

## ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 635.657:575

### КЛАССИФИКАЦИЯ СОРТОВ НУТА ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНЫМ МАРКЕРАМ

© 2011 г. Г. Е. Акинина<sup>1</sup>, О. Н. Безуглая<sup>2</sup>, В. Н. Попов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева

(Харьков, Украина)

<sup>2</sup>Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева

Национальной академии аграрных наук Украины

(Харьков, Украина)

Проанализирован полиморфизм 24 сортов нута из Украины и России по 15 морфологическим признакам и 13 микросателлитным локусам. Отмечен сходный уровень полиморфизма в сортах нута по разным типам данных, оцененный по индексу полиморфизма Шеннона. Показано, что микросателлитные локусы являются лучшими дифференцирующими дескрипторами сортов нута по сравнению с морфологическими признаками: окраска цветков, цвет, форма и характер поверхности семян. Выявлено, что все изученные сорта нута из Украины и России по исследованным признакам проявляют незначительную дифференциацию в связи с их высокой идентичностью. Обсуждаются возможные причины кластеризации сортов в связи с их происхождением. Описана группа сортов нута, в родословных которых доминируют генотипы сортов Кубанский 163 и Кубанский 199.

**Ключевые слова:** *Cicer arietinum* L., микросателлиты, морфологические дескрипторы, генетическая и фенотипическая изменчивость, генетические расстояния

Успех селекционно-генетических исследований непосредственно связан с формированием и поддержанием коллекций генетического разнообразия растений, которые классифицируют в зависимости от целей и задач. Среди разных видов коллекций особое место занимают признаковые коллекции, как основной источник исходного материала для селекции любой сельскохозяйственной культуры. Создание таких признаковых коллекций является первым этапом формирования генетических коллекций вида (Рябчун, Богуславский, 2002; Коваль и др., 2003). Одним из основных принципов создания признаковой коллекции является подбор образцов, отражающих спектр внутривидовой из-

менчивости по комплексу признаков, с учетом современных тенденций в селекции.

Существуют различные критерии для оценки генетического разнообразия растений (Смирнов, 2005). Классическими дескрипторами полиморфизма культурных растений являются морфологические признаки (Безугла та ін., 2004; Кобизева та ін., 2004). Вместе с тем, использование морфологических признаков имеет ряд недостатков, таких как лимитированное их количество, зависимость от условий окружающей среды, субъективность оценки. Это может приводить к закладке идентичных генотипов в процессе формирования коллекции, что влечет за собой значительный рост дублированных образцов в центрах генетических ресурсов растений. Альтернативным подходом для оптимизации количества образцов является анализ их генетического разнообразия по ДНК-маркерам, который позволяет провести наиболее точную классификацию коллекции и в дальнейшем структу-

Адрес для корреспонденции: Попов Виталий Николаевич, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;  
e-mail: vnpor@mail.ru

## КЛАССИФИКАЦИЯ СОРТОВ НУТА

рировать генофонд определенного культурного вида (Сиволап, Календарь, 1998; Брик, Сиволап, 2001; Чеботарь, Сиволап, 2001; Кожухова и Сиволап, 2004; Брик и др., 2006; Саналатий и др., 2006; Митрофанова и др., 2009).

В Украине Национальный генбанк растений насчитывает около 125 тыс. образцов, среди которых весомую часть составляют зернобобовые культуры (Рябчун, Богуславский, 2002). Генофонд последних представлен не только широко возделываемыми видами, но и видами, которые не доминируют в сельскохозяйственном производстве, например, нут (*Cicer arietinum* L.). Нут представляет интерес для выращивания в засушливых агроклиматических зонах Украины как альтернатива другим зернобобовым культурам. В Национальном центре генетических ресурсов растений Украины (НЦГРРУ) сохраняются сортообразцы нута из многих стран мира, в том числе из Украины и России, которые описаны по основным морфологическим признакам. Так, показано эффективное использование фенотипической изменчивости для оценки генетических коллекций нута (Upadhyaya et al., 2002; Talebi et al., 2003; Upadhyaya, 2003), хотя известно, что культурный нут является строгим самоопылителем с низким уровнем внутри- и межпопуляционной изменчивости (Sethy et al., 2006). Например, незначительное генетическое разнообразие сортов нута было показано с использованием изоферментов (Ahmad et al., 1992), запасных белков (Ghafoor et al., 2003), RFLP и RAPD маркеров (Udupa, 1993; Sant et al., 1999; Iruela et al., 2002). В то же время в литературе представлены результаты, которые показали высокий уровень изменчивости микросателлитных локусов у сортов нута (Huttel et al., 2006; Sethy et al., 2006; Upadhyaya et al., 2008). Значительный полиморфизм микросателлитных локусов позволил дифференцировать образцы нута и оценить наибольшие генетические коллекции нута в мировых генцентрах ICRISAT (Индия) и ICARDA (Сирия) (Upadhyaya et al., 2008).

Образцы нута из Украины и России, которые сохраняются в коллекции НЦГРРУ, традиционно оцениваются по морфологическим признакам. Научные данные по изучению разнообразия украинских и российских сортов нута в коллекции НЦГРРУ по молекулярным маркерам в литературе отсутствуют. В связи с этим целью работы стало изучение полиморфизма сортов нута из Украины и России по морфологическим признакам и микросателлитным локусам. Также в задачу работы входило выявление закономерности дифференциации сортов нута на основе

сравнительного анализа морфологических и молекулярно-генетических данных.

## МЕТОДИКА

Объектами исследования были 24 образца (12 украинских и 12 российских сортов) нута (*Cicer arietinum* L.) из НЦГРРУ (г. Харьков) (табл. 1).

Изучали следующие морфологические признаки сортов нута: окраска стебля, особенности листа (окраска, размер листочков, форма листочков) и цветка (размер, окраска), признаки зрелого боба (окраска, форма, длина, ширина) и семян (форма, особенности поверхности, окраска, масса 1000 семян), форма растения. Для сорта Заволжский авторам были известны только признаки семян, поэтому он не использовался в кластеризации сортов нута по морфологическим признакам.

Для изучения генетического разнообразия сортов нута были выбраны 13 микросателлитных локусов, описанных другими авторами как полиморфные (табл.2) (Huttel et al., 1999; Sethy et al., 2006; Upadhyaya et al., 2008).

ДНК выделяли из смеси шести семян СТАВ методом (Ausubel et al., 1987). Полиморфизм микросателлитных локусов изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core) в амплификаторе Терцик (Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 20 нг ДНК и 1 мкМ каждого праймера.

Для амплификации использовали программу, предложенную Huttel et al. (1999) с модификациями. Амплификацию проводили с начальной денатурацией в течение 4 мин при 94°C и последующими 30 циклами в таком режиме: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг праймеров – 23 с при 50°C, элонгация – 20 с при 72°C, конечная элонгация – 5 мин при 72°C.

Продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в 3%-ом агарозном геле с бромистым этидием в боратном буфере с низкой ионной силой. Электрофорез проводили в горизонтальном приборе Hoefer SuperSub100 (Brody et al., 2004). В качестве маркеров молекулярной массы использовали DNA ladders 50 bp и pUC 19/MspI DNA Marker. Полученные гели документировали с использованием фотосистемы Nikon.



## КЛАССИФИКАЦИЯ СОРТОВ НУТА

Для определения количества и размеров продуктов амплификации применяли программу Totallab 120 (<http://www.totallab.com>).

Разнообразие сортов нута оценивали по индексу Шеннона (Мэгарран, 1992), который рассчитывали по формуле:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \ln p_i)$$

где  $H'$  - индекс Шеннона;

$S$  – количество категорий (проявлений признака, аллелей локуса);

$p_i$  – частота проявления признака.

Индекс Шеннона наиболее часто используется при описании полиморфизма морфологических признаков растений (Talebi et al., 2002; Rumpunen et al., 2003; Uradhyaya 2003). Вместе с тем, показана корреляция индекса Шеннона с индексами генетического разнообразия (Zhang et al., 2010). В связи с этим в нашей работе для оценки полиморфизма сортов нута по морфологическим и молекулярно-генетическим данным мы использовали индекс разнообразия Шеннона. Это позволило сравнить полиморфизм сортов нута, описанный по различным типам данных – морфологическим и молекулярно-генетическим.

Максимально возможное значение индекса Шеннона ( $H_{max}$ ) рассчитывали по формуле:

$$H_{max} = - \sum_{i=1}^S \frac{1}{S} \ln \frac{1}{S} = \ln S.$$

За число категорий ( $S$ ) принимали количество всех градаций каждого признака/аллельных вариантов микросателлитного локуса в общей выборке изученных сортов нута.

Частоту проявления морфологических признаков/аллельных вариантов локусов, индекс полиморфности ( $PIC$ ), индекс генетического разнообразия Nei ( $D$ ) рассчитывали в программе Excel с помощью надстройки Microsatellite Tools for Excel (<http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit>).

Для оценки дивергенции между сортами нута рассчитывали генетические расстояния Nei на основе бинарной матрицы («+» – присутствие признака, «-» – отсутствие признака) и создавали деревья методом ближай-

ших соседей с помощью программы PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylipl.html>).

Статистическую достоверность образования кластеров в полученных деревьях оценивали при помощи бутстреп-анализа в программе PHYLIP. Оценка бутстреп-значений проведена в 1000 повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Полиморфизм сортов нута по морфологическим признакам*

При фенотипической характеристике сортов нута из России и Украины все изученные морфологические признаки были полиморфными. Максимальное количество градаций (6) отмечалось по признаку окраска семян, а минимальное (2) по большинству признаков: окраска стебля, окраска и размер листа, размер цветка, форма, окраска и размер боба. Среднее количество градаций для одного признака для украинских сортов составило  $2,27 \pm 0,08$ , для российских сортов –  $2,60 \pm 0,09$ , а в общей выборке –  $2,87 \pm 1,13$ .

Максимальное значение индекса разнообразия Шеннона ( $H'$ ) в сортах нута отмечалось по признаку окраска семян ( $H' = 1,27$ ). Значительным уровнем разнообразия отличались также признаки формы и характера поверхности семян ( $H' = 0,98$  и  $0,93$ , соответственно).

Наименее изменчивыми в общей выборке украинских и российских сортов нута оказались признаки размер цветка ( $H' = 0,3$ ) и окраска зрелого боба ( $H' = 0,3$ ). Общий уровень полиморфизма сортов нута по всем изученным морфологическим признакам для украинских образцов составил –  $0,62$ , для российских образцов –  $0,69$ , а в общей выборке сортов –  $0,70$  (табл. 3). Таким образом, украинские и российские сорта нута характеризовались сходным уровнем полиморфизма с небольшим преобладанием индекса Шеннона у сортов из России. В общей выборке сортов нута отмечался довольно высокий уровень изменчивости по сравнению с максимальным значением индекса Шеннона ( $H_{max} = 0,99$ ). Однако, следует отметить, что  $H_{max}$  рассчитывалось только для градаций признаков, представленных в изученной выборке сортов. При привлечении в анализ сортов нута из других стран и увеличении выборки значение  $H_{max}$  будет увеличиваться, а значи-

Таблица 3. Индекс разнообразия Шеннона ( $H'$ ) по морфологическим признакам сортов нута из Украины и России

Признак	Украина	Россия	Общая выборка	$H'_{max}$
Окраска стебля	0,00	0,59	0,39	0,69
Окраска листка	0,68	0,66	0,69	0,69
Размер листков	0,68	0,92	0,83	1,10
Форма листков	0,56	0,94	0,79	1,10
Размер цветка	0,29	0,30	0,30	0,69
Окраска цветка	0,82	0,47	0,69	1,10
Окраска зрелого боба	0,00	0,47	0,30	0,69
Форма зрелого боба	0,45	0,59	0,39	0,69
Длина зрелого боба	0,56	0,30	0,46	0,69
Ширина зрелого боба	0,69	0,59	0,67	0,69
Форма семян	0,89	0,98	0,98	1,39
Поверхность семян	0,89	0,96	0,93	1,10
Окраска семян	1,08	1,23	1,27	1,79
Размер семян	1,01	0,45	0,98	1,39
Форма растения	0,69	0,92	0,84	1,10
Среднее по всем признакам	0,62±0,32	0,69±0,29	0,70±0,29	0,99±0,34

Примечание: ± – стандартное отклонение.

мость  $H'$  для конкретных групп сортов уменьшаться.

Для изучения дивергенции сортов нута по морфологическим признакам были рассчитаны генетические расстояния  $Nei$  и построено NJ-дерево с последующей оценкой достоверности топологии методом бутстреп-анализа.

Все изученные сорта нута по морфологическим признакам находились на незначительных расстояниях друг от друга. Так, максимальное расстояние составило 0,019485 (между сортами ВИР 32 и Кубанский 199), а минимальное – 0,000918 (между сортами Шахтинский и Юбилейный).

В топологии согласованного NJ-дерева можно условно выделить четыре основных кластера (рис. 1). Для сортов кластера 1 характерна антоциановая окраска стебля, средние и крупные листья с зеленой и сизо-зеленой окраской яйцевидной формы; белые цветки среднего размера; длинные и средние ромбические бобы желтого цвета; очень крупные семена (масса 1000 семян > 350 г), округлой и шаровидной формы желто-розовой и желтой окраски с слабощероховатой и гладкой поверхностью; растения стоячей и компактной формы (табл. 4). При этом следует отметить, что закономерностей объединения сортов нута по происхождению не выявлено (табл. 1).

Второй кластер включал 10 сортов (рис. 1). От предыдущей группы их отличало наличие представителей с эллиптической формой ли-

сточков (сорта Зеленоградский 36, Смачный, Розанна, ВИР 32), с грушевидной формой боба (ВИР 32), раскидистой формой растения (Шахтинский). В этой группе отмечались также сорта с мелкими (масса 1000 семян 51-150 г) – Зеленоградский 36, и средними (масса 1000 семян 151-250 г) – Смачный, семенами. Вошедшие в этот кластер сорта по всем остальным морфологическим признакам полностью идентичны образцам первого кластера. Таким образом, сорта нута, вошедшие в эти кластеры, по морфологическим признакам можно рассматривать как одну идентичную группу образцов. Происхождение большинства сортов нута кластера 2 нам неизвестно. По имеющимся родословным сортам Зеленоградский 36, Смачный, Розана и Днепровский общего предка у них не выявлено.

Кластер 3 образовали сорта Совхозный 14, Колорит, Краснокутский 123, Александрит и Пегас. Сорта данной группы отличает от сортов предыдущих кластеров появление представителей с зеленой окраской стебля с антоциановой пигментацией (сорта Совхозный 14, Краснокутский 123). Окраска листьев у сортов, объединенных в этом кластере, преимущественно зеленая, а цветков сиренево-розовая. У одного сорта (Совхозный 14) наблюдается бурая окраска зрелых бобов. У остальных сортов зрелые бобы желтого цвета, как и у представителей кластеров 1 и 2. Семена у сортов нута этой группы красно-коричневые и коричневые, округло-угловатой формы, поверхность зерна шероховатая (табл. 4). Следует отметить, что

## КЛАССИФИКАЦИЯ СОРТОВ НУТА

**Таблица 4. Структура кластеров, полученных на основе изменчивости по морфологическим признакам нута**

Признак	№ кластера			
	1	2	3	4
Окраска стебля	Антоциановая	Антоциановая	Антоциановая, зеленая с антоциановой пигментацией	Антоциановая, зеленая с антоциановой пигментацией
Окраска листка	Зеленая, сизо-зеленая	Зеленая, сизо-зеленая	Зеленая, сизо-зеленая	Зеленая, сизо-зеленая
Размер листочков	Средний, крупный	Средний, крупный	Средний, крупный	Крупный
Форма листочков	Яйцевидная, эллиптическая	Яйцевидная, эллиптическая	Яйцевидная, эллиптическая	Яйцевидная, эллиптическая
Размер цветка	Средний	Средний	Средний, крупный	Средний
Окраска цветка	Белая	Белая	Белая, сиренево-розовая	Розовая, сиренево-розовая
Окраска зрелого боба	Желтая	Желтая	Желтая, бурая	Желтая, бурая
Форма зрелого боба	Ромбическая, грушевидная	Ромбическая, грушевидная	Ромбическая, грушевидная	Ромбическая
Размер зрелого боба	Длинные, средние	Длинные	Длинные, средние	Длинные, средние
Ширина зрелого боба	Средняя	Широкий	Широкий, средняя	Широкие, средняя
Форма семян	Округлая, шаровидная	Округлая, шаровидная	Округло-угловатая	Округло-угловатая, угловатая
Поверхность семян	Слабошероховатая, гладкая	Слабошероховатая, гладкая	Шероховатая	Шероховатая
Окраска семян	Желто-розовый, желтый	Желто-розовый, желтый	Коричневый и красно-коричневый	Гороховый, черный
Размер семян	Крупное и очень крупное	Мелкое, среднее, крупное	Крупное и очень крупное	Мелкое, среднее
Форма растения	Стоячая, компактная	Стоячая, компактная, раскидистая	Компактная, стоячая	Компактная, стоячая

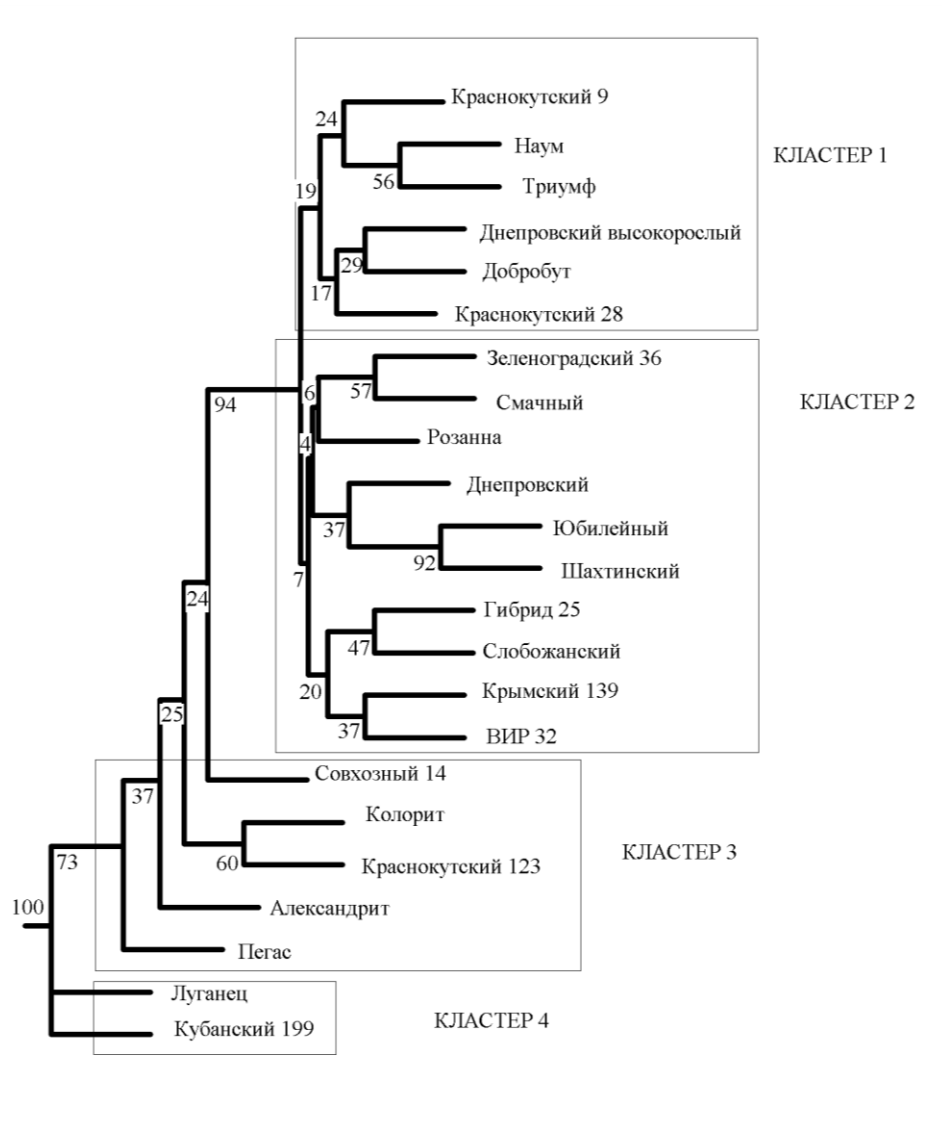
большинство генотипов кластера 3 имеют общность происхождения (табл. 1). Во всех их родословных присутствуют сорта Кубанский 163 и Кубанский 199.

Кластер 4 состоит только из двух сортов – Луганец и Кубанский 199. По большинству морфологических признаков они подобны представителям сортов кластера 3. Однако их отличают признаки семян, которые не встречаются ни у одного сорта остальных кластеров. Так, сорт Луганец имеет семена горохового типа, а сорт Кубанский 199 мелкие черные семена угловатой формы.

Таким образом, при изучении полиморфизма и кластеризации сортов нута по морфологическим признакам, очевидно, что наиболее изменчивыми, и как следствие, дифференцирующими дескрипторами, являются признаки семян. Именно морфологические признаки семян являются наиболее полиморфными у нута культурного и определяют принадлежность растений нута к двум разновидностям – *desi* и

*kabuli*. Так, для *desi*-типа характерны розовые цветки, мелкие коричневые или желто-коричневые семена, угловатой формы с морщинистой поверхностью. Разновидность нута *kabuli*, напротив, представлена формами с белыми цветками, крупными, округлыми и слабоугловатыми семенами (Uradhyaya et al., 2002). Показано, что наивысший уровень изменчивости в коллекции сортов нута наблюдался по окраске семян (Uradhyaya, 2003). Среди 10 наиболее важных дифференцирующих морфологических и агрономических дескрипторов в коллекции сортов нута определены окраска, характер поверхности семян и масса 1000 семян (Uradhyaya et al., 2002).

В наших исследованиях также наблюдались четкие закономерности в кластеризации сортов нута по признакам цветков и семян. Так, кластеры 1 и 2 представлены сортами с белыми цветками, светлыми слабошероховатыми семенами округлой и шаровидной формы. В кластерах 2 и 3 вошли сорта с сиренево-розовыми цветками, темными округло-угловатыми и уг-



**Рис. 1. Согласованное NJ-дерево, отражающее взаимосвязи сортов нута из России и Украины, построенное на основе полиморфизма 15 морфологических признаков. Здесь и далее в основании каждого кластера указаны бутстреп-значения, %.**

ловатыми семенами с шероховатой поверхностью.

Таким образом, генотипы кластеров 1 и 2 можно отнести к разновидности *kabuli*, а сорта кластеров 3 и 4 – к разновидности *desi*. Сорт Луганец (кластер 4) относится к промежуточному гороховому типу.

Несмотря на четкую и логичную дифференциацию сортов нута по признакам семян, все они находились на незначительных расстояниях друг от друга. Этим, вероятно, объясняются низкие бутстреп-значения для большинства узлов в согласованном NJ-дерево (рис. 1). По большинству морфологических признаков сорта нута настолько подобны, что возможна любая топология в каждом кластере.

В связи с этим для более достоверной дифференциации сортов нута, вероятно, необходимо использовать большее количество морфологических признаков и привлекать другие показатели – агрономические, физиологические, а также молекулярно-генетические, из которых последние имеют достаточно высокую способность различать даже близкородственные генотипы.

**Полиморфизм сортов нута по микросателлитным локусам**

В результате амплификации ДНК 24 генотипов сортов нута из Украины и России с использованием праймеров к 13 микросателлитным локусам было выявлено 40 аллельных вариантов. Четыре локуса – CaSTMS25, NCPGR41, NCPGR52 и NCPGR55 были моно-

## КЛАССИФИКАЦИЯ СОРТОВ НУТА

**Таблица 5. Значения индексов разнообразия Шеннона ( $H'$ ), полиморфности ( $PI$ ), генетического разнообразия Нея ( $D$ ) по микросателлитным локусам в сортах нута из России и Украины**

Локус	Индекс разнообразия Шеннона ( $H'$ )			Индекс полиморфности ( $PI$ )			Индекс генетического разнообразия Нея ( $D$ )			
	Украина	Россия	Общая выборка	$H_{max}$	Украина	Россия	Общая выборка	Украина	Россия	Общая выборка
CaSTMS 10	0,87	0,64	0,82	1,10	0,45	0,35	0,42	0,52	0,46	0,50
CaSTMS 14	1,13	1,63	1,67	1,79	0,56	0,75	0,76	0,65	0,81	0,81
CaSTMS 25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NCPGR 21	0,56	0,29	0,54	1,10	0,30	0,14	0,26	0,39	0,16	0,29
NCPGR 41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NCPGR 50	1,03	1,01	1,38	1,39	0,55	0,54	0,70	0,65	0,64	0,76
NCPGR 51	0,29	0,69	0,60	1,61	0,14	0,38	0,33	0,16	0,52	0,42
NCPGR 52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NCPGR 55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NCPGR 57	0,64	0,89	0,79	1,10	0,35	0,46	0,41	0,46	0,57	0,51
NCPGR 81	1,36	1,75	1,70	1,79	0,69	0,79	0,78	0,77	0,86	0,82
NCPGR 90	1,14	0,30	1,09	1,61	0,57	0,24	0,51	0,67	0,29	0,57
NCPGR 94	0,72	1,14	1,01	1,39	0,36	0,57	0,50	0,42	0,67	0,58
Среднее по всем локусам	±0,50	±0,61	±0,62	±0,73	±0,25	±0,29	±0,29	±0,29	±0,31	±0,32
<b>Коэффициент корреляции (<math>r</math>) <math>H'</math> с <math>PI</math> или <math>D</math></b>					<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	<b>0,996</b>	<b>0,993</b>	<b>0,974</b>	<b>0,987</b>

Примечание: ± – стандартное отклонение.

морфными в выборке сортов нута. По остальным локусам был выявлен полиморфизм (табл. 5). Минимальное число аллелей (2) наблюдалось по локусу NCPGR51, а максимальное (6) для CaSTMS14 и NCPGR81.

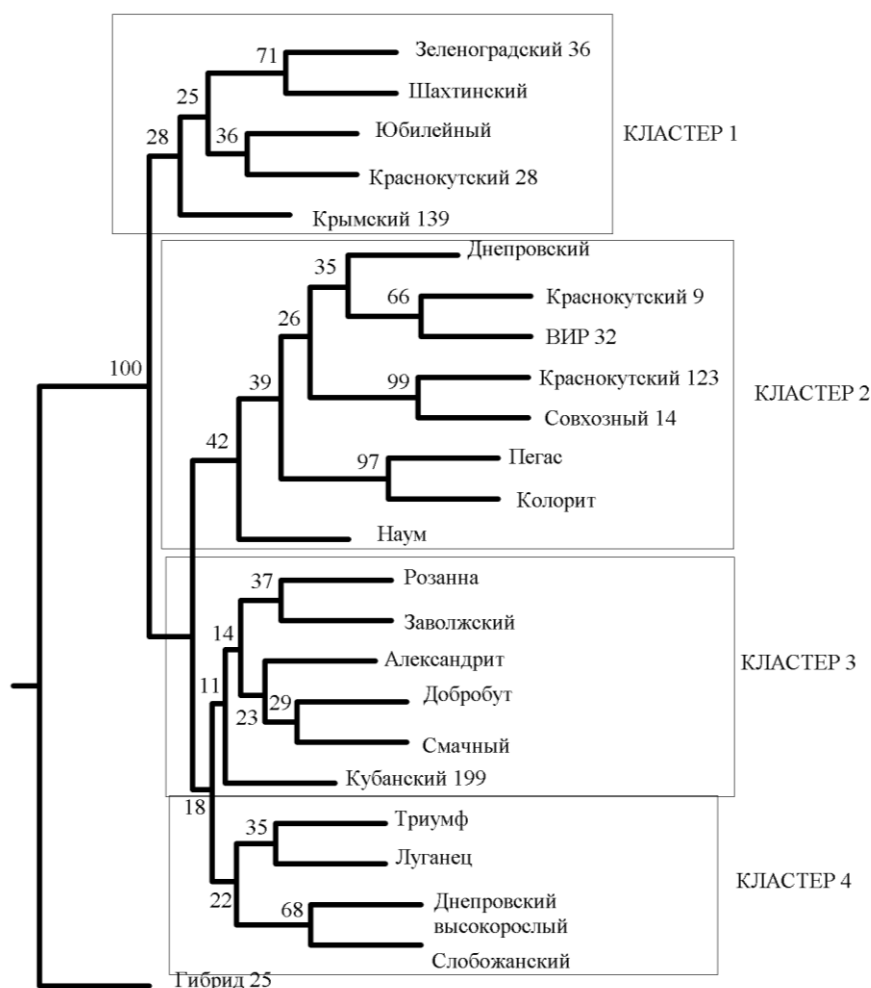
Наиболее полиморфными в изученных сортах нута выявились локусы NCPGR81 ( $H' = 1,70$ ) и CaSTMS14 ( $H' = 1,67$ ). Следует отметить, что для массива данных по микросателлитным локусам были также рассчитаны индексы генетического разнообразия: индекс полиморфности ( $PI$ ), индекс генетического разнообразия Нея ( $D$ ), которые имели высокие значения корреляции с индексом разнообразия Шеннона ( $H'$ ) (табл. 5). Эти результаты подтверждают возможность описания молекулярно-генетических данных с помощью индекса Шеннона, выявленную другими авторами (Zhang et al., 2010). Это упрощает сравнение массивов данных, относящихся к разным категориям, например, морфологических и молекулярных.

Среднее число аллельных вариантов на один локус в общей выборке сортов составило  $3,08 \pm 1,85$ , для украинских сортов –  $2,38 \pm 1,19$ , а для российских –  $2,62 \pm 1,76$ . Генетическое разнообразие сортов нута по всем локусам по ин-

дексу Шеннона составило  $0,74 \pm 0,62$  (табл. 5). По сравнению с максимальным значением  $H_{max} = 0,99$  сорта нута по микросателлитным локусам обладали значительным уровнем изменчивости. Однако, снова следует отметить, что  $H_{max}$  рассчитано для количества аллельных вариантов, представленных в изученной выборке сортов. Вместе с тем, индекс генетического разнообразия Нея, при расчете которого учитывается распределение аллельных вариантов гена согласно закону Харди-Вайнберга ( $D_{max} = 1$ ), свидетельствует о среднем уровне изменчивости украинских и российских сортов нута по микросателлитным локусам ( $D = 0,40 \pm 0,32$ ).

Сравнение абсолютных значений генетических расстояний, рассчитанных на основе полиморфизма микросателлитных локусов и морфологических признаков, между сортами нута из Украины и России свидетельствует о большей дифференциации изучаемых сортов по молекулярным данным, чем по фенотипическим. Так, максимальное расстояние Nei составило 0,047968 между сортами Смачный и Днепровский, Александрит и Наум, Триумф и Наум, Слобожанский и Наум; минимальное – 0,00000 между сортами Краснокутский 123 и Совхозный.





**Рис. 2.** Согласованное NJ-дерево, отражающее взаимосвязи сортов нута из России и Украины, построенное на основе полиморфизма 13 микросателлитных локусов.

В результате кластеризации сортов нута методом присоединения ближайших соседей с последующим бутстреп-анализом было условно выделено четыре кластера (рис. 2). Сорт Гибрид 25 не вошел ни в один из кластеров.

При детальном анализе структуры выделенных кластеров показано, что в мономорфных микросателлитных локусах сортов нута всех кластеров амплифицировались следующие продукты: CaSTMS25 – 178 пн, NCPGR41 – 264 пн, NCPGR52 – 245 пн, NCPGR55 – 204 пн (табл. 6).

У генотипов, объединенных в кластер 1, также были выявлены мономорфные локусы – CaSTMS10 (204 пн), NCPGR50 (215 пн), NCPGR57 (221 пн). Остальные локусы были полиморфными в этой группе сортов и отличались следующим набором аллельных вариан-

тов: CaSTMS14 (110, 120, 100 пн), NCPGR21 (155, 180 пн), NCPGR81 (180, 190, 215 пн), NCPGR90 (210, 155 пн), NCPGR94 (195, 188, 178 пн). По локусу CaSTMS14 у сорта Крымский 139 выявлен уникальный аллельный вариант 100 пн, который не встречался ни у одного из сортов в общей выборке. Уникальные аллельные варианты отмечены также у сорта Юбилейный по локусам NCPGR21 (180 пн) и NCPGR94 (188 пн). Всего в сортах амплифицировалось 20 аллельных вариантов. При анализе родословных сортов, вошедших в этот кластер, общих предков не выявлено (табл. 1). Следует отметить, что в данный кластер вошли только российские сорта.

Кластер 2 включал как российские, так и украинские сорта (рис. 2). По количеству аллельных вариантов данная группа сортов характеризуется наивысшим уровнем полимор-

## КЛАССИФИКАЦИЯ СОРТОВ НУТА

**Таблица 6. Структура кластеров, полученных на основе изменчивости по молекулярным данным**

Размер аллельного варианта локуса, пн	№ кластера				
	1	2	3	4	Гибрид 25
CaSTMS10	240	204,210	240	240	240
CaSTMS14	110, 120, 100	150, 135, 120	140, 110	135	135
CaSTMS25	178	178	178	178	178
NCPGR 21	155, 180	160, 155	155	155, 160	155
NCPGR41	264	264	264	264	264
NCPGR 50	215	230,220	220,240	230,220,	215
NCPGR51	210	203,210	203	203,210	210
NCPGR52	245	245	245	245	245
NCPGR55	204	204	204	204	204
NCPGR57	221	210	221	221	225
NCPGR81	180, 190, 215	215, 220, 230, 190	200, 190	222, 190	200
NCPGR90	210, 155	210, 194	155, 200	200, 210	210
NCPGR94	195, 188, 178	178, 195	195, 178, 170	178, 195	178

физма по сравнению с сортами, вошедшими в кластер 1. У сортов этого кластера было идентифицировано 24 аллельных варианта по всем изученным микросателлитным локусам. Генотипы этой группы отличаются от генотипов кластера 1 наличием следующих аллельных вариантов: 210 пн (CaSTMS10), 150 и 135 пн (NCPGR21), 230 и 220 пн (NCPGR50), 203 пн (NCPGR51), 210 пн (NCPGR57), 215, 220, 230 пн (NCPGR81) и 194 пн (NCPGR90). Аллельные варианты 230 пн (NCPGR81) и 194 пн (NCPGR90) являются характерными только для сортов ВИР 32 и Наум, соответственно, и не встречаются у других изученных сортов нута. В этом кластере выявлено три узла с высоким уровнем достоверности. Бутстреп-значения для пары сортов Краснокутский 9 и ВИР 32, Краснокутский 123 и Совхозный 14, Пегас и Колорит составили 66, 99 и 97%, соответственно. Происхождение сортов Краснокутский 9 и ВИР 32 авторам, к сожалению, неизвестно. Вместе с тем, анализ родословных сортов Краснокутский 123, Совхозный 14, Пегас и Колорит показал, что они имеют общих предков. Так, при создании сорта Краснокутский 123 использован сорт Совхозный 14. В свою очередь Совхозный 14 создан на основе сортов Кубанский 163 и Кубанский 199. При создании сортов Колорит и Пегас были привлечены сорта Кубанский 163 и Кубанский 199. Таким образом, кластер 2 можно назвать группой сортов, берущих начало от сортов Кубанский 163 и Кубанский 199.

Кластер 3 также представлен российскими и украинскими сортами нута, для которых характерны следующие отличия от сортов кластера 2: локус CaSTMS10 представлен аллелем 240 пн, локус CaSTMS14 аллелями 140, 110 пн, NCPGR50 – 240 пн, NCPGR57 – 221 пн,

NCPGR81 – 200 пн, NCPGR90 – 155, 200 пн и NCPGR94 – 170 пн. В кластере 3 не выявлено узлов с высокой достоверностью. Вместе с тем, сорта Розанна и Заволжский, которые образуют общий узел, имеют общность происхождения. В их родословных присутствуют сорта Кубанский 163 и Кубанский 199. Сорт Кубанский 199 также является представителем кластера 3. Общих предков в сортах Александрит, Добробут, Смачный не выявлено.

Кластер 4 представлен четырьмя сортами из Украины – Триумф, Луганец, Днепровский высокорослый и Слобожанский, которые образовали два узла. Эти сорта характеризовались подобным набором аллельных вариантов, характерных для сортов кластера 3. Однако по локусу CaSTMS14 у этих сортов отмечен продукт с размером 135 пн, по NCPGR21 выявлен аллельный вариант 160 пн, по NCPGR41 – 230 пн, по NCPGR51 – 210 пн, NCPGR81 – 222 пн, NCPGR90 – 186, 210 пн. Продукт амплификации размером 186 пн по локусу NCPGR90 выявлен только у сорта Триумф. Сорта Днепровский высокорослый и Слобожанский объединяются с высокой степенью достоверности, однако в связи с отсутствием у нас информации об их родословных, невозможно сравнить их по происхождению. Родословные сортов Триумф и Луганец известны, однако общность в происхождении между ними не выявлена.

Сорт Гибрид 25 не вошел ни в один кластер, но тяготеет к кластеру 4. От представителей кластера 4 Гибрид 25 отличало наличие аллельных вариантов 215, 225 и 200 пн локусов NCPGR50, NCPGR57, NCPGR81, соответственно. Среди них только аллельный вариант 225 пн (NCPGR57) является уникальным. Родословная сорта Гибрид 25 нам не известна.

Таким образом, в результате кластеризации сортов нута из России и Украины показана их значительная дифференциация по сравнению с группированием сортов по морфологическим признакам. В NJ – дереве, построенном на основе молекулярных данных, отмечается большее количество узлов с высокими бутстреп-значениями. Несмотря на это, генотипы многих сортов нута по изученным микросателлитным локусам подобны друг другу, о чем, вероятно, свидетельствует наличие большого количества узлов с невысокой достоверностью (рис. 2). Дифференцирующими явились наиболее полиморфные локусы – NCPGR81, CaSTMS14, NCPGR90, NCPGR94. При анализе доступных авторам родословных сортов нута выявлено, что многие изученные сорта нута созданы на основе генотипов Кубанский 163 и Кубанский 199. Очевидно, это обусловило объединение сортов в кластер 2. Следует отметить, что сорта нута, в которых встречались уникальные аллельные варианты микросателлитных локусов, согласно родословным отличались иным происхождением. Так, например, Наум – единственный местный сорт в общей выборке сортов нута, а в родословных сортов Юбилейный и Триумф присутствуют зарубежные сортообразцы. Происхождение сортов Крымский 139, Гибрид 25 и ВИР 32, в которых также отмечены уникальные аллельные варианты, нам не известно. Можно предположить, что эти сорта создавались при участии генотипов, не связанных родством с проанализированными нами сортообразцами нута.

***Анализ обобщенного NJ-дерева, построенного на основе морфологических и молекулярно-генетических данных сортов нута из Украины и России***

При кластеризации сортов нута по морфологическим признакам и разнообразию микросателлитных локусов были получены NJ-деревья с несколько отличающимися топологиями. Вместе с тем, другие авторы отмечают высокое сходство топологий деревьев, полученных на основе морфологических и молекулярных данных, при кластеризации сортов нута, а также других видов растений (Talebi et al, 2008).

В наших исследованиях несколько узлов с высокой достоверностью отмечались в обоих согласованных деревьях, построенных на основе фенотипических и молекулярно-генетических данных. Так, сорта Совхозный 14, Колорит, Краснокутский 123, Колорит и Пегас

всегда образовывали один кластер. В родословных этих сортов присутствуют генотипы сортов Кубанский 163 и Кубанский 199. При анализе топологии двух деревьев с высокой достоверностью объединяются также сорта Шахтинский и Юбилейный. К сожалению, родословная сорта Шахтинский неизвестна, поэтому провести сравнительный анализ по происхождению сортов не представляется возможным.

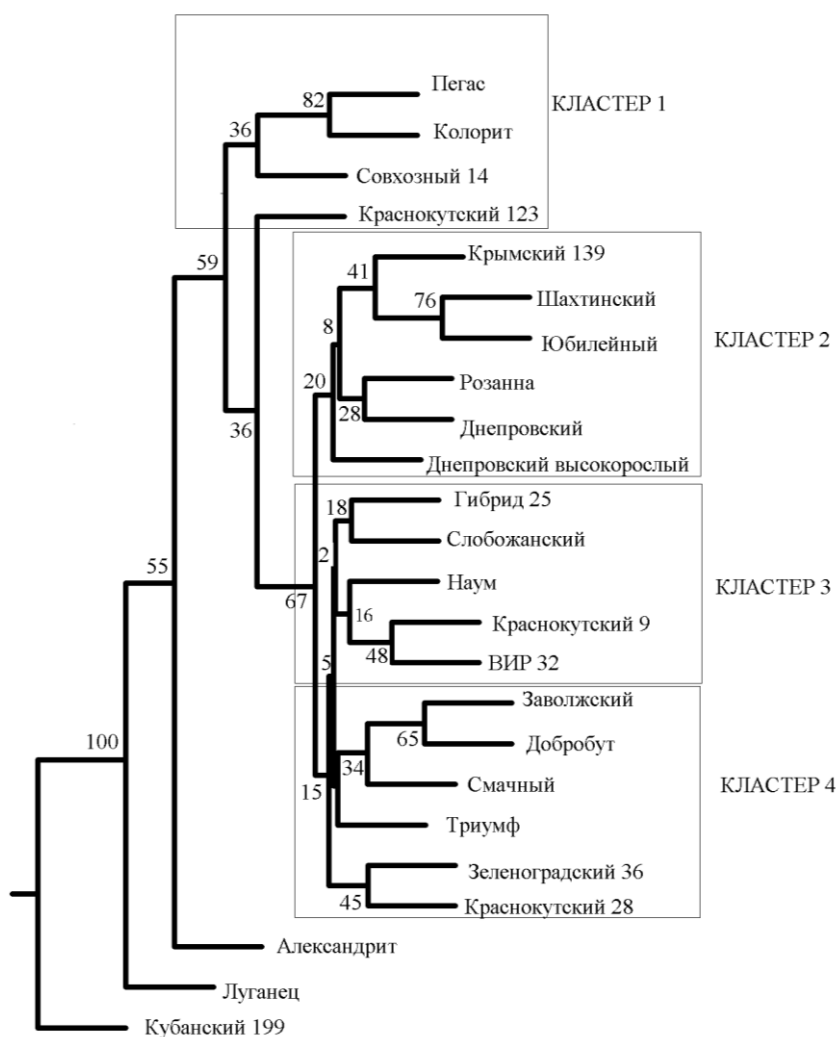
Другие изученные сорта нута по-разному группировались в NJ-деревьях с низкими бутстреп-значениями. Причинами этого может быть недостаточное количество дифференцирующих признаков, а также высокая идентичность сортов по описанным признакам. Для проверки этих предположений было построено обобщенное NJ-дерево на основе совместной матрицы морфологических и молекулярных данных. В обобщенном дереве сохранялись определенные закономерности в группировании сортов, которые были выявлены при анализе топологии деревьев, полученных по морфологическим и молекулярным данным. Сорта группировались в четыре кластера (рис. 3). Сорта Александрит, Луганец, Кубанский 199 не вошли ни в один из выделенных кластеров, но находились вблизи кластера 4. Сорт Луганец отличался от других изученных сортов нута наличием семян горохового типа, сорт Кубанский 199 – черными мелкими семенами. Обособление сорта Александрит в обобщенном дереве, по-видимому, определяет наличие сходных аллельных вариантов с сортами Луганец и Кубанский 199 по большинству изученных микросателлитных локусов.

Дифференциация сортов в обобщенном NJ-дереве занимала промежуточное положение между топологиями на основе морфологических и молекулярных данных. Так, максимальное расстояние Nei составило 0,018935 между сортами Заволжский и Кубанский 199, минимальное – 0,001173 между сортами Шахтинский и Юбилейный.

В кластер 1 вошли четыре сорта, которые имеют общее происхождение (рис. 3). Как уже отмечалось выше, эти сорта представляли один кластер и в отдельных деревьях, построенных на основе морфологических и молекулярно-генетических данных.

Сорта кластеров 2, 3, 4 относятся к разновидности *kabuli* с белыми цветками и светлыми семенами, несколько различающимися по набору аллельных вариантов микросателлитных локусов. Наиболее достоверные узлы сре-

### КЛАССИФИКАЦИЯ СОРТОВ НУТА



**Рис. 3. Обобщенное NJ-дерево, отражающее взаимосвязи сортов нута из России и Украины, построенное на основе полиморфизма 15 морфологических признаков и 13 микросателлитных локусов.**

ди них образовали сорта Юбилейный – Шахтинский (бутстреп-значение 76%), Заволжский – Добробут (бутстреп-значение 65%). Остальные сорта группировались с низким уровнем достоверности, что предполагает возможным другие топологии в этих кластерах и подтверждает высокую идентичность многих сортов нута из Украины и России по изученным морфологическим и молекулярным признакам.

В результате анализа полиморфизма сортов нута из России и Украины по морфологическим и молекулярно-генетическим данным отмечен сходный уровень их разнообразия ( $H' = 0,70$  и  $0,74$ , соответственно). Вместе с тем, полиморфизм микросателлитных локусов явился лучшим дифференциатором сортов нута. Так, максимальное расстояние Nei между сортами нута, рассчитанное на основе молекулярных

данных, составило 0,047968, а минимальное 0,000000, в то время как для фенотипических данных эти же показатели составили 0,019485 и 0,000918, соответственно.

Основными дифференцирующими фенотипическими признаками сортов нута оказались окраска цветков, семян, форма и характер поверхности семян. По этим дескрипторам сорта нута четко группировались в две группы – *kabuli* (кластер 1,2) и *desi* (кластер 3, 4 – сорт Кубанский 199) (рис. 1). Сорт Луганец (кластер 4) относится к промежуточному гороховому типу.

В кластере 2 выявлены родственные взаимосвязи между сортами Краснокутский 123, Совхозный 14, Пегас, Колорит. В их родослов-

ных присутствуют генотипы сортов Кубанский 163 и Кубанский 199.

При анализе топологии дерева, полученного по данным об изменчивости микросателлитных локусов, группирование вышеописанных сортов сохранялось. Так, сорта Краснокутский 123, Совхозный 14 и Пегас по-прежнему находились в одном кластере с высокими бутстреп-значениями (рис. 2). Однако, несмотря на это, сохранялось большое количество узлов с низкими бутстреп-значениями. Наиболее вероятными причинами этого является недостаточное количество дескрипторов и высокая идентичность сортов нута. С целью проверки этих предположений было построено обобщенное NJ-дерево на основе морфологических и молекулярно-генетических данных. В обобщенном дереве сохранялись тенденции, отмеченные в отдельных деревьях, построенных по морфологическим и молекулярным данным. Так, сорта, имеющие общее происхождение, объединялись в один кластер (рис. 3). Однако большинство сортов объединялось в группы с низким уровнем достоверности, что, очевидно, свидетельствует об их высокой идентичности.

Таким образом, в нашем исследовании выявлена незначительная дифференциация сортов нута из России и Украины по морфологическим признакам и микросателлитным локусам. Описана группа сортов, которая имеет родственное происхождение. Показано, что полиморфизм микросателлитных локусов в сортах нута проявляет лучшую дифференцирующую способность по сравнению с морфологическими признаками. Результаты исследования являются актуальными для мониторинга и инвентаризации Национальной коллекции генетических ресурсов Украины и свидетельствуют о необходимости расширения генетической основы отечественных сортов нута.

## ЛИТЕРАТУРА

- Безугла О.М., Кобизева Л.Н., Рябчун В.К. та ін. Широкий уніфікований класифікатор України роду *Phaseolus* L. – X., 2004. – 51 с.
- Брик А.Ф., Календарь Р.Н., Стратула О.Р., Сиволап Ю.М. IRAP- и REMAP-анализ сортов ячменя одесской селекции // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 3. – С. 24-33.
- Брик А.Ф., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация сортов сои (*Glycine max* L.) // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 9. – С. 1266-1273.
- Коваль С.Ф., Коваль В.С., Тымчук С.М., Богуславский Р.Л. Генетические коллекции: проблемы формирования, сохранения и использования // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37, № 4. – С. 46-53.
- Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 59-66.
- Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. – М.: Мир, 1992. – 181 с.
- Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Конарев А.В., Балфорьер Ф. Генетическая дифференциация гексаплоидной пшеницы по данным анализа микросателлитных локусов // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 11. – С. 1530-1539.
- Рябчун В.К., Богуславский Р.Л. Проблеми та перспективи збереження генофонду рослин в Україні. – X., 2002. – 38 с.
- Саналатий А.В., Солоденко А.Е., Сиволап Ю.М. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSRP-анализа // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 4. – С. 37-43.
- Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н. Исследование внутривидового полиморфизма и идентификация генотипов ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 6. – С. 35-41.
- Смирнов В.Г. Значение генетических коллекций для фундаментальных исследований и селекционных программ // Идентифицированный генофонд растений и селекция. – СПб.: ВИР, 2005. – С. 783-806.
- Чеботарь С.В., Сиволап Ю.М. Дифференциация, идентификация и создание базы данных сортов *T. aestivum* L. украинской селекции на основе STMS-анализа // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 6. – С. 18-27.
- Ahmad F., Gaur P.M., Slinkard A.E. Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations in the genus *Cicer* L. // Theor Appl Genet. – 1992. – V. 83. – P. 620-627.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. Current protocols in molecular biology. – N.Y.: John Wiley & Sons, 1987. – P. 4.3.1-4.3.3.
- Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E. et al. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media. // Biotechniques. – 2004. – V. 37, № 4. – P. 598-602.
- Ghafoor A., Gulbaaz F.N., Afzal M. et al. Interrelationship between SDS-PAGE markers and agronomic traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Pak. J. Bot. – 2003. – V. 35, № 4. – P. 613-624.

## КЛАССИФИКАЦИЯ СОРТОВ НУТА

- Huttel B., Winter P., Weising K. et al. Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Genome. – 1999. – V. 42. – P. 210-217.
- Iruela M., Rubio J., Cubero J.I. et al. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers // Theor. Appl. Genet. – 2002. – V. 104. – P. 643-651.
- Rumpunen K., Bartish I., Garkava-Gustavsson L. et al. Molecular and morphological diversity in the plant genus *Chaenomeles* // Japanese Quince – Potential Fruit Crop for Northern Europe. – Swedish University of Agricultural Sciences, 2003. – P. 1-13.
- Sant V.J., Patankar A.G., Sarode N.D. et al. Potential of DNA markers in detecting divergence and analysis in heterosis in Indian elite chickpea cultivars // Theor. Appl. Genet. – 1999. – V. 98. – P. 1217-1225.
- Sethy N., Edwards B., Bhatia S. Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2006. – V. 112. – P. 1416-1428.
- Talebi R., Fayaz F., Mardi M. et al. Genetic relationships among chickpea (*Cicer arietinum*) elite lines // Int. J. Agri. Biol. – 2008. – V. 10, № 3. – P. 301-305.
- Udupa S.M., Sharma A., Sharma R.P., Pai R.A. Narrow genetic variability in *Cicer arietinum* L. as revealed by RFLP analysis. // J. Plant Biochem. Biotech. – 1993. – V. 2. – P. 83-86.
- Upadhyaya H., Ortiz R., Bramel P., Singh S. Phenotypic diversity for morphological and agronomic characteristics in chickpea core collection // Euphytica. – 2002. – V. 123 – P. 333-342.
- Upadhyaya H. Geographical patterns of variation for morphological and agronomic characteristics in the chickpea germplasm collection // Euphytica. – 2003. – V. 132. – P. 343-352.
- Upadhyaya H., Dwivedi S., Baum M. et al. Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // BMC Plant Biol. – 2008. – V. 8. – № 106.
- Zhang X., Zhang Y.J., Yan R. et al. Genetic variation of white clover (*Trifolium repens* L.) collections from China detected by morphological traits, RAPD and SSR // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – V. 9, № 21. – P. 3032-3041.

Поступила в редакцию  
28.01.2011 г.

## CLASSIFICATION OF CHICKPEA CULTIVARS BASED ON MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS

G. Ye. Akinina<sup>1</sup>, O. M. Bezuglaya<sup>2</sup>, V. M. Popov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>V.V. Dokuchayev Kharkiv Agrarian University  
(Kharkiv, Ukraine)

<sup>2</sup>Yurjev Plant Production Institute  
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
(Kharkiv, Ukraine)

Polymorphism of 24 chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars from Ukraine and Russia using 15 morphological traits and 13 microsatellites loci is analyzed in this work. The similar level of polymorphism in chickpea cultivars using different types of data that was estimated by the diversity index of Shannon is marked. It is shown that microsatellites loci are better differentiate descriptors of chickpea cultivars as compared to morphological traits: flower color; color, form and seed surface nature of seeds. It is revealed, that all studied chickpea cultivars from Ukraine and Russia show insignificant differentiation in connection with their high identity by studied traits. Possible reasons of chickpea cultivars clustering in connection with their origin are discussed. The chickpea cultivars group in which pedigrees are dominate the genotypes of two cultivars Kubanskiy 163 and Kubanskiy 199 is described.

**Key words:** *Cicer arietinum* L., microsatellites, morphological descriptors, genetics and phenotypic variability, genetic distances

**КЛАСИФІКАЦІЯ СОРТІВ НУТУ  
ЗА МОРФОЛОГІЧНИМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНИМИ МАРКЕРАМИ**

Г. Є. Акініна<sup>1</sup>, О. М. Безугла<sup>2</sup>, В. М. Попов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва  
(Харків, Україна)*

<sup>2</sup>*Інститут рослинництва ім. В.Я.Юр'єва  
Національної академії аграрних наук України  
(Харків, Україна)*

Проаналізовано поліморфізм 24 сортів нуту (*Cicer arietinum* L.) з України і Росії за 15 морфологічними ознаками і 13 мікросателітними локусами. Виявлено схожий рівень поліморфізму в сортах нуту за різними типами даних, оцінений за індексом поліморфізму Шеннона. Показано, що мікросателітні локуси є кращими диференціюючими дескрипторами сортів нуту порівняно з морфологічними ознаками: забарвлення квіток, колір, форма і характер поверхні насіння. Виявлено, що всі вивчені сорти нуту з України і Росії виявляють незначну диференціацію у зв'язку з їх високою ідентичністю за вивченими ознаками. Обговорюються можливі причини кластеризації сортів у зв'язку з їх походженням. Описана група сортів нуту, в родоводах яких домінують генотипи сортів Кубанський 163 і Кубанський 199.

**Ключові слова:** *Cicer arietinum* L., мікросателіти, морфологічні дескриптори, генетична і фенотипічна мінливість, генетичні відстані