

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ ЧЕРЕШНІ (*PRUNUS AVIUM* L.) З ВИКОРИСТАННЯМ ISSR-ПЛР МАРКЕРІВ

Я.І. ІВАНОВИЧ¹, К.М. УДОВИЧЕНКО¹, М.О. БУБЛИК¹, Р.А. ВОЛКОВ²

¹ Інститут садівництва НААН України, Київ
E-mail: ivanovych.yar@gmail.com

² Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

ISSR-ПЛР маркери використано для оцінки генетичного різноманіття та встановлення ступеня спорідненості 21 сорту черешні української та трьох сортів західноєвропейської селекції, які широко культивуються в Україні. Оцінено дискримінаційні можливості 11 ISSR-ПЛР праймерів, з використанням яких отримали 193 продукти ампліфікації. Кращими праймерами, придатними для рутинного використання, виявились UBC 835, 836, 841 та 881. Досліджені сорти є генетично гетерогенними та можуть бути розділені на дві основні групи. До першої належать близькоспоріднені сорти, отримані шляхом гібридизації Дрогопи жовтої, Валерія Чкалова та деяких інших форм. Друга група охоплює менш подібні сорти, які виникли від західноєвропейських та невідомих предків. Обговорюється походження кількох українських сортів.

Ключові слова: українські сорти черешні, ISSR-маркери, генетичне різноманіття, *Prunus avium*.

Вступ. Черешня (*Prunus avium* L.) – плодова порода, що культивується у помірному кліматичному поясі та високо ціниться у світі. В Україні черешня є однією із основних плодкових культур. В останні десятиріччя українськими селекціонерами створено велику кількість сортів черешні, перспективних для промислового вирощування та конкурентоздатних на світовому ринку [1]. Основними селекційними центрами черешні в Україні є Інститут садівництва НААН, Мелітопольська ДСС ІС ім. М.Ф. Сидоренка, Артемівська ДСР ІС, Інститут помології ім. Л.П. Симиренка НААН та Нікітський ботанічний сад – ННЦ НААН.

Традиційно для ідентифікації та аналізу генетичних відмінностей між сортами черешні використовують лише мінливі фенотипові ознаки. Разом з тим ДНК-маркери вже тривалий час є потужним інструментом досліджень генетичного різноманіття. Генотипування сортів рослин за допомогою ДНК-маркерів дозво-

ляє уточнити їх походження та вирішити ряд важливих завдань селекції, зокрема, досягти стандартизації насіння та садивного матеріалу, а також захистити авторські права селекціонерів [2].

На сьогодні основними вимогами до ДНК-маркерів є висока інформативність та відтворюваність. Цим вимогам в першу чергу відповідають SNP (Single Nucleotide Polymorphism) та мікросателітні, або SSR (Simple Sequence Repeats) маркери. Проте для оцінки генетичного різноманіття та уточнення походження близькоспоріднених форм більш придатними є полілокусні ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)-ПЛР маркери через поєднання таких позитивних характеристик, як відтворюваність та охоплення всього геному [2].

Метод ISSR-ПЛР вже неодноразово використовувався при дослідженні плодкових культур, а саме для встановлення філогенетичних зв'язків у роді *Prunus* [3], з'ясування кореляції між ISSR-ПЛР маркерами та господарсько цінними ознаками, а також для генетичного профілювання плодкових культур в цілому і зокрема таких представників роду *Prunus*, як алича (*P. cerasifera*), слива звичайна (*P. domestica*), абрикос (*P. armeniaca*), вишня звичайна (*P. cerasus*), черешня (*P. avium*) та ін. [3–6].

Більшість сортів черешні, які культивуються або використовуються у селекційній роботі в Україні, не вивчалися на молекулярному рівні, тому залишаються не охарактеризованими ані монолокусними, ані полілокусними маркерами. Невідомі генетична конституція та спорідненість таких сортів, хоча прояснення цих питань є важливим, особливо враховуючи факт існування сортів від вільного запилення та використання при схрещуванні суміші пилку різних сортів. Цікавим прикладом є сорт черешні Дар Млієва, що походить від вільного запилення вишні звичайної (*Prunus cerasus* L.) сорту

© Я.І. ІВАНОВИЧ, К.М. УДОВИЧЕНКО, М.О. БУБЛИК, Р.А. ВОЛКОВ, 2017

Любська [1]. Актуальною є також необхідність упорядкування маточних насаджень сортів черешні, оскільки навіть в наукових установах трапляється неправильне їх маркування. У даній статті з використанням ISSR-ПЛР маркерів вперше проведено оцінку генетичного різноманіття 24 сортів черешні, визначено ступінь їх спорідненості та уточнено походження деяких із них.

Матеріали і методи. Рослинний матеріал сортів черешні відбирали в колекційних насадженнях Інституту садівництва НААН, Мелітополь-

ської ДСС ІС ім. М.Ф. Сидоренка, Артемівської ДСР ІС та Інституту помології ім. Л.П. Смирненка НААН (табл. 1). В дослідження було включено 21 сорт української селекції та три – закордонної. У кожного сорту досліджували по одному зразку.

Загальну геномну ДНК виділяли з 60–70 мг молодого листя ЦТАБ-методом [12] з деякими модифікаціями. Концентрацію препаратів ДНК визначали електрофоретично.

Реакцію ампліфікації з використанням ISSR-праймерів проводили в об'ємі 15 мкл, що вклю-

Таблиця 1. Перелік досліджуваних сортів черешні

Сорт	Батьківські форми	Оригіатор
Валерій Чкалов	Розова в.з. [1, 7]	Мелітопольська ДСС
Мелітопольська чорна	Французька чорна в.з. [7]	Мелітопольська ДСС
Анонс	Наполеон біла × (Валерій Чкалов + Жабуле + Ельтон + 713 + 719 + 4324 + 4326 + 2125 + Францис + 1039 + 1042 + Наполеон біла + Наполеон рожева) [7]	Мелітопольська ДСС
Талісман	Дрогана жовта × Валерій Чкалов [7]	Мелітопольська ДСС
Крупноплідна	Наполеон біла × (Валерій Чкалов + Ельтон + Жабуле) [1, 7]	Мелітопольська ДСС
Казка	Дрогана жовта × Валерій Чкалов [7]	Мелітопольська ДСС
Мелітопольська мирна	Дрогана жовта × Валерій Чкалов [7]	Мелітопольська ДСС
Темпоріон	Дрогана жовта × (Валерій Чкалов + Сонячний шар) [7]	Мелітопольська ДСС
Аншлаг	Цешенська жовтнева × Престижна [1, 8]	Мелітопольська ДСС
Ласуня	Цешенська жовтнева × Престижна [8]	Мелітопольська ДСС
Прощальна Тараненко	Д 54-82 (Дончанка × Валерій Чкалов) × Джерело [9]	Артемівська ДСР
Василиса прекрасна	Донецький уголок × Донецька красавиця [1, 7]	Артемівська ДСР
Донецька красавиця	Дрогана рожева × Валерій Чкалов [7]	Артемівська ДСР
Отрада	Аннушка × Анонс [1]	Артемівська ДСР/ІС
Аннушка	Дрогана жовта × Валерій Чкалов [8]	Артемівська ДСР
Ярославна	Дончанка × Валерій Чкалов [1, 7]	Артемівська ДСР
Ніжність	Дрогана жовта в.з. [7]	Інститут садівництва
Любава	Дрогана жовта × Францис [1, 7]	Інститут садівництва
Китаївська чорна	Дрогана жовта в.з. [1]	Інститут садівництва
Легенда Млієва	Невідомо [7]	Інститут садівництва
Дар Млієва	Крупноплідна в.з. [1]	Інститут помології
Regina (Регіна)	Любська в.з. [1, 7]	Інститут помології
Bigarreau Natif Burlat (Бігарро Бурлат)	Schneiders späte Knorpelkirsche × Rube [10]	Німеччина
Drogans gelbe Knorpelkirsche (Дрогана жовта)	Невідомо [11]	Франція
	Невідомо [11]	Німеччина

Примітка. в.з. – вільне запилення.

Генетичне профілювання українських сортів черешні (Prunus avium L.)

чали 30–50 нг геномної ДНК, 0,8 мкМ праймера, 0,1 мМ кожного дНТФ, 1,5–2,0 мМ MgCl₂, 1,5 мкл 10× Taq ДНК полімеразного буфера та 0,5 ОА Taq ДНК полімерази («СибЭнзим», РФ). ПЛР здійснювали на ампліфікаторах Терцик та Eppendorf Mastercycler personal за наступною схемою: первинна денатурація – 5 хв при 94 °С, 32 цикли, що включали 30 с при 94 °С для денатурації, 60 с при 50–60 °С (табл. 2) для гібридизації праймера, 2,5 хв при 72 °С для елонгації; кінцева елонгація 5 хв при 72 °С.

При проведенні ISSR-ПЛР використовували 11 праймерів до мікросателітних геномних послідовностей, п'ять з яких із виродженими нуклеотидами (табл. 2).

Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР здійснювали в 10%-ному неденатуруючому (нативному) поліакриламідному гелі (ПААГ) протягом 4,5 год при напруженості 15–18 В/см. Після цього гель забарвлювали бромистим етидієм (рис. 1). Використовували GeneRuler 100 bp Plus («Thermo Scientific», США) як маркер молекулярних мас.

Електрофореграми продуктів ампліфікації аналізували з використанням програми TotalLab TL120. Кожну реакцію проводили у трикратному повторенні для перевірки відтворюваності ампліфікованих фрагментів. При створенні бінарних матриць відтворювані фрагменти в спектрах ампліфікації оцінювалися як наявні (1) чи відсутні (0).

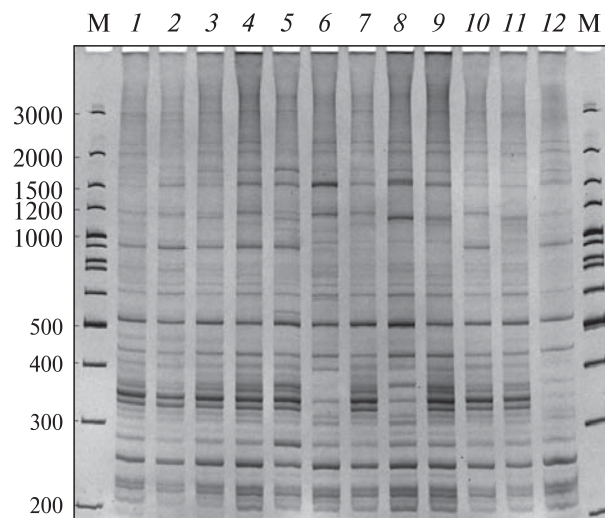


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих з використанням праймера UBC 835 та геномної ДНК сортів черешні: 1 – Донецька краса, 2 – Отрада, 3 – Аннушка, 4 – Ярославна, 5 – Ніжність, 6 – Любава, 7 – Китаївська чорна, 8 – Легенда Млієва, 9 – Дар Млієва, 10 – Регіна, 11 – Бігарро Бурлат, 12 – Дрогана жовта, М – маркер молекулярних мас GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Scientific)

Використані праймери охарактеризовували за кількістю ампліфікованих фрагментів ДНК (ТВ), кількістю поліморфних фрагментів (ПВ) та відсотком поліморфних фрагментів (РРВ) (табл. 3). Для порівняння інформативності ок-

Таблиця 2. Використані ISSR праймери та умови ампліфікації

Назва	T _{ан} , °С	Mg ²⁺ , мМ	Послідовність (5'–3')
UBC 807	50	2,0	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 809	52	2,0	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 810	50	2,0	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811	52	2,0	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 827	52	2,0	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC 834	52	1,5	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 835	56	2,0	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC 836	54	2,0	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC 841	56	2,0	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
UBC 857	56	2,0	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
UBC 881	60	2,0	GGG TGG GGT GGG GTG

Примітка. Праймери із набору UBC № 9 (University of British Columbia, Vancouver, Canada).

ремий праймерів їх дискримінаційні можливості оцінювали з використанням декількох показників поліморфізму: кількість відмінних алелів (N_a), кількість ефективних алелів (N_e), індекс інформативності Шеннона (I), очікувана гетерозиготність (H_e або GD , gene diversity) та гетерозиготність, що спостерігається (H_o). Обрахунки первинних бінарних даних проводили в MS Excel. Перелічені статистичні показники обраховували за допомогою макросу GenAlEx 6.502 [13].

Окремо придатність ISSR-ПЛР праймерів для генетичного профілювання сортів черешні оцінювали обрахунком наступних параметрів: частка поліморфних даних (polymorphic information content, PIC), маркерний індекс (marker index, MI) та розділяюча здатність (resolving power, Rp). Величину PIC для кожного локусу знаходили за формулою

$$PIC = 2f_i(1 - f_i),$$

де PIC_i – частка поліморфних даних i -го локусу; f_i – частота ампліфікованих фрагментів, $1 - f_i$ – частота неампліфікованих фрагментів [14].

Частота була обрахована як частка ампліфікованих фрагментів в кожному локусі до загальної кількості зразків (окрім пропущених

даних). PIC вираховували як середнє значення PIC_i всіх локусів даної маркерної системи;

$$PIC_i = \Sigma PIC_i/n,$$

де n – величина вибірки.

Ефективне комплексне співвідношення (Effective Multiplex Ratio, EMR) визначали за формулою

$$EMR = n \cdot \beta,$$

де n – середнє значення кількості фрагментів, ампліфікованих у кожного генотипу в маркерній системі; $\beta = PB/TB$. Маркерний індекс було підраховано для характеристики здатності кожної маркерної системи виявляти в генотипів поліморфні локуси. Для кожної маркерної системи MI визначали за формулою $MI = EMR \cdot PIC$ [15], а розділяючу здатність – за формулою

$$Rp = \Sigma Ib,$$

де $Ib = I - (2 \cdot [0,5 - p_i])$, а p_i є пропорцією від загальної кількості генотипів, що містять i -й фрагмент ДНК [16].

Матрицю первинних бінарних даних конвертували в матрицю генетичних дистанцій, використовуючи коефіцієнт Dice [17] в програмі

Таблиця 3. Дискримінаційні характеристики маркерних систем при генетичному профілюванні 24 сортів черешні

Маркерна система	Розмір фрагментів, п.н.	TB	PB	PPB,%	PIC	MI	Rp	N_a	N_e	I	H_e	H_o
UBC 810	455–860	14	10	71,43	0,302	1,99	6,67	1,714	1,513	0,416	0,285	0,292
UBC 811	290–1230	21	14	66,67	0,192	1,76	6,50	1,667	1,345	0,307	0,204	0,208
UBC 827	240–1980	22	14	63,64	0,199	1,93	6,50	1,636	1,349	0,319	0,210	0,215
UBC 834	690–5000	17	14	82,35	0,211	1,80	5,00	1,824	1,419	0,383	0,251	0,257
UBC 835	240–1600	27	20	74,07	0,212	2,60	8,91	1,741	1,379	0,340	0,225	0,230
UBC 836	290–2000	41	28	68,29	0,210	3,23	12,67	1,683	1,269	0,275	0,173	0,177
UBC 841	475–1755	15	12	80,00	0,292	2,10	7,17	1,800	1,474	0,416	0,279	0,285
UBC 881	340–3050	36	33	91,67	0,242	4,29	12,00	1,917	1,475	0,421	0,278	0,284
Σ		193	145									

Примітка. TB – кількість ампліфікованих фрагментів ДНК (number of total bands), PB – кількість поліморфних фрагментів (number of polymorphic bands), PPB – відсоток поліморфних фрагментів (percentage of polymorphic bands), PIC – частка поліморфних даних (polymorphic information content), MI – маркерний індекс (marker index), Rp – розділяюча здатність (resolving power), N_a – кількість відмінних алелів, N_e – кількість ефективних алелів, I – індекс інформативності Шеннона, H_e – очікувана гетерозиготність та H_o – гетерозиготність, що спостерігається.

DARwin 6.0.012 [18]. Генетичну спорідненість між 24 сортами черешні аналізували методом незваженого попарного середнього (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA).

Для з'ясування спорідненості сортів черешні та їх належності до певних генетичних груп використовували також програму Structure 2.3.4 [19], в основі якої лежить кластеризація Баєса. Цим методом вираховується відсоток приналежності певного сорту до кожної з K груп (генетичних пулів), які об'єднують найбільш споріднені форми. Достовірним вважається значення K , яке характеризується найвищим показником $\ln P(D)$ [21]. В нашому дослідженні при $K = 3$, $\ln P(D) = -1523,6$.

Результати досліджень та їх обговорення. Використання восьми праймерів (ISSR-ПЛР) дозволило виявити 193 продукти ампліфікації, з яких 75 % виявились поліморфними. В ампліфікаційних спектрах переважали амплікони розміром від 400 до 1500 п.н., які добре піддаються розпізнаванню та інтерпретації. Три праймери (UBC 807, 809, 857) були виключені з дослідження на етапі оцінки їх придатності для розділення генотипів черешні. Проведення ПЛР-ампліфікації з використанням праймера UBC 809 дозволяло отримувати на електрофореграмі лише набори дифузних смуг, більша частина яких не була придатна для інтерпретації. Спектри ампліфікації, отримані для праймерів UBC 807 та 857, були в значній мірі мономорфними. У 12 тестованих генотипів праймер UBC 807 виявляв лише один поліморфний локус, а UBC 857 – три.

Найвищий рівень (91,6 %) поліморфізму серед використаних праймерів виявлено для UBC 881. Раніше при дослідженні грецьких сортів черешні цей праймер демонстрував значно нижчий (64,2 %) рівень поліморфізму [5]. Середній рівень поліморфізму сортів, охарактеризованих нами з використанням восьми праймерів, склав 75,1 % із найвищими значеннями для праймерів UBC 834, 841 та 881.

В інших роботах використання подібного набору праймерів дозволило виявити значно нижчий рівень поліморфізму у сортів черешні. Зокрема, при використанні 10 ISSR праймерів рівень поліморфізму становив 57,7 % [5], а 30 ISSR праймерів – 39,5 % [6]. Аналогічно, за

нашими даними показники генетичного різноманіття, отримані з використанням праймерів UBC 811, 827, 834, 841 та 881, виявились також значно вищими, ніж ті, що наводяться в літературі [5, 6]. Проте слід зазначити, що нижчі показники генетичного різноманіття у згаданих роботах можуть бути наслідком застосування для електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації агарозного гелю, оскільки цей метод є менш чутливим порівняно із розділенням фрагментів ДНК в ПААГ.

Оцінюючи за маркерним індексом праймери, застосовані для генетичного профілювання досліджуваних сортів черешні, можна стверджувати, що UBC 835, 836 та 881 видаються найбільш перспективними. Значення MI в них виявились в 1,5–2 рази вище порівняно з іншими праймерами. Крім того, UBC 835, 836 та 881 демонструють найвищі показники розділюючої здатності. Водночас найвищі значення частки поліморфних даних та індексу інформативності Шеннона мають праймери UBC 810, 841 та 881 (табл. 3). Взагалі, використані праймери достовірно відрізняються за показниками кількості відмінних та ефективних алелів. Різниця між очікуваною та гетерозиготністю, що спостерігалась, не є вагомою.

Самостійне використання такого набору праймерів, як UBC 836 та 881, дозволило диференціювати всі 24 сорти і, зокрема, близькоспоріднені.

Графічне зображення приналежності окремих сортів до певних груп (генетичних пулів) було отримано в програмі Structure (рис. 2). Найбільш статистично вірогідною була приналежність досліджуваних сортів до трьох генетичних пулів ($K = 3$). На бар-діграмі добре видно, що всі сорти черешні (за виключенням сорту Мелітопольська чорна), що походять із Мелітопольської ДСС (табл. 1), демонструють подібність між собою і можуть бути віднесені до одного генетичного пулу. До другого пулу можна віднести майже всі сорти (за виключенням сортів Василіса прекрасна та Прощальна Тараненко) Артемівської ДСР, деякі інші сорти української селекції, які мають предкові форми європейського походження (Мелітопольська чорна, Ярославна, Ніжність, Любава, Китаївська чорна, Легенда Млієва, Дар Млієва) та сорти із Західної Європи (Регіна, Бігарро

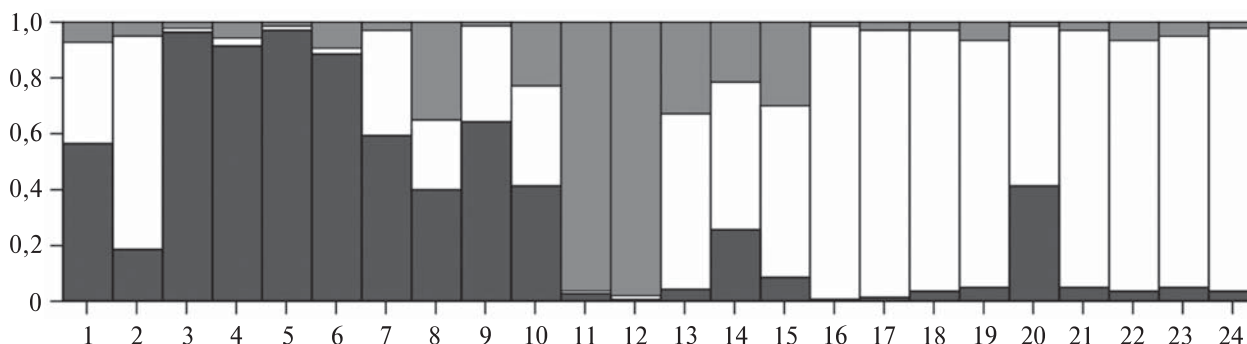


Рис. 2. Генетична конституція українських сортів черешні. Кожен сорт зображений окремою вертикальною колонкою, яка поділена на три частини, що відображають оцінену частку відношення до трьох генетичних пулів: 1 – Валерій Чкалов, 2 – Мелітопольська чорна, 3 – Анонс, 4 – Талісман, 5 – Крупноплідна, 6 – Казка, 7 – Мелітопольська мирна, 8 – Темпоріон, 9 – Аншлаг, 10 – Ласуня, 11 – Прощальна Тараненко, 12 – Василиса прекрасна, 13 – Донецька красавиця, 14 – Отрада, 15 – Аннушка, 16 – Ярославна, 17 – Ніжність, 18 – Любава, 19 – Китаївська чорна, 20 – Легенда Млієва, 21 – Дар Млієва, 22 – Regina (Регіна), 23 – Bigarreau Hatif Burlat (Бігарро Бурлат), 24 – Drogans gelbe Knorpelkirsche (Дрогана жовта)

Бурлат, Дрогана жовта). І, нарешті, два сорти – Василиса прекрасна і Прощальна Тараненко, які виявились подібними між собою та відмінними від решти досліджуваних сортів, відносяться до третього генетичного пулу. Більше половини досліджуваних сортів можна віднести до одного з трьох генетичних пулів, тоді як решта сортів мають суттєву частку генетичної інформації різних генетичних пулів, тобто є генетично гетерогенними.

Для визначення генетичної подібності між дослідженими сортами черешні застосовували метод UPGMA-кластеризації. Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти на п'ять кластерів – А–Е (рис. 3).

До кластерів А і В увійшли сорти, в яких однією з предкових форм був сорт Валерій Чкалов, що є гібридом кавказького походження. Зокрема, до підкластера А1 належать три сорти – Казка, Мелітопольська мирна і Талісман, які є гібридами від схрещування сортів Дрогана жовта та Валерій Чкалов. При цьому два сорти – Казка та Талісман – демонструють високу спорідненість, тоді як Мелітопольська мирна виявилась більш віддаленою формою. Для пояснення різниці між дослідженими сортами, які отримані від тих самих батьків, нагадаємо, що внаслідок широкого розповсюдження самонесумісності переважна більшість сортів черешні являють собою високогетерозиготні гібриди, у яких при схрещуванні між собою має спостері-

гатись суттєве розщеплення. Отримані нами результати цілком відповідають таким уявленням.

До підкластера А1 також належать сорти Крупноплідна та Анонс, які виявились найбільш подібними між собою серед усіх досліджених нами сортів. Материнською формою для цих сортів був сорт Наполеон біла (Bigarreau Napoleon blanc), який є соматичним бруньковим мутантом сорту Дрогана жовта [11], а отже ці сорти практично мають бути генетично ідентичними. При створенні сортів Крупноплідна та Анонс материнську форму Наполеон біла було запилено сумішшю пилку кількох сортів, серед яких був і пилок сорту Валерій Чкалов (табл. 1). З огляду на те, що сорти Крупноплідна та Анонс розташовані на дендрограмі у кластері А1, логічно припустити, що батьківською формою для них був саме сорт Валерій Чкалов.

Сорти Аншлаг та Ласуня (підгрупа А2) походять від однієї батьківської пари Цешенська жовтнева (Zöschener Oktober Knorpelkirsche) × Престижна і демонструють подібність до сортів підкластера А1. Останнє пояснюється тим, що Престижна є нащадком сорту Валерій Чкалов [8].

Майже всі сорти, які входять до кластера А, за результатами аналізу у програмі Structure належать до першого генетичного пулу (рис. 2). І лише у сорту Ласуня геном більш ніж на половину складається з матеріалу, що належить до інших генетичних пулів.

Генетичне профілювання українських сортів черешні (*Prunus avium* L.)

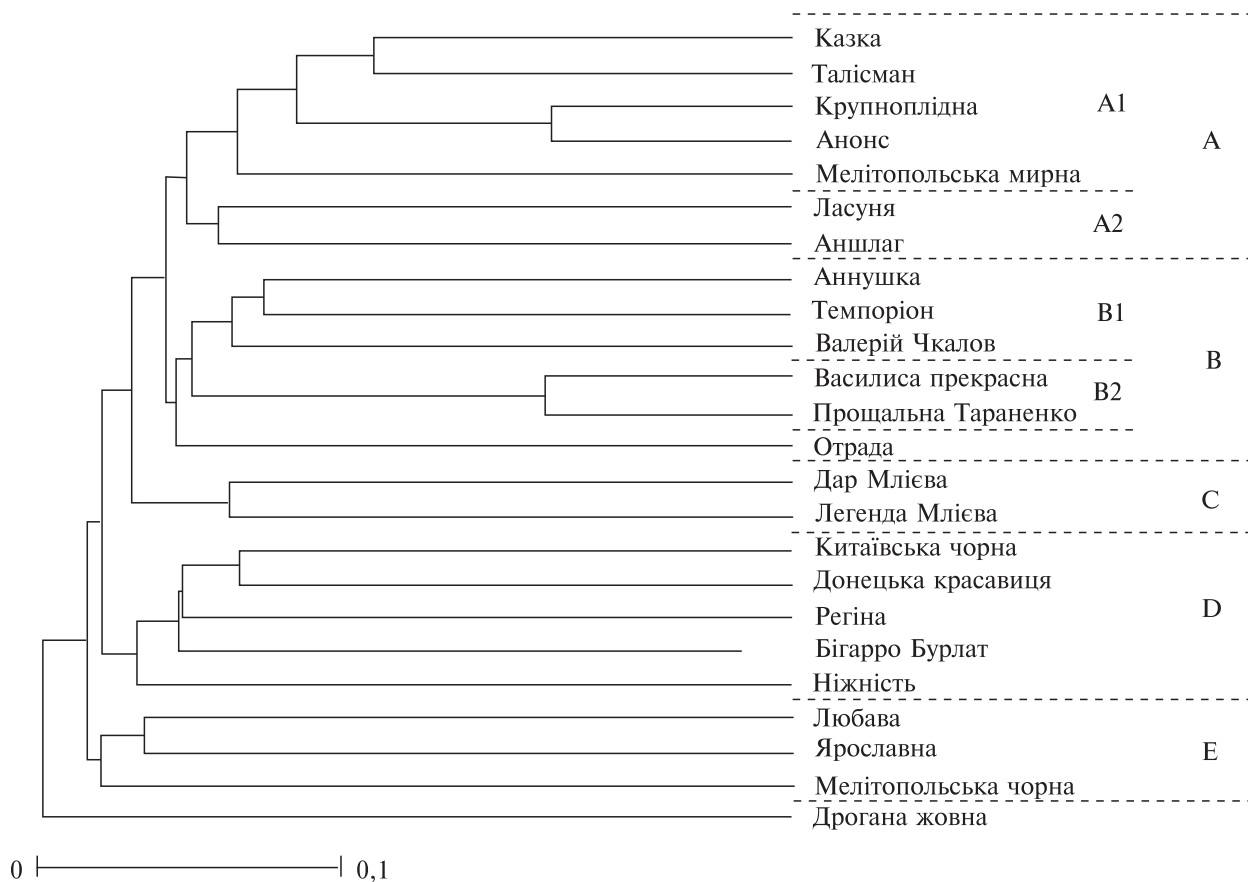


Рис. 3. UPGMA-клатограма генетичної спорідненості 24 сортів черешні

Кластер В формують шість сортів. Зокрема, до підкластера В1 належать сорти Аннушка, Темпоріон та Валерій Чкалов. Близька подібність цих сортів виглядає цілком природною, оскільки сорт Аннушка створено шляхом гібридизації сортів Дончанка (який отримали з насіння Дрогани жовтої) та Валерій Чкалов. Що ж стосується сорту Темпоріон, то він виник від запилення Дрогани жовтої сумішшю пилку сортів Валерій Чкалов та Сонячний шар. Враховуючи належність сорту Темпоріон до підкластера В1, більш імовірною батьківською формою видається Валерій Чкалов.

До підкластера В2 належать сорти Василиса прекрасна (Донецький угольок × Донецька красавиця) і Прощальна Тараненко (Д 54-82 (Дончанка × Валерій Чкалов) × Джерело). Хоча ці сорти мають різне походження, вони показують дуже високу спорідненість. Це можна пояснити тим, що батьківські форми, тобто сорти Доне-

цький угольок, Донецька красавиця, Дончанка та Джерело, отримано з однакового вихідного матеріалу. Зокрема відомо, що сорти Валерій Чкалов та/або Дрогана жовта брали участь у походженні цих чотирьох сортів [1, 7, 9], що цілком узгоджується з їх розташуванням на дендрограмі. Крім того, при створенні сорту Донецька красавиця було використано сорт Дрогана розова, походження якого до кінця не відомо, тоді як походження сортів Дончанка та Джерело потребує уточнення, оскільки при їх отриманні використовували вільне запилення. Отже, своєрідність сортів Василиса прекрасна та Прощальна Тараненко може бути наслідком успадкування частини геному від спільного невідомого предка. Таким чином, можна припустити, що генетично близькі сорти Василиса прекрасна та Прощальна Тараненко являють приклад того, як подібний набір генетичної інформації може бути отриманий різними шляха-

ми в процесі селекції. Цікавою задачею у майбутньому могло би бути вивчення походження кожної хромосоми в геномі цих сортів.

Обидва сорти з підкластера В2 належать до третього генетичного пулу, тоді як всі три сорти з підкластера В1 є генетично гетерогенними, але мають у геномі істотно частку третього генетичного пулу (рис. 2).

Ізольоване положення в кластері В займає сорт Отрада, стосовно походження якого існують суперечності. В одній публікації [8] вказується, що сорт походить із гібридної сім'ї Дрогана жовта × Валерій Чкалов, в іншій [1] — Аннушка × Анонс. Розташування сорту Отрада на дендрограмі краще узгоджується із другим варіантом походження.

До кластерів С, D та E увійшли три сорти західноєвропейського походження, їх нащадки та сорти від вільного запилення. Кластер С, який є найближчим сусідом до кластерів А і В, утворюють два сорти Інституту помології — Дар Млієва та Легенда Млієва, які отримані шляхом вільного запилення. Материнською формою сорту Легенда Млієва був сорт Крупноплідна (підкластер А1), що може пояснити певну подібність між сортом Легенда Млієва та кластерами А і В. Що стосується сорту Дар Млієва, то його материнською формою була вишня звичайна сорту Любська. Відповідно належність сорту Дар Млієва до кластера С (тобто подібність до сорту Легенда Млієва) можна пояснити тим, що його батьківською формою був один з представників кластерів А або В або близька до них форма.

Кластер D формують два європейські сорти — Бігарро Бурлат і Регіна, та три сорти української селекції — Донецька красавиця, Китаївська чорна та Ніжність. Донецька красавиця вважається гібридом Дрогана рожева × Валерій Чкалов [7]. При цьому Дрогана рожева як сорт не зареєстрована: це форма невідомого походження, імовірно європейського (Ярушников В.В., Артемівська ДСР, персональне повідомлення). Можливо, що це старий німецький сорт Наполеон рожева (Bigarreau Napoleon) під помилковою назвою. Європейське походження форми Дрогана рожева може бути причиною поєднання в одному кластері сорту Донецька красавиця та двох європейських сортів — Бігарро Бурлат та Регіна.

Стосовно походження Китаївської чорної відомо лише те, що цей сорт має гібридне походження. Отримані нами результати вказують на суттєву подібність між сортами Китаївська чорна та Донецька красавиця. Для порівняння вкажемо, що генетична дистанція між цими сортами є такою ж або навіть меншою, ніж між сортом Валерій Чкалов та його прямими нащадками, які входять до складу підкластерів А1 та В1. Імовірною причиною подібності сортів Китаївська чорна та Донецька красавиця може бути їх походження від спільних європейських предкових сортів. Зважаючи на те, що сорт Ніжність походить від схрещування європейських сортів Дрогана жовта × Францис (Emperor Francis), його присутність у кластері D є цілком зрозумілою.

До складу останнього кластера E належать три українські сорти — Любава, Ярославна та Мелітопольська чорна, які виникли від вільного запилення. Об'єднання в одному підкластері сортів Любава та Ярославна імовірно пов'язано з тим, що їх материнською формою був сорт Дрогана жовта, проте досить велика генетична дистанція між сортами Любава та Ярославна свідчить про те, що вони мають різні батьківські форми.

В цілому результати, отримані при побудові дендрограм, відповідають даним про належність сортів черешні до певних генетичних груп (рис. 2), зокрема всі сорти, що входять до кластерів С, D та E, за результатами, які було отримано в програмі Structure, належать до другого генетичного пулу.

Отримані нами результати добре узгоджуються із наявною інформацією стосовно спорідненості сортів черешні української селекції та дозволяють у ряді випадків уточнити їх походження. В цілому серед досліджених сортів можна виділити дві групи. До першої групи входять близькоспоріднені сорти, які являють собою гібриди першого-третього покоління, отримані від сортів Дрогана жовта та Валерій Чкалов (кластери А і В); у походженні деяких із цих сортів (особливо з підкластера В) важливу роль відігравали інші невідомі форми. Друга група є генетично більш різноманітною та охоплює старі сорти європейського походження і споріднені з ними українські сорти, походження яких все ще залишається неповністю зрозумі-

лим (кластери D та E). Особливо це стосується сортів, отриманих внаслідок вільного запилення. Проміжне положення між цими групами займають представники кластера С.

Несподіваним виявилось ізольоване розташування на дендрограмі сорту Дрогана жовта та його порівняно мала подібність до решти досліджених сортів, хоча сорт Дрогана жовта брав участь у походженні багатьох з них. Можливим поясненням цих результатів може бути те, що в процесі гібридизації з іншими сортами було втрачено найбільш специфічні для Дрогана жовтої алелі, проте ця гіпотеза вимагає подальшого уточнення.

На загал, отримані нами результати для порівняно невеликої вибірки українських сортів черешні [8, 20] свідчать про їх генетичну гетерогенність. Це пояснюється тим, що вони мають різне географічне походження – західно-європейське, кавказьке та місцеве. Порівнюючи наші результати із подібними дослідженнями, зазначимо, що при вивченні 21 грецького сорту черешні з використанням SSR та ISSR-ПЛР маркерів встановлено їхню переважно автохтонну природу. Ці сорти було успішно розділені за географічною приналежністю на сорти із Північної та Південної Греції [5]. В іншому дослідженні 92 зразки дикої черешні та сортів із Західної Європи, генотиповані SSR маркерами, розділили на дев'ять генетичних кластерів [21].

Для уточнення походження сортів черешні української селекції необхідно в подальшому залучити до аналізу більшу кількість маркерних систем, зокрема мікросателітних та інших типів, а також збільшити розмір вибірки і в першу чергу розширити набір потенційних батьківських сортів.

Висновки. ISSR-ПЛР маркери успішно використано для оцінки генетичного різноманіття та встановлення ступеня спорідненості 24 сортів черешні української та закордонної селекції, які широко культивуються в Україні. При цьому кращими праймерами виявились UBC 835, 836, 841 та 881. Досліджені сорти є генетично гетерогенними та можуть бути розділені на дві основні групи. До першої групи належать близькоспоріднені форми, при створенні яких ведучу роль відіграли сорти Дрогана жовта та Валерій Чкалов, тоді як сорти другої групи є

менш подібними між собою, що пояснюється використанням при їх отриманні кількох сортів європейського та невідомого походження.

ISSR-PCR FINGERPRINTING OF UKRAINIAN SWEET CHERRY (*PRUNUS AVIUM* L.) CULTIVARS

Ya.I. Ivanovych, K.M. Udovychenko, M.O. Bublyk, R.A. Volkov

Institute of Horticulture NAAS, Kyiv
E-mail: ivanovych.yar@gmail.com
Yuri Fedkovych National University, Chernivtsi

ISSR-PCR markers were used to assess genetic diversity and to elucidate relatedness among 21 Ukrainian and 3 West European sweet cherry varieties, which are widely cultivated in Ukraine. The discriminatory potential was tested for 11 ISSR-PCR primers, which produced 193 amplicons. UBC 835, 836, 841 and 881 were identified as the best primers suitable for routine application. The studied cultivars appear to be genetically highly heterogenic and can be divided in two main groups. The first one includes closely related cultivars obtained by hybridization of Drogan's Yellow (Drogans gelbe Knorpelkirsche), Valerii Chkalov and some other forms. The second group comprises less similar cultivars derived from several West-European and unknown ancestors. Origin of several Ukrainian cultivars is discussed.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ УКРАИНСКИХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-ПЦР МАРКЕРОВ

Я.И. Иванович, Е.Н. Удовиченко, Н.А. Бублик, Р.А. Волков

ISSR-ПЦР маркеры использованы для оценки генетического разнообразия и установления степени родства 21 сорта черешни украинской и 3 сортов западноевропейской селекции, которые широко культивируются в Украине. Оценены дискриминационные возможности 11 ISSR-ПЦР праймеров, с использованием которых получены 193 продукта амплификации. Лучшими праймерами, пригодными для рутинного использования, оказались UBC 835, 836, 841 и 881. Исследованные сорта являются генетически гетерогенными и могут быть разделены на две основные группы. К первой относятся близкородственные сорта, полученные путем гибридизации Дроганы желтой, Валерия Чкалова и нескольких других форм. Вторая группа охватывает менее схожие сорта, которые возникли от западноевропейских и неизвестных предков. Обсуждается происхождение нескольких украинских сортов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lytovchenko, O.M., Pavliuk, V.V., and Omelchenko, I.K., *The best varieties of fruit, berry and nut crops of Ukrainian breeding*, Kyiv, Presa Ukrainy, 2011.
2. Sivolap, Yu.M., Kozhukhova, N.E., and Kalendar, R.N., *Variability and specificity of agricultural plants genomes*, Odesa: Astroprint, 2011.
3. Yılmaz, K.U., Ercişli, S., Asma, B.M., Doğan, Y., and Kafkas, S., Genetic relatedness in *Prunus* genus revealed by inter-simple sequence repeat markers, *HortScience*, 2009, vol. 44, no. 2, pp. 293–297.
4. Najafzadeh, R., Arzani, K., Bouzari N., and Saei, A., Genetic diversity assessment and identification of new sour cherry genotypes using intersimple sequence repeat markers, *Int. J. Biodiversity*, 2014, Article ID 308398, 8 p.
5. Ganopoulos, I.V., Kazantzis, K., Chatzicharis, I., Karayiannis, I., and Tsaftaris, A.S., Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers, *Euphytica*, 2011, vol. 181, no. 2, pp. 237–251.
6. Lisek, A., and Rozpara, E., Identification and genetic diversity assessment of cherry cultivars and rootstocks using the ISSR-PCR technique, *J. Fruit Ornament. Plant Res.*, 2009, vol. 17, no. 2, pp. 95–106.
7. Turovtsev, M.I., Taranenko, L.I., Pavliuk, V.V. et al., *Pomology: Vol. 4. Plum, sour cherry, sweet cherry*, Pavliuk, V.V., Ed., Kyiv, Urozhai, 2004.
8. Turovtsev, M.I., Turovtseva, V.O., and Turovtseva, N.M., Sweet cherry (*Cerasus avium* Moench.) breeding in the Institute of Irrigating Horticulture named after M. Sydorenko of UAAS, *Sci. Bull. Nat. Univ. Life and Environ. Sci. Ukraine*, 2009, vol. 13, pp. 51–58.
9. Nemicheva, N.V., Chigrin, N.F. and Yarushnikov, V.V., *Fruit trees: best varieties*, Moscow: Mir Knigi, 2007.
10. Webster, A.D., and Looney, N.E., *Cherries: Crop Physiology, Production and Uses*, 1st ed., Oxon, UK: CAB International, 1996.
11. Symyrenko, L.P., *Pomology: Vol. 3. Stone fruits, quince, south rowan, dogwood, medlar, garden hazelnuts and forest hazelnut*, Kyiv: State Edition of Agricult. Lit. UkrSSR, 1963.
12. Doyle, J.J., and Doyle, J.L., A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.*, 1987, vol. 19, pp. 11–15.
13. Peakall, R., and Smouse, P.E., GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update, *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, pp. 2537–2539.
14. Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Vanbockstaele, E., Depicker, A., and De Loose, M., AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.), *Mol. Breed.*, 2000, vol. 6, no. 2, pp. 125–134.
15. Varshney, R.K., Chabane, K., Hendre, P.S., Aggarwal, R.K., and Graner, A., Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys, *Plant Sci.*, 2007, vol. 173, no. 6, pp. 638–649.
16. Prevost, A., and Wilkinson, M.J., A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars, *Theor. Appl. Genet.*, 1999, vol. 98, no. 1, pp. 107–112.
17. Nei, M., and Li, W.H., Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, no. 10, pp. 5269–5273.
18. Perrier, X., Flori, A., and Bonnot, F., Data analysis methods, *Genetic diversity of cultivated tropical plants*, Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J.C., Ed., Montpellier: Enfield Sci. Publ., 2003.
19. Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P., Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 2000, vol. 155, no. 2, pp. 945–959.
20. Taranenko, L., Stone fruit crops cultivars for Donbass and Northern regions of Ukraine, *Plant varieties studying and breeder's right protection*, 2009, vol. 10, no. 2, pp. 85–95.
21. Guarino, C., Santoro, S., De Simone, L., and Cipriani, G., *Prunus avium*: nuclear DNA study in wild populations and sweet cherry cultivars, *Genome*, 2009, vol. 52, no. 4, pp. 320–337.

Надійшла 17.04.16