

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАН УКРАЇНИ»**

ІВАНОВИЧ ЯРОСЛАВ ІВАНОВИЧ



УДК 577.213.3:575.174.015.3:630*165:634.232

**ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ ДЛЯ МАРКЕР-ОПОСЕРЕДКОВАНОГО
ДОБОРУ СОРТІВ ЧЕРЕШНІ (*PRUNUS AVIUM* L.)
УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодових і ягідних культур Інституту садівництва Національної академії аграрних наук України

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор
Волков Роман Анатолійович,
Чернівецький національний університет імені
Юрія Федьковича МОН України, заступник
директора з наукової роботи Інституту біології,
хімії та біоресурсів, завідувач кафедри
молекулярної генетики та біотехнології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Кунах Віктор Анатолійович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН
України, завідувач відділу генетики клітинних
популяцій

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Ісаєнков Станіслав Валентинович,
Державна установа «Інститут харчової
біотехнології та геноміки НАН України»,
завідувач відділу рослинних харчових продуктів
та біофортificaції

Захист дисертації відбудеться «11» жовтня 2018 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а. Факс: (044) 434 3777. Адреса електронної пошти: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано 10 вересня 2018 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук,
доцент



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO) у світі спостерігається стабільне зростання площі насаджень, урожайності та валового збору плодів черешні (FAOSTAT, 2016). З огляду на збільшення попиту на плоди черешні на світовому ринку актуальною є потреба цілеспрямованого покращення сортименту в короткі строки.

Україна є однією з найбагатших країн світу за наявністю та використанням генетичного різноманіття рослин і входить до десятки країн, що зробили найбільший вклад у розвиток селекції черешні (Sansavini, 2008) та до десятки найбільших виробників плодів цієї культури (FAOSTAT, 2016). За останні десятиріччя українськими селекціонерами створено велику кількість сортів черешні, перспективних для промислового вирощування та конкурентоздатних на світовому ринку (Туровцев та ін., 2009; Тараненко, 2009; Литовченко, 2011).

Черешня є однією з важливих промислових плодових культур в Україні. В першу чергу велике значення для виробників мають сорти, що володіють специфічними господарсько-цінними ознаками: характерним габітусом, стійкістю до хвороб та шкідників, самоплідністю, надраннім та пізнім строком дозріванням плодів, високими показниками врожайності, придатністю до механізованого збирання плодів, транспортабельністю, високим вмістом вуглеводів, сухих розчинних речовин та ін. (Theiler-Hedtrich, 1994; Olmstead & Lang, 2004; Sansavini, 2008; Schuster, 2012; De Franceschi et al., 2013; Quero-Garcia, 2014; Cai et al., 2017).

Вивчення на сучасному рівні генетичного різноманіття культурних рослин вкрай важливе для цілеспрямованих селекційних досліджень (Guarino et al., 2009; Peace et al., 2012; Laidò et al., 2013; Boucheffa et al., 2017; Hewitt et al., 2017). У зв'язку зі стрімким розвитком молекулярних методів та активними дослідженнями геномів культурних рослин актуальним є пошук генів господарсько-цінних ознак (Biscarini et al., 2017). Проте, на сьогодні більшість сортів черешні вітчизняної селекції не вивчались на молекулярно-генетичному рівні.

У зв'язку з цим виникає необхідність створення генетичних профілів сортів черешні української селекції для проведення цілеспрямованих селекційних досліджень (Schuster, 2012; De Franceschi et al., 2013; Cai et al., 2017), контролю сортової ідентичності та генетичної стабільності клонів при розмноженні садивного матеріалу на безвірусній основі, управління колекціями (банками) генетичних ресурсів та захисту прав селекціонерів (Giovannini et al., 2016; UPOV; ECPGR). Створення цілісної, сучасної системи оцінки сортової ідентичності черешні з використанням різних підходів можливе при поєднанні молекулярних даних із традиційними селекційними, помологічними описами, узагальненими даними сортовипробування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано у секторі біотехнологічних досліджень відділу вірусології, оздоровлення та розмноження плодових і ягідних культур Інституту садівництва НААН. Роботу виконано у рамках державних програм «Розробити наукові основи виробництва здорового садивного матеріалу та генетичного контролю господарсько-цінних ознак плодових, ягідних та декоративних культур» (№ 0711U00317, 2013-2015 рр.) та «Вдосконалити методи цілеспрямованого і прискореного створення нових

високопродуктивних сортів плодових і ягідних культур, адаптованих до умов вирощування та сучасних технологій» (№ 0104U004106, 2013-2015 рр.), науково-технічної програми НААН «Сільськогосподарська біотехнологія» за завданням «Поліпшення генотипів рослин з використанням досягнень сучасної біотехнології» (№ 0104U004106, 2013-2015 рр.) НААН України. Частина досліджень виконано під час короткострокової наукової місії (STSM) у Відділі біології та патології плодових культур Центру Бордо-Аквітанія INRA (Бордо, Франція, 2016 р.) у рамках програми COST FA1104 «Sustainable production of high-quality cherries for the European market».

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було вивчення генетичного різноманіття українських сортів та диких форм черешні сучасними молекулярно-генетичними методами для визначення перспектив використання та консервації генофонду цієї культури в Україні. Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Провести порівняльну оцінку дискримінаційних можливостей IRAP-, REMAP-, ISSR- та SSR-маркерів при генетичному профілюванні українських сортів та форм черешні. Використовуючи молекулярні маркери, оцінити генетичне різноманіття сортів черешні української селекції.

2. Сформувати референсну колекцію ДНК сортів та форм черешні. За результатами генетичного профілювання сформувати базу даних ДНК-типуювання та створити генетичні профілі сортів та форм черешні, що можуть бути використані для доповнення традиційних паспортів сортів.

3. Оцінити рівень генетичної спорідненості та з'ясувати генетичну конституцію сортів та форм черешні української селекції за молекулярними маркерами.

4. Розробити метод дослідження та ідентифікувати у сортів черешні алельні варіанти гена *PavCNR12*, пов'язаного із масою плодів.

5. Ідентифікувати у сортів та форм черешні алелі самонесумісності *S*-локусу, котрі контролюють самоплідність та самобезплідність.

Об'єкт дослідження – молекулярно-генетичний поліморфізм сортів та форм черешні.

Предмет дослідження – молекулярні маркери отримані в результаті ДНК-типуювання, алелі *MC* локусів та генів господарсько-цінних ознак *PavCNR12* і *S*-локусу (*S-PHKazi* та *SFB*).

Методи дослідження. У роботі були застосовані наступні методи досліджень: молекулярно-генетичні (екстракція та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), рестрикційне розщеплення ампліфікованої поліморфної послідовності, електрофорез продуктів ампліфікації, сиквенування фрагментів ДНК); статистичні (визначення ряду дискримінаційних показників для різних типів молекулярних маркерів, побудова дендрограм та застосування Баєсівської статистики для вивчення генетичного різноманіття, спорідненості та генетичної структури (конституції) сортів та форм черешні, підбір мінімальних ефективних маркерних панелей для однозначної ідентифікації сорту); біоінформатичні (вирівнювання нуклеотидних послідовностей, ПЛР *in silico*, підбір ендонуклеаз рестрикції для розщеплення ампліфікованої поліморфної послідовності *in silico*).

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі вперше проведено обширне вивчення генетичного різноманіття, генетичної структури та з'ясування

філогенетичної спорідненості сортів черешні української селекції. Вперше оцінено дискримінаційні можливості різних типів молекулярних маркерів для генетичного профілювання українських сортів черешні. Вперше проведено порівняння генетичної структури та оцінку рівня спорідненості сортів черешні української та закордонної селекції із ландрасами та дикорослими формами черешні. Розроблено альтернативний метод ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12*. Проведено порівняння молекулярних маркерів пов'язаних із ознакою маси плоду на прикладі сортів черешні української селекції. Визначено алелі самонесумісності (самобезплідності) та групи перехресної несумісності у перспективних українських сортів черешні. Ідентифіковано імовірно нові алельні варіанти гена *PavCNR12* та генів *S*-локусу, які потребують подальшого дослідження та детальної характеристики.

Практичне значення отриманих результатів. Створено генетичні профілі сортів та форм черешні, які використано для стандартизації технології вирощування сертифікованого садивного матеріалу, контролю його ідентичності, однорідності та захисту авторських прав селекціонерів. Виділено найбільш цінні сорти та форми черешні із різних генетичних кластерів для консервації та збереження у розбудову питання про створення центру генетичних ресурсів кісточкових культур. Закладено підвалини для ефективного управління колекціями генетичних ресурсів сортів черешні в Україні. Створено базу даних, що може бути використана у селекції для цілеспрямованого добору батьківських форм черешні при схрещуванні за ознаками величини плодів та самонесумісності. Відібрано маркери мікросателітних локусів (CPST038 та BPPST034) та CAPS-маркери, що можуть бути використані в маркер-опосередкованій селекції (MAS) та селекції гібридних сіянців (MASS) за традиційними для України напрямками селекції черешні. Запропоновано новий високоінформативний та швидкий метод ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12*. З'ясовані алелі самонесумісності (алелі *S*-локусу) та групи перехресної несумісності (ГПН, СІГ) для оптимізації планування та закладання промислових насаджень черешні.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені у дисертації, автор отримав особисто та за безпосередньої участі у виконанні експериментів. Здобувач самостійно провів пошук та аналіз літератури по тематиці дослідження, виконав експериментальну частину роботи, статистичну обробку та попередній аналіз даних. Планування окремих етапів роботи, аналіз отриманих експериментальних даних, обговорення результатів дослідження та підготовка наукових публікацій проводились спільно із зав. сектором біотехнології Н.В. Тряпичиною, зав. відділом вірусології Інституту садівництва НААН К.М. Удовиченко та науковим керівником проф. Р.А. Волковим, з якими автор має спільні публікації.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження представлено на VIII Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Україна, Харків, 2013); Міжнародній науковій нараді «Збагачення генетичного різноманіття рослин» (Україна, Харків, 2014); Збірник наукових праць «Біологічні дослідження – 2015» (Україна, Житомир, 2015); XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Україна, Львів, 2015); 5th IMBG International Conference of Young Scientists and the 1st Conference of Young Scientists of the Department BioPhMB NAS of Ukraine «CYS-2015» (Україна, Київ,

2015); 3rd Conference of Young Scientist «Plant Biology and Biotechnology» (Україна, Київ, 2017); Міжнародній науковій конференції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (Україна, Одеса, 2017).

Публікації. Основні результати дисертаційних досліджень висвітлено у 15 наукових працях, з яких шість статей у фахових виданнях, глава у монографії, науковий звіт та сім тез доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів, двох розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаної літератури та додатків. Повний обсяг становить 160 сторінок машинописного тексту, включаючи 15 таблиць та 22 рисунки. Список використаної літератури включає 255 джерел. Додатки складають 14 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто сучасні дані щодо ботанічної та молекулярно-генетичної характеристики черешні. Описано основні типи молекулярних маркерів та сферу їх застосування, маркер-опосередкований добір в селекції сортів плодових культур та черешні зокрема. Також висвітлено стан досліджень найважливіших кількісних та якісних (менделівських) ознак черешні, за якими проводиться селекція на сучасному рівні.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано більше 200 зразків ДНК, виділених зі 110 сортів та форм черешні відібраних в колекційних насадженнях Інституту садівництва НААН, Мелітопольської ДСС ім. М.Ф. Сидоренка ІС НААН, Артемівської ДСР ІС НААН, Дослідної станції помології ім. Л.П. Симиренка ІС НААН, Центрі генетичних ресурсів кісточкових культур INRA (в Toulence та Bourgan, Франція), приватних господарствах та природних популяціях дикої черешні. Для виділення загальної рослинної ДНК було використано СТАВ- та SiO₂-методи (Doyle, 1987; Boom, 1990; Li, 2012) із власними модифікаціями.

ПЛР проводили із власними модифікаціями кількох методів (Schuelke, 2000; Clarke, 2003) генетичного профілювання. Обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції проводили згідно рекомендацій виробника (Thermo Fisher Scientific). Електрофорез нуклеїнових кислот – горизонтальний, вертикальний та капілярний – здійснювали згідно стандартних методик (Маниатис, 1984) та рекомендацій виробників реактивів (Beckman Coulter); забарвлення нуклеїнових кислот проводили як описано (Paneva, 2000; Маниатис, 1984; Biotium) із модифікаціями.

Статистичний та біоінформатичний аналіз проводили із використанням: OligoCalc (Kibbe, 2007) для розрахунку температури гібридизації праймерів; TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics Ltd.) для аналізу електрофореграм; MS Excel, GenAlEx 6.5 (Peakall, 2012), Cervus 3.0 (Kalinowski, 2007) та ін. для оцінки генетичного різноманіття; DARwin 6.0 (Perrier, 2003), MultiDendrograms 4.1 (Fernández, 2008), STRUCTURE 2.3 (Pritchard, 2000) та ін. для з'ясування генетичної конституції та спорідненості сортів; SMS (Stothard, 2000), Geneious 4.8.5 (Kearse, 2012), BLAST®

(Altschul, 1990) та ін. для розробки альтернативного методу ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12*.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка генетичного різноманіття сортів черешні при використанні IRAP-, REMAP- та ISSR-ПЛР маркерів. Використання восьми праймерів IRAP- та REMAP-ПЛР для дослідження 15 сортів черешні дозволило виявити 85 маркерів, з яких 26% виявились поліморфними. В цілому рівень дискримінаційних можливостей досліджених праймерів виявився низьким та зіставним при IRAP- та REMAP-ПЛР. На загал, для рутинного генетичного профілювання сортів черешні ці маркерні системи інтересу не представляють.

Використання восьми праймерів для ISSR-ПЛР при вивченні 24 сортів черешні дозволило виявити 193 продукти ампліфікації, з яких 75% виявились поліморфними. Найвищий рівень (91,6%) поліморфізму серед використаних праймерів виявлено для UBC 881. Самостійне використання праймерів UBC 836 та 881 дозволило успішно диференціювати всі 24 сорти, в тому числі близькоспоріднені. За маркерним індексом (MI) та показником розділяючої здатності (Rp) кращими для оцінки поліморфізму генотипів черешні серед випробуваних в ISSR-ПЛР виявились праймери UBC 835, 836 та 881.

Оцінка генетичного різноманіття сортів та форм черешні при використанні мікросателітних (МС) маркерів. Генетичне профілювання сортів черешні із використанням мікросателітних маркерів було проведено в два етапи. На першому етапі вибірку із 37 сортів та форм черешні було охарактеризовано за допомогою маркерів із десяти МС локусів та виявлено 66 алелів (рис. 1). У зв'язку з проблемами сортоідентичності 10 генотипів було виключено із подальшого аналізу. Для дев'яти поліморфних мікросателітів кількість алелів на локус у 27 досліджених нами сортів черешні варіює від 4,00 до 12,00 із середнім значенням 7,33 (4,37 для кількості ефективних алелів). На обох етапах досліджень було оцінено показники генетичного різноманіття та дискримінаційні можливості маркерів. Оцінку проводили за наступними показниками: кількість алелів на локус (N_a), кількість ефективних алелів (N_e), очікувана гетерозиготність (H_o), гетерозиготність, що спостерігається (H_e), індекс фіксації Райта (F), частка поліморфних даних (PIC), індекс інформативності Шеннона (I , sH_A), імовірність ідентичності неспоріднених генотипів (P_{ID}), імовірність ідентичності повних сибсів (P_{ID-SIB}). Враховуючи всі проаналізовані показники генетичного різноманіття, в першій частині нашого дослідження найбільш інформативними виявились маркери таких локусів: EMPA015, EMPAS02, EMPAS06, PseGA34 та PS12A02. В цілому, серед 66 ідентифікованих алелів 30 виявились поширеними (>10%), а 36 – малопоширеними (<10%). З-поміж досліджених локусів, найбільше малопоширених алелів знайдено для EMPAS06 – 9, EMPA015 – 7, EMPAS02 та PS12A02 – 5, PseGA34 – 4.

На другому етапі дослідження за допомогою маркерів 18 МС локусів було охарактеризовано 94 сорти та форми черешні й виявлено 151 алель. Кількість алелів на локус у досліджених сортів та форм черешні варіює від 2,00 до 16,00 із середнім значенням 8,39 (2,92 для кількості ефективних алелів). Середнє значення кількості алелів на локус, виявлених у наших дослідках є вищим порівняно зі значеннями, наведеними в більшості подібних досліджень черешні. Враховуючи проаналізовані

вище показники генетичного різноманіття, в другій частині нашого дослідження найбільш інформативними виявились маркери таких локусів: CPSCT034, CPSCT034, VPPCT040, EPPV4230, VPPCT037 та pchgms55.

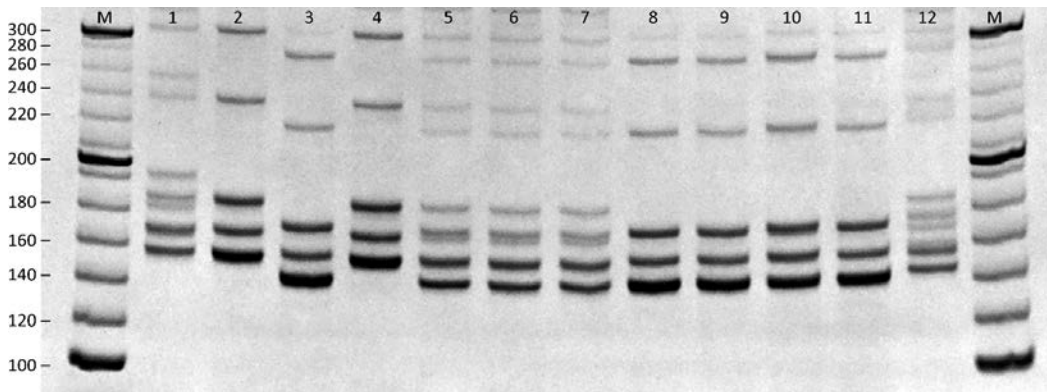


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації праймерів до MS локусу PseGA34 та геномної ДНК сортів та форм черешні: 1 – Валерій Чкалов, 2 – Простір, 3 – Престижна, 4 – Аншлаг, 5 – Ласуня, 6 – Дачниця, 7 – Донецька красавиця, 8 – Ярославна, 9 – Дончанка, 10 – Легенда Млієва, 11 – Дар Млієва, 12 – Дрогана жовта.

Підбір мінімально необхідних наборів мікросателітних маркерів. Вивчалась імовірність ідентичності (P_{ID}), котра дозволяє оцінити середню імовірність того, що два незалежні зразки будуть мати ідентичні генотипи. У нашому дослідженні P_{ID} дозволяє оцінити скільки локусів необхідно для достовірної генетичної ідентифікації дослідженої вибірки сортів черешні. При оцінці P_{ID} припускається, що досліджувана вибірка складається із сортів, які походять від випадкового схрещування і порівнюються неспоріднені рослини. Водночас, P_{ID-SIB} допускає оцінку імовірності ідентичності споріднених зразків у вибірці. На першому етапі, використання маркерів дев'яти MS локусів дозволило розрізнити 24 з 27 генотипів. Не зважаючи на низьку статистичну імовірність ідентичності сортів черешні (рис. 2) за їх використання не вдалося розрізнити дві пари близькоспоріднених сортів: Анонс – Крупноплідна та Прощальна Тараненко – Василиса прекрасна. Проте, ці сорти не є дублікатами, оскільки відрізняються за спектрами ISSR-ПЛР маркерів.

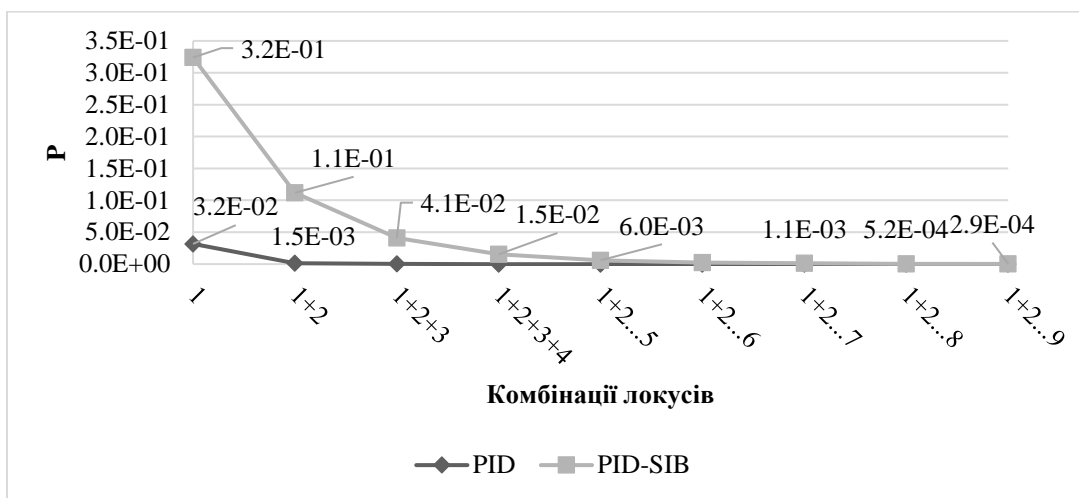


Рис. 2. Імовірність ідентичності (P_{ID} та P_{ID-SIB}) сортів черешні для комбінацій MS локусів (перший етап). 1 – EMPaS02, 2 – PS12A02, 3 – EMPaS06, 4 – EMPA015, 5 – PseGA34, 6 – VPPCT039, 7 – PMS2, 8 – UDP98-412, 9 – EPPCU9168.

Генетичні профілі МС маркерів для ідентифікації деяких сортів черешні

Сорт		МС локуси ¹ (розмір фрагментів, нп)					
		ВРРСТ037	ЕМРА002	ЕМРА026	ЕМРАS02	ЕМРАS10	ЕМРАS14
1	Аннушка	158:172	126	238	158:166	170:180	218:220
2	Анонс	158:164	124:126	224:238	158:164	180:200	218:220
3	Аншлаг	164:172	124:126	238	158	170:180	218:220
4	Василиса прекрасна	154:164	124:126	252	158:164	180	218:220
5	Дар Млієва	164:170	124:126	224	156:164	180:200	218:220
6	Дачниця	164:170	124:126	224:238	158	170:180	–
7	Донецька красавиця	170	126	238	158:166	170	218:220
8	Дончанка	164:172	124:126	224:238	158	170:180	218:220
9	Казка	164:172	124:126	238	158:164	170	218:220
10	Крупноплідна	158:164	124:126	224:238	158:164	180:200	218:220
11	Ласуня	170:172	124:126	238	158	170:180	218:220
12	Легенда Млієва	158:170	124:126	224	158	170:180	218:220
13	Любава	154:170	124	224:238	158	170:180	218:220
14	Мелітопольська мирна	170:172	124:126	238	156:164	180:205	220
15	Мелітопольська чорна	164:170	124:126	238	–	170:180	220:232
16	Отрада	158	124:126	238	158:164	180	218:220
17	Престижна	164:172	124	238	158	170:180	218:220
18	Простір	172	124	238	158	170:205	218
19	Прощальна Тараненко	154:164	124:126	252	158:164	180	218:220
20	Тайна	158:172	126	238	158:166	170:180	218:220
21	Талісман	170:172	124:126	238	158:164	170	220
22	Темпоріон	158:170	126	–	158	–	218:220
23	Ярославна	158:170	124:126	238	158	170:205	–
24	Bigarreau Hâtif Burlat	158:160	126	224:238	156:162	170	218:220
25	Regina	158:164	126	224	158:164	184	218:220
26	Bigarreau Napoleon	158:164	124:126	224:238	158:162	170	220:232
27	Dönissens Gelbe Knorpel.	164:170	124	238	156:160	170:180	220

Примітка. ¹ – напівжирним шрифтом виділено унікальні комбінації алелів.

На другому етапі, використання дев'яти (з 18) МС локусів з найвищими дискримінаційними показниками дозволило розрізнити 90 генотипів. Подібно до першого етапу дослідження, із використанням мінімального набору з дев'яти МС локусів не вдалося розрізнити дві пари близькоспоріднених сортів: Леся – Джерело та Казка – гібридна форма Д 58-52. Проте, використання всіх 18 МС локусів дозволило успішно розділити всі 94 сорти та форми. Водночас, застосування лише шести МС локусів (табл. 1), що входять до рекомендовано ЕСРGR переліку МС локусів та генотипів дозволило ідентифікувати 81 із 94 генотипів.

Таким чином, використані МС локуси з рекомендованого переліку мають обмежені дискримінаційні можливості та не в повній мірі придатні для ідентифікації великої кількості генотипів черешні.

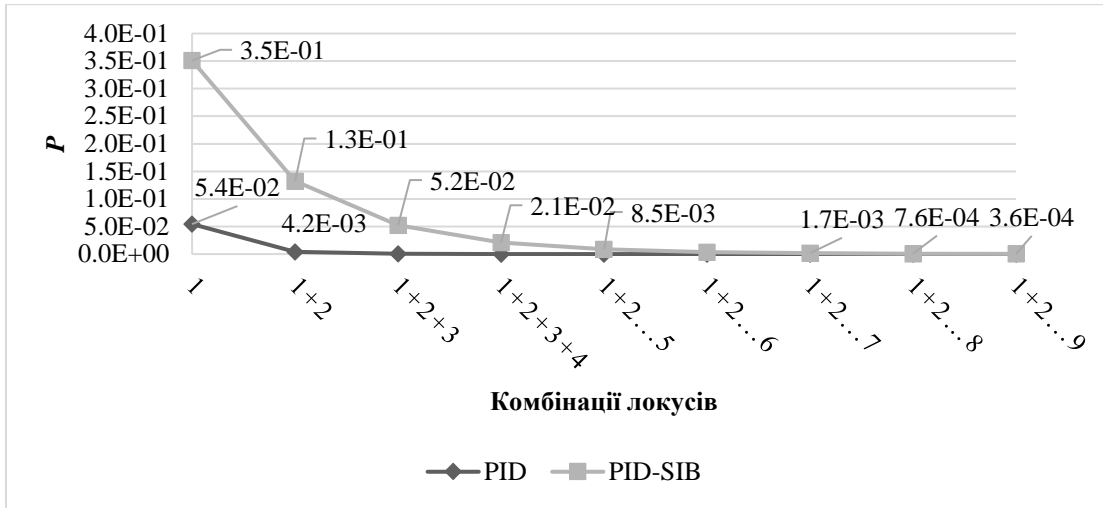


Рис. 3. Імовірність ідентичності (P_{ID} та P_{ID-SIB}) сортів та форм черешні для комбінацій МС локусів (другий етап). 1 – ВРРСТ037, 2 – ЕРДСУ3392, 3 – ВРРСТ040, 4 – СРРСТ034, 5 – рсгms55, 6 – ЕРРВ4230, 7 – ЕМРaS02, 8 – УДР98-022, 9 – ЕРРСУ3090.

Генетична конституція та спорідненість сортів черешні при використанні ISSR-ПЛР маркерів. Для з'ясування спорідненості сортів черешні та їх належності до певних генетичних груп було використано програму STRUCTURE, в основі якої лежить кластеризація Баєса. При використанні цього методу вираховується відсоток приналежності певного сорту до кожної з K груп (генетичних пулів), які об'єднують найбільш споріднені форми. Із використанням восьми ISSR праймерів (193 маркерні смуги) було оцінено 24 сорти черешні. В результаті аналізу ISSR-ПЛР даних найвищим показником виявилось значення $\ln P(D)$ при $K=3$ (рис. 4). До першого генетичного пулу ввійшли сорти, що походять з Мелітопольської ДСС (окрім Мелітопольської чорної), до другого пулу – переважно сорти Артемівської ДСР та сорти предковими формами яких були західноєвропейські сорти. Два сорти Василиса прекрасна і Прощальна Тараненко, котрі виявились подібними між собою та відмінними від решти досліджуваних сортів, утворили третій генетичний пул.

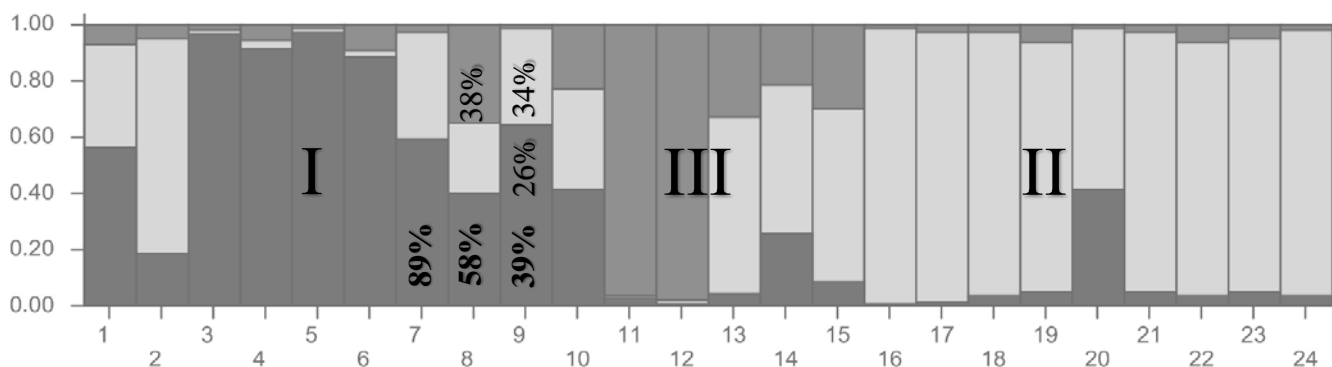


Рис. 4. Генетична конституція українських сортів черешні при використанні ISSR-ПЛР маркерів. Кожен сорт зображений окремою вертикальною колонкою, яка поділена на три частини, що відображають оцінену частку відношення до трьох генетичних пулів: 1 – Валерій Чкалов, 2 – Мелітопольська чорна, 3 – Анонс, 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 – Регіна, 23 – Бігарро Бурлат, 24 – Дрогана жовта.

Для визначення генетичної подібності між дослідженими сортами черешні застосовували також метод UPGMA-кластеризації. Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти на п'ять кластерів – А–Е (рис. 5).

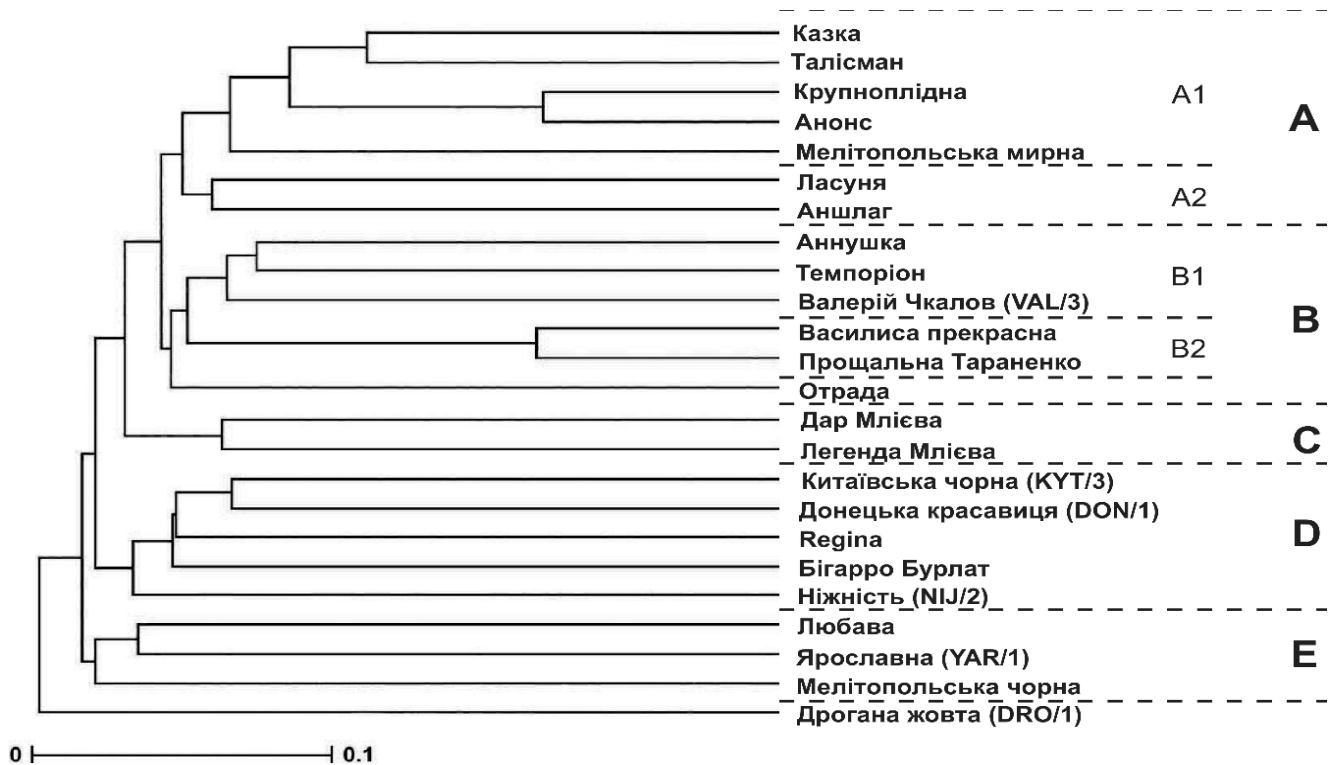


Рис. 5. Кладограма генетичної спорідненості 24 сортів черешні побудована методом UPGMA з використанням восьми ISSR праймерів.

Генетична конституція та спорідненість сортів черешні при використанні SSR-ПЛР маркерів. На першому етапі при дослідженні дев'яти МС локусів (66 смуг) було оцінено 27 сортів черешні. Для визначення генетичної подібності між дослідженими сортами черешні було застосовано метод UPGMA-кластеризації (рис. 6). В якості зовнішньої групи було використано вишню магалебську (*P. mahaleb*). Заштриховані блоки на дендрограмі є графічним зображенням багатозначності дерева у формі мультидендрограми. Довжина блоку відображає рівень гетерогенності усередині підкластеру. Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти на чотири кластери – А-D.

На загал, дендрограма, отримана на основі порівняння наборів SSR-ПЛР маркерів (рис. 6) за своєю структурою переважно узгоджується із нашим попереднім дослідженням (рис. 5), де використовувались ISSR-ПЛР маркери. Відмінності у кластеризації зумовлені різницею в наборі досліджених генотипів, використанні різних типів маркерів, їх кількості, характеру успадкування та алгоритмами кластеризації відповідних методів. Зокрема, наші результати підтверджують високу генетичну подібність та взаємне розміщення на дендрограмі в першу чергу близько споріднених сортів, що входять до складу кластерів А і В та їх відмінність від сортів західноєвропейської селекції. Присутність у досліджуваній вибірці як близькоспоріднених, так і генетично віддалених сортів є непростим завданням для кластеризації традиційними ієрархічними методами.

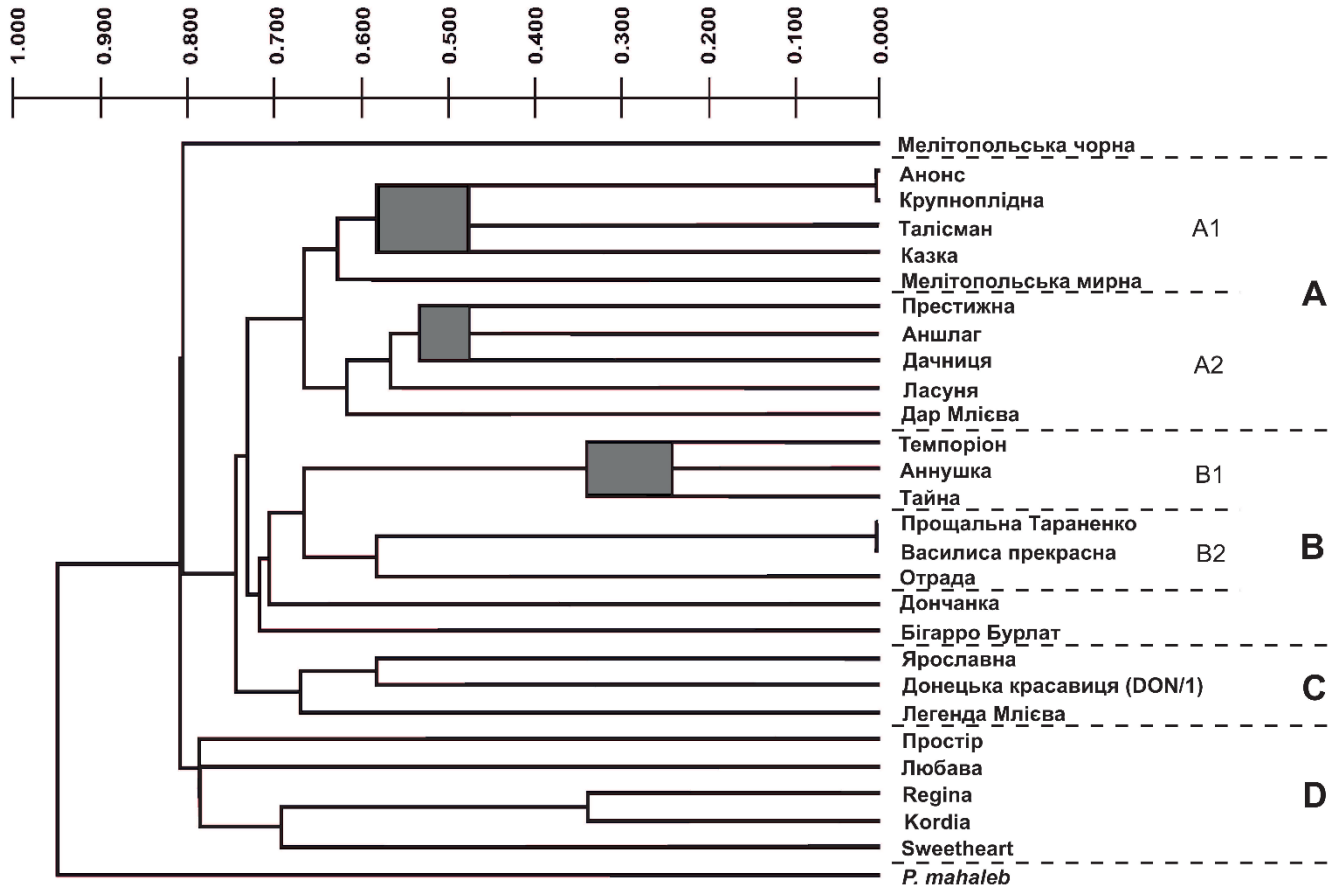


Рис. 6. Кладограма генетичної спорідненості 27 сортів черешні побудована методом UVGMA з використанням 66 МС маркерів.

На другому етапі при дослідженні 19 МС локусів (151 маркер) було оцінено 94 сорти та форми черешні. Найбільш статистично вірогідною була приналежність досліджуваних генотипів до десяти генетичних пулів ($K = 10$).

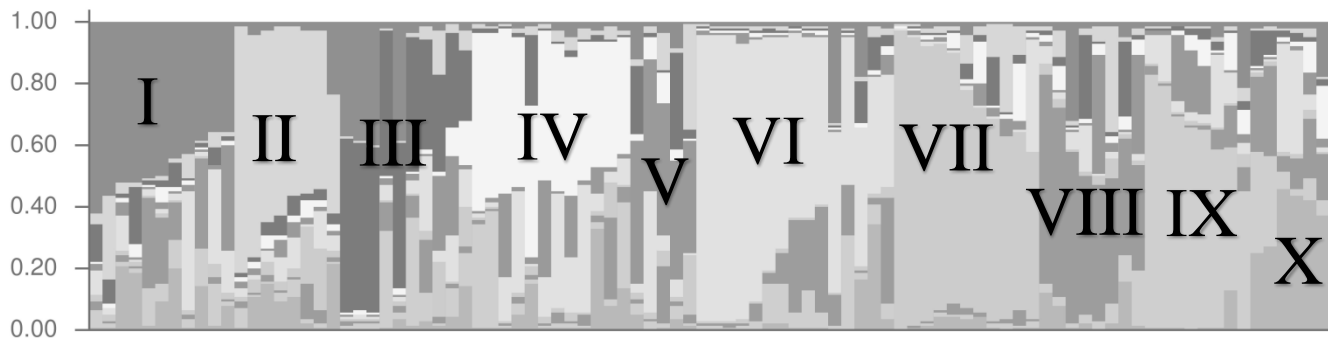


Рис. 7. Генетична структура 94 сортів та форм черешні при використанні МС маркерів.

Окрім того було оцінено середню імовірність приналежності (average probability of assignment, Q) кожного із 94 генотипів дослідженої вибірки до ідентифікованих десяти генетичних пулів (рис. 8). Домінуючим виявився генетичний пул 6, а вагомими також пули 7 та 9. Найменш представленим виявився генетичний пул 5. Переважна більшість сортів та форм виявились в значній мірі генетично гетерогенними, що імовірно є наслідком направленої гібридизації та/або проявом системи гаметофітної самонесумісності (ГСН).

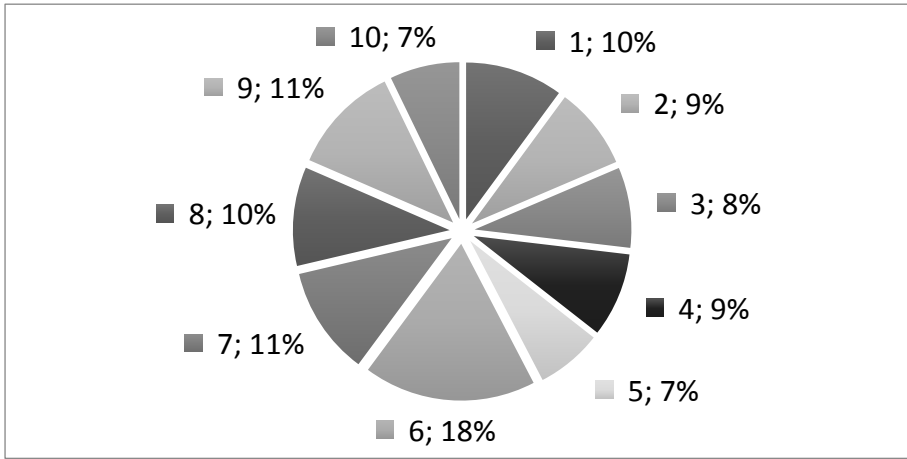


Рис. 8. Приналежність дослідженої вибірки сортів та форм черешні до кожного з 10 генетичних пулів. Відсотками показано середнє значення імовірності приналежності (Q) до кожного генетичного пулу.

Перший генетичний пул (11 генотипів) представлений переважно сортами та форми, батьківськими формами яких слугували західноєвропейські сорти (зокрема, Дрогана жовта та Денисена жовта). До другого генетичного пулу (вісім генотипів) ввійшли сорти західноєвропейської селекції. Типовими представниками кластеру є сорти Folfer та Sato Nishiki ($Q \geq 0,7$). До третього генетичного пулу (десять генотипів) ввійшли переважно сорти селекції Артемівської ДСС. Яскравих представників даного генетичного пулу в дослідженій вибірці сортів не виявилось, оскільки дана група сортів генетично гетерогенна. Найвищий рівень генетичної гетерогенності виявлено у сорту Донецька рання, в геномі якого на домінуючий третій генетичний пул припадає лише 22,8 % (частка кожного з решти дев'яти пулів є меншою). До четвертого та десятого генетичного пулу ввійшли переважно сорти, що мають місцеве походження та сорти, батьківськими формами яких слугували старі західноєвропейські сорти. На загал до цих двох пулів відноситься 16% генетичного матеріалу досліджених сортів та форм черешні. Більшість сортів даної групи було отримано на Дослідній станції помології ім. Л.П. Симиренка ІС НААН. До четвертого генетичного пулу ввійшли 12 генотипів. До п'ятого генетичного пулу ввійшли п'ять генетично гетерогенних сортів.

До шостого та дев'ятого пулів переважно ввійшли сорти, предковими формами яких були Дрогана жовта, Наполеон біла та Валерій Чкалов. Разом до цих двох груп відноситься 39% генетичного матеріалу досліджених сортів та форм черешні. Типовими представниками шостого генетичного пулу (15 генотипів) є гібридна форма Д 58-52, сорти Казка та Міраж ($Q \geq 0,8$) та Аншлаг ($Q \geq 0,7$). До сьомого генетичного пулу (11 генотипів) ввійшли ландраси Харата, Saint Georges, культивовані форми дикої черешні із Чернівецької та Київської області та деякі інші форми. Даний пул на відміну від інших виявив значний рівень гомогенності форм, що його сформували. П'ять форм характеризуються $Q \geq 0,8$, одна $Q \geq 0,7$ та дві $Q \geq 0,6$. До восьмого генетичного пулу (вісім генотипів) ввійшли сорти, батьківськими формами яких слугували різні західноєвропейські сорти. Найбільш типовими представниками пулу є Денисена жовта та Зодіак ($Q \geq 0,6$). До дев'ятого генетичного пулу (десять генотипів) ввійшли сорти Прощальна Тараненко ($Q \geq 0,9$) та Василиса прекрасна ($Q \geq 0,8$), які в значній мірі характеризуються генетично гомогенною структурою. До десятого генетичного кластеру ввійшли чотири генетично гетерогенні генотипи.

В нашому дослідженні 15 референтних сортів з дев'яти генетичних пулів,

виявлених попередньо (Camrou et al., 2016), перерозподілились між шістьма виявленими нами пулами. Таким чином, неописаними раніше виявились пули 4 та 10, 6 та 9. Привертає увагу, що батьківськими формами сортів із четвертого та десятого пулів є форми селекції Дослідної станції помології, частина сортів невідомого походження та отримані від вільного запилення. На основі наведених фактів логічним є припущення, що при отриманні оригінальних сортів на Дослідній станції помології було використано ряд ландрас та інших форм місцевого походження, які невідомі селекціонерам Західної Європи. Щодо шостого та дев'ятого генетичних пулів, то їх сформували сорти (F_1 - F_3), предковими формами яких були переважно західноєвропейський сорт Дрогана жовта, її клон Наполеон біла та український сорт Валерій Чкалов.

Генетичну спорідненість між дослідженими сортами та формами черешні на другому етапі досліджень було оцінено використовуючи незважений метод об'єднання найближчих сусідів (UWN-J). Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти та форми на три кластери – А-С (рис. 9). До кластеру А переважно увійшли сорти, в яких однією з предкових форм у F_1 - F_2 був сорт Валерій Чкалов або

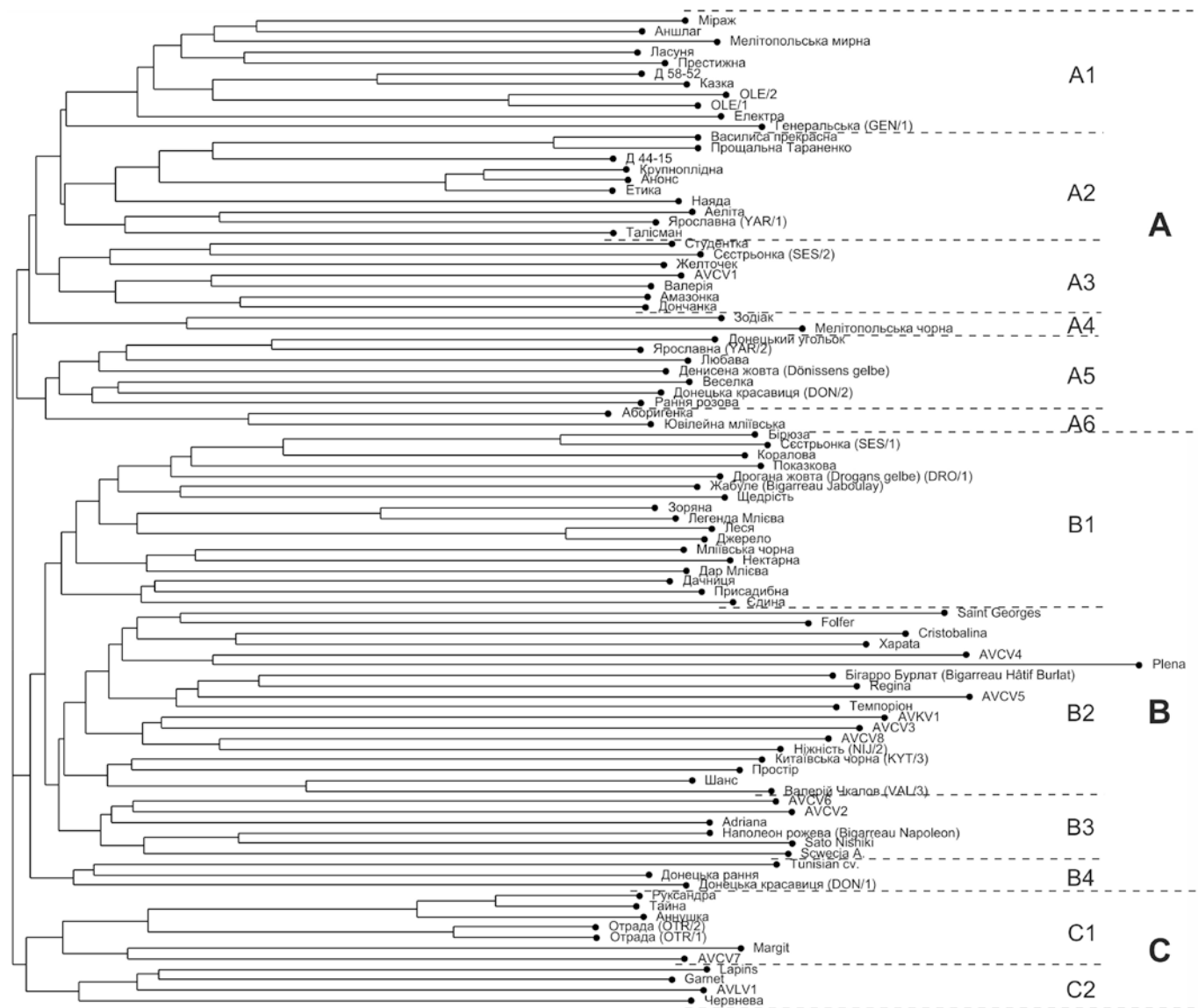


Рис. 9. Кладограма генетичної спорідненості 94 сортів та форм черешні побудована методом N-J на основі маркерів із 18 МС локусів та S-локусу.

Дрогана жовта (чи його клон Наполеон біла). Аналізуючи походження сортів, що увійшли в кластер А, зазначимо, що важливою батьківською формою західноєвропейського походження є Дрогана жовта, а також у деяких випадках інші старі німецькі сорти, такі як Цешенська жовтнева, Денисена жовта та Франц Йосиф. Водночас кластер В включає як ряд західноєвропейських сортів, так і сорти української селекції, створені за їх участі. Кластер С є зовнішньою групою для всіх решти досліджених сортів черешні.

Розробка та апробація методу диференціації алельних варіантів *PavCNR12* за допомогою CAPS-маркерів. З метою розробки альтернативного методу ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12* було проведено їх вирівнювання, *in silico* ПЛР із праймерами CNR12-C2-F та -R (De Franceschi et al., 2013) та наступне *in silico* розщеплення ампліфікатів ендонуклеазами рестрикції (рестриктазами). Метою цього аналізу було виявлення рестриктаз, застосування яких дозволяє отримувати відмінний набір фрагментів для трьох відомих алелів гена *PavCNR12*. За підсумками проведеного пошуку було встановлено, що очікувана довжина ПЛР-продукту має становити 917 нп. Було підібрано оптимальну рестриктазу, *TaiI* (ACGT↓) (ізошизомер *MaeII* - A↓CGT) за використання якої можливо диференціювати всі три відомі алелі: для першого з них має утворюватись набір фрагментів 133/170/256/358 нп, для другого – 62/133/358/364 нп та для третього – 133/358/426 нп відповідно (рис. 10, а).

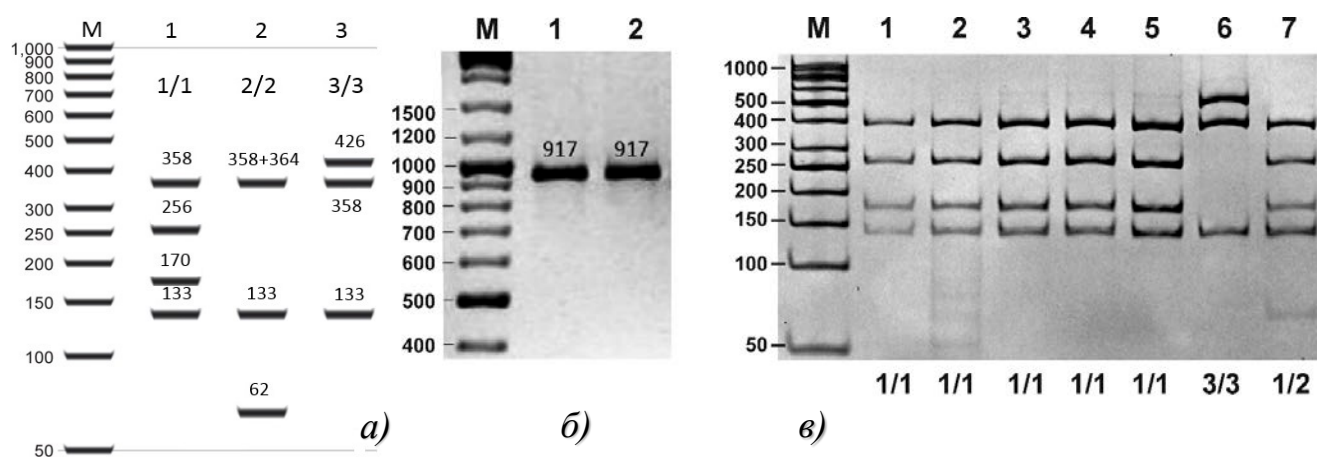


Рис. 10. Очікувані набори фрагментів ДНК після обробки ПЛР-ампліфікатів рестриктазою *TaiI*. Генотипи: 1 – *PavCNR12*-1/1, 2 – *PavCNR12*-2/2, 3 – *PavCNR12*-3/3; М – 50 бп DNA Ladder (а); Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих з використанням праймерів CNR12-C2-F та -R та геномної ДНК сортів черешні Крупноплідна (1) та Казка (2), М – GeneRuler DNA Ladder Mix (б); Електрофореграма фрагментів ДНК, отриманих після обробки ПЛР-ампліфікатів рестриктазою *TaiI*. 1 – Форма DON/1, 2 – Отрада, 3 – Аннушка, 4 – Тайна, 5 – Форма YAR/1, 6 – Форма NIJ/2, 7 – Любава, М – O'GeneRuler 50 бп DNA Ladder. Під рисунком вказано варіанти алелів гена *PavCNR12* (в).

Для додаткової перевірки надійності розробленого нами методу генотипування, отримані дані було підтверджено методом прямого секвенування ПЛР-ампліфікатів промоторної ділянки гена *PavCNR12* сортів Крупноплідна, Ласуня та форми NIJ/2. Порівняння отриманих послідовностей із вже відомими алельними варіантами гена

PavCNR12-1 (Acc. No. KC139086), *PavCNR12-2* (KC139087) та *PavCNR12-3* (KC139088) повністю підтвердило наші результати щодо стану *PavCNR12*-алелів, отримані із використанням нових CAPS-маркерів. Розроблений нами метод дозволяє швидко та надійно проводити ідентифікацію алельних варіантів *PavCNR12-1*, -2 та -3 без використання затратної та трудомісткої процедури сиквенування. Отримані CAPS-маркери є кодомінантними та дозволяють чітко відрізнити у гомо- та гетерозиготні форми.

Вивчення варіації алельних станів гена *PavCNR12*. З використанням розробленого методу генотипування *PavCNR12* було досліджено 70 сортів та форм черешні. Аналіз отриманих результатів свідчить, що майже всі (67 із 70) досліджені сорти черешні є носіями алеля *PavCNR12-1*. При цьому 36 сортів (51% від загальної кількості) є гомозиготними по цьому алелю, 16 сортів мають генотип *CNR12-1/2*, а 4 - генотип *CNR12-1/3*. Отже, розмір плодів у 28% сортів міг би бути додатково збільшений за умови введення у геном алеля *PavCNR12-1* та/або переведення його у гомозиготний стан. Розрахунок показує, що частоти алелів *PavCNR12-1*, -2 та -3 у нашій вибірці становлять 73,6, 12,1 та 5,7%, відповідно (рис. 11). Висока частота алеля *PavCNR12-1* (70,6%) у культурних форм черешні спостерігалась і у попередніх дослідженнях (De Franceschi et al., 2013). Цікаво, що у нашій вибірці частота зустрічальності бажаного алеля *PavCNR12-1* вище, а небажаних алелів *PavCNR12-2* та -3, відповідно, нижче, ніж повідомлялось раніше (De Franceschi et al., 2013). Враховуючи, що наша вибірка складається переважно з українських сортів, цю різницю можна розглядати як приклад високого рівня ефективності селекції черешні в Україні.

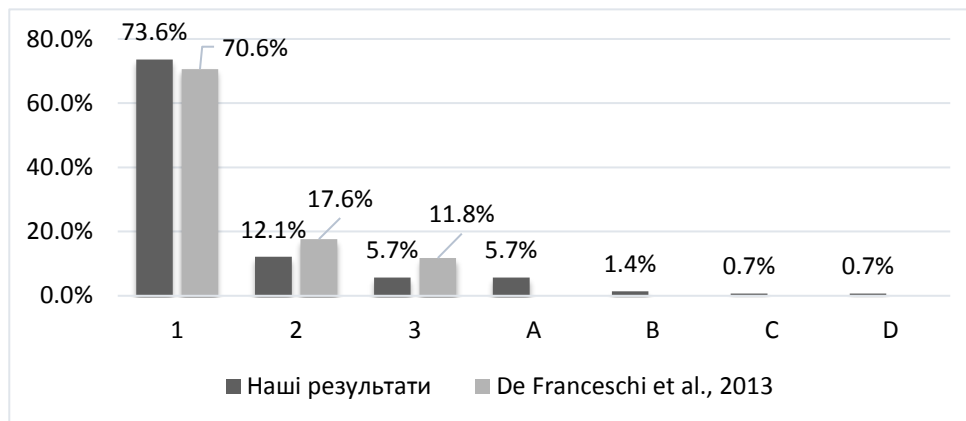


Рис. 11. Частоти зустрічальності алелів *PavCNR12-1* (1), -2 (2) та -3 (3) у сортів черешні у нашому дослідженні (70 форм) та згідно De Franceschi et al., 2013 (17 форм).

Аналіз нових та порівняння із відомими алельними варіантами *PavCNR12*. У восьми сортів черешні – Китаївська чорна, Мліївська чорна, Нектарна, Шанс, Cristobalina, Jaboulay, Харата та форми GEN/1 – було виявлено неочікувані патерни, що характеризуються наявністю на електрофореграмі смуг довжиною 406/436 нп. У двох сортів черешні – Бірюза та Зоряна – було виявлено спектри, що характеризуються смугами 386/426/446 нп. В елітній гібридній формі Д 58-52 було виявлено смуги 392/426 нп, а у декоративного сорту черешні Plena – 135/917 нп. Присутність цих неочікуваних CAPS-маркерів розміром близько 406 та 436 нп (позначено як варіант А); 386, 426 та 446 нп (варіант В); 392 та 426 нп (варіант С), 135 та 917 нп (варіант D) свідчить про існування додаткових, раніше не описаних алелів гена *PavCNR12*.

Асоціації маркерів MC локусів CPST038 та BPPCT034 із CAPS-маркерами та алелями *PavCNR12*. Незважаючи на досить широке застосування MC локусів CPST038 (скорочено C38) та BPPCT034 (скорочено B34) в маркер-опосередкованій селекції черешні, у вільному доступі є інформація лише про 68 генотипів черешні (GDR; Ortega, 2013; De Franceschi et al., 2013). Для MC локусів C38/B34 раніше (Zhang et al., 2009) було виділено чотири гаплотипи: a – 192/225, b – 190/255, c – 204/235 та d – 190/255. Було встановлено зв'язок цих гаплотипів із масою плодів, яка зростає у послідовності ac – ad – bc – bd (гетерозиготи). На сайті GDR (Genome Database for Rosacea) було опубліковано розширений перелік гаплотипів та їх зв'язок із масою плодів. Нещодавно (De Franceschi et al., 2013) були ідентифіковані алельні варіанти *PavCNR12*, які відомі лише у 17 сортів черешні та показано їх зв'язок із MC, що фланкують локус. Аналіз варіювання частот зустрічальності алелів MC локусів C38 та B34 свідчить про суттєве переважання у дослідженій вибірці з 94 сортів та форм черешні деяких алелів, які видаються асоційованими із більшою масою плоду.

Серед 70 досліджених нами генотипів черешні 37 виявились гомозиготами по *PavCNR12-1*, причому у 25 з них гомозиготний стан *PavCNR12-1* чітко корелював із C38/B34 гаплотипом 190/255. Другий алель *PavCNR12-2* було виявлено у 17 сортів, при цьому зчеплення із C38/B34 гаплотипом 204/235 було виявлено у 13 сортів. Третій алель *PavCNR12-3* виявлено у семи сортів; зчеплення із C38/B34 гаплотипами 192/223 та 192/225 було виявлено у п'яти з них. В нашому дослідженні 4,6% (та 5,9% у De Franceschi et al., 2013) C38/B34 гаплотипів виявили невідповідність ідентифікованим алелям *PavCNR12*. Імовірно причиною цього може бути порушення зчеплення, незважаючи на невелику відстань (10.9-14.9 cM) між локусами C38 та B34. Гаплотипи 192/223 та 192/225 як правило зчеплені із третім алелем *PavCNR12-3*, проте у нашому дослідженні були виявлені разом з алелями *PavCNR12-A*, *-B* та *-C*. Імовірно видається, що дані алелі є різновидом *PavCNR12-3* із різними однонуклеотидними замінами, які змінили кількість сайтів рестрикції для *Tail*.

Ідентифікація алелів самонесумісності (S). Аналіз 120 зразків черешні, переважно сортів української селекції, за допомогою трьох пар консенсусних (вироджених) праймерів дозволив отримати чіткі смуги на електрофореграмі у переважній більшості досліджених генотипів (рис. 12). Було ідентифіковано 17 різних S-алелів та 243 S-гаплотипи по всій вибірці. У трьох форм черешні AVCV3, AVCV5 та AVCV6 було виявлено лише один S-гаплотип, тоді як у двох інших – GEN/1 та AVCV4 – було знайдено по три гаплотипи. Останні дві форми імовірно є триплоїдами чи анеуплоїдами, котрі досить поширені у черешні (Darlington, 1928).

Окрім описаних раніше, в нашому дослідженні було знайдено три імовірно нові S-алелі. Вони характеризуються специфічними продуктами ампліфікації першого та другого інтрону гена *S-PHKazi* та/або інтрону гена *SFB* (табл. 2). Згідно до існуючої номенклатури S-алелів у черешні та вишні, їх тимчасово було названо S_{X1} , S_{X2} та S_{X3} . У форм черешні, в яких нами було виявлено лише один S-гаплотип, другий не ідентифікований алель було позначено як S_{null} . Алель S_{X1} було виявлено у двох досліджуваних зразків – ландраси черешні (AVCV4) із Чернівецької обл. та форми GEN/1, отриманої із Дослідної станції помології ім. Л.П. Симиренка ІС НААН (с. Мліїв, Черкаська обл.). Алель S_{X2} було виявлено у декоративної форми черешні Plena

(Multiplex, Grandiflora), отриманої із Ботанічного саду ЛНУ імені Івана Франка. Алель S_{X3} було виявлено у форми черешні (AVCV2) із Чернівецької обл.

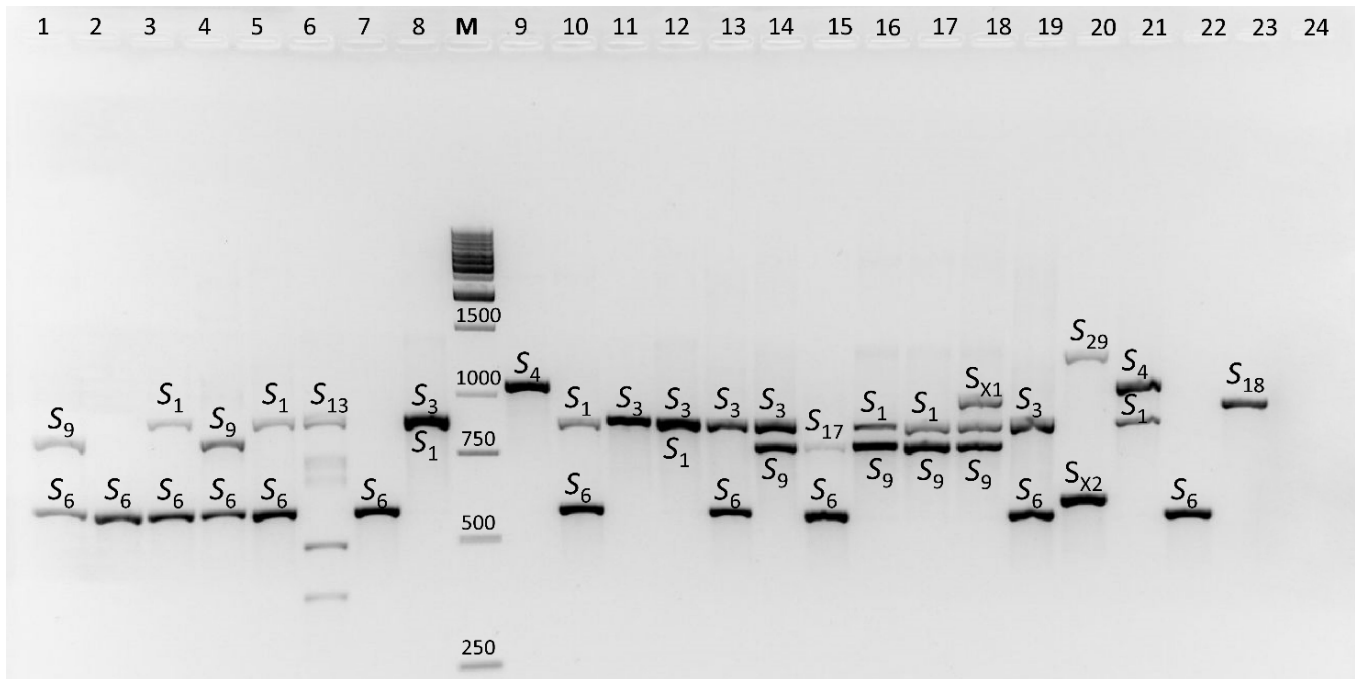


Рис. 12. Електрофореграма продуктів ампліфікації праймерів PaConsII-F & R до другого інтрону гена *S-PHKasi*. 1 – Легенда Млієва, 2 – Дар Млієва, 3 – Коралова, 4 – Зоряна, 5 – Бірюза, 6 – Наяда, 7 – Нектарна, 8 – Ювілейна мліївська, 9 – Червнева, 10 – Мліївська чорна, 11 – Веселка, 12 – Аборигенка, 13 – Показкова, 14 – Щедрість, 15 – Єдина, 16 – OLE/1, 17 – OLE/2, 18 – GEN/1, 19 – DRO/1, 20 – Plena, 21 – AVCV1, 22 – AVCV2, 23 – AVCV3, 24 – негативний контроль (без ДНК матриці); М – GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Таблиця 2

Форма	Генотип	S-генотипи деяких досліджених форм черешні			Походження
		Довжина продуктів ампліф. (нп) праймерів PaConsI	Довжина продуктів ампліф. (нп) праймерів PaConsII	Довжина продуктів ампліф. (нп) праймерів F-BOX	
AVCV2	S_6S_{X3}	370 /443	577	180	Чернівецька обл.
AVCV3	$S_{18}S_{null}$	342	935	183	Чернівецька обл.
AVCV4	$S_6S_{14}S_{X1}$	334/ 367 /443	577 /719/ 1000	180/ 183	Чернівецька обл.
AVCV5	$S_{10}S_{null}$	365	734	138 /175	Чернівецька обл.
AVCV6	S_3S_{null}	234	898	202	Чернівецька обл.
AVKV1	$S_{12}S_{17}$	346/396	788	185	Київська обл.
NIJ/2	S_6S_{17}	396/443	577/788	180/190	Київська обл.
GEN/1	$S_1S_9S_{X1}$	357/ 367 /380	798/874/ 1000	189	Черкаська обл.
Plena	$S_{29}S_{X2}$	283 /342	625 /1256	193/195	Великобританія

Проаналізовані сорти черешні було віднесено до 17 вже відомих груп перехресної несумісності (ГПН). Винятком є лише сорт Єдина із генотипом S_6S_{17} , що було віднесено до групи O (універсальні запилювачі). Найбільш численною групою (рис. 13) є 12 сортів, котрі належать до XXXVII (S_5S_9) ГПН, а також сім - до VII (S_3S_5), по шість - до X (S_6S_9) та XVIII (S_1S_9) ГПН. Найменш численними є сорти, що належать

до II (S_1S_3), VI (S_3S_6), XV (S_5S_6), XXVII (S_4S_{12}), XLIII (S_2S_9), XXX (S_6S_7) та XVII (S_4S_6) ГПН.

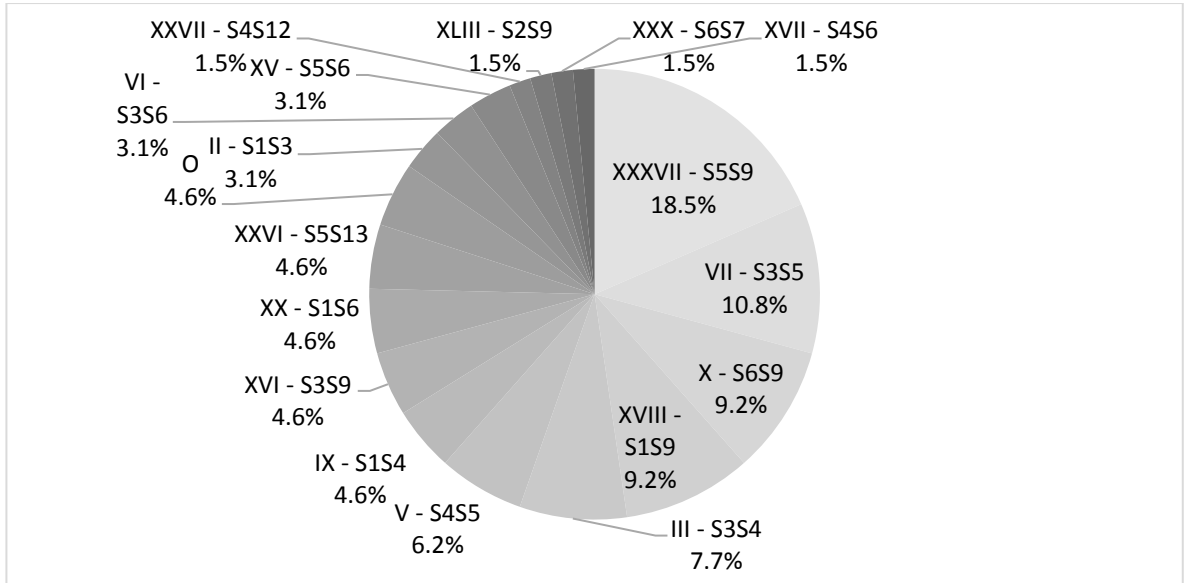


Рис. 13. Розподіл українських сортів та форм черешні по групах перехресної несумісності.

Нерівномірність розповсюдження S -алелів. В дослідженій нами вибірці із 80 українських сортів та форм черешні домінують алелі S_9 (21,4%), S_5 (18,5%), S_3 (14,9%), S_6 (13,1%), S_1 (12,5%) та S_4 (8,3%). На загал такий алельний профіль узгоджується із описаною раніше картиною розповсюдження алелів серед культивованих у Європі сортів черешні. В цілому, наші результати узгоджуються із попереднім дослідженням (Lisek et al., 2015), де було висунуто твердження, що східноєвропейські сорти черешні характеризуються високою частотою зустрічальності алелю S_5 . Значна поширеність алелів S_5 та S_9 в українських сортів суттєво відрізняє їх від сортів з інших регіонів Європи (Lisek et al., 2015).

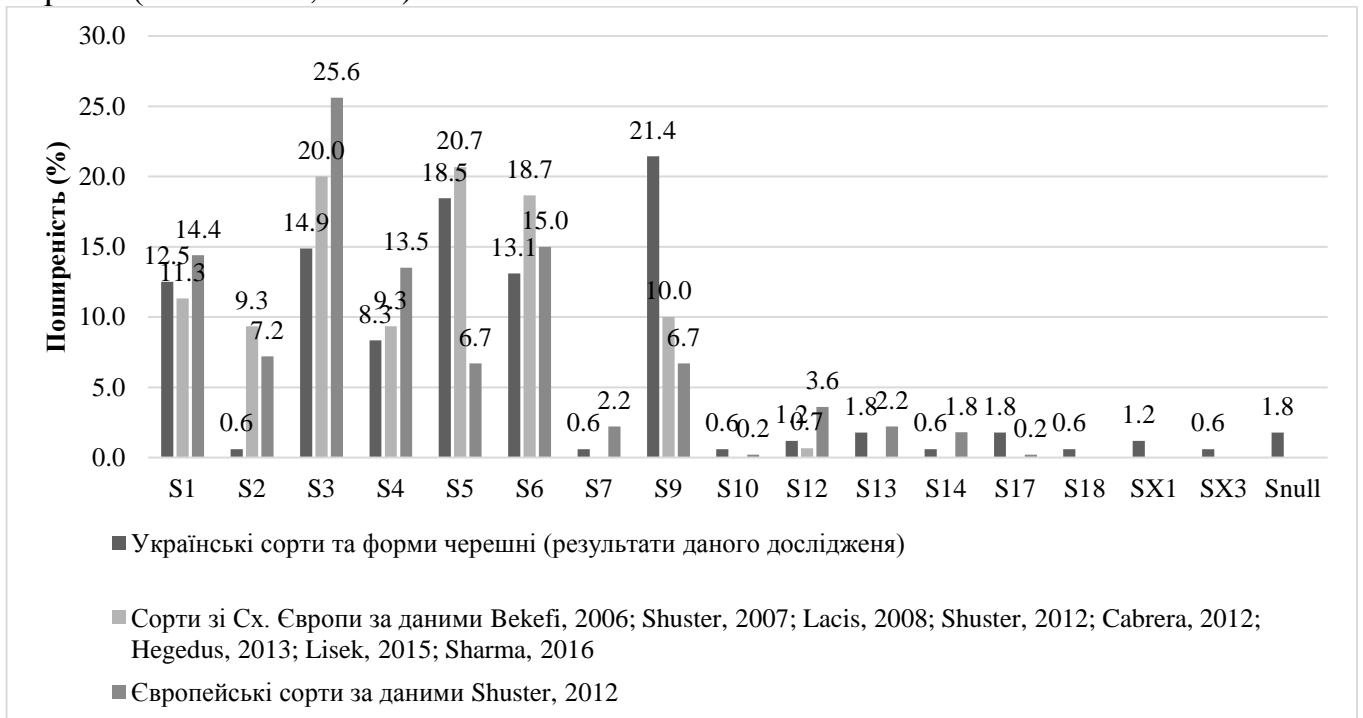


Рис. 14. Частоти зустрічальності S -алелів у сортах черешні.

При порівнянні результатів нашого дослідження із попередніми даними про поширення *S*-алелів серед українських, східноєвропейських та групи європейських сортів було виявлено ряд відмінностей. Зокрема, алель S_1 у всіх трьох групах зустрічається із подібною частотою; алель S_5 в українських сортів черешні зустрічається дещо рідше, ніж в цілому серед східноєвропейських сортів; водночас частота алеля S_9 в українських сортів черешні вдвічі вища в порівнянні із вибіркою східноєвропейських сортів та втричі – порівняно із референтною групою європейських сортів; алелі S_3 , S_4 та S_6 в українських сортів зустрічаються рідше у порівнянні з двома іншими групами; алелі S_2 , S_{12} , S_{13} та S_{17} є рідкісними в українських сортів черешні; алелі S_7 , S_{10} та S_{18} було виявлено лише в культивованих форм дикої черешні.

ВИСНОВКИ

У роботі, використовуючи молекулярні маркери, було оцінено генетичне різноманіття сортів черешні української селекції та форм дикої черешні. Також проведено оцінку дискримінаційних можливостей кількох типів маркерів при генетичному профілюванні. Висвітлено рівень генетичної спорідненості та з'ясовано генетичну конституцію сортів та форм черешні за молекулярними маркерами. Ідентифіковано алельні варіанти гена *PavCNR12*, алелі самонесумісності *S*-локусу та групи перехресної несумісності. Запропоновано більш актуальну модель асоціації маркерів МС локусів із CAPS-маркерами та алелями гена *PavCNR12*. Проаналізовано нерівномірність розповсюдження *S*-алелів у Сх. Європі.

1. Визначення дискримінаційних можливостей досліджених IRAP-, REMAP-, ISSR-праймерів та МС локусів дозволило оцінити ефективність їх використання для генетичного профілювання українських сортів та форм черешні. Встановлено найбільш ефективні для оцінки поліморфізму генотипів черешні ISSR-праймери (UBC 835, 836 та 881) та МС локуси (EMPA015, EMPAS02, EMPAS06, PceGA34, PS12A02, CPSCT034, CPSCT034, BPPCT040, EPPB4230, BPPCT037, pchgms55), що дозволяють отримати маркери з високими дискримінаційними можливостями. Показано обмежену придатність для генетичного профілювання сортів черешні IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів.

2. Сформовано референсну колекцію ДНК 102 сортів та 36 форм черешні, запропоновано алгоритм її використання для ідентифікації та перевірки сортової ідентичності, зокрема, для близько споріднених сортів та випадків виявлення омонімів сортів. Створено базу даних ДНК-типуювання та генетичні профілі з використанням IRAP-, REMAP-, ISSR-, CAPS-, МС маркерів та *S*-локусу для більше 100 сортів та форм черешні. Отримані молекулярні маркери можуть бути використані для доповнення традиційних паспортів сортів черешні.

3. Використання молекулярних маркерів дозволило з'ясувати філогенетичну спорідненість та прояснити генетичну конституцію (структуру) українських сортів та форм черешні. Виявлено чотири раніше неописані генетичні пули серед сортів та форм черешні українського походження. Отримані дані можуть бути використані для оцінки генетичного різноманіття при управлінні банком геноплазми черешні та враховуватись при виборі вихідних форм при схрещуванні.

4. Впроваджено новий швидкий та надійний метод ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12* із застосуванням кодомінантних CAPS-маркерів, що

дозволяють відрізнити гомо- та гетерозиготні форми. З використанням цього методу встановлено алельний стан гена *PavCNR12* у 70 сортів черешні української та закордонної селекції та виявлено суттєве переважає частоти алеля *PavCNR12-1* над алелями -2 та -3.

5. Встановлено алельний стан *S*-локусу та групи перехресної несумісності у 120 зразків сортів черешні та форм дикої черешні. Ідентифіковано 17 різних *S*-алелів. Проаналізовані сорти черешні віднесено до 17 відомих груп перехресної несумісності. З'ясовано, що для українських сортів черешні типовими є алелі *S*₁, *S*₃, *S*₄, *S*₅, *S*₆ та *S*₉. Характерною є висока розповсюдженість алелів *S*₅ та *S*₉, що відрізняє українські сорти від інших європейських. Водночас висока частота зустрічання алеля *S*₉ відрізняє українські сорти як від східноєвропейських, так і від європейських в цілому. Виявлено щонайменше один новий *S*-алель, ще два потребують подальшого вивчення.

6. Дослідження дозволило встановити, що українські сорти черешні є унікальними, різноманітними та відмінними від сортів Зх. Європи, а їх генетичний потенціал використаний не повністю. Застосування молекулярних маркерів дозволить прискорити селекцію, цілеспрямовано підбирати форми для схрещування, створити та ефективно управляти банком геноплазми цієї культури, оптимізувати планування та закладання промислових насаджень українськими сортами черешні.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ivanovych Ya.I., Udovychenko K.M., Bublyk M.O., Volkov R.A. (2017). ISSR-PCR fingerprinting of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Cytol. Genet.*, 51 (1), 40-47. *Дисертант брав участь у плануванні та проведенні експерименту, здійсненні статистичної обробки даних та їх аналізі, участь у написанні рукопису статті.*

2. Ivanovych Ya., Volkov R. (2017). Genetic relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from Ukraine determined by microsatellite markers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 1-9. *Дисертант брав участь у плануванні та проведенні експерименту, здійсненні статистичної обробки даних та їх аналізі, участь у написанні рукопису статті.*

3. Іванович Я.І., Волков Р.А. (2017). Алельний стан гена *PavCNR12* у сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції. *Вісник УТГіС*, 15 (1), 40-46. *Дисертант брав участь у плануванні та проведенні експерименту, здійсненні статистичної обробки даних та їх аналізі, участь у написанні рукопису статті.*

4. Іванович Я.І., Тряпціна Н.В., Удовиченко К.М., Волков Р.А. (2017). Ідентифікація алелів самонесумісності в сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції. *Вісник УТГіС*, 15 (2), 150-159. *Дисертант брав участь у плануванні та проведенні експерименту, здійсненні статистичної обробки даних та їх аналізі, участь у написанні рукопису статті.*

5. Іванович Я.І., Тряпціна Н.В. (2014) Профілювання геному сортів черешні української селекції за допомогою IRAP-ПЛР та REMAP-ПЛР маркерів. *Наук. вісник ЧНУ. Біологія (Біологічні системи)*, 6 (2), 115-119. *Дисертант брав участь у*

плануванні та проведенні експерименту, здійсненні статистичної обробки даних та їх аналізі, участь у написанні рукопису статті.

6. Іванович Я.І. (2015) Сучасний стан вивчення геному (*Prunus avium* (L.) L.) черешні. *Наук. доп. НУБіП України*, 51 (2), 1-20. Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел та зробив огляд основних напрямків досліджень з генетики черешні.

7. Удовиченко К.М., Тряпціна Н.В., Медведєва Т.В., Іванович Я.І. (2016). Біотехнології в садівництві. В: І.В. Гриник та М.О. Бублик (Ред.), Актуальні дослідження і розробки Інституту садівництва НААН та його мережі (с. 53-62). Київ: КТ "Забеліна-Фільковська Т. С. і компанія Київська нотна фабрика". Здобувачем разом зі співавторами проведено аналіз літературних, узагальнення деяких власних експериментальних даних та написано розділ до монографії.

8. Ivanovych Ya.I. (2016). Sweet cherry genetic fingerprinting: methods and techniques. Marker-assisted selection (MAS) approaches for selection of sweet cherry varieties. COST FA1104 STSM Scientific Report (C. V. Aquitaine/A3C, Trans.) (p. 1-13). Bordeaux: INRA. Дисертант самостійно планував та проводив експеримент, здійснював статистичну обробку даних, їх аналіз та написання рукопису звіту.

9. Іванович Я.І. (2013). Використання ретротранспозонів для паспортизації сортів черешні. Тези представлені на VIII Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків.

10. Іванович Я.І. (2014). Генотипування українських сортів черешні з використанням ISSR-ПЛР маркерів. Тези представлені на Міжнародній науковій нараді «Збагачення генетичного різноманіття рослин», Харків.

11. Іванович Я.І. (2015). Полілокусні маркерні системи для генотипування сортів черешні. Тези представлені на конференції «Біологічні дослідження – 2015», Житомир.

12. Іванович Я.І. (2015). Метод ідентифікації алелів гена *PavCNR12*, пов'язаного із розміром плодів черешні. Тези представлені на XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів.

13. Ivanovych Ya., Volkov R., Triapitsyna N., Udovychenko K. (2015). *Microsatellite fingerprinting of perspective Ukrainian sweet cherry varieties (Prunus avium L.)*. Paper presented at the 5th IMBG International Conference of Young Scientists and the 1st Conference of Young Scientists of the Department BioPhMB NAS of Ukraine "CYS-2015", Kyiv.

14. Ivanovych Ya.I., Volkov R.A. (2017). *Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry cultivars of Ukrainian origin*. Paper presented at the 3rd Conference of Young Scientist "Plant Biology and Biotechnology", Kyiv.

15. Іванович Я.І., Тряпціна Н.В., Удовиченко К.М. (2017). *Маркер-опосередкований добір та генетичне профілювання кісточкових культур в Україні*. Тези представлені на Міжнародній науковій конференції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин», Одеса.

АНОТАЦІЯ

Іванович Я. І. Генетичне профілювання для маркер-опосередкованого добору сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції. – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2018.

Вивчення генетичного різноманіття українських сортів черешні з використанням ДНК-маркерів важливо для проведення цілеспрямованих селекційних досліджень, контролю сортової ідентичності та генетичної стабільності клонів, управління колекціями генетичних ресурсів та захисту прав селекціонерів. Генетичне профілювання українських сортів та форм черешні (всього 110 генотипів) з використанням молекулярних маркерів (ММ: IRAP, REMAP, ISSR, SSR) кількох типів було проведено для оцінки їх дискримінаційних можливостей, вибору найбільш придатних ММ для рутинного використання та підбору мінімально необхідних наборів мікросателітних локусів для ідентифікації генотипів, формування генетичних профілів сортів та доповнення паспортів сортів, оцінки генетичної спорідненості генотипів. Аналіз генетичної структури вибірки з 94 генотипів дозволив виявити десять генетичних пулів, чотири з яких виявились раніше неописаними. До пулів 4 та 10 ввійшли сорти при створенні яких, імовірно, було використано ряд ландрас та інших форм місцевого походження. Генетичні пули 6 та 9 сформовані переважно F₁-F₃ нащадками сортів Дрогана жовта та Валерій Чкалов. Дослідження генів господарсько-цінних ознак полягало в ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12* та генів *S*-локусу. Запропоновано новий метод ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12* із застосуванням кодомінантних CAPS-маркерів. З використанням розробленого методу встановлено алельний стан гена *PavCNR12* у 70 сортів черешні та виявлено суттєве переважання частоти бажаного алеля *PavCNR12-1* над алелями -2 та -3. Для 70 сортів черешні української селекції та десяти форм ідентифіковано 14 відомих алелів самонесумісності, *S*-генотипи та 17 груп перехресної несумісності. Серед українських сортів черешні найбільш поширеними є алелі *S*₁, *S*₃, *S*₄, *S*₅, *S*₆ та *S*₉. Характерним є домінування алелів *S*₅ та *S*₉, що відрізняє українські сорти від інших європейських.

Ключові слова: сорти та форми черешні, *Prunus avium* L., генетичне профілювання, молекулярні маркери, генетична структура та спорідненість, маркер-опосередкований добір.

АННОТАЦИЯ

Иванович Я. И. Генетическое профилирование для маркер-опосредованной селекции сортов черешни (*Prunus avium* L.) украинской селекции. – Квалификационная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. – ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2018.

Изучение генетического разнообразия украинских сортов черешни с использованием ДНК-маркеров важно для проведения целенаправленных селекционных исследований, контроля сортовой идентичности и генетической стабильности клонов, управления коллекциями генетических ресурсов и защиты прав селекционеров. Генетическое профилирование украинских сортов и форм черешни (всего 110 генотипов) с использованием молекулярных маркеров (ММ: IRAP, REMAP, ISSR, SSR) нескольких типов было проведено для оценки их дискриминационных возможностей, выбора наиболее подходящих ММ для рутинного использования и подбора минимально необходимых наборов микросателлитных локусов для идентификации генотипов, формирования генетических профилей сортов и дополнения паспортов сортов, оценки генетического родства генотипов. Анализ генетической структуры выборки из 94 генотипов позволил выявить десять генетических пулов, четыре из которых оказались ранее не описанными. К пулам 4 и 10 относятся сорта, при создании которых, вероятно, был использован ряд ландрас и других форм местного происхождения. Генетические пулы 6 и 9 сформированы преимущественно F₁-F₃ потомками сортов Дрогана желтая и Валерий Чкалов. Исследование генов хозяйственно-ценных признаков заключалось в идентификации аллельных вариантов гена *PavCNR12* и генов *S*-локуса. Предложен новый метод идентификации аллельных вариантов гена *PavCNR12* с применением кодоминантных CAPS-маркеров. С использованием разработанного метода установлено аллельное состояние гена *PavCNR12* у 70 сортов черешни и выявлено существенное преобладание частоты желательного аллеля *PavCNR12-1* над аллелями -2 и -3. Для 70 сортов черешни украинской селекции и десяти форм идентифицировано 14 известных аллелей самонесовместимости, *S*-генотипы и 17 групп перекрестной несовместимости. Среди украинских сортов черешни наиболее распространены аллели *S*₁, *S*₃, *S*₄, *S*₅, *S*₆ и *S*₉. Характерно доминирование аллелей *S*₅ и *S*₉, что отличает украинские сорта от других европейских.

Ключевые слова: сорта и формы черешни, *Prunus avium* L., генетическое профилирование, молекулярные маркеры, генетическая структура и родство, маркер-опосредованная селекция.

SUMMARY

Ivanovych Ya. I. Genetic fingerprinting for the marker-assisted selection of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. – Manuscript.

Dissertation for the PhD degree in specialty 03.00.22 – molecular genetics. – Institute of food biotechnology and genomics of the National academy of sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The study of the genetic diversity of Ukrainian sweet cherry cultivars using DNA markers is important for targeted breeding research, control of cultivar identity and genetic stability of clones, management of collections of genetic resources and protection of breeders' rights. The genetic fingerprinting of Ukrainian sweet cherry cultivars and accessions (total of 110 genotypes) was conducted using several types of molecular markers (MM): IRAP, REMAP, ISSR, SSR. The discriminatory capacity of the markers was evaluated. Also, the most suitable MM for routine use and the minimal sets of microsatellite loci required for genotyping were determined. We created genetic profiles of the cultivars and complemented the cultivars passports with these profiles, as well as evaluated the genetic relatedness of the genotypes. The analysis of the genetic structure of 94 cultivars reveals the existence of ten gene pools, four of which were previously unknown. Genetic pools 4 and 10 include cultivars, which were probably obtained using some landraces and other forms of local origin. Genetic pools 6 and 9 are predominantly formed by F₁-F₃ progeny of Drogans Yellow and Valerii Chkalov. Allelic variants of the *PavCNR12* and the *S*-locus genes that control economically important traits were identified. A new convenient method for the identification of allelic variants of the *PavCNR12* gene using codominant CAPS-markers is proposed. Applying this method, the allelic status of *PavCNR12* was elucidated for 70 sweet cherry cultivars of Ukrainian and foreign breeding. A significant prevalence of the desirable allele *PavCNR12-1* over alleles *PavCNR12-2* and *-3* was found among the studied cultivars. *S*-genotypes were determined for 70 local sweet cherry cultivars, promising breeding clones, 10 wild accessions of Ukrainian origin and 14 foreign cultivars. In total, 14 different *S*-alleles were detected. The most common *S*-alleles were *S*₁ (12.5%), *S*₃ (14.9%), *S*₄ (8.3%), *S*₅ (18.5%), *S*₆ (13.1%) and *S*₉ (21.4%). The relative occurrence of the identified *S*-alleles confirms that the studied cultivars belong to the European group of origin. Characteristic is the domination of the *S*₅ and *S*₉ alleles, which distinguishes the cultivars of Ukrainian origin from other European ones. All analyzed cultivars were classified into 17 known cross-incompatibility groups (CIG). The largest groups are CIGs XXXVII (*S*₅*S*₉), VII (*S*₃*S*₅), X (*S*₆*S*₉) and XVIII (*S*₁*S*₉), which include 12, seven, six and six cultivars, respectively. Most rare are cultivars, which belong to the CIGs II (*S*₁*S*₃), VI (*S*₃*S*₆), XV (*S*₅*S*₆), XXVII (*S*₄*S*₁₂), XLIII (*S*₂*S*₉), XXX (*S*₆*S*₇) and XVII (*S*₄*S*₆). The cultivar 'Yedyna' was an exception since it carries the alleles *S*₆ and *S*₁₇ and was placed in the group O as a universal pollinator.

Key words: sweet cherry cultivars and accessions, *Prunus avium* L., genetic fingerprinting, molecular markers, genetic structure and relatedness, marker-assisted selection.