

О. О. Колесник^{1,2},

С. В. Чеботар², канд. біол. наук, ст. науковий співробітник

О. М. Хохлов³, канд. сіль.-госп. наук, зав. відділу

Ю. М. Сиволап², д-р біол. наук, проф., акад., директор

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

² Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН,

Овідіопільська дор., 3, Одеса, 65036, Україна

³ Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та сортовивчення

Овідіопільська дор., 3, Одеса, 65036, Україна

e-mail: sabina-chebotar@rambler.ru

ДИФЕРЕНЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ СОРТІВ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОСАТЕЛІТНОГО АНАЛІЗУ ТА КОМП'ЮТЕРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МОРФОМЕТРИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ЗЕРНА

Для комплексної характеристики 17 сучасних сортів озимої м'якої пшениці селекції СГІ-НЦНС визначили аельний склад за п'ятьма мікросателітними локусами та величину шести морфометричних показників зерна. Мікросателітний аналіз дозволяє чітко та унікально ідентифікувати досліджені сорти, у тому числі — багатолінійні. Комп'ютерний аналіз цифрових зображень зерна дозволяє отримати детальну морфометричну характеристику, на основі якої можливо провести відносне розподілення сортів на групи, проте не здатний однозначно ідентифікувати генотипи. Оскільки два методи мають різну природу, їх спільне застосування забезпечує більш повну характеристику сортів.

Ключові слова: пшениця, мікросателітний аналіз, поліморфізм ДНК, параметри розміру зерна.

Вступ

Визначення сорту рослини необхідно як у селекційно-насінницькій роботі, так і при захисті й охороні прав селекціонерів [1]. Щороку в країні створюються та реєструються нові сорти і гібриди, які здатні конкурувати із зарубіжними і користуватися попитом [2]. Визначення критеріїв індивідуальності сорту, таких як вирізняльність, однорідність та стабільність (DUS-тест), — надає сорту статусу інтелектуальної власності. Правове забезпечення державної реєстрації сортів рослин є основою сучасного насінництва та розсадництва [1].

Згідно з настановою Міжнародної спілки захисту сортів рослин (UPOV) [3], основу DUS-тесту пшениці складає сукупність 26 ознак переважно морфологічного характеру. Розроблена на їх базі вітчизняна інструкція розширена до 38 ознак, переважно за рахунок більш детального опису особ-

ливостей зерна. Проте навіть досить широкий сортимент морфологічних ознак не завжди задовольняє практичні потреби, у зв'язку з чим згадана вище настанова UPOV у якості опції рекомендує застосовувати електрофореетичний метод ідентифікації сортів за алелями локусів, що кодують субодиниці високомолекулярних глютенінів. Дослідженнями, проведеними у СГІ, показана гетерогенність багатьох сортів селекції СГІ-НЦНС за даними електрофореу гліадинів [4].

Актуальним в Україні є створення інформаційної бази даних, яка б відбивала молекулярно-генетичні характеристики сортів м'якої пшениці та джерел, що використані в селекційному процесі [5]. На сучасному етапі розвитку біотехнологічної науки перспективним напрямом у розробці системи каталогізації генетичних джерел та реєстрації сортів м'якої пшениці є використання ПЛР-методів, зокрема аналізу мікросателітних (МС) локусів [6].

Як відомо, методика ДНК-технології МС-аналізу є досить коштовною. Ряд авторів [7, 8] раніше широко використовували метод диференціації сортів за аналізом морфометричних параметрів розміру зерна, що є більш дешевим та доступним для застосування у масових дослідженнях. З розвитком комп'ютерних технологій створено методи швидкої і точної оцінки морфометричних, а також колориметричних параметрів [9, 10, 11], зросла їх диференційна здатність.

Дана робота задумана як модель ситуації, коли треба дати порівняльну характеристику сортам пшениці, маючи у розпорядженні лише їх насіння. Для диференціації та ідентифікації нових українських сортів озимої м'якої пшениці нами були використані обидві групи методів: аналіз п'яти мікросателітних локусів та визначення шести морфометричних характеристик зерна.

Матеріали і методи дослідження

Матеріалом для дослідження слугували 17 сучасних сортів м'якої озимої пшениці (*T. aestivum* L.) селекції СГІ-НЦНС та еталонні сорти: Альбатрос одеський і два колекційні зразки сорту Безоста 1 [12]. Насіння категорії "1 репродукція" було висіяно в полі ділянками (СГІ-НЦНС) за близьких умов середовища. По кожному сорту рендомізованим способом було взято по 4 колоси для аналізу. Облік отриманих даних проводили для кожного колоса окремо. Таким чином, загальна кількість зразків була 68. Дані про походження сортів наведено в табл. 1.

Характеристика мікросателітних локусів та відповідних праймерів наведена в табл. 2. ДНК виділяли за Сиволапом та ін. [6].

Для проведення ПЛР з праймерами до МС-локусів застосовували ампліфікатор "Терцик" ("ДНК-Технологія", Москва, Росія). Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила 10 x ПЛР буфер, складом: 3 М КСl, 2 М Трис-НСl рН 8,4 (25 °С), 2 М MgCl₂, 10 % Твін-20; 0,2 мМ dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 250 нМ прямого та зворотнього праймерів, 100 нг ДНК, 1 одиницю ДНК-полімерази Таq. Поверх реакційного розчину нашаровували 20 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію з праймера-

ми до мікросателітних локусів проводили у режимі: початкова денатурація при 94 °С — 3 хв, потім 45 циклів, які включали: денатурацію при 94 °С — 1 хв, відпалювання праймерів при 60 °С — 1 хв, елонгацію при 72 °С — 2 хв, останній цикл — 10 хв при 72 °С.

Таблиця 1

Сорти м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), досліджені у роботі

№	Назва	Автори	Дата занесення у Реєстр сортів рослин України, рік
1	Господиня	М. А. Литвиненко, Н. О. Гончарук та інш.	2007
2	Скарбниця	М. А. Литвиненко, Н. О. Гончарук, О. М. Пташенчук та інш.	2007
3	Косовиця	М. А. Литвиненко, Н. О. Гончарук, О. М. Пташенчук та інш.	2008
4	Антонівка	М. А. Литвиненко, Н. О. Гончарук, О. М. Пташенчук та інш.	2008
5	Заможність	М. А. Литвиненко, Н. О. Гончарук, О. М. Пташенчук та інш.	2008*
6	Благодарка одеська	М. А. Литвиненко, Н. О. Гончарук, О. М. Пташенчук та інш.	2008*
7	Місія одеська	М. А. Литвиненко, Н. О. Гончарук, О. М. Пташенчук та інш.	2008*
8	Дальницька	А. В. Абакуменко, М. А. Литвиненко	2005
9	Єдність	М. А. Литвиненко, Н. О. Гончарук, О. М. Пташенчук та інш.	2008
10	Кірія	С. П. Лифенко, М. І. Єриняк, В. П. Федченко та інш.	2004
11	Ліона	С. П. Лифенко, М. І. Єриняк, В. П. Федченко та інш.	2005
12	Куяльник	С. П. Лифенко, М. І. Єриняк, В. П. Федченко та інш.	2003
13	Пошана	С. П. Лифенко, М. І. Єриняк, В. П. Федченко та інш.	2004
14	Запорука	С. П. Лифенко, М. І. Єриняк, В. П. Федченко та інш.	2008
15	Бунчук	С. П. Лифенко, М. І. Єриняк, В. П. Федченко та інш.	2008*
16	Подяка	С. П. Лифенко, М. І. Єриняк, В. П. Федченко та інш.	2008
17	Оксана	О. І. Рибалка, Д. В. Аксельруд, О. П. Боделан, П. П. Бонжан	2007
18	Альбатрос одеський	М. А. Литвиненко, А. Ф. Гержов, Ф. Г. Кириченко та інш.	1990
19	Безоста 1 (1)	П. П. Лук'яненко, П. А. Лук'яненко, Н. Д. Тарасенко	1955
20	Безоста 1 (2)	П. П. Лук'яненко, П. А. Лук'яненко, Н. Д. Тарасенко	1955

Примітки: 2008* — Занесений до переліку сортів, перспективних для вирощування в 2008 році; сорти Альбатрос одеський та два колекційні зразки Безоста 1 (1) і Безоста 1 (2) взято у дослідження в якості еталонних сортів.

Таблиця 2

Мікросателітні локуси, досліджені в роботі

Локус	Хромосомна локалізація	Праймери (5'-3')	Мотив МС-локусу генотипу Chinese Spring *
<i>Xgwm095</i>	2A	gatcaaacacacacccctcc aatgcaaaagtgaaaaaccg	(AC) ₁₆
<i>Xgwm155</i>	3A	caatcatttcccctccc aatcattggaatccatagcc	(CT) ₁₉
<i>Xgwm165/I</i>	4D	tgcagtggctcagagtttcc ctttctttcagattgcgcc	(GA) ₂₀
<i>Xgwm186</i>	5A	gcagagcctggttcaaaaag cgctctagcgagagctatg	(GA) ₂₆
<i>Xgwm190</i>	5D	gtgcttgctgagctatgagtc gtgccacgtgggtaccttg	(CT) ₂₂

Примітка: * — згідно даних Röder et al. [17].

Для ідентифікації алельного складу мікросателітних локусів у досліджуваних сортів продукти ПЛР (5 мкл-аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 10 % денатуруючому (8 М сечовина) поліакриламідному гелі в 1 x TBE-буфері (89,0 mM Тріс, 89,0 mM борна кислота, 2,0 mM Na₃EDTA) при постійній напрузі 500 В та температурі 60 °С 2-3 години, залежно від довжини фрагментів ампліфікації. Кожні 14 доріжок з пробами ДНК, що тестуються, супроводжувалися зразком ДНК з відомою молекулярною масою. За стандарт молекулярної маси використовували ДНК рUC 19/Msp I та рBlueScript DNA/Msp I. Поліакриламідні гелі фарбували сріблом відповідно до [13].

Відеозображення електрофоретичних спектрів ампліфікованої ДНК отримували у системі відеодокументації “Image Master VDS” (“Amersham Pharmacia Biotech”, Великобританія). Розміри алелів у парах нуклеотидів визначали за допомогою комп’ютерної програми “Image Master 1D Elite”.

Для кластеризації досліджених сортів на основі генетичної схожості дані МС-аналізу представляли в системі С/А (присутність/відсутність алеля з визначеною молекулярною масою), розраховували генетичні дистанції й проводили кластерний аналіз за допомогою програми MEGA [13]. Побудову дендрограми здійснювали методом кластеризації UPGMA, за алгоритмом [15]:

$$NL_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y) = 2n_{11} / (2n_{11} + n_{01} + n_{10})$$

Представлене вище відношення визначає пропорцію смуг, загальних для двох генотипів X і Y, до суми всіх смуг зразків X і Y.

Індекс поліморфності (PIC) розраховували для кожного мікросателітного локусу окремо згідно Botstein et al. [16]: $PIC = 1 - \sum (P_i)^2$, де

P_i — частота i^{th} алеля в популяції.

Комп’ютерний аналіз розмірів та пропорцій зернівок проводили за допомогою програми “ImageJ” 1.42 (National Institutes of Health, США).

Цифрові зображення зернівок отримували на сканері HP ScanJet 3570с. Усі зернівки орієнтували однаково: їх викладали борозенками донизу, щоб зародок знаходився ліворуч. Вимірювали площу проекції зернівки на площину, довжину та ширину зерна, довжину великої та малої вісі зернівок і показник округлості зерна, який визначали за формулою:

$$Cз = 4\pi * Sз / Pз^2,$$

де $Sз$ — площа проекції зерна на площину, $Pз$ — периметр зернівки.

Статистичну обробку рядів даних здійснювали у програмі Excel інструментами обчислення параметрів варіаційної статистики. Дисперсійний аналіз даних проводили, використовуючи процедуру GLM (генеральна лінійна модель) із спеціалізованого програмного комплексу AGROBASE 21 (Agronomics Software Inc., Канада). При цьому використано систему позначення груп достовірності літерами.

Кластерний аналіз за морфометричними параметрами проводили у програмі TREES [18]. Величини евклідової відстані визначали як: $D_{ij} = [S(X_{ki} - X_{kj})^2]^{0.5}$, де D_{ij} — евклідова відстань між i -м і j -м зразками, X_{ki} — значення k -й випадкової змінної для i -го зразка, нормалізоване шляхом обчислення середнього за всіма зразками й поділу на величину стандартного відхилення по всіх зразках.

Результати дослідження та їх обговорення

За даними методу MC-аналізу п'яти локусів у дослідженій вибірці виявлено десять гетерогенних сортів. Загалом виявлено 32 алелі. В середньому на кожен з MC-локусів припадає 5-6 алелів. Менш поліморфними були MC-локуси *Xgwm095-2A* та *Xgwm190-5D*, у кожному з яких визначено по чотири алелі. Алельна різноманітність за мікросателітними локусами досліджених сортів представлена у табл. 3.

Так, досліджені сорти Ліона та Скарбниця (рис. 1), Заможність (рис. 2), Подяка, Запорука, Бунчук є гетерогенними за трьома локусами. У сорту Подяка виявлено сукупності рослин з генотипами, що характеризуються унікальною комбінацією алелів. Для першої групи генотипів це алелі розміром 120 п.н. за локусом *Xgwm095-2A*, 125 п.н. за *Xgwm186-5A*, 193 п.н. за *Xgwm165/1-4D* та 208 п.н. за локусом *Xgwm190-5D*. Друга група представлена алелями 122 п.н. за *Xgwm095-2A*, 135, 139 п.н. за локусом *Xgwm186-5A*, 193 п.н. за *Xgwm165/1-4D* та 210 п.н. за локусом *Xgwm190-5D*. Третя група характеризується наступною комбінацією алелів — 110 п.н., 127, 129 п.н., 193 п.н. та 212 п.н., відповідно до послідовності вказаних локусів. Сорт Місія одеська є гетерогенним за даними двох локусів *Xgwm186-5A* і *Xgwm155-3A*. Гетерогенність сортів Господиня, Єдність та Благодарка одеська визначено лише за одним з тестованих п'яти локусів.

В ході виконання роботи проаналізовано розподіл частот алелів мікросателітних локусів на загальній вибірці 68 тестованих генотипів рослин досліджених сортів. Показники частот алелів за кожним аналізованим локусом і величини індексу поліморфності наведені у табл. 4.

Таблиця 3

Алельна різноманітність за мікросателітними локусами досліджених сортів

№	Сорт	Мікросателітний локус				
		<i>Xgwm186</i> (5A)	<i>Xgwm095</i> (2A)	<i>Xgwm165/1</i> (4D)	<i>Xgwm155</i> (3A)	<i>Xgwm190</i> (5D)
		алелі в п.н.				
1	Господиня	102	122	193; 195	139;141;143	204
2	Скарбниця	113; 139	122	191; 193	145;147;149; 152	208
3	Косовиця	102	122	193	147	208
4	Антонівка	102	122	185; 195	139; 147	208
5	Заможність	123;125;129 135;139;142	122	191;193;195	139; 143	208
6	Благодарка одеська	125	120	189; 193	143	208
7	Місія одеська	123;125; 135;139;142	122	185;193;195	139; 143	208
8	Дальницька	102; 107	120; 122	193	141;143;145	208
9	Єдність	102	120; 122	185; 195	139	208
10	Кірія	102; 129	120; 122	185	141;143;145	208
11	Ліона	113; 129	120; 122	193	139; 143;145;147	208
12	Куяльник	102	122;110	185	139; 143	204
13	Пошана	102; 113; 135	120; 122	193	145;147;149	204
14	Запорука	102; 113;115;125	120	189; 193	139; 145	204; 208
15	Бунчук	123; 125;129	122; 124	185;191;193	139; 143	208
16	Подяка	125; 129; 127; 135; 139	110; 120; 122	193	129; 141	208;210;212
17	Оксана	113;115	122;110	195	139; 149	204
18	Альбатрос одеський	113	122;124	193; 195	143;145;147	204
19	Безоста 1 (1)	102	122;110	195	129;143	204
20	Безоста 1 (2)	102	122;110	195	129;143	204

Показник PIC варіював від 0,55 для локусу *Xgwm190* до 0,87 для *Xgwm186*; найбільшою частотою характеризувався алель 208 п.н. локусу *Xgwm190*, а найменшу частоту мали алелі 107 п.н. та 127 п.н. за локусом *Xgwm186*, а також 152 п.н. за локусом *Xgwm155*.

Важливо підкреслити, що кожен з досліджених сортів був унікально охарактеризований за алелями МС-локусів. При цьому йдеться про сорти, близькі за походженням, біологічними характеристиками і, певним чином, — за морфологією. Навіть відносно проста система, відображена у табл. 4 (5 локусів, загалом 32 алелі), яка далеко не вичерпує можливостей

методу, потенційно дає можливість однозначно ідентифікувати до $11 \times 4 \times 5 \times 8 \times 4 = 7040$ генотипів.

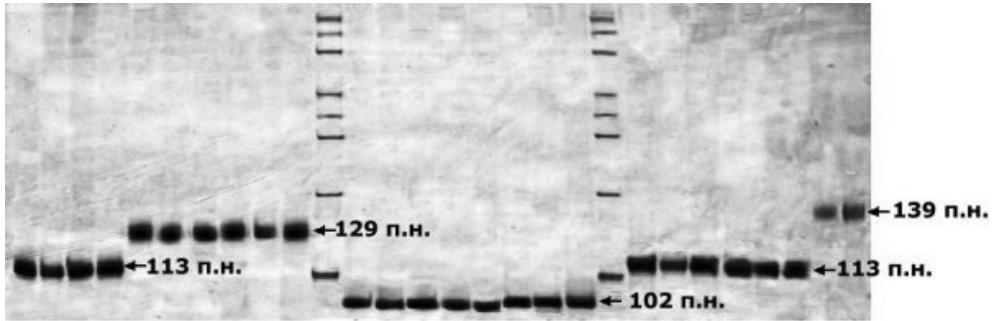


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації в 10 % ПААГ з праймерами до МС-локусу *Xgwm186-5A*

Примітки. Сорти: Альбатрос одеський (1, 2); Ліона (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); Господиня (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18); Скарбниця (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). М — фрагменти ДНК маркеру молекулярної маси рUC 19 / Msp I. Стрілками вказані розміри фрагментів ампліфікації в п.н.

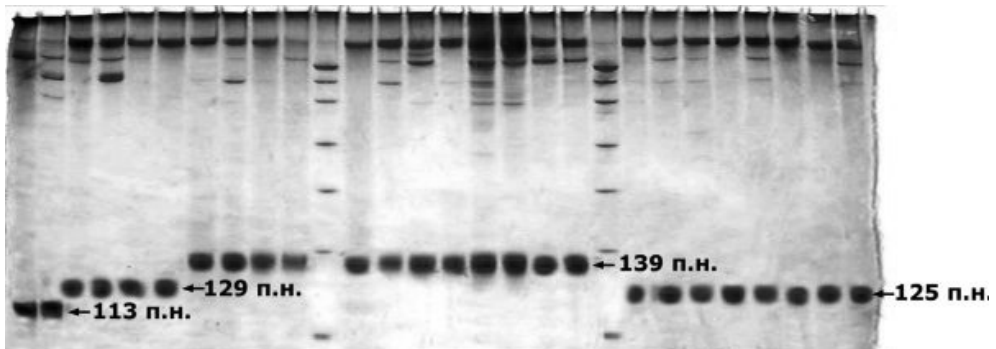


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації в 10 % ПААГ з праймерами до МС-локусу *Xgwm186-5A*

Примітки. Сорти: Альбатрос одеський (1, 2); Заможність (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); Місія одеська (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18); Бунчук (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). М — фрагменти ДНК маркеру молекулярної маси рUC 19 / Msp I. Стрілками вказані розміри фрагментів ампліфікації в п.н.

На рис. 3 представлена кластеризація досліджених сортів на основі розрахованих генетичних дистанцій за даними МС-аналізу.

Як представлено на дендрограмі, всі досліджені сорти, за винятком двох колекційних зразків сорту Безоста 1, які мають однакову МС-характеристику, повністю розділені вже за даними п'яти МС-локусів. Колекційні зразки сорту Безоста 1, як і слід було чекати, на дендрограмі не розділилися, й об'єднані в один субсубкластер із сортом Куюльник з генетичною

дистанцією 0,066. Сорт Куяльник створений складною ступінчастою гібридизацією (Одеська червоноколоса х Ольвія) х Альбатрос одеський з наступним індивідуальним добором елітної родини в F_2 . Сорт Ольвія, що входить до родоходу вищезазначеного сорту Куяльник, має родовід: Безоста 1 (S) / Ред Ривер 68 // Од 51.

Таблиця 4

Частоти алелів досліджуваних МС-локусів та індекс їх поліморфності (PIC)

Мікросателітний локус	Алелі			PIC
	кількість	розміри (п.н.)	частота	
<i>Xgwm186</i>	11	102, 107 113, 115 123, 125, 127, 129, 135, 139, 142	0,26, 0,02, 0,12, 0,10, 0,06, 0,12, 0,02, 0,10, 0,08, 0,08, 0,04	0,87
<i>Xgwm095</i>	4	110, 120, 122, 124	0,15, 0,24, 0,55, 0,06	0,61
<i>Xgwm165/1</i>	5	185, 189, 191, 193, 195	0,18, 0,06, 0,09, 0,40, 0,27	0,72
<i>Xgwm155</i>	8	129, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 152	0,07, 0,22, 0,09, 0,26, 0,15, 0,13, 0,06, 0,02	0,83
<i>Xgwm190</i>	4	204, 208, 210, 212	0,35, 0,57, 0,04, 0,04	0,55

Аналіз розподілу досліджених сортів на дендрограмі виявив один кластер, до якого примикає гетерогенний за даними трьох локусів сорт Подяка з генетичною дистанцією 0,331. Зазначений кластер поділяється на два субкластери, при розгляді яких необхідно відзначити їх складність і значну субкластеризацію.

У першому субкластері, який у свою чергу також поділяється на два субсубкластери, зібрано в основному сучасні сорти м'якої пшениці селекції СГІ-НЦНС, а також два колекційні зразки сорту Безоста 1. Мінімальну генетичну відстань в 0,019 у.о. мають сорти Антонівка і Єдність, що створені групою авторів — Литвиненком М. А., Гончарук Н. О., Пташенчуком О. М. та ін. До відзначених сортів приєднується сорт Косовиця з генетичною дистанцією 0,084, що також був створений у лабораторії Литвиненка М. А.

Сорти Кірія та Дальницька утворюють пару з генетичною дистанцією 0,066. Аналіз родоходів цих сортів показав, що сорт Кірія виведений методом складної ступінчастої гібридизації Обрій х Південна зоря х Лан х Ювілейна 75 з наступним індивідуальним добором елітної родини в F_3 . У свою чергу Дальницька отримана схрещуванням F_1 (Л 2784 х Ер 3484) х Бриз з подальшим добором кращої сім'ї. До цих сортів приєднується з генетичною відстанню в 0,122 у.о. сорт Ліона, який був створений, як і сорт Кірія, групою авторів на чолі з Лифенком С.П. і має родовід: {{Од 16 х (Тр 114 / 65 А х Прибій) х Од. напівкарл.] х (Лерма рохо х Кавказ)} х Альбатрос од.

Сорти Пошана і Альбатрос одеський об'єднані в пару з генетичною дистанцією 0,144, що цілком підтверджується даними аналізу їх родоходів. Так, сорт Пошана виведений методом гібридизації Золотава та Альбатрос одеський з наступним індивідуальним добором елітної родини в F_2 .

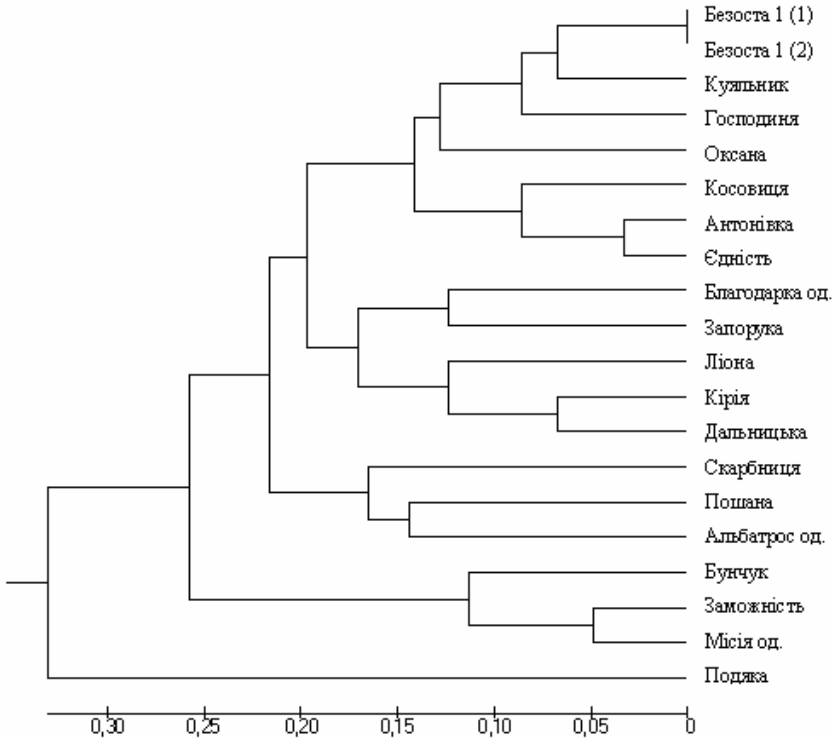


Рис. 3. Кластерний аналіз досліджуваних сортів пшениці за генетичними дистанціями, розрахованими за даними МС-аналізу

Розглядаючи другий субкластер, треба відзначити, що представлені у ньому сорти є гетерогенними за даними декількох локусів. Так, мінімальну генетичну відстань в 0,050 у.о. мають сорти *Заможність* і *Місія одеська*, створені Литвиненком М. А., Гончарук Н. О., Пташенчуком О. М. та ін. Слід відмітити, що сорт *Заможність* є гетерогенним по локусах *Xgwm186-5A*, *Xgwm155-3A* та *Xgwm165/1-4D*, а сорт *Місія одеська* — за локусами *Xgwm186-5A* та *Xgwm155-3A*. До зазначених сортів примикає з генетичною відстанню в 0,113 у.о. сорт *Бунчук*, що гетерогенний щодо локусів *Xgwm186-5A*, *Xgwm155-3A* та *Xgwm095-2A*.

Морфометричні параметри зерна досліджених сортів озимої м'якої пшениці наведено в табл. 5. За параметром площі виділено п'ять груп достовірності, позначених літерами. Сорти *Антонівка* та *Благодарка одеська*, які мають найбільшу площу, належать до групи "а"; *Косовиця*, *Місія одеська*, *Дальницька*, *Куяльник*, *Пошана*, *Подяка*, *Альбатрос одеський* — до "abc"; *Скарбниця*, *Кірія* та два колекційні зразки сорту *Безоста 1* — до "cde"; групу "e" представляє сорт *Єдність*, що характеризується найменшою площею проекції зерна на площину.

За параметром довжини зернівки виділено сім груп достовірності. Досліджений параметр корелює з показником довжини великої вісі зернівки,

Таблиця 5

Характеристика сортів за параметрами розміру зерна

n = 25

№	Сорт	*Sз, мм ²	ГД	Із, мм	ГД	dз, мм	ГД	Sз	ГД	Rз, мм	ГД	гз, мм	ГД
1	Господиня	20,89	ab	7,81	ab	3,59	a	0,676	de	7,61	ab	3,49	abcd
2	Скарбинця	19,30	cde	7,38	cdef	3,55	ab	0,686	cde	7,24	cde	3,40	bcde
3	Косовиця	19,91	abc	7,75	abc	3,50	ab	0,654	f	7,55	abcd	3,35	de
4	Антонівка	21,06	a	7,68	abcd	3,57	ab	0,698	bcd	7,55	abcd	3,52	ab
5	Заможність	19,80	abcd	7,37	def	3,54	ab	0,698	bcd	7,21	cde	3,50	abcd
6	Благодарка одеська	21,05	a	7,74	abc	3,59	ab	0,684	de	7,63	ab	3,52	abc
7	Місія одесь- ка	20,34	abc	7,45	bcdef	3,56	ab	0,716	ab	7,33	bcde	3,53	ab
8	Дальницька	19,99	abc	7,29	ef	3,59	ab	0,722	ab	7,18	e	3,55	a
9	Єдність	18,04	e	6,83	g	3,50	ab	0,726	a	6,70	f	3,43	abcde
10	Кірія	19,31	cde	7,30	ef	3,53	ab	0,694	cde	7,18	e	3,42	abcde
11	Ліона	19,55	bcd	7,27	f	3,54	ab	0,702	bcd	7,18	e	3,47	abcd
12	Куюльник	20,32	abc	7,53	abcdef	3,53	ab	0,696	bcd	7,45	abcde	3,47	abcd
13	Пошана	20,48	abc	7,86	a	3,46	abc	0,674	ef	7,73	a	3,37	cde
14	Запорука	19,68	bcd	7,70	abcd	3,33	cd	0,668	ef	7,61	ab	3,29	ef
15	Бунчук	18,46	de	7,45	bcdef	3,23	d	0,678	de	7,37	bcde	3,19	f
16	Поляка	20,57	abc	7,71	abcd	3,51	ab	0,686	cde	7,57	abc	3,45	abcd
17	Оксана	19,43	cd	7,35	def	3,48	abc	0,703	bcd	7,20	de	3,44	abcd
18	Альбатрос одеський	20,58	abc	7,66	abcde	3,62	a	0,690	cde	7,45	abcde	3,52	abc
19	Безоста 1 (1)	19,24	cde	7,40	cdef	3,45	abc	0,694	cde	7,24	cde	3,38	cde
20	Безоста 1 (2)	19,26	cde	7,50	abcdef	3,42	bc	0,674	ef	7,28	bcde	3,37	de
-	ГС	19,86	-	7,49	-	3,51	-	0,692	-	7,35	-	3,44	-
-	НІР _{0,5}	1,35	-	0,37	-	0,17	-	0,030	-	0,36	-	0,15	-

*Примітки: ГД — групи достовірності, позначені літерами; Sз — площа проекції зерна на площину; Із — довжина зерна; dз — ширина зерна; Сз — округлість зерна; Rз — довжина великої вісі зернівок; гз — довжина малої вісі зернівок; ГС — генеральне середнє; НІР_{0,5} — найменша істотна різниця

за яким виявлено шість груп достовірності, а також з площею проекції зерна на площину. Сорт Єдність з мінімальним показником довжини зернівки належить до групи “g”; сорт Ліона — до “f”; сорт Пошана, що має максимальну довжину зернівки, — до групи “a”.

За шириною зерна досліджено чотири групи достовірності: до першої “a” належать сорти Господиня та Альбатрос одеський; до групи “ab” — Скарбниця, Косовиця, Антонівка, Заможність, Благодарка одеська, Місія одеська, Дальницька, Єдність, Кірія, Ліона, Куяльник та Подяка. Групу “d”, яка характеризується мінімальними показниками ширини зернівки, представляє сорт Бунчук. Досліджений параметр корелює з показником довжини малої вісі зернівки, за яким виявлено шість груп достовірності, а також з величиною округлості зерна.

За округлістю зерна виділено шість груп достовірності. Найбільшою величиною округлості зернівки характеризується сорт Єдність, який належить до групи “a”; найменшою — сорт Косовиця, що відноситься до групи “f”.

За сукупністю показників площі проекції зерна на площину, довжини, ширини, довжини великої і малої вісі зерна й параметром округлості зерна серед досліджених сортів можна виділити три групи, що не розрізняються за дослідженими показниками в межах групи: сорти Подяка, Господиня та Благодарка одеська (група I); сорти Місія одеська та Куяльник (група II); сорти Ліона, Дальницька та Заможність (група III). Названі сорти представлено у табл. 6, кожному дана індивідуальна оцінка щодо окремих рядів досліджуваних показників за допомогою критерію t Ст'юдента.

Для гетерогенних сортів не зафіксовано достовірних відмінностей між групами генотипів, що може бути пов'язано з недостатньою вибіркою зерен для кожного сорту.

Мінімальні відмінності морфометричних параметрів розміру зерна у вказаних в табл. 6. сортів, що вираховані по окремо досліджених показниках, у сукупності все ж дають змогу дослідити дані сорти пшениці за допомогою кластерного аналізу (рис. 4).

При кластерному аналізі досліджених сортів на дендрограмі виявлено один великий кластер, до якого примикає сорт Єдність, що розташований відособлено та має, на відміну від всіх інших сортів, зерно відмінної конфігурації, яке характеризується мінімальними показниками довжини та площі і максимальною величиною округлості. Розглянутий кластер у свою чергу поділяється на два субкластери, які мають складну будову. Два генетично однакові за попередніми даними (рис. 3.) колекційні зразки сорту Безоста 1 виявляли різницю, яка дозволила об'єднати ці сорти на дендрограмі з дистанцією 1,856, яка перевищує мінімальну досліджену дистанцію 0,516 у.о. між сортами Господиня та Благодарка одеська за морфометричними параметрами. Обидва колекційні зразки сорту Безоста 1 мають майже однакові показники морфометричних параметрів розміру зерна та відносяться до одних розмірних груп за цими параметрами. Виявлена достатньо велика дистанція між ними може відображати вплив умов вирощування при культивуванні на полях СГІ-НЦНС. Як наслідок, можна

вважати, що порівняльна характеристика сортів пшениці на підставі вивчення лише їх насіння недостатньо надійна.

Таблиця 6

Характеристика сортів, що не диференціюються в межах групи за параметрами розміру зерна

n = 25

Група	Сорт	*Sз, мм ²	lз, мм	dз, мм	Sз	Rз, мм	гз, мм
I	Подяка	20,57 ± 2,89	7,71 ± 0,80	3,51 ± 0,29	0,686 ± 0,049	7,57 ± 0,85	3,45 ± 0,23
	Господиня	20,89 ± 0,76	7,81 ± 0,22	3,59 ± 0,06	0,676 ± 0,029	7,61 ± 0,20	3,49 ± 0,05
	Благодарка одеська	21,05 ± 2,01	7,74 ± 0,24	3,59 ± 0,29	0,684 ± 0,051	7,63 ± 0,18	3,51 ± 0,29
II	Місія одеська	20,34 ± 0,60	7,45 ± 0,40	3,56 ± 0,09	0,716 ± 0,029	7,33 ± 0,30	3,53 ± 0,09
	Куяльник	20,32 ± 1,61	7,53 ± 0,34	3,53 ± 0,14	0,696 ± 0,023	7,45 ± 0,35	3,47 ± 0,14
III	Ліона	19,55 ± 1,85	7,27 ± 0,36	3,54 ± 0,22	0,702 ± 0,033	7,18 ± 0,37	3,47 ± 0,20
	Дальницька	19,99 ± 0,96	7,29 ± 0,40	3,59 ± 0,10	0,722 ± 0,028	7,18 ± 0,27	3,53 ± 0,09
	Заможність	19,80 ± 0,62	7,37 ± 0,14	3,54 ± 0,10	0,698 ± 0,018	7,21 ± 0,19	3,50 ± 0,12

*Примітки: наведені $\bar{x} \pm t * S\bar{x}$ — середні величини та їх довірчі інтервали; Sз — площа проекції зерна на площину; lз — довжина зерна; dз — ширина зерна; Sз — округлість зерна; Rз — довжина великої вісі зернівок; гз — довжина малої вісі зернівок.

Ряд сортів — Антонівка та Альбатрос одеський, а також Місія одеська і Дальницька утворюють пари відповідно з дистанціями 0,980 та 1,031 у.о. Розглянуті сорти створено Литвиненком М.А., Гончарук Н.О., Пташенчуком О.М. та ін, тому, можливо, вони є близькими за біологічними характеристиками і певним чином — за морфологією.

Розглянуті у табл. 6 сорти Господиня та Благодарка одеська, які достовірно не розрізняються від сорту Подяка за дослідженими показниками в межах групи I, об'єднано на дендрограмі в один субкластер з мінімальною дистанцією 0,516. Розглядаючи великий субкластер А, зазначимо, що сорт Подяка, об'єднаний з сортом Куяльник з дистанцією 1,134, все ж входить до його складу. Сорти Місія одеська і Куяльник, що належать до II групи сортів, що достовірно не розрізняються між собою, не згруповані на дендрограмі. Місія одеська утворює пару з сортом Дальницька з дистанцією 1,031. Проте, розглядаючи більший за розміром субкластер В, можна сказати, що ці сорти входять все ж до одного великого субкластеру. Сорти Ліона і Заможність, які достовірно не розрізняються з сортом Дальницька за дослідженими показниками в межах групи III, об'єднано на дендрограмі в один субкластер з дистанцією 0,619, і разом з сортом Дальницька входять до єдиного більшого за розміром субкластеру С.

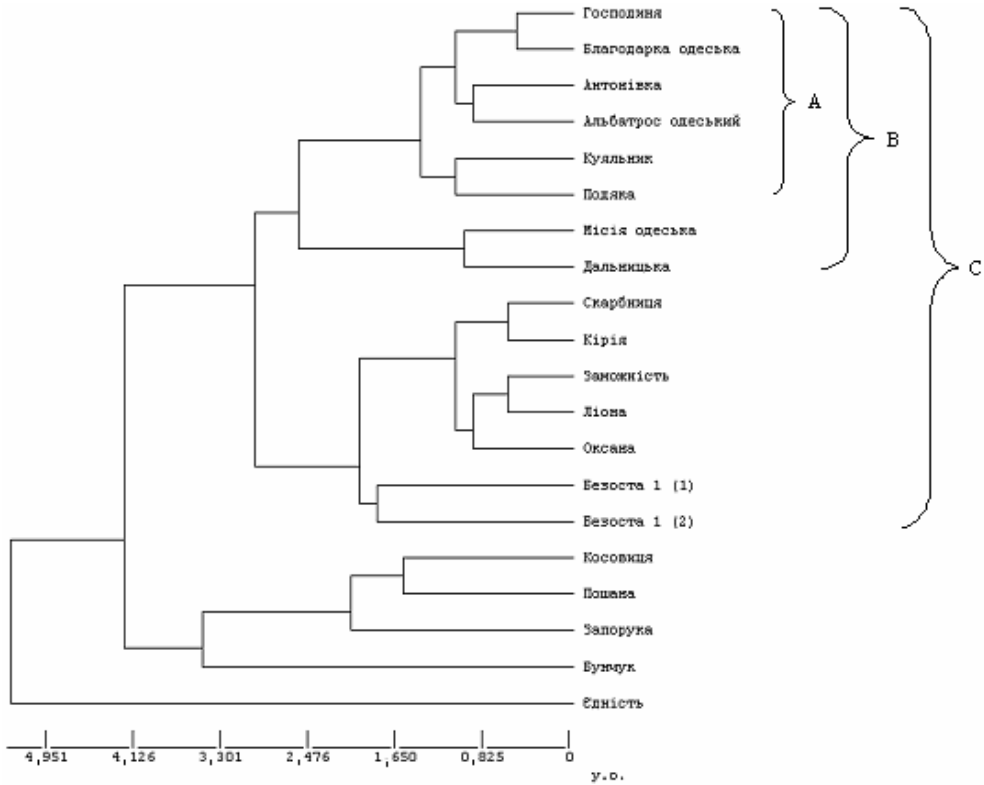


Рис. 4. Кластерний аналіз сортів пшениці за сукупністю морфометричних характеристик зерен

Висновки

В результаті проведеної роботи з'ясовано, що сумісне застосування двох систем опису об'єкта, а саме мікросателітного аналізу й комп'ютерного аналізу морфометричних параметрів розміру зерна, дозволяє більш повно характеризувати сорти м'якої пшениці. ДНК-технологія мікросателітного аналізу дозволяє більш чітко ідентифікувати досліджені сорти пшениці за унікальною комбінацією алелів МС-локусів, а також дає можливість виявити багатолінійність й гетерогенність сортів, на відміну від аналізу морфометричних параметрів розміру зерна. Останній дозволяє ранжувати варіацію морфометричних показників зерна, але не дає змоги однозначно охарактеризувати генотип, диференціювати його від інших та ідентифікувати. Можливо, причинами цього є варіація умов вирощування, а також замала кількість визначених у наших дослідженнях морфометричних характеристик зерна. Таким чином, метод диференціації за аналізом морфометричних параметрів розміру зерна має свої обмеження і очевидно потребує доповнень з боку більш специфічних методів.

Список літератури

1. *Волкодав В. В.* Правова охорона сортів рослин в Україні // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. — 2005. — № 1. — С. 98-109.
2. *Ажаман І. А.* Сучасний стан і перспективи розвитку ринку насіння озимих зернових культур // Економіка АПК. — 2004. — № 5. — С. 126-131.
3. *UPOV.* Guidelines for the conduct of tests for Distinctness, Uniformity and Stability. Wheat. TG/3/11 Corr. 1996-10-18.
4. *Литвиненко М. А., Ванін В. А.* Результати оцінки вітчизняних сортів озимої м'якої пшениці за DUS-тестом // Аграрний вісник Причорномор'я. — 2001. — Вип. 12. — С. 91-98.
5. *Сиволап Ю. М., Топчиева Е. А., Чеботарь С. В.* Идентификация и паспортизация сортов мягкой пшеницы методами RAPD- и SSRP-анализа // Генетика. — 2000. — Т. 36, № 1. — С. 44-51.
6. *Использование ПЦР анализа в генетико-селекционных исследованиях* / Под ред. Ю. М. Сиволапа. Научно-методическое руководство. — К.: Аграрна наука, 1998. — С. 8-33.
7. *Pietrzak L. N., Fulcher R. G.* Polymorphism of oat kernel size and shape in several Canadian oat cultivars // Can. J. Plant. Sci. — 1995. — Vol. 75, N 1. — P. 105-109.
8. *Sapirstein H. D.* Varietal identification by digital image analysis. In Wrigley C.W. (Ed.) Identification of food-grain varieties // American association of Cereal Chemists Inc. St. Paul. MN. — 1995. — P. 91-130.
9. *Цеема В. М., Хохлов О. М.* Інструментальне визначення сортоспецифічних характеристик кольору зерна пшениці // Зб. наук. праць СГІ. — 2007. — Вип. 10. (50). — С. 116-135.
10. *Цеема В. М., Хохлов О. М.* Морфометрична характеристика зерен пшениці засобами "машинного бачення" (у друку) // Зб. наук. праць СГІ. — 2009. — Вип. 14 (54). — С. 186-193.
11. *Grain morphometric characterisation of genetically related wheat selections using image analysis* / Bhagwat S. G., Sainis J. K., Shouche S. P. et al. // Cereal Res. Com. — 2003. — Vol. 31. — P. 205-212.
12. *Каталог сортів та гібридів зернових, зернобобових, олійних, кормових культур* Селекційно-генетичного інституту. — О., 2008. — 178 с.
13. *Technical manual.* GenePrint® STR Systems (Silver Stain Detection). Promega Corporation, 2001. — 47 p.
14. *Mega: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences* / Kumar S., Dudley J., Nei M. et al. // Briefings in Bioinformatics. — 2008. — Vol. 9, № 4. — P. 299-306.
15. *Nei M., Li W.-H.* Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76, N 10. — P. 5269-5273.
16. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms* / Botstein D., White R. L., Skolnick M. et al. // Am J Hum Genet. — 1980. — Vol. 32 (3). — P. 314-315.
17. *A Microsatellite Map of Wheat* / Röder M. S., Korzun V., Wendehake K. et al. // Genetics. — 1998. — № 149. — P. 2007-2023.
18. *Календарь Р. Н.* Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков // Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений: Тез. докл. — Киев, 1994. — С. 25-26.

О. А. Колесник^{1,2},

С. В. Чеботарь², канд. биол. наук, ст. научный сотрудник

А. Н. Хохлов³, канд. сель.-хоз. наук, зав. отдела

Ю. М. Сиволап², д-р биол. наук, проф., акад., директор

¹ Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

² Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,

Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина

³ Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноводства и сортоизучения УААН

Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина

e-mail: sabina-chebotar@rambler.ru

ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА И КОМПЬЮТЕРНОГО АНАЛИЗА МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЗЕРНА

Резюме

Для комплексной характеристики 17 современных сортов озимой мягкой пшеницы селекции СГИ-НЦНС определяли аллельный состав по пяти микросателлитным локусам и величину шести морфометрических показателей зерна. Микросателлитный анализ позволяет четко и уникально идентифицировать исследованные сорта: в том числе — многолинейные. Компьютерный анализ цифровых изображений зерна позволяет получить детальную морфометрическую характеристику, на основе которой можно провести относительное разделение сортов на группы, однако не способен однозначно идентифицировать генотипы. Поскольку два метода имеют разную природу, их общее применение обеспечивает более полную характеристику сортов.

Ключевые слова: пшеница, микросателлитный анализ, полиморфизм ДНК, параметры размера зерна.

O. Kolesnik^{1,2}, S. Chebotar², A. Khokhlov³, Yu. Sivolap²

¹ Mechnykov Odesa National University
Dvoryanska Str., 2, Odessa, 65026, Ukraine

² South Plant Biotechnology Center UAAS
Ovidiopolska doroga Str., 3, 65036 Odessa, Ukraine

³ Plant Breeding and Genetic Institute UAAS
Ovidiopolska doroga Str., 3, 65036 Odessa, Ukraine
e-mail: sabina-chebotar@rambler.ru

**DIFFERENTIATING ABILITY OF WHEAT VARIETY
IDENTIFICATION METHODS USING MICROSATELLITE ANALYSIS
AND COMPUTER ANALYSIS OF THE GRAIN MORPHOMETRIC
PARAMETERS**

Summary

To characterize 17 modern winter soft wheat varieties of PBGI of UAAS breeding the allelic composition of five microsatellite loci was determined parameters instead “indicators” and the values of the six morphometric grain parameters were measured. The microsatellite analysis allows to identify the investigated varieties, including multilinear ones, accurately and uniquely. The computer analysis of digital grain images allows to obtain detailed morphometric characteristic on the basis of which it is possible separate varieties into groups, however this method is not able to identify genotypes unequivocally. As the both methods have different nature, their general applying provides more complete characteristic of the investigated varieties.

Key words: wheat, microsatellite analysis, DNA polymorphism, parameters of the grain size.