

## Використання EST-SSR маркерів для аналізу поліморфізму сортів салату посівного (*Lactuca sativa* L.) вітчизняної селекції

Н. В. Лещук<sup>1</sup>, О. В. Хареба<sup>2</sup>, Л. М. Присяжнюк<sup>1\*</sup>, Ю. В. Шитікова<sup>1</sup>, Є. М. Стариченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Український інститут експертизи сортів рослин, вул. Генерала Родимцева, 15, м. Київ, 03041, Україна,  
\*e-mail: prysiazhniuk\_l@ukr.net

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041,  
Україна, e-mail: lena1060725@gmail.com

**Мета.** Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів салату посівного вітчизняної селекції за EST-SSR маркерами. **Методи.** Молекулярно-генетичний аналіз, статистичні методи. **Результати.** Представлено результати вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму 7 сортів салату посівного за 7-ма EST-SSR маркерами. За досліджуваними маркерами ідентифіковано 37 алелів, у середньому 5,29 алеля на локус. Найполіморфнішим виявився маркер KSL-92, за яким було виявлено 7 алелів, Polymorphism Information Content (PIC) – 0,98. Найменше значення PIC – 0,57 було у маркера KSL-37, за яким ідентифіковано найменшу кількість алелів – 3. Для оцінювання генетичного різноманіття сортів салату за EST-SSR маркерами було визначено генетичні дистанції між сортами із застосуванням міри близькості Жаккара. Найближчими виявились сорти з генетичними дистанціями 0,17: 'Зорепад' і 'Малахит', 'Малахит' і 'Дублянський', 'Дублянський' і 'Смуглянка', 'Крутянський' і 'Смуглянка'. Найвіддаленішим виявився сорт 'Скарб' із значеннями генетичних дистанцій 0,00 щодо інших досліджуваних сортів. За розрахованими генетичними дистанціями сорти 'Зорепад' і 'Малахит', 'Малахит' і 'Дублянський', які належать до одного різновиду *Lactuca sativa* L.

var. *secalina*, мали високий ступінь генетичної близькості. Сорти 'Скарб' і 'Погонич', які належать до різновидів *L. sativa* L. var. *longifolia* та var. *angustana*, відповідно, були генетично віддаленими, що підтвердили значення генетичних дистанцій. Значення індексу Шеннона всередині різновиду салату посівного за досліджуваними EST-SSR маркерами становило 0,61, між різновидами – 0,96, середнє значення – 1,57. **Висновки.** Найвищий рівень поліморфізму було зауважено за маркером KSL-92, найменшу кількість алелів (3 алеля) було ідентифіковано за маркером KSL-37. Сорти, генетичні дистанції між якими становили 0,17, виявились найближчими. Найвіддаленішим сортом за досліджуваними EST-SSR маркерами виявився сорт 'Скарб'.

**Ключові слова:** ДНК маркери; різновиди салату; генетичні дистанції; алелі; PIC.

### Вступ

Салат посівний (*Lactuca sativa* L.) є однією з найпопулярніших зеленних культур у світі завдяки високій харчовій цінності, низькому вмісту цукрів та жирів, окрім того са-

лат багатий на вітаміни С, Е, К і каротиноїди [1, 2]. Основними різновидами салату посівного, які вирощують для споживчого використання, є *Lactuca sativa* L. var. *secalina*, *Lactuca sativa* L. var. *capitata*, *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* та *Lactuca sativa* L. var. *angustana*. Необхідною умовою реєстрації нових сортів в Україні відповідно до вимог UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants) є науково-технічна експертиза заявки на сорт, яка передбачає кваліфікаційну експертизу на відмінність, стабільність і стабільність (ВОС) за морфологічними ознаками. Станом на 04.05.2020 у Державний реєстр сортів рослин, придатних до поширення в Україні було включено 197 сортів салату посівного, з них 121 сорт різно-

Nadiya Leschuk

<https://orcid.org/0000-0001-6025-3702>

Olena Khareba

<https://orcid.org/0000-0002-6763-1988>

Larysa Prysiazhniuk

<http://orcid.org/0000-0003-4388-0485>

Yuliia Shytikova

<http://orcid.org/0000-0002-1403-694X>

Yevhenii Starychenko

<http://orcid.org/0000-0001-8608-5268>

виду *Lactuca sativa* L. var. *secalina*, 49 – *Lactuca sativa* L. var. *capitata*, 26 – *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* та 1 сорт – *Lactuca sativa* L. var. *angustana* [3]. На проявлення морфологічних ознак можуть впливати умови навколишнього середовища, що в свою чергу спричинює труднощі з ідентифікації сортів, які відрізняються між собою за декількома ознаками з мінімальним діапазоном ступеня проявлення. Відповідно до принципів UPOV для виявлення різниці між такими сортами можуть бути застосовані додаткові методи аналізу, зокрема, ДНК маркери, які мають чимало переваг завдяки їхній незалежності від впливу навколишнього середовища [4]. Широко застосовують SSR (Simple Sequence Repeats) маркери завдяки їхній кодомінантності та розповсюдженню по геному [5]. SSR маркери можуть знаходитись як в кодуючих, так і некодуючих регіонах генома. Серед них особливий інтерес представляють EST-SSR маркери (Expressed Sequence Tag-SSR), які безпосередньо пов'язані з областями, що експресують, і широко використовуються для аналізу генетичного різноманіття та структури популяцій [6].

Для вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів салату посівного застосовували як SSR, так і EST-SSR маркери [1, 2, 5, 7]. Однак, в основному досліджували іноземні сорти салату, які не вирощують в Україні. Варто зауважити, що було досліджено взаємодії між сортами, які належать до різних груп за господарсько-споживчою класифікацією та не приділено достатню увагу вивченню біологічного різноманіття різних видів сортів та поліморфізму сортів всередині одного різновиду.

**Мета досліджень** – визначити молекулярно-генетичний поліморфізм сортів салату посівного української селекції за EST-SSR маркерами.

### Матеріали та методика досліджень

Матеріалом для досліджень слугували 7 сортів салату посівного: 'Зорепад', 'Малахіт', 'Дублянський', 'Крутянський' (*Lactuca sativa* L. var. *secalina*); 'Смуглянка' (*L. sativa* L. var. *capitata*); 'Скарб' (*L. sativa* var. *longifolia*), 'Погонич' (*L. sativa* L. var. *angustana*).

#### Екстракція ДНК та проведення ПЛР

ДНК виділяли із 4-денних проростків, отриманих за стандартною методикою [8]. Екстракцію ДНК проводили з використанням катіонного детергенту ЦТАБ (цетилтриметиламоній бромід), дворазовим очищенням суміші хлороформом та розчином етанолу. Отриману ДНК розчиняли в ТЕ буфері [9]. Досліджували молекулярно-генетичний поліморфізм сортів салату із застосуванням 7-ми EST-SSR маркерів, які за результатами досліджень Hong et al., 2015 мали PIC вище 0,5 [4]. Характеристики праймерів та нуклеотидні послідовності представлено в таблиці 1.

#### Проведення ПЛР та визначення розміру ампліконів

ПЛР виконували на ампліфікаторі T-CY (Creacon Technologies B.V., The Netherlands). Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила: 20 нг ДНК, однократний (1×) буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 50 мМ KCl; 0,01% Triton X-100), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 100 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), 0,4 мкМ кожного з праймерів та 1 од. Таq полімерази. Температурні режими ПЛР: початкова денатурація

Таблиця 1

### Характеристика EST-SSR маркерів для оцінки поліморфізму сортів салату посівного

Назва маркера	NCBI EST код	Нуклеотидні послідовності праймерів 5'→3'	Мотив SSR
KSL-37	CLSM1424	F: TCTCTTGCTCCAATACCCGA R: GTATCGGGCTCATGTCCTT	(AGA) <sub>15</sub>
KSL-173	CLSM444	F: ATAGTCACGACTCACGCCCA R: CCATTTTCTCTTTCTGCGA	(CT) <sub>14</sub>
KSL-26	CLSM14994	F: GGGCTTTCTCTCCTTTCTTT R: AATTGGATCCTGTCGAGGG	(TC) <sub>16</sub>
KSL-32	CLSM14764	F: CGGGGAGCATTTAGTGTGTG R: AATTGGGGTCCGATTTGAG	(CT) <sub>14</sub>
KSL-92	CLSY517	F: GGTCTCTTTCTCTGCCCTG R: TCGCGTTCTGAAGTAGCCAT	(CT) <sub>20</sub>
KSL-119	CLSM10279	F: TTCGACTCGTCTTCGACGC R: CGATGTCACACCACCCATCT	(TC) <sub>16</sub>
KSL-271	CLSS8197	F: ACAAAGGCAAGATTGGGTCA R: GCGGATATGCAGCCATAACA	(ATG) <sub>12</sub>

Примітка. F – прямий праймер; R – зворотній праймер.

94 °C – 4 хв, денатурація 94 °C – 30 с, гібридизація праймерів 55 °C – 30 с, елонгація 72 °C – 45 с, кінцева елонгація 72 °C – 10 хв, 40 циклів. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою капілярного електрофорезу з використанням аналізатора нуклеїнових кислот Fragment Analyzer (Agilent Technologies, США) та набору реактивів dsDNA 910 Reagent Kit, 35–1,500 bp. Обробляли результати та визначали розмір ампліконів за допомогою комп'ютерної програми PROSize 2.0.

**Статистична обробка даних**

Для оцінювання інформативності досліджуваних локусів розраховували частоти ідентифікованих алелів та PIC [10]. Для оцінки поліморфізму досліджуваних різновидів салату посівного за EST-SSR маркерами використовували індекс Шеннона [11] за допомогою програмного забезпечення GenAlEx 6.503. Групували досліджувані сорти за коефіцієнтами подібності Жаккара на основі бінарної матриці наявності/відсутності певного алелю [4].

**Результати досліджень**

У результаті ампліфікації ДНК 7 сортів салату посівного за 7-ма EST-SSR маркерами було ідентифіковано 37 алелів, в середньому 5,29 алелів на локус. Серед досліджуваних маркерів найполіморфнішим виявився KSL-92, за яким виявлено 7 алелів (рис. 1).

У всіх досліджуваних сортах салату посівного виявлено алелі різного розміру – від 193 до 311 п.н., відповідно й значення PIC було високим – 0,98. Найменше значення PIC – 0,57 зазначено у маркера KSL-37, за яким ідентифіковано найменшу кількість алелів – 3 (рис. 2).

Визначено, що алель розміром 198 п.н. за маркером KSL-37 ідентифіковано тільки у сорту 'Дублянський' різновиду *L. sativa* var. *secalina* (рис. 2). Інші сорти мали алелі розміром 191 та 193 п.н. Причому, варто зауважити, що алель розміром 193 п.н. мав найбільшу частоту – 0,57. Характеристику всіх отриманих алелів за досліджуваними маркерами для сортів салату наведено в таблиці 2.

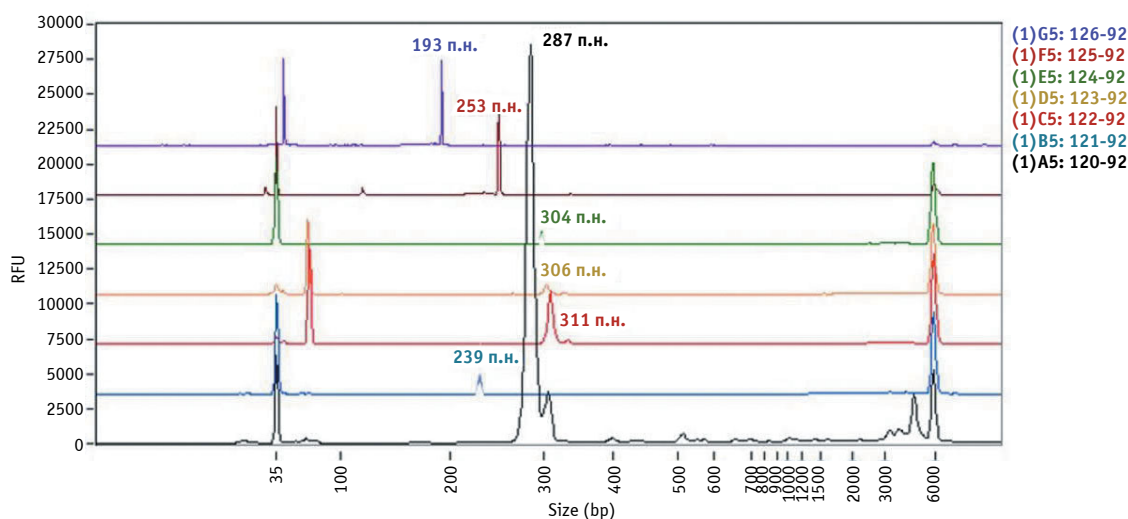
Таблиця 2

**Характеристика отриманих алелів за EST-SSR маркерами салату посівного**

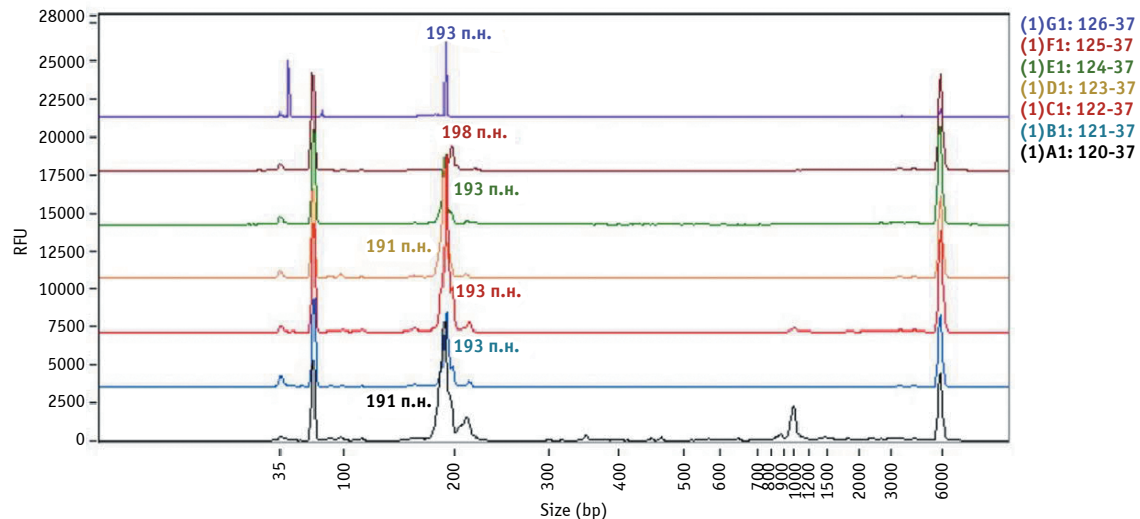
EST-SSR	Кількість алелів	Розмір алелів, п.н.	Частота алелів	PIC
KSL-37	3	191–198	0,14-0,57	0,57
KSL-173	5	151–349	0,14-0,43	0,98
KSL-26	5	217–260	0,14-0,29	0,98
KSL-32	6	175–222	0,14-0,29	0,98
KSL-92	7	193–311	0,14	0,98
KSL-119	5	244–285	0,14-0,29	0,92
KSL-271	6	174–293	0,14-0,29	0,98

Унаслідок ПЛП аналізу за досліджуваними маркерами ідентифіковано від 3 до 7 алелів на один локус. За маркерами KSL-173, KSL-26 та KSL-119 було ідентифіковано по 5 алелів. Розмір отриманих алелів становив 151–349 п.н. за маркером KSL-173, 217–260 п.н. за маркером KSL-26 та 244–285 п.н. за маркером KSL-119. Частоти визначених за цими маркерами алелів варіювали від 0,14 до 0,43, PIC – 0,92–0,98. За маркерами KSL-32 та KSL-271 було отримано алелі розмірами 175–222 та 174–293 п.н., відповідно, розподіл частот – від 0,14 до 0,29, PIC – 0,98.

Hong et al. [4] досліджували 92 сорти салату посівного різних форм за господарсько-споживчою класифікацією: салат листковий,



**Рис. 1. Результати капілярного електрофорезу продуктів ампліфікації сортів салату за маркером KSL-92:** 120 – сорт 'Зорепад', 121 – 'Малахіт', 122 – 'Дублянський', 123 – 'Крутянський', 124 – 'Смуглянка', 125 – 'Скарб', 126 – 'Погонич'



**Рис. 2. Результати капілярного електрофорезу продуктів ампліфікації сортів салату за маркером KSL-37:**  
120 – сорт ‘Зорепад’, 121 – ‘Малахіт’, 122 – ‘Дублянський’, 123 – ‘Крутянський’, 124 – ‘Смуглянка’,  
125 – ‘Скарб’, 126 – ‘Погонич’

головчастий та салат ромен з використанням 58 EST-SSR маркерів. Загалом авторами було отримано 176 алелів за досліджуваними маркерами, що склало близько 3 алелів на локус. Для маркерів, які були використані в дослідженнях, PIC становив від 0,505 до 0,743. Найполіморфнішим маркером виявився KSL-26, найменше значення PIC було отримано за маркером KSL-271. У наших дослідженнях найполіморфнішим виявився маркер KSL-92 з PIC 0,98. Причому, слід зазначити, що він суттєво відрізнявся розмірами алелів, отриманих за цим маркером. Hong et al. [4] для досліджуваних сортів салату посівного отримали алелі розмірами 188–196 п.н. У наших дослідженнях розмір алелів був від 193 до 311 п.н. Алелі, розміром більше 300 п.н. за маркером KSL-92 були ідентифіковані у різновидів *L. sativa* var. *capitata*, *L. sativa* var. *longifolia* та *L. sativa* var. *angustana*. За маркером KSL-37, який у наших дослідженнях виявився найменш поліморфним, розмір алелів також відрізнявся від отриманих за цим же маркером Hong et al. [4]. Так, за результатами наших аналізів розмір алелів за маркером KSL-37 становив 191–198 п.н., тоді як у роботі Hong et al. [4] – 125–155 п.н.

У роботі Wang et al. [2] описано використання розроблених ними 15-ти EST-SSR маркерів для оцінювання генетичного різноманіття 66 зразків салату посівного. У результаті досліджень авторами отримано від 3 до 11 алелів, що склало в середньому 6,2 алеля на локус. У нашій роботі застосовано меншу кількість зразків та маркерів, а середня кількість алелів на локус склала 5,29.

Отже, достатньо рівномірний розподіл частот алелів та отримані значення PIC за до-

сліджуваними EST-SSR маркерами вказують на можливість їхнього використання для оцінювання генетичного різноманіття сортів салату посівного різних різновидів.

Відповідно до отриманих алелів за EST-SSR маркерами було визначено генетичні дистанції між сортами салату посівного. Відповідно до інтерпретації результатів оцінки міри близькості за Жаккардом ідентичними вважають сорти із значенням генетичних дистанцій 1,00, із збільшенням відмінності числове значення зменшується до 0,00 [4].

Визначено, що за 7-ма EST-SSR маркерами найближчими виявились сорти: ‘Зорепад’ і ‘Малахіт’, ‘Малахіт’ і ‘Дублянський’, ‘Дублянський’ і ‘Смуглянка’, ‘Крутянський’ і ‘Смуглянка’ (рис. 3).

Найвіддаленішим виявився сорт ‘Скарб’ із значеннями генетичних дистанцій 0,00 стосовно інших досліджуваних сортів. Між сортами ‘Зорепад’ і ‘Дублянський’, ‘Зорепад’ і ‘Крутянський’, ‘Зорепад’ і ‘Погонич’, ‘Малахіт’ і ‘Крутянський’, ‘Малахіт’ і ‘Смуглянка’, ‘Малахіт’ і ‘Погонич’, ‘Дублянський’ і ‘Погонич’, ‘Смуглянка’ і ‘Погонич’ значення генетичних дистанцій були 0,08, що відповідно до отриманих даних свідчить про середній ступінь генетичної близькості між ними.

Відповідно до отриманих генетичних дистанцій сорти ‘Зорепад’ і ‘Малахіт’, ‘Малахіт’ і ‘Дублянський’, які належать до одного різновиду *L. sativa* var. *secalina*, мали високий ступінь генетичної близькості за 7-ма досліджуваними EST-SSR маркерами.

Проте, сорти ‘Крутянський’, ‘Дублянський’ і ‘Смуглянка’, які також виявились близькими, є представниками двох різновидів *L. sativa* var. *secalina* та var. *capitata*, відповідно.

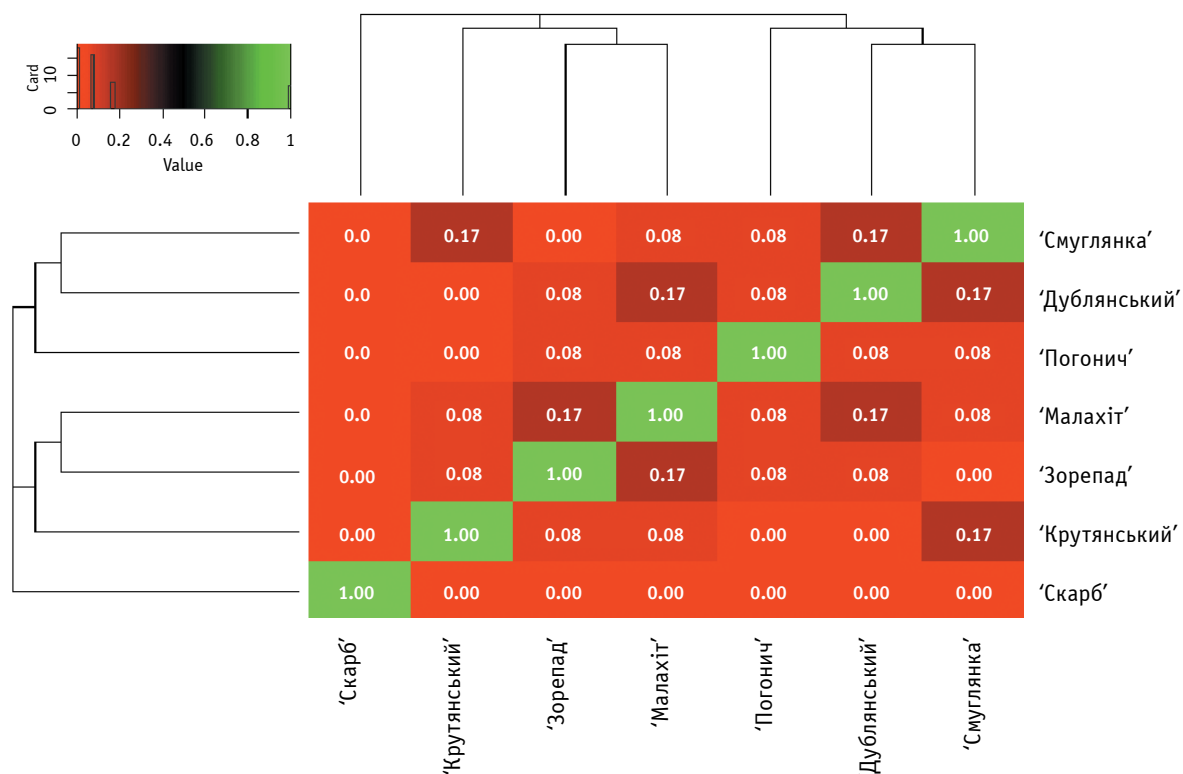


Рис. 3. Групування сортів салату посівного за коефіцієнтами подібності Жаккара на основі EST-SSR маркерів

Сорти 'Скарб' і 'Погонич', які належать до різновидів *L. sativa* var. *longifolia* та var. *angustana*, відповідно, є генетично віддаленими від інших досліджуваних сортів, що підтверджують значення генетичних дистанцій.

Унаслідок оцінювання генетичної близькості сортів салату посівного, проведеного Hong et al. [4], було зазначено, що до одного кластеру відповідно до дистанцій Жаккара увійшли сорти салату як однієї господарсько-споживчої групи (сорти листового салату з червоними листками), так і сорти салату із різних груп: салат ромен, головчастий салат, листовий салат із зеленими листками. У дослідженнях Simko [7] також спостерігали включення в один кластер сортів, які належать до різних груп, зокрема, салату айсберг та головчастого салату.

Rauscher та Simko [5] визначали ступінь генетичної близькості між різними господарсько-споживчими групами та видами салату за SSR маркерами. Автори досліджували 36 зразків салату за 97-ма SSR маркерами. За результатами їхніх досліджень найближчими виявились сорти салату, що належали до головчастого типу та салату ромен, також сорти, які були представниками одного типу і не сформували окремих кластерів. Авторами зауважено, що генотипування сортів салату за допомогою SSR мар-

керів пов'язане із більшою кількістю помилок, ніж із залученням EST-SSR. Фактори, що збільшують їхню кількість, включають наявність неспецифічних продуктів ПЛР, велику кількість алелів на локус та великий розмір амплікону [7].

Отже, генетичну близькість сортів салату посівного, які належать до двох різновидів можна пояснити тим, що EST-SSR знаходяться в кодуючих ділянках генів та є більш консервативними для близьких видів та різновидів ніж SSR [7].

Для оцінювання видового різноманіття рослин за морфологічними та молекулярно-генетичними даними найчастіше використовують індекс Шеннона [12]. Індекс різноманіття Шеннона є кількісною мірою, що відображає, скільки різних типів існує в наборі даних, і одночасно враховує, наскільки рівномірно основні об'єкти розподіляються між цими типами [13].

Унаслідок виконаних розрахунків отримано значення індексу Шеннона всередині різновиду та між досліджуваними різновидами салату посівного (рис. 4).

Визначено, що рівень поліморфізму між різновидами салату посівного за 7-ма EST-SSR маркерами був вищим (61%) ніж всередині різновиду (39%), індекс Шеннона становив 0,96 та 0,61, відповідно, загальне значення індексу для досліджуваних сортів – 1,57.



Рис. 4. Частка рівня внутрішнього і зовнішнього поліморфізму різновидностей салату посівного

Відомо, що чим більший індекс Шеннона, тим більше видове різноманіття популяції. Це пояснюють тим, що збільшення індексу вказує на підвищення невизначеності та однорідності структури системи [12]. Зазвичай значення індексу Шеннона знаходиться в межах від 1,5 до 3,5. У наших дослідженнях невисокий індекс Шеннона можна пояснити тим, що серед досліджуваних різновидів салату посівного тільки один (*L. sativa* var. *secalina*) представлено декількома сортами. В дослідженнях Kim et al., 2019 [14] показано, що індекс Шеннона, розрахований для досліджуваних популяцій гвоздики за 17-ма SSR маркерами, варіював залежно від складу популяцій та мав високе значення для популяцій із більшою кількістю об'єктів. Отже, застосування 7-ми EST-SSR маркерів у дослідженнях виявилось ефективним для оцінювання генетичного різноманіття сортів салату посівного чотирьох різновидів та може бути використано для їхньої ідентифікації. Для детальнішого оцінювання різновидів та їхнього сортового різноманіття дослідження буде продовжено із залученням більшої кількості EST-SSR маркерів і сортів.

## Висновки

Визначено поліморфізм за 7-ма EST-SSR маркерами 7 сортів салату посівного 4 різновидів. Найполіморфнішим виявився маркер KSL-92, за яким ідентифіковано 7 алелів. Визначено, що найближчими за досліджуваними EST-SSR маркерами були сорти, генетичні дистанції між якими становили 0,17. Найвіддаленішим від досліджуваних сортів виявився сорт 'Скарб', який є представником *L. sativa* var. *longifolia*, для нього показник генетичної дистанції за коефіцієнтом Жаккара склав 0,00.

Для досліджуваних різновидів салату посівного було розраховано коефіцієнт біологічного різноманіття Шеннона, середнє значення якого становило 1,57. Таким чином, використання EST-SSR маркерів для оцінювання генетичного різноманіття салату посівного можна застосовувати для визначення відмінних та подібних сортів в селекційній практиці та в процесі кваліфікаційної експертизи з визначення критеріїв відмінності, однорідності та стабільності сортів салату посівного усіх різновидів.

## Використана література

- Zhou H., Zhan, P., Luo J. et al. The establishment of a DNA fingerprinting database for 73 varieties of *Lactuca sativa capitata* L. using SSR molecular markers. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2019. Vol. 60, Iss. 1. P. 95–103. doi: 10.1007/s13580-018-0102-3
- Wang S., Wang B., Liu J. et al. Novel polymorphic EST-based microsatellite markers characterized in lettuce (*Lactuca sativa*). *Biologia.* 2017. Vol. 72, Iss. 11. P. 1300–1305. doi: 10.1515/biolog-2017-0154
- Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2020 році. URL: <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin>
- Hong J. H., Kwon Y. S., Mishra R. K., Kim D. H. Construction of EST-SSR databases for effective cultivar identification and their applicability to complement for lettuce (*Lactuca sativa* L.) distinctness test. *Am. J. Plant Sci.* 2015. Vol. 6, Iss. 1. P. 113–125. doi: 10.4236/ajps.2015.61013
- Rauscher G., Simko I. Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. *BMC Plant Biol.* 2013. Vol. 13, Iss.11. P. 1–11. doi: 10.1186/1471-2229-13-11
- Шаптуренко М. Н., Печковская Т. В., Вакула С. И. и др. Информативные EST-SSR-маркеры для типирования и внутривидовой дифференциации *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2016. Т. 20, № 1. С. 51–56. doi: 10.18699/VJ16.133
- Simko I. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Hered.* 2009. Vol. 100, Iss. 2. P. 256–262. doi: 10.1093/jhered/esn072
- Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості : ДСТУ 4138-2002. [Чинний від 2004-01-01]. Київ : Держспоживстандарт України, 2003. 173 с.
- Методика проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні. Методи визначення показників якості продукції рослинництва / за ред. С. О. Ткачик. 3-тє вид. випр. і доп. Вінниця : Нілан-ЛТД, 2015. 160 с. URL: <https://sops.gov.ua/uploads/page/5b7e67fb8d4b9.pdf>
- Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н., Вербицкая Т. Г. и др. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. Киев : Аграрна наука, 1998. 156 с.
- Орлова Ю. С. Использование индексов биологического разнообразия для анализа альгофлоры бассейна р. Алатырь. *Вестник Мордовского ун-та.* 2013. № 3–4. С. 53–57.
- Therault G., Nkongo K. K., Narendrula R., Beckett P. Molecular and ecological characterisation of plant populations from limed and metal-contaminated sites in Northern Ontario (Canada): ISSR analysis of white birch (*Betula papyrifera*) populations. *Chem. Ecol.* 2013. Vol. 29, Iss. 7. P. 573–585. doi: 10.1080/02757540.2013.820715
- Silva D. C., Diniz L. E. C. Blank, A. F. et al. Assessment of genetic diversity of a native population of *Eplingiella fruticosa*: a plant with therapeutic potential. *Genet. Mol. Res.* 2017. Vol 16, Iss. 3. P. 1–10. doi: 10.4238/gmr16039749

14. Kim B., Nakamura K., Tamura S., Lee B. Y. et al. Genetic diversity and population structure of *Lychnis wilfordii* (Caryophyllaceae) with newly developed 17 microsatellite markers. *Genes Genom.* 2019. Vol. 41, Iss. 4. P. 381–387. doi: 10.1007/s13258-018-0759-0

## References

- Zhou, H., Zhang, P., Luo, J., Liu, X., Fan, S., Liu, C., & Han, Y. (2019). The establishment of a DNA fingerprinting database for 73 varieties of *Lactuca sativa capitata* L. using SSR molecular markers. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 60(1), 95–103. doi: 10.1007/s13580-018-0102-3
- Wang, S., Wang, B., Liu, J., Ren, J., Huang, X., Zhou, G., & Wang, A. (2017). Novel polymorphic EST-based microsatellite markers characterized in lettuce (*Lactuca sativa*). *Biologia*, 72(11), 1300–1305. doi: 10.1515/biolog-2017-0154
- Derzhavnyi reestr sortiv roslyn, prydatnykh dlia poshyrennia v Ukraini v 2020 r. [State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2020]. (2020). Retrieved from <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslyn> [in Ukrainian]
- Hong, J. H., Kwon, Y. S., Mishra, R. K., & Kim, D. H. (2015). Construction of EST-SSR databases for effective cultivar identification and their applicability to complement for lettuce (*Lactuca sativa* L.) distinctness test. *Am. J. Plant Sci.*, 6(1), 113–125. doi: 10.4236/ajps.2015.61013
- Rauscher, G., & Simko, I. (2013). Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. *BMC Plant Biol.*, 13(11), 1–11. doi: 10.1186/1471-2229-13-11
- Shapturenko, M. N., Pechkovskaya, T. V., Vakula, S. I., Yakimovich, A. V., Zabar, Yu. M., & Khotyleva, L. V. (2016). Informativnye EST-SSR-markery dlya tipirovaniya i vnurividovoy differentsiatsii *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 20(1), 51–56. doi: 10.18699/VJ16.133 [in Russian]
- Simko, I. (2009). Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Hered.*, 100(2), 256–262. doi: 10.1093/jhered/esn072

УДК 635.52:577.213.3

Лещук Н. В.<sup>1</sup>, Хареба Е. В.<sup>2</sup>, Присяжнюк Л. М.<sup>1\*</sup>, Шитикова Ю. В.<sup>1</sup>, Стариченко Е. М.<sup>1</sup> Использование EST-SSR маркеров для анализа полиморфизма сортов салата посевого (*Lactuca sativa* L.) отечественной селекции // Plant Varieties Studying and Protection. 2020. Т. 16, № 2. С. 226–233. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.16.2.2020.209259>

<sup>1</sup>Український інститут експертизи сортів рослин, ул. Генерала Родимцева, 15, г. Київ, 03041, Україна, e-mail: prysiazhniuk\_l@ukr.net

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природопольовання України, ул. Героїв Оборони, 15, г. Київ, 03041, Україна, e-mail: lena1060725@gmail.com

**Цель.** Определение молекулярно-генетического полиморфизма сортов салата посевого отечественной селекции с помощью EST-SSR маркеров. **Методы.** Молекулярно-генетический анализ, статистические методы. **Результаты.** Представлены результаты изучения молекулярно-генетического полиморфизма 7 сортов салата посевого с помощью 7 EST-SSR маркеров. В результате анализа по исследуемым маркерам идентифицировано 37 аллелей, в среднем 5,29 аллели на локус. Наиболее полиморфным оказался маркер KSL-92, с помощью которого выявлено 7 аллелей, Polymorphism Information Content (PIC) – 0,98. Наименьшее значение PIC – 0,57 было у маркера KSL-37, с помощью которого идентифицировано наименьшее количество аллелей – 3. Для оценки генетического разнообразия сортов салата с помощью EST-SSR маркеров были определены генетические дистанции между сортами с применением меры близости Жаккара. Наиболее близкими оказались сорта, генетические дистанции между которыми составляли 0,17: ‘Зорепад’ и ‘Малахіт’, ‘Малахіт’ и ‘Дублянський’, ‘Дублянсь-

- Nasinnia silskohospodarskykh kultur. *Metody vyznachennia yakosti: DSTU 4138-2002* [Seeds of agricultural crops. Methods of quality determination: State Standart 4138-2002]. (2003). Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy. [in Ukrainian]
- Tkachyk, S. O. (Ed.). (2016). *Metodyka provedennia kvalifikatsiinoi ekspertyzy sortiv roslyn na prydatnist do poshyrennia v Ukraini. Metody vyznachennia pokaznykiv yakosti produktsii roslinnystva* [Methods of qualification examination of plant varieties for Value for Cultivation and Use in Ukraine. Methods for determining the quality of crop products]. (3 ed., rev.). Vinnytsia: Nilan-LTD. URL: <https://sops.gov.ua/uploads/page/5b7e67fb8d4b9.pdf>. [in Ukrainian]
- Sivolap, Yu. M., Kalendar, R. N., Verbitskaya, T. G., Brik, A. F., Kozhukhova, N. E., Solodenko, A. E., ... Topchieva, E. A. (1998). *Ispolzovanie PCR-analiza v genetiko-selektionnykh issledovaniyakh* [The use of PCR analysis in genetic breeding studies]. Kyiv: Ahrarna nauka. [in Russian]
- Orlova Yu. S. (2013). Using of diversity indexes to analysis of algoflora of Alatyr river basin. *Vestnik Mordovskogo universiteta* [Mordovia University Bulletin], 3–4, 53–57. [in Russian]
- Theriault, G., Nkongolo, K. K., Narendrula, R., & Beckett, P. (2013). Molecular and ecological characterisation of plant populations from limed and metal-contaminated sites in Northern Ontario (Canada): ISSR analysis of white birch (*Betula papyrifera*) populations. *Chem. Ecol.*, 29(7), 573–585. doi: 10.1080/02757540.2013.820715
- Silva, D. C., Diniz, L. E. C., Blank, A. F., Nizio, D. A. D. C., Pinto, J. A. O., Pereira, K. L. G., & Arrigoni-Blank, M. D. F. (2017). Assessment of genetic diversity of a native population of *Eplingiella fruticosa*: a plant with therapeutic potential. *Genet. Mol. Res.*, 16(3), 1–10. doi: 10.4238/gmr16039749
- Kim, B., Nakamura, K., Tamura, S., Lee, B. Y., & Kwak, M. (2019). Genetic diversity and population structure of *Lychnis wilfordii* (Caryophyllaceae) with newly developed 17 microsatellite markers. *Genes Genom.*, 41(4), 381–387. doi: 10.1007/s13258-018-0759-0

кий’ и ‘Смуглянка’, ‘Крутянський’ и ‘Смуглянка’. Наиболее удаленным оказался сорт ‘Скарб’ со значениями генетических дистанций 0,00 по отношению к другим исследуемым сортам. Согласно рассчитанным генетическим дистанциям сорта ‘Зорепад’ и ‘Малахіт’, ‘Малахіт’ и ‘Дублянський’, которые относятся к одной разновидности *Lactuca sativa* L. var. *secalina*, имели высокую степень генетической близости. Сорта ‘Скарб’ и ‘Погонич’, которые относятся к разновидностям *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* и *Lactuca sativa* L. var. *angustana*, соответственно, были генетически отдаленными, что подтверждают значения генетических дистанций. Значение индекса Шеннона внутри разновидности салата посевого по исследуемым EST-SSR маркерам составило 0,61, между разновидностями – 0,96, среднее значение – 1,57. **Выводы.** Наиболее высокий уровень полиморфизма был отмечен по маркеру KSL-92, наименьшее количество аллелей (3 аллели) было идентифицировано с помощью маркера KSL-37. Сорта, генетические дистанции между которыми составляли 0,17, оказались наиболее близкими.

Наиболее отдаленным сортом по исследованным EST-SSR маркерам оказался сорт 'Скарб'.

**Ключевые слова:** ДНК маркеры; разновидности салата; генетические дистанции; аллели; PIC.

UDC 635.52:577.213.3

**Leshchuk, N. V.<sup>1</sup>, Khareba, O. V.<sup>2</sup>, Prysiazhniuk, L. M.<sup>1\*</sup>, Shytykova, Yu. V.<sup>1</sup>, & Starychenko, Ye. M.<sup>1</sup>** (2020). Application of EST-SSR markers for analysis of polymorphism of lettuce varieties (*Lactuca sativa* L.) of domestic breeding. *Plant Varieties Studying and Protection*, 16(2), 226–233. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.16.2.2020.209259>

<sup>1</sup>Ukrainian Institute for Plant Variety Examination, 15 Henerala Rodymtseva St., Kyiv, 03041, Ukraine, \*e-mail: prysiazhniuk\_l@ukr.net

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15 Heroiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine, e-mail: lena1060725@gmail.com

**Purpose.** Determination of molecular genetic polymorphism of lettuce cultivars of Ukrainian breeding by EST-SSR markers. **Methods.** Molecular genetic analysis, statistical methods. **Results.** The results of molecular genetic polymorphism study of 7 lettuce cultivars by 7 EST-SSR markers are presented. As a result of the analysis by studied markers, 37 alleles were detected with an average 5.29 alleles per locus. The KSL-92 marker, which identified 7 alleles, proved to be the most polymorphic (PIC – Polymorphism Information Content 0.98). The lowest PIC value (0.57) was noted for the KSL-37 marker by which 3 alleles were identified. For assessing the genetic diversity of lettuce cultivars by EST-SSR markers, genetic distances between cultivars were determined based on Jaccard's similarity coefficient. It was determined that the most similar cultivars with genetic distances 0.17 were 'Zorepad' and 'Malakhit', 'Malakhit' and 'Dublianskyi', 'Dublianskyi' and 'Smuhlianka', 'Krutianskyi' and 'Smuhlianka'. The most distant cultivar was 'Skarb' with a genetic distance 0.00 compared to other studied cultivars. According to the calcu-

lated genetic distances, the cultivars 'Zorepad' and 'Malakhit', 'Malakhit' and 'Dublianskyi', which belong to the same variety *Lactuca sativa* L. var. *secalina* have a strong genetic similarity. The cultivars 'Skarb' and 'Pohonych', which belong to the varieties *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* and *Lactuca sativa* L. var. *angustana*, respectively, were genetically distant, what was confirmed by *genetic distances values*. It was determined that the Shannon index within the lettuce variety by 7 EST-SSR markers is 0.61, between varieties – 0.96, the average value is 1.57. **Conclusions.** According to the results of studies of 7 lettuce cultivars, it was found that the highest polymorphism was determined by the KSL-92 marker, the minimum of alleles number (3 alleles) was identified by KSL-37 marker. Based on calculated genetic distances, it was noticed that lettuce cultivars, genetic distances between which are 0.17, were the most similar. The most distant cultivar based on 7 EST-SSR markers was 'Skarb' cultivar.

**Keywords:** DNA markers; lettuce varieties; genetic distances; alleles; PIC.

Надійшла / Received 19.05.2020

Погоджено до друку / Accepted 09.06.2020