманих рослин була підтверджена за допомогою ПЛР.

Проведена морфобіологічна оцінка трансформантів, які несуть чужорідний ген *bar* у поколіннях T<sub>0</sub>-T<sub>6</sub> дозволила охарактеризувати стійкість



рослин за основними показниками росту і розвитку. Між рослинами T<sub>2</sub> та T<sub>3</sub> спостерігається більша варіабельність за дослідженими ознаками, ніж в контролі, що дозволяє припустити наявність рослин з різним ступенем стійкості до гербіциду. Частота виживаності рослин T<sub>6</sub> 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.

*У розділі «Моніторинг розповсюдження генетично модифікованих рослин на полях та у торгівельній мережі України»* представлено результати вивчення розповсюдження трансгенних рослин на сільськогосподарських полях України. Визначено наявність продуктів переробки трансгенної сої в харчових продуктах торгівельної мережі України. Для цього розроблена нова вдосконалена методика детекції трансформаційних подій на основі полімеразної ланцюгової реакції. Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційних подій MON810, GA21 та NK603 показало, що середня частота їх зустрічальності в Україні станом на весну 2009 року, становить приблизно 4%. Перевірка зразків насіння кукурудзи Дніпропетровської області на присутність трансгенних форм засвідчила наявність трансформаційних подій NK603 та Vt176 з частотою 5-10% .

Розроблена мультиплексна реакція для детекції трансформаційної події GA21 з одночасною ампліфікацією гена зеїну кукурудзи та мультиплексні реакції для детекції трансформаційних подій MON810 та NK603. Ідентифікація трансгенного статусу гербіцид-стійкого ріпаку на території Київської області підтвердила присутність у декількох рослинах глюфосинату амонію та гліфосату, трансгену *bar* і трансформаційної події GT73 з трансгеном CP4 *epsps*.

Вивчення вмісту ГМ-сої у харчових продуктах показало, що з 45 опрацьованих зразків - 29 містять у своєму складі ген *lectin* специфічний для сої, серед них 23 харчові продукти, що відповідно вказує на присутність

добавок сої в них. З 29 зразків 6 дали позитивну реакцію на трансформаційну подію GTS 40-3-2, серед них 5 зразків сої 1 зразок харчового продукту, що представлений соєвим білком для спортсменів іноземного виробництва. Наявність *nos*-термінатору в харчових продуктах може свідчити про присутність трансгенного матеріалу інших культур.

*У розділі «Використання молекулярних маркерів у селекції злаків»* узагальнено результати досліджень автора з розробки методичних та практичних засад використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

Розроблено дев'ять систем на основі IRAP, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами різних злакових культур. Досліджено генетичне різноманіття генотипів м'якої пшениці і спельти за IRAP-маркерами та показано рівень генетичної відмінності між вивченими сортами цих видів. Виявлена висока ефективність ПЛР на основі праймерів до ретротранспозону Sukkula як за окремого використання, так і у комбінаціях з праймерами до ретротранспозонів Wilma07 і Nikita у дослідженнях геному ячменю. Встановлено, що найефективнішими для дослідження генетичного різноманіття пшениці є розроблені системи REMAP Sukkula+A17898 та Sukkula+HB10 для яких відсоток виявленого поліморфізму становить 50 % та 23,07%, відповідно.

Здійснено хімічний мутагенез тритикале для відбору рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*. Проведено молекулярне дослідження мутантних рослин з використанням IRAP-маркерів, в результаті якого підтверджено зміни у геномі тритикале під дією мутагенів.

Розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах м'якої озимої пшениці та чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm626*,



*Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, що розташовані на 6В хромосомі і 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* =  $6,77 \pm 2,08$ %.

Аналіз рослин F<sub>4</sub> і F<sub>5</sub> поколінь на вміст біологічно важливих елементів методом ICP-MS виявив, що присутність гена *Gpc-B1* зумовлює статистично достовірне підвищення рівня накопичення у зернівках заліза, цинку, марганцю, міді, селену та магнію. Комплексний аналіз вимірювання вмісту загального білка зернівок у рослин F<sub>5</sub> покоління методом К'ельдаля та NIR показав, що ген *Gpc-B1* зумовлює підвищення вмісту білка на 14% у порівнянні з вихідним сортом Куяльник.

Проведено моделювання праймерів та перевірено їх ефективність для визначення трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1* методом ПЛР. Здійснена оцінка 44 сімей F<sub>5</sub> покоління, носіїв гена *Gpc-B1*, на наявність алельних субодиниць генів *Glu-1* запасних білків. За трьома локусами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16 найбільш цінних сімей, які мають оптимальну для хлібопекарської якості алельну складову локусу *Glu-1*.

Методом ПЛР визначено алельний склад генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які детермінують консистенцію ендосперму зернівки пшениці. У багатофакторному дисперсійному аналізі впливу різних алелів генів *Pinb-D1*, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* та їх комбінацій на текстуру зерна гібридів пшениці було виявлено спільний вплив ( $p < 0,01$ ) комбінацій алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1*. На відміну від гібридів, де було показано сильний вплив ( $p < 0,001$ ) на твердозерний тип ендосперму наявності тих чи інших алелів гена *Pinb-D1*, у комерційних сортів української селекції такого впливу виявлено не було. Для детекції гібридів м'якої пшениці F<sub>1</sub> та F<sub>2</sub> створено та використано маркерну систему для визначення перенесення модифікованого локусу із геном *SBEIIa*, який викликає збільшення накопичення амілози в зерні. Відібрано перспективні для залучення в селекційний процес зразки.

За допомогою системи ДНК-маркерів визначено алельний склад генів *Psy1*, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні злакових культур

у 162 сортів та гібридів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції. Серед дослідженої вибірки було відібрано зразки пшениці, у яких можна очікувати найвищу концентрацію каротиноїдів. Показано, що використання молекулярно-генетичних маркерів може бути ефективним для аналізу геномів пшениці на наявність алелів генів PPO, що відповідають за активність поліфенолоксидази.

Встановлено, що підібрані маркерні системи (молекулярно-генетичний аналіз ДНК та електрофоретичне визначення білків) є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Показано, 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.

*У розділі «Прикладні результати створення вихідного матеріалу та сортів злакових культур»* представлена практична придатність розроблених ДНК-технологій для генотипування найбільш поширених в Україні зернових культур шляхом їх впровадження у селекційний процес та отримання нового вихідного матеріалу. Ініційовано кілька нових напрямів селекції озимої пшениці, яких раніше не було в Україні.

Започатковано програму створення цінного селекційного матеріалу пшениці за ознаками стійкості до хвороб, посухостійкості та якості зерна на основі використання генетичної плазми егілопсів – дикорослих співродичів м'якої пшениці. За цілеспрямованих схрещувань в геном даної культури перенесено цілу серію алелів глютенін- та гліадинкодуєчих локусів та ген, який викликає екстрем'який тип консистенції ендосперму, чим створено генетичну базу для селекції екстра-сильних за характеристиками хлібопекарської якості сортів пшениці.

Доведено ефективність використання гена *Gpc-B1*, перенесеного від дикорослої пшениці емер, у селекційних програмах пшениці з метою



підвищення вмісту білка і ключових мікроелементів у зерні, поліпшення його технологічної і споживчої цінності. Отримані агрономічно цінні селекційні лінії озимої пшениці з підвищеним вмістом протеїну та ключових нутрієнтів - заліза, марганцю, цинку та селену.

Розпочато дослідження генетичних систем, що контролюють колір зерна та отримані генотипи пшениці з білим, чорним та голубим кольором зерна з високою антиоксидантною активністю як основи для нового напрямку селекції пшениці круп'яного використання з поліпшеною харчовою цінністю зерна.

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

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Робота виконувалась у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії впродовж 2009-2020 рр. 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.).

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором 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 піклораму та дикамби на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. Оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* та методом *in planta* та отримано рослини, стійкі до фосфінотрицину. Удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин кукурудзи в культурі *in vitro* методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та отримано трансгенні рослини, стійкі до гліфосату та фосфінотрицину.

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 полімеразної ланцюгової реакції, 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 полімеразних ланцюгових реакцій, 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.

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 отриманих результатів** полягає у отриманні трансгенних рослин м'якої пшениці та кукурудзи, стійких до гербіцидів, придатних для використання в селекційних програмах з генетичного поліпшення даних культур. Розроблені способи створення генетично модифікованих рослин можуть застосовуватися як елементи біотехнологічних, молекулярно-генетичних та селекційних програм, а також використовуватися для створення нових 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; *Psy*, 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 зкість 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.).

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

Понад 80 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Цілеспрямоване і логічне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати значний обсяг експериментального матеріалу. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: 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.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу дуже великого і об'ємного фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням методів досліджень. Достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. Тому, вважаю, що наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.** Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на міжнародних наукових форумах. Зокрема, за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 3 монографії у співавторстві, 54 статей 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.

**Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.** Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Автореферат адекватно відображує зміст дисертації.

**Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації.**

Позитивно оцінюючі дисертаційну роботу Моргуна Б.В., варто виділити окремі питання і зауваження, а саме:



1. Які стресові фактори є найбільш загрозливими для культурних злаків: абіотичні чи біотичні?
2. Які з досліджуваної лінійки культурних злаків виявились найбільш стресостійкими?
3. Пшениця належить до рослин із С-3 типом фотосинтезу, тоді як кукурудза – має С-4 тип фотосинтезу, який, як відомо, є більш продуктивним. Чи враховувалась ця обставина при проведенні дослідження?
4. В роботі вивчались рослини дикого злаку щучника антарктичного, який володіє високим адаптаційним потенціалом. Що відомо про місце походження цього виду, наскільки він генетично споріднений з пшеницею і її вірогідним попередником спельтою?
5. Чи розглядалась можливість використання природних регуляторів росту, зокрема саліцилової і жасмонової кислот, для підвищення стійкості досліджуваних рослин?

**Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці.** Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів молекулярної генетики рослин. Результати роботи Моргуна Б.В. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках закладів, що займаються проблемами генетичного поліпшення рослин, а також в курсах лекцій з генетики, молекулярної біології Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора біологічних наук.** Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, рецензована дисертаційна робота «Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції», є

завершеною науковою роботою, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор Моргун Богдан Володимирович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,  
завідувач відділу фітогормонології  
Інституту ботаніки НАН України,  
доктор біологічних наук, професор

Косаківська І.В.

03.09.2021



Підпис *Косаківської І.В.*  
Засвідчую  
Відділ кадрів