
ЗМІНА КЛІМАТУ

УДК 633.11:577.218:57.045

DOI <https://doi.org/10.32846/2306-9716/2020.eco.4-31.31>

МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ПОСУХОСТІЙКИХ ГЕНОТИПІВ ПШЕНИЦІ В УМОВАХ ЗМІН КЛІМАТУ

Пикало С.В., Демидов О.А., Юрченко Т.В.,
Хоменко С.О., Гуменюк О.В., Харченко М.В.
Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла
Національної академії аграрних наук України
вул. Центральна, корпус 2, 08853, с. Центральне,
Миронівський район, Київська область
pykserg@ukr.net

Завдяки своїй широкій географічній адаптації та цінності для харчування людини пшениця є однією з найважливіших культур у світі. Рослини пшениці піддаються дії різних стресів у природному середовищі. Для виживання рослини реагують і пристосовуються до цих стресів на фізіологічному, біохімічному, клітинному, а також молекулярному рівнях. Серед абіотичних факторів, які сформували і продовжують формувати еволюцію рослин, доступність води є найбільш важливим.

У зв'язку з посухою урожай пшениці постійно знижується, що є загрозою для світової продовольчої безпеки в сільсько-господарському виробництві. Саме тому одним із пріоритетних напрямів селекції пшениці є створення сортів, стійких до дії водного дефіциту. Стійкість до посухи – це складна ознака, контрольована багатьма генами. Генотипи пшениці зазвичай демонструють різний рівень посухостійкості, що робить їх молекулярну характеристику і класифікацію вкрай важливими для створення стійких сортів.

Генна інженерія рослин на стійкість до посухи може бути досягнута шляхом регульованої експресії стрес-індукованих транскрипційних факторів, які будуть регулювати експресію відповідних генів. Досягнуті успіхи в дослідженнях геному і молекулярної технології призвели до використання в селекції ДНК-маркерів, що дало змогу значно підвищити ефективність добору і прискорити створення нових сортів із високим потенціалом врожайності та адаптивності. Введення молекулярних маркерів у селекцію рослин надало селекціонерам цінний інструмент для характеристики генетичного матеріалу.

Результати, отримані в ході аналізу літературних даних, свідчать, що молекулярні маркери дозволяють розрізняти послідовності ДНК-геному між сортами чи лініями і є потужними засобами для ідентифікації генотипів пшениці з господарсько-цінними ознаками. Вони дають змогу досліджувати тисячі геномних ділянок зародкової плазми пшениці в умовах водного дефіциту, а тому в багатьох країнах світу є невід'ємним складником селекційного процесу цієї культури. *Ключові слова:* пшениця, генотип, молекулярні маркери, посуха, стійкість, гени.

Molecular markers for identification of drought tolerant wheat genotypes under climate change conditions. Pykalo S., Demydov O., Yurchenko T., Khomenko S., Humeniuk O., Kharchenko M.

Wheat is one of the most important crops in the world due to its wide geographical adaptation and human nutritional value. Wheat plants are exposed to various stresses in their natural environment. For survival, plants respond and adapt to these stresses at physiological, biochemical, cellular, and molecular levels. Among the abiotic factors that have shaped and continue to shape plant evolution, water availability is the most important.

Due to the drought, the wheat harvest is constantly declining, which poses a threat to global food security in agricultural production. That is why one of the priority directions of wheat breeding is the creation of varieties that are resistant to the action of water deficit. Drought tolerance is a complex trait controlled by many genes. Wheat genotypes generally exhibit varying levels of drought tolerance, making molecular characterization and classification critical for developing resistant varieties.

Genetic engineering of plants for drought tolerance can be achieved through the regulated expression of stress-induced transcription factors, which, in turn, will regulate the expression of the corresponding genes. The advances in genome research and molecular technology have led to the use of DNA markers in breeding, which has significantly increased the efficiency of selection and accelerated the creation of new varieties with a high potential for productivity and adaptability. The introduction of molecular markers in plant breeding has provided breeders with a valuable tool for characterizing genetic material.

The results obtained in the course of the analysis of literature data indicate that molecular markers make it possible to distinguish genome DNA sequences between varieties and lines and thus are powerful tools for identifying wheat genotypes with commercially valuable traits. They make it possible to study thousands of genomic regions of wheat germplasm in conditions of water deficit, and therefore in many countries of the world are an integral part of the breeding process of this crop. *Key words:* wheat, genotype, molecular markers, drought, tolerance, genes.

Постановка проблеми. Пшениця – одна з найважливіших продовольчих культур, оскільки пшеничний хліб є продуктом харчування населення більшості країн світу [1–3]. Абіотичні стреси, такі як посуха, засолення, високі температури тощо, є поширеними несприятливими умовами навколишнього середовища, які негативно впливають на продуктивність пшениці в усьому світі. Окрім того, процеси урбанізації та індустріалізації все більше займають родючі землі і передбачають надмірне використання пестицидів, ставлячи під загрозу довкілля.

Глобальні зміни клімату, які спостерігаються у світі, викликали посилення впливу абіотичних стресових чинників на рослинний організм. Стрес, викликаний посухою, негативно впливає на ріст і розвиток рослин, що призводить до різкого зниження продуктивності рослин [4; 5]. Посуха є найбільш серйозною перешкодою при вирощуванні сільськогосподарських культур та отриманні максимального врожаю, оскільки вода необхідна для кожного етапу розвитку, починаючи з проростання насіння до дозрівання рослини [6–7].

Водний стрес призводить до зниження морфологічних і агрономічних параметрів, а також до порушень на фізіологічному, біохімічному і молекулярному рівнях [4]. З огляду на це доречним є ідентифікація сортів пшениці, які добре пристосовані до нестачі води, а також визначення ефективних і надійних критеріїв відбору посухостійких форм.

Традиційно сортовий відбір ґрунтується на морфологічних ознаках, при цьому полігенні ознаки, зокрема посухостійкість, проаналізувати дуже важко. Принципово новим підходом є застосування методів біотехнології, що значно полегшує та прискорює традиційний селекційний процес створення нових ліній і сортів пшениці [8].

Варто зазначити, що за останні десятиліття поряд із морфолого-анатомічними і фізіолого-біохімічними методами оцінки стрес-стійкості рослин біотехнологічні підходи набули досить широкого поширення [9]. Сучасні біотехнології дають змогу значно скоротити терміни добору та оцінки сортів і успішно застосовуються селекціонерами по всьому світу. Подальший прогрес у вивченні посухостійкості пшениці буде залежати не лише від розвитку клітинних технологій, але й більш глибокого пізнання молекулярних механізмів регуляції та експресії генів, які детермінують цю ознаку [10–11].

Виклад основного матеріалу. На сучасному етапі селекції оцінка генетичного різноманіття пшениці відбувається не лише на основі аналізу родоходів, вивчення морфологічних і біохімічних ознак, а й за допомогою молекулярно-генетичних досліджень [13–14]. Останні розробки у галузі молекулярної генетики надали селекціонерам потужні інструменти для виявлення форм із господарсько-цінними ознаками. Загалом молекулярно-генетичний аналіз дозволяє виявляти специфічні генетичні маркери,

зручні для відбору генотипів, стійких до різних несприятливих факторів навколишнього середовища, зокрема посухи. Накопичено вже багато даних, які свідчать про важливе значення молекулярних механізмів у формуванні стійкості рослин до різного роду стресів [13; 15; 16].

Вважається, що одним із можливих механізмів адаптації рослин до стресових умов є збільшення геномної нестабільності та розширення генетичного різноманіття [17; 18]. Дослідження багатьох авторів показують, що значну роль у процесах адаптації рослин до несприятливих факторів зовнішнього середовища відіграє активування мобільних генетичних елементів та генів, що кодують білки, які залучені в адаптивних реакціях [10; 14; 19; 20].

Активування мобільних генетичних елементів за умов стресу призводить до підвищення мутабельності за рахунок більш високої частоти їх перемішень у ділянки активного еухроматину [10; 14; 21]. В. McClintock [22] вперше запропонувала гіпотезу про те, що індукція міграції мобільних генетичних елементів, спричинена стресовими чинниками, найімовірніше є реакцією геному на несподівані зміни середовища. Ці елементи індукують генетичну мінливість у широкому діапазоні – від структурних перебудов хромосом до незначних змін експресії генів [14; 21].

Одними з найбільш досліджених мобільних генетичних елементів у рослин є ретротранспозони. Доведено підвищення активності ретротранспозонів за умов абіотичного стресу та виявлено їх транскрипційну активність, що свідчить про значну роль цих елементів у формуванні відповіді на дію стресових чинників [21].

Зазначено, що реакція рослини на посуху супроводжується також активацією генів, які беруть участь у сприйнятті стресу та в передачі сигналу стресу [23]. Ці групи генів кодують білки, які захищають клітини від згубних наслідків дії водного дефіциту. Вони беруть участь у всій послідовності реакції клітини на стрес, такий як передача сигналів, контроль транскрипції, захист мембран і білків, а також видалення вільних радикалів і токсичних сполук [24]. Сюди належать гени, які детермінують накопичення сумісних осмолітів, пасивний транспорт через мембрани та енергозберігаючі водні транспортні системи [24; 25]. Інша група генів, активованих у результаті посухи, складається з регуляторних білків, які додатково регулюють передачу сигналу стресу і модулюють експресію генів [24].

Розшифрування нуклеотидних послідовностей геномів пшениці дозволило виявити окремі гени, пов'язані зі стрес-реакцією [11]. Е. Sivamani та співавтори [16] вказали, що ген *HVA1* сприяє росту рослин пшениці за умов посухи. Натепер велика увага приділяється послідовностям генів, що кодують білки, які відіграють велику роль у реакції рослин на стресові фактори. Ці гени здебільшого представлені транскрипційними факторами і генами дегідринів [26].

Серед усіх транскрипційних факторів увагу багатьох вчених привертають чинники, які пов'язують елемент відповіді на дегідратацію (DREB) [10; 11]. У літературі наводяться дані на користь того, що ген *Dreb1* у третій хромосомі геному А може відповідати за формування толерантності до абіотичних стресових чинників, зокрема до посухи [10; 15]. Гени групи DREB можуть розглядатися як перспективні кандидати для селекції за допомогою маркер-асоційованої селекції (MAS), спрямованої на стійкість до посухи [15].

О.Р. Lakhneko та співавтори [27] вивчали поліморфізм попередньо відібраних локусів генів трьох транскрипційних факторів (*TaNAC2a*, *TaWRKY2*, *TaWRKY19*) і протеїн пізнього ембріогенезу (*LEA*) дегідрину (*Td29b*), пов'язаних зі стійкістю пшениці до посухи. Структуру генів і хромосомну локалізацію було встановлено за допомогою біоінформаційних підходів.

З'ясовано, що гени *TaWRKY2* і *TaWRKY19* складаються з чотирьох екзонів і трьох інтронів, локалізованих на плечах 2BS і 1DS хромосоми; *TaNAC2a* містить два екзони та один інтрон 7AS; ген *Td29b* містить один екзон 3AS. У результаті використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) не було виявлено поліморфізму для локусів генів *TaNAC2a*, *TaWRKY19* і *Td29b* за допомогою попередньо відібраних пар праймерів. Проте для локусу *TaWRKY2* виявлено поліморфні фрагменти. Скринінг поширення поліморфних локусів проводили для набору сортів пшениці та жита, а також міжвидових гібридів. Виявлений поліморфізм локусу *TaWRKY2* свідчить про наявність деяких інших алелів цього гена. Автори зазначили, що одержані дані є важливими для подальших досліджень посухостійкості пшениці.

Значного поширення набула практика використання головних генів і їх комбінацій (пірамідування), що пов'язано з наявністю молекулярних маркерів до цих генів і з можливістю використання їх у MAS [27; 28]. Молекулярно-генетичні маркери – поліморфні ознаки, які виявляються методами молекулярної біології на рівні нуклеотидної послідовності ДНК для певного гену або для будь-якої іншої ділянки хромосоми при порівнянні різних генотипів [28].

Молекулярні або ДНК-маркери широко використовуються для виявлення локусів генів, що детермінують ознаку посухостійкості, а тому дозволяють успішно вирішувати низку задач фундаментального і прикладного характеру. Їх використання набуває популярності в практичній селекції не лише для оцінки генетичної різноманітності, а й для ідентифікації стійких форм [27]. Переваги використання цієї системи маркерів полягають у можливості тестування генетичного поліморфізму на рівні самих генів, а не їх продуктів, як це відбувається у випадку застосування біохімічного маркування [23]. ДНК-маркерна система дозволяє маркувати різні ділянки ДНК, в тому числі некодуючі [29]. Окрім того, матеріалом для подібного роду маркування можуть слу-

гувати різні тканини і органи незалежно від стадії онтогенезу, що надає незаперечну перевагу порівняно з іншими типами маркерів [30].

Молекулярні маркери є корисним доповненням до морфологічних і фізіологічних характеристик сортів, оскільки дозволяють ідентифікувати сорти на ранніх стадіях розвитку рослин, а тому значно підвищують ефективність селекції [20; 32]. Відомо, що стійкість до посухи та інших абіотичних стресів контролюється багатьма другорядними генами (полігенами) [29].

Локуси на хромосомах, які належать до цього типу генів, називають локусами кількісних ознак (QTL) [31]. Розробка ефективних молекулярних маркерів необхідна для ідентифікації низки QTL для різних культур, у тому числі пшениці [31; 32]. Потенційні маркери стійкості до стресу можна визначити за допомогою картування QTL характеристик, пов'язаних із урожайністю, у середовищах з модельованим водним дефіцитом [33]. Синтез молекулярних маркерів шляхом картування QTL значно полегшує вивчення складних кількісно успадковуваних ознак [34].

Молекулярні маркери вважаються поліморфними, якщо існує різниця в послідовності ДНК між досліджуваними індивідуумами [30; 34]. Таким чином, вони є індикатором поліморфізму послідовностей. У селекції пшениці на посухостійкість є певний набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, серед яких можна виділити такі: 1) аналіз поліморфізму довжин фрагментів рестрикції (RFLP); 2) аналіз поліморфізму за допомогою ПЛР (SSR, ISSR, RAPD, CAPS, SNP, IRAP, функціональні маркери); 3) транскриптомний аналіз [34; 35].

RFLP (restriction fragment length polymorphism; поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів) – перший метод молекулярних маркерів, розроблений D. Botstein із колегами [36] для профілювання ДНК. Метод заснований на техніці розщеплення за допомогою особливих рестрикційних ферментів (ендонуклеаз рестрикції) молекул ДНК, що розрізняються в гомологічних ділянках і відповідно місць рестрикції при порівнянні довжин отриманих фрагментів [37].

Одержані фрагменти розподіляються за допомогою електрофорезу. Після перенесення на мембрану вони ідентифікуються гібридизацією з радіоактивно міченими пробамі (Southern blotting). Гібридизація дозволяє визначати довжини фрагментів, комплементарних пробам. Кожен фрагмент розглядається як окрема алель і використовується в генетичному аналізі. Достатній ступінь поліморфізму, кодомінантність, частота і рівномірний розподіл по геному, висока відтворюваність дозволили використовувати цей метод для локалізації генів посухостійкості пшениці [38].

J.M. Morgan спільно з M.K. Tan [39] методом RFLP у пшениці визначили хромосомне розташування локусу гена осморегуляції. Як зазначають автори, раніше була відома локалізація цього гена на хромосомі 7A, але його специфічне положення зали-

шалося нез'ясованим. Аналіз зчеплення з локусами RFLP дозволив припустити вірогідне положення на короткому плечі приблизно в 13 сМ до напрямку центромери від локусу RFLP *Xpsr119*. Дослідники підсумували, що отримані результати, які базувалися на порівняно невеликій вибірці, є попередніми (розвідувальними), а тому вимагають подальшого підтвердження.

RFLP аналіз також був використаний для маркування солестійких генів у пшениці. Виявлено, що лише один амплікон *Psr906* є поліморфним із загальної їх кількості (80), розташованих на 7 хромосомі гомологічних груп [40]. Окрім цього, результати засвідчили, що ген солестійкості розташований у локусі *Xpsr906* довгого плеча хромосоми 5A.

SSR (simple sequence repeats, тандеми повторів простих послідовностей) – ділянки ДНК, що складаються з тандемів повторюваних одиниць: моно-, ди-, три-, тетра- або пентануклеотидів [41]. Це прості повторювані послідовності (мікросателіти), які зустрічаються повсюдно у еукаріот. Мікросателіти присутні як у некодуєчих, так і в кодуєчих ділянках геному, а також у хлоропластному [42] і мітохондріальному геномах [43].

Поліморфізм відображає зміну кількості повторюваних одиниць у певній ділянці геному. За деякими оцінками частота повторів у рослин коливається від 10 до 80 [44]. Нуклеотидна послідовність використовується для конструювання праймерів для ампліфікації різної кількості повторюваних одиниць [37; 45]. Ці праймери є дуже корисними для швидкого і точного виявлення поліморфних локусів.

Важливою особливістю мікросателітів є те, що вони еволюціонують швидше, ніж решта ДНК, піддаючись «динамічним мутаціям», які призводять до появи алелей із різною кількістю повторюваних одиниць [37]. Тому мікросателіти є досить поліморфними. Високий поліморфізм у поєднанні з повсюдним поширенням і мультиалелізмом робить їх дуже перспективними в якості молекулярних маркерів [45].

Маркери SSR часто використовуються для молекулярних досліджень пшениці, тому що вони мають кодомінантний тип спадкування, локусну специфічність, відтворюваність і високий рівень інформативності [20]. Крім того, вони мають багатоядерну природу, специфічність до хромосом, високий коефіцієнт поліморфізму і широке поширення по всьому геному пшениці, що робить його придатним молекулярним маркером для досліджень генетичних характеристик цієї культури [23; 46].

Використовуючи SSR маркери, R.S. Tomar і співавтори [47] провели кореляційний аналіз морфологічних і агрономічних ознак в умовах водного стресу і виявили філогенетичний зв'язок між 31 генотипом пшениці. Генетична різноманітність сортів озимої і ярої пшениці з точки зору стійкості до посухи була вивчена не лише фенотиповими спостереженнями, але й за допомогою SSR [48].

M. Golabadi та співавтори [49] використали мікросателітні маркери для ідентифікації QTL із такими ознаками, як маса тисячі зерен та індекс врожаю. M. Faheem зі співавторами [50] методом SSR досліджували генетичну різноманітність D-геному пшениці з точки зору посухостійкості. P. Ramya та співавтори [51], використовуючи SSR маркери, дали генетичну характеристику 24 сучасним сортам пшениці щодо їх використання в селекції на посухостійкість. Беручи до уваги результати багатьох досліджень, можна констатувати, що SSR маркери є досить корисними та надійними, а тому можуть бути ефективно використані для ідентифікації генів посухостійкості пшениці.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats, ділянка геному між двома сусідніми, протилежно орієнтованими мікросателітами) – в якості праймерів використовується послідовність серцевинної частини мікросателіту з декількома (1-3) нуклеотидами, які примикають до тандему повторностей [37]. Десятки фрагментів безлічі локусів, отриманих під час ПЛР, розподіляються електрофорезом і оцінюються на присутність (внаслідок домінантності маркерів) фрагментів певного розміру. Головна перевага цього типу маркерів – відсутність необхідності знання послідовностей при конструюванні праймерів [37].

ISSR – полілокусна система, яка за рахунок подовження праймера і підвищення температури відпалу характеризується більш високою точністю і відтворюваністю результатів, зберігаючи при цьому відносно невисоку собівартість [52]. Ця маркерна система може бути використана як експрес-метод встановлення генетичного поліморфізму. Інвертовані повтори викликають особливий інтерес, оскільки схильність до формування вторинних структур ДНК (шпильок, петель) становить основу для геномної нестабільності в ділянках їх локалізації [53].

При проведенні ISSR-аналізу немає потреби в попередній інформації про ділянку ДНК, що ампліфікується [54]. Цей метод характеризується високою точністю і відтворюваністю результатів. В якості праймерів для ISSR-аналізу поліморфізму ДНК використовують короткі ди- і тринуклеотидні мікросателітні повтори. Такі праймери дозволяють ампліфікувати фрагменти ДНК, які знаходяться між двома досить близько розташованими інвертованими мікросателітами. В результаті ампліфікується досить велика кількість фрагментів, представлених на електрофореграмі дискретними смугами (ISSR-фінгерпрінтинг). У геномах рослин кількість мікросателітних повторів досить велика, що робить цей метод зручним для генетичного аналізу [55]. ISSR-метод не вимагає попереднього знання нуклеотидної послідовності досліджуваної ДНК, характеризується високою відтворюваністю і може бути з успіхом використаний для виявлення посухостійких форм.

У дослідженні R.H. Maqsood та співавторів [56] за використання ISSR-аналізу у пшениці визначено

З QTL локуси, пов'язані з відносним вмістом води, термостабільністю клітинної мембрани та швидкістю фотосинтезу. У роботі автори використовували чотири ISSR праймери, які відобразили 73 поліморфні смуги із загальної їх кількості – 623.

За допомогою критерію Хі-квадрат показано, що 61 смуга розділена з коефіцієнтом поділу 3:1. Позитивна кореляція між відносним вмістом води, стабільністю клітинної мембрани, швидкістю фотосинтезу та масою тисячі зерен засвідчила, що виявлені QTL локуси можуть суттєво збільшити врожайність за стресових умов. Автори дійшли висновку, що виявлені локуси можуть бути корисними для селекціонерів при створенні посухостійких сортів пшениці.

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA, випадково ампліфікована поліморфна ДНК) – метод ампліфікації ДНК сегментів із використанням випадкових праймерів (приблизно 10 нуклеотидів), що не вимагає попереднього знання послідовності ДНК [37; 57]. Однак внаслідок стохастичної природи ДНК ампліфікації важливими є оптимізація і підтримка відповідних умов для отримання відтворюваних результатів [58; 59].

Незважаючи на низьку специфічність, підвищену чутливість до умов реакції і не досить високу відтворюваність результатів, ці маркери мають низьку перевагу перед іншими маркерними системами: швидкість і простота методу, використання довільних 10-нуклеотидних праймерів, універсальних для різних видів і родів живих організмів, порівняно низька собівартість [60].

Крім того, RAPD – це полілокусна система, яка дозволяє аналізувати відразу значну частину генотипу, що досить зручно при вивченні генетичної структури популяцій, встановленні родинних зв'язків між таксонами, порівняння геномів різних груп організмів [61]. Метод використовується при вивченні генетичної різноманітності мало вивчених таксономічних груп, його рідко застосовують при пошуку асоціації з господарсько-цінними ознаками, за винятком картування генів кількісних ознак [62]. Показано, що специфічний фрагмент OPZ09-590 є RAPD-маркером, зчепленим із геном стійкості до осмотичного стресу [63].

У дослідженні М. Вагакат зі співавторами [64] два типи молекулярних маркерів RAPD і ISSR були використані для визначення генетичного різноманіття серед 12 генотипів пшениці. Високий рівень поліморфізму був виявлений як із маркерами RAPD, так і з ISSR. В аналізі RAPD за допомогою 30 праймерів було отримано 322 фрагменти ДНК, з яких 18,6% виявилися поліморфними в усіх генотипів, у той час як решта ампліконів (81,4%) були поліморфними в одному або декількох генотипах.

В ISSR аналізі 192 із 238 фрагментів (80,7%) виявилися поліморфними. Специфічні RAPD та ISSR маркери були успішно розроблені для ідентифікації стійких (Ksu103, Ksu105) і сприйнятливої

(Yesora Rojo) до посухи сортів. Автори підсумували, що молекулярні маркери продемонстрували високий ступінь варіації серед проаналізованих генотипів пшениці, які є цінним джерелом генетичного різноманіття пшениці і можуть бути використані у майбутніх селекційних програмах цієї культури.

R. Deshmukh та співавтори [65] використовували RAPD маркери для виявлення поліморфізму у 12 сортів пшениці, зокрема для аналізу щодо їх стійкості і сприйнятливості до посухи. Всього для ідентифікації цих геномних ділянок було використано 14 маркерів, з яких один продемонстрував поліморфну структуру з поліморфізмом 18,6%, чітко розділяючи генотипи на стійкі і сприйнятливі до посухи.

Автори наголосили, що хоча для створення більш специфічних і тісних асоціацій зі стійкими до посухи локусами потрібні більш досконалі методології, RAPD є простим, швидким і ефективним засобом ідентифікації стійких до водного стресу сортів. Ефективність використання цього типу маркерів під час скринінгу посухостійких форм пшениці підтверджено також у працях інших авторів [66; 67].

CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences, розщеплені ампліфіковані поліморфні послідовності) – ампліфікація послідовностей, що вирізуються за місцем рестрикції відповідних пізнаванню рестриктазою нуклеотидних поліморфних гомологічних ділянок [37]. Відмінності виявляються за довжиною фрагментів ДНК, які чітко розділяються при електрофорезі.

Принцип роботи CAPS-маркерів базується на ампліфікації невеликого фрагменту ДНК замість використання усього геному [68; 69]. CAPS-маркери є кодомінантними і дозволяють виявляти поліморфізм у великій кількості зразків. Розробка і використання CAPS-маркерів сприяє більш точному картуванню генів стійкості культурних рослин до різного роду стресів [70; 71]. Ця система маркерів успішно застосовується в молекулярній біології для оцінки генетичних ресурсів різних груп рослин, у тому числі пшениці [72].

Розроблений CAPS-маркер P22F/Pra/PvuII дозволяє відрізнити гени-кандидати *DREB* (dehydration-responsive element-binding protein) пирійного походження від генів *DREB* м'якої пшениці. Вбудовування подібних генів у чужий геном дозволяє підвищувати стійкість рослин до абіотичних стресів, у тому числі дефіциту вологи [73].

SNP (single-nucleotide polymorphism; поліморфізм за одним нуклеотидом) – маркери цього типу досить часто використовуються в дослідженнях геному [74]. Техніка базується на тому, що в організмах зміни в одному нуклеотиді призводять до точкових мутацій, зумовлюючи поліморфізм за одним нуклеотидом. Для створення специфічних праймерів необхідне знання послідовностей і фланкуючих ділянок.

Оскільки метод дозволяє автоматизовано здійснювати високоякісне генотипування з одночасним

використанням великої кількості SNP-маркерів, присутність багатьох тисяч проб на чіпі дозволяє одночасно аналізувати достатню кількість SNP-локусів [75]. Водночас відмінність алелей лише за одним нуклеотидом і безліч проб унеможливило створення оптимальних умов гібридизації для всього масиву зразків. У низці випадків це призводить до гібридизації аналізованої ДНК з невідповідними пробами [76].

Розроблені молекулярні SNP-маркери, які можуть бути використані для подальшого аналізу асоціації нуклеотидного поліморфізму гена *SRLK* (salt-induced receptor-like kinase), підвищена експресія якого активує роботу інших генів – факторів транскрипції *MtZpt2-1* і *MtZpt-2*, що формують захисну реакцію на засолення у різних видів люцерни [77]. Маркери однонуклеотидного поліморфізму є надійними завдяки їх високій чисельності і економічній ефективності насамперед завдяки досягненням у технології секвенування і їх застосуванню для генотипування різних видів сільськогосподарських культур, зокрема пшениці [78].

Функціональні маркери (ФМ) є ідеальними молекулярними маркерами для селекції пшениці і точно визначають алелі цільового гена. ФМ розробляються з поліморфізмів послідовностей, присутніх у алельних варіантах функціонального гена в локусі [79]. Вони перевершують випадкові ДНК-маркери, такі як RFLP і SSR, завдяки повному їх зв'язку з алелями відповідного локусу.

Нині розроблено 97 ФМ для ідентифікації 93 алелей на основі послідовностей відповідних генів та описано загальний підхід щодо ідентифікації генів пшениці і розробки ФМ [80]. Крім того, описано 14 молекулярних маркерів, специфічних для чужорідних генів, виведених від близьких родичів пшениці [79].

Для ампліфікації ДНК І.М. Нусеупова та співавтори [80] у своїх дослідженнях використали дві пари геном-специфічних праймерів, розроблених для генів *DREB1* пшениці. У 69 із 75 генотипів пшениці методом ПЛП-аналізу з використанням функціонального маркера P25F/P25R, специфічного до гена *DREB A1*, були виявлені діагностичні амплікони розміром 596 п.н. Наявність гена *DREB D1* у геномі D перевіряли за допомогою специфічного функціонального маркера P22F/P22R, а ампліфікація фрагментів довжиною 586 п.н. спостерігалася у 56 генотипів пшениці.

А.В. Baval' зі співавторами [10] за допомогою функціональних маркерів, спеціально синтезованих для А, В і D геномів пшениці, провели ідентифікацію *Dreb1* генів у рослин-регенерантів пшениці, індукованих із стійких калюсних ліній. Праймер P25F/P25R синтезований для ампліфікації фрагментів ДНК розміром 596 п.н. *Dreb A1* гена в геномі А. P21F/P21R також було обрано як праймер, що ампліфікує відповідну ділянку (ДНК фрагмент, розміром 1113 п.н.) цього ж гена.

Праймери P22F/P22R і P20F/P20R синтезовані для послідовностей *Dreb1* гена з генома D, результатом ампліфікації яких є фрагменти ДНК роз-

міром 596 і 1193 п.н. відповідно. Праймер P18F/P18R, який ампліфікував ДНК фрагменти розміром 717 і 789 п.н., був синтезований як специфічний праймер для В геному.

У результаті досліджень за використання п'яти пар праймерів, специфічних до *Dreb1* генів пшениці, авторами показано, що тільки чотири з них є придатними для аналізу рослин-регенерантів. Дослідники припускають, що стійкість до водного дефіциту у отриманих форм може бути пов'язана з генетичною мінливістю, яка зачіпає регуляторні гени, зокрема *Dreb1*, та очевидно зумовлюється зміною їх експресії. Показано, що амплікони розміром 596 п.н. та 717 п.н., продукти ампліфікації генів *Dreb A1* та *Dreb B1*, виявляються тільки у стійких до водного дефіциту регенерантів і відсутні у нестійких форм.

IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – метод ампліфікації геномної ДНК між близько розташованими послідовностями ретротранспозонів [37; 81]. Однією з переваг цього методу є можливість одночасного аналізу багатьох локусів у різних ділянках геному [82; 83]. Поліморфізм у цьому випадку зумовлюється або мутацією в ділянці зв'язування праймера, або безпосередньо транспозицією через вбудовування ретротранспозонів в іншу ділянку ДНК [10; 14; 83]. Літературні джерела свідчать про ефективність використання цього методу для дослідження генетичних зв'язків між популяціями та видами [9; 14; 21], генетичного картування та аналізу соматональних варіацій у злакових культур [10; 14].

Результати роботи дослідників Інституту фізіології рослин і генетики НАН України [10] свідчать про активацію ретротранспозону *Cassandra* у м'якої пшениці в процесі добору на стійкість до водного дефіциту та показано специфічність змін у спектрах продуктів ампліфікації ДНК. Методом IRAP-аналізу виявлено, що амплікони розміром 596 п.н. та 717 п.н. – продукти генів *Dreb A1* та *Dreb B1*, наявні у стійких до водного дефіциту рослин і відсутні у нестійких форм.

Транскриптомний аналіз. Транскриптомний аналіз передбачає застосування ДНК-мікрочипів, які є скляною основою з упорядкованими рядками. На чип можуть бути нанесені унікальні клони комплементарної ДНК (кДНК) від 10 до 15 тисяч. Фрагменти кДНК на чіпі геноспецифічні, а їх розмір варіює в межах 200-2500 нуклеотидів [84; 85].

Із тканин рослини виділяється інформаційна РНК, на основі якої за допомогою реакції зворотної транскрипції синтезується кДНК, при цьому використовують синтетичні олігонуклеотиди, що мічені флуоресцентною міткою. Зразок кДНК є сумішшю транскриптів більшості генів, які активно експресуються на певному етапі онтогенезу рослин або за дії певного патогена [86]. Під час гібридизації такого зразка на мікрочип мічені транскрипти генів утворюють дуплекс із кДНК, яка закріплена на мікрочіпі. За інтенсивністю флуоресценції визначають

рівень експресії кожного гена в тканинах рослини на зміну умов середовища [85].

Дослідники із Національного інституту генетичної інженерії та біотехнології (Іран) і Державного університету Південної Дакоти (США) у спільних дослідженнях [19] методом транскриптомного аналізу досліджували гени, які беруть участь у реакції на водний дефіцит, у сортів м'якої пшениці місцевої селекції. Моделюючи умови посухи, вчені у сорту L-82 виявили підвищений рівень експресії генів, пов'язаних із захистом від окисного стресу. Автори наголосили, що виділений стійкий сорт може бути використаний у якості донора генів посухостійкості і є цінним вихідним матеріалом у подальшій селекції пшениці.

Варто підкреслити, що однією з ключових переваг використання молекулярних маркерів є те, що з їх допомогою можна проводити добір за генотипом, тоді як у традиційній селекції добір індивідуальних рослин для схрещувань здебільшого здійснюється на основі аналізу фенотипу [86].

Попри зазначені вище переваги застосування технології MAS у селекції пшениці має і певні недоліки. Насамперед це пошук молекулярних маркерів і підбір до них праймерів потребує проведення додаткової тривалої роботи. Окрім того, для коректної інтерпретації результатів досліджень слід враховувати той факт, що застосування маркерів пов'язане з низкою помилок генотипування, головні з яких – випадіння

більших алелей, «нуль» алелі, «stutter» алелі внаслідок особливостей *Tag*-полімерази, негомологічність ампліфікованих послідовностей однакового розміру (гомоплазія) [37]. Такий підхід характеризується також надзвичайним рівнем складності та потребує дороговартісного обладнання, а тому не завжди є економічно виправданим.

Головні висновки. Таким чином, аналіз літератури дозволив виявити світову тенденцію щодо застосування молекулярних маркерів для ідентифікації сортів пшениці з цінними практичними властивостями. Молекулярно-генетичний аналіз на основі ПЛР натеper широко використовується при створенні посухостійких сортів пшениці, а впровадження ДНК-технологій дозволяє розширювати можливості спрямованої селекції.

Молекулярні маркери можуть мати перевагу при ідентифікації стійких форм рослин у видів, механізм стійкості яких реалізується на різних етапах онтогенезу, що може бути складно або зовсім не можливо виконати іншими методами. Пошук джерел стійкості, маркування та ідентифікація генів, що відповідають за посухостійкість рослин, лежить в основі сучасної селекції. Застосування молекулярних маркерів значно спрощує ідентифікацію стійких генотипів та дає можливість ефективно прискорити селекційний процес, тому в багатьох країнах вважається важливим доповненням до класичних методів селекції сільськогосподарських рослин, зокрема пшениці.

Література

- Breiman A., Graur D. Wheat evaluation. *Israel Journal Plant Sciences*. 1995. Vol. 43. № 2. P. 58–95.
- Черенков А.В., Гасанова І.І., Солодушко М.М. Пшениця озима – розвиток та селекція культури в історичному аспекті. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. 2014. № 6. С. 3–6.
- Жемела Г.П., Кузнецова О.А. Вплив сортових властивостей на продуктивність та якість зерна пшениці м'якої озимої. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2012. № 3. С. 23–25.
- Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005. Vol. 24. № 1. P. 23–58.
- Raveena Bharti R., Chaudhary N. Drought resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2019. Vol. 8. № 9. P. 1780–1792.
- Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*. 2005. Vol. 56. № 11. P. 1159–1168.
- Срмоленко Н.С., Хохлов В.М. Порівняння просторово-часових характеристик посух в Україні на початку та наприкінці ХХ сторіччя. *Український гідрометеорологічний журнал*. 2012. № 10. С. 65–72.
- Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214.
- Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. К.: Логос, 2014. 375 с.
- Bavol A.V., Zinchenko M.O., Dubrovna O.V. Molecular polymorphism of wheat cell lines resistant to metabolites produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* under the effect of osmotic stress. *Cytology and Genetics*. 2014. Vol. 48. № 1. P. 49–54.
- Dehghani I., Mostajeran A., Esmaceli A., Ghannadian M. The role of *DREB2* gene in drought tolerance of common wheat (*Triticum aestivum* L.) associated with *Azospirillum brasilense*. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2019. Vol. 17. № 2. P. 4883–4902.
- Abd El-Hadi A.A. Molecular characterization of some durum wheat drought tolerant mutants by RAPD and ISSR analysis. *Arab Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 15. № 1. P. 77–90.
- Ribaut J.-M., Poland D. Molecular approaches for the genetic improvement of cereals for stable production in water-limited environments. A Strategic Planning Workshop held at CIMMYT. 1999. 180 p.
- Кунах В.А. Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин. К.: Логос, 2013. 300 с.
- De Leonardis A.M., Marone D., Mazzucotelli E., Neffar F., Rizza F., Di Fonzo N., Cattivelli L., Mastrangelo A.M. Durum wheat genes upregulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant Science*. 2007. Vol. 172. № 5. P. 1005–1016.
- Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J.M., Al-Niemi T., Dyer W.E., Ho T.H.D., Qu R. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science*. 2000. Vol. 155. № 1. P. 1–9.

17. Fàbregas N., Fernie A.R. The metabolic response to drought. *Journal of Experimental Botany*. 2019. Vol. 70. № 4. P. 1077–1085.
18. Sallam A., Alqudah A.M., Dawood M.F., Baenziger P.S., Börner A. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. № 13. 3137.
19. Chaichi M., Sanjarian F., Razavi K., Gonzalez-Hernandez J.L. Analysis of transcriptional responses in root tissue of bread wheat landrace (*Triticum aestivum* L.) reveals drought avoidance mechanisms under water scarcity. *PLoS one*. 2019. Vol. 14. № 3. e0212671.
20. Eid M. Validation of SSR molecular markers linked to drought tolerant in some wheat cultivars. *Journal of Plant Breeding and Genetics*. 2018. Vol. 6. № 3. C. 95–109.
21. Grandbastien M.A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Science*. 1998. Vol. 3. № 5. P. 181–187.
22. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 1984. Vol. 226. № 4676. P. 792–801.
23. Sönmezöglü Ö.A., Terzi B. Characterization of some bread wheat genotypes using molecular markers for drought tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2018. Vol. 24. № 1. P. 159–166.
24. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 2007. Vol. 58. № 2. P. 221–227.
25. Fleury D., Jefferies S., Kuchel H., Langridge P. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2010. Vol. 61. № 12. P. 3211–3222.
26. Rana R.M., Rehman S.U., Ahmed J., Bilal M. A comprehensive overview of recent advances in drought stress tolerance research in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian Journal of Agriculture and Biology*. 2013. Vol. 1. № 1. P. 29–37.
27. Lakhneko O.R., Stepanenko A.I., Morgun B.V., Kuzminskiy Ye.V. Polymorphism of some transcription factor genes related to drought tolerance in wheat. *Biotechnologia Acta*. 2018. Vol. 11. № 2. P. 47–56.
28. Bidhan R., Noren S.K., Mandal A.B., Basu A.K. Genetic engineering for abiotic stress tolerance in agricultural crops. *Biotechnology*. 2011. Vol. 10. № 1. P. 1–22.
29. Moose S.P., Mumm R.H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. 2008. *Plant Physiology*. Vol. 147. № 1. P. 969–977.
30. Ciucă M., Petcu E. SSR markers associated with membrane stability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Romanian Agricultural Research*. 2009. Vol. 29. P. 21–24.
31. Farokhzadeh S., Fakheri B.A., Nezhad N.M., Tahmasebi S., Mirsoleimani A. Mapping QTLs of flag leaf morphological and physiological traits related to aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2019. Vol. 25. № 4. P. 975–990.
32. Devi R., Ram S., Rana V., Malik V.K., Pande V., Singh G.P. QTL mapping for salt tolerance associated traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 2019. Vol. 215. № 12. C. 210.
33. Touzy G., Rincint R., Bogard M., Lafarge S., Dubreuil P., Mini A., Deswarte J.-C., Beauchêne K., Le Gouis J., Praud S. Using environmental clustering to identify specific drought tolerance QTLs in bread wheat (*T. aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2019. Vol. 132. № 10. P. 2859–2880.
34. Hayward A.C., Tollenaere R., Dalton Morgan J., Batley J. Molecular marker applications in plants. *Methods in Molecular Biology*. 2015. Vol. 1245. P. 13–27.
35. Milad S.I., Wahba L.E., Barakat M.N. Identification of RAPD and ISSR markers associated with flag leaf senescence under water stressed conditions in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*. 2011. Vol. 5. P. 334–340.
36. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980. Vol. 32. № 3. P. 314–331.
37. Омашева М.Е., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования. *Биотехнология. Теория и практика*. 2013. Вып. 4. С. 20–28.
38. Semagn K., Björnstad Å., Ndjiondjop M.N. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*. 2006. Vol. 5. № 25. P. 2540–2568.
39. Morgan J.M., Tan M.K. Chromosomal location of a wheat osmoregulation gene using RFLP analysis. *Functional Plant Biology*. 1996. T. 23. № 6. C. 803–806.
40. Weng Y.J. RFLP molecular marker of salinity tolerance gene in wheat germplasm Chadian Red. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*. 1999. Vol. 3. P. 1–5
41. Powell W., Machray G.C., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*. 1996. Vol. 1. № 7. P. 215–222.
42. Chung S.M., Staub J.E., Chen J.F. Molecular phylogeny of Cucumis species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome*. 2006. Vol. 49. № 3. P. 219–229.
43. Rajendrakumar P., Biswal A.K., Balachandran S.M., Srinivasarao K., Sundaram R.M. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23. P. 1–4.
44. Hicks M., Adams D., O’Keefe S., Macdonald E., Hodgetts R. The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*). *Genome*. 1998. Vol. 41. P. 797–805.
45. Paniego N., Echaide M., Munoz M., Fernandez L., Torales S., Faccio P., Fuxan I., Carrera M., Zandomeni R., Suarez E.Y., Hopp H.E. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*. 2002. Vol. 45. № 1. P. 34–43.
46. El Siddig M.A., Baenziger P.S., Dweikat I., El Hussein A.A. Preliminary screening for water stress tolerance and genetic diversity in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from Sudan. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. Vol. 11. № 2. P. 1–8.
47. Tomar R.S., Deshmukh R.K., Naik K.B., Tomar S.M.S. Development of chloroplast-specific microsatellite markers for molecular characterization of alloplasmic lines and phylogenetic analysis in wheat. *Plant Breeding*. 2013. Vol. 133. № 1. P. 12–18.

48. Dodig D., Zori M., Kobiljski B., Momirovi G.S., Quarrie S.A. Assessing drought tolerance and regional patterns of genetic diversity among spring and winter bread wheat using simple sequence repeats and phenotypic data. *Crop and Pasture Science*. 2010. Vol. 61. P. 812–824.
49. Golabadi M., Arzani A., Mirmohammadi Maibody S.A.M., Sayed Tabatabaei B.E., Mohammadi S.A. Identification of microsatellite markers linked with yield components under drought stress at terminal growth stages in durum wheat. *Euphytica*. 2011. Vol. 177. P. 207–221.
50. Faheem M., Mahmood T., Shabbir G., Akhtar N., Gul. A., Mujeeb-Kazi A. Assessment of D-genome based genetic diversity in drought tolerant wheat germplasm. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2015. Vol. 17. № 4. P. 791–796.
51. Ramya P., Jain N., Singh P.K., Singh G.P., Prabhu K.V. Population structure, molecular and physiological characterisation of elite wheat varieties used as parents in drought and heat stress breeding in India. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2015. Vol. 75. № 2. P. 250–252.
52. El-Moneim A. Characterization of ISSR and SCoT markers and TaWRKY gene expression in some Egyptian wheat genotypes under drought stress. *Journal of Plant Production Sciences*. 2019. Vol. 8. № 1. P. 31–46.
53. Бавол А.В., Злацька А.В. Поліморфізм ДНК калюсних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* за використання ISSR-методу. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41. № 1. С. 69–74.
54. Nazarzadeh Z., Onsoori H., Akrami S. Genetic diversity of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using RAPD and ISSR molecular markers. *Journal of Genetic Resources*. 2020. Vol. 6. № 1. P. 69–76.
55. Abd El-Aziz G.H., Ahmed S.S., El Mangoury K., Fahmy A.H. Using different growth regulators in wheat to overcome negative effects of drought stress as one of climate change impacts and evaluation of genetic variation using ISSR. *Advances in Environmental Biology*. 2016. Vol. 10. № 6. P. 82–91.
56. Maqsood R.H., Amjid M.W., Saleem M.A., Shabbir G., Khaliq I. Identification of genomic regions conferring drought tolerance in bread wheat using ISSR markers. *Pakistan Journal of Botany*. 2017. Vol. 49. № 5. P. 1821–1827.
57. Shu Q.Y., Liu G.S., Qi D.M., Chu C.C., Liu. J., Li H.J. An effective method for axillary bud culture and RAPD analysis of cloned plants in tetraploid black locust *Plant Cell Report*. 2003. Vol. 22. № 3. P. 175–180.
58. Sreedhar R.V., Venkatachalam L., Bhagyalakshmi N. Genetic fidelity of long-term micropropagated shoot cultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) as assessed by molecular markers. *Biotechnology Journal*. 2007. Vol. 2. № 8. P. 1007–1013.
59. Rai G.K., Singh M., Rai N.P., Bhardwaj D.R., Kumar S. In vitro propagation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb.) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2012. Vol. 18. № 3. P. 273–280.
60. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18. № 22. P. 6531–6535.
61. Garcia A.A.F., Banchimol L.L., Barbosa A.M.M. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*. 2004. Vol. 27. № 4. P. 579–588.
62. Ballesta P., Mora F., Del Pozo A. Association mapping of drought tolerance indices in wheat: QTL-rich regions on chromosome 4A. *Scientia Agricola*. 2020. Vol. 77. № 2. e20180153.
63. Weng Y.J., Chen D.M. Molecular markers and its clone for salt tolerance gene in wheat. *Acta genetica Sinica*. 2002. Vol. 29. № 4. P. 343–349.
64. Barakat M., Al-Doss A.A., Moustafa K., Ibrahim E. Morphological and molecular characterization of Saudi wheat genotypes under drought stress. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2010. Vol. 8. № 1. P. 220–228.
65. Deshmukh R., Tomar N.S., Tripathi N., Tiwari S. Identification of RAPD and ISSR markers for drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2012. Vol. 18. № 1. P. 101–104.
66. Gorji A.H., Darvish F., Esmaeilzadehmoghadam M., Azizi F. Application RAPD technique for recognition genotypes tolerant to drought in some of bread wheat. *Asian Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 2. № 3. P. 159–168.
67. El Ameen T.M. Molecular markers for drought tolerance in bread wheat. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 2013. Vol. 4. № 4. P. 171–179.
68. Heubl G. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques. *Planta Medica*. 2010. Vol. 76. № 17. P. 1963–1974.
69. Hu C.Y., Tsai Y.Z., Lin S.F. Development of STS and CAPS markers for variety identification and genetic diversity analysis of tea germplasm in Taiwan. *Botanical Studies*. 2014. Vol. 55. № 1. P. 1–15.
70. Cui Y., Lee M.Y., Huo N., Bragg J., Yan L., Yuan C., Li C., Holditch S.J., Xie J., Luo M.C., Li D., Yu J., Martin J., Schackwitz W., Gu Y.Q., Vogel J.P., Jackson A.O., Liu Z., Garvin D.F. Fine mapping of the Bsr1 barley stripe mosaic virus resistance gene in the model grass *Brachypodium distachyon*. *PLoS One*. 2012. Vol. 7. № 6. e38333.
71. Jo K.-R., Arens M., Kim T.-Y., Jongsma M.A., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen H.J. Mapping of the *S. demissum* late blight resistance gene R8 to a new locus on chromosome IX. *Theoretical and Applied Genetics*. 2011. Vol. 123. № 8. P. 1331–1340.
72. Shavrukov Y. Comparison of SNP and CAPS markers application in genetic research in wheat and barley. *BMC Plant Biology*. 2016. Vol. 16. P. 1–11.
73. Почтовый А.А., Карлов Г.И., Дивашук М.Г. Создание молекулярных маркеров на гены DREB пырейного происхождения, обеспечивающих повышение засухоустойчивости в геномах злаков. *Вестник Башкирского университета*. 2013. Т. 18. № 3. С. 745–747.
74. Brookes A.J. The essence of SNPs. *Gene*. 1999. Vol. 234. № 2. P. 177–186.
75. Шаптуренко М.Н., Вакула С.В., Корзун В., Хотылева Л.В. SNP-анализ генетического разнообразия пшеницы Беларуси. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2016. Vol. 60. № 4. P. 98–103.
76. Varshney A., Mohapatra T., Sharma R.P. Development and validation of CAPS and AFLP markers for white rust resistance gene in *Brassica juncea*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004. Vol. 109. P. 153–159.

77. Вишнева М.С., Павлов А.В., Дзюбенко Е.А., Дзюбенко Н.И., Потокина Е.К. Нуклеотидный полиморфизм гена *SRLK*, определяющего устойчивость к засолению люцерны посевной (*Medicago sativa* L.). *Генетика*. 2014. Т. 50. № 4. С. 433–442.
78. Silvar C., Perovic D., Casas A.M., Igartua E., Ordon F. Development of a cost-effective pyrosequencing approach for SNP genotyping in barley. *Plant Breeding*. 2011. Vol. 130. № 3. P. 394–397.
79. Liu Y., He Z., Appels R., Xia X. Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012. Vol. 125. № 1. P. 1–10.
80. Huseynova I.M., Rustamova S.M., Abdullayeva G.R. Application of PCR-based functional markers for identification of DREB1 genes in *Triticum aestivum* L. *SciFed Biotech & Bioengineering Journal*. 2018. Vol. 1. P. 1.
81. Morgun B.V., Dubrovna O.V. IRAP analysis of transgenic wheat plants with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*. 2019. Vol. 53. № 5. P. 384–391.
82. Дубровна О.В., Гончарук О.М., Великожон Л.Г. IRAP-аналіз генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. *Физиология растений и генетика*. 2017. Т. 49. № 2. С. 110–120.
83. Dubrovna O.V., Velikozhon L.G., Slivka L.V., Kondratskaya I.P., Reshetnikov V.N., Makai S. Detection of DNA polymorphism of transgenic wheat plants with proline metabolism heterologous genes. *Plant Physiology and Genetics*. 2020. Vol. 52. № 3. P. 196–207.
84. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Каледарь Р.Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. Одесса : Астроспринт, 2011. 336 с.
85. Леск А. Введение в биоинформатику. М. : Бином, 2009. 320 с.
86. Литвиненко М.А., Топал М.М., Шестопал О.Л., Замбриборщ І.С., Галаев О.В. Удосконалена технологія селекційного процесу пшениці м'якої озимої з використанням біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів. Науково-методичний посібник. Одеса : СГІ-НЦНС, 2015. 40 с.