

УДК 633.11[575::576+581.821.1+577.2]

ЗВ'ЯЗОК SSR-МАРКЕРІВ З ВАРІЮВАННЯМ ЩІЛЬНОСТІ РОЗМІЩЕННЯ ПРОДИХІВ У М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Н.П. ЛАМАРІ, М.В. ГАЛАЄВА, В.І. ФАЙТ, О.О. ПОГРЕБНЮК

*Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3
e-mail: n.p.lamari@gmail.com*

Досліджували наявність асоціацій між алельними відмінностями мікросателітних локусів (SSR) і генетичним поліморфізмом за ознакою «щільність розміщення продихів» (ЩРП) рекомбінантно-інбредних ліній (РІЛ) озимої м'якої пшениці. Цитологічний аналіз продихів епідермісу листка, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) і статистичні розрахунки виконували за загальноприйнятими методиками. Виявлено генетичне різноманіття за ознакою ЩРП у популяції РІЛ пшениці F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса. Відмічено високовірогідний ($P \leq 0,01$) рівень залежності варіювання ЩРП генотипів популяції РІЛ від алельного складу локусу *Xbarc330-5A*, встановлено вірогідність впливу алельних відмінностей SSR-локусів у дев'яти потрійних поєднаннях мікросателітних локусів на варіювання ЩРП. Обґрунтовано використання одного з восьми потрійних поєднань SSR-маркерів для маркування генів, що детермінують підвишену ЩРП.

Ключові слова: м'яка пшениця, SSR-локуси, продихи, щільність продихів.

Продихи — одна з важливих анатомо-морфологічних структур рослини, що забезпечує газообмін між навколишнім середовищем і клітинами мезофілу, а функціонування останніх великою мірою визначає життєдіяльність рослин. Залежно від виду рослин та екологічних умов їх вирощування продихи займають від 0,5 до 5 % епідермісу листка, найбільше їх на нижній (абаксіальній) поверхні, а ЩРП змінюється від 5 до 1000 на 1 мм². Кількість, розміщення і морфологія продихів на поверхні листкових пластинок — важливий показник адаптації рослин. Зокрема, зміна ЩРП може істотно впливати на ефективність використання води [16], інтенсивність фотосинтезу [13], резистентність до захворювань [11]. Морфогенез продихового апарату рослин залежить як від внутрішніх чинників — метамерної приналежності, ділянки і поверхні листка (абаксіальна чи адаксіальна) [1, 22], так і від дії різних стресорів навколишнього середовища — сольовий стрес [21], посуха [23], водний дефіцит [19] тощо. Генотипне різноманіття за ЩРП, вірогідні значення коефіцієнтів генотипної кореляції її з морозостійкістю ідентифікують цю ознаку як зумовлену генотипом та як показник морозостійкості [8, 17].

Згідно з літературними даними, на відмінності генотипів пшениці за ЩРП впливають кілька хромосом. Зокрема встановлено негативний

вплив на щільність продихів хромосоми 6В. У моносомних ліній ярої пшениці сорту Опал збільшення цього показника пов'язане з хромосомами 7А і 4D [4].

Виявлення ефектів головних генів, що роблять основний внесок у формування цієї кількісної ознаки, дуже важливе як з наукового, так і з господарського погляду, а створення маркерів до таких локусів відкриє шлях до прогнозування і маркерного добору генотипів з оптимальними значеннями ЩРП. Сьогодні для аналізу геному пшениці часто використовують SSR-, ISBP- і SNP-маркери [20]. Перевага SSR-маркерів полягає у високому рівні поліморфізму через велике число алелів в одному локусі (ISBP і SNP — біалельні) і стабільність отриманих результатів. Серед шляхів маніпулювання генетичною мінливістю важливими є методи молекулярного маркування локусів кількісних ознак — QTL (quantitative trait loci), що становлять головний інтерес сучасного молекулярного підходу до селекції полігенних ознак, у тому числі маркер-опосередкованої селекції — MAS (marker assisted selection) [18]. Найпотужнішим засобом маркування локусів кількісних ознак є аналіз наборів рекомбінантно-інбредних ліній [14], що дає змогу оцінити зв'язки між ознаками з урахуванням можливих генетичних взаємодій [12].

Метою нашої роботи було виявлення асоціацій між алельним складом мікросателітних маркерів (SSR-) і рівнем генетичного поліморфізму за ознакою ЩРП у популяції рекомбінантно-інбредних ліній озимої м'якої пшениці.

Методика

Вихідним матеріалом були 2 батьківські сорти і 98 РІЛ F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса, створені у відділі загальної та молекулярної генетики Селекційно-генетичного інституту—Національного центру насіннезнавства та сортовивчення [9]. Насіння РІЛ і батьківських сортів висіяли восени 2015 р. (5 жовтня) на п'ятирядкових ділянках завдовжки 1 м з площею живлення окремої рослини 30 × 5 см². Розміщували варіанти рендомізованими блоками в десятиразовій повторності.

Для цитологічного дослідження готували препарати епідермісу із середньої частини абаксальної поверхні пластинки повністю сформованого у польових умовах третього листка. Кількість продихів на певній площі підраховували з використанням сітчастого окуляр-мікрометра зі збільшенням ×7 мікроскопа «Биолам Л-211» відповідно до загальноприйнятої методики [10]. У мікрометри площу квадратів сітки окуляр-мікрометра перерахували за допомогою об'єкт-мікрометра визначенням (у мікрометрах квадратних) площі сітки окуляр-мікрометра за збільшення об'єктива ×10. Значення площі (0,8 мм²) слугувало постійним коефіцієнтом для цього збільшення, на який ділили підраховану кількість продихів, щоб отримати ЩРП на одиницю площі листка. Для характеристики одного генотипу долучили сто значень ЩРП (повторень), отриманих на препаратах з епідермісу листків десяти рослин.

Для аналізу зв'язку між алельним складом певного SSR-локусу та варіабельністю ЩРП залучили результати молекулярно-генетичного (алельні відмінності) аналізу 14 поліморфних мікросателітних маркерів 5-ї групи хромосом, за якими були виявлені відмінності між батьківськими сортами та ідентифіковані РІЛ F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса, що описані в наших попередніх дослідженнях [2, 3].

Залежно від невідповідності чи відповідності даних нормальному розподілу, встановленому за допомогою λ -критерію Колмогорова—Смирнова [5], подальші розрахунки вели параметричними й непараметричними методами. У першому випадку вірогідність і ступінь впливу як одного, так і потрібної комбінації алелів оцінювали відповідно за допомогою параметричного критерію Стьюдента та однофакторного дисперсійного аналізу [7]. Якщо розподіл експериментальних даних відрізнявся від нормального, вплив незалежної змінної (фактора) на залежну змінну вивчали з використанням Н-критерію Краскела—Уолліса (Kruskal—Wallis test), що є непараметричною альтернативою однофакторному дисперсійному аналізу; значущість відмінностей між двома незалежними вибірками оцінювали за U-критерієм Манна—Уїтні (Mann—Whitney U-test). Число всіх можливих поєднань SSR-локусів, що складалось із n -різних локусів по k , які відрізнялися хоча б одним із них, обчислювали за формулою

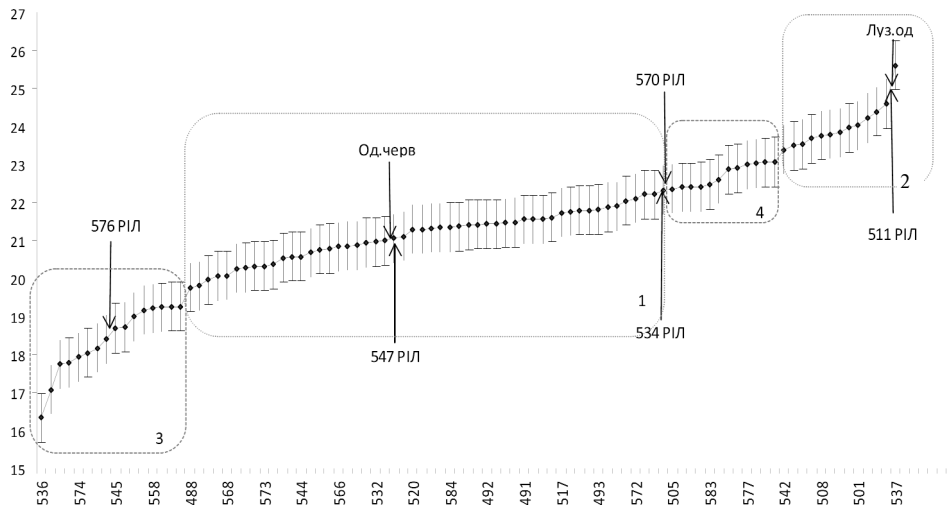
$$C_k^n = \frac{n!}{k!(n-k)!}$$

де C — число поєднань локусів; n — загальне число SSR-локусів; k — число локусів у поєднанні.

Наявність зчеплень між локусами окремих хромосом оцінили на основі порогового значення відношення правдоподібності логарифма шансів LOD-score (logarithm of odds) [6]. LOD розраховували з використанням програмного забезпечення JoinMap (версія 4.1) (знаходиться у вільному доступі). Параметри $\text{LOD} \geq 3,0$ ($P < 0,001$) і $\text{LOD} > 2,5$ ($P < 0,01$) [15] свідчили про зчеплене успадкування локусів.

Результати та обговорення

Варіювання λ -критерію Колмогорова—Смирнова ЩРП 93 РІЛ від 0,065 (РІЛ 496 і 556) до 0,135 (РІЛ 518) свідчило як про відповідність розподілів останніх за цією ознакою нормальному ($\lambda_{0,05} = 0,136$; $n = 100$), так і про правомірність застосування параметричних критеріїв для подальших розрахунків у цій вибірці РІЛ. Розподіл значень ознаки решти (п'яти) РІЛ (№ 511, 534, 547, 570, 576) та обох батьківських сортів Лузанівка одеська й Одеська червоноколоса відрізнялись від нормального (відповідно за $P \leq 0,01$ і $P \leq 0,05$). Розмах варіювання за ЩРП популяції РІЛ становив 9,3 шт/мм² (рисунок) — від 16,3 до 25,6 шт/мм² (відповідно 536 і 537 РІЛ). Розміщення на графіку медіан ЩРП п'яти РІЛ і батьківських сортів, розподіл ЩРП, яких відрізнявся від нормального, позначено стрілками. За результатами однофакторного дисперсійного аналізу встановлено високозначущий вплив фактора «гено-тип» на варіабельність 93 РІЛ за цією ознакою ($F = 16,24$, де $F_{0,01} = 1,49$; $df = 92$, $df_{\text{залишку}} = 9207$), значення ЩРП яких підпорядковане нормальному розподілу. В свою чергу, істотність відповідного впливу цього фактора на варіювання ЩРП усєї популяції РІЛ оцінили за результатами Н-критерію Краскела—Уолліса ($H = 1343,40$; $k = 98$). Оскільки число порівнюваних груп перевищило 3, а кількість спостережень у кожній групі перевищила 5, розраховане значення тестової статистики H порівнювали з критичним значенням (χ^2) Пірсона, так як розподіл H



Середні значення та найменша істотна різниця (НІР) ознаки «щільність розміщення продохів» вибірки рекомбінантно-інбредних ліній та їхніх батьківських сортів (Од. чер. — Одеська червоноколоса, Луз. од. — Лузанівка одеська)

близький до такого χ^2 із числом ступенів свободи $df = k - 1 = 97$, де k — число груп.

За вірогідності розбіжностей між ЩРП РІЛ на високому рівні значущості ($\chi^2_{0,01} = 75,28$) встановлено істотний вплив фактора «генотип» на варіабельність ознаки у популяції з 98 РІЛ. Значення медіани ЩРП батьківських сортів Одеська червоноколоса і Лузанівка одеська, що дорівнювали відповідно 21,0 і 24,7 шт/мм², відрізнялись на високому рівні вірогідності ($U = 3646,0$; $p = 0,001$; $n = 100$). Від значень РІЛ 529 і РІЛ 526 (відповідно 21,0 і 24,6 шт/мм²) — близьких до значень батьківських сортів Одеська червоноколоса та Лузанівка одеська — достовірно не відрізнялись ($\text{НІР}_{0,05} = 1,30$ шт/мм²) за цією ознакою — 53 і 14 % РІЛ відповідно, на рисунку окреслені прямокутниками 1 і 2, що в сумі становило лише 67 % загальної кількості ліній, оскільки ЩРП решти РІЛ були відмінними від таких обох батьківських сортів. За відсутності РІЛ із більшою ЩРП, ніж у сорту Лузанівка одеська, виявлено дві групи РІЛ з меншою ЩРП порівняно як з обома сортами, так і з сортом Лузанівка одеська окремо (17 і 14 % відповідно, прямокутники 3 і 4 на рисунку). Звідси можна припустити, що реалізація у фенотипі нижчої і вищої ЩРП детермінована кількома полімерними генами з кумулятивним типом взаємодії, за яким прояв ознаки залежить від сумарної дії генів: чим більше алелів, тим вищий ступінь прояву ознаки, тобто у генотипах сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса є як максимальна в цій комбінації схрещування, так і більша за чисельністю група алелів, що зумовлюють прояв у фенотипі як вищої, так і нижчої ЩРП.

Стосовно відповідності середньоарифметичних величин і медіан ЩРП вивченої вибірки РІЛ нормальному розподілу ($\lambda = 0,070$, $\lambda_{0,05} = 0,136$) для встановлення вірогідності впливу алеля окремого SSR-локусу на варіабельність РІЛ за ЩРП використали критерій Стюдента для незалежних вибірок. В табл. 1 наведено кількості лише гомозигот-

ТАБЛИЦЯ 1. Розмір ДНК-фрагментів, кількість та середні значення ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$) щільності розміщення продинів генотипів рекомбінантно-інбредних ліній — носіїв різних алелів мікросателітних локусів від сортів Лузанівка одеська (L) та Одеська червоноколоса (O)

SSR-локуси	Розмір ДНК-фрагмента, пн		Кількість РІЛ		$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, шт/мм ²		t
	L	O	L	O	L	O	
<i>Xbarc117-5A</i>	224	230	45	47	21,4±0,27	21,3±0,28	0,37
<i>Xbarc319-5A</i>	218	206	52	42	21,2±0,26	21,4±0,29	-0,74
<i>Xbarc330-5A</i>	104	106	54	43	20,9±0,27	21,9±0,27	-2,64**
<i>Xgwm156-5A</i>	311	290	49	47	21,3±0,26	21,3±0,29	0,21
<i>Xwmc75-5B</i>	210	190	48	46	21,3±0,28	21,3±0,26	0,13
<i>Xbarc89-5B</i>	130	124	55	43	21,4±0,27	21,2±0,28	0,38
<i>Xwmc415-5B</i>	174	172	47	51	21,6±0,29	21,0±0,24	1,61
<i>Xgwm3191-5B</i>	178	236	52	46	21,5±0,28	21,0±0,25	1,34
<i>Xcfd7-5B</i>	194	Null*	53	43	21,4±0,27	21,1±0,27	0,75
<i>Xbarc4-5B</i>	180	158	54	42	21,5±0,26	21,1±0,29	1,01
<i>Xbarc88-5B</i>	84	80	55	41	21,4±0,26	21,2±0,30	0,61
<i>Xcfd8-5D</i>	160	162	43	51	21,4±0,29	21,2±0,26	0,51
<i>Xgwm182-5D</i>	165	162	50	44	21,5±0,26	21,1±0,27	1,13
<i>Xbarc322-5D</i>	224	230	40	53	21,6±0,27	21,1±0,27	1,57

*Null — відсутність фрагмента ампліфікації (нуль-алель); ** — вірогідно за $P \leq 0,01$.

них генотипів — носіїв алелів від сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса. Для кожного окремого локусу кількість ліній варіювала від 92 до 98, що пов'язано з виключенням з аналізу гетерозиготних ліній. Порівняльним аналізом середніх значень ЩРП двох груп ліній — носіїв альтернативних алелів по кожному з 14 поліморфних SSR-локусів сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса виявлено вірогідні алельні відмінності ($t > t_{0,05}$) за одним із них *Xbarc330-5A*. Встановлено високівірогідне ($P \leq 0,01$) збільшення ЩРП у генотипу РІЛ з алелем 106 пн (21,9 шт/мм²) цього локусу порівняно з таким носієм алеля 104 пн (20,9 шт/мм²), що походить від сортів Одеська червоноколоса і Лузанівка одеська відповідно. Аналогічну тенденцію ($P \geq 0,05$) щодо підвищення ЩРП залежно від походження алелів виявлено також за локусом *Xbart319-5A* — від 21,2 до 21,4 шт/мм² у генотипів з алелями 206 і 218 пн відповідно. За двома SSR-маркерами (*Xgwm156-5A*, *Xwmc75-5B*) встановлено однакові ЩРП (21,3 шт/мм²) для обох генотипів, носіїв альтернативних алелів, за рештою локусів — тенденцію до зменшення ЩРП у генотипів з алелями, що походять від сорту Одеська червоноколоса.

Із використанням 75 РІЛ, гомозиготних за усіма SSR-локусами, оцінили істотність впливу як поєднань трьох різних локусів, так і комбінацій алелів на варіабельність ЩРП. Вибір кількості локусів у комбінації, спільна дія яких асоційована з варіюванням генотипів РІЛ за ЩРП, зумовлений наявністю відмінностей між сортами за трьома парами неалельних генів із кумулятивним типом взаємодії [19]. На підставі вірогідності критерію Фішера, розрахованого в однофакторному дисперсійному комплексі, виявили істотність впливу на варіабельність ЩРП популяції РІЛ дев'яти потрібних поєднань SSR-

ТАБЛИЦА 2. Статистические величины цитальности размещения продуктив генотипов в зависимости от комбинации аллелей по трем локусам SSR-локусов

Показатель	Комбинации аллелей за происхождениям дельты по трем локусам										F	НПР	
	LLL ¹	LLO	LOL	LOO	OLL	OLO	OOL	OOO ²					
№ 1 (<i>Xgwm3191-5B Xgwm182-5D Xbarc322-5D</i>)													
пш	178+165+224	178+165+230	178+162+224	236+162+230	236+165+224	236+165+230	236+162+224	236+162+224	236+162+230	236+162+224	236+162+230	2,22 ³	1,73
\bar{X}	22,5±0,47	21,1±0,54	20,3±0,66	21,8±0,47	21,6±0,49	21,3±0,57	21,3±0,57	21,3±0,57	20,0±0,54	21,3±0,57	20,0±0,54		
n	12	9	6	12	11	8	8	8	9	8	9		
№ 2 (<i>Xgwm156-5A Xwmc415-5B Xbarc4-5B</i>)													
пш	160+174+180	160+174+158	160+172+180	160+172+158	162+174+180	162+174+158	162+172+180	162+172+180	162+172+158	162+172+180	162+172+158	2,19 ³	1,73
\bar{X}	22,1±0,42	24,1±1,14	21,9±0,81	20,7±0,42	21,3±0,42	21,6±0,81	20,2±0,57	20,2±0,57	21,3±0,47	20,2±0,57	21,3±0,47		
n	15	2	4	15	15	4	8	8	12	8	12		
№ 3 (<i>Xgwm156-5A Xwmc415-5B Xbarc88-5B</i>)													
пш	311+174+84	311+174+80	311+172+84	311+172+80	290+174+84	290+174+80	290+172+84	290+172+84	290+172+80	290+172+84	290+172+80	2,41 ³	1,71
\bar{X}	21,3±0,41	24,0±0,92	21,3±0,61	20,8±0,41	22,0±0,40	21,7±1,13	19,9±0,65	19,9±0,65	21,4±0,48	19,9±0,65	21,4±0,48		
n	15	3	7	15	16	2	6	6	11	6	11		
№ 4 (<i>Xgwm156-5A Xwmc415-5B Xbarc4-5B</i>)													
пш	311+174+180	311+174+158	311+172+180	311+172+158	290+174+180	290+174+158	290+172+180	290+172+180	290+172+158	290+172+180	290+172+158	2,94 ⁴	1,68
\bar{X}	21,3±0,40	24,0±0,91	21,5±0,59	20,7±0,40	22,1±0,40	20,8±0,91	19,7±0,70	19,7±0,70	21,3±0,45	19,7±0,70	21,3±0,45		
n	15	3	7	15	15	3	5	5	12	5	12		
№ 5 (<i>Xgwm156-5A Xwmc415-5B Xbarc89-5B</i>)													
пш	311+174+130	311+174+124	311+172+130	311+172+124	290+174+130	290+174+124	290+172+130	290+172+130	290+172+124	290+172+130	290+172+124	2,44 ³	1,71
\bar{X}	21,3±0,41	24,0±0,92	21,6±0,72	20,8±0,39	22,0±0,40	21,6±1,13	20,0±0,65	20,0±0,65	21,3±0,48	20,0±0,65	21,3±0,48		
n	15	3	5	17	16	2	6	6	11	6	11		

Закінчення табл. 2

Показ- ник	Комбінації алейв за походженням дев'яти порційних поєдань локусів										F	НІР
	LLL ¹	LLO	LOL	LOO	OLL	OLO	OOL	OOO ²				
№ 6 (<i>Xbare117-5A Xwmc415-5B Xbare88-5B</i>)												
пш	224+174+84	224+174+80	224+172+84	224+172+80	230+174+84	230+174+80	230+172+84	230+172+80	230+172+84	230+172+80	230+172+80	230+172+80
\bar{X}	21,2±0,39	24,0±0,92	21,3±0,65	20,9±0,44	22,2±0,43	21,7±1,13	20,2±0,60	21,2±0,44	20,2±0,60	21,2±0,44	21,2±0,44	2,46 ³
n	17	3	6	13	14	2	7	13	7	13	13	1,71
№ 7 (<i>Xbare117-5A Xwmc415-5B Xbare4-5B</i>)												
пш	224+174+180	224+174+158	224+172+180	224+172+158	230+174+180	230+174+158	230+172+180	230+172+158	230+172+180	230+172+158	230+172+158	3,05 ⁴
\bar{X}	21,2±0,38	24,0±0,90	21,5±0,64	20,7±0,43	22,4±0,43	20,8±0,90	20,0±0,64	21,2±0,42	20,0±0,64	21,2±0,42	21,2±0,42	1,67
n	17	3	6	13	13	3	6	14	6	14	14	
№ 8 (<i>Xbare117-5A Xwmc415-5B Xbare89-5B</i>)												
пш	224+174+130	224+174+124	224+172+130	224+172+124	230+174+130	230+174+124	230+172+130	230+172+124	230+172+130	230+172+124	230+172+124	2,65 ³
\bar{X}	21,2±0,38	24,0±0,92	21,6±0,71	20,8±0,42	22,2±0,42	21,6±1,12	20,0±0,65	21,2±0,42	20,0±0,65	21,2±0,42	21,2±0,42	1,70
n	17	3	5	14	14	2	6	14	6	14	14	
№ 9 (<i>Xbare117-5A Xbare330-5A Xbare4-5B</i>)												
пш	224+104+180	224+104+158	224+106+180	224+106+158	230+104+180	230+104+158	230+106+180	230+106+158	230+106+180	230+106+158	230+106+158	2,26 ³
\bar{X}	21,2±0,43	20,6±0,47	21,4±0,54	23,6±0,81	20,9±0,51	21,3±0,66	22,5±0,54	21,1±0,49	22,5±0,54	21,1±0,49	21,1±0,49	1,72
n	14	12	9	4	10	6	9	11	9	11	11	

Примітка: L¹ — алей сорту Лузанівка одеська; O² — алей сорту Одеська червоноколоса; ^{3, 4} — вірогідно відповідно при $P \leq 0,05$ і $P \leq 0,01$.

локусів із 364 можливих (табл. 2). Логічно припустити, що в місці локалізації цих локусів знаходяться гени, що впливають на ЩРП.

У кожному з дев'яти поєднань локусів виявлено вісім груп генотипів (від 2 до 17 ліній у кожній), що характеризувались власною аallelною комбінацією мікросателітних локусів. Найчисленнішими за кількістю РІЛ (17 ліній) були три генотипи, що є носіями у потрійних поєднаннях локусів *Xbarc117-5A Xwmc415-5B Xbarc88-5B*, *Xbarc117-5A Xwmc415-5B Xbarc4-5B* та *Xbarc117-5A Xwmc415-5B Xbarc89-5B* лише алелів від сорту Лузанівка одеська (позначення LLL, поєднання локусів № 6, 7, 8, див. табл. 2), один генотип з алелем від сорту Лузанівка одеська за локусом *Xgwm156-5A* та алелів від сорту Одеська червоноколоса за локусами *Xwmc415-5B*, *Xbarc89-5B* (позначення LOO, поєднання локусів № 5). П'ять генотипів представлені лише двома РІЛ, у чотирьох з яких алель локусу *Xwmc415-5B* від сорту Лузанівка одеська поєднаний з відповідними чотирма парами алелів локусів *Xgwm156-5A* і *Xbarc88-5B*, *Xgwm156-5A* і *Xbarc89-5B*, *Xbarc117-5A* і *Xbarc88-5B*, *Xbarc117-5A* і *Xbarc89-5B* від сорту Одеська червоноколоса (позначення OLO, поєднання локусів відповідно № 3, 5, 6, 8). В поєднанні локусів № 2 мінімальна кількість РІЛ притаманна генотипу з алелем 160 пн локусу *Xcfd-5D*, алелем 174 пн локусу *Xwmc415-5B* — обидва походять від сорту Лузанівка одеська та алелем 158 пн локусу *Xbarc4-5B* — від сорту Одеська червоноколоса (позначення LLO), генетична формула якого *Xcfd8-5D*₁₆₀ *Xwmc415-5B*₁₇₄ *Xbarc4-5B*₁₅₈.

Значення *F*-критерію перевищили табличні значення двох рівнів вірогідних меж ймовірності $P = 0,99$ (поєднання локусів № 4 і 7) та $P = 0,95$ (решта поєднань локусів), що підтвердило істотність впливу фактора «генотип» на варіювання ЩРП у межах кожного з дев'яти потрійних поєднань мікросателітних локусів.

Найширший діапазон (4,3 шт/мм²) генетичного варіювання — від 19,7 до 24,0 шт/мм² ($НІР_{0,01} = 2,94$ шт/мм²) виявлено між ЩРП генотипів із різним поєднанням алелів одного локусу хромосоми 5A (*Xgwm156-5A*) з двома — хромосоми 5B (*Xwmc415-5B* і *Xbarc4-5B*), що відображено у поєднанні № 4. Найнижчий рівень (2,5 шт/мм²) генетичного різноманіття встановлено в поєднанні локусів *Xgwm3191-5B Xgwm182-5D Xbarc322-5D* (поєднання № 1). Рівень генетичного різноманіття (4,1 шт/мм²) в поєднанні локусів № 3 (*Xgwm156-5A Xwmc415-5B Xbarc88-5B*) наближався до раніше наведеного максимального у поєднанні № 4. У площині дев'яти потрійних поєднань мікросателітних локусів мінімальні значення ЩРП варіювали від 19,7 до 20,6 шт/мм² у генотипів *Xgwm156-5A*₂₉₀ *Xwmc415-5B*₁₇₂ *Xbarc88-5B*₁₈₀ і *Xbarc117-5A*₂₂₄ *Xbarc330-5A*₁₀₄ *Xbarc4-5B*₁₅₈ (відповідно OOL у поєднанні № 4 і LLO у поєднанні № 9). Генотипи з мінімальними і максимальними ЩРП більшості поєднань локусів (семи з дев'яти) належали відповідно до груп OOL і LLO. Цей факт може бути пов'язаний як з наявністю в усіх генотипах семи поєднань локусів алелів 172 чи 174 пн відповідно локусу *Xwmc415-5B*, так і з тим, що три локуси хромосоми 5B (*Xbarc4-5B*, *Xbarc88-5B*, *Xbarc89-5B*) і два — хромосоми 5A (*Xbarc117-5A*, *Xgwm156-5A*) є зчепленими ($LOD \geq 3$) між собою. Дещо відмінна картина в першому й дев'ятому поєднаннях локусів від більшості таких може бути пов'язана в першому випадку з наявністю у генотипів незчеплених між собою локусів *Xgwm182-5D* і *Xbarc322-5D*, у другому — локусу *Xbarc330-5A*. Зо-

крема у поєднанні локусів *Xgpr3191-5B Xgwm182-5D Xbarc322-5D* (№ 1) найменше і найбільше значення ЩРП — 20,0 і 22,5 шт/мм² — встановили у генотипів з комбінаціями алелів відповідно 236 + 162 + 230 та 178 + 165 + 224 пн, усі алелі яких походили або тільки від сорту Одеська червоноколоса, або тільки від сорту Лузанівка одеська (позначення ООО і LLL відповідно). Для поєднання *Xbarc117-5A Xbarc330-5A Xbarc4-5B* (№ 9) мінімальне значення ЩРП (20,6 шт/мм²) встановлено у групі генотипів з алелями 224 + 104 + 158 пн (LLO), максимальне (23,6 шт/мм²) — 224 + 106 + 158 пн (LOO). За винятком першого поєднання локусів (№ 1) решта (№ 2—9) генотипів з максимальними ЩРП були найбільш відокремленими. Зокрема генотипи *Xbarc117-5A₂₂₄ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc4-5B₁₅₈* поєднання № 7, *Xbarc117-5A₂₂₄ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc89-5B₁₂₄* поєднання № 8 та *Xbarc117-5A₂₂₄ Xbarc330-5A₁₀₆ Xbarc4-5B₁₅₈* поєднання № 9 з максимальною ЩРП вірогідно відрізнялись від шести інших у вказаних поєднаннях локусів. У поєднаннях локусів № 2—6 генотипи відповідно *Xcfd8-5D₁₆₀ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc4-5B₁₅₈*, *Xgwm156-5A₃₁₁ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc88-5B₈₀*, *Xgwm156-5A₃₁₁ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc4-5B₁₅₈*, *Xgwm156-5A₃₁₁ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc89-5B₁₂₄*, *Xbarc117-5A₂₂₄ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc88-5B₈₀* формували ЩРП істотно вищу за таку решти семи генотипів. У свою чергу, генотипи з мінімальними ЩРП вірогідно відрізнялись лише від двох (поєднання № 2, 5—9) або трьох (поєднання № 3, 4) генотипів із семи можливих.

За результатами виконаного дослідження встановлено генетичне різноманіття за ознакою ЩРП у наборі з 98 РІЛ F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса, вірогідність впливу алельних відмінностей у дев'яти потрійних поєднаннях мікросателітних локусів на варіювання ЩРП цієї вибірки за наявності асоціації з окремим SSR-локусом *Xbarc330-5*. Для маркування генів, які детермінують підвищену ЩРП, обґрунтованим є використання одного з восьми поєднань SSR-маркерів до алелів локусів: *Xcfd8-5D₁₆₀ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc4-5B₁₅₈*, або *Xgwm156-5A₃₁₁ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc88-5B₈₀*, або *Xgwm156-5A₃₁₁ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc4-5B₁₅₈*, або *Xgwm156-5A₃₁₁ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc89-5B₁₂₄*, або *Xbarc117-5A₂₂₄ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc88-5B₈₀*, або *Xbarc117-5A₂₂₄ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc4-5B₁₅₈*, або *Xbarc117-5A₂₂₄ Xwmc415-5B₁₇₄ Xbarc89-5B₁₂₄*, або *Xbarc117-5A₂₂₄ Xbarc330-5A₁₀₆ Xbarc4-5B₁₅₈*. У свою чергу, для фланкування генів, які детермінують прояв низької ЩРП листка, не можна рекомендувати жодного з досліджених поєднань SSR-маркерів.

1. Агаев М.Г. Закон Зеленского и его значение // Материалы междунар. науч. конф. (23—27 января 2006). — Казань, 2006. — С. 65—67.
2. Галаева М.В., Файт В.И., Чеботар С.В., Галаев А.В. Зв'язок алелів мікросателітних локусів п'ятої групи хромосом з морозостійкістю озимої пшениці // Цитология и генетика. — 2013. — 47, № 5. — С. 3—11.
3. Галаева М.В., Файт В.И., Галаев А.В. и др. Морозостойкость рекомбинантно-инбредных линий пшеницы и ее связь с аллелями микросателлитных локусов // Факторы экспер. эволюции организмов. — 2014. — 15, № 7. — С. 27—31.
4. Генетические основы селекции растений: в 4 т. — Т. 2. Частная генетика растений / Науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. — Минск: Беларус. навука, 2010. — С. 579.
5. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. — М.: Физматлит, 2006. — 816 с.
6. Кочерина Н.В., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. Использование лод-оценки в картировании локусов количественных признаков у растений // Докл. Россельхозакадемии. — 2011. — № 3. — С. 14—17.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

8. Ламари Н.П., Файт В.И. Зв'язок стоматографічних ознак з морозостійкістю сортів та рекомбінантно-інбредних ліній м'якої озимої пшениці // Матеріали міжнар. наук. конф. (17—19 жовтня 2012). — Одеса, 2012. — С. 266—267.
9. Файт В.И. Проблемы генетического анализа зимо-морозостойкости // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — **36**, № 5. — С. 371—382.
10. Цитологическая и цитозембриологическая техника (для исследования культурных растений): Методич. указания / Л.И. Абрамова, И.Н. Орлова, М.А. Вишнякова и др.; под ред. Л.И. Орел. — Л.: ВИР, 1982. — 119 с.
11. Чернецкая А.Г., Валетов В.В. Ранняя диагностика сортов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) на устойчивость к мучнистой росе (*Sphaerotheca mors-uvae* (Schw) Berk. et Gurt) // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. — 2007. — № 1. — С. 66—70.
12. Burr B. Recombinant inbred lines for molecular mapping in maize: theoretical and practical consideration // TIG. — 1991. — N 7. — P. 55—60.
13. Driscoll S.P., Prins A., Olmos E. et al. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves // J. Exp. Bot. — 2006. — **57**, N 2. — P. 381—390.
14. Hanocq E. Detection and mapping of QTL for earliness components in a bread wheat recombinant inbred lines population // TAG. — 2004. — **110**, N 1. — P. 106—115.
15. Laner E.S., Botstein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps // Genetics. — 1989. — **121**, N 1. — С. 185—199.
16. Liao J.X., Chang J., Wang G.X. Stomatal density and gas exchange in six wheat cultivars // Cereal Res. Communic. — 2005. — **33**, N 4. — P. 719—726.
17. Limin A.E., Fowler D.B. Relationship between guard cell length and cold hardiness in wheat // Can. J. Plant Sci. — 1994. — **74**, N 1. — P. 59—62.
18. Li Y.C. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review // Mol. Ecol. — 2002. — **11**, N 12. — P. 2453—2465.
19. Mohammady S. Inheritance of tolerance to water stress in wheat (*Triticum aestivum* L.): Ph. D. Thesis. — University of Newcastle, UK, 2002.
20. Paux E., Sourdille P., Mackay I., Feuillet C. Sequence-based marker development in wheat: advances and applications to breeding // Biotechnol. Adv. — 2012. — **30**, N 5. — P. 1071—1088.
21. Solmaz I., Sari N., Dasgan Y. et al. The effect of salinity on stomata and leaf characteristics of dihaploid melon lines and their hybrids // J. Food Agricult. Environ. — 2011. — **9**, N 3—4. — P. 172—176.
22. Wang H. Genotypic, intraplant, and environmental variation in stomatal frequency and size in wheat // Can. J. Plant Sci. — 1993. — **73**, N 3. — P. 671—678.
23. Zhang Y.P., Wang Z.M., Wu Y.C., Zhang X. Stomatal characteristics of different green organs in wheat under different irrigation regimes // Acta Agron. Sin. — 2006. — **32**. — P. 70—75.

Отримано 01.09.2017

СВЯЗЬ SSR-МАРКЕРОВ С ВАРЬИРОВАНИЕМ ПЛОТНОСТИ РАЗМЕЩЕНИЯ УСТЬИЦ У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Н.П. Ламари, М.В. Галаева, В.И. Файт, О.О. Погребнюк

Селекционно-генетический институт—Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины, Одесса

Исследовали наличие ассоциаций между аллельными отличиями микросателлитных локусов (SSR) и генетическим полиморфизмом по признаку «плотность размещения устьиц» (ПРУ) рекомбинантно-инбредных линий (РИЛ) озимой мягкой пшеницы. Цитологический анализ устьиц эпидермиса листа, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и статистические расчеты выполняли по общепринятым методикам. Обнаружено генетическое разнообразие по признаку ПРУ в популяции РИЛ пшеницы F₇ Лузановка одесская/Одесская червоноколосая. Отмечен высокодостоверный ($P \leq 0,01$) уровень зависимости варьирования ПРУ генотипов популяции РИЛ от аллельного состава локуса *Xbarc330-5A*, установлена достоверность влияния аллельных отличий SSR-локусов в девяти тройных сочетаниях

микросателлитных локусов на варьирование ПРУ. Обосновано использование одного из восьми тройных сочетаний SSR-маркеров для маркировки генов, детерминирующих повышенную ПРУ.

RELATION BETWEEN SSR MARKERS AND VARIATION IN STOMATAL FREQUENCY OF BREAD WHEAT

N.P. Lamari, M.V. Galayeva, V.I. Fait, O.O. Pogrebnuk

Plant Breeding and Genetics Institute—National Center of Seed and Cultivars Investigation,
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
3 Ovidiopolska road, Odesa, 65036, Ukraine

Associations between the allelic differences of microsatellite markers (SSR) and genetic polymorphism of the trait «stomatal frequency» (SF) in winter bread wheat recombinant-inbred lines (RIL) population were identified. The cytological analysis of the leaf epidermal stomata, polymerase chain reaction (PCR) and statistical calculations were carried out in accordance with generally accepted methods. Genetic diversity in the FS trait of the wheat RIL F₇ Luzanivka odeska/Odeska chervonokolosa population was identified. A high significance ($P \leq 0.01$) level of dependence of the variation of FS values in the RIL population on the allelic composition at the *Xbarc330-5A* locus was noted. A significant influence of allelic differences at SSR loci in nine triple combinations of microsatellite loci on the variation of the FS was established. For the purpose of marking the genes that determine the increased FS is reasonable to use one of eight triple combinations of SSR-markers.

Key words: bread wheat, SSR locus, stomata, stomatal frequency.