

О. І. РИБАЛКА

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр  
насіннезнавства та сортовивчення

## **ГЕНОМІКА, ТРАНСКРИПТОМІКА, ПРОТЕОМІКА І БІОІНФОРМАТИКА НА СЛУЖБІ СУЧАСНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ПШЕНИЦІ**

*Зроблено огляд світових досліджень у галузі секвенування геному пшениці, розробки останньої генерації молекулярних маркерів хромосом та їх використання в сучасній селекції пшениці. Досягнення протеоміки, транскриптоміки та біоінформатики успішно використовуються в світовій селекції для контролю агрономічно важливих QTL. Реальний стан досліджень, пов'язаних з результативністю селекції пшениці в Україні оцінено як катастрофічний, несумісний зі створенням конкурентного селекційного продукту - сортів і якісного насіння.*

*Ключові слова: пшениця, селекція, ДНК, секвенування, геном, транскриптоміка, протеоміка, біоінформатика, молекулярні маркери*

З позицій сьогодення важливо позначити перспективи зростання виробництва та експортного потенціалу України, визначити науково обґрунтовані пріоритети, які здатні реально підвищити урожай зерна пшениці українських ланів та його якість. Які ж ці пріоритети? Відомі дві складові підвищення урожаю зерна пшениці і його якості: технологія вирощування і сорт. За сортом стоїть селекція та її допоміжні наукоємні галузі: генетика, біотехнологія.

Ми є свідками глобальних кліматичних змін на Землі. Періодичні нищівні кліматичні катаклізми зводять нанівець урожаї пшениці, роблять непридатними для вирощування культури цілі аграрні регіони. Ці явища не обходять і Україну. Вчена спільнота світу сьогодні активно працює над розробкою біотехнологій, які були б здатні радикально поліпшити адаптивні властивості рослини пшениці, її здатність давати відносно стабільні урожаї зерна належної якості за екстремальних кліматичних умов вирощування. Провідна роль у розробці таких технологій належить сучасній генетиці, генній інженерії, біотехнології, які в кінцевому результаті є основою сучасної наукової селекції – інтегрованої технології створення новітніх сортів пшениці, адаптованих до умов ризикованого землеробства. За оцінками фахівців, лише на генетичні і біотехнологічні дослідження культури пшениці щорічно у цивілізованому світі витрачається більше 380 млн доларів США [1].

Можливість цільового маніпулювання пулом генетичного матеріалу пшениці з метою радикального впливу шляхом селекції на її агрономічні ознаки ще ніколи за всю історію селекційного поліпшення цієї культури не була так важливою, як сьогодні [2].

Щоби успішно маніпулювати генним матеріалом пшениці у фокусі сучасної генної інженерії, в цивілізованих країнах світу активно ведуться дослідження унікального геному пшениці, його структури і функції. Адже геном культурної хлібної гексаплоїдної пшениці (*Triticum aestivum* L.,  $2n=6x=42$ ) за розміром є одним з найскладніших і найбільших серед культурних рослин: 17 мільярдів пар основ на гаплоїдний геном. Це у 40 разів більше, ніж геном рису і у 5 разів (!) більше за геном людини. Одна лише хромосома 3В пшениці за розміром ДНК вдвічі перевищує розмір усього генома рису [3]. Отже, гігантський розмір генома пшениці включно з її трьома (А, В і D) гомеологічними геномами та домінуванням (від 86 до 92%) повторів ДНК робить завдання секвенування генома пшениці з використанням ВАС (Bacterial Artificial Chromosome) бібліотеки ДНК клонів дійсно грандіозним інтернаціональним проектом, до якого залучені вчені провідних країн світу. У процесі створення ВАС бібліотеки клонів ДНК пшениці розрізається ферментами рестриктазами на фрагменти розміром приблизно 150 кб та інтегрується у ВАС вектор, потім трансформується в геном бактерії *E. coli*, де вона реплікується і зберігається. Кілька таких ВАС бібліотек, що містять 0,5-1 мільйон або більше клонів, щойно створені і секвеновані або секвенуються [4]. Цей проект під назвою Міжнародний консорціум з секвенування генома пшениці (IWGSC, [www.wheatgenome.org](http://www.wheatgenome.org)) був заснований у 2004 році [5]. Не менш важливим міжнародним науковим проектом з позиціонування систематично клонованих і секвенованих індивідуальних генів пшениці (конструювання фізичних карт хромосом) є проект Європейська ініціатива (European Triticeae Genomics Initiative, ETGI, [www.etgi.org](http://www.etgi.org)), першим середньотерміновим завданням якого було конструювання фізичної карти хромосом сорту пшениці Chinese Spring, для якого раніше було створено унікальний набір спеціальних цитогенетичних ліній з хромосомними делеціями [6]. Сьогодні вже відчутні практичні для селекції наслідки реалізації проектів секвенування ДНК генома пшениці та конструювання фізичних карт хромосом, результатом яких є створення нових класів молекулярних маркерів хромосом пшениці, таких як, наприклад, ISBPs (Insertion Based Sequence Polymorphism). Зв'язок цих маркерів з елементами ретротранспозонами забезпечує високий рівень їх генетичного поліморфізму та високу ефективність маркування важливих кількісних ознак пшениці [7]. Сьогодні на зміну другої генерації методів капілярного секвенсу ДНК, наприклад "Sanger sequencing", прийшли ще більш ефективні методи, як наприклад, технології Roche 454, Solexa та ABI SOLiD. Наприклад, технологія секвенування Illumina Solexa в одному лише досліді дозволяє генерувати до 40 000 000 кроків читання фрагментів ДНК розміром до 75 бп. Ця процедура секвенує короткі фрагменти ДНК і не дає змоги конструювати цілісні псевдохромосоми пшениці. Однак результати такого секвенування надзвичайно цінні для конструювання серій молекулярних маркерів для контролю цільових генів кількісних ознак пшениці.

Паралельно з секвенуванням генома пшениці у світі активно розвиваються дослідження експресії генів пшениці, що об'єднані у цілу галузь, яка зветься

транскриптоміка. Установлено, що пшеничний геном має тенденцію організації генів у «острівки», які налічують 1-4 гени і розділені міжгенною ДНК, що містить контролюючі елементи транскрипції та великі фрагменти елементів ретротранспозонів [8]. Фундаментальною властивістю генів є їх рівень транскрипції у різних тканинах, що має безпосереднє відношення до їх функції. Дослідження в галузі транскриптоміки починалися з класичних експериментів з оцінки реакції генів пшениці на цитокініни. Сьогодні високий рівень досліджень експресії генів пшениці забезпечує сучасні високоефективні мікрочіп технології прямого секвенування РНК, які дозволяють оцінювати рівень експресії тисяч генів одночасно. В результаті впровадження сучасних технологій транскриптоміки для пшениці розроблені високоефективні EST (Expressed Sequence Tags) молекулярні маркери хромосом, які віддзеркалюють експресію пшеничного генома у формі РНК з різних типів тканин, різних етапів життєвого циклу рослини, за різних умов вирощування, які зібрані у кДНК бібліотеки генома, що експресується ([www.plexdb.org](http://www.plexdb.org)). Лише на листопад 2006 року для пшениці було оприлюднено інформацію про більш ніж 850 000 EST послідовностей, а на сьогодні цей перелік суттєво зріс. Створення EST бібліотек є одним із найбільш значимих досягнень сучасної світової геноміки. EST розроблені на базі коротких (від 100 до 600 bp) фрагментів секвенування кДНК клонів і тому репрезентують геном пшениці, що експресується. У пшениці першою дослідженою у такий спосіб тканиною був ендосперм зернівки у фазі розвитку [9]. Технологія дослідження ДНК транскрипції за допомогою ДНК чипів сьогодні забезпечує реальну можливість детекції і картування експресії QTL пшениці [10]. Нова генерація сучасних технологій секвенування кДНК забезпечує надзвичайно широку базу даних аналізу транскриптів, що репрезентують певні ділянки генома, особливо такого складного, як геном пшениці, що представлений великими сімействами генів та ще й множинними копіями.

У дослідженнях пшениці як біологічної системи після геноміки і транскриптоміки надзвичайно важливу роль відіграє протеоміка. Адже білки є факторами експресії генів. В системі метаболізму рослини білки вступають у складні перетворення, такі як альтернативний сплайсінг, модифікація (глікозилювання, фосфорилування), деградація. Тому дослідження білків більш складне, ніж дослідження нуклеїнових кислот. Протеоміка генерує особливо цінну інформацію для селекції пшениці, оскільки дає змогу, на відміну від ДНК маркерів (QTL), вивчати кінцеві продукти генів, що безпосередньо впливають на конкретні селекційні ознаки, дозволяє спостерігати ефекти конкретних алелів та передбачати їх комбінації в селекційно цінних генотипів.

Методи сучасної протеоміки дозволяють вивчати не лише білкові профілі експресії генів, а й досліджувати посттрансляційні модифікації білків, взаємодії білок-білок і т.п. Методи сучасної мас-спектрометрії особливо суттєво підвищили рівень чутливості і специфічності у кількісному визначенні окремих білків як факторів

експресії генів. Фактично революційні дослідження протеїн-протеїн взаємодії привели до створення біочіпів на кшталт мікрочіпів ДНК [11].

На сьогодні детально досліджено N- і C-термінальну структуру запасних білків зерна  $\alpha$ -спіральної просторової конфігурації, що містять залишки амінокислоти цистеїну, беруть участь у формуванні між- та внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків та відіграють критичну роль у стабілізації макромолекулярної структури білків клейковини а відтак і хлібопекарських якостей борошна. Центральною частиною цих білків є тандем, що повторюється, гексапептид (консенсус PGQGQQ) та нонапептид (GYPTS(P/L)QQ), а для деяких білкових субодиниць лише трипептидні (GQQ) мотиви. Зміна структури білкових молекул у центральному регіоні повторів закономірно впливає на інші нековалентні міжмолекулярні взаємодії в залежності від позиції зміни у регіоні повторів. Це пояснює на молекулярному рівні особливості поведінки фізичних параметрів пшеничного тіста [12]. Дає селекціонеру розуміння та інструмент цілеспрямованого керування хлібопекарськими властивостями пшениці. Профілі фракцій білків зерна пшениці різного стану розчинності детально досліджуються сьогодні за допомогою методів високоефективного двовимірного (two-dimensional) електрофорезу та MALDI-TOF-MS методу мас-спектрометрії, які дають змогу ідентифікувати практично кожну молекулу білків зерна та визначити її роль у загальній протеомі пшеничного зерна [13,14]. Так, деталізований двовимірний електрофорез дає можливість ідентифікувати у зерновій протеомі щонайменше 3000 білків. Оцінка ж зернової протеоми за аналізом транскриптів прогнозує існування 8-10 000 білків [9]. Така величезна чисельність білків зерна робить імовірним присутність у їх структурі епітопів з імуногенною та алергенною активністю щодо чутливих осіб, що вживають у їжу продукти з пшеничного зерна. І це доведено дослідженнями сироватки крові чутливих індивідуумів, схильних до анафілаксії через вживання продуктів із зерна пшениці. Ідентифіковано епітопи в доменах, що повторюються, білків альфа- бета- гама- і омега-гліадинів зерна пшениці, які зв'язуються з IgE-імуноглобулінами, провокують запальні та алергійні реакції людей, що страждають на захворювання типу імунодиспепсії, або целиакії [15]. Отже, пшеничне зерно є для людини джерелом не лише корисних, а й вельми шкідливих для здоров'я білків [16].

Сучасний двовимірний електрофорез протеоми зерна пшениці дозволяє також ідентифікувати генетичні фактори генної експресії, що регулюють накопичення білка в зерні пшениці. Так, головні важелі регуляції умісту високомолекулярних глютенінів у зерні пшениці як QTL фактори були локалізовані в шести хромосомних сегментах, один з яких локалізований у довгому плечі хромосоми 1В, покриває 70% варіації за умістом х субодиниць що кодуються локусом Glu-B1[17]. Цікаво, що ендосперм – специфічний, основний регіон, лейцин застібка (zipper) фактор (bZip) активатора синтезу запасних білків зерна пшениці (SPA), позитивний регулятор, що зв'язується з промотором проламінкодуючих генів, картований у тому ж QTL сегменті, що й локус Glu-B1[17,18].

Одним з найважливіших компонентів листової протеоми є 1,5-бісфосфат карбоксилаза / оксигеназа, або коротко RuBisCO, що характеризується як лімітуючий фактор обох стратегічних для рослини процесів фотосинтезу і фотореспірації. Активність *in vivo* цього центрального компоненту листової біології модулюється залишком лізину у каталітичному сайті. Контроль активності RuBisCO інгібіторами і активаторами у зв'язку зі стійкістю рослин, наприклад проти посухи, має надзвичайно важливий практичний інтерес [19,20]. Термостабільність RuBisCO зі зв'язаним протеїном RCA сприяє підвищенню активності фотосинтезу за умов високих і стресових температур навколишнього середовища. Визначено локалізацію генетичного контролю RuBisCO. Велика субодиниця RuBisCO контролюється геном у секвенованому геномі хлоропластів і відповідно кожна клітина містить тисячі копій цього гена. Мала субодиниця RuBisCO контролюється мультигенними копіями у ядерному геномі [21].

Цікавим прикладом взаємодії геном/протеома є індукція у ліній пшениці з житньо-пшеничною 1RS.1BL транслокацією екстра-експресії інгібітору альфа-амілази, генетичний контроль якого локалізований у хромосомі 3D. Це явище може обмежувати використання зерна таких ліній для їжі та корму [22].

Та, без сумніву, найефективнішим інструментом у арсеналі методів сучасного селекціонера є система молекулярних маркерів хромосом. Молекулярні маркери пов'язані з послідовностями ДНК певного сегмента генома, який у свою чергу може бути асоційованим з певною агрономічною ознакою рослини. Ефективним для селекції молекулярним маркером може бути той, який проявляє максимальний поліморфізм (алельність) і може бути ідентифікованим у різних генотипів та популяціях від їх схрещування. Технологія молекулярних маркерів еволюціонувала у напрямі підвищення ефективності, зниження вартості та відтворюваності, що є найважливішими вимогами сучасної комерційної селекції.

Перша генерація молекулярних маркерів базувалася на ДНК гібридизації. Прикладом цієї генерації є система RELP (Restriction Fragment Length Polymorphism) маркерів. Друга генерація молекулярних маркерів базувалася на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) і включає наступні системи: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats) або мікросателіти. Мікросателіти особливо ефективні для селекційного використання. Вони є базою для конструювання генетичних карт, здатні поєднувати інформацію (фенотипові ознаки у формі QTL) з великої кількості схрещувань [23].

Сучасна третя генерація молекулярних маркерів ґрунтується на послідовностях ДНК. Серед них клас SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Потенційно найбільш ефективна, найбільш поширена і найбільш точна група маркерів. Маркери SNP базуються на даних секвенування ДНК транскриптів (EST - Expressed Sequence Tags) у різних тканинах або на даних секвенування генома. Отже, SNP маркери безпосередньо пов'язані з конкретним геномом, його мутаціями,

а також з функціональністю різних алелів гена. Інша, зовсім нова група маркерів ISBP (Insertion Based Polymorphism). Ці маркери пов'язані зі вставками (інсерціями) в геномі елементів ретротранспозонів. Маркери ISBP характеризуються високим рівнем генетичного поліморфізму, вони відображають динаміку змін у еволюційній історії генома пшениці [24,25]. І зовсім недавно запроваджена технологія маркерів хромосом пшениці DArT (Diversity Arrays Technology). Це незалежний від даних секвенування вискоефективний метод детектування поліморфізму ДНК шляхом порівняння фрагментів генома різних генотипів шляхом гібридизації ДНК з використанням мікрочипів [26]. Ця технологія дозволяє ідентифікувати сотні генетичних маркерів у одному експерименті.

Важко переоцінити роль функціональних генетичних маркерів у сучасній селекції пшениці. Ці маркери безпосередньо пов'язані з послідовністю гена або модифікаціями в його структурі, з відповідним фенотипом та ефектом гена на прояв селекційних ознак. В якості останніх прикладів дослідження функціональних маркерів пшениці слід навести визначення різних молекулярно-генетичних механізмів стійкості до хвороб, що контролюються генами *Tsn-1* (чутливість до *Stagonospora toxin*), листової іржі *Lr34*, жовтої іржі *Yr36* та стеблової іржі *Sr2* [27,28]. Детальний огляд функціональних маркерів пшениці представлений Bagge et al. [29]. Крім вже згаданої стійкості до хвороб, важливе значення для селекції пшениці мають такі функціональні маркери, як *Vm* (тип розвитку) гени, що контролюють біосинтез класу білків зерна глютенінів, активності поліфенолоксидази (PPO) зерна, висоти стебла (*Rht*).

Цікавим є приклад розробки молекулярних маркерів важливої для селекції пшениці (особливо для країн Азії) ознаки якості зерна – жовтої пігментації борошна. Ця ознака характеризує присутність у борошні пшениці важливих для здоров'я людини антиоксидантів – каротиноїдів. У ході досліджень виявлено, що ключовим ферментом у біосинтезі каротиноїдів є фермент фітоєн синтаза (ген *Psy*) [30]. Ген *Psy* є ключовим фактором що регулює біосинтез каротиноїдів також у зерні кукурудзи і рису [31,32]. Для пшениці знайдені і локалізовані у хромосомах 7A і 7B головні QTL, використання яких в селекції дозволяє ефективно контролювати вміст у борошні жовтих каротиноїдів як факторів підвищеної біологічної цінності зерна [33].

ДНК технології на базі ПЛР забезпечують швидкий доступ до ідентифікації нових алелів цільових генів-кандидатів шляхом порівняння мутантних і природних популяцій, наприклад нещодавно розробленим новим методом TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) [34]. Це новий інструмент у генетичних дослідженнях, що використовує методи традиційного хімічного мутагенезу та високі сучасні технології детекції мутацій. Принцип методу у тому, що цільовий ген у мутантної і немутантної лінії пшениці ампліфікується. У разі, якщо мутагенез генерує у цільовому гені делеції, особини, що несуть делецію, ідентифікуються і ефекти нових алелів досліджуються. Для ідентифікації SNP мутацій чи заміни нуклеотидів продукти ампліфікації цільового гена мутантної і нормальної лінії змішуються і новий

SNP продукт ідентифікується шляхом рестрикції вузькоспецифічним ферментом CEL1 і гібридизації фрагментів ДНК [35].

Розробка серій молекулярних маркерів хромосом привело до створення в поміч селекції цілої новітньої галузі, що швидко удосконалюється, – MAS (Marker-assisted Selection), або селекції за допомогою молекулярних маркерів [36]. Серед багатьох відомих створених класів молекулярних маркерів хромосом у MAS селекції пшениці сьогодні чільне місце зайняли два класи – SNP, про які вже згадувалося раніше, і SSR (Single Sequence Repeats). Створення SNP і SSR систем фактично було революційним етапом у використанні молекулярних маркерів у генетичному аналізі, картуванні генома, створення генетичних карт хромосом пшениці високої щільності і селекції. SNP вважаються найбільш витонченими молекулярними маркерами, оскільки вони відображають елементарні процеси генетичної варіабельності на рівні окремих нуклеотидів ДНК. Маркери SNP категоризовані у відповідності з типами заміни нуклеотидів: транзиції (C/T або G/A) та трансверсії (C/G, A/T, C/A або T/G). Частота генетичного поліморфізму цих маркерів та їх потенційна чисельність практично не обмежені [37]. Низька частота мутацій у SNP маркерах робить їх дуже ефективними у вивченні комплексу агрономічних ознак, інструментом у дослідженні еволюції гігантського генома пшениці [38].

SSR маркери (мікросателіти) – це короткі послідовності ДНК у вигляді тандемних повторів моно-, ди-, три-, тетра- і пентануклеотидів [39]. Унікальність і селекційна цінність SSR маркерів у їх мультиалельній генетичній мінливості, соматичній стабільності та кодомінантному характері успадкування [40, 41]. Сукупність названих характеристик SSR маркерів роблять їх ідеальними для дослідження генетики популяцій, еволюційних студій, картування генів, вивчення різноманіття генетичної плазми і клонів, ідентифікації селекційних ліній і сортів, вирішення багатьох інших задач практичної селекції пшениці [40,42]. Поліморфізм SSR маркерів виявляється шляхом ПЛП-ампліфікації на основі загальної ДНК з використанням двох унікальних праймерів, що складаються з коротких послідовностей нуклеотидів, які фланкують, а отже і визначають SSR локус. Поліморфізм, що детектується, є результатом мінливості за довжиною мотиву, що повторюється, а значить і розміру продукту ампліфікації. І хоча один і той же мотив, що повторюється, може бути представленим у різних ділянках у межах генома пшениці, він все ж є унікальною послідовністю нуклеотидів. Саме тому є можливість вибирати і сконструювати праймери комплементарні до фланкуючих регіонів, які специфічно ампліфікують SSR локус.

Як результат узагальнення і логічного функціонального об'єднання вищеназваних галузей геноміки, транскриптоміки, протеоміки і феноміки (сукупності ознак генотипів) виникла нова дисципліна, що отримала назву біоінформатика. Прикладна біоінформатика за сучасним визначенням – це «структурування біологічної інформації для її логічного, ефективного впровадження» [43]. Началом біоінформатики є пізнання генома пшениці шляхом секвенування ДНК, секвенування

генів і їх алельних варіантів, про що вже було згадано раніш і, зважаючи на критичну важливість цих досліджень, слід ще раз на цьому наголосити. Основою сучасних високотехнологічних процедур секвенування ДНК звісно ж є сучасна технічна лабораторна база. Однією з найбільш продуктивних сучасних технологій секвенування ДНК є процедура піросеквенування з використанням лабораторних систем піросеквенування. Наприклад, система GC20 (Roche) дозволяє виконати сиквенс 20 мільйонів (!) пар основ протягом 4 годин. На її зміну вже прийшла нова система GC100, потужність якої становить 100 мільйонів (!! ) пар основ за той же проміжок часу. З прикладної точки зору найбільш цінною інформацією є знання про послідовність інформаційної РНК (messenger RNA), або mRNA, що є результатом експресії конкретних генів у конкретних тканинах рослини. На основі mRNA будується бібліотека клонів комплементарної ДНК (cDNA). Індивідуальні cDNA з бібліотеки клонів потім секвенуються на основі вже згаданої раніше серії EST послідовностей, створюється одна з найефективніших систем SNP молекулярних маркерів хромосом пшениці.

Наприклад, шляхом дослідження серії EST послідовностей, пов'язаних з реакцією рослин пшениці на різні стреси, у 21 тканини рослин пшениці ідентифіковано кілька сотень генів-кандидатів, що відповідають за реакцію рослин на ці стреси [44]. Подібні дослідження були виконані з ідентифікації серії генів у 11 та 42 різних тканинах, що пов'язані з реакцією рослин пшениці на низькі та критично низькі температури [45,46].

Отже, сьогодні зусиллями провідних світових лабораторій накопичена воістину величезна база даних з секвенування генома ДНК пшениці. Систематизація цієї бази даних зосереджена у Міжнародному центрі співробітництва з секвенування ДНК (INSDC-International Nucleotide Sequence Database Collaboration). До неї залучені Національний інститут генетики (Мішіма, Японія), Генбанк Національного центру біотехнологічної інформації (Бетезда, США), Європейський інститут біоінформатики (Великобританія), Інститут досліджень з геноміки (Роквіль, Меріленд, США) та інші світові наукові центри [47-50]. Сучасна web-базована система узагальнених досліджень геномів рослин, включно з даними секвенування генома пшениці, має назву PlantGDB (Plant Genome Database) і розміщена на сайті: ([www.plantgdb.org/](http://www.plantgdb.org/)). Ця база даних містить пошукову анотацію для більш ніж 243 000 прогнозованих генів пшениці визначених з використанням 854 000 EST послідовностей [51]. Додаткову інформацію з секвенування генома пшениці можна знайти також на кількох інших сайтах: (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>) та ([www.cerealsdb.uk.net/wheat.htm](http://www.cerealsdb.uk.net/wheat.htm)). Інша вільно доступна база, що містить дані з секвенування генома пшениці, дизайни мікрочипів експресії генів, анотацію функції генів, фізичні і генетичні карти хромосом пшениці, має назву HarvEST і розміщена на сайті: (<http://harvest.ucr.edu/>).

Дослідження експресії та функції генів в системі світової мережі наукових установ із вивчення генома пшениці здійснюється з використанням сучасних методів, що еволюціонували від аналізу експресії одного гена за один акт методом Northern



Blotting (DNA/mRNA) та RTPCR до методів паралельного масового дослідження експресії генів шляхом мікрочип-аналізу, таких як SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) та MPSS (Massively Parallel Signal Sequencing) [52,53]. Методи мікрочип-аналізу базуються на гібридизації нуклеїнових кислот, тоді як методи SAGE та MPSS мають за основу секвенування послідовностей генів, що експресуються. З точки зору вартості та ефективності дослідження експресії генів перевага залишається за методами мікрочип-аналізу. У якості одного з перших прикладів успішного мікрочип-аналізу експресії генів пшениці була створена бібліотека з 35 клонів кДНК, отриманих на різних стадіях розвитку зернівки ([www.cerealsdb.uk.net](http://www.cerealsdb.uk.net)) та різних тканин зернівки пшениці ([www.wheatbp.net](http://www.wheatbp.net)). Аналогічна бібліотека кДНК створена для генів, що диференційно експресуються в процесі наливу зернівки пшениці [54] та бібліотека кДНК генів відповіді на дію низьких температур що загалом репрезентує 947 генів [55]. Лише на 2006 рік база даних Affimetrix Format Wheat Array (Великобританія) була представлена набором у більш ніж 70 000 проб кДНК, що становили більше 60 000 транскриптів для всіх 42 хромосом генома пшениці.

Біоінформатика охоплює також результати системи світових досліджень продуктів експресії генів, різних метаболітів пшениці та шляхів їх перетворення у процесі метаболізму рослини пшениці (протеоміка і метаболоміка) у зв'язку з результатами досліджень геноміки, наприклад сайт: (<http://www.genome.jp/kegg/>).

У зв'язку з накопиченою світовими науковими центрами величезною базою даних з секвенування ДНК генома пшениці, виникла необхідність у розробці інструментів для створення на цій основі дизайну молекулярних маркерів з метою їх використання в генетичних дослідженнях та контролю агрономічних ознак у селекції. Одним з таких інструментів є комп'ютерна web-базована програма SSRPrimer, яка дозволяє в режимі реального часу створювати дизайн SSR праймерів на базі даних секвенування ДНК генома пшениці [56]. Альтернативно користувач має доступ до SSR Taxonomy Tree (таксономічного древа) з метою ідентифікації попередньо дібраних праймерів для SSR ампліфікації для будь-яких видів рослин, представлених у межах GeneBank [57]. Ця система містить більше 14 мільйонів SSR праймерів для вірусів, бактерій, тварин і рослин, включно з 84 000 SSR пар праймерів для різних видів пшениці.

Інша комп'ютерна система пошуку SNP маркерів autoSNP ідентифікує поліморфізм SNP та insertion/deletion (інерція/делеція) або indel поліморфізм серед даних загального секвенсу генома і працює з іншими програмами добору праймерів, такими як CAP3, D2/CAP3 або TGICL [58,59]. Доступний також SNP сервер як web-базований інструмент для добору SNP на базі даних секвенування генома пшениці з використанням програми autoSNP в режимі реального часу [60]. Процес пошуку необхідних послідовностей ДНК на SNP сервері ініціюється програмою BLAST, яка ідентифікує схожі послідовності. Потім програма auto SNP детектує необхідні SNP послідовності та insertion/deletion (indel) поліморфізм. Після завершення добору ряду послідовностей програма PolyPhred здійснює оцінку послідовностей і диференціює

дібрані послідовності як дійсний поліморфізм і випадкові помилки комп'ютерного добору послідовностей. Кожен з описаних вище інструментів підвищує імовірність пошуку необхідних молекулярних маркерів для конкретних генів-кандидатів з метою їх генетичного дослідження та використання в практичній MAS селекції [61,62]. З використанням системи пошуку молекулярних маркерів autoSNP співробітниками Університету Брістоль (Великобританія) ідентифіковано більше 47 000 SNP кандидатів з 400 000 ДНК послідовностей свідчення, про які доступні на сайті: [www.cerealsdb.uk.net/discover.htm](http://www.cerealsdb.uk.net/discover.htm) [63].

Конструювання і використання молекулярних генетичних маркерів у генетичних та селекційних програмах потребує необхідності створення відповідних баз даних, що були би доступними для публічного та комерційного використання. Однією з найбільш відомих таких баз даних, яка містить інтегровану інформацію про молекулярні маркери, їх локалізацію на генетичних картах, поліморфізм генів пшениці, жита, ячменю, вівса та їхніх дикорослих спів родичів, є GrainGenes, що тісно пов'язана з іншою базою даних Gramene database [64]. Спеціалізовану і систематизовану інформацію про використання молекулярних маркерів у MAS селекції містить інша база даних Wheat CAP (Coordinated Agricultural Project). Це американський мультиінституційний проект, заснований USDA-CSREES і спрямований на поліпшення сортів пшениці США. Метою Wheat CAP є систематизація накопиченої у світі інформації про зв'язок молекулярних маркерів з агрономічними ознаками пшениці, публічний доступ до цієї бази даних з метою використання в селекції для поліпшення сортів пшениці за зерною продуктивністю, стійкістю до біотичних та абіотичних факторів середовища, якістю зерна.

Зв'язок молекулярних маркерів з агрономічними ознаками пшениці ґрунтується на картуванні генів, створенні генетичних карт. Відповідно генетичні карти можуть бути представлені у вигляді спеціального каталога генів чи графічно. Для візуалізації і співставлення генетичних карт пшениці розроблена спеціальна комп'ютерна програма CMap ([www.gmod.org](http://www.gmod.org)), яка використовується для формування баз даних Gramene та GrainGenes. Система GrainGenes містить 8 карт для *T. monosocum*, 9 карт для *T. turgidum*, 4 карти для *Aegilops tauschii* і 50 карт для гексаплоїдної пшениці *T. aestivum* (<http://rye.pw.usda.gov/cgi-bin/cmap/>). Система Gramene містить дві карти для *T. turgidum* і 9 карт для *T. aestivum* ([www.gramene.org/cmap/](http://www.gramene.org/cmap/)). Кожна з цих систем дозволяє у віртуальному режимі здійснювати порівняння між відповідними молекулярними маркерами на різних картах чи групах зчеплення генів як у межах генома культурної пшениці, так і її дикорослих співродичів.

А з метою здійснення картування генів на хромосомах пшениці та QTL аналізу розроблено ще кілька комп'ютерних програм для вільного чи комерційного завантаження. Деталізований список усіх типів програм для генетичного картування та QTL аналізу міститься на сайті Університету Рокфеллера: Rockefeller University Linkage Software List (<http://linkage.rockefeller.edu/soft/>). Цей список включає безкоштовну програму MapMarker 3,0 (<http://www.broad.mit.edu/ftp/distribution/soft->

[ware/mapmarker3/](http://www.kyasma.nl/index.php/mc.JointMap)). Доступна також програма під назвою QTL Cartographer (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/index.php>), розроблена для картування генів з використанням інбредних ліній. До списку входить також програма JointMap 4,0 для розрахунків частот зчеплення генів на генетичних картах з використанням популяцій (BC1, F2, Recombinant Inbred Lines (у будь-якому поколінні)), гаплоїдів, подвоєних гаплоїдів та сімей перехресно запилюваних видів. Цю програму можливо придбати лише за плату (<http://www.kyasma.nl/index.php/mc.JointMap>).

Отже, з викладеного вище видно, що селекціонери пшениці розвинених країн мають сьогодні надзвичайно широкі можливості контролю у процесі селекції за комплексом агрономічних ознак із застосуванням молекулярних маркерів, що забезпечують високу результативність створення конкурентних сортів пшениці. Для українських селекціонерів, на жаль, ці сучасні інструменти ефективного поліпшення сортів пшениці практично недоступні через брак, перш за все, відповідної лабораторно-технічної бази. Легко передбачувані також і наслідки цього обмеження, які вже помітні на результативності вітчизняної селекції, а у найближчому майбутньому зроблять її абсолютно неконкурентоздатною у порівнянні зі світовою.

Іншим потужним джерелом для створення сучасних сортів пшениці є генерування генетичної варіабельності, багатого генетичного різноманіття, без якого селекція навіть за визначенням не може бути результативною. Важливими інструментами в руках селекціонера, які здатні реально впливати на результативність селекції, є віддалені схрещування і створення генетично модифікованих організмів (ГМО). Статус та комерційні перспективи ГМО в Україні, незважаючи на його приголомшуючий прогрес у світі, залишаються невизначеними, що також буде мати вельми передбачувані вкрай негативні, а можливо й катастрофічні як наукові, так і економічні наслідки для нашої держави. Тому тему ГМО ми залишимо для наступних публікацій і акцентуємо увагу на ролі в селекції віддалених схрещувань. Причому зробимо акцент не взагалі на віддалених схрещуваннях, а саме на тому напрямі віддалених схрещувань, який вже забезпечив реальний успіх у селекції і перспективи якого ще далеко не вичерпані. Мова піде про використання в схрещуваннях з культурною пшеницею синтетичної гексаплоїдної пшениці (SHW-synthetic hexaploid wheat) або синтетичних амфіплоїдів [65].

Синтетичні амфіплоїди – це генотипи з геномною формулою AABBDD ( $2n=6x=42$ ), що об'єднують у своєму геномному складі два дикорослі види-співродичі пшениці: *Triticum turgidum* ssp. *durum/dicoccoides* ( $2n=4x=28$  AABB) та *Aegilops tauschii* (синоніми *Ae.squarrosa*, *Triticum tauschii*;  $2n=2x=14$ DD). *Aegilops tauschii* є генетично близьким до пшениці дикорослим донором ключового генома D культурної пшениці, відповідального за її важливі агрономічні ознаки: урожай зерна, його якість, стійкість до хвороб та абіотичних стресових факторів середовища вирощування. Перевага синтетичних амфіплоїдів над іншими генетично далекими дикорослими видами-співродичами пшениці у тому, що синтетики легко схрещуються з сортами культурної пшениці, їх хромосоми вільно рекомбінують з хромосомами культурної

пшениці, передаючи їй селекційно цінні ознаки без ознак негативних, які елімінуються з селекційної популяції в результаті кросоверної рекомбінації і негативного добору. Синтетичні гексаплоїди створюють шляхом схрещування тетраплоїдного і диплоїдного компонентів і наступного подвоєння кількості хромосом у гібрида F<sub>1</sub> [66]. Одною з найбагатших у світі колекцій (більше 250 зразків) синтетичних гексаплоїдів є колекція CIMMYT (Мексика). Багаті колекції синтетиків також наявні в Університеті штату Канзас (США) та ICARDA.

Синтетичні гексаплоїди безпосередньо використовуються в селекційних програмах пшениці. Одним з найефективніших шляхів використання в селекції цього багатого генетичного матеріалу є процедура прогресивного беккросу АВ (advanced backcross)-QTL з використанням молекулярних маркерів і QTL аналізу [67]. На практиці рекомендується 1-2 беккроси культурною пшеницею, щоб отримати багаті за генетичною варіабельністю BC<sub>1</sub>(2)F<sub>1</sub> і BC<sub>1</sub>(2)F<sub>2</sub> популяції для селекційного добору. Добір за бажаною ознакою в таких селекційних популяціях продукує елітні рослини пшениці, які несуть лише маленькі сегменти хромосоми дикорослого виду без жодного відчутного їхнього негативного впливу на життєздатність та зернову продуктивність рослин [68].

Вклад синтетичних амфіплоїдів у практику селекційного поліпшення пшениці вельми відчутний як за позитивним впливом на зернову продуктивність, посухостійкість, стійкість до засолення ґрунту, стійкість до хвороб, так і інші важливі ознаки пшениці [69,70,71,72]. Перший сорт, створений на основі схрещувань з синтетичними гексаплоїдами Chuanmai 42, нині вирощується в Китаї, де займає площу більше 100 000 га. За перші два роки випробувань у провінції Сичуань він обійшов за урожаєм усі місцеві комерційні сорти, перевищивши стандарт на 22,7% [73].

Широке розповсюдження серед сортів пшениці Австралії, Мексики та інших країн отримав ген *Cre 3* походженням від *Aegilops tauschii*, що забезпечує високу стійкість рослин до злакової цистової нематоди. Для ідентифікації гена *Cre 3* в селекційних популяціях було розроблено SCAR і SSR маркери [74]. На основі цього матеріалу створені високопродуктивні сорти пшениці, які мали перевагу над іншими місцевими, особливо в умовах посухи та на бідних ґрунтах [75]. Серед синтетиків було виявлено високу стійкість до цілого ряду інших хвороб та шкідників, таких як гессенська муха, індійська сажка, борошниста роса, стеблова, листовая і жовта іржа, септоріоз, фузаріоз, жовта листовая плямистість та інші [65]. Практично для всіх відомих генів стійкості до хвороб, що походять від синтетиків, знайдено молекулярні маркери [76].

У цілому ряді досліджень було показано, що лінії пшениці похідні, від схрещувань з синтетичними амфіплоїдами, мали перевагу за зерновою продуктивністю (плюс 11-30% у порівнянні зі стандартами) у північних і південних зонах пшеничного поясу Австралії [77,78]. Особливо помітну перевагу за урожаєм (вище за 149%) похідні від синтетиків лінії пшениці у порівнянні з місцевими сортами

мали у гостро посушливих регіонах Австралії [79]. Подібні результати були отримані при випробуванні похідних від синтетиків ліній у ряді регіонів країн Середземного моря, Центральної і Західної Азії, Північної Африки, Сирії. Фізіологічною основою підвищеної адаптивності похідних від синтетиків ліній і їх високої зернової продуктивності є більш тривалий період продуктивного фотосинтезу, оскільки вони довше за місцеві сорти зберігали життєздатною зелену (*stay-green phenotype*) листову поверхню. Автори досліджень роблять наголос на генетично зумовленій здатності синтетиків передавати культурній пшениці високу стійкість рослин до посухи, що стає надзвичайно актуальним за умов глобального потепління на земній кулі, в результаті якого тисячі гектарів у традиційних пшеничних зонах світу стають непридатними для вирощування пшениці [80,81,82].

Амфіплоїди-синтетики здатні позитивно впливати не лише на зазначені вище ознаки пшениці, а й також на якість зерна. Однією з найважливіших ознак якості зерна пшениці є його фізична твердість, від якої залежать борошномельні (вихід борошна при помелі) та хлібопекарські (ВПС% – водопоглинальна спроможність борошна) властивості. Хромосома 5D (локус *Ha*) пшениці є основним детермінантом ознаки твердості зерна пшениці. Генетична варіабельність за ознакою твердості зерна визначається алелями локусу *Pina* і *Pinb*. У егілопса *Aegilops tauschii*, як компоненту гексаплоїдних синтетиків, виявлено вісім різних алелів *Pina* і шість унікальних алелів *Pinb*, асоційованих з ознакою м'якозерності [83,84,85]. У локусах *Gli/Glu*, що кодують біосинтез клейковинних білків зерна, егілопсу *Aegilops tauschii* виявлено серію унікальних алелів, відсутніх у сортів культурної пшениці. У рекомбінантно-інбредних ліній від схрещування культурної пшениці з синтетиками ідентифіковано QTL з позитивним впливом на хлібопекарські властивості борошна [86].

Важливою характеристикою сучасних сортів пшениці має бути стійкість до проростання зерна на пні. На жаль, більшість сортів пшениці мають короткий період спокою зародка зернівки і тому чутливі до проростання зерна на пні. Ознака чутливості до проростання зерна на пні є кількісною і контролюється у пшениці багатьма генами. Егілопс *Aegilops tauschii* виявився ефективним донором цілої серії унікальних алелів, що забезпечують високу стійкість пшениці до проростання зерна на пні [87]. Генетичний потенціал стійкості *Aegilops tauschii* до проростання зерна на пні використано для поліпшення австралійського сорту білозерної пшениці Janz [88]. Автори ідентифікували сім QTL, що контролюють ознаку стійкості до проростання зерна в хромосомах 1D, 2D, 3D, 6D і 4A. У матеріалі, похідному від схрещування пшениці з синтетиками, ідентифіковано також найсильніший QTL, позначений як *Ophs.sau-2D*, локалізований в інтервалі між маркерами Xgwm261-Xgwm 484, вплив якого на ознаку стійкості до проростання зерна на пні становив 26-28% від загальної варіації ознаки у досліді [89]. Цілий ряд надзвичайно стійких до проростання зерна на пні білозерних ліній пшениці, похідних від схрещування пшениці з синтетиками, було

отримано і успішно використано в селекційних програмах Китаю та Австралії [88,90,91].

Гексаплоїдні синтетики переважали усі сорти пшениці у масштабному досліді з гідропонікою при концентрації 100 ммоль солі NaCl [92]. У дослідях з австралійськими сортами пшениці синтетики суттєво переважали останні навіть за концентрацій солі NaCl у 250 ммоль [93]. Головний локус *Kna 1*, що контролює  $K^+/Na^+$  поглинання і утилізацію корінням рослин, був локалізований на хромосомі 4DL [94]. У синтетиків додатково до хромосоми 4D було знайдено ще ряд інших факторів, що забезпечують високу солестійкість рослин у хромосомах 2B, 3B, 4B, 6D, 7A і 7D. Ці дані свідчать про те, що синтетики є також незамінними донорами генів солестійкості для сортів культурної пшениці [65]. Отже, гексаплоїдні синтетики є потужним джерелом розширення генетичної варіабельності для селекції пшениці, поліпшення сортів пшениці за комплексом агрономічних ознак, включаючи урожай зерна, якість і адаптивність до біотичних та абіотичних факторів навколишнього середовища [95].

Таким чином, ця стаття містить стислий огляд найбільш вагомих (звичайно ж далеко не всіх) досліджень у галузях генетики, біотехнології та генної інженерії - новітніх науково ємких інструментів, здатних суттєво впливати на результативність створення сучасних конкурентних сортів пшениці як важливої складової підвищення урожайності культури та якості зерна. На жаль, якщо поглянути на цитовані джерела, там немає жодної наукової публікації високого світового ґатунку, виконаної в наукових лабораторіях України. Стан занепаду вітчизняної біологічної науки, авангардом якої є генетика і біотехнологія, без перебільшення, – катастрофічний. Якщо державою у найближчі роки не будуть вжиті заходи щодо радикального поліпшення генетичних і біотехнологічних досліджень, українська селекція буде не здатною створювати конкурентний продукт – сорт, якісне насіння. А це вже питання національної безпеки України. Такий стан речей є щонайменше неприйнятним, а точніше ганебним для держави, що претендує на роль потужного світового виробника і експортера зерна пшениці.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The world wheat book. A history of wheat breeding. 2011, Lavoisier Publ., Eds. A. Bonjean, W. Angus, M. Ginkel.– Vol. 2.– 1201 p.
2. Appels R., Barsby T., Risacher T., Bekes F. Linking the genome to phenotypes in wheat: advances in technologies and concepts. The world wheat book. A history of wheat breeding. 2011, Lavoisier Publ., Eds. A. Bonjean, W. Angus, M. Ginkel.– Vol. 2.– P. 709- 748.
3. Paux E., Sourdille P., Salse J., Saintenac C., Choulet F., Leroy P., Korol A., Michalak M., Kianian S., Spielmeier W., Lagudah E., Somers D., Kilian A., Alaux M., Vautrin S., Berges H., Eversole K., Appels R., Safar J., Simkova H., Dolezel J., Bernard M., Feuillet C. A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. Science.– 2008.–

Vol. 322.– P.101-104.

4. Ling P., Chen X. Construction of a hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) bacterial artificial chromosome library for cloning genes for stripe rust resistance. *Genome*.– 2005. – Vol. 48.– P.1028-1036.
5. Gill B., Appels R., Botha-Oberholster A-M., Buell C., Bennetzen J., Chalhoub B., Chumley F., Dvorak J., Iwanaga M., Keller B., Li W., McCombie R., Ogihara Y., Quetier F., Sasaki T. A workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. *Genetics*.– 2004.– Vol. 168.– P.1087-1096.
6. Endo T., Gill B. The deletion stocks of common wheat. *J. Hered.*– 1996.– Vol. 87.– P. 295- 307.
7. Charles M., Belcram H., Just J., Huneau C., Viollet A., Couloux A., Segurens B., Carter M., Huteau V., Coriton O., Appels R., Sylvie Samain S., Boulos Chalhoub B. Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat. *Genetics*.– 2008.– Vol. 180.– P. 1071-1086.
8. Erayman M., Sandhu D., Sidhu D., Dilbirligi M., Baenziger P., Gill K. Demarcating the gene rich regions of the wheat genome. *Nucleic Acid Res.*– 2004.– Vol. 32.– P. 3546- 3565.
9. Clarke B., Hobbs M., Skylas D., Appels R. Genes active in developing wheat endosperm. *Funkt. Integr. Genomics*. – 2000.– Vol. 1.– P. 44-55.
10. Jordan M., Somers D., Banks T. Identifying regions of the wheat genome controlling seed development by mapping expression quantitative trait loci. *Plant Biotechnology Journal*.– 2007.– Vol. 5.– P. 442-453.
11. Jones R., Gordus A., Krall J., MacBeath G. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature*.– 2006.– Vol. 439.– P. 168-174.
12. Wellner N., Marsch G., Savage A., Halford N., Shewry P., Miils E., Belton P. Comparison of repetitive sequences derived from high molecular weight subunits of wheat glutenin, an elastomeric plant protein. *Biomacromolecules*.– 2006.– Vol. 7.– P. 1096-1103.
13. Altenbach S., Kothari K. Omega-gliadin genes expressed in *Triticum aestivum* cv. Butte 86: effects of post-anthesis fertilizer on transcript accumulation during grain development. *Journal of Cereal Science*.– 2007.– Vol. 46. – P. 169-177.
14. Altenbach S., Kothari K., Tanaka C., Hurkman W. Genes encoding the PR-4 protein wheatwin are developmentally regulated in wheat grains and respond to high temperatures during grainfill. *Plant Science*.– 2007.– Vol.173 (2).– P. 135-143.
15. Tanabe S. Epitope peptides and immunotherapy. *Current Protein and Peptide Science*.– 2007.– Vol.8.– P.109-118.
16. Weichel M., Vergoossen N., Bonomi S., Scibilia J., Ortolani C., Ballmer-Weber B., Pastorallo E., Cramer R. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy*.– 2006.– Vol.61.– P.128-135.

17. Guillaumie S., Charmet G., Linossier L., Torney V., Robert N., Ravel C. Colocation between a gene encoding the bZip factor SPA and an eQTL for a high-molecular-weight glutenin subunit in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*.– 2004.– Vol. 47.– P. 705-713.
18. Ravel C., Nagy I., Martre P., Sourdille P., Dardevet M., Balfourier F., Pont C., Giankola S., Praud S., Charmet G. Single nucleotide polymorphism, genetic mapping and expression of genes coding for the DOF wheat prolamins-box binding factor. *Funct. Integr. Genomics*.– 2006.– Vol. 6.– P.310-321.
19. Kurek I., Chang T., Bertain S., Madrigal A., Liu L., Lassner M., Zhu G. Enhanced thermo stability of Arabidopsis Rubisco activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress. *Plant Cell*. – 2007.– Vol.19.– P.3230-3241.
20. Rao A.G. The outlook for protein engineering in crop improvement. *Plant Physiol*.– 2008. – Vol. 147.– P. 6-12.
21. Ogihara Y., Isono K., Kolima T., Endo A., Hanaoka M., Shiina T., Terachi T., Utsugi S., Murata M., Mori N., Takumi S., Ikeo K., Gojobori T., Murai R., Matsuoka Y., Ohnishi Y., Tajiri H., Tsunewaki K. Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.) Chloroplast genome: complete sequence and contig clones. *Plant Molecular Biology Reporter*.– 2000.– Vol.18.– P. 243-253.
22. Gobaa S., Bancel E., Kleijer G., Stamp P., Branlard G. Effect of the 1RS.1BL translocation on wheat endosperm, as revealed by proteomic analysis // *Proteomics*. 2007.– Vol. 7.– P. 4349-4357.
23. Appels R., Francki M., Chibbar R. Advances in cereal functional genomics // *Funct. Integr. Genomics*.– 2003.– Vol. 3.– P. 1-24.
24. Jing R., Knox M., Lee J., Vershinin A., Ambrose M., Ellis T., Flavel A. Insertional polymorphism and antiquity of *PDR1* retrotransposon insertions in *Pisum* species // *Genetics*.– 2005.– Vol. 171.– P. 741-752.
25. Paux E., Roger D., Jacques D., Bernard M., Sourdille P., Feuillet C. Insertion site-based polymorphism: recycling the “junk” from the wheat genome // *Plant and Animal Genome XY Conference*.– 2007.
26. Akbari M., Wenzl P., Caig V., Carling J., Xia L., Yang S., Uszinski G., Mohler V., Lehmensiek A., Kuchel H., Hayden M., Howes N., Sharp P., Vaughan P., Rathmell B., Huttner E., Kilian A. Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome // *Theor. Appl. Genet.* – 2006.– Vol. 113.– P. 1409-1420.
27. Lu H., Faris J. Macro- and microcolinearity between the genomic region of wheat chromosome 5B containing the *Tsn-1* gene and the rice genome // *Func. Integr. Genomics*.– 2006.– Vol. 6.– P. 90-103.
28. Krattinger S., Lagudah E., Spielmeier W., Singh R., Huerta-Espino J., McFadden H., Bossolini E., Selter L., Keller B. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat // *Science*. – 2009.– Vol. 323(5919).– P. 1360- 1363.
29. Bagge M., Xia X., Lubberstedt T. Functional markers in wheat. *Curr. Op. Plant Biol.*–



2007.– Vol. 10.– P. 211-216.

30. Lindgren L., Stalberg K., Hoglund A., Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased level of carotenoids, chlorophyll and abscisic acid // *Plant Physiol.*– 2003.– Vol. 132.– P. 779- 785.
31. Palaisa K., Morgante M., Williams M., Rafalski A. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci // *Plant Cell.* 2003.– Vol. 15.– P.1795-1506.
32. Gallagher C., Matthews P., Wurtzell E. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses // *Plant Physiol.*– 2004.– Vol. 135.– P. 1776- 1783.
33. Zhang L., Yan J., Xia X., He Z., Sutherland M. QTL mapping for kernel yellow pigment content in common wheat // *Acta Agron. Sin.*– 2006.– Vol. 32.– P. 41-45.
34. Slade A., Fuerstenberg S., Loeffler D., Steine M., Facciotti D. Reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING // *Nature Biotechnology.* – 2005.– Vol. 23.– P. 75-81.
35. Dong C., Dalnon-Morgan J., Vincent Km Sharp P. Breeding desired quality wheat by reverse genetics // *RACI Cereal Chemistry.*– 2008.
36. Koebner R., Summers R. 21th century wheat breeding: plot selection or plate detection? *Trends in Biotechnology.*– 2003.– Vol. 21.– P. 59-63.
37. Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphism in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.*– 2002.– Vol. 5.– P. 94-100.
38. Syvänen A. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms // *Nature Reviews Genetics.*– 2001.– Vol. 2.– P. 930-942.
39. Engel S., Linn R., Taylor J., Davis S. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies // *Journ. of Mammology.*– 1996, – Vol. 77.– P. 504-518.
40. Powell W. Machray G., Provan J. Polymorphism revealed by single sequence repeats // *Trends in Plant Science.*– 1996.– Vol. 1.– P.215-222.
41. Morgante M., Olivieri A. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics // *The Plant Journal.* –1993.– Vol. 3.– P. 175-182.
42. Cruzan M. Genetic markers in plant evolutionary ecology // *Ecology.* –1998.– V. 79.– P. 400- 412.
43. Edvards D. Wheat bioinformatics. *The World Wheat Book. A history of wheat breeding. Volume 2.* Lavoisier Publishing. Eds. A. Bonjean, W. Angus. – 2011.– P. 851-875.
44. Mochida K., Kawaura K., Shimosaka E., Kawakami N., Shin-I T., Kohara Y., Yamazaki Y., Ogihara Y. Tissue expression map of a large number of expressed sequence tags and its application to in silico screening of stress response genes in common wheat // *Molecular Genetics and Genomics.*– 2006.– V. 276 (3)– P. 304-312.
45. Houde M., Belcaid M., Ouellet F., Danyluk J., Monroy A., Dryanova A., Gulick P., Bergeron A., Laroche A., Links M., MacCarthy L., Crosby W., Sarhan F. Wheat EST

- resources for functional genomics of abiotic stress. *BMC Genomics*.– 2006.– Vol. 7.– Art. #149.
46. Chao S., Lazo G., You F., Grossman C., Hummel D., Lui N., Laudencia-Chingcuanco D., Anderson J., Close T., Dubcovsky J., Gill B., Gill K., Gustafson J., Kianian S., Lapitan N., Nguyen H., Sorrels M., McGuire P., Qualset C., Anderson O. Use of a large-scale Triticeae expressed sequence tag resource to reveal gene expression profiles in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Genome*.– 2006.– Vol. 49(5).– P. 531-544.
  47. Ohyanagi H., Tanaka T., Sakai H., Shigemoto Y., Yamaguchi K., Habara T., Fujii Y., Antonio B., Nagamura Y., Imanishi T., Ikeo K., Itoh T., Gojobori T., Sasaki T. The rise annotation project database (rap-db): hub for *Oryza sativa* ssp. japonica genome information. *Nucleic Acid Res.*– 2006.– Vol. 34.– D741- D744.
  48. Benson D., Karsh-Mizrachi I., Lipman D., Ostell J., Wheeler D. Genbank. *Nucleic Acid Res.*– 2006.– Vol. 34.– D16-D20.
  49. Cochrane G., Aldebert P., Althorpe N., Andersson M., Baker W., Baldwin A., Bates K., Bhattacharyya S., Browne P., van den Broek A., Castro M., Duggan K., Eberhardt R., Faruque N., Gamble J., Kanz C., Kulikova T., Lee C., Leinonen R., Lin Q., Lombard V., Lopez R., McHale M., McWilliam H., Mukherjee G., Nardone F., Pastor M., Sobbany S., Stoehr P., Tzouvara K., Vaughan R., Wu D., Zhu W., Apweiler R. EMBL nucleotide sequence database: development in 2005. *Nucleic Acid Res.*– 2006.– Vol. 34.– D10-D15.52.
  50. Lee Y., Tsai J., Sankara S., Karamycheva S., Pertea G., Saltana R., Antonescu V., Chan A., Cheung F., Quackenbush J. The TIGR gene indices: clustering and assembling EST and known genes and integration with eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Res.*– 2005.– Vol.33.– D71-D74.
  51. Dong O., Schlueter S., Brendel V. Plant tGDB, plant genome database and analysis tools. *Nucleic Acid Res.*– 2004.– Vol. 32(1).– D354-D359.
  52. Poroyko V., Hejlek L., Spollen W., Springer G., Nguyen H., Sharp R., Bohnert H., The maize root transcriptome by serial analysis of gene expression // *Plant Physiol.*– 2005.– Vol.138. – P. 1700-1710.
  53. Lu C., Tej S., Luo S., Haudenschild C., Meyers B., Green P. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome // *Science*.– 2005.– Vol. 309.– P. 1567-1569.
  54. Leader D. Transcriptional analysis and functional genomics in wheat. *Journal of Cereal // Science*.– 2005.– Vol. 41(2).– P. 149-163.
  55. Gulik P., Drouin S., Yu Z., Danyluk J., Poisson G., Monroy A., Sarhan F. Transcriptome comparison of winter and spring wheat responding to low temperature // *Genome*.– 2005.– Vol. 48(5).– P. 913-923.
  56. Robinson A., Love C., Batley J., Barker G., Edwards D. Simple sequence repeat marker loci discovery using SSRPrimer // *Bioinformatics*.– 2004.– Vol. 20.– P. 3223- 3233.
  57. Jewell E., Robinson A., Savage D., Ervin T., Love C., Lim G., Li X., Batley G.

## SSRPrimer

and SSR Taxonomy Tree: Biome SSR discovery // *Nucleic Acid Research*. (in press).

58. Batley J., Barker G., O'Sullivan H., Edwards K., Edwards D. Mining for single nucleotide polymorphism and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data // *Plant Physiology*.– 2003.– Vol. 132.– P. 84-91.
59. Pertea G., Huang X., Liang F., Antonescu V., Sultana R., Karamycheva S., Lee Y., White J., Cheung F., Parvizi B., Tsai J., Quackenbush J. TIGR Gene Indices clustering Tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets // *Bioinformatics*.– 2003.– Vol. 19(5).– P.651-652.
60. Savage D., Batley J., Ervin T., Logan E., Love C., Lim G., Mongin E., Barker G., Spangenberg G., Edwards D. SNPServer: a real time SNP discovery tool // *Nucleic Acid Research*.– 2005.– Vol. 33.– W493-W495.
61. Stephens M., Sloan J., Robertson P., Scheet P., Nickerson D. Automating sequence-based detection and genotyping of SNPs from diploid samples // *Nat. Genet.* –2006.– Vol. 38(3).– P. 375-381.
62. Bhangale T., Stephens M, Nickerson D. Automating resequencing – based detection of insertion-deletion polymorphisms // *Nat. Genet.* (in press).
63. Barker G., Batley J., O'Sullivan H., Edwards K., Edwards D. Redundancy based detection of sequence polymorphism in expressed sequence tags data using autoSNP // *Bioinformatics*.– 2003.– Vol. 19.– P. 421-422.
64. Carollo V., Matthews D., Lazo G., Blake T., Hummel D., Lui N., Hane D., Anderson O. GrainGenes 2,0 an improved resource for the small grain community // *Plant Physiol.* – 2005.– Vol. 139.– P. 643-651.
65. Ogbonnaya F. Development, management and utilization of synthetic hexaploids in wheat improvement. *The World Wheat Book. A history of wheat breeding.* 2011, Lavoisier Publ., Eds. A. Bonjean, W. Angus, M. Ginkel.– Vol. 2.– P. 823-849.
66. Mujeeb-Kazi A. Interspecific and intergeneric hybridization in Triticeae for wheat improvement. In: *Biodiversity and wheat improvement* (Ed. Damania A.), (John Wiley and Sons: Chichester, UK).– 1993.– P. 95-102.
67. Tunksley S., Nelson J. Advanced backcross QTL analysis: a method of the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines // *Theor. Appl. Genet.*– 1996.– Vol. 92.– P. 191-203.
68. Zhang P., Dreisigacker S., Melchinger A., Reif J., Mujeeb-Kazi A., van Ginkel M., Hoisington D., Warburton M. Quantifying novel sequence variation and selective advantage in synthetic tetraploid wheats and their backcross-derived lines using SSR markers // *Molecular Breeding*.– 2005.– Vol. 15.– P. 1-10.
69. Ogbonnaya F., Bariana H., Shankar M., Hollaway G., Imtiaz M., Trethowan R., Lagudah E. , van Ginkel M. Mining synthetic hehaploids for multiple disease resistance to improve wheat // *Austr. Journ. Agric. Res.* –2008.– Vol. 59(5).– P. 421-431.
70. Trethowan R., Mujeeb-Kazi A. Novel germplasm resources for improving environment stress tolerance of hexaploid wheat // *Crop Science*.– 2008.– Vol. 48(4).–

P. 1255-1265.

71. Ogonnaya F., Halloran G., Lagudah E., D genome of wheat – 60 years on from Kihara, Sears and McFadden. In: Tsunewaki Koichiro (ed.). *Frontiers of Wheat Bioscience*. Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Science, Yokohama, Japan.– 2005.
72. Thompson J. Resistance to root-lesion nematodes (*Pratylenchus thornei* and *P. neglectus*) in synthetic hexaploid wheats and their durum and *Aegilops tauschii* parents // *Austr. Journ. Agric. Res.*– 2008.– Vol. 59(5).– P. 432-446.
73. Yang W., Liu D., Li J., Zhang L., Wei H., Hu X., Zheng Y., He Z., Zou Y. Synthetic hexaploid wheat and its utilization for wheat genetic improvement in China // *Journ.Genet.Genomics.*– 2009.– Vol. 36(9).– P. 539-546.
74. Martin E., Eastwood R., Ogonnaya F. Identification of microsatellite markers associated with cereal nematode resistance gene *Cre 3* in wheat // *Austr. Journ. Agric. Res.*– 2004.– Vol. 55.– P. 1205-1211.
75. Eastwood R., Gororo N., Martin E. Experiences with synthetic wheat in a commercial whet breeding program. “1<sup>st</sup> Synthetic Wheat Symposium” Sept. 4-6<sup>th</sup>, Horsham, Victoria, Australia, Abstracts, (Eds: Imtiaz M., Ogonnaya F., van Ginkel M.).– 2006.– P. 9.
76. Zwart R., Thompson J., Milgate A., Bansal U., Williamson P., Raman H., BarianaH. QTL mapping of multiple foliar disease and root-lesion nematode resistances in wheat // *Molecular Breeding*. – 2009.– DOI 10.2007/s11032.
77. Dreccer F., Borgogone G., Ogonnaya F., Trethowan R., Winter B. CIMMYT-selected derived synthetic bread wheats for rainfed environments: yield evaluation in Mexico and Australia // *Field Crop Research.*– 2007.– Vol. 100.– P. 218-228.
78. Ogonnaya F., Ye G., Trethowan R., Dreccer F., Shepperd J., van Ginkel M. Yield of synthetic backcross-derived lines in rainfed environments of Australia // *Euphytica.*– 2007.– Vol. 157.– P. 321-336.
79. Gorogo N., Eagles H., Fastwood R., Nikolas M., Flood R., Use of *Triticum taushii* to improve yield of wheat in low-yielding environments – *Euphytica.*– 2002.– Vol. 123.– P. 241-254.
80. Christopher J., Manschadi A., Dung Y. Synthetic hexaploid wheats can exhibit stay-green phenotype and high yield in the Australian northern grains region. 1<sup>st</sup> Synthetic Wheat Symposium “Synthetics for Wheat Improvement”, Sept. 4-6<sup>th</sup> Horsham, Victoria, Australia, Abstracts, (Eds: Imtiaz M., Ogonnaya F., van Ginkel M.).– 2006.– P. 33.
81. Rattey A., Chapman S., McIntyre C., Shorter R. Utility of derived synthetic wheat to enhance adaptive traits for yield in the northern region of Australia. The 11<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp. Proc. (Eds: Appels R., Eastwood R., Lagudah E., Langridge P., Mackay M., McIntyre L.), Sydney University Press.– 2008.– <http://hdl.handle.net/2123/3442>.
82. Yang W., Liu D., Li J., Zhang L., Wei H., Hu X., Zheng Y., He Z., Zou Y. Synthetic hexaploid wheat and its utilization for wheat genetic improvement in China // *Journ. Genet. Genomics.*– 2009.– Vol. 36(9).– P. 539-546.

83. Gedye K., Morris C., Bettge A. Determination and evaluation of the sequence and textural effects of the puroindoline a and puroindoline b genes in a population of synthetic hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.*– 2004.– Vol. 109.– P. 1597-1603.
84. Massa A., Morris C., Gill B. Sequence diversity of puroindoline a, puroindoline b, and the grain softness protein genes in *Aegilops tauschii* coss // *Crop Science.*– 2004.– Vol. 44.– P. 1808-1816.
85. Lillemo M., Chen F., Xia X., William M., Trethowan R., He Z. Puroindoline grain hardness alleles in CIMMYT bread wheat endosperm // *Journ. Cereal Sci.*– 2006.– Vol. 44.– P. 86- 92.
86. Nelson J., Andreescu C., Breseghello F., Finney P., Gualberto D., Bergman C., Pena R., Perretant M., Leroy P., Qualset C., Sorrels M. Quantitative trait locus analysis of wheat quality traits // *Euphytica.*– 2006.– Vol. 149.– P. 145-159.
87. Ogonnaya F., Imtiaz M., Depauw R. Haplotype diversity at pre-harvest sprouting QTL in wheat // *Genome.*– 2007. – Vol. 50.– P. 107-118.
88. Imtiaz M., Ogonnaya F., Oman J., van Ginkel M. Characterization of QTLs controlling genetic variation for pre-harvest sprouting in synthetic backcross derived wheat lines // *Genetics.*– 2008.– Vol. 178.– P. 1725-1736.
89. Ren X., Lan X., Li D., Wang L., Zheng Y. Mapping QTLs for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 2D in a synthetic hexaploid wheat x common wheat cross // *Journ. Appl. Genet.*– 2008.– Vol. 49(4).– P. 333-341.
90. Lan X., Zheng Y., Ren X., Liu D., Wei Y., Yan Z. Utilization of pre-harvest sprouting tolerance gene of synthetic wheat RSP // *Journ. Plant Genet. Resources.*– 2005.– Vol. 6.– P. 204-209.
91. Li J., Wei H., Yang W., Peng Z. Genetic ecaluation of synthetic hexaploid wheat *Cereta/Aegilops tauschii* 783 with resistance to stripe rust and pre-harvest sprouting by SSR markers // *Molecular Plant Breeding.* – 2005.– Vol. 3.– P. 810-814.
92. Dreccer M., Ogonnaya F., Borgognone G. Sodium exclusion in primary synthetic wheats. In: *Proc. 11<sup>th</sup> Wheat Breeding Assembly, Symp. Seeding the Future.* 21-24<sup>th</sup> Sept. Canberra.– 2004.– P. 118-121.
93. Ogonnaya F., Steadman E., Burch D., Moody D., Munns R. Breeding for salinity tolerance using synthetic wheats. *Genomics Symp., The Genomics of Salinity.* 16-18<sup>th</sup> Nov., Australia.– 2009.– P. 160-163.
94. Dubcovsky J., Sant Maria G., Epstein E., Luo M., Dvořák J. Mapping of the K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> discrimination locus *Kna1* in wheat // *Theor. Appl. Genet.*– 1996.– Vol. 92.– P. 448- 454.
95. Gill B., Friebe B., Raupp W., Wilson D., Cox T., Sears R., Broun-Guedira G., Fritz A. Wheat genetic resources center: the first 25 years // *Advances in Agronomy.*– 2006.– Vol. 89.– P. 73-136.

Надійшла 13.03. 2013 р.