



Міністерство аграрної політики
та продовольства України



Український інститут
експертизи сортів рослин



Поєднання фенотипових та молекулярних дистанцій для управління референсною колекцією сортів кукурудзи

м. Вінниця
ТОВ «ТВОРИ»
2024

Міністерство аграрної політики та продовольства України

Український інститут експертизи сортів рослин

**Поєднання фенотипових
та молекулярних дистанцій
для управління референсною колекцією
сортів кукурудзи**

м. Вінниця
ТОВ «ТВОРИ»
2024

Автори: Л. М. Присяжнюк, С. М. Гринів, М. М. Таганцова, Є. М. Стариченко, І. О. Діхтяр, Ю. В. Шитікова, С. І. Мельник

Рецензенти:

Ліханов А. Ф., доктор біологічних наук, доцент, професор кафедри ботаніки, дендрології та лісової селекції Національного університету біоресурсів і природокористування України;

Карпук Л. М., доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач кафедри землеробства, агрохімії та ґрунтознавства Білоцерківського національного аграрного університету.

Розглянуто, схвалено та рекомендовано до друку Вченою радою Українського інституту експертизи сортів рослин (протокол № 18 від 04 грудня 2024 року).

Присяжнюк Л. М., Гринів С. М., Таганцова М. М. та ін. Поєднання фенотипових та молекулярних дистанцій для управління референсною колекцією сортів кукурудзи. Науково-методичні рекомендації. Вінниця : ТОВ «ТВОРИ», 2024. 24 с.

ISBN 978-617-552-720-7

У науково-методичних рекомендаціях представлено результати досліджень, проведених в Українському інституті експертизи сортів рослин. Авторами запропоновано застосування підходу розрахунку фенотипових та молекулярних дистанцій між лініями кукурудзи звичайної для управління референсною колекцією загальновідомих сортів. Наведено методику екстракції ДНК з рослинного матеріалу, проведення ПЛР та капілярного електрофорезу продуктів ампліфікації.

Рекомендації призначені для експертів сорту та фахівців Українського інституту експертизи сортів рослин, селекціонерів, спеціалістів науково-дослідних установ, викладачів закладів вищої освіти та аспірантів, які вивчають теоретичні та методологічні основи сучасної селекції та експертизи сортів рослин.

ЗМІСТ

Терміни та скорочення	4
Вступ	5
1. Молекулярно-генетичний аналіз	6
1.1. Екстракція ДНК з рослинного матеріалу	6
1.2. Проведення ПЛР ДНК кукурудзи за SSR маркерами	8
1.3. Капілярний електрофорез продуктів ПЛР	9
2. Підготовка даних морфологічних ознак та молекулярних характеристик	12
2.1. Підготовка даних молекулярних характеристик для імпортування в ПЗ GAIA	12
2.2. Підготовка даних морфологічних ознак для імпортування в ПЗ GAIA	14
2.3. Підготовка текстових файлів даних вагомості різниці ступенів прояву морфологічних ознак та молекулярних характеристик	16
3. Визначення молекулярних та морфологічних дистанцій за допомогою ПЗ GAIA	19
3.1. Визначення параметрів сесії та проведення порівнянь	19
3.2. Представлення та інтерпретація результатів порівнянь	20
Список використаних літературних джерел	23

Терміни та скорочення

Алель – алель мікросателітного локуса, що характеризуються значним поліморфізмом довжини

ВОС – відмінність, однорідність та стабільність

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПЗ – програмне забезпечення

GAIA – комп'ютерна програма для обробки даних ВОС в поєднанні з генетичними дистанціями

SSR – (simple sequence repeats) прості, тандемно організовані повтори ДНК, з розміром мономера від двох до п'ятих пар нуклеотидів

UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) – Міжнародний союз з охорони нових сортів рослин

Вступ

У багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні, існує досить багато досліджень, пов'язаних із застосуванням ДНК маркерів для оцінки генетичного різноманіття. З початку 2000-х років низкою держав, що є членами UPOV започатковано застосовування додаткових методів оцінки сортів з використанням біохімічних та молекулярних методів для управління референсними колекціями сортів рослин.

Наразі, розробка та застосування підходу для реалізації завдань кваліфікаційної експертизи сортів рослин на ВОС із використанням сучасних методів обробки даних на основі фенотипових дистанцій та застосування методів молекулярного аналізу для прийняття рішення про відмінність сортів набуває актуальності у зв'язку із збільшенням кількості нових сортів та звуженням спектру прояву морфологічних ознак.

Основною задачею використання методів молекулярно-генетичного аналізу є підвищення об'єктивності оцінки нових сортів та зменшення кількості сортів, що необхідно випробовувати в польових умовах поряд один з одним (side-by-side). З метою оцінки нових сортів та управління колекціями загальновідомих сортів державами-членами UPOV застосовуються поєднання оцінки сортів за якісними та кількісними морфологічними ознаками, а також порівняння молекулярних дистанцій між сортами.

В документі серії TGP (Test Guidelines Programme) – TGP/15 Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS) міститься керівництво щодо застосування біохімічних та молекулярних маркерів під час експертизи на ВОС на основі схвалених UPOV моделей та приклади їх використання країнами-членами UPOV. Відповідно до викладеної концепції, ключовою особливістю Моделі 2 є управління колекцією загальновідомих сортів, які за фенотиповими та молекулярними дистанціями є достатньо відмінними з метою скорочення польових випробувань.

Для реалізації Моделі 2 спеціалістами GEVES (Група по вивченню та контролю сортів та насіння Франції) розроблено ПЗ GAIA, що поєднує аналіз прояву морфологічних ознак та молекулярних характеристик сортів.

У науково-методичних рекомендаціях описано підхід щодо визначення фенотипових та молекулярних дистанцій між лініями кукурудзи звичайної із застосуванням ПЗ GAIA, а також наведено умови екстракції ДНК, проведення ПЛР та капілярного електрофорезу продуктів ампліфікації з метою управління референсною колекцією загальновідомих сортів кукурудзи. Для досліджень використовували 57 ліній кукурудзи звичайної, що відібрані експертами сорту відповідно до ступеню їх подібності між собою.

1. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ

1.1. Екстракція ДНК з рослинного матеріалу

Обладнання та матеріали:

аналітичні ваги; мікроцентрифуга з ротором для мікропробірок (прискорення не менше 12000 g); термостат для мікропробірок (орієнтовний діапазон температур 10–100°C); вортекс; витяжна шафа; сушарка вакуумна (за потреби); порцелянові ступки і товчачики (у разі екстракції ДНК із проростків або частини рослини); шпатель та плашки для наважок; холодильник з морозильною камерою (температура не менше -20°C); мікропробірки на 1,5–2 мл; штативи для пробірок; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; спектрофотометр (спектральний діапазон від 260 нм); одноразові кювети.

Реактиви (ступінь очистки – «чда»):

- ізопропіловий спирт; ізопропанол; 2-пропанол – $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$;
- EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid; етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль дигідрат – $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$, EDTA;
- етиловий спирт; етанол – $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$;
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane; 2-аміно-2-гідрооксиметил-1,3-пропандіол; тріс; TRIZMA – $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$;
- хлорид натрію – NaCl;
- хлороформ; трихлорметан; метилтрихлорид – CHCl_3 ;
- СТАВ; cetyltrimethylammonium bromide; ЦТАБ – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$;
- н-Гексан, норм-Гексан – $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$;
- гідроксид натрію – NaOH;
- хлороводнева кислота – HCl;
- деіонізована вода.

Приготування розчинів:

– лізуючий розчин (на 200 мл: СТАВ – 4 г; NaCl – 16,4 г; Tris – 3,15 г; EDTA – 1,5 г, pH розчину 8,0). Кінцеві концентрації компонентів: 20 мМ EDTA; 100 мМ Tris-HCl; 1,4 М NaCl; 2% СТАВ. Зберігають за температури 4°C до 4 місяців.

– розчин для преципітації (на 200 мл: СТАВ – 1 г; NaCl – 0,5 г, pH розчину 8,0). Кінцеві концентрації компонентів: 0,5% СТАВ; 0,04 М NaCl. Зберігають розчин при 4°C до 4 місяців.

– хлороформ; трихлорметан; метилтрихлорид – CHCl_3 (Мм = 119,37).

– розчин 1,2 М NaCl (на 100 мл: NaCl – 7 г). Зберігають при кімнатній температурі до 6 місяців.

– ізопропіловий спирт; ізопропанол; 2-пропанол – $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (Мм=60,10)

– розчин для відмивання (70% етиловий спирт). Зберігають розчин при кімнатній температурі до 6 місяців.

– розчин ТЕ (на 200 мл: 0,5 М EDTA pH 8,0 – 400 мкл; 1 М Tris-HCl pH 8,0 – 1 мл). Кінцеві концентрації ТЕ розчину: 1 мМ EDTA pH 8,0; 10 мМ Tris-HCl pH 8,0. Зберігають розчин при 4°C до 6 місяців.

- розчин 0,5 М EDTA (на 200 мл: 37,22 г EDTA, рН розчину 8,0). Зберігають за температури 4°C до 6 місяців.
- розчин 1 М Tris-HCl (на 200 мл: 24,2 г Tris, рН розчину 8,0. Зберігають за температури 4°C до 6 місяців.
- рН розчинів регулюють за допомогою 1 М NaOH або концентрованої HCl.

Проведення екстракції ДНК

1) Для виділення ДНК використовують подрібнені до стану борошна зернівки (наважка – 25 мг), проростки насіння, отримані відповідно до чинних ДСТУ та частини рослини (молоді листки) – наважка 50 мг.

2) Наважку зразка змішують або розтирають у ступці (у разі екстракції ДНК із проростків або частини рослини) з 500 мкл лізуючого розчину та переносять у мікроцентрифужну пробірку.

У разі екстракції ДНК із насіння соняшнику, перед етапом лізису, до наважки зразка додають 500 мкл н-гексану та вортексують. Інкують протягом 30 хв за кімнатної температури та повністю видаляють н-гексан. Осад висушують до повного випаровування н-гексану.

3) Інкують за температури 65°C протягом 45 хв. Після цього центрифугують за 13000 g протягом 10 хв.

4) Весь супернатант ~300 мкл переносять у нову мікроцентрифужну пробірку та додають хлороформ у співвідношенні 1:1 до відібраного супернатанту, обережно перемішують протягом 30 с.

5) Після центрифугування за 13000 g упродовж 10 хв переносять верхній шар (~250 мкл) у нову мікроцентрифужну пробірку та повторюють п. 5.

6) Після центрифугування за 1000 g протягом 5 хв додають 2 об'єми (~500 мкл) розчину для преципітації та обережно перемішують.

7) Інкують 60 хв за кімнатної температури.

8) Центрифугують за 13000 g протягом 5 хв та обережно видаляють супернатант не зачіпаючи осад (преципітат).

9) Розчиняють преципітат в 350 мкл 1,2 М NaCl та додають 0,6 об'єму (210 мкл) охолодженого ізопропілового спирту, обережно перемішують.

10) Центрифугують за 13000 g протягом 10 хв, після чого видаляють супернатант, не зачіпаючи осад. До отриманого осаду додають 500 мкл 70% етилового спирту, обережно перемішують.

11) Центрифугують за 13000 g протягом 10 хв, видаляють супернатант. Осад підсушують за 60°C протягом 30 хв.

12) Сухий осад, в якому міститься ДНК розчиняють в 50 мкл розчину TE. Отриману ДНК одразу використовують для проведення ПЛР або зберігають за температури +4°C не більше одного місяця.

13) Концентрацію та чистоту ДНК визначають за допомогою спектрофотометра при довжинах хвиль 260 та 280 нм.

1.2. Проведення ПЛР ДНК кукурудзи за SSR маркерами

Обладнання та матеріали для ПЛР:

ампліфікатор (термоциклер); мікроцентрифуга з ротором для мікропробірок; мікроцентрифуга з ротором під плашки (прискорення не менше 2000 g); вортекс; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; пробірки 1,5–2,0 мл; пробірки або плашки для ПЛР, які сумісні із термоблоком ампліфікатора; штативи для пробірок; кришки для пробірок або покривна плівка для плашок.

Реактиви для ПЛР:

- термостабільна ДНК полімераза;
- дезоксинуклеотидтрифосфати (dNTP);
- ПЛР буфер;
- $MgCl_2$ (у складі ПЛР буферу або окремо);
- праймери (таблиця 1.1);
- вода для ПЛР.

Умови проведення ПЛР:

1) Розраховують кількість компонентів реакційної суміші для проведення ПЛР відповідно до їх кінцевих концентрацій у загальному об'ємі реакції (таблиця 1.2).

2) Реакційну суміш готують у пробірці 1,5–2,0 мл. Розрахунок компонентів ПЛР здійснюють з урахуванням можливих втрат під час внесення суміші у пробірки або плашки для ПЛР (фактична кількість зразків + 10% від фактичної кількості зразків).

3) Додають в кожну пробірку або лунку плашки для ПЛР кількість реакційної суміші, яка відповідає параметрам ПЛР, визначеним для певних SSR маркерів.

4) Після цього в кожну пробірку або лунку плашки для ПЛР додають відповідну до параметрів ПЛР кількість ДНК. Всі операції бажано проводити на льоду з метою уникнення утворення неспецифічних фрагментів реакції.

5) Готову реакційну суміш центрифугують для осадження крапель та бульбашок протягом 15 с за 2000 g. Пробірки або плашки з реакційною сумішшю поміщають в ампліфікатор та задають параметри ПЛР (таблиця 1.3).

Таблиця 1.1.

Характеристика праймерів

SSR	Послідовність праймерів 5'→3'	Хромосома	Мотив	Очікуваний розмір алелів, п.н.
phi064	*F - CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT **R - ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC	1	(ATCC) _n	75–110
umc1448	F - ATCCTCTCATCTTTAGGTCCACCG R - CATATACAGTCTCTCTGGCTGCTCA	2	(GCT) ₅	137–161
umc1061	F - AGCAGGAGTACCCATGAAAGTCC R - TATCACAGCACGAAGCGATAGTG	10	(TCG) ₆	97–107
bnlg1782	F - CGATGCTCCGCTAGGAATAG R - TGTGTTGGAAATGACCCAA	8	(AG) ₁₃	219–236

Продовження Таблиці 1.1.

SSR	Послідовність праймерів 5'→3'	Хромосома	Мотив	Очікуваний розмір алелів, п.н.
bnlg1129	F - GAGAGTATGCTACTCGCCGC R - GACGAGTTTGGAGTGCCATT	9	(AG) ₁₂	179–202
phi093	F - AGTGCCTCAGCTTCATCGCCTACAAG R - AGGCCATGCATGCTTGCAACAATGGATACA	4	AGCT	281–294
phi233376	F - CCGGCAGTCGATTACTCC R - CGAGACCAAGAGAACCCTCA	8	CCG	140–159
phi083	F - CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC R - ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT	2	(AGCT) ₂	123–136
phi96100	F - AGGAGGACCCCAACTCTG R - TTGCACGAGCCATCGTAT	2	ACCT	275–294

*F – прямий праймер; **R – зворотний праймер

Таблиця 1.2.

Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	1,8 мМ
dNTP	250 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,25 мкМ
Зворотний праймер	0,25 мкМ
Вода для ПЛР	-
ДНК (концентрація 20 нг/мкл)	1,5 мкл (~2,5 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 кл

Таблиця 1.3.

Параметри ПЛР

1 цикл	10 циклів (TD від 64°C до 55°C)	30 циклів			1 цикл	1 цикл
94°C	94°C		94°C			
10:00*	00:30	72°C	00:30	72°C	72°C	
		64°C	00:30	55°C	00:30	10:00
		00:30		00:30		10°C
Тип реакції – touchdown (TD)						

*Примітка: одиниці вимірювання часу «хвилини:секунди»

1.3. Капілярний електрофорез продуктів ПЛР

Обладнання та матеріали для капілярного електрофорезу:

мікроцентрифуга з ротором для мікропробірок; мікроцентрифуга з ротором під плашки (прискорення не менше 2000 g); вортекс; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; пробірки 1,5–2,0 мл; штативи для пробірок; система капілярного електрофорезу з детекцією флюоресценції (аналізатор нуклеїнових кислот); капілярна матриця з робочою довжиною капілярів не менше 33 см; плашки, які сумісні із системою капілярного електрофорезу: для зразків, для буферних розчинів; мірні циліндри.

Реактиви для капілярного електрофорезу:

– набір реактивів для капілярного електрофорезу (розмір ампліконів 50–1500 п.н.), деіонізована вода (ступінь очистки не менше 18,2 МОм).

Умови проведення капілярного електрофорезу*

Принцип методу базується на автоматичному високопродуктивному розділенні нуклеїнових кислот у тонких трубках капілярів (зовнішній діаметр 50 мкм) заповнених гелевими матрицями під дією електричного поля. Детекція розділених за розмірами нуклеїнових кислот відбувається в кінцевій точці капілярів за рахунок флюоресценції чутливого інтеркалюючого барвника, який знаходиться в матриці гелю в процесі аналізу та випромінює флюоресценцію, коли зв'язується з молекулами нуклеїнових кислот.

Для проведення капілярного електрофорезу користуються інструкцією до приладу, яким оснащена лабораторія та інструкцією до набору реактивів для капілярного електрофорезу відповідно до довжини капілярної матриці.

1) Необхідні плашки для аналізу: плашка для зразків на 96 лунок, плашка для маркеру молекулярної маси та плашка для зберігання капілярів – 96-лункові ПЛР плашки з напів-юбкою (Semi-skirted 96-Well PCR Plates); плашка для вхідного буферу та відходів – 96-лункові (глибокі лунки з заокругленим дном) плашки об'ємом 1 мл (Deer 96-Well Plates).

2) У програмному вікні обирають тип набору реактивів для капілярного електрофорезу, довжину матриці капілярів, задають об'єм гелю та кондиціонуючого буферу, та підписують зразки.

3) Підготовка гелю: для аналізу 96 зразків наповнюють відповідну ємність 40 мл гелю та додають 4 мкл інтеркалюючого барвника. Добре перемішують уникаючи утворення бульбашок та під'єднують до системи закачування гелю в приладі.

4) Підготовка кондиціонуючого буферу: готують 1×кондиціонуючий буфер (5×кондиціонуючий буфер розводять деіонізованою водою). Для аналізу 96 зразків наповнюють відповідну ємність 40 мл 1×кондиціонуючого буферу та під'єднують до системи закачування буферу в приладі.

5) Підготовка плашки для вхідного буферу: в кожную лунку 96-лункової плашки Deer 96-Well Plate вноситься по 1 мл 1×вхідного буферу. Плашку, наповнену буфером, поміщають в шухлядку «В» приладу. Буфер з плашкою необхідно змінювати кожен день.

6) Підготовка плашки для маркеру молекулярної маси: в кожную лунку 96-лункової плашки Semi-skirted 96-Well PCR Plate вносять по 30 мкл розчину, що містить верхній та нижній маркери молекулярної маси (1 та 500 п.н.). На нанесений розчин маркерів додають по 20 мкл мінеральної олії. Підготовлену плашку поміщають в шухлядку «М» приладу. Плашка з розчином маркерів розрахована не менше ніж на 30 розділень.

7) Порожню плашку Deep 96-Well Plate розміщують у шухлядці «W». У неї з капілярів зливається частина відпрацьованих буферів.

8) Підготовка плашки з буфером для зберігання капілярів: у кожну лунку 96-лункової плашки Semi-skirted 96-Well PCR Plate вносять по 100 мкл буферу для зберігання капілярів та розміщують плашку у шухлядці № 3.

9) Підготовка плашки зразків: у кожну лунку (окрім H12) плашки Semi-skirted 96-Well PCR Plate вноситься по 22 мкл 1×TE буферу для розбавлення та по 2 мкл зразків (продуктів ПЛР). В лунку H12 вноситься маркер молекулярної маси 35–400 п.н. Вміст лунок необхідно ретельно перемішати, уникаючи утворення бульбашок, та потім центрифугувати протягом 15 с за 2000 g. У разі аналізу меншої кількості зразків, лунки заповнюються 1×TE буфером для розбавлення (24 мкл). Плашку із зразками поміщають в одну із шухлядок № 1, 2, слідкуючи за тим, щоб зразки стояли в тій шухлядці, яка обрана у програмі.

10) Запускають процес розділення, який на довжині матриці 55 см становить близько 1,5 години. Після закінчення розділення, візуалізація результатів доступна у вигляді графіків з характерними піками, електрофореграми та таблиці даних інтенсивності флюоресценції, кількості та розміру отриманих ампліконів.

*Примітка: процедура проведення капілярного електрофорезу описана для приладу Fragment Analyzer™ (Agilent, США), капілярна матриця на 96 зразків, робоча довжина 55 см, роздільна здатність – 3 п.н., набір для проведення капілярного електрофорезу Agilent DNF-905 dsDNA Kit 1 500 bp) (Agilent, США).

2. ПІДГОТОВКА ДАНИХ МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК ТА МОЛЕКУЛЯРНИХ ХАРАКТЕРИСТИК

2.1. Підготовка даних молекулярних характеристик для імпортування в ПЗ GAIA

1) Створюють нову базу даних та завантажують шаблон файлу Microsoft Excel, що містить 8 активних аркушів, які відповідають робочим вікнам ПЗ GAIA: Види, Сорти, Випробування, Характеристики (ознаки), якісні ознаки, дані молекулярного аналізу (електрофоретичні характеристики, ДНК маркери), кількісні ознаки та біо-молекулярні дистанції (рис. 2.1).

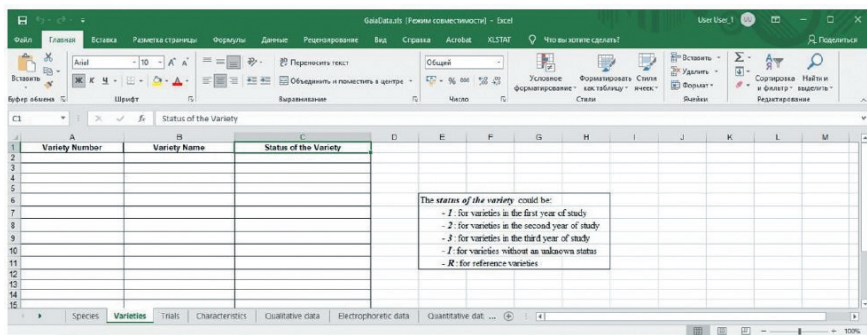


Рис. 2.1. Робоче вікно програми Microsoft Excel файлу для імпортування даних

2) Відповідно до отриманих ампліконів формують список молекулярних характеристик. Кожну характеристику представляють у вигляді «SSR маркер + алель, яка ідентифікована для досліджуваних генотипів».

3) Для 57 досліджених ліній кукурудзи звичайної за 9 SSR маркерами отримано від 4 до 12 алелів на один маркер. Список молекулярних характеристик в даному випадку налічує 68 ознак, що дорівнює загальній кількості ідентифікованих алелів (рис. 2.1).

4) З метою розрахунку молекулярних дистанцій на основі отриманих алелів будують матрицю, у якій присутність/відсутність певного алелю позначають 1/0, відповідно. Номер молекулярної характеристики, що присвоєно у складеному списку, має бути відображений у верхньому рядку таблиці побудованої матриці (рис. 2.1).

5) Розраховують молекулярні дистанції за Роджером з використанням мови програмування для статистичних розрахунків R або іншого програмного забезпечення, що дозволяє проводити аналогічні розрахунки.

6) Отримані значення молекулярних дистанцій представляють парно між досліджуваними генотипами (рис. 2.2 і 2.3).

	A	B
32	50	1061.111
33	51	1061.108
34	52	1061.103
35	53	1061.114
36	54	1061.199
37	55	983.296
38	56	983.280
39	57	983.266
40	58	983.285
41	59	983.299
42	60	983.279
43	61	1448.174
44	62	1448.145
45	63	1448.154
46	64	1448.191
47	65	1448.130
48	66	1448.159
49	67	1448.140
50	68	1448.185
51	69	1448.155
52	70	1782.240
53	71	1782.258
54	72	1782.277
55	73	1782.237
56	74	1782.249
57	75	1782.229
58	76	1782.224
59	77	1782.233
60	78	1782.269
61	79	1782.265
62	80	1782.206
63	81	1782.214
64	82	983.158
65	83	983.148
66	84	983.142
67	85	983.136
68	86	983.156
69	87	983.127

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W
1	Variety Number	Variety Status	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
2	18909054	R	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	18909054	I	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	18909089	R	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	18909089	I	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	18909108	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	18909142	R	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	18909023	I	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	18909025	R	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	18909025	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
11	18909032	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12	18909033	I	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	18909036	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	18909060	I	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	18909065	R	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	18909091	I	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	18909104	I	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	18909108	I	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
19	18909119	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
20	18909131	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	18909140	I	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
22	18909167	I	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	18909168	I	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	18909180	I	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
25	18909182	I	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	18909187	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	18909177	I	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	18909218	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	18909036	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	18909247	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	18909248	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	20309032	I	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	20309048	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	20309050	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	20309052	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	20309054	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	20309063	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	20309076	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Рис. 2.2. Робоче вікно програми Microsoft Excel файлу: аркуші Характеристика та Електрофоретичні характеристики ліній кукурудзи звичайної

	A	B	C	D
1	Variety Number	Variety Number	Type of Distance*	Value of Distance
2	18909064	18909054	ROG	0.380689
3	18909065	18909054	ROG	0.380394
4	18909089	18909054	ROG	0.380689
5	18909108	18909054	ROG	0.380689
6	18909142	18909054	ROG	0.380689
7	18909023	18909054	ROG	0.380689
8	18909025	18909054	ROG	0.380689
9	18909029	18909054	ROG	0.380689
10	18909032	18909054	ROG	0.418609
11	18909033	18909054	ROG	0.380394
12	18909036	18909054	ROG	0.380689
13	18909060	18909054	ROG	0.341056
14	18909065	18909054	ROG	0.341056
15	18909091	18909054	ROG	0.418609
16	18909104	18909054	ROG	0.341056
17	18909108	18909054	ROG	0.418609
18	18909119	18909054	ROG	0.241056
19	18909131	18909054	ROG	0.341056
20	18909140	18909054	ROG	0.341056
21	18909157	18909054	ROG	0.380394
22	18909158	18909054	ROG	0.380394
23	18909160	18909054	ROG	0.250636
24	18909162	18909054	ROG	0.418609
25	18909167	18909054	ROG	0.162409
26	18909177	18909054	ROG	0.380689
27	18909218	18909054	ROG	0.380689

Рис. 2.3. Робоче вікно програми Microsoft Excel файлу: аркуші Характеристика та Електрофоретичні характеристики ліній кукурудзи звичайної

2.2. Підготовка даних морфологічних ознак для імпортування в ПЗ GAIA

1) На аркуші Види (**Species**) вводять код та назву культури. На аркуші (**Varieties**) заносять номери заявок, назви сортів та їх статус. Статус сортів в цьому ПЗ означає рік випробування певного сорту або позначення як референсного (сорту робочої колекції загальновідомих сортів) (рис. 2.4).

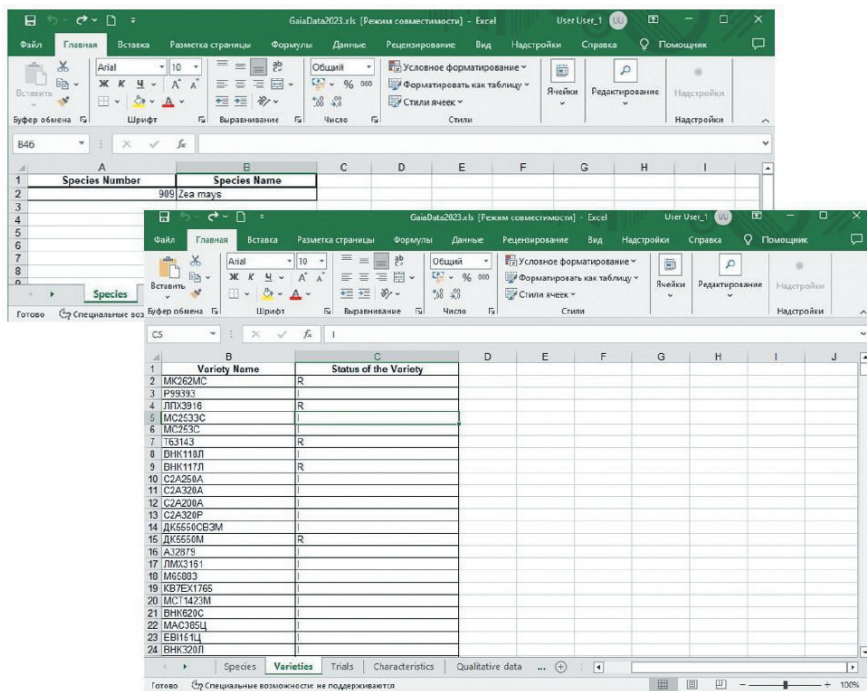


Рис. 2.4. Робоче вікно програми Microsoft Excel файлу: аркуші Види та Сорти для кукурудзи звичайної

2) На аркуші Випробування (**Trials**) вносять інформацію про точки випробування: код пункту дослідження та його назва (рис. 2.5).

3) На аркуші Характеристики (**Characteristics**) вводять номери морфологічних ознак, їх повну та коротку назви відповідно до методики проведення кваліфікаційної експертизи на ВОС. Для кукурудзи звичайної – це 41 морфологічна ознака. Також на цьому аркуші потрібно зазначити і молекулярні характеристики як вказано у пункті 3 підрозділу 2.1. Відповідно до типу ознаки вказують її цифрове позначення (**Type of characteristic**): 1 – якісні морфологічні ознаки, 2 – молекулярні характеристики, 3 – кількісні морфологічні ознаки (рис. 2.5).

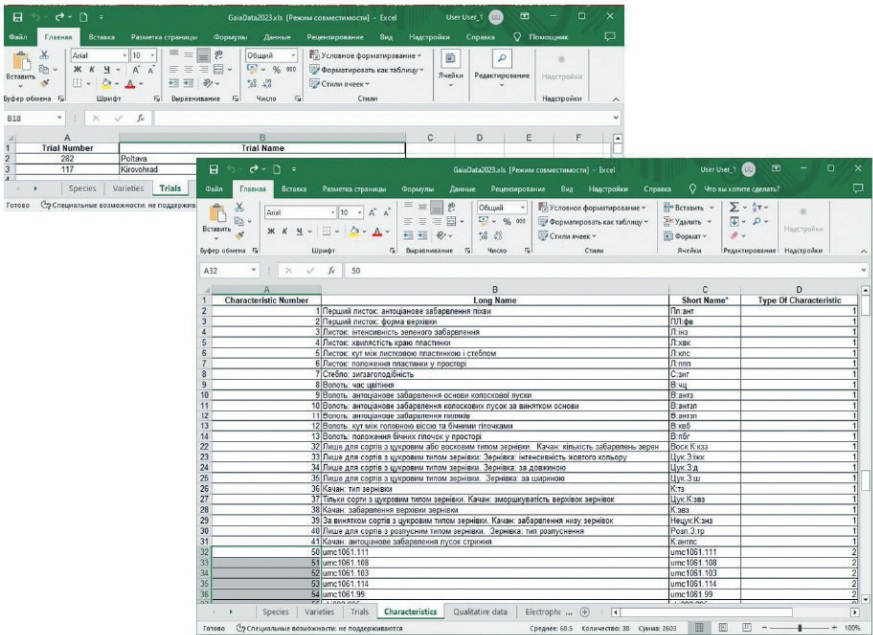


Рис. 2.5. Робоче вікно програми Microsoft Excel файлу для імпортування даних: аркуші Випробування та Характеристики кукурудзи звичайної

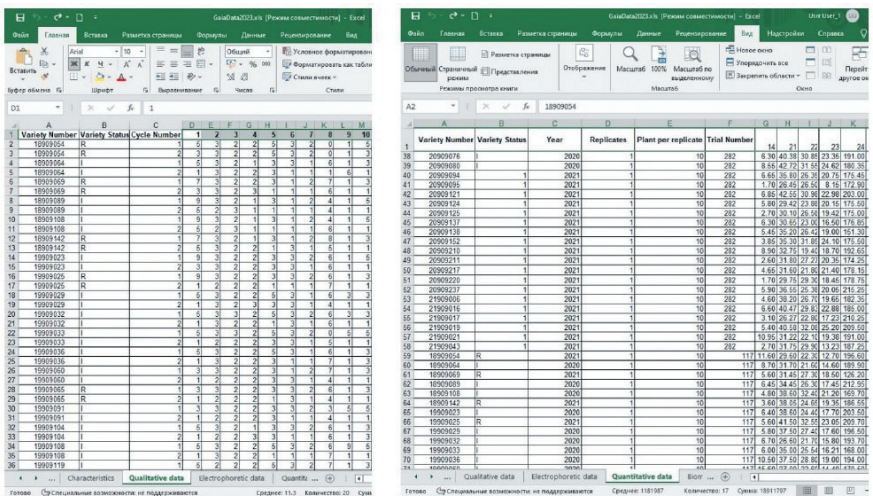


Рис. 2.6. Робоче вікно програми Microsoft Excel файлу для імпортування даних: аркуші Якісні ознаки та Кількісні ознаки ліній кукурудзи звичайної

4) На Аркуші Якісні ознаки (**Qualitative data**) вводять номер заявки, статус сорту, номер циклу (в даному випадку – код пункту досліджень) та дані якісних ознак. Дані вводяться в порядку чергування для всіх (мінімум 2) пунктів, де проводяться випробування певної культури. Якісні ознаки позначають номерами, ступені прояву – від 1 до 9.

5) На аркуші Кількісні ознаки (**Quantitative data**) заповнюють наступні поля: номер заявки, статус сорту, рік випробування, кількість повторень, кількість рослин на повторення, номер пункту дослідження та безпосередньо дані вимірювань кількісних ознак. Причому, на цьому аркуші спочатку вносяться дані по першому пункту дослідження за всіма сортами, а нижче – по другому (рис. 2.6).

2.3. Підготовка текстових файлів даних вагомості різниці ступенів прояву морфологічних ознак та молекулярних характеристик

1) Всі текстові файли, що готуються до імпортування даних, оформлюють відповідно до структури полів ПЗ GAIA.

2) У файлі ступенів прояву якісних ознак зазначають наступну інформацію: номер ознаки, код прояву ознаки та прояв ознаки.

3) У файлі вагомості різниці ступенів прояву якісних ознак вносять такі дані: номер ознаки, код прояву ознаки у стовбці (1 сорт), код прояву ознаки в рядку (2 сорт), вагомість 1 циклу (1 пункт дослідження) та вагомість 2 циклу (2 пункт дослідження). Така структура файлу базується на матричній побудові кодової формули двох сортів, що порівнюються (табл. 2.1). Вагомість різниці ступенів прояву якісних та кількісних морфологічних ознак для кукурудзи звичайної встановлено спеціалістами відділу кваліфікаційної експертизи на ВОС сортів рослин УІЕСР на основі їх досвіду та з урахуванням значимості групових ознак, рекомендованих методикою проведення експертизи сортів рослин групи зернових на відмінність, однорідність і стабільність для виду *Zea mays* L.

Таблиця 2.1.

**Матрична структура визначення вагомості різниці
ознаки «волокно: час цвітіння (8)» кукурудзи звичайної**

	Сорт 1	Сорт 2								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сорт 2	1	0	0	1	2	3	4	5	6	6
	2			0	1	2	3	4	5	6
	3				0	1	2	3	4	5
	4					0	1	2	3	4
	5						0	1	2	3
	6							0	1	2
	7								0	1
	8									0
	9									0

4) Для імпорту значень ваги різниці ступеню прояву кількісних морфологічних ознак готують два текстових файли з різною структурою. Файл № 1 включає номер ознаки, код пункту дослідження, $D_{\min-inf}$ та

$D_{\min-sup}$. Файл № 2 містить наступну інформацію: номер ознаки, напрям різниці, $P_{\min}$ та $P_{\max}$, та номер пов'язаної якісної ознаки (за наявності).

5) Для кожного випробування та кожної ознаки спеціаліст повинен визначити два мінімальних значення для розрахунку ваги кількісних ознак: найнижче значення мінімальної дистанції $D_{\min-inf}$ – величина, що використовується як основа мінімального значення ваги $P_{\min}$ та найвище значення мінімальної дистанції $D_{\min-sup}$ – величина, що використовується як основа максимального значення ваги $P_{\max}$. Різниця між двома сортами має бути більшою за встановлені певні порогові значення. Такі порогові значення можуть бути встановлені довільно або розраховані (15 або 20% середнього значення вимірюваної величини для кожного випробування, або НІР (найменша істотна різниця) на рівні 1 та 5% значущості тощо). Для аналізу ліній кукурудзи обрано порогові значення різниці – 15 та 20% середнього значення для кожного випробування.

6) Виходячи із умови про мінімальні дистанції між сортами, що спостерігаються для кожної ознаки та пункту випробування, для визначення вагомості $P_{\min}$ встановлено мінімальне значення якщо різниця більша за $D_{\min-inf}$. За умови, що різниця між середніми значеннями величини кількісної ознаки більша за $D_{\min-sup}$ встановлено максимальне значення вагомості $P_{\max}$. У випадку, якщо різниця менша за $D_{\min-inf}$ значення вагомості становить нуль (рис. 2.7).

Quant1_traits1520_cor.txt	Quant1_weights.txt
14;282;15;20	14;0;4;3;0
14;117;15;20	21;0;6;3;0
21;282;15;20	22;0;6;3;0
21;117;15;20	23;0;6;2;0
22;282;15;20	24;0;6;4;0
22;117;15;20	25;0;4;2;0
23;282;15;20	26;0;4;3;0
23;117;15;20	27;0;6;3;0
24;282;15;20	28;0;6;3;0
24;117;15;20	29;0;3;2;0
25;282;15;20	31;0;4;3;0
25;117;15;20	
26;282;15;20	
26;117;15;20	
27;282;15;20	
27;117;15;20	
28;282;15;20	
28;117;15;20	
29;282;15;20	
29;117;15;20	
31;282;15;20	
31;117;15;20	

Рис. 2.7. Структура текстових файлів вагомості різниці кількісних ознак кукурудзи звичайної

7) У файл для імпорту вагомості різниці молекулярних характеристик (електрофоретичних ознак) вносять наступні дані: номер ознаки, номер хромосоми (за розташуванням мікросателітного локусу), вагомість різниці (алеля) та вагомість маркера.

8) Вагомість відмінності між SSR маркерами та ідентифікованими алелями визначають за наступним принципом. Вище значення вагомості різниці між SSR маркерами встановлюється для маркера, за яким ідентифіковано більшу кількість алелів (маркер більш по-

ліморфний). Відповідно нижче значення вагомості отримують менш поліморфні маркери. Наприклад, якщо за маркером bnlg1782 визначено 12 алелів для досліджуваної вибірки ліній кукурудзи звичайної, то вагомість різниці для цього маркера становить 1,00, за маркером phi233376 ідентифіковано всього 4 алеля, його вагомість дорівнює 0,00. Для інших SSR маркерів вагомість різниці між маркерами розподіляється у межах від 0,25 до 0,75.

9) Для різниці між ідентифікованими алелями найвищу вагомість присвоюють алелям, що ідентифіковані за менш поліморфними маркерами. В цьому випадку, навпаки, алелі ідентифіковані за phi233376 мають вагомість 1,00, а алелі, що визначені за маркером bnlg1782 мають найнижчу вагомість для досліджуваної вибірки – 0,25. За іншими маркерами вагомість алелів встановлюється між 0,50 та 0,75.

10) У створеній базі даних ПЗ GAIA перед завантаженням підготовлених файлів (GaiaData.xls та текстових файлів) у меню Reference обирають пункт Молекулярні дистанції (Bm Distance) та встановлюють тип дистанцій: за Роджером «ROG» та «Roger's».

3. ВИЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ДИСТАНЦІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЗ GAIA

3.1. Визначення параметрів сесії та проведення порівнянь

1) Після імпортування даних визначають параметри сесій для порівняння сортів. В меню Reference ПЗ GAIA обирають пункт Сесії (Sessions) та додають нову сесію у вікні, що відкрилось. Вводять назву сесії, обирають зі списку, що випадає, ботанічний таксон, тип молекулярних дистанцій (Roger's) та задають порогові значення, що будуть визначати «Відмінні плюс» сорти: порогове значення відмінності – 8, фенотипова межа – 6 та генотипова межа – 0,30. У список ознак сесії додають всі якісні та кількісні морфологічні ознаки, а також молекулярні характеристики.

2) Для проведення порівнянь сортів в меню Comparison обирають Визначення (Definition) та у вікні, що відкрилось, створюють порівняння, обравши тип порівняння (Type of comparison) – Qualit+Quant+Vm, вводять назву порівняння, обирають ботанічний таксон (Species) та сесію (Session), параметри якої визначено попереднім кроком у вікні Сесії (Sessions).

3) Встановлюють параметри оцінки за якісними ознаками (Qualitative parameters): обирають Цикл 1 для оцінки за якісними ознаками (Cycle 1 of qualitative experiment), тобто дані, які надійшли з основного пункту досліджень). Для кількісних ознак обирають тип аналізу Minimalist (зважування, пов'язане з найменшою різницею).

4) В полі параметри порівнянь (Comparison parameters) обирають рік експертизи (Status). Після введення всіх параметрів, натискають Застосувати визначене порівняння (Validate the definition of a comparison) та запускають тип аналізу, натиснувши Запуск порівняння (Launch the comparison) (рис. 3.1).

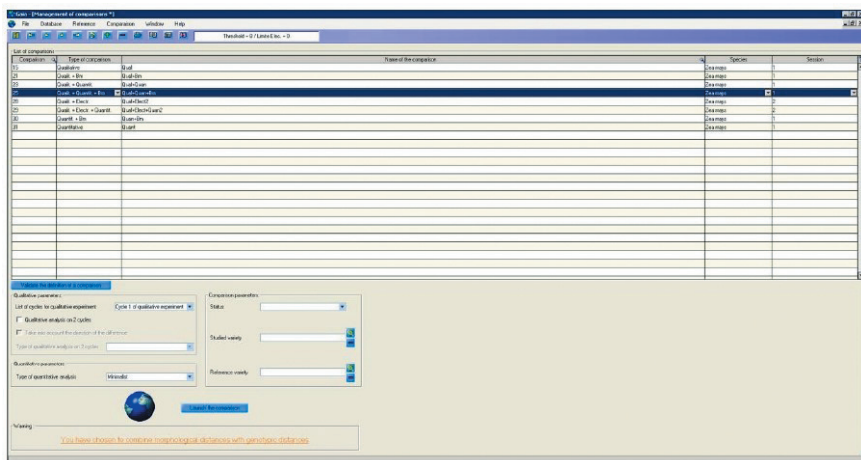


Рис. 3.1. Робоче вікно ПЗ GAIA: створення та задання параметрів порівнянь ліній кукурудзи звичайної

3.2. Представлення та інтерпретація результатів порівнянь

1) Для перегляду результатів порівняння, в меню Comparison обирають Перегляд (View) та визначають тип відображення: у вигляді дерева (Tree view) або табличному вигляді (Tabular view).

2) Для досліджуваних ліній кукурудзи за якісними, кількісними ознаками та молекулярними дистанціями отримано 12 «Відмінних плюс» ліній (рис. 3.2 та 3.3).

The screenshot shows the GAIA software interface. The left pane displays a tree view of comparisons, with a list of comparisons including 'GAIA1 (1)', 'GAIA2 (2)', 'GAIA3 (3)', 'GAIA4 (4)', 'GAIA5 (5)', 'GAIA6 (6)', 'GAIA7 (7)', 'GAIA8 (8)', 'GAIA9 (9)', 'GAIA10 (10)', 'GAIA11 (11)', 'GAIA12 (12)', 'GAIA13 (13)', 'GAIA14 (14)', 'GAIA15 (15)', 'GAIA16 (16)', 'GAIA17 (17)', 'GAIA18 (18)', 'GAIA19 (19)', 'GAIA20 (20)', 'GAIA21 (21)', 'GAIA22 (22)', 'GAIA23 (23)', 'GAIA24 (24)', 'GAIA25 (25)', 'GAIA26 (26)', 'GAIA27 (27)', 'GAIA28 (28)', 'GAIA29 (29)', 'GAIA30 (30)', 'GAIA31 (31)', 'GAIA32 (32)', 'GAIA33 (33)', 'GAIA34 (34)', 'GAIA35 (35)', 'GAIA36 (36)', 'GAIA37 (37)', 'GAIA38 (38)', 'GAIA39 (39)', 'GAIA40 (40)', 'GAIA41 (41)', 'GAIA42 (42)', 'GAIA43 (43)', 'GAIA44 (44)', 'GAIA45 (45)', 'GAIA46 (46)', 'GAIA47 (47)', 'GAIA48 (48)', 'GAIA49 (49)', 'GAIA50 (50)', 'GAIA51 (51)', 'GAIA52 (52)', 'GAIA53 (53)', 'GAIA54 (54)', 'GAIA55 (55)', 'GAIA56 (56)', 'GAIA57 (57)', 'GAIA58 (58)', 'GAIA59 (59)', 'GAIA60 (60)', 'GAIA61 (61)', 'GAIA62 (62)', 'GAIA63 (63)', 'GAIA64 (64)', 'GAIA65 (65)', 'GAIA66 (66)', 'GAIA67 (67)', 'GAIA68 (68)', 'GAIA69 (69)', 'GAIA70 (70)', 'GAIA71 (71)', 'GAIA72 (72)', 'GAIA73 (73)', 'GAIA74 (74)', 'GAIA75 (75)', 'GAIA76 (76)', 'GAIA77 (77)', 'GAIA78 (78)', 'GAIA79 (79)', 'GAIA80 (80)', 'GAIA81 (81)', 'GAIA82 (82)', 'GAIA83 (83)', 'GAIA84 (84)', 'GAIA85 (85)', 'GAIA86 (86)', 'GAIA87 (87)', 'GAIA88 (88)', 'GAIA89 (89)', 'GAIA90 (90)', 'GAIA91 (91)', 'GAIA92 (92)', 'GAIA93 (93)', 'GAIA94 (94)', 'GAIA95 (95)', 'GAIA96 (96)', 'GAIA97 (97)', 'GAIA98 (98)', 'GAIA99 (99)', 'GAIA100 (100)'. The right pane shows a table of results for a selected comparison, with columns for 'Comparison', 'Type of comparison', 'Date', 'Name of comparison', 'Qualitative analysis on 2 points', and 'Quantitative analysis on 2 points'. The table contains 10 rows of data, including comparisons like 'GAIA1 (1)', 'GAIA2 (2)', 'GAIA3 (3)', 'GAIA4 (4)', 'GAIA5 (5)', 'GAIA6 (6)', 'GAIA7 (7)', 'GAIA8 (8)', 'GAIA9 (9)', 'GAIA10 (10)'. The table also includes a section for 'Results of qualitative comparison for the current test variable' and a section for 'Results of quantitative comparison for the current test variable'.

Рис. 3.2. Робоче вікно ПЗ GAIA: перегляд порівнянь ліній кукурудзи звичайної у вигляді дерева для «Відмінних плюс» та пар ліній кукурудзи, що виявились не «Відмінними плюс»

The screenshot shows the GAIA software interface with a tabular view of comparison results. The table displays a detailed comparison of various corn lines, including their names, dates, and results for qualitative and quantitative analysis. The table has columns for 'Comparison', 'Type of comparison', 'Date', 'Name of comparison', 'Qualitative analysis on 2 points', and 'Quantitative analysis on 2 points'. The table contains 10 rows of data, including comparisons like 'GAIA1 (1)', 'GAIA2 (2)', 'GAIA3 (3)', 'GAIA4 (4)', 'GAIA5 (5)', 'GAIA6 (6)', 'GAIA7 (7)', 'GAIA8 (8)', 'GAIA9 (9)', 'GAIA10 (10)'. The table also includes a section for 'Results of qualitative comparison for the current test variable' and a section for 'Results of quantitative comparison for the current test variable'.

Рис. 3.3. Робоче вікно ПЗ GAIA: перегляд порівнянь ліній кукурудзи звичайної у вигляді таблиці для «Відмінних плюс» та пар ліній кукурудзи, що виявились не «Відмінними плюс»

3) Алгоритм аналізування наступний: спочатку досліджувані лінії порівнюються ПЗ за якісними морфологічними ознаками, потім для не «Відмінних плюс» ліній (лінії, що не подолали порогове значення відмінності – 8) проводиться порівняння за кількісними морфологічними ознаками, та на останньому етапі не «Відмінні плюс» лінії порівнюються за молекулярними дистанціями. Під час такого порівняння діє наступний принцип: якщо пара ліній має сумарне значення вагомості відмінності за морфологічними ознаками більше або дорівнює встановленому значенню фенотипової межі (6), то такі лінії в подальшому порівнюються за молекулярними дистанціями.

4) Генотипова межа показує, що фенотипові та молекулярні дистанції, у разі вибору порівняння за якісними, кількісними та молекулярними дистанціями, будуть поєднуватись для пари ліній, молекулярні дистанції яких більше або дорівнюють 0,30. Тобто, за умови поєднання порівнянь якісних + кількісних з молекулярними дистанціями, обидва аналізи будуть враховані тільки для пар ліній, в яких виконується одночасно умова: фенотипова межа більша або дорівнює 6, молекулярні дистанції яких більше або дорівнюють 0,30.

5) Для відображення результатів порівнянь із застосуванням молекулярних дистанцій в графічному та табличному вигляді у вікні перегляду натискають Застосувати молекулярні дистанції (Impact of Bm distance).

6) Відповідно до підходу щодо застосування молекулярних дистанцій, додатково, окрім 12 «Відмінних плюс» ліній, визначені пари ліній, що є «Відмінними плюс» згідно з розподілом на основі встановлених фенотипових та генотипових меж. За результатами порівнянь визначено 4 зони на графіку відображення результатів, в які розподілені пари ліній кукурудзи звичайної відповідно до фенотипових та молекулярних дистанцій (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Робоче вікно ПЗ GAIA: перегляд порівнянь ліній кукурудзи звичайної із застосуванням молекулярних дистанцій (графічне відображення)

7) Відповідно до умов, що визначені для поєднання морфологічних та молекулярних дистанцій, важливою для прийняття рішення щодо подальшого порівняння ліній в польових умовах поряд одна з одною, є зона 4. В зоні 4 розташовані лінії кукурудзи, що за фенотиповими та молекулярними дистанціями перевищили встановлені межі (фенотипова межа 6 та генотипова межа 0,30) (рис 3.5).

Table 3.5										P&G	
Line	Parent	Material	Year of initial entry	N	Phenotypic distance	Genotypic distance	N	Phenotypic distance	Genotypic distance		
1	10-001-001	10-001-001	10-001-001	1	10-001-001	10-001-001	1	10-001-001	10-001-001	1	1.00
2	10-001-002	10-001-002	10-001-002	2	10-001-002	10-001-002	2	10-001-002	10-001-002	2	1.00
3	10-001-003	10-001-003	10-001-003	3	10-001-003	10-001-003	3	10-001-003	10-001-003	3	1.00
4	10-001-004	10-001-004	10-001-004	4	10-001-004	10-001-004	4	10-001-004	10-001-004	4	1.00
5	10-001-005	10-001-005	10-001-005	5	10-001-005	10-001-005	5	10-001-005	10-001-005	5	1.00
6	10-001-006	10-001-006	10-001-006	6	10-001-006	10-001-006	6	10-001-006	10-001-006	6	1.00
7	10-001-007	10-001-007	10-001-007	7	10-001-007	10-001-007	7	10-001-007	10-001-007	7	1.00
8	10-001-008	10-001-008	10-001-008	8	10-001-008	10-001-008	8	10-001-008	10-001-008	8	1.00
9	10-001-009	10-001-009	10-001-009	9	10-001-009	10-001-009	9	10-001-009	10-001-009	9	1.00
10	10-001-010	10-001-010	10-001-010	10	10-001-010	10-001-010	10	10-001-010	10-001-010	10	1.00
11	10-001-011	10-001-011	10-001-011	11	10-001-011	10-001-011	11	10-001-011	10-001-011	11	1.00
12	10-001-012	10-001-012	10-001-012	12	10-001-012	10-001-012	12	10-001-012	10-001-012	12	1.00
13	10-001-013	10-001-013	10-001-013	13	10-001-013	10-001-013	13	10-001-013	10-001-013	13	1.00
14	10-001-014	10-001-014	10-001-014	14	10-001-014	10-001-014	14	10-001-014	10-001-014	14	1.00
15	10-001-015	10-001-015	10-001-015	15	10-001-015	10-001-015	15	10-001-015	10-001-015	15	1.00
16	10-001-016	10-001-016	10-001-016	16	10-001-016	10-001-016	16	10-001-016	10-001-016	16	1.00
17	10-001-017	10-001-017	10-001-017	17	10-001-017	10-001-017	17	10-001-017	10-001-017	17	1.00
18	10-001-018	10-001-018	10-001-018	18	10-001-018	10-001-018	18	10-001-018	10-001-018	18	1.00
19	10-001-019	10-001-019	10-001-019	19	10-001-019	10-001-019	19	10-001-019	10-001-019	19	1.00
20	10-001-020	10-001-020	10-001-020	20	10-001-020	10-001-020	20	10-001-020	10-001-020	20	1.00
21	10-001-021	10-001-021	10-001-021	21	10-001-021	10-001-021	21	10-001-021	10-001-021	21	1.00
22	10-001-022	10-001-022	10-001-022	22	10-001-022	10-001-022	22	10-001-022	10-001-022	22	1.00
23	10-001-023	10-001-023	10-001-023	23	10-001-023	10-001-023	23	10-001-023	10-001-023	23	1.00
24	10-001-024	10-001-024	10-001-024	24	10-001-024	10-001-024	24	10-001-024	10-001-024	24	1.00
25	10-001-025	10-001-025	10-001-025	25	10-001-025	10-001-025	25	10-001-025	10-001-025	25	1.00
26	10-001-026	10-001-026	10-001-026	26	10-001-026	10-001-026	26	10-001-026	10-001-026	26	1.00
27	10-001-027	10-001-027	10-001-027	27	10-001-027	10-001-027	27	10-001-027	10-001-027	27	1.00
28	10-001-028	10-001-028	10-001-028	28	10-001-028	10-001-028	28	10-001-028	10-001-028	28	1.00
29	10-001-029	10-001-029	10-001-029	29	10-001-029	10-001-029	29	10-001-029	10-001-029	29	1.00
30	10-001-030	10-001-030	10-001-030	30	10-001-030	10-001-030	30	10-001-030	10-001-030	30	1.00
31	10-001-031	10-001-031	10-001-031	31	10-001-031	10-001-031	31	10-001-031	10-001-031	31	1.00
32	10-001-032	10-001-032	10-001-032	32	10-001-032	10-001-032	32	10-001-032	10-001-032	32	1.00
33	10-001-033	10-001-033	10-001-033	33	10-001-033	10-001-033	33	10-001-033	10-001-033	33	1.00
34	10-001-034	10-001-034	10-001-034	34	10-001-034	10-001-034	34	10-001-034	10-001-034	34	1.00
35	10-001-035	10-001-035	10-001-035	35	10-001-035	10-001-035	35	10-001-035	10-001-035	35	1.00

Рис. 3.5. Робоче вікно ПЗ GAIA: перегляд порівнянь ліній кукурудзи звичайної із застосуванням молекулярних дистанцій (табличне відображення)

8) Пари ліній (35 пар ліній), що за фенотиповими та молекулярними дистанціями увійшли в зону 4 можуть вважатися «Відмінними плус» та не потребують випробовування поряд один з одним в польових умовах.

9) Пари лінії, що увійшли до зон 1, 2 та 3 мають бути висіяні поряд. Особлива увага має бути приділена парам ліній із зони 1, що виявились найбільш подібними відповідно до отриманих значень сумарної вагомості за морфологічними ознаками та молекулярними дистанціями.

Таким чином, запропонований підхід визначення відмінності ліній кукурудзи може застосовуватись для управління референсною колекцією ліній та гібридів кукурудзи під час планування польових досліджень з кваліфікаційної експертизи на ВОС. Розрахунок значень сумарної вагомості за морфологічними ознаками та молекулярними дистанціями дозволяє скоротити кількість сортів, що необхідно порівнювати поряд один з одним в польових умовах, що суттєво спрощує процес оцінки ступенів прояву морфологічних ознак під час кваліфікаційної експертизи на ВОС.

Список використаних літературних джерел

1. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських культур за допомогою SSR маркерів: методичні рекомендації. Вінниця : ФОП Корзун Д. Ю., 2019. 24 с.
2. Методика визначення відповідності сортів кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) критеріям відмінності, однорідності та стабільності. URL: https://sops.gov.ua/uploads/page/Meth_DUS/2024/Method_kukurudza_2024_07_22.pdf
3. Присяжнюк Л. М., Гринів С. М., Мельник С. І. та ін. Методи молекулярно-генетичного аналізу для оцінки сортів рослин на ВОС та сортової ідентифікації: методичні рекомендації. Вінниця : ТВОРИ, 2023. 40 с.
4. Присяжнюк Л. М., Стариченко Є. М., Гринів С. М. та ін. Застосування програмного забезпечення GAIA в кваліфікаційній експертизі сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність. Вінниця : «ТВОРИ», 2021. 24 с.
5. Document TGP/15 Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS). URL: https://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_15.pdf
6. ISO/TR 17623:2015 Molecular biomarker analysis – SSR analysis of maize. 2015. URL: <https://www.iso.org/standard/60171.html>
7. Guitouni C., Chevalier C. GAIA user's guide. France: GEVES, 2010. 61 p.
8. TWC/21/4. GAIA SOFTWARE: crop expert phenotypic distances between varieties. 2003. URL: https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/twc/21/twc_21_4.pdf
9. TWC/25/13. GAIA SOFTWARE. 2007. URL: https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/twc/25/twc_25_13.pdf

**ПОЄДНАННЯ ФЕНОТИПОВИХ ТА МОЛЕКУЛЯРНИХ ДИСТАНЦІЙ
ДЛЯ УПРАВЛІННЯ РЕФЕРЕНСНОЮ КОЛЕКЦІЄЮ СОРТІВ КУКУРУДЗИ**

Науково-методичні рекомендації

Автори:

**Л. М. Присяжнюк, С. М. Гринів, М. М. Таганцова, Є. М. Стариченко, І. О. Діхтяр,
Ю. В. Шитікова, С. І. Мельник**

Комп'ютерне верстання – А. І. Бойко

Підписано до друку 24.12.2024.
Формат 60х84/16. Папір офсетний.
Друк цифровий. Гарнітура Schoolbook.
Умов. друк. арк. 1,4. Обл.-вид. арк. 0.92.
Наклад 50 прим. Зам. № 9507.

Віддруковано з оригіналів замовника.

Видавець та виготовлювач ТОВ «ТВОРИ».
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців, виготовлювачів і розповсюджувачів
видавничої продукції серія ДК № 6188 від 18.05.2018 р.
21034, м. Вінниця, вул. Немирівське шосе, 62а.
Тел.: 0 (800) 33-00-90, (096) 97-30-934, (093) 89-13-852.
e-mail: info@tvoru.com.ua
<http://www.tvoru.com.ua>

