

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ САДІВНИЦТВА**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА “ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА  
ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ”**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ІВАНОВИЧ ЯРОСЛАВ ІВАНОВИЧ**

УДК 577.213.3:575.174.015.3:630\*165:634.232

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

03.00.22 – молекулярна генетика

Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,

результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 Іванович Я.І.

Науковий керівник: Волков Р.А., доктор біологічних наук, професор

**Київ – 2018**

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ .....	5
СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	11
ВСТУП.....	11
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНА МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ СОРТИМЕНТУ ЧЕРЕШНІ (огляд літератури) .....	16
1.1. Ботанічна та молекулярно-генетична характеристика черешні як представника підроду <i>Cerasus Pers.</i> ....	16
1.2. Молекулярні маркери: основні типи та галузь їх застосування.....	19
1.2.1. Мультилокусні молекулярні маркери.....	19
1.2.2. Монолокусні молекулярні маркери .....	22
1.3. Маркер-опосередкований добір в селекції сортів черешні та управління генетичними ресурсами.....	24
1.4. Локуси кількісних та якісних (менделівських) ознак у черешні .....	28
1.4.1. Морфологічні та фізіологічні ознаки.....	29
1.4.2. Властивості плодів .....	31
1.4.3. Фенологічні властивості.....	35
1.4.4. Стійкість до біотичних та абіотичних факторів середовища .....	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	43
2.1. Рослинний матеріал .....	43
2.2. Виділення загальної рослинної ДНК та визначення її концентрації.....	43
2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).....	45
2.3.1. IRAP-, REMAP- та ISSR-ПЛР .....	46
2.3.2. SSR-ПЛР.....	47
2.3.3. Ген <i>PavCNR12</i> .....	49
2.3.4. <i>S</i> -локусні гени ( <i>S-PHKаза</i> та <i>SFB</i> ).....	49

2.4. Електрофорез нуклеїнових кислот .....	51
2.4.1. Горизонтальний електрофорез в агарозному гелі .....	51
2.4.2. Вертикальний електрофорез в поліакриламідному гелі .....	51
2.4.3. Капілярний електрофорез (фрагментний аналіз).....	52
2.4.4. Забарвлення нуклеїнових кислот .....	52
2.5. Статистичні та біоінформатичні методи аналізу .....	53
2.5.1. Аналіз електрофореграм.....	53
2.5.2. Оцінка генетичного різноманіття.....	54
2.5.3. Генетична конституція та спорідненість сортів .....	56
<b>РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ СОРТІВ ЧЕРЕШНІ</b> <b>УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ.....</b>	<b>59</b>
3.1. Оцінка генетичного різноманіття.....	59
3.1.1. IRAP- та REMAP-ПЛР маркери.....	59
3.1.2. ISSR-ПЛР маркери .....	61
3.1.3. Мікросателітні маркери.....	64
3.2. Підбір мінімально необхідних наборів мікросателітних маркерів .....	69
3.3. Генетична конституція та спорідненість сортів черешні.....	74
3.3.1. ISSR-ПЛР маркери .....	74
3.3.2. Мікросателітні маркери.....	75
<b>РОЗДІЛ 4. МАРКЕР-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ДОБІР СОРТІВ ЧЕРЕШНІ</b> <b>УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ.....</b>	<b>91</b>
4.1. Вивчення варіації алельних станів гена <i>PavCNR12</i> .....	91
4.1.1. Розробка та апробація методу диференціації алельних варіантів <i>PavCNR12</i> за допомогою CAPS-маркерів .....	91
4.1.2. Аналіз нових та порівняння із відомими алельними варіантами <i>PavCNR12</i> .....	97

4.1.3. Асоціації маркерів MC локусів CPSC038 та BPPCT034 із CAPS-маркерами та алелями <i>PavCNR12</i> .....	98
4.2. Самонесумісність у сортів черешні.....	103
4.2.1. Ідентифікація алелів самонесумісності ( <i>S</i> ).....	103
4.2.2. Нерівномірність розповсюдження <i>S</i> -алелів .....	108
РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	114
5.1. Генетичне профілювання сортів черешні та аналіз генетичного різноманіття .....	114
5.2. Господарсько-цінні ознаки у черешні та перспективи впровадження маркер-опосередкованого добору у селекційні програми .....	117
ВИСНОВКИ.....	121
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	123
ДОДАТОК А.....	143
ДОДАТОК Б.....	146
ДОДАТОК В .....	150
ДОДАТОК Г.....	151
ДОДАТОК Д.....	153
ДОДАТОК Е .....	155
ДОДАТОК Ж .....	157

## АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.22 «Молекулярна генетика». – Інститут садівництва НААН України, Новосілки. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2018.

В проведених дослідженнях оцінено дискримінаційні можливості різних типів молекулярних маркерів (IRAP, REMAP, ISSR, SSR) для генетичного профілювання українських сортів черешні. Показано обмежену придатність для генетичного профілювання IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів та в деякій мірі ISSR-ПЛР маркерів. Найбільш інформативними є маркери ряду мікросателітних локусів та окремі ISSR-ПЛР маркери. Для оцінки поліморфізму генотипів черешні кращими серед випробуваних виявились праймери UBC 835, 836 та 881 (ISSR) та MC локуси EMPA015, EMPAS02, EMPAS06, PceGA34, PS12A02, CPST034, CPST034, BPPCT040, EPPB4230, BPPCT037, pchgms55 з високими статистичними показниками дискримінаційних можливостей.

У роботі було проведено підбір мінімально необхідних наборів мікросателітних маркерів. Вивчалась імовірність ідентичності ( $P_{ID}$  та  $P_{ID-SIB}$ ), котра передбачає, що досліджувана вибірка складається із сортів, які походять від випадкового схрещування і порівнюються неспоріднені рослини ( $P_{ID}$ ) та оцінка імовірності ідентичності споріднених зразків у вибірці ( $P_{ID-SIB}$ ) відповідно. Не зважаючи на низьку статистичну імовірність ідентичності сортів за використання двох мінімальних наборів на вибірках різних розмірів, декілька пар близькоспоріднених сортів не вдалося розрізнити. Проте, ці сорти не є дублікатами, оскільки відрізняються за спектрами ISSR-ПЛР маркерів.

У дисертації вивчено генетичне різноманіття українських сортів черешні в порівнянні із сортами закордонної селекції, ландрасами та дикорослими формами черешні, а також прояснено генетичну структуру та проведено оцінку рівня філогенетичної спорідненості українських сортів черешні із врахуванням їх

батьківських форм. При з'ясуванні генетичної конституції сортів та форм в нашому дослідженні було описано 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  $F_1$ - $F_3$  нащадками сортів Дрогана жовта (в т. ч. клон Наполеон біла) та Валерій Чкалов. Аналіз кладограм генетичної спорідненості в цілому підтверджує дані щодо генетичної структури досліджених сортів.

В проведених дослідженнях було оцінено філогенетичну спорідненість між 94 дослідженими сортами та формами черешні, зокрема, використовуючи незважений метод об'єднання найближчих сусідів (UWN-J). Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти та форми на три кластери – А-С. До кластеру А переважно увійшли сорти, в яких однією з предкових форм у  $F_1$ - $F_2$  був сорт Валерій Чкалов або Дрогана жовта (чи його клон Наполеон біла). Аналізуючи походження сортів, що ввійшли в кластер А, виявлено, 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.

У роботі із застосуванням кодомінантних CAPS-маркерів запропоновано новий швидкий та надійний метод ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12*, що має вплив на масу плоду у черешні. З використанням розробленого методу встановлено алельний стан гена *PavCNR12* у 70 сортів черешні української та закордонної селекції та виявлено суттєве переважання частоти бажаного алеля *PavCNR12-1* (73.6%) над алелями -2 (12.1%) та -3 (5.7%). Маса плодів у 28% сортів могла би бути додатково збільшена за умови введення у геном алеля *PavCNR12-1* та/або переведення його у гомозиготний стан.

В дисертації проведено порівняння алелів MC локусів (CPSCT038 та VPPCT034, C38/B34) та CAPS-маркерів із алельними варіантами гена *PavCNR12*, пов'язаного із ознакою маси плоду на прикладі сортів черешні української селекції. Використовуючи існуючі моделі асоціації функціональних гаплотипів MC локусів

C38/B34 із розмірами плодів у черешні було запропоновано власну модель. В нашій моделі за основу було взято раніше ідентифіковані алельні варіанти *PavCNR12*, для яких показано зв'язок із масою плодів (De Franceschi et al., 2013) та доповнено відомостями про зв'язок C38/B34 гаплотипів із масою плодів та розробленими нами CAPS-маркерами.

У роботі, 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% C38/B34 гаплотипів виявили невідповідність ідентифікованим алелям *PavCNR12*.

В проведених дослідженнях для 70 сортів черешні української селекції та десяти дикорослих форм та ландрас черешні встановлено алелі самонесумісності (самобезплідності, *S*), *S*-генотипи та групи перехресної несумісності. З'ясовано, що серед українських сортів черешні найбільш поширеними є алелі *S*<sub>9</sub> (21,4%), *S*<sub>5</sub> (18,5%), *S*<sub>3</sub> (14,9%), *S*<sub>6</sub> (13,1%), *S*<sub>1</sub> (12,5%) та *S*<sub>4</sub> (8,3%). Характерним є домінування алелів *S*<sub>5</sub> та *S*<sub>9</sub>, що відрізняє українські сорти від інших європейських.

При порівнянні результатів нашого дослідження із попередніми даними про поширення *S*-алелів серед українських, східноєвропейських та західноєвропейських сортів було виявлено ряд відмінностей. Зокрема, алель *S*<sub>1</sub> у всіх трьох групах зустрічається із подібною частотою; алель *S*<sub>5</sub> в українських сортів черешні зустрічається дещо рідше, ніж в цілому серед східноєвропейських сортів; водночас частота алеля *S*<sub>9</sub> в українських сортів черешні вдвічі вища в порівнянні із вибіркою східноєвропейських сортів та втричі – порівняно із референтною групою європейських сортів; алелі *S*<sub>3</sub>, *S*<sub>4</sub> та *S*<sub>6</sub> в українських сортів зустрічаються рідше у порівнянні з двома іншими групами; алелі *S*<sub>2</sub>, *S*<sub>12</sub>, *S*<sub>13</sub> та *S*<sub>17</sub> є рідкісними в українських сортів черешні; алелі *S*<sub>7</sub>, *S*<sub>10</sub> та *S*<sub>18</sub> було виявлено лише в культивованих форм дикої черешні.

Проаналізовані сорти черешні було віднесено до 17 вже відомих груп перехресної несумісності. Винятком є лише сорт Єдина із генотипом  $S_6S_{17}$ , що було віднесено до групи O (універсальні запилювачі). Найбільш численною групою є 12 сортів, котрі належать до XXXVII ( $S_5S_9$ ) групи перехресної несумісності, а також сім до VII ( $S_3S_5$ ), по шість до X ( $S_6S_9$ ) та XVIII ( $S_1S_9$ ) груп перехресної несумісності. 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 ( $S_4S_6$ ) груп перехресної несумісності.

В процесі виконання роботи було сформовано референсну колекцію ДНК 77 сортів та ряду форм черешні. Створено базу даних ДНК-типування та генетичні профілі сортів з використанням IRAP-, REMAP-, ISSR-, CAPS-, MC маркерів та маркерів генів *S*-локусу. Отримані молекулярні маркери можуть бути використані для доповнення традиційних паспортів та однозначної ідентифікації сортів черешні. Застосовуючи молекулярні маркери, для ряду сортів, при створенні яких було використано суміш пилку, у роботі було запропоновано імовірні батьківські форми.

Отримані алельні характеристики варіювання генів господарсько-цінних ознак (*PavCNR12*, гени *S*-локусу) та зчеплені з ними маркери можуть бути використані для впровадження маркер-опосередкованого добору в селекційні програми черешні в Україні.

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

#### **Список публікацій здобувача:**

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. doi: 10.3103/S0095452717010066
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. doi: 10.1080/14620316.2017.1342568
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.



4. Іванович Я.І., Тряпіцина 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.
5. Іванович Я.І., Тряпіцина 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.
6. Іванович Я.І. (2015) Сучасний стан вивчення геному (*Prunus avium* (L.) L.) черешні. *Наук. доп. НУБіП України*, 51 (2), 1-20.
7. Удовиченко К.М., Тряпіцина 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 (сс. 53-62). Київ: КТ "Забеліна-Фільковська Т. С. і компанія Київська нотна фабрика".
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.) (pp. 1-13). Bordeaux: INRA. doi: 10.13140/RG.2.2.11739.98080
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. *Форма участі – заочна.*
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. *Форма участі – заочна.*
11. Іванович Я.І. (2015). Полілокусні маркерні системи для генотипування сортів черешні. Тези представлені на конференції «Біологічні дослідження – 2015», Житомир. *Форма участі – заочна.*
12. Іванович Я.І. (2015). Метод ідентифікації алелів гена *RavCNR12*, пов'язаного із розміром плодів черешні. Тези представлені на XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів. *Форма участі – очна.*

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 5<sup>th</sup> IMBG International Conference of Young Scientists and the 1<sup>st</sup> Conference of Young Scientists of the Department BioPhMB NAS of Ukraine “CYS-2015”, Kyiv. *Форма участі – очна.*

14. Ivanovych Ya.I., Volkov R.A. (2017). *Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry cultivars of Ukrainian origin*. Paper presented at the 3<sup>rd</sup> Conference of Young Scientist “Plant Biology and Biotechnology”, Kyiv. *Форма участі – заочна.*

15. Іванович Я.І., Тряпїцина 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. *Форма участі – заочна.*

## СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- AFLP – поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів (Amplified fragment length polymorphism)
- CAPS – рестрикційний поліморфізм ампліфікованих послідовностей (Cleaved amplified polymorphic sequence)
- ЕСРGR – Європейська спільна програма з генетичних ресурсів рослин (European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources)
- GBS – Генетичне профілювання шляхом секвенування (Genotyping by sequencing)
- GWAS – Повногеномний пошук асоціацій (Genome-wide association studies)
- IRAP – поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами (Inter-retrotransposon amplified polymorphism)
- ISSR – послідовності ДНК між простими повторами (Inter simple sequence repeat)
- LG – група зчеплення, пара хромосом (Linkage group)
- LINE – ретротранспозони довгого типу (Long Interspersed Nuclear Elements)
- MAS – добір за маркерами або маркер-опосередкований добір (Marker-assisted selection)
- NGS – секвенування другого або нового покоління (Next-generation sequencing)
- PIC – індекс поліморфності (Polymorphic information content)
- QTL – локус кількісної ознаки (Quantitative trait loci)
- RAPD – довільно ампліфікована поліморфна ДНК (Random amplification of polymorphic DNA)
- REMAP – поліморфізм ампліфікованих послідовностей між фрагментом LTR-ретротранспозону і мікросателітним повтором, (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism)

RFLP	– поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів ПДРФ (Restriction fragment length polymorphism)
SINE	– ретротранспозони короткого типу (Short Interspersed Nuclear Elements)
SNP	– поліморфізм однонуклеотидних замін (Single nucleotide polymorphism)
SSR	– повтори простих послідовностей (Simple sequence repeats), мікросателіти (МС)
UPGMA	– незважений парногруповий метод з арифметичним усередненням, (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
UPOV	– Міжнародна організація захисту нових сортів рослин (International Union for the Protection of New Varieties of Plants)
ГСН	– система гаметофітної само-несумісності (gametophytic self-incompatibility system, GSI)
дНТФ	– суміш дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (dNTP)
ЕДТА	– етилендіамінтетраацетат
нп	– нуклеотидна пара (bp)
ПААГ	– поліакриламідний гель (PAGE)
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція (PCR)
ЦТАБ	– цетилтриметиламоній бромід (СТАВ)

## ВСТУП

За даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO) у світі спостерігається стабільне зростання площі насаджень, урожайності та валового збору плодів черешні. 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 [169] та до десятки найбільших виробників плодів черешні [64]. За останні десятиріччя українськими селекціонерами створено велику кількість сортів черешні перспективних для промислового вирощування та конкурентоздатних на світовому ринку.

Черешня є однією з важливих промислових плодкових культур в Україні. За даними FAO в Україні скоротились площі насаджень черешні, але їх урожайність за останні роки перевищує середні світові показники. Відповідно, валовий збір плодів черешні стабілізувався на рівні 72-73 тис. тон. 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 дозріванням плодів, високими показниками врожайності, придатністю до механізованого збирання плодів, транспортабельністю, високим вмістом вуглеводів, сухих розчинних речовин та ін.

**Актуальність досліджень.** Вивчення на сучасному рівні генетичного різноманіття культурних рослин вкрай важливе для цілеспрямованих селекційних досліджень. У зв'язку зі стрімким розвитком молекулярних методів та активними дослідженнями геномів культурних рослин актуальним є пошук генів господарсько-цінних ознак. 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; контролю сортової ідентичності та генетичної стабільності клонів при розмноженні традиційними та біотехнологічними методами; управління

колекціями (банками) генетичних ресурсів та захисту прав селекціонерів. Створення цілісної, сучасної системи оцінки сортової ідентичності черешні з використанням різних підходів можливе при поєднанні молекулярних даних із традиційними селекційними, помологічними описами та узагальненими даними сортовипробування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота була виконана 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, а також короткострокової наукової місії (STSM) в рамках програми COST FA1104 «Sustainable production of high-quality cherries for the European market» (номер реєстрації COST-STSM-ECOST-STSM-FA1104-180116-070455, 2016 р.).

**Мета і завдання досліджень.** 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 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. Сформуванню референсних колекцій 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 МС локусів та генів господарсько-цінних ознак *PavCNR12* і *S*-локусу (*S-PHKazi* та *SFB*).

**Методи дослідження.** Молекулярно-генетичні методи (екстракція та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), розщеплення ампліфікованої поліморфної послідовності, електрофорез продуктів ампліфікації, секвенування фрагментів ДНК); статистичні методи (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 методи (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 одержаних 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 (CIG) для оптимізації планування та закладання промислових насаджень черешні.

**Особистий вклад здобувача.** 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. Тряпціною, зав. відділом вірусології Інституту



садівництва НААН К.М. Удовиченко та науковим керівником проф. Р.А. Волковим, з якими автор має спільні публікації.

**Апробація результатів дослідження.** 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); 5<sup>th</sup> IMBG International Conference of Young Scientists and the 1<sup>st</sup> Conference of Young Scientists of the Department BioPhMB NAS of Ukraine «CYS-2015» (Україна, Київ, 2015); 3<sup>rd</sup> 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 об'єм 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.

## РОЗДІЛ 1. СУЧАСНА МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ СОРТИМЕНТУ ЧЕРЕШНІ (огляд літератури)

### 1.1. Ботанічна та молекулярно-генетична характеристика черешні як представника підроду *Cerasus* Pers.

До роду *Prunus* L. (родина Rosaceae) входять біля 200 видів (більше 1200 таксонів видового рангу, підвидів та форм [76]), що включають господарсько-цінні кісточкові культури. Різні систематики неодноразово розділяли та об'єднували рід. На сьогодні найбільш широко прийнятою є доповнена класифікація роду *Prunus* за Rehder [162], що включає п'ять підродів (*Amygdalus*, *Prunus*, *Cerasus*, *Emplectocladus*, *Padus* та *Laurocerasus*) [108]. У дослідженні 48 видів стверджується, що рід *Prunus* є монофілетичним та походить від спільного євразійського предка [24].

Підрід Вишня *Cerasus* Pers. поділяють на 7 секцій, водночас обидва широко культивовані види – черешню (*P. avium* (L.) L.) та вишню звичайну (*P. cerasus* L.) – відносять до секції *Cerasus* Koehne [102, 105, 204]. Окремим видом *P. ×gondouinii* Rehd. виділяють групу дюків, гібридів *P. avium* × *P. cerasus* [56].

Olden та Nybom висували припущення, що вишня звичайна виникла як гібрид степової вишні (*P. fruticosa*) та черешні. В подальшому аллотетраплоїдне походження вишні було підтверджене ізоферментним аналізом, *in situ* гібридизацією геномної ДНК та каріотипуванням. Встановлено також, що хлоропластний геном вишні звичайної успадкований по материнській лінії від вишні степової [102].

Ім'я *P. avium* дав черешні Лінней у 1755 р. Цей вид також називають дикою черешнею, пташиною вишнею та ін. Вважається, що черешня виникла в Близько-Східному центрі походження культурних рослин чи Кавказькому регіоні в результаті одомашнення дикої черешні. Черешня є місцевою рослиною як в Азії, (напр., на півночі сучасного Ірану), на Близькому Сході так і в Україні. Широко розповсюджена вона в Європі, особливо в Греції, Італії та Іспанії. Ареал свідчить, що вид виник неподалік Каспійського та Чорного морів, звідки далі повільно

поширювався. Першочергово він розповсюджувався перелітними птахами, потім людиною, починаючи з кам'яного віку. Hedrick описує ареал поширення черешні від материкової частини Європи до Далекого сходу Росії та півночі Індії, з численними локаціями в Каспійсько-Чорноморському регіоні [72, 102, 111].

Базове число хромосом ( $x$ ) в роді *Prunus* становить 8 [108]. Черешня є диплоїдним видом із набором хромосом  $2n = 16$ . У черешні відомі також триплоїди ( $2n = 3x = 24$ ; *P. avium* var. *nana* Bean, або *P. avium* 'Nana') та тетраплоїди ( $2n = 4x = 32$ ) [50, 51, 170, 233]. Відомо чимало анеуплоїдних сортів черешні (Noble, Schmidt, Emperor Francis, Napoleon, Black Eagle та ін.), що мають від однієї до трьох надкомплектних хромосом ( $2n = 17, 18, 19$ ) [50]. Darlington відмічав, що анеуплоїди були виявлені як у культивованих сортів, так і у дикорослих форм та є досить поширеними. В більш пізніх дослідженнях повідомлялось про триплоїди, виявлені в популяціях дикої черешні з Бельгії, Франції, Німеччини, Іспанії та в сортів із Туреччини [37, 53, 90, 176]. Триплоїдність дикої черешні Gardeline та десяти інших форм французького походження було встановлено після дослідження мікросателітних локусів, S-локусу та підтверджено цитофлуориметрично [176].

Розмір геному ( $2C$ ) черешні в ранніх дослідженнях [8] було оцінено методом проточної цитометрії на рівні 0.70 пг, або 338 млн. нп, вишні – 1.24 пг, 599 млн. нп та дюків – 1.42 пг, 685 млн. нп. За останніми результатами оцінки [125] методом проточної цитометрії розмір геному черешні складає біля 0.73 пг, вишні – біля 1.42 пг, *P. fruticosa* (тетраплоїд) – 1.31 пг, *P. × eminens* (тетраплоїд) – 1.34 пг, *P. × mohacsyana* (триплоїд) – 1.02 пг. На молекулярному рівні розмір геному черешні наразі оцінюють близько 380 млн. нп [181].

На сьогодні існує чимало підходів для секвенування як рослинного геному, так і транскриптому: (1) пряме секвенування за Сенджером; (2) масове паралельне секвенування, другого або нового покоління (next-generation sequencing, NGS DNA-seq), зокрема, повногеномне секвенування (whole genome sequencing, WGS) та секвенування транскриптому, тобто сукупності мРНК, NGS-методами (NGS RNA-seq); секвенування зразків ДНК з використанням векторів, напр. бактеріальних штучних хромосом (bacterial artificial chromosomes, BAC); пошукове секвенування

геному (genome survey sequencing, GSS); секвенування експресованих послідовностей (expressed sequence tags, ESTs) та ін. [141, 161, 167].

Секвенування експресованих послідовностей (кДНК) в один прохід (single-pass) з подальшим аналізом випадкових клонів із кДНК бібліотеки мало місце в дослідженні різних плодових культур. Даний метод (EST) було використано в ряді досліджень черешні [32-34, 78] для ідентифікації генів, аналізу їх диференційної експресії, створення великих наборів клонів для ДНК-мікрочіпів (DNA microarrays) та пошуку MC і SNP-маркерів [212].

Раніше було кілька повідомлень з різних наукових центрів про секвенування геному (NGS DNA-seq) черешні методом секвенування нового покоління, проте детальні результати так і не були повністю опубліковані. В одному з них [155] було просеквеновано біля 60% (204 млн. нп) геному сорту Big Star та проведено вирівнювання послідовностей розміром біля 105 млн. нп (~51% отриманої послідовності) із геномом персика. Ідентичність порівнюваної послідовності з геномом персика склала більше 80%, що свідчить про високий рівень подібності геномів черешні та персика [155].

Зовсім нещодавно стало відомо про завершення повногеномного (NGS DNA-seq) секвенування черешні (<http://cherry.kazusa.or.jp/>) [181]. Поточна версія отримала назву PAV\_r1.0. Було просеквеновано 272.4 млн. нп (77.8%) геному сорту Satonishiki, а розмір всього геному оцінюється біля 352.9 млн. нп Решта 97 млн. нп послідовні представлені послідовностями збагаченими повторюваними елементами та мають розмір <1,000 нп. Для вивчення поліморфізму було проведено часткове секвенування (re-sequencing) геному шести японських сортів черешні Benikirari, Benisayaka, Benishuho, Benitemari, Beniutaka та Nanyo. Було виявлено 1,016,866 SNP та 162,402 інсерцій/делецій, з яких 0.7% мутацій виявились мовчазними. Вміст GC пар склав 37.7%. На повторювані послідовності (такі як транспозони та ретротранспозони) у PAV\_r1.0 припало 43.8% (119.4 млн. нп) геному. За результатами оцінки розмірів псевдомолекул (хромосом), на першу пару припало 15.3% генетичної інформації, 2 – 8.9%, 3 – 8%, 4 – 9.5%, 5 – 6%, 6 – 8.5%, 7 – 7%, 8 – 7.2%, сумарно 70.4% геному PAV\_r1.0 [181].

## 1.2. Молекулярні маркери: основні типи та галузь їх застосування

Для ідентифікації та аналізу генетичної відмінності між різними сортами черешні традиційно використовують виключно фенотипові характеристики. Морфологічний аналіз є швидким та простим, і тому широко використовується для визначення та опису спадкових ознак через фенотипування. Проте, фактори навколишнього середовища впливають на фенотипові ознаки та можуть підвищувати мінливість господарсько-цінних характеристик, що погіршує надійність методу [255]. Для подолання цих труднощів широко використовують молекулярні методи основані на аналізі ДНК: RAPD, AFLP, ISSR, SSR, SNP та ін. В результаті чого покращується характеристика спадкових ознак та оцінка генетичного різноманіття [72, 115].

Вибір маркерної системи для виконання конкретного завдання залежить від мети дослідження та простоти виконання [205]. Оптимальні маркерні системи дають відтворювані результати, недорогі у використанні, інформативні, кодомінантні, з високим рівнем поліморфізму, прості для аналізу [135]. Залежно від хімічної природи маркерів, системи молекулярного маркування можуть бути поділені на білкові (запасні білки, ізоферменти) та ДНК-маркерні системи (гібридизаційні ПДРФ-методи та ПЛР-методи) .

### 1.2.1. Мультилокусні молекулярні маркери

**Ізоферментні маркери** (*Isoenzymes*). Ізоферменти є різними молекулярними формами одного ферменту. Ізоферментні маркери використовували для покращення ефективності селекційних програм, з'ясування зв'язку з господарсько-цінними ознаками та встановлення родинних зв'язків в підроді *Cerasus*. Зокрема, використовуючи ізоферментні маркери вивчались популяції дикої черешні [77], сорти черешні та вишні [30], *P. mahaleb* L., *P. fruticosa* Pall., *P. gondounii* Redh., *P. serrulata* Lindl., підщепи Gisela 5, Gisela 6, MaxMa, Colt [49], гібридне потомство *P. avium* 'Napoleon' × *P. incisa* E621 та × *P. nipponica* F1292 [26].

**ПДРФ-маркери** (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*). За допомогою методу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів проводили картування і пошук локусів кількісних ознак в гібридному потомстві вишень

Rheinische Schattenmorelle × Érdi bőtermő. Використовуючи метод ПЛР-RFLP вивчалась різноманітність хлоропластної ДНК (хлДНК) у популяції дикої черешні [138], сортів черешні та вишні [148], з'ясовувалась їх спорідненість та походження хлДНК вишні. Із застосуванням методу ПДРФ були створені одні з перших генетичних карт вишні, проводились дослідження QTL господарсько-цінних ознак вишні [219, 220]. Перевагою методу є кодомінантний тип успадкування маркерів.

**RAPD-маркери** (*Random Amplified Polymorphic DNA*). До цієї групи відносяться маркери, засновані на ПЛР із застосуванням олігонуклеотидних праймерів з довільною, випадковою послідовністю. В даному методі використовується, як правило, тільки один праймер, що зв'язується з ДНК в двох різних коротких ділянках інвертованих повторів. Як наслідок, при ПЛР ампліфікуються анонімні фрагменти з, як правило, унікальною послідовністю ДНК, що знаходиться між цими повторами [135]. Даний метод активно використовувався при дослідженні генетичного різноманіття, зокрема, для маловивчених таксономічних груп [249]. Застосовуючи RAPD-аналіз була створена перша генетична карта черешні [190], вивчались дикорослі види підроду *Cerasus* [39, 225]. Цей метод також було використано для з'ясування спорідненості та ідентифікації сортів плодових культур, зокрема, черешні [121, 139], міжвидових гібридів та форм дикорослих видів підроду *Cerasus*, які використовують у якості підщеп [120]. Недоліком цього методу є домінантний тип успадкування RAPD-маркерів, проблеми з відтворюваністю та інтерпретацією результатів, через що на сьогодні метод втратив актуальність.

**AFLP-маркери** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Маркери цього типу використовуються при дослідженні поліморфізму геному в цілому. Суть цього методу полягає у обробці певною рестриктазою геномної ДНК із наступним лігуванням отриманих фрагментів зі специфічними олігонуклеотидними адаптерами. Отримані продукти використовують в якості матриці для проведення ПЛР-ампліфікації із міченими праймерами. При застосуванні різних комбінацій праймерів даним методом можна проаналізувати значну кількість локусів. AFLP-маркери часто успадковуються як тісно зчеплені кластери в центромерній чи теломерній ділянці хромосом, хоча іноді спостерігається успадкування маркерів

незалежно від цих ділянок [135, 249]. Метод широко використовувався для встановлення філогенії в роді *Prunus* [6, 196], популяційних дослідженнях [52], ідентифікації сортів плодових культур, зокрема, черешні [81, 188, 197, 230]. Перевагою методу є досить широкий спектр фрагментів ДНК та відносно великий відсоток поліморфних локусів.

**ISSR-маркери** (*Inter-Simple Sequence Repeat, inter-SSR*). Метод є RAPD-подібною маркерною системою, що не потребує інформації про послідовність геному. Він передбачає ампліфікацію анонімних послідовностей ДНК розміщених між інвертованими повторами мікросателітів. В цьому методі використовується один (або декілька) праймер із селективними нуклеотидами (“якір”) на одному з кінців. ISSR-маркерам властивий домінантний тип успадкування та більш висока точність і відтворюваність порівняно з RAPD-маркерами. Водночас локалізація ампліфікатів в геномі, як і їх функція залишаються невідомими [135, 243, 246]. Цей метод продемонстрував високі дискримінаційні можливості для профілювання геномів *Rosaceae*, його також використовували для встановлення філогенії в роді *Prunus* [39, 205], пошуку зв’язків між ISSR-маркерами та господарсько-цінними ознаками [39, 72], ідентифікації сортів різних культур, в тому числі таких кісточкових порід як алича (*P. cerasifera*), слива звичайна (*P. domestica*), абрикос (*P. armeniaca*), плумкот (*P. domestica* × *P. armeniaca*), *C. prostrata* [205], вишня [140] та черешня [72, 122].

**IRAP-маркери** (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*). В даному методі проводиться ПЛР-ампліфікація між інвертованими праймерами (праймером) комплементарними до двох поряд розміщених LTR-ретротранспозонів. Метод має кілька варіантів: 1) використовується один праймер, а два інвертовані LTR з прямою послідовністю (тобто, в одному ланцюгу 5'-кінець одного направлений до 3'-кінця іншого), або два LTR із різних ретротранспозицій, розміщені інвертовано; 2) використовується два праймери до інвертованих LTR – один з 5'-кінця, інший з 3'-кінця LTR, орієнтовані в різні сторони від ретротранспозону, а сусідні LTR розміщені як довгі прямі повтори; 3) праймери до LTR із різних ретротранспозонів в різній орієнтації. Для IRAP-маркерів характерний домінантний тип успадкування [135, 243].

### **REMAP-маркери** (*Retrotransposon - Microsatelite Amplified Polymorphism*).

Маркери даного типу отримують використовуючи для ампліфікації праймер до ділянки LTR-ретротранспозону та праймер до 3'-кінця ділянки простого MC повтору (ISSR-праймер). В цьому випадку розміщення ампліфікованого фрагменту транспозону "заякорюється" через використання праймера до MC локусу. Таким чином, одночасно можуть ампліфікуватись послідовності трьох різних типів: фрагменти розміщені між локусами LTR та мікросателіту (переважно), між двома мікросателітами та між двома ретроелементами. REMAP-маркери демонструють домінантний тип успадкування [135, 243].

#### **1.2.2. Монолокусні молекулярні маркери**

**Мікросателітні (MC) -маркери** (*Simple Sequence Repeat, SSR*; також *STMS, STR*). Мікросателіти широко розповсюджені в усіх без винятку еукаріотичних геномах. З огляду на ряд переваг над іншими типами маркерів вони найчастіше використовуються для дослідження спадкових ознак. Маркери MC локусів є високоефективними через їх простоту аналізу, відтворюваність, кодомінантний характер успадкування та високий рівень поліморфізму, хороші дискримінаційні можливості. MC маркери характеризуються відмінністю багатьох алелів через варіацію кількості повторюваних одиниць (мотивів), що зазвичай являють собою короткі 1~6-нуклеотидні послідовності ДНК. Розміщені вони по всьому геному та переважно перед генами та між ними [135]. Обмеженням даного методу є те, що його можливо використовувати тільки для рослин з великим відсотком розшифрованості геному, оскільки для конструювання праймерів потрібно знати послідовність ДНК, яка межує з зоною мікросателіту [249].

Метод активно використовується для ідентифікації сортів (генетичного профілювання) [72, 188], встановлення філогенетичних зв'язків [80], створення генетичних карт [46, 106], пошуку локусів кількісних та якісних ознак [226], в популяційній генетиці як дикорослих, так і культивованих рослин, зокрема, черешні. На основі фагової бібліотеки геномної ДНК черешні сорту Валерій Чкалов було створено серію із 15 мікросателітних маркерів UCD-CH [193] та 6 маркерів PMS із повторами CT, CA, GA [7, 42].



**SNP-маркери** (*Single Nucleotide Polymorphism*). Однонуклеотидні заміни є найбільш розповсюдженим поліморфізмом в геномах. Через свою поширеність і придатність для високо-роздільного гаплотипування, SNP-маркери найкраще підходять для пошуку QTL в геномі. SNP-маркери зазвичай біалельні, через що окремий SNP часто менш інформативний, ніж конкретний MC маркер. Порівняно з MC маркерами, більша кількість SNP в геномі робить їх більш придатними для цілеспрямованого дослідження поліморфізму конкретних генів [34, 106]. Високо-роздільне SNP-гаплотипування (в процесі *genotyping by sequencing*, GBS) дозволяє ідентифікацію більше двох алельних варіантів. Для виявлення SNP може бути використано ПЛР-ПДРФ (PCR-RFLP або CAPS, *Cleaved amplified polymorphic sequence*) метод та ряд інших. Одним із оптимальних методів для виявлення SNP є HRM-аналіз (*High Resolution Melting*, HRM), який було використано для ідентифікації сортів черешні [71]. Було показано, що в родині *Prunus* одна нуклеотидна заміна зустрічається в середньому кожних 598 нп, частіше в некодуючих (один SNP на 390 нп), ніж в кодуючих послідовностях (один SNP на 1850 нп) [167].

**Генотипування через секвенування** (*Genotyping-by-Sequencing*, GBS) – це новітній метод, який передбачає використання NGS для отримання первинної нуклеотидної послідовності ДНК та подальшого генетичного профілювання. Метод дозволяє виявляти гомоплазію навіть у великих масивах даних та забезпечує високий рівень відтворюваності отриманих результатів. З метою профілювання можуть використовуватись як MC, так і SNP-маркери знайдені в нуклеотидних послідовностях. Порівняно із традиційними підходами для ідентифікації MC маркерів, GBS забезпечує низьку вартість ідентифікації одного маркера з меншими затратами часу та отриманням більшої кількості даних високої якості [11, 79, 161, 214]. В одному з останніх досліджень було показано, що велика частка гомоплазії (32%) свідчить, що алельне різноманіття в дослідженнях на основі розмірів MC маркерів є суттєво недооціненим [214].

Часткове повногеномне секвенування (NGS DNA-seq, re-sequencing) з низьким покриттям (*low-coverage*) 16 сортів черешні та 8 сортів вишні дозволило виявити >368 000 SNP-маркерів. В підсумку було створено панель RosBREED 6K

cherry SNP array v1, до якої увійшли 5 960 SNP-маркерів. GBS-профілювання з використанням даної панелі маркерів 269 генотипів черешні та 330 генотипів вишні продемонструвало поліморфність 1 825 SNP-маркерів у черешні та 2 058 у вишні, відповідно [151].

В нещодавніх публікаціях метод NGS DNA-seq був використаний не лише для генетичного профілювання, але й для повногеномного вивчення генетичного різноманіття [86], створення високороздільних генетичних карт [79, 106], повногеномних досліджень асоціацій (genome-wide association studies, GWAS), картування QTL, генів господарсько-цінних ознак [12, 38] та високо-роздільного гаплотипування [38, 106, 151] сортів черешні (в т. ч. сорту Крупноплідна). У кількох дослідженнях було проведено NGS RNA-seq з метою отримання панелі експресії генів для функціональних досліджень та пошуку генів-кандидатів [3, 117]. В іншому дослідженні [107] з використанням NGS RNA-seq було просиквеновано транскриптоми двох сортів черешні (Bing і Rainier), виявлено 2243 'імовірних' (putative) SNP-маркери та проведено HRM-аналіз важливих батьківських форм черешні.

### **1.3. Маркер-опосередкований добір в селекції сортів черешні та управління генетичними ресурсами**

Лауреат нобелівської премії миру Dr. Norman E. Borlaug вказував на те, що сучасна геноміка та досягнення в біотехнології зроблять великий вклад в медицину та охорону здоров'я, а також забезпечать можливість другої Зеленої Революції (2nd Green Revolution), що наступить після поєднання сучасних наукових продуктів та методологій із традиційними селекційними прийомами [23, 161].

Традиційна стратегія селекційних схем багаторічних культур має ряд недоліків, серед яких потреба у великих площах насаджень, висока вартість та розтягнутість у часі [237]. Тривалість селекційного процесу від схрещування до створення сорту в родині Rosaceae може коливатись в межах 12-20 років. Зважаючи на ці обставини, впровадження молекулярних підходів для пришвидшення відбору генотипів вважають ключем до покращення ефективності селекційних програм [136, 161].

Наприклад, в селекції яблуні традиційними методами період від насінини до отримання перших плодів із сіянця зазвичай займає п'ять-сім років, тоді як при використанні SNP-маркерів (за GBS) бажані генотипи можуть бути відібрані за термін близько двох років [161]. Серед плодових культур третьою по значимості культурою є персик, після яблуні та груші. Щороку в світі створюють біля 100 сортів персика, що свідчить про високі темпи селекції цієї культури. Водночас, через невеликий розмір геному (близько 265 млн нп) та швидкий вступ у плодоношення (близько трьох років) персик став модельним об'єктом для селекції плодових культур сучасними, в т. ч. NGS-методами. Над цією культурою зараз продовжується як активні молекулярні дослідження (напр. в 2013 р. стала доступною вся послідовність геному персика (NGS DNA-seq) [218], одне за одним публікуються численні відкриття генів та алелів господарсько-цінних ознак), так і сучасні селекційні програми із впровадженням результатів молекулярних досліджень [11].

Молекулярні маркери (напр., ПДРФ-маркери чи ін.) непридатні для безпосереднього виявлення та оцінки ефектиності QTL, але можуть використовуватись в якості непрямого критерія при селекції для генетичного покращення конкретної кількісної ознаки. Добір, що ведуть таким способом було названо маркер-опосередкованим (marker-assisted selection, MAS), а селекційний процес (marker-assisted breeding, MAB). В основі методу лежить кореляція між фенотиповою ознакою та молекулярним маркером, що був виявлений та є результатом нерівномірного зчеплення (linkage disequilibria, LD) між локусом кількісної ознаки та локусом маркера. На практиці безпосередньо молекулярні дані є допоміжними, а через високу вартість їх отримання, доцільним вважається їх використання при дослідженні найважливіших господарсько-цінних ознак [141].

Водночас, Greenpeace вже тривалий час позиціонує MAS (син. Selection with Markers and Advanced Reproductive Technology, SMART breeding) як неінвазійну альтернативу генно-інженерним біотехнологічним методам [211].

Було показано [116], що відносна ефективність індексу селекції при поєднанні фенотипових та молекулярних даних в оптимальному варіанті є функцією успадкування ( $h^2$ ) ознаки та частки ( $p$ ) адитивних генетичних варіацій

ознаки, що асоційована із локусом маркера. Ефективність в такому випадку дорівнює одиниці при  $h^2 = 1$ , а фенотип ідеально відображає рівень селекції. Проте для ознак з низьким рівнем успадкування ефективність може бути значно вищою через високе значення  $p$ . Це означає, що маркерні дані можуть мати велике значення, якщо велика частка адитивних генетичних варіацій асоційована з маркерами. Ефективність максимальна при  $p = 1$ , складає  $1/h$  та суттєво зростає при надзвичайно малих значеннях  $h$ . В такому випадку все значення індексу селекції залежить від молекулярних даних. Доведено ефективність добору навіть виключно на основі молекулярних даних. Про це свідчить, що при  $p > h^2$ , добір лише на основі маркерних даних є більш ефективним, ніж індивідуальний фенотиповий добір [141].

На першому етапі MAS пріоритетним є селекція потомства отриманих сіянців (marker-assisted seedling selection, MASS) з використанням молекулярних маркерів до основних генів господарсько-цінних ознак з переліку обов'язкових ('must-have traits') як напр., стійкість до шкідників та хвороб, колір м'якоті, карликовий габітус у підщеп чи ін. Такий підхід дозволяє суттєво зменшити кількість сіянців, що пройдуть селекцію та створять гібридну популяцію, підвищують рівень і успішність селекції [161].

В розвинених країнах сьогодні окрім вже звичних MAS та MAB застосовують також MABC (marker-assisted backcrossing), пірамідування генів (marker-assisted gene pyramiding), MARS (marker assisted recurrent selection) та повногеномну чи геномну селекцію (genome-wide or genomic selection, GS) [161].

Розвиток методів молекулярного ДНК-маркування радикально змінив підходи до ідентифікації, визначення спорідненості сортів, оцінювання генетичного різноманіття, картування генів, пошуку сортів-донорів господарсько-цінних ознак в селекції і генетиці культурних рослин [21, 29, 115, 250]. На даний момент молекулярні методи все ширше застосовують як у селекції, так і при створенні та управлінні генетичними банками [74]. До основних напрямків використання молекулярних маркерів при роботі з генетичними ресурсами рослин відносять наступні:

- інтродукція генетичних ресурсів рослин через пошук нового різноманіття;
- виявлення внутрішньовидових зв'язків та з'ясування міжвидових відносин;
- аналіз спорідненості видів та генотипів для найбільш ефективного підбору батьківських пар при гібридизації;
- контроль генетичної стабільності клонів при розмноженні *in vitro*;
- захист авторських прав: ідентифікація та реєстрація джерел і донорів цінних ознак; вирішення спірних питань авторства сортів і форм рослин.

Для захисту авторських прав зі сторони міжнародних організацій було прийнято ряд нормативних документів та рекомендацій щодо застосування біохімічних та молекулярних методів (в т. ч. генетичне профілювання) для ідентифікації сортів. Декілька стандартів та рекомендацій прийнятих Міжнародним союзом з охорони нових сортів рослин (International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV) розширюють традиційне випробування на відмінність, однорідність та стабільність (Distinctness, Uniformity and Stability, DUS-тест) та регламентують використання молекулярних маркерів для захисту прав селекціонерів [208-210]. Однак детальні рекомендації стосуються переважно зернових та олійних культур, а також троянд. Щодо генетичного профілювання кісточкових культур, UPOV було опубліковано лише кілька рекомендацій щодо генотипування сортів персика з використанням МС маркерів [206, 207]. Активну діяльність в управлінні колекціями, зокрема, плодових культур взяла Європейська спільна програма з генетичних ресурсів рослин (European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources, ECPGR). Для гармонізації генетичного профілювання колекцій черешні та вишні було запропоновано стандартний набір генотипів та МС маркерів для їх однозначної ідентифікації (табл. В.1) [48]. Через деякі обмеження рекомендованого переліку МС маркерів було запропоновано альтернативну панель для ідентифікації сортів вишні [114]. Подібні рекомендації були прийняті ECPGR також для ряду інших плодових культур.

Додаткової значимості генетичне профілювання культивованих сортів набрало після прийняття нових стандартів в управлінні банками генетичних

ресурсів кісточкових культур. В цьому стандарті, прийнятому в січні 2016 року, стає обов'язковим наведення «молекулярних характеристик» сорту, а також верифікація ідентичності сортозразка, що підтримується в колекції. Оновлені таким чином паспорти із морфологічними описами, фотографіями та ін. даними зберігаються у базах даних (EURISCO та European *Prunus* Database) [74].

В одній із нещодавніх публікацій [41], використовуючи SNP-маркери досліджувались 210 генотипів черешні (ландрас, сортів ранньої та сучасної селекції) різного походження, що підтримуються в Центрі генетичних ресурсів кісточкових культур INRA. Прояснення генетичного різноманіття, нерівномірності зчеплення (linkage disequilibrium, LD) та популяційної структури вважається критично важливим для ефективно організації і використання генетичних ресурсів. Зокрема, одним із завдань дослідження була ідентифікація базової колекції ('core collection') для пошуку асоціацій між маркерами та господарсько-цінними ознаками черешні. Подібні дослідження, переважно із використанням MS маркерів є численними та дозволяють одночасно досягти кілька цілей. Зокрема, провести ідентифікацію генотипів, з'ясувати їх генетичну спорідненість, приналежність до певних генетичних груп чи пулів та водночас можуть бути використані для упорядкування генетичних ресурсів.

#### **1.4. Локуси кількісних та якісних (менделівських) ознак у черешні**

Селекція черешні на сучасному рівні проводиться за найважливішими кількісними (quantitative trait loci, QTL) та якісними (Mendelian trait loci, MTL) характеристиками. До якісних (моно- та олігогенних) ознак у черешні відносять такі як самоплідність та самобезплідність, колір м'якоті, соку й екзокарпу, альбінізм, карликовість габітусу, стійкість проти борошнистої роси. Поряд з іншими кісточковими культурами переважна більшість господарсько-цінних ознак у черешні є кількісними (полігенними) і мають складне успадкування [58, 167]. До кількісних ознак у черешні відносять такі, як сила росту, швидкоплідність, строки цвітіння і дозрівання плодів (ранньо-, пізньостиглість), їх величина та біохімічні показники, урожайність, сила утримання плодів на плодоніжках, стійкість проти розтріскування плодів, бактеріального раку та ін. [28, 133, 143, 199, 228].

Кількість відомих локусів (QTL та MTL) зчеплених із господарсько-цінними ознаками відображає економічну важливість кісточкових культур. Найважливішою культурою є персик та споріднені міжвидові гібриди (498 QTL/MTL), менш дослідженими відповідно є абрикос (142 QTL/MTL), мигдаль (90 QTL/MTL), черешня та вишня (21 QTL/MTL) та слива і споріднені міжвидові гібриди (9 QTL/MTL) [167].

#### 1.4.1. Морфологічні та фізіологічні ознаки

Головною метою досліджень в цьому напрямку є зменшення розмірів дерева, самоплідність, покращення якості плодів та урожайності [169]. Для полегшення вивчення генетики габітусу черешні Sansavini визначив три класи: компактні, спурові (шпорцеві) та стандартні крони. Компактний і спуровий габітуси контролюються багатьма рецесивними генами, оскільки схрещування між класами призводить переважно до утворення стандартної крони [88].

*Самоплідність та самобезплідність.* Черешня є аллогамною. Як і в інших представників родин Розові запилення контролюється системою гаметофітної самонесумісності (ГСН; gametophytic self-incompatibility). Ця система генетично детермінована одним мультиалельним локусом (*S*) з двома генами, що кодують специфічні детермінанти (у стовпчику маточки та пилкових зернах) реакції самонесумісності. Запліднення у видів із ГСН відбувається лише тоді, коли *S*-алелі, що експресуються у пиловій трубці та стовпчику маточки відрізняються. Якщо *S*-алель гаплоїдного пилку збігається з одним із алелів диплоїдної тканини стовпчика маточки – ріст пилової трубки зупиняється, пилок відторгається і запліднення не відбувається. У кісточкових культур (триба Amygdaleae) відомо два зчеплені *S*-локусні гени, що беруть участь у відповіді на розпізнавання несумісності – ген рибонуклеази (*S-PHKazi*) кодує компонент стовпчика маточки – основний глікопротеїн з РНКазною активністю та *SLF/SFB* (*S*-locus F-box/*S*-haplotype-specific F-box) кодує компонент пилку – білок з F-бокс мотивами [35, 53, 89, 195].

У черешні *S*-локус локалізований в шостій парі хромосом [34]. Згідно з останніми даними, в черешні ідентифіковано 33 *S*-алелі та повідомляється про 60 груп перехресної несумісності (cross-incompatibility group, CIG) культивованих

сортів [37, 126-128, 172, 173, 195]. Для черешні притаманний ауткросинг (схрещування рослин з різних ліній), який стимулюється ГСН [88]. Сукупність специфічних *S*-алелів (*S*-гаплотипів) називають *S*-генотипом. Оскільки запилення сортів із однієї групи несумісності виключене, знання *S*-генотипів сортів є економічно важливим [184]. Сорти з унікальними несумісними генотипами відносять до нульової групи. Такі сорти в насадженнях можна поєднувати з деревами, що належать до будь-якої із груп перехресної несумісності як універсальні запилювачі (напр., сорт *Moscattella* з  $S_{17}S_{21}$ ). Наразі відомо 25 сортів з унікальними комбінаціями *S*-алелів [173]. Якщо *S*-генотипи батьківських форм були, наприклад  $S_1S_2$  та  $S_1S_3$ , унеможлиблюється зворотне схрещування з одним із батьків, що ускладнює детальні генетичні дослідження [195, 199].

Самоплідність у сортів черешні є рідкісною ознакою та переважно спричинена мутантними алелями *S*-локусу  $S_3'$  та  $S_4'$  (штучно отримані), а також  $S_5'$  (природній) із порушеною функцією пилку [89, 130]. Водночас, в третій парі хромосом у сорту *Cristobalina* знайдено додатковий локус, який має відношення до самосумісності. Його роль ще повністю не з'ясована, проте детермінанти, що він кодує у пилкових зернах викликають самоплідність не зважаючи на самонесумісний *S*-генотип ( $S_3S_6$ ) [35]. У генетичних дослідженнях і селекційних програмах та при створенні промислових насаджень на сьогодні активно використовуються самоплідні сорти черешні, серед них: *Axel* ( $S_3S_3'$ ); *Lapins*, *Skeena* ( $S_1S_4'$ ); *Stella*, *Sweetheart*, *Sunburst* ( $S_3S_4'$ ); *Kronio* ( $S_5'S_6$ ); *Cristobalina* ( $S_3S_6$ ) та багато ін. [172]. Всього наразі відомо 72 самоплідні сорти черешні [173].

У самобезплідних (самонесумісних; *self-incompatible*, *SI*) видів, зокрема черешні, сорти-продуценти мають поєднуватись із запилювачами для забезпечення взаємозапилення й утворення достатньої кількості зав'язі. Недостатня продуктивність насаджень часто спричинена сортами-запилювачами, тому самоплідні (самосумісні; *self-compatible*, *SC*) сорти пріоритетні в селекції черешні [89]. Порівняно із самобезплідними сортами, самоплідні зазвичай краще забезпечують високі стабільні врожаї та легше адаптуються до широкого діапазону умов навколишнього середовища. Також самоплідні сорти можуть використовуватись як універсальні запилювачі для самобезплідних [169].



Самоплідні сорти черешні української селекції невідомі. Наразі близько 40 сортів та гібридів черешні вітчизняної селекції досліджувались за кордоном, а їх *S*-генотипи були ідентифіковані (табл. Ж.1) [85, 123, 172, 180].

*Діаметр штамбу* має прямий вплив на якість плодів та урожайність. Деревя з більшим діаметром штамбу, водночас, мають широкі кути відгалуження скелетних гілок і меншу висоту дерева. Дані сортові ознаками є важливими в агротехніці для створення високоврожайних та компактних насаджень. Використовуючи метод SLAF-seq (specific-locus amplified fragment sequencing) досліджувались QTL пов'язані із діаметром штамбу у популяції Wanhongzhu × Lapins. Було показано [221], що діаметр штамбу контролюється чотирма локусами, один QTL в LG6, два в LG7 та один в LG8, кожен з яких пояснює 15-22% фенотипової варіації ознаки. Результати дозволили припустити, що до вступу в плодоношення діаметр штамбу знаходиться під контролем QTL в LG6, а після початку плодоношення ознака переважно детермінується локусами в LG7 та LG8. SNP-маркери, що фланкують три локуси були використані для гаплотипування та ідентифікації алелів, що асоційовані з різними фенотиповими проявами. Алелі *lm* (SLAF-marker 2808, LG7), *nn* (2473, LG7) та *lm* (3614, LG8) асоційовані із найбільшими значеннями діаметру штамбу [221].

#### **1.4.2. Властивості плодів**

Серед характеристик плодів, основна увага приділяється розміру, зовнішньому вигляду, забарвленню екзокарпу, смаковим якостям, біохімічним показникам (вміст сухих розчинних речовин, титрована кислотність, рН та ін.) і тривалості зберігання. Ці ознаки переважно обумовлені генотипом, проте на їх прояв значною мірою впливають ґрунтово-кліматичні умови, сорто-підщепні комбінування та агротехнічні заходи [169, 226].

*Маса плодів.* Морфологічно культурна і дика черешні дуже схожі, зокрема, формою плодів. Найбільш вагомою зміною, що відбулася в процесі одомашнення є збільшення розміру плодів. Діаметр плодів черешні є важливим фактором у виборі споживача та основною складовою при формуванні ціни [169]. Встановлено, що основним чинником, який впливає на діаметр та масу плодів черешні є кількість

клітин мезокарпу [54, 226]. Діаметр плодів черешні є кількісною ознакою, що ускладнює її аналіз з використанням методів класичної генетики [226].

На сьогодні відомо вісім локусів (в LG (linkage group) 1-3, 5, 6) кількісних ознак (QTL, Quantitative Trait Loci), які мають адитивний вплив на масу плодів. При цьому, найбільший інтерес становлять локалізовані в LG2 та LG3 локуси *FW\_G2a*, *FW\_G2b* та *FW\_G3* [40, 54, 166]. Мікросателітні локуси CPSC038 та BPPCT034 розміщені на відстані 10.9-14.9 сМ один від одного та окреслюють локус *FW\_G2a* [166]. Для даних мікросателітів було вперше показано асоціацію із масою плодів у черешні [226], відтоді вони набули широкого застосування в маркер-опосередкованій селекції. Позитивним вважається гаплотип (розміри МС алелів у нп) 190/255 (Q/Q), небажаними вважаються гаплотипи 204/235 (q/Q), 192/223 та 192/225 (q/q) [226].

Згодом, в локусі *FW\_G2a* було виявлено ген *PavCNR12*, який є представником родини регуляторів кількості клітин (*FW2.2* або *CNR*, Cell Number Regulator). Відомо три його алельні варіанти: *PavCNR12-1*, *PavCNR12-2* та *PavCNR12-3*, що мають 14 поліморфних нуклеотидів в некодуючих ділянках [54]. Варіації у нуклеотидній послідовності гена *PavCNR12* у черешні можуть використовуватись для пошуку гомозигот по алелю *PavCNR12-1*, оскільки такі рослини демонструють на 9-16% більшу масу плодів. Відповідно, генотипи із алелями *PavCNR12-2* та, особливо, *PavCNR12-3* є небажаними [54]. Оскільки алель *PavCNR12-1* недостатньо закріплений в сортименті, генотипування існуючих сортів черешні по алелям *PavCNR12* має практичне значення для цілеспрямованої маркер-опосередкованої селекції.

*Забарвлення плодів.* Колір екзокарпу і самого плоду у черешні варіює від жовтого та рум'яного до темно-червоного. Колір плодів залежить від метаболізму антоціанів та значною мірою визначається на транскрипційному рівні через фактори транскрипції, які регулюють активність численних структурних генів. Успадкування кольору плодів у черешні вивчається вже тривалий час, проте генетичні та молекулярні основи регуляції залишались мало зрозумілими [97, 150]. Було показано, що на формування забарвлення впливають транскрипційні фактори типу R2R3-МҮВ, зокрема, РаМҮВА1, РаМҮВА2, РаМҮВА3 та ін. [2, 119, 150].

Використовуючи AFLP-, SRAP та MC маркери проводили пошук QTL пов'язаних із кольором екзокарпу та ендокарпу [185]. Мажорний QTL асоційований із кольором плодів було виявлено в LG3, мінорні QTL було виявлено в LG6 та LG8. Водночас, в якості гена-кандидата (CG, candidate gene) із LG3 було запропоновано *PavMYB10*. Виявлені два алельні варіанти *PavMYB10* відрізняються одонуклеотидними замінами у промоторній ділянці [185]. Згодом, у сортів із білим забарвленням плодів було виявлено велику інсерцію в одному з алелів *PavMYB10*. Вважається, що інсерція та невеликі зміни в послідовності промотора *PavMYB10* є причиною низької експресії цього гена в сортів із білими плодами [223]. Нещодавно в LG3 було описано два гени *PavMYB10.1* (syn. *PavMYB1* та *PavMYBA*) та *PavMYB10.2* (syn. *PavMYB10*) [97], які експресуються у сортів із темно-червоними плодами (Lapins) та сортів із рум'янцем (Rainier) та відсутні у сортів із жовтими плодами (Big Dragon). В обох генів *PavMYB10.1* було описано по три алельні варіанти *a*, *b* та *c*. Ген *PavMYB10.1* контролює експресію *PavANS* та *PavUFGT* і регулює таким чином накопичення антоціанів. На відміну від попереднього, експресія *PavMYB10.2* не корелює із накопиченням антоціанів. На основі комбінацій алелів *PavMYB10.1* автори публікації [97] розділили досліджені сорти на три групи: із жовтим забарвленням плодів (*c/c*), із рум'янцем (*b/b* та *b/c*) та червоним забарвленням (*a/a*, *a/b* та *a/c*). Для використання в маркер-опосередкованій селекції було запропоновано MC локус *Pav-R<sub>f</sub>-SSR* [168] із LG3, проте отримані результати важко інтерпретувати.

*Концентрація сухих розчинних речовин та титрована кислотність.* До сухих розчинних речовин (вимірюється в градусах Brix, °Bx) відносяться: вуглеводи, кислоти, азотисті сполуки, ферменти, розчинні форми пектинів та вітамінів, дубильні речовини та ін. фенольні сполуки, мінеральні солі та ряд невідомих сполук. Вміст сухих розчинних речовин, титрована кислотність, фенольні сполуки, співвідношення цукрів та кислот визначають смакові якості кожного сорту [169]. Використовуючи SNP-маркери проводили пошук QTL пов'язаних із вмістом сухих розчинних речовин та титрованою кислотністю. Мажорні QTL асоційовані із вмістом сухих розчинних речовин було виявлено в

LG2, LG4 та мінорний QTL на LG7. Локуси пов'язані із титрованою кислотністю було виявлено в LG2, LG4 та LG6 [229].

В іншому дослідженні [160] із застосуванням SNP-маркерів було виявлено три QTL, асоційовані із показниками рН та титрованої кислотності. Найбільш стабільний QTL було виявлено в LG6, що пояснює 24.6% варіації (percentage of explained variation, PEV, %) показників рН та 28.3% показників титрованої кислотності (популяція Regina × Lapins). Два мажорних QTL, асоційованих з концентрацією фруктози було виявлено в LG1 та LG4, що пояснюють відповідно 14.4-20.4% та 36.4% варіації (популяція Fercer × INRA-X). Виявлено один QTL в LG3 асоційованих з концентрацією сахарози; два QTL пов'язані із з концентрацією глюкози, мажорний QTL в LG1 пояснює 20.3% (популяція Fercer × INRA-X) та один мінорний в LG4; шість QTL асоційованих із концентрацією сорбітолу з мажорним QTL в LG4, що пояснює 17.3% варіації (популяція Fercer × INRA-X); сім QTL асоційованих із концентрацією яблучної кислоти з мажорним QTL в LG6, що пояснює 30.8% (популяція Regina × Lapins) та 31% варіації (популяція Fercer × INRA-X) [160].

*Щільність плодів* – це одна з ознак, що найбільше цінується, забезпечує краще дозрівання плодів, вищу транспортабельність, триваліший термін зберігання, придатність для холодильного зберігання і експортну цінність [169]. Використовуючи MC та SNP-маркери проводили пошук QTL щільності плодів черешні та генів-кандидатів, що пояснюють високий відсоток фенотипової варіації. Пов'язані з ознакою локуси були виявлені на всіх хромосомах, проте найстабільнішими є QTL виявлені на другій парі хромосом (LG2), які контролюють до 20% варіації (популяція Regina × Lapins) та в LG5, локус *ff5.2* – до 24.1% варіації (популяція Regina × Garnet). Водночас в LG2, LG5 та LG6 було виявлено колокалізацію QTL пов'язаних із масою та щільністю плодів, що імовірно є проявом одомашнення [40, 158]. Подібні результати було отримано в іншому дослідженні [20], де використання SNP-маркерів дозволило виявити три QTL щільності плодів в LG2. Дані SNP-маркери були використані для пошуку асоціацій (marker-locus-trait associations) із трьома параметрами щільності плодів (виражено щільні, помірно-щільні та м'які) та ідентифікації функціональних гаплотипів. В

нещодавньому дослідженні один мажорний QTL щільності плодів було знайдено в LG1 та підтверджено в LG6 [12].

*Сила утримання плодів на плодоніжках.* Успішність механізованого та напівмеханізованого збирання плодів залежить від здатності плодів до утримання на плодоніжках. Розвиток механізованого збирання плодів черешні стимулював селекцію сортів, що б поєднували низьку силу утримання плодів на плодоніжках та високу якість плодів (напр. сорт Sentennial) [228]. З нещодавнього досліджень відомо, що PFRF є кількісною ознакою. Припускається, що PFRF успадковується аддитивно, а сильна епістатична генна взаємодія спричинює варіації. Показано, що на PFRF в значній мірі впливають як генетичні, так і фактори навколишнього середовища. Сіянци  $F_1$  (напр. Lapins  $\times$  Chelan) мають нижчу силу утримання плодів, ніж батьківські сорти. Ознаки якості плодів та PFRF успадковуються незалежно. Вищесказане підтверджує можливість отримання в ході селекції сортів черешні із низькими значеннями сили утримання плодів та їх високою якістю [228].

### **1.4.3. Фенологічні властивості**

Зміни клімату вважаються однією із найбільших проблем 21 століття. Згідно четвертого оцінюючого звіту Міжурядової групи експертів з питань змін клімату (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) протягом останнього сторіччя середня температура на Землі зросла на  $0.74 \pm 0.18^\circ\text{C}$  та подальшою тенденцією зростання [43]. Таке зростання температури створює ризик для виробництва плодів деревних порід у регіонах із помірним та субтропічним кліматом протягом наступних десятиліть. Цей ризик пов'язаний із нестачею адаптованості періоду спокою та вегетаційного періоду до майбутніх кліматичних умов, що переважно представлені зростанням частоти весінніх заморозків та нестачею необхідного періоду з низькими температурами [43].

У плодівих порід помірного клімату вплив холоду взимку (потреба в холоді) та послідуєчий теплий період (потреба в теплі) навесні необхідні для цвітіння. Фенологія, особливо репродуктивної сфери, є критичною для плодівих дерев, оскільки урожайність та якість плодів прямо залежать від правильного розвитку квітки [44]. В цьому напрямку селекція спрямована на закріплення таких ознак, як

пізніє цвітіння, раннє та пізніє дозрівання плодів, їх одномірність, низька й висока потреба в холоді [169].

*Період спокою бруньки.* Строки цвітіння у багаторічних рослин критично важливі для виживання у помірнокліматичних умовах та регулюються тривалістю періоду спокою бруньки. З'ясування найбільш стабільних локусів асоційованих з датою розкриття бруньок привело до їх встановлення в LG4 та LG8 [159]. Досліджувались 79 генів-кандидатів пов'язаних із періодом спокою та цвітінням, що були виявлені в різних видів. З них, 57 генів-кандидатів виявились колокалізованими із QTL, що асоційовані із потребою в холоді, теплі чи датою цвітіння. Використовуючи SNP-маркери, 39 генів-кандидатів були картовані в популяціях Regina × Lapins та Regina × Garnet. Гени-кандидати локалізовані в найбільш значимому QTL на LG4 є багатообіцяючими для селекції сортів адаптованих до різних кліматичних умов [45].

*Строки цвітіння.* Фенологічні ознаки такі як потреба в холоді та теплі грають ключову роль у визначенні дати цвітіння та є критичними для синхронізації строків цвітіння з умовами середовища [43]. В черешні процеси цвітіння індукуються специфічними коливаннями холоду та тепла. Якщо температура стає середньою процес порушується [44]. Останні дослідження [43-45, 59] кісточкових культур (черешні, абрикоса, мигдалю та персика) показали, що потреба в холоді має значно більший вплив на дату цвітіння ніж потреба в теплі. У більшості плодових культур дата цвітіння вважається кількісною ознакою. Проведений в ряді досліджень кісточкових культур пошук QTL показав колокалізацію локусів дати цвітіння та потреби в холоді. Використовуючи SNP-маркери було виявлено один мажорний QTL асоційований із потребою в холоді в LG4, що пояснює (explained variation, EV) в середньому 17,5% фенотипових варіації (популяція Regina × Garnet). Цей же локус асоційований із датою цвітіння та контролює в середньому 21,2% (популяція Regina × Lapins) та 36,3% фенотипових варіацій (популяція Regina × Garnet). Для ознаки потреби в теплі не було виявлено стабільного QTL. Пошук генів-кандидатів дозволив виявити в цільовому локусі дві групи генів. Одна група кодує ферменти біосинтезу гібереліну, інша належить до негативних регуляторів розвитку квітки [43].

*Строки дозрівання плодів.* Термін та тривалість дозрівання плодів і як наслідок період їх реалізації є ознаками, що мають першочергову важливість для черешні. Водночас, плодоношення у регіонах із помірним кліматом відбувається протягом короткого періоду та часто не довше 5-6 тижнів у конкретній області. Серед кісточкових, черешня дозріває найшвидше, починаючи з кінця травня і до кінця липня із середнім строком дозрівання – у середині червня. З метою розширення періоду дозрівання плодів селекція спрямована на створення надранніх та дуже пізніх сортів [59, 169].

На противагу чисельним QTL строків цвітіння, у популяціях черешні, персика й абрикоса виявлено значно менше локусів асоційованих зі строками дозрівання плодів. Використовуючи MC маркери було виявлено один мажорний QTL асоційований зі строками цвітіння в LG4, що пояснює в середньому 20,4% фенотипових варіації (популяція Regina × Lapins). Мінорні локуси, що контролюють строки дозрівання плодів у черешні було також виявлено в LG1, LG5 та LG6 [59, 159]. Подальше дослідження QTL із LG4 сприяло виділенню чотирьох генів-кандидатів. Один із них є ортологом гена ERF4 (*Arabidopsis ethylene-responsive transcription factor 4*) та хорошим геном-кандидатом щодо контролю строків дозрівання плодів. Більшість ERF-генів пов'язані із дозріванням плодів чи з метаболізмом етилену і відомі у томатів, сливи, яблуні та ківі. Висувається гіпотеза про контроль строків дозрівання плодів у клімактеричних культур геном ERF4. Пояснює її, зокрема, значно сильніший прояв у персика й абрикоса (клімактеричні плодові культури), ніж у черешні (неклімактерична порода) [59].

#### **1.4.4. Стійкість до біотичних та абіотичних факторів середовища**

Загальноприйнятими напрямками в селекції є толерантність до високих температур і посухи у літній період (посухостійкість) та низьких температур узимку (морозостійкість) [194]. Проте досі недостатньо вивчені генетичні механізми, що контролюють стійкість до більшості факторів середовища. Хороша адаптивність до умов середовища конкретного сорту є результатом сукупності факторів, що включає морозо-, холодостійкість та потребу в теплі, взаємодія яких регулює різні стадії росту, зокрема – строки цвітіння і дозрівання плодів. Важливим

напрямок селекції є толерантність до водного стресу, який є причиною розтріскування плодів [10, 108, 222].

Численними є дослідження польової стійкості сортів, гібридних та дикорослих форм черешні, міжвидових гібридів та дикорослих споріднених видів, що відрізняються рівнем толерантності та стійкості (резистентності) до широкого кола збудників та шкідників і мають безпосередню цінність для селекції. Для закріплення більшості типів резистентності проводиться селекція традиційними методами [251]. Проте, практично відсутні молекулярні дані про стійкість черешні до патогенів та шкідників [88, 102, 124, 169, 194]. Водночас, молекулярна селекція деяких інших кісточкових культур виявилась більш просунутою та привела до розробки маркер-опосередкованої інтрогресії (marker-assisted introgression, MAI) генів одного виду в геном іншого [175].

*Розтріскування плодів.* Для черешні однією з найважливіших характеристикою є толерантність до розтріскування плодів. У багатьох регіонах вирощування черешні ускладнюється розтріскуванням плодів, що як правило, спричинене опадами напередодні їх дозрівання та є основною причиною втрати урожаю. За сприятливих умов, напр., у Пн. Європі, розтріскування плодів може приводити до втрати до 80% урожаю. Дана ознака є однією із найскладніших для селекції традиційними методами.

Розтріскування плодів характеризується утворенням тріщин шкірки плоду та, іноді, розтріскуванням вглиб м'якоті. Тріщини бувають різної локалізації – біля основи плодоніжки (пуповинні, лійкові), біля верхівки плоду (верхівкові, апікальні), через щок плоду (бічні) [14]. Викликане дощем розтріскування плодів є комплексним явищем і спричиняється різними факторами. Зазвичай цю проблему пов'язують із сортом, умовами вирощування, системою зрошення, підщепою, розміром плодів, осмотичним потенціалом м'якоті, сортовими особливостями шкірки та стадією розвитку плодів. Основний механізм, що спричиняє це порушення не цілком зрозумілий, так як і причина швидкого зростання поглинання плодом води. Вважається, що зростання вмісту води в плоді може бути результатом як прямої абсорбції через кутикулу екзокарпу, так і через судинну систему.



Припускають, що різні типи розтріскування можуть бути спричинені не одним процесом, а скоріше результатом різних шляхів поглинання води [14, 134].

Використовуючи MS та SNP-маркери було виявлено декілька QTL толерантності до розтріскування плодів, кожен з яких пояснював невеликий відсоток виявленої варіації [58]. Подальші дослідження підтвердили комплексний характер толерантності до розтріскування плодів. Локуси толерантності до розтріскування різних ділянок плоду були виявлені на різних парах хромосом, що підтверджує існування різних генетичних механізмів розтріскування. Було виявлено, що QTL толерантності до верхівкових та пуповинних тріщин є більш значимими, ніж QTL толерантності до бічних тріщин. Пояснюють це тим, що бічні тріщини можуть утворюватись із первинних верхівкових чи пуповинних тріщин, внаслідок чого виникає комплексне розтріскування. Найбільш значимий QTL чутливості/ толерантності до пуповинного розтріскування плодів із LG5 пояснює до 15% фенотипової варіації (популяція Regina × Lapins) в польових умовах [14, 158, 159]. Повідомлялось про можливу кореляцію між схильністю до розтріскування та концентрацією алкенів в епікутикулярному воску різних сортів черешні [159].

*Роль екзокарпу в розтріскуванні плодів.* Кутикулярна мембрана плодів черешні постійно під стресом. Із попередніх досліджень відомо, що постійний натяг кутикулярної мембрани призводить до утворення мікроскопічних тріщин. Мікротріщини послаблюють бар'єрну функцію кутикулярної мембрани, що захищає плід від патогенів та неконтрольованої втрати чи проникнення води. Стрес і натяг є результатом зупинки росту (накопичення) кутикулярної мембрани на ранніх етапах розвитку, тоді як поверхня плоду продовжує зростати. Максимум накопичення кутикулярної мембрани у сорту Regina настає приблизно на 19-й день після цвітіння та складає  $93 (\pm 5) \text{ mg/fruit d}^{-1}$  [3].

Секвенування генів (NGS RNA-Seq), що експресуються в екзокарпі плодів сорту Regina та аналіз послідовностей дозволило виявити 13 генів, що позитивно корелюють із рівнем накопичення кутикулярної мембрани [3]. Водночас, в іншому подібному дослідженні було проведено секвенування РНК (транскриптоми) екзокарпу трьох сортів (Lapins, Regina та Bing) з нормальними умовами

вирощування та в умовах водного стресу. За результатами дослідження було ідентифіковано декілька генів, що беруть участь у синтезі алкенів та причетні до розвитку тріщин [14, 182]. Перспективними для подальших досліджень вважаються гени *PaWINA*, *PaWINB*, *PaLipase*, *PaLTPG1*, *PaATT1*, *PaLCR*, *PaGPAT4/8*, *PaLACS2*, *PaLACS1* та *PaCER1*. Зниження рівня експресії декількох з них протягом розвитку плоду веде до припинення накопичення кутикули [3, 14]. Розроблено схему метаболічних шляхів компонентів кутикулярної мембрани епідермісу плодів черешні [3]. Подальше дослідження дозволило створити транскриптомну базу даних *P.avium\_v2.0*. Повногеномний аналіз засвідчив про існування тісного зв'язку між регуляцією функціонування генів (пов'язаних із транскрипційною регуляцією, транспортом цукрів, метаболізмом ліпідів) на різних етапах розвитку плоду та перебудовами в клітинній стінці [2].

Із розвитком тріщин пов'язані також механізми модифікації клітинної стінки на більш пізніх етапах протягом досягання плодів. Досягання та розм'якшення плодів є результатом комбінованої дії багатьох ферментів, зокрема: полігалактуранази (PG), пектинестерази (PE), експансинів та  $\beta$ -галактозидази [31]. Результати попередніх досліджень свідчать, що рівень транскрипції гена  $\beta$ -галактозидази коливається протягом процесів дозрівання плодів та демонструє найвищий рівень при зав'язуванні плодів і знижується при їх досягненні [13, 110]. Порівняння рівнів транскрипції гена  $\beta$ -галактозидази за допомогою ПЛР в реальному часі у двох сортів, що відрізняються рівнем толерантності (*Kordia*, толерантний; *Bing*, чутливий) виявило, що на всіх етапах розвитку плоду експресія була вища у більш стійкого сорту. Порівняння рівнів транскрипції кількох генів експансинів у сортів *Kordia* та *Bing* показало найвищий рівень транскрипції під час зміни кольору плодів у *Bing*. Водночас, рівень експресії одного з генів експансинів у *Kordia* вищий, розтягнутий у часі і співпадає із дозріванням плодів. Остання особливість імовірно відповідає за більшу здатність клітинної стінки до розширення. Таким чином пояснюється значна пластичність клітинної стінки плоду для попередження появи мікротріщин на більш пізніх стадіях розвитку плоду [13, 14].

*Стійкість до борошнистої роси.* Однією із найбільш небезпечних хвороб черешні є борошниста роса черешні, збудником якої є *Podosphaera clandestina*. Створення елітних сортів черешні із природньою стійкістю є ефективним шляхом для зменшення використання фунгіцидів та пестицидів, полегшення переходу до екологічно-раціональних систем і як результат – зростання прибутковості. Багато промислово значимих сортів черешні чутливі до борошнистої роси, зокрема Bing, Van, Rainier, Lapins, Sweetheart та Stella, яка є предком більшості сучасних самоплідних сортів.

Вперше стійкість до борошнистої роси було виявлено у форми PMR-1, само-несумісного ( $S_4S_9$ ) сіянця невідомого походження із низькою якістю плодів. В процесі досліджень було встановлено, що резистентність успадковується моногенно, по домінантному типу. Відповідно ген отримав назву *Pmr1*, а в форми PMR-1 знаходиться в гетерозиготному стані [143-145].

Стійкість до борошнистої роси було виявлено також у сортів Chelan, Hedelfinger, Venus та Moreau, у кожного з них було виявлено один домінантний ген в гетерозиготному стані. Використовуючи SNP-маркери було виявлено два QTL, що пояснюють стійкість або чутливість до борошнистої роси в LG1 при дослідженні 480 генеалогічно пов'язаних сіянців. Перший QTL фланкований SNP-маркерами rs1.26215806 та rs1.27968875, а другий QTL – rs1.33106240 та rs1.33907538 відповідно. Наразі, сорти-донори гена *Pmr1* активно впроваджуються в селекційні програми [143-145].

В іншому дослідженні [99] декількох плодових культур вивчався ген стійкості до борошнистої роси. У персика було ідентифіковано ген *PpMlo1*, подібний ген було виявлено в інших Розоцвітих, зокрема, по одній копії у черешні та вишні [98, 99].

*Аналоги генів резистентності.* Генетичні дослідження показали, що NBS-LRR аналоги генів стійкості (resistance gene analog, RGA) схильні до утворення кластерів та часто картуються в локусах основних генів стійкості чи локусах кількісних ознак. Ідентифікація та використання специфічних RGA в якості молекулярних маркерів має потенціал для скринінгу рослинного матеріалу, що демонструє різний ступінь фенотипової стійкості та безпосередньої ідентифікації

генів чи геномних ділянок, що відповідають за резистентність до хвороби. Дослідження RGA були проведені в різних таксономічних групах, включаючи родину Rosaceae, проте у черешні такі дослідження були поодинокими [15]. В одному з досліджень RGA [15], у вибірці сортів черешні було виявлено 90 RGA, що належать до двох основних класів (підродин TIR та non-TIR). Результати засвідчили, що використання RGA в дослідженні плодових культур має потенціал не лише з'ясування локалізації генів стійкості, але й для відбору батьківських форм в колекції геноплазми та проливає світло на еволюційну консервативність RGA та спорідненість у родині Rosaceae.

Огляд літературних джерел був опублікований в Іванович Я.І. (2015) Сучасний стан вивчення геному (*Prunus avium* (L.) L.) черешні. *Наук. доп. НУБіП України*, 51 (2), 1-20.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Рослинний матеріал

Рослинний матеріал сортів черешні було відібрано в колекційних насадженнях Інституту садівництва НААН, Мелітопольської ДСС ім. М.Ф. Сидоренка ІС, Артемівської ДСР ІС та Дослідної станції помології ім. Л.П. Симиренка ІС НААН, приватних господарствах та природних популяціях дикої черешні. (табл. Б.1). Зразки ДНК 15 сортів черешні закордонної селекції було люб'язно надані Dr. José Quero Garcia (INRA-Bordeaux, Франція). Надані зразки були виділені із рослинного матеріалу, що зберігається в Центрі генетичних ресурсів кісточкових культур INRA (Centre de Ressources Génétiques (CRG) *Prunus*) та розташовані в Toulence та Bourran. Центр входить до Національної мережі генетичних ресурсів кісточкових культур Франції (Le réseau national *Prunus*) та Європейської спільної програми з генетичних ресурсів рослин (ECPGR).

### 2.2. Виділення загальної рослинної ДНК та визначення її концентрації

**Модифікований ЦТАБ-метод.** Одним із найбільш поширених та доступних методів виділення є метод описаний Doyle, в основі якого лежить використання дитергенту цетилтриметиламонійброміду (ЦТАБ, СТАВ) в складі лізис-буферу [61]. Попередньо готують розчини: буфер для лізису (2% СТАВ, 100 мМ Трис-НСІ (рН 8.0), 1.4 М NaCl, 20 мМ ЕДТА, 0.04% полівінілпіролідон (ПВП) К10, 0,005%  $\beta$ -меркаптоетанол), буфер ТЕ (10 мМ Трис-НСІ (рН 8.0), 1 мМ ЕДТА).

Метод включає наступні етапи.

1. Приготувати 60-70 мг тканин листка або 90-100 мг очищених від лусок бруньок.

2. Гомогенізація та лізис. До рослинної тканини додати 1 мл лізис-буферу та розтерти. Відібрати 500-700 мкл гомогенату в пробірку типу еппендорф. Лізис проводити 1 год. при 60°C та перемішувати струшуванням.

3. Депротейнізація. Після лізису в кожному пробірці додати 500 мкл хлороформу чи суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), перемішати до

побіління. Центрифугувати 10 хв. при 10 000 g. Супернатант відібрати в нові пробірки та повторити депротеїнізацію.

4. Осадження. До надосаду додати 0,7 об'єму (~ 500 мкл) ізопропанолу чи 2 об'єми (~1 мл) 96% етанолу. Інкубувати за  $-20^{\circ}\text{C}$  протягом ночі, обережно збовтати. Центрифугувати 10 хв. при 10 000 g. Обережно злити супернатант.

5. Очистка. До осаду додати ~ 700 мкл 70-80% етанолу, перемішати струшуванням. Центрифугувати 2 хв. при 10 000 g, надосад злити. Повторити використовуючи 96% етанол. Сушити при  $37^{\circ}\text{C}$  близько 15 хв. до висихання етанолу.

6. Осад розчинити в 100 мкл TE чи деіонізованої води струшуванням. Перевірити концентрацію препарату ДНК електрофоретично та на спектрофотометрі шляхом вимірювання  $A^{260}$ . Оцінити забрудненість полісахаридами при  $A^{260}/A^{230}$  і білками при  $A^{260}/A^{280}$  [245].

**Модифікований метод з використанням  $\text{SiO}_2$ .** Вперше метод з використанням  $\text{SiO}_2$  для очистки та виділення нуклеїнових кислот описав Boom [22]. В подальшому явище зв'язування нуклеїнових кислот із частинками крупної фракції оксиду кремнію набуло широкого використання. В нашому дослідженні ми використали кілька модифікацій цього методу для отримання якісних препаратів ДНК і зупинились на наступному.

Попередньо готують розчини: буфер для лізису (2% СТАВ, 100 мМ Трис-НСІ (рН 8.0), 1.4М NaCl, 20 мМ ЕДТА), буфер TE (10 мМ Трис-НСІ (рН 8.0), 0.1мМ ЕДТА), буфер для промивання (70% етанол, 100 мМ Трис-НСІ (рН 8.0)). Приготувати розчин крупної фракції частинок  $\text{SiO}_2$ . 4.8 г  $\text{SiO}_2$  суспендують у ddH<sub>2</sub>O до сумарного об'єму 40 мл. Після осадження 1 год., 39 мл переносять у нову посудину і осаджують ще 4 год. 35 мл супернатанту зливають та додають 48 мкл 30% HCl до осаду щоб довести рН до 2. Суспензію розділяють на аліквоти, автоклавують та зберігають у холодильнику.

Метод включає наступні етапи. 1. Приготувати 50-60 мг тканин листка.

2. Гомогенізація та лізис. До тканин листка додати 1 мл лізис-буферу та розтерти. Відібрати 500-700 мкл гомогенату в пробірку типу еппендорф. Лізис проводити 1 год. при  $60^{\circ}\text{C}$  та перемішувати струшуванням.

3. Депротейнізація. Після лізису в кожну пробірку додати 500 мкл хлороформу чи суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), перемішати до побіління. Центрифугувати 10 хв. при 10 000 g. Супернатант відібрати в нові пробірки та повторити депротейнізацію.

4. До надосаду додати 40 мкл SiO<sub>2</sub>, вортексувати та інкубувати 10 хв. Центрифугувати 10 хв. при 10 000 g.

5. Відмивання осаду. До осаду додати ~ 700 мкл буферу для промивання, перемішати вортексуванням. Супернатант злити, промивання повторити. Сушити при 37°C до висихання етанолу.

6. До осаду додати 50 мкл TE, перемішати вортексуванням. Інкубувати 25 хв. при 56°C, перемішати вортексуванням. Центрифугувати 2 хв. при 10 000 g. Супернатант відібрати в нові пробірки, перед використанням центрифугувати для осадження залишків SiO<sub>2</sub>, що можуть інгібувати проходження ПЛР [118, 163].

### 2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Метод полімеразної ланцюгової реакції передбачає використання специфічних праймерів для отримання дискретних продуктів ампліфікації ДНК окремих ділянок геному [243].

Праймери використані для профілювання сортів черешні (табл. 2.1 – 2.4) належать до різних маркерних систем. Температуру плавлення ДНК ( $T_m$ ) обраховували за допомогою програми OligoCalc [104].

Усі маніпуляції з приготування реакційної суміші проводили на льоду. Компоненти для приготування проби змішували у наступному порядку: деіонізована стерильна вода, ПЛР-буфер, MgCl<sub>2</sub>, суміш дНТФ (AppliChem, ThermoScientific чи VWR), праймери, *Taq* ДНК-полімераза (СибЭнзим, ThermoScientific чи Sigma), розчин ДНК. Загальний об'єм реакційної суміші становив 15 мкл. Кінцеві концентрації варіювали залежно від різновиду ПЛР.

ПЛР проводили на ампліфікаторах Терцик (ДНК-Технология, РФ), Mastercycler® personal 5332, Mastercycler® 5341 (Eppendorf, Німеччина) та Veriti® (Applied Biosystems®, США). Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР здійснювали в 2% агарозному гелі та 10% поліакриламідному гелі.

### 2.3.1. IRAP-, REMAP- та ISSR-ПЛП

**IRAP.** Використані в даній роботі IRAP-праймери створені для дослідження поліморфізму різних типів та ділянок ретротранспозонів. Так, SIRE-1 є праймером до LTR-послідовностей повнорозмірних ретротранспозонів; LINE (non LTR) – праймер до ретротранспозонів без LTR; iPBS – праймери до сайту зв'язування зворотної транскриптази мініатюрних ретротранспозонів; TRIM – праймери до LTR-послідовностей мініатюрних ретротранспозонів.

Таблиця 2.1

Праймери використані для IRAP-, REMAP-, ISSR-ПЛП та умови ампліфікації

№	Назва	ПЛП-метод	T <sub>a</sub> , °C	C (Mg <sup>2+</sup> ), мМ	Послідовність (5' – 3')
1	SIRE-1	IRAP	57.3		GCA CTT ATG CAA GTG GGA TCA GC
2	TRIM K002	IRAP	59.4		AGC TCC CAA AAG GCC TCG TGC
3	TRIM K008	IRAP	59.1		GCG GAC AAT ATC GTG CTA CGG TG
4	iPBS 2272	IRAP	39		GGC TCA GAT GCC A
5	iPBS 2077	IRAP	34.7		CTC ACG ATG CCA
6	iPBS 2237	IRAP	55.9		CCC CTA CCT GGC GTG CCA
7	non-LTR (LINE)	IRAP	52		CCG CCC TAT TAG TTT GAT TGG
8	TRIM K002 8565	REMAP	59.4		AGC TCC CAA AAG GCC TCG TGC GT CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC
9	TRIM K008 8565	REMAP	59.1		GCG GAC AAT ATC GTG CTA CGG TG GT CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC
10	UBC 807	ISSR	50	2,0	AGA GAG AGA GAG AGA GT
11	UBC 809	ISSR	52	2,0	AGA GAG AGA GAG AGA GG
12	UBC 810	ISSR	50	2,0	GAG AGA GAG AGA GAG AT
13	UBC 811	ISSR	52	2,0	GAG AGA GAG AGA GAG AC
14	UBC 827	ISSR	52	2,0	ACA CAC ACA CAC ACA CG
15	UBC 834	ISSR	52	1,5	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
16	UBC 835	ISSR	56	2,0	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
17	UBC 836	ISSR	54	2,0	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
18	UBC 841	ISSR	56	2,0	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
19	UBC 857	ISSR	56	2,0	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
20	UBC 881	ISSR	60	2,0	GGG TGG GGT GGG GTG

Примітка: праймери із набору UBC № 9. University of British Columbia, Vancouver, Canada.

Реакцію ампліфікації проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 30-50 нг геномної ДНК, 1× ПЛП буфер, 0.8 мкМ праймера, 0.1 мМ кожного дНТФ, 1.5-2.25 мМ MgCl<sub>2</sub> та 0.5 ОА Таq полімерази (СибЭнзим, РФ). ПЛП проводили за наступною програмою: первинна денатурація – 5 хв. при 94°C; 36 циклів, що включають 30 с



при 94°C, 1 хв. при  $T_a$  (табл. 2.1), 2 хв. 30 с при 72°C; кінцева елонгація 5 хв. при 72°C. Праймери TRIM та iPBS раніше використовувались для генетичного профілювання сортів яблуни, хеномелесу та ін. [5, 100].

**REMAP.** Реакцію ампліфікації проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 30-50 нг геномної ДНК, 1× ПЛР буфер, 0.8 мкМ праймера, 0.1 мМ кожного дНТФ, 1.5-2.0 мМ  $MgCl_2$ , та 0.5 ОА *Taq* полімерази (СибЭнзим, РФ). ISSR-ПЛР проводили за тією ж програмою, що й IRAP-ПЛР використовуючи відповідні праймери (табл. 2.2). Використаний в REMAP-ПЛР праймер 8565 є ISSR-праймером до мікросателітних послідовностей з якірними 5' послідовностями.

**ISSR.** Реакцію ампліфікації проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 30-50 нг геномної ДНК, 1× ПЛР буфер, 0.8 мкМ праймера, 0.1 мМ кожного дНТФ, 1.5-2.0 мМ  $MgCl_2$ , та 0.5 ОА *Taq* полімерази (СибЭнзим, РФ). ISSR-ПЛР проводили на за тією ж програмою, що й IRAP-ПЛР використовуючи відповідні праймери (табл. 2.2). Використані в ISSR-ПЛР UBC є праймерами до мікросателітних геномних послідовностей. Частина послідовностей на 3'-кінці мають вироджені нуклеотиди.

### 2.3.2. SSR-ПЛР

Реакцію ампліфікації з використанням МС-праймерів (№ 1-10) проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 30-50 нг геномної ДНК, 1× *Taq* ДНК полімеразний буфер, 1.5 мМ  $MgCl_2$ , 0.2 мМ кожного дНТФ, 0.2 мкМ кожного з праймерів (табл. 2.2) та 0.5 ОА *Taq* ДНК полімерази (СибЭнзим, РФ). ПЛР проводили за “понижуючою програмою” [47]: первинна денатурація – 90 с при 94°C; 10 циклів, що включали 30 с при 94°C для денатурації, 45 с при 60°C (–0.5°C за цикл) для гібридизації праймерів, 1 хв. при 72°C для елонгації; 25 циклів, що включали 30 с при 94°C, 45 с при 55°C, 1 хв. при 72°C; кінцева елонгація 5 хв. при 72°C.

Реакцію ампліфікації з використанням флуоресцентно мічених МС-праймерів (№ 11-29) проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 2-10 нг геномної ДНК, 1× ПЛР буфер, 0.2 мкМ праймера, 0.2 мМ кожного дНТФ, 2.5 мМ  $MgCl_2$  та 0.25 ОА JumpStart™ *Taq* DNA Polymerase (Sigma, США). ПЛР проводили за наступною програмою [171]: первинна денатурація – 15 хв. при 94°C; 15 циклів, що

включали 45 с при 94°C для денатурації, 45 с при 56-58°C для гібридизації праймерів, 45 с при 72°C для елонгації; 25 циклів, що включали 45 с при 94°C, 45 с при 53°C, 45 с при 72°C; кінцева елонгація 10 хв. при 72°C.

Таблиця 2.2

## Використані мікросателітні праймери

№	Назва локусу	Флуоресцентна мітка	Група зчеплення	Посилання
1	BPPCT030	немає	3	E. Dirlewanger et al. (2002)
2	BPPCT039	немає	4	E. Dirlewanger et al. (2002)
3	EMPA015	немає	3	Clarke and Tobutt (2003)
4	EMPAS02	немає	4	Vaughan and Russell (2004)
5	EMPAS06	немає	4	Vaughan and Russell (2004)
6	EPPCU9168	немає	2	Howad et al. (2005)
7	PceGA34	немає	7	Downey and Iezzoni (2000)
8	PMS02	немає	7	Cantini et al. (2001)
9	PS12A02	немає	6	Sosinski et al. (2000)
10	UDP98-412	немає	3	Testolin et al. (2000)
11	EMPA002	D2	1	Clarke and Tobutt (2003)
12	UDP98-022	D2	1	Testolin et al. (2000)
13	BPPCT034	D4	2	E. Dirlewanger et al. (2002)
14	CPSCT034	D3	2	Mnejja, Garcia-Mas, Howad, Badenes, and Arús (2004)
15	CPSCT038	D3	2	Mnejja et al. (2004)
16	EMPaS02	D2	3	Vaughan and Russell (2004)
17	LG3_13.146	D3	3	Stegmeir, Cai, Basundari, Sebolt, and Iezzoni (2015)
18	BPPCT040	D2	4	E. Dirlewanger et al. (2002)
19	EMPaS10	D4	4	Vaughan and Russell (2004)
20	pchgms55	D2	4	Howad et al. (2005)
21	BPPCT037	D2	5	E. Dirlewanger et al. (2002)
22	EMPaS14	D4	5	Vaughan and Russell (2004)
23	EPPB4230	D4	5	Howad et al. (2005)
24	EPPCU3090	D3	6	Howad et al. (2005)
25	M19A	D3	6	Yamamoto et al. (2002)
26	CPSCT022	D4	7	Mnejja et al. (2004)
27	EPDCU3392	D2	7	Howad et al. (2005)
28	EMPA026	D3	8	Clarke and Tobutt (2003)
29	pchgms49	D4	8	Howad et al. (2005)

На першому етапі досліджень, під час вибору МС локусів для генетичного профілювання сортів черешні основними критеріями вибору були дискримінаційні показники маркерів, а також їхня приналежність до переліку рекомендованих ЕСРGR. На другому етапі досліджень вибір МС локусів був зумовлений їх

близьким розташуванням до генів ряду господарсько-цінних ознак (маса, щільність та колір плодів) у черешні чи інших кісточкових культур.

### 2.3.3. Ген *PavCNR12*

Для ампліфікації фрагменту гена *PavCNR12* було використано раніше опубліковані праймери CNR12-C2-F та CNR12-C2-R (табл. 2.3) [54]. Реакцію ампліфікації проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 30-50 нг геномної ДНК, 1× ПЛР буфер, 0.5 мкМ кожного праймера, 0.2 мМ кожного дНТФ, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub> та 0.5 ОА *Taq* ДНК полімерази (СибЭнзим, Росія). ПЛР проводили за «понижуючою програмою» [47]: первинна денатурація – 90 с при 94°C; 10 циклів, що включали 30 с при 94°C для денатурації, 45 с при 60°C (–0.5°C за цикл) для гібридизації праймерів, 1 хв. при 72°C для елонгації; 25 циклів, що включали 30 с при 94°C, 45 с при 55°C, 1 хв. при 72°C; кінцева елонгація 5 хв. при 72°C. Рекомендована авторами оригінальної статті [54] програма ампліфікації не дозволила отримати чіткого мономорфного ПЛР-продукту.

Таблиця 2.3

Праймери використані для ампліфікації фрагменту гена *PavCNR12*

Назва	Послідовність (5' – 3')	Посилання
CNR12-C2-F	TTG CCA TAA ATA GAT ATC CAA AA	De Franceschi et al. (2013)
CNR12-C2-R	GAT TTC CAT CAG CCA TCT G	

### 2.3.4. *S*-локусні гени (*S-PHKazi* та *SFB*)

Для ампліфікації фрагментів генів *S*-локусу було використано раніше опубліковані консенсусні праймери до першого та другого інтрону *S-PHKazi* та інтрону *SFB*, що були флуоресцентно мічені (табл. 2.4). Реакції ампліфікації було проведено згідно рекомендацій щодо приготування ПЛР-сумішей та програм із оригінальних статей [183, 184, 217].

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації праймерів до другого інтрону *S-PHKazi* було проведено в 1,5% агарозному гелі SeaKem® GTG™ (Lonza) та TopVision (Thermo Scientific) на приладах для горизонтального гелелектрофорезу StarPhoresis N2023-1410 (STARLAB, Німеччина) та Hoefer HE 100 SuperSub™ (Hoefer Scientific, США). Агарозні гелі забарвлювали GelRed™ або

етидій бромідом (EtBr). В якості маркера молекулярних мас використовували GeneRuler 1kb DNA Ladder та GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Електрофореграми продуктів ампліфікації аналізували з використанням програми TotalLab TL120.

Таблиця 2.4

Послідовності праймерів використаних для ідентифікації алелів *S*-локусу

Праймери	Послідовність (5' – 3')	Посилання
PaConsI-F PaConsI-R2	<b>D3</b> -(C/A)CT TGT TCT TG(C/G) TTT (T/C)GC TTT CTT C GCC ATT GTT GCA CAA ATT GA	Sonneveld et al. (2006)
PaConsII-F PaConsII-R	G GCC AAG TAA TTA TTC AAA CC CA(T/A) AAC AAA (A/G)TA CCA CTT CAT GTA AC	Sonneveld et al. (2003)
F-BOX5'A F-BOXintronR	<b>D4</b> -TTK SCH ATT RYC AAC CKC AAA AG CWG GTA GTC TTD SYA GGA TG	Vaughan et al. (2006)

Використання трьох пар вироджених праймерів до інтронних послідовностей генів *S-PHKazi* та *SFB* дозволило ідентифікувати більшість алелів. Декілька алелів ( $S_2$ ,  $S_5$ ,  $S_7$ ,  $S_{12}$ ) не були виявлені при використанні пари праймерів PaConsII-F/R, натомість успішно ідентифіковані після ампліфікації із парою праймерів PaConsI-F/R2. Відомо, що при стандартних умовах ампліфікації з використанням пари праймерів PaConsII-F/R неможливо отримати фрагменти, що відповідають алелям  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_5$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{13}$  та  $S_{16}$  [184]. Водночас нами було успішно ампліфіковано фрагменти, що відповідають алелям  $S_1$ ,  $S_{10}$  та  $S_{13}$ . В нашому дослідженні було використано рекомендовані авторами умови ампліфікації пари праймерів PaConsII-F/R, дві ДНК-полімерази (DreamTaq™ (Thermo Scientific), JumpStart™ (Sigma-Aldrich)), виконано умови для ампліфікації довгих фрагментів та проведено оптимізацію концентрації  $Mg^{2+}$ . Раніше вже повідомлялось про подібну проблему з ідентифікацією вищезгаданих алелів, проте вона залишилась невирішеною. Видається імовірним, що причина вибіркової ампліфікації окремих алелів полягає у послідовності вироджених праймерів. Вочевидь, використаний нами один із варіантів послідовностей вироджених праймерів не придатний для ампліфікації всього спектру фрагментів.

## **2.4. Електрофорез нуклеїнових кислот**

### **2.4.1. Горизонтальний електрофорез в агарозному гелі**

Метод включає наступні етапи. 1. Підготовка. Попередньо готують розчини: однократний трис-боратний буфер ( $1\times$  TBE; 0.089 М трис, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА).

2. Приготування гелю. Залежно від необхідної концентрації (1-2%), готують наважку агарози, суспендують в  $1\times$  TBE і заливають у підготовлену рамку. Після застигання гелю переносять в камеру для електрофорезу, заливають  $1\times$  TBE до рівня 2-3 мм над гелем, виймають гребінку.

4. Нанесення проб. Готуються проби змішуванням розчину загальної ДНК чи ПЛР-продуктів та буферу для нанесення  $6\times$  DNA Loading Dye (Thermo Scientific) в співвідношенні проб і буферу – 5:1.

5. Електрофорез проводять при напруженості електричного поля до 5 В/см<sup>2</sup> [245].

### **2.4.2. Вертикальний електрофорез в поліакриламідному гелі**

В якості приладу для поліакриламідного гелю (ПААГ) електрофорезу використовували PROTEAN<sup>®</sup> II хі Cell із розміром гелю 16×20 см та товщиною 1 мм.

Метод включає наступні етапи.

1. Підготовка. Перед заливанням гелю скло, гребінки та спейсери знежирюють, миють та протирають етанолом, збирають гелеву рамку. Попередньо готують розчини: 30% розчин мономерів (29 г акриламідну і 1 г N,N-метиленбісакриламідну), 10% розчин персульфату амонію (ПСА),  $1\times$  TBE та  $5\times$  TBE.

2. Приготування пробки. Готується 15% пробка, що містить: 1 мл 30% розчину мономерів; 890 мкл деіонізованої води; 440 мкл  $5\times$  TBE; 12.5 мкл TEMED (NNN'N'-тетраметилетилендіамін); 12.5 мкл свіжоприготовленого 10% ПСА. Пробка полімеризується протягом 10-15 хв. при кімнатній температурі.

3. Приготування гелю. Готується 10% ПААГ, що містить: 8 мл 30% розчину мономерів; 11.2 мл деіонізованої води; 4.8 мл  $5\times$  TBE; 11 мкл TEMED; 110 мкл 10% ПСА. Гелеву форму на 20 хв. поміщають в термостат при 50-60°C.

4. Для електрофорезу використовують 1× TBE. Напруга виставляється з розрахунку 15-20 В/см довжини гелю, тобто 200-300 В. Перед нанесенням проб проводять префореуз 15 хв. Тривалість електрофорезу залежить від розміру фрагментів ДНК. Після проведення електрофорезу гель фарбують. Приготування і нанесення проб проводили, як описано в 2.3.1.

### **2.4.3. Капілярний електрофорез (фрагментний аналіз)**

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з використанням флуоресцентно мічених МС-праймерів, а також мічених праймерів до першого інтрону *S-PHKazi* та інтрону *SFB* було проведено на CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США). Кожну реакцію ПЛР попередньо проводили на окремих плашках. В якості маркера молекулярних мас використовували CEQ™ DNA Size Standard Kit – 400 та 500. Для виявлення та встановлення розмірів алелів було використано попередньо встановлене програмне забезпечення (CEQ™ 8000 Genetic Analysis System v.9).

### **2.4.4. Забарвлення нуклеїнових кислот**

**Фарбування бромистим етидієм.** Для забарвлення ДНК перед заливанням агарозного гелю до нього додавали бромистий етидій (EtBr; С=100 мг/мл до кінцевої 0.5 мг/мл). Для забарвлення ПААГ, після проведення електрофорезу гель інкубували в 1× TBE з EtBr (С=0.5 мг/мл) протягом 15 хв., після чого промивали дистильованою водою [232, 245]. Візуалізацію нуклеїнових кислот та фотографування гелів проводили на транслюмінаторі BioSan .

**Фарбування за допомогою GelRed™ (Biotium).** GelRed™ придатний для забарвлення одно- та дволанцюгової ДНК (ssDNA, dsDNA) та РНК в агарозному та поліакриламідному гелі. Даний барвник володіє високою чутливістю, стабільний та безпечний для навколишнього середовища. На відміну від EtBr, він не здатний проникати через мембрани живих клітин, немутагенний в робочих концентраціях та нетоксичний для гідробіоти.

Забарвлення проводили згідно рекомендацій виробника. Для цього маточний розчин 10 000× GelRed™ додавали в теплий розчин агарози в пропорції 1:10,000 та

добре перемішували. Візуалізацію нуклеїнових кислот проводили на стандартному трансільюмінаторі при довжині хвилі 302 чи 312 нм.

**Фарбування нітратом срібла ДНК-фрагментів в ПААГ.** Метод забарвлення ДНК нітратом срібла більш чутливий, ніж фарбування бромистим етидієм. Особливо це важливо для детекції одноланцюгової ДНК. Важливою умовою є використання бідистильованої або деіонізованої води [149].

1. Фіксація. Гель поміщають на 5 хв. в 10% етанол, для тривалого зберігання – в 40% метанол.

2. Окислення. Гель залишають на 10 хв. в 1% азотній кислоті. Промивають дистильованою водою 2 рази протягом декількох секунд.

3. Забарвлення сріблом. Гель заливають 0.012 М нітраті срібла і залишають на 20-30 хв у темряві. Промивають дистильованою водою 2 рази протягом декількох секунд.

4. Проявлення проводять в 0,28 М розчині  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  із додаванням 0.019% формаліну. Формалін додається безпосередньо перед використанням розчину. Додають частину проявника, відмивають гель і видаляють розчин з осадом срібла. Повторюють процедуру до досягнення бажаної інтенсивності забарвлення. Зупиняють проявлення 10% оцтовою кислотою протягом 5 хв. Промивають гель дистильованою водою.

## **2.5. Статистичні та біоінформатичні методи аналізу**

### **2.5.1. Аналіз електрофореграм**

Після електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації та їх візуалізації отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab TL120 (рис. 2.1).

Кожна реакція проводилася у трьохкратному повторенні для перевірки відтворюваності маркерів. Під час аналізу мультилокусних молекулярних маркерів створювались бінарні матриці. Відтворювані фрагменти в спектрах ампліфікації оцінювались як наявні (1) або відсутні (0). В аналіз було включено лише ті спектри, серед яких були виявлені поліморфні маркери. Під час аналізу монолокусних

молекулярних маркерів (зокрема, мікролателітів) створювались матриці алельних варіантів.

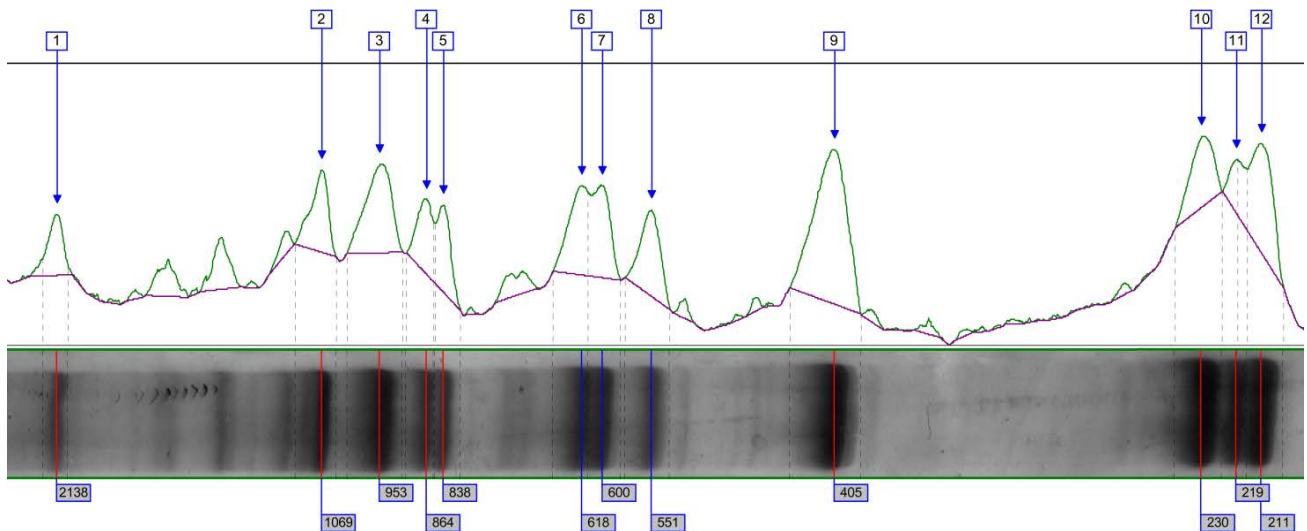


Рис. 2.1. Вікно аналізу смуг у програмі аналізу одновимірних гелів. Позначено номери фрагментів та молекулярну масу.

### 2.5.2. Оцінка генетичного різноманіття

Для оцінки генетичного різноманіття сортів черешні та оцінки дискримінаційних можливостей маркерних систем було використано різні статистичні методи.

Обрахунки первинних бінарних даних (ISSR, IPAR, REMAP – див. пункт 3.1.1.) проводили в MS Excel за допомогою макросу GenAIEx 6.502 [152]. ISSR-, IPAR-, REMAP-маркери були охарактеризовані такими статистичними показниками, як кількість ампліфікованих фрагментів ДНК (number of total bands, TB), кількість поліморфних фрагментів (number of polymorphic bands, PB) та відсоток поліморфних фрагментів (percentage of polymorphic bands, PPB). Для порівняння інформативності окремих праймерів їх дискримінаційні можливості оцінювали з використанням декількох показників поліморфізму: кількість відмінних алелів ( $N_a$ ), кількість ефективних алелів ( $N_e$ ), індекс інформативності Шеннона ( $^sH_A$  або  $I$ ), очікувана гетерозиготність ( $H_e$  або GD, gene diversity) та гетерозиготність, що спостерігається ( $H_o$ ).



Окремо придатність ISSR-ПЛР маркерів для генетичного профілювання сортів черешні оцінювалась обрахунком наступних параметрів: частка поліморфних даних (polymorphic information content, PIC), маркерний індекс (marker index, MI) та розділяюча здатність (resolving power, Rp). Величину PIC для кожного локусу обраховували за формулою  $PIC = 2f_i(1 - f_i)$ , де  $PIC_i$  є часткою поліморфних даних  $i$ -го локусу,  $f_i$  є частотою ампліфікованих фрагментів, а  $1 - f_i$  є частотою неампліфікованих фрагментів [164]. Частота була обрахована як частка ампліфікованих фрагментів в кожному локусі до загальної кількості зразків (окрім пропущених даних). PIC вираховувалось як середнє значенням  $PIC_i$  всіх локусів даної маркерної системи;  $PIC = \sum PIC_i / n$ , де  $n$  – величина вибірки. Ефективне комплексне співвідношення (Effective Multiplex Ratio, EMR) обраховували за формулою  $EMR = n \times \beta$ , де  $n$  є середнім значенням кількості фрагментів, ампліфікованих для кожного генотипу при використанні ISSR-праймера, а  $\beta = PB/TB$ . Маркерний індекс було підраховано для характеристики здатності кожного ISSR-праймера виявляти в генотипів поліморфні локуси. Для кожної маркерної системи MI обраховувався за формулою  $MI = EMR \times PIC$  [213]. Розділяюча здатність розраховувалась за формулою  $Rp = \sum Ib$ , де  $Ib = 1 - (2 \times |0.5 - p_i|)$ , а  $p_i$  є пропорцією від загальної кількості генотипів, що містять  $i$ -й фрагмент ДНК [156].

Обрахунки первинних алельних даних MC (див. пункт 3.1.3) проводили в MS Excel.

Для порівняння інформативності досліджених мікросателітних локусів їх дискримінаційні можливості були охарактеризовані за наступними показниками: кількість відмінних алелів ( $N_a$ ), кількість ефективних алелів ( $N_e$ ), індекс інформативності Шеннона ( ${}^sH_A$  або  $I$ ), очікувана гетерозиготність ( $H_e$ ), гетерозиготність, що спостерігається ( $H_o$ ) та індекс фіксації Райта ( $F$ ). Перелічені статистичні показники обраховували за допомогою макросу GenAlEx 6.502 [152] для MS Excel. В програмі Cervus 3.0.7 [101] було обраховано імовірність ідентичності неспоріднених сортів (probability of identity,  $P_{ID}$ ), імовірність ідентичності повних сибсів (probability of siblings identity,  $P_{ID-SIB}$ ) та частку поліморфних даних (polymorphic information content, PIC) за формулою [27]:

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

де  $p_i$  і  $p_j$  є частотами  $i$ -их та  $j$ -их алелів, а  $n$  є кількістю алелів даного локусу.

Додатково, з використанням макросу GenAlEx 6.502 [152], було обраховано імовірність ідентичності (probability of identity, PI) неспоріднених сортів ( $PI$ ) та сибсів ( $PIsibs$ ) при використанні комбінацій MC локусів для підбору їх мінімального ефективного набору.

### 2.5.3. Генетична конституція та спорідненість сортів

Для з'ясування генетичної спорідненості між 24 сортами черешні в процесі аналізу результатів ISSR-ПЛР матриця первинних бінарних даних була конвертована в матрицю генетичних дистанцій використовуючи коефіцієнт Dice [142] в програмі DARwin 6.0.012 [154]. Генетичну спорідненість між 24 сортами черешні аналізували використовуючи метод незваженого попарного середнього (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA).

Для з'ясування спорідненості сортів черешні та їх належності до певних генетичних груп було використано програму STRUCTURE 2.3.4 [157], 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. Достовірним вважається значення  $K$ , яке характеризується найвищим показником  $\ln P(D)$  [80].

Обрахунки було здійснено у двох повторах з наступними налаштуваннями: кількість кластерів ( $K$ ) значення варіювало від 1 до 8. Кожен прохід включав 100.000 кроків «burn-in period» у 100.000 Монте-Карло марковських ланцюгів (Monte Carlo Markov Chain, MCMC). За основу було взято припущення про змішану модель (admixture model) та присутність кореляції між частотами алелів. Для встановлення кількості кластерів не було використано жодної попередньої інформації.

Для з'ясування генетичної спорідненості між 27 сортами черешні в процесі аналізу результатів SSR-ПЛР матрицю генетичних дистанцій було розраховано за методом простого співпадіння (simple matching, SM) в програмі DARwin 6.0.013

[154]. В якості зовнішньої групи було використано вишню магалебську (*P. mahaleb*). Дендрограма була побудована методом незваженого середнього (Unweighted Variable-Group Method using Averages, UVGMA), кофенетичні матриці були створені та розраховано коефіцієнт кофенетичної варіації (cophenetic correlation coefficient, CPCC) в MultiDendrograms 4.1.0 [66]. Особливістю цієї програми є можливість побудови багатозначних дерев (*multivalued tree*), що вирішує проблему існування множинних варіантів побудови дерева, яка існує при використанні традиційного UPGMA. Для графічного зображення багатозначних дерев пропонується концепція мультидендрограм (*multidendrogram*). Такий варіант представлення результатів дозволяє наглядно спостерігати наявність зв'язків протягом процесу агломерації.

Для з'ясування генетичної спорідненості між 94 сортами та формами черешні було застосовано функції програми DARwin 6.0.013 [154]. В процесі аналізу сумарних даних на основі MS маркерів та S-локусу, матрицю генетичних дистанцій було розраховано за методом простого співпадіння з 10.000 бутстрепів та трансформовано до Евклідових дистанцій. Дендрограма була побудована методом незваженого об'єднання найближчих сусідів (UnWeighted Neighbor-Joining, N-J) з отриманої матриці Евклідових дистанцій. В аналіз були включені всі 94 генотипи.

Для з'ясування спорідненості сортів черешні та їх належності до певних генетичних груп було використано програму STRUCTURE 2.3.4 [157]. Обрахунки було здійснено у двох повторах з наступними налаштуваннями: кількість кластерів ( $K$ ) значення варіювало від 1 до 12. Кожен прохід включав 500.000 кроків «burn-in period» та 500.000 Монте-Карло марковських ланцюгів (Monte Carlo Markov Chain, MCMC). За основу було взято припущення про змішану модель (admixture model) та присутність кореляції між частотами алелів. Для встановлення кількості кластерів не було використано жодної попередньої інформації.

При даному  $K$  аналізувався прохід із найвищим значенням імовірності для оцінки співвідношення кластерів в кожному з генотипів. Генотипи з оціненим відношенням  $\geq 0.8$  (80%) до будь-якого з генетичних кластерів, вважались типічними його представниками; якщо оцінена участь кластеру була  $< 0.8$ , тоді вважали, що генотип належить до змішаної групи.

Аналіз батьківства українських сортів черешні свідчить про те, що на ранніх етапах селекції в Інституті садівництва, Інституті помології (нині Дослідна станція помології) та Інституті зрошувального садівництва (нині Мелітопольська Дослідна станція садівництва) використовували старі західноєвропейські сорти: Денисена жовта, Дрогана жовта, Франц Йосиф, Рання Маркі, Жабуле, Цешенська жовтнева та ін. [231, 244, 247, 248, 252, 253]. Значна частина старих західноєвропейських сортів навіть на півдні України виявились малоприсадибними для культивування [252], проте використовувались у селекційних цілях в Нікітському ботанічному саду. В подальшому група адаптивних сортів, нащадків західноєвропейських сортів були використані в подальшій селекційній роботі. Також, однією із найважливіших батьківських форм для українських сортів черешні є сорт Валерій Чкалов (Розова в.з. або Кавказька Розова в.з.), проте щодо його походження існують розбіжності. Ландраси (сорти народної селекції) черешні в Україні є не настільки поширеним явищем, як у Зх. Європі, водночас, вони понині залишаються практично недослідженими. На відміну від українських ландрас вишні, описано лише декілька ландрас черешні (напр., Ал-Кірез (Al-Kires), Дайбера чорна (Bigarreau de Crimée), Жунжинська, Кіска-Сап (Kiska-sap, Guigne Kiss-Skazar), Татарська чорна (Black Tartarian), імовірно Золота та Дегерменкойська). В селекції сортів вишні дуже поширеним є використання ландрас. Натомість відомі також і сорти черешні, котрі є нащадками ландрас Дайбера чорна, Золота та Татарська чорна, напр., Бірюза, Чорна Ільчишина, Генеральська, Виставочна, Патріотка Криму, Перспективна, Победительница та ін. Переважно це сорти селекції Нікітського ботанічного саду та деякі Інституту помології. Окрему відносно численну групу формують сорти отримані від вільного запилення чи після використання суміші пилку. В цьому випадку батьківською формою може бути як культивованій сорт, ландраса, так і дикоросла форма. Нечисленну групу формують сорти, котрі були отримані внаслідок міжвидової гібридизації: вишня × черешня (Дар Млієва), черешня × вишня степова (Чернявка (Наполеон рожева × *P. fruticosa* Кримка), Оказія), дюк × черешня (Зоряна, Сестрьонка), черешня × дюк (Спектр, Новинка, Рання вишнева, імовірно Бірюза). Найбільших успіхів у селекції черешні було досягнуто на Мелітопольській ДСС та в деякій мірі на Артемівській ДСР, де одним із основних завдань було створення сортів адаптивних до умов середовища.

## РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ СОРТІВ ЧЕРЕШНІ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

### 3.1. Оцінка генетичного різноманіття

#### 3.1.1. IRAP- та REMAP-ПЛР маркери

Використання восьми праймерів IRAP- та REMAP-ПЛР для дослідження 15 сортів черешні дозволило виявити 85 маркерів, з яких 26% виявились поліморфними. В ампліфикаційних спектрах переважали ПЛР-продукти розміром від 400 до 1000 нп (рис. 3.1). Лише в спектрах ампліфікації праймерів TRIM K002

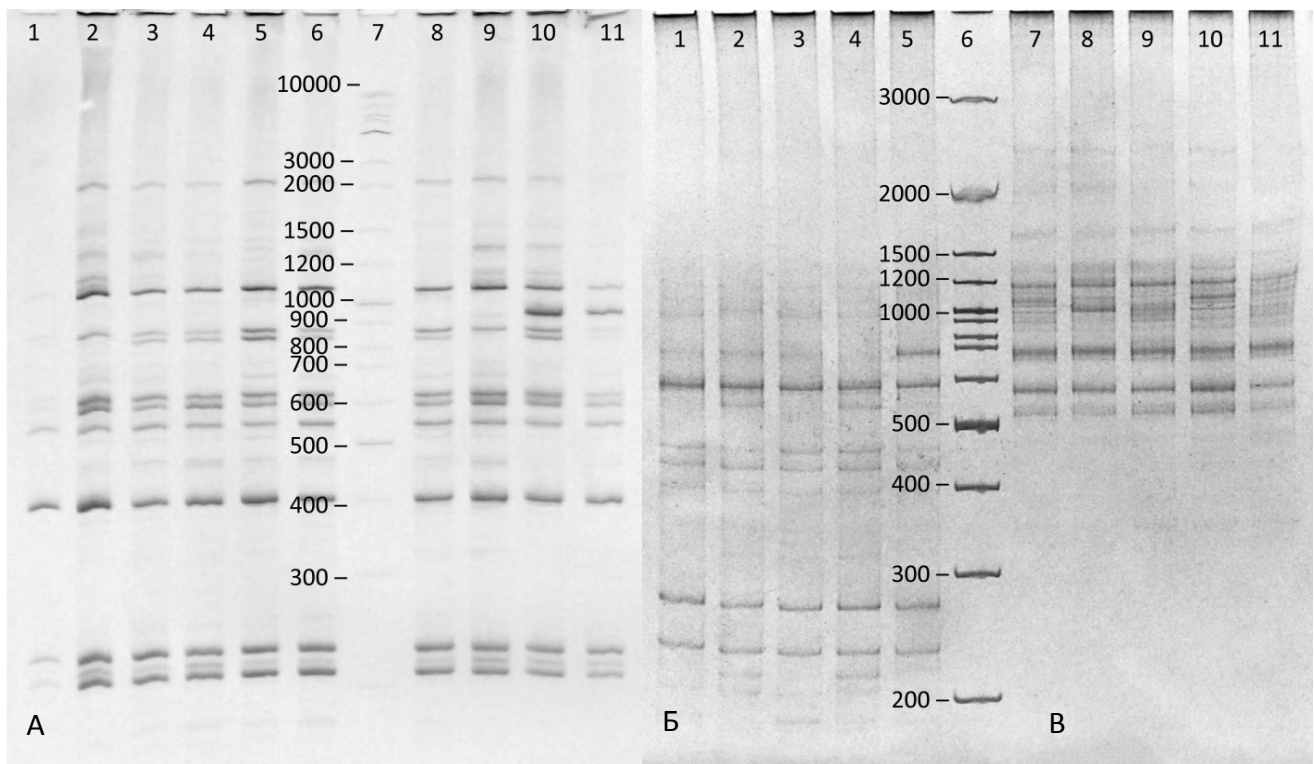


Рис. 3.1. Електрофореграми продуктів ампліфікації: А – праймера TRIM K002 та геномної ДНК сортів черешні: 1 – Валерій Чкалов (VAL/1-2), 2 – Мелітопольська чорна, 3 – Крупноплідна, 4 – Темпоріон, 5 – Казка, 6 – Анонс, 7 – маркер молекулярних мас GeneRuler 1 000 bp (Thermo Scientific), 8 – Талісман, 9 – Донецька красавиця (DON/1), 10 – Regina, 11 – Прощальна Тараненко; Б – пари праймерів TRIM K002+8565, В – TRIM K008+8565 та геномної ДНК: 1, 7 – Валерій Чкалов (VAL/1-2), 2, 8 – Мелітопольська чорна, 3, 9 – Анонс, 4, 10 – Талісман, 5, 11 – Чудо, 6 – маркер молекулярних мас GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Scientific).

та TRIM K008+8565 були виявлені високомолекулярні ПЛР-продукти з розмірами понад 2000 нп [234, 236, 239].

За використання праймера TRIM K008 не було отримано чітких спектрів при ампліфікації ДНК черешні, хоча відомо, що цей праймер дозволяє виявляти маркери з високими дискримінаційними можливостями при генетичному профілюванні інших представників родини Розові (Rosaceae) [5]. Використання праймерів TRIM K002 та TRIM K008 в комбінації з ISSR-праймером 8565 дозволило отримати значно більш інформативні спектри ампліфікації. Серед IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів найбільшу кількість локусів виявлено за використання пари праймерів TRIM K008+8565. Натомість за дискримінаційними характеристиками (табл. 3.1) таке поєднання праймерів поступається комбінації праймерів TRIM K002+8565. Остання виявилася найбільш вдалою з поміж проаналізованих IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів.

Таблиця 3.1

Дискримінаційні характеристики IRAP та REMAP маркерів при генетичному профілюванні 15 сортів черешні

Праймери	Розмір фрагментів, нп	TB	PB	P (%)	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	I	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>
TRIM K002	210-2100	12	3	25.00	1.250	1.136	0.123	0.081	0.084
iPBS 2237	405-700	3	0	-	-	-	-	-	-
iPBS 2272	545-1300	9	2	22.22	1.222	1.137	0.114	0.076	0.079
iPBS 2077	635-1420	8	2	25.00	1.250	1.250	0.173	0.125	0.143
SIRE-1	390-2100	9	3	33.33	1.333	1.160	0.151	0.097	0.108
LINE	265-1790	13	4	30.77	1.308	1.209	0.177	0.120	0.137
TRIM K002 +8565	175-990	12	4	33.33	1.333	1.236	0.202	0.138	0.158
TRIM K008 +8565	535-2460	19	4	21.05	1.211	1.164	0.132	0.092	0.105

При електрофоретичному розділенні ПЛР-продуктів для пари праймерів TRIM K008+8565 переважна більшість (>80%) ампліфікатів утворюють щільний кластер в межах від 500 до 1000 нп. Така згрупованість фрагментів ДНК в спектрах технічно ускладнює оцінку кожного окремого амплікону як у автоматичному, так і в ручному режимі, тобто є небажаною при генетичному профілюванні. Праймер iPBS 2237 дозволив виявити лише 3 мономорфні локуси, які не було враховано при оцінюванні дискримінаційних показників. За використання двох інших праймерів із

цієї групи отримано спектри з більшою кількістю фрагментів ампліфікації. У порівнянні з TRIM K008+8565 та TRIM K002 для ампліфікаційних спектрів праймерів iPBS 2272 та iPBS 2077 характерною є структурна рівномірність спектру фрагментів при електрофоретичному розділенні, що спрощує їх аналіз.

Проте, в цілому рівень дискримінаційних можливостей досліджених праймерів виявився низьким та зіставним у IRAP- та REMAP-ПЛР. Підсумовуючи, можна зазначити, що для рутинного генетичного профілювання сортів черешні ці маркерні системи інтересу не представляють.

### **3.1.2. ISSR-ПЛР маркери**

Використання восьми праймерів для ISSR-ПЛР при дослідженні 24 сортів черешні дозволило виявити 193 продукти ампліфікації, з яких 75 % виявились поліморфними. В ампліфікаційних спектрах переважали амплікони розміром від 400 до 1500 нп, які добре піддаються розпізнаванню та інтерпретації (рис. 3.2). Три праймери (UBC 807, 809, 857) були виключені з дослідження на етапі оцінки їх придатності для розділення генотипів черешні. Проведення ПЛР-ампліфікації з використанням праймера UBC 809 дозволяло отримувати на електрофореграмі лише набори дифузних смуг, більша частина яких не була придатна для інтерпретації. Спектри ампліфікації, отримані для праймерів UBC 807 та 857, були в значній мірі мономорфними. У 12 тестованих генотипів праймер UBC 807 виявляв лише один поліморфний локус, а UBC 857 – три [93, 236, 242].

Найвищий рівень (91,6%) поліморфізму серед використаних праймерів виявлено для UBC 881. Раніше при дослідженні грецьких сортів черешні цей праймер демонстрував значно нижчий (64,2%) рівень поліморфізму [72]. Середній рівень поліморфізму сортів, охарактеризованих нами з використанням восьми праймерів, склав 75,1% із найвищими значеннями для праймерів UBC 834, 841 та 881.

В інших роботах використання подібного набору праймерів дозволило виявити значно нижчий рівень поліморфізму у сортів черешні.

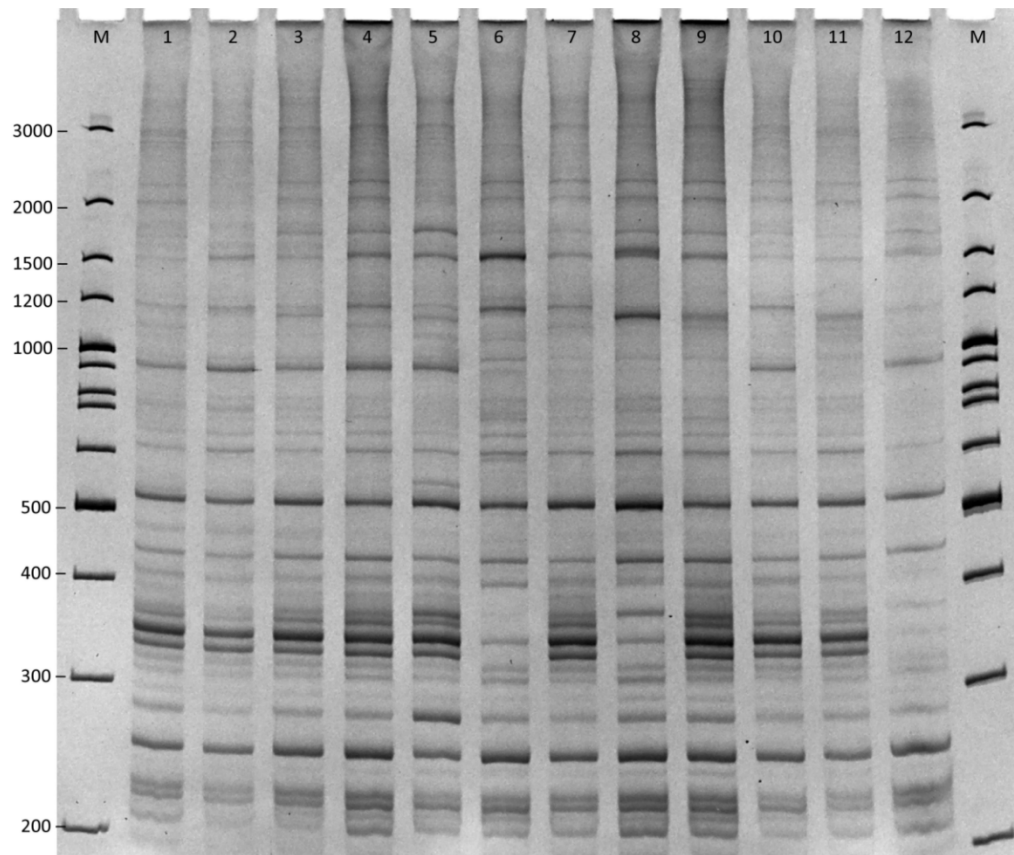


Рис. 3.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації праймера UBC835 та геномної ДНК сортів черешні: 1 – Донецька красавиця (DON/1), 2 – Отрада, 3 – Аннушка, 4 – Ярославна (YAR/1), 5 – Ніжність (NIJ/2), 6 – Любава, 7 – Китаївська чорна (KYT/3), 8 – Легенда Млієва, 9 – Дар Млієва, 10 – Regina, 11 – Бігарро Бурлат, 12 – Дрогана жовта (DRO/1). М – маркер молекулярних мас GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Scientific).

Зокрема, при використанні 10 ISSR праймерів рівень поліморфізму становив 57,7 % [72], а 30 ISSR праймерів – 39,5 % [122]. Аналогічно, за нашими даними показники генетичного різноманіття, отримані з використанням праймерів UBC 811, 827, 834, 841 та 881, виявились також значно вищими, ніж ті, що наводяться в літературі [72, 122]. Проте слід зазначити, що нижчі показники генетичного різноманіття у згаданих роботах можуть бути наслідком застосування для електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації агарозного гелю, оскільки цей метод є менш чутливим порівняно із розділенням фрагментів ДНК в ПААГ.



Дискримінаційні характеристики ISSR-ПЛР маркерів при генетичному профілюванні 24 сортів черешні

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

Примітка. ТВ – кількість ампліфікованих фрагментів ДНК (number of total bands), РВ – кількість поліморфних фрагментів (number of polymorphic bands), РРВ – відсоток поліморфних фрагментів (percentage of polymorphic bands), РІС – частка поліморфних даних (polymorphic information content), МІ – маркерний індекс (marker index), Рр – розділяюча здатність (resolving power),  $N_a$  – кількість відмінних алелів,  $N_e$  – кількість ефективних алелів,  $I$  – індекс інформативності Шеннона,  $H_e$  – очікувана гетерозиготність та  $H_o$  – гетерозиготність, що спостерігається.

Оцінюючи за маркерним індексом праймери, застосовані для генетичного профілювання досліджуваних сортів черешні, можна стверджувати, що UBC 835, 836 та 881 видаються найбільш перспективними. Значення МІ в них виявились в 1,5–2 рази вище порівняно з іншими праймерами. Крім того, UBC 835, 836 та 881 демонструють найвищі показники розділяючої здатності. Водночас найвищі значення частки поліморфних даних та індексу інформативності Шеннона мають праймери UBC 810, 841 та 881 (табл. 3.2). На загал, використані праймери достовірно відрізняються за показниками кількості відмінних та ефективних алелів. Різниця між очікуваною та гетерозиготністю, що спостерігалась, не є вагомою.

Самостійне використання праймерів UBC 836 та 881 дозволило успішно диференціювати всі 24 сорти, в тому числі близькоспоріднені. Водночас, застосовуючи окремо UBC 827, було диференційовано 21 генотип, UBC 810 – 20, UBC 810 та 835 – 18, UBC 810 та 834 – 14 сортів.

### 3.1.3. Мікросателітні маркери

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 [91, 94, 254]. Пізніше, на другому етапі було вирішено провести більш розширене дослідження із залученням більшої кількості генотипів та МС локусів [92].

На першому етапі дослідження використання десяти пар праймерів (№ 1-10 з табл. 2.3) до МС локусів дозволило виявити 67 алелів. Один локус (ВРРСТ030) був виключений з дослідження як непридатний для розпізнавання генотипів черешні, оскільки спектри ампліфікації цього локусу для 24 протестованих генотипів були мономорфними (лише один фрагмент довжиною 128 нп). Використовуючи праймери до дев'яти МС локусів було проведено профілювання 37 сортів та форм черешні (рис. 3.3), проте у зв'язку з проблемами сортоідентичності 10 генотипів було виключено із подальшого аналізу.

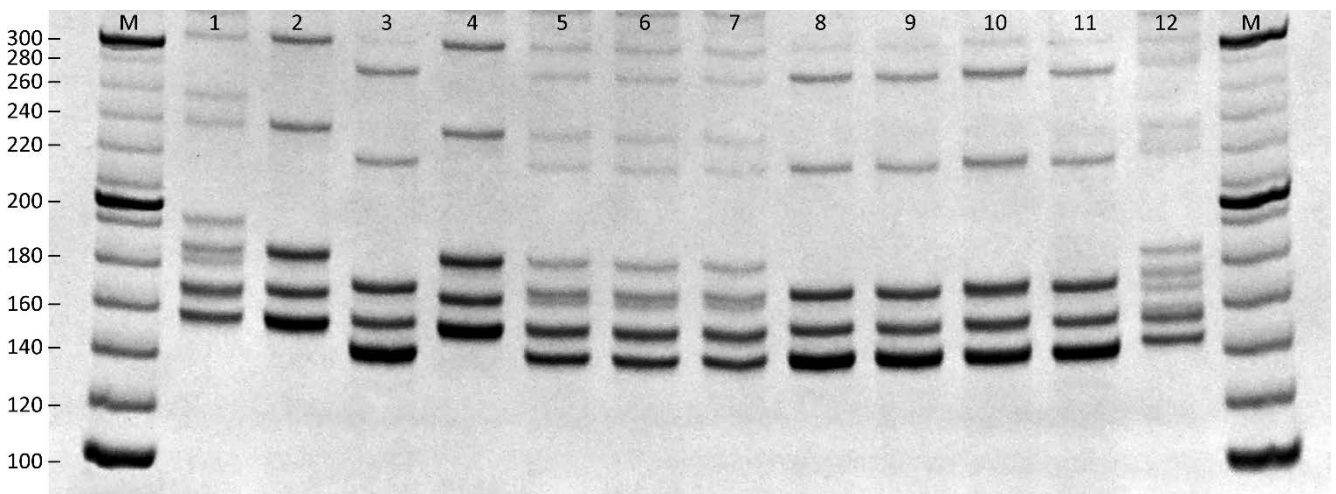


Рис. 3.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації праймерів до МС локусу PseGA34 та геномної ДНК сортів та форм черешні: 1 – Валерій Чкалов (VAL/3), 2 – Простір, 3 – Престижна, 4 – Аншлаг, 5 – Ласуня, 6 – Дачниця, 7 – Донецька красавиця (DON/2), 8 – Ярославна (YAR/1), 9 – Дончанка, 10 – Легенда Млієва, 11 – Дар Млієва, 12 – Дрогана жовта (DRO/1).

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,  $N_e$ ). Середнє значення кількості алелів

на локус, виявлених у наших дослідках, є вищим порівняно зі значеннями, наведеними в більшості подібних досліджень черешні. Наприклад, при генотипуванні 21 сорту черешні з використанням 15 пар праймерів до мікросателітів середнє значення алелів на локус склало 5.80 [72]. В іншій роботі [47] підчас вивчення 19 мікросателітних локусів у 14 сортів черешні середнє значення алелів на локус становило 3.30. Лише в одному з відомих нам досліджень [80], де вивчались 28 мікросателітних локусів у 92 сортів черешні середнє значення алелів на локус було вищим, ніж у нашому випадку – 7.64.

Очікувана гетерозиготність в нашому дослідженні варіює від 0.526 до 0.868 із середнім значенням 0.739; в попередніх дослідженнях черешні середнє значення очікуваної гетерозиготності становило 0.460 [47], 0.600 [57], 0.663 [80] та 0.683 [72]. Гетерозиготність, що спостерігається у нашому випадку варіювала від 0.541 до 1.000 (середнє значення – 0.883). Значення очікуваної та спостереженої гетерозиготності були порівняні з використанням індексу фіксації Райта ( $F$ ), що варіювало від -0.353 до -0.028 із середнім значенням по всіх локусах -0.194 (табл. 3.3). Негативне значення індексу фіксації означає надлишковість гетерозиготності, що спричинена негативним вибірковим схрещуванням (negative assortative mating) чи добороом на користь гетерозигот (selection for heterozygotes) [101]. У випадку черешні високі значення очікуваної та спостереженої гетерозиготності спричинені системою гаметофітної самонесумісності, яка не допускає самозапилення та знижує рівень інбридингу [191].

Значення  $P_{IS}$  для різних локусів коливається в межах від 0.480 до 0.854 із середнім показником 0.700, що є вищим у порівнянні з більшістю попередніх досліджень. Найближче значення  $P_{IS}$  (0.671) було показано в іншому дослідженні [67]. В нашому дослідженні значення  $P_{ID}$  (імовірність ідентичності неспоріднених сортів) коливається в межах від 0.032 до 0.271. Середнє значення  $P_{ID}$  (0.116) виявилось меншим у порівнянні з даними Ganopoulos et al. [72], де даний показник мав значення 0.232. Тобто, в нашому дослідженні імовірність ідентифікації сорту є вищою. Крім того, з огляду включення в дослідження близькоспоріднених сортів черешні, нами також оцінювалась імовірність ідентичності повних сибсів. Встановлено, що значення  $P_{ID-SIB}$  варіює від 0.324 до 0.555 із середнім 0.409.

Показники генетичного різноманіття та дискримінаційних можливостей мікросателітних локусів при генетичному профілюванні 27 сортів черешні

Локус	Розмір фрагментів, п.н.	Na	Ne	Ho	He	F	I	PIС	P <sub>ID</sub>	P <sub>ID-SIB</sub>
ВРРСТ039	130-142	4.000	3.778	0.972	0.735	<b>-0.322</b>	1.358	<b>0.687</b>	0.118	0.412
ЕМРА015	204-240	<b>10.000</b>	<b>4.704</b>	1.000	0.787	<b>-0.270</b>	<b>1.856</b>	<b>0.763</b>	<b>0.070</b>	<b>0.374</b>
ЕМРАS02	130-192	<b>10.000</b>	<b>7.564</b>	0.973	0.868	-0.121	<b>2.123</b>	<b>0.854</b>	<b>0.032</b>	<b>0.324</b>
ЕМРАS06	116-228	<b>12.000</b>	<b>4.996</b>	0.919	0.800	-0.149	<b>1.948</b>	<b>0.777</b>	<b>0.063</b>	<b>0.366</b>
ЕРРСУ9168	162-192	5.000	2.108	0.541	0.526	-0.028	1.022	0.480	0.271	0.555
РсеGA34	140-166	<b>8.000</b>	<b>4.199</b>	0.919	0.762	<b>-0.206</b>	<b>1.619</b>	<b>0.726</b>	<b>0.093</b>	<b>0.392</b>
PMS2	134-166	4.000	3.115	0.919	0.679	<b>-0.353</b>	1.186	<b>0.612</b>	0.170	0.453
PS12A02	152-172	<b>8.000</b>	<b>6.018</b>	0.919	0.834	-0.102	<b>1.922</b>	<b>0.813</b>	<b>0.048</b>	<b>0.345</b>
UDP98-412	106-126	5.000	2.928	0.784	0.659	<b>-0.190</b>	1.197	0.596	0.179	0.466
Mean	-	7.333	4.379	0.883	0.739	-0.194	1.581	0.700	0.116	0.409
Total		66							6.083× e-10	2.891× e-4

Враховуючи всі проаналізовані вище показники генетичного різноманіття, в першій частині нашого дослідження найбільш інформативними виявились маркери таких локусів: ЕМРА015, ЕМРАS02, ЕМРАS06, РсеGA34 та PS12A02.

Таблиця 3.4

Алелі мікросателітних локусів та їх частоти у сортів черешні

ЕМРАS02		ЕМРАS06		РсеGA34		UDP98-412	
Розмір фрагментів, п.н.	Частота, %	Розмір фрагментів, п.н.	Частота, %	Розмір фрагментів, п.н.	Частота, %	Розмір фрагментів, п.н.	Частота, %
130	10.8	116	1.4	140	10.8	106	20.3
132	35.1	198	2.7	144	35.1	116	2.7
134	24.3	200	12.2	146	24.3	122	1.4
136	4.1	202	24.3	152	4.1	124	45.9
138	2.7	204	4.1	154	2.7	126	29.7
140	20.3	206	4.1	156	20.3		
142	1.4	210	4.1	160	1.4		
144	1.4	212	33.8	166	1.4		
156	10.8	216	2.7				
192	35.1	222	6.8				
		224	2.7				
		228	1.4				

Наші результати підтверджують доцільність використання індексу інформативності Шеннона ( $S_{H_A}$ ) для оцінки дискримінаційних можливостей маркерів. Цей показник в даному дослідженні варіює від 1.022 в найменш інформативного локусу (ЕРРСУ9168) до 2.123 в найбільш інформативного

(EMPAS02). Ці дані добре узгоджуються як з кількістю ефективних алелів, часткою поліморфних даних, так і з імовірністю ідентифікації сортів.

Для ефективної ідентифікації сортів черешні значення мають МС локуси з великою кількістю рідкісних алелів. 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. Натомість, для ERPCU9168 – 3, UDP98-412 – 2, PMS2 – 1, тоді як для BPPCT039 малопоширених алелів взагалі не виявлено. Для рекомендованих ECPGR мікросателітних локусів (табл. В.1) у табл. 3.4 наведені виявлені алелі та їх частоти у досліджених сортів черешні.

На другому етапі дослідження використання 18 пар праймерів до мікросателітних локусів дозволило на загал виявити 151 алель. Три локуси (LG3\_13.146, S4PAV та CPSCCT005) були виключені з дослідження на етапі оцінки їх придатності для розпізнавання генотипів черешні, оскільки спектри їх ампліфікації були мономорфними.

У 18 поліморфних мікросателітів кількість алелів на локус у 94 сортів та форм черешні варіює від 2.00 до 16.00 (табл. 3.5) із середнім значенням 8.39 (2.92 для кількості ефективних алелів,  $N_e$ ). Середнє значення кількості алелів на локус, виявлених у наших дослідках є вищим порівняно зі значеннями, наведеними в більшості подібних досліджень черешні.

Очікувана гетерозиготність в нашому дослідженні варіює від 0.022 до 0.840 із середнім значенням 0.583; в попередніх дослідженнях черешні середнє значення очікуваної гетерозиготності становило 0.310 [16], 0.498 [216], 0.684 [65] та 0.720 [147]. Гетерозиготність, що спостерігається варіювала від 0.021 до 0.825 (середнє 0.600). Значення очікуваної та спостереженої гетерозиготності були порівняні з використанням індексу фіксації Райта ( $F$ ), що варіював від -0.237 до 0.510 із середнім значенням по всіх локусах 0.025. З раніше опублікованих досліджень природніх популяцій відомо, що середнє значення індексу фіксації Райта варіювало від 0.012 до 0.185 [9, 55, 96], а при дослідженні культивованих сортів склало -0.032 [72].

Показники генетичного різноманіття та дискримінаційних можливостей МС  
локусів при генетичному профілюванні 94 сортів та форм черешні

Локус	Розмір фрагментів, п.н. <sup>1</sup>	Na	Ne	I	He	Ho	F	PIС	P <sub>ID</sub>	P <sub>ID-SIB</sub>
ВРРСТ034	232-290	13	2.297	1.285	0.585	0.565	-0.036	0.536	0.218	0.522
ВРРСТ037	144-180	10	5.715	1.855	0.840	0.825	-0.019	0.801	0.054	0.351
ВРРСТ040	138-166	11	4.151	1.708	0.798	0.759	-0.051	0.726	0.091	0.393
СРSCT022	265-279	8	2.351	1.116	0.578	0.575	-0.006	0.510	0.246	0.524
СРSCT034	192-210	9	3.997	1.597	0.779	0.750	-0.039	0.713	0.099	0.400
СРSCT038	202-246	8	1.865	0.941	0.453	0.464	0.022	0.430	0.321	0.598
ЕМРА002	124-150	5	2.058	0.815	0.598	0.514	-0.163	0.408	0.342	0.579
ЕМРА026***	224-252	6	2.139	0.905	0.261	0.532	0.510	0.440	0.311	0.562
ЕМРАS02	152-168	8	3.048	1.393	0.693	0.672	-0.032	0.632	0.148	0.451
ЕМРАS10	168-205	10	2.598	1.388	0.582	0.615	0.053	0.583	0.180	0.487
ЕМРАS14	218-232	3	2.099	0.799	0.648	0.524	-0.237	0.413	0.337	0.573
ЕРDCU3392	128-150	9	4.654	1.712	0.793	0.785	-0.011	0.755	0.076	0.377
ЕРРВ4230	276-314	16	3.294	1.728	0.677	0.696	0.027	0.673	0.115	0.431
ЕРРСУ3090	190-206	8	2.876	1.292	0.553	0.652	0.152	0.596	0.177	0.468
М19А	189-192	2	1.022	0.059	0.022	0.021	-0.011	0.021	0.958	0.979
pchgms49	160-204	9	1.828	0.983	0.467	0.453	-0.032	0.427	0.325	0.605
pchgms55	144-204	9	3.791	1.567	0.602	0.736	0.182	0.695	0.111	0.410
UDP98-022	102-118	7	2.899	1.371	0.559	0.655	0.147	0.620	0.154	0.461
Mean	-	8.3 89	2.927	1.251	0.583	0.600	0.025	0.554	0.237	0.510
Total		151							6.705× e-14	3.14× e-6

Примітки: <sup>1</sup> – розмір фрагментів є більшим порівняно з оригінальним через використання під час ампліфікації М13-хвостів; \*\*\* – виявлено значимий розподіл Харді-Вайнберга (HW) на 0.1% рівні.

Враховуючи проаналізовані вище показники генетичного різноманіття, в другій частині нашого дослідження найбільш інформативними виявились маркери таких локусів: СРSCT034, СРSCT034, ВРРСТ040, ЕРРВ4230, ВРРСТ037 та pchgms55.

Значення РІС для різних локусів коливається в межах від 0.021 до 0.801 із середнім показником 0.554, що у порівнянні з попередніми дослідженнями є поміним. Найближче значення РІС (0.596) було показано в іншому дослідженні [227] при профілюванні 19 сортів черешні. В нашому дослідженні значення Р<sub>ID</sub> (імовірність ідентичності неспоріднених сортів) коливається в межах від 0.054 до 0.958. Середнє значення Р<sub>ID</sub> (0.237) виявилось середнім показником у порівнянні з попередніми дослідженнями, де даний показник мав значення 0.207 [147], 0.248

[153] та 0.654 [65]. Отже, в нашому дослідженні імовірність ідентифікації сорту є досить високою. В нашій роботі імовірність ідентичності двох неспоріднених сортів при дослідженні 18 мікросателітних локусів склало  $6.705 \times e^{-14}$ . Для порівняння, при дослідженні 10 локусів у шести сортів черешні [153]  $P_{ID}$  для вибірки склало лише  $0.121 \times e^{-6}$ . Оскільки в дослідження було включено чимало близькоспоріднених сортів черешні, нами також вивчалась імовірність ідентичності повних сибсів. Встановлено, що значення  $P_{ID-SIB}$  варіює від 0.351 до 0.979 із середнім – 0.510.

Порівнюючи результати генетичного профілювання сортів та форм черешні з використанням МС маркерів на першому та другому етапах досліджень відрізнявся розмір вибірки ( $N_I = 37$ ,  $N_{II} = 94$ ), перелік досліджуваних локусів та власне метод аналізу та відхилення. На першому етапі досліджень використовували немічені праймери, продукти ампліфікації розділяли на вертикальному електрофорезі в поліакриламідному гелі (ПААГ), який забарвлювали, а детекцію маркерів проводили аналізуючи електрофореграми. Водночас на другому етапі досліджень використовували флуоресцентно мічені праймери, продукти ампліфікації розділяли за допомогою капілярного електрофорезу (фрагментний аналіз) на Beckman Coulter. Ряд генотипів проаналізованих на першому етапі досліджень не було включено до другого етапу. Серед проаналізованих МС локусів, спільним на обох етапах дослідження був лише локус EMPaS02. Даний локус на першому етапі досліджень виявився більш інформативним ніж на другому, що імовірно, зумовлено особливостями різних методів аналізу.

### **3.2. Підбір мінімально необхідних наборів мікросателітних маркерів**

Імовірність ідентичності ( $P_{ID}$ ) дозволяє оцінити середню імовірність того, що два незалежні зразки будуть мати ідентичні генотипи [152]. У випадку нашого дослідження,  $P_{ID}$  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.

Наведені в табл. 3.6 та табл. 3.7 МС локуси є рекомендованими Робочою групою з кісточкових культур ECPGR для гармонізації генетичного профілювання сортів черешні. Повний перелік рекомендованих локусів [48] наведено в додатку Б.

Для вибірки із 27 сортів (перший етап) черешні було оцінено як  $P_{ID}$ , так і  $P_{ID-SIB}$ , оскільки в ній представлені як неспоріднені, так і близькоспоріднені сорти черешні (рис. 3.4). З результатів оцінки випливає, що для успішного розрізнення неспоріднених сортів достатньо перших трьох локусів. Водночас, імовірність ідентичності споріднених сортів прямує до нуля лише при використанні перших п'яти – шести МС локусів.

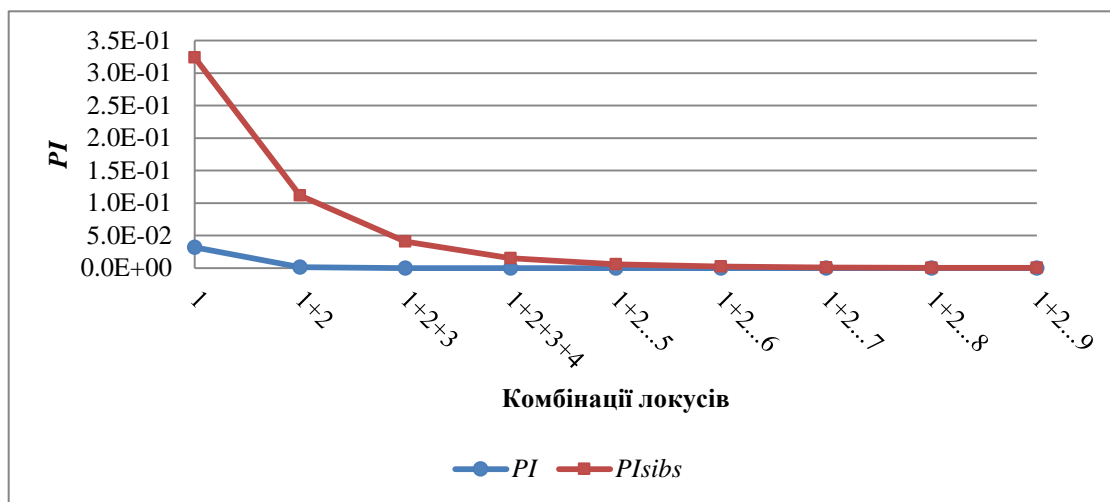


Рис. 3.4. Імовірність ідентичності ( $P_{ID}$  та  $P_{ID-SIB}$ ) сортів черешні для комбінацій МС локусів. Примітка: 1 – EMPAS02, 2 – PS12A02, 3 – EMPAS06, 4 – EMPA015, 5 – PseGA34, 6 – VPPCT039, 7 – PMS2, 8 – UDP98-412, 9 – ERPCU9168.

Використання маркерів як чотирьох (табл. 3.6), так і дев'яти МС локусів (рис. 3.4) дозволило розрізнити 24 з 27 генотипів. Не зважаючи на низьку статистичну імовірність ідентичності сортів черешні (рис. 3.4) 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 із нашого попереднього дослідження (див. пункт 3.3.1.) [242]. Вища специфічність ISSR-ПЛР маркерів імовірно пояснюється через ампліфікацію одним праймером кількох анонімних ділянок, локалізованих на різних хромосомах. Натомість мікросателітні локуси



переважно мають відому локалізацію та певний рівень поліморфізму, а при його нестачі необхідно збільшувати кількість досліджуваних локусів.

Мінімальна маркерна панель (табл. 3.6) для ідентифікації 27 досліджених сортів черешні дозволяє успішно розділити досліджені генотипи за деяким винятком. Для переліку із 27 генотипів, використаного в першій частині дослідження наведено профілі МС маркерів отримані на другому етапі досліджень (табл. 3.7).

Таблиця 3.6

## Генетичні профілі МС маркерів для ідентифікації деяких сортів черешні

Сорт		МС локуси <sup>1</sup> (розмір фрагментів, нп)			
		EMPaS02	EMPaS06	PceGA34	UDP98-412
1	Аннушка	136:144	202:212	144:146	124:126
2	Анонс	136:140	206:224	144:156	106:124
3	Аншлаг	132:156	202:212	154:156	106:124
4	Василиса прекрасна	134:138	200:212	144:146	106:124
5	Дар Млієва	130:136	200:212	144:146	106:126
6	Дачниця	132:156	200:212	144:156	106:124
7	Донецька красавиця (DON/1)	134:138	212:222	144:156	124:126
8	Дончанка	132:192	202:212	144:146	106:126
9	Казка	136:140	202:212	144:156	124:126
10	Крупноплідна	136:140	206:224	144:156	106:124
11	Ласуня	132:156	202:212	144:156	106:126
12	Легенда Млієва	132:156	202:222	144:146	124:126
13	Любава	138:156	202:210	152	106:126
14	Мелітопольська мирна	134:140	210:228	144:156	124:126
15	Мелітопольська чорна	134:138	206:222	144:156	106:126
16	Отрада	134:138	204:212	144:146	106:126
17	Престижна	132:156	210:212	144:146	106:124
18	Простір	132:156	202:216	154:156	124:126
19	Прощальна Тараненко	134:138	200:212	144:146	106:124
20	Тайна	136:144	202:212	144:146	124
21	Талісман	136:140	202:222	144:156	106:124
22	Темпоріон	136:144	200:212	144:146	124:126
23	Ярославна (YAR/1)	132:156	202:212	144:146	106:126
24	Bigarreau Hatif Burlat (BIG/2)	136:142	202	146:160	122:124
25	Kordia	138:142	198:212	140:146	124:126
26	Regina (REG/1)	138:142	198:212	140:146	126
27	Sweetheart	136:156	212	140	116:124

Примітка. <sup>1</sup> – жирними числами відмічені унікальні комбінації алелів.

Для вибірки із 94 сортів (другий етап) та форм черешні було оцінено як P<sub>ID</sub>, так і P<sub>ID-SIB</sub>, оскільки в ній представлені як неспоріднені, так і близькоспоріднені сорти черешні (рис. 3.5). З результатів оцінки випливає, що для успішного

розрізнення неспоріднених сортів достатньо перших трьох локусів. Водночас, імовірність ідентичності споріднених сортів прямує до нуля лише при використанні перших п'яти – шести МС локусів.

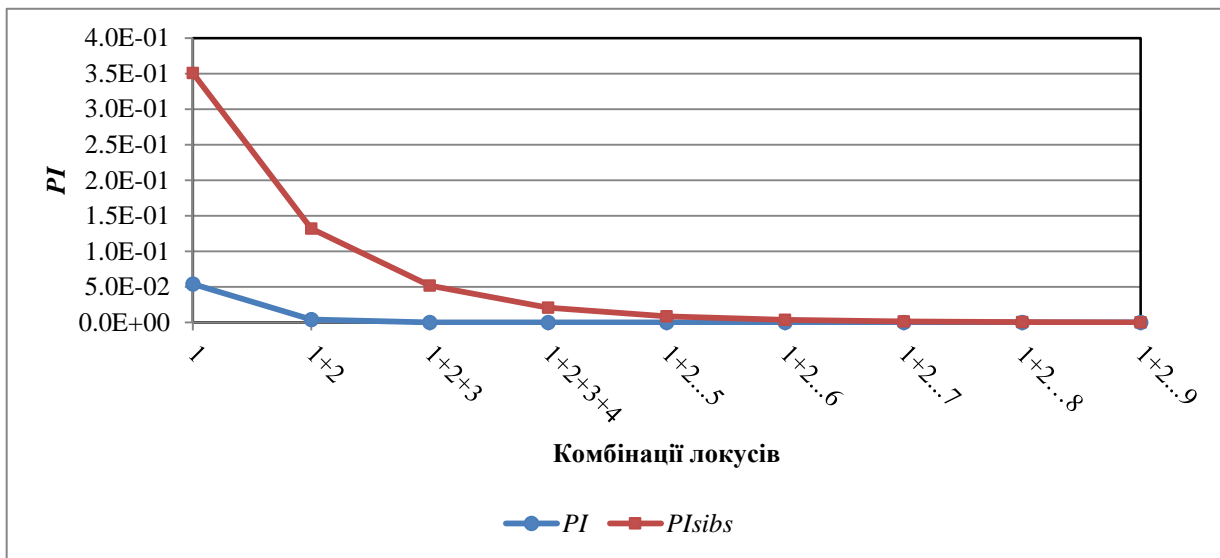


Рис. 3.5. Імовірність ідентичності ( $P_{ID}$  та  $P_{ID-SIB}$ ) сортів та форм черешні для комбінацій МС локусів. Примітка: 1 – ВРРСТ037, 2 – EPDCU3392, 3 – ВРРСТ040, 4 – CPSCU034, 5 – pchgms55, 6 – EPPB4230, 7 – EMPaS02, 8 – UDP98-022, 9 – ERPCU3090.

Використання дев'яти (з 18) МС локусів з найвищими дискримінаційними показниками дозволило розрізнити 90 генотипів. Як і на першому етапі дослідження, не зважаючи на низьку статистичну імовірність ідентичності сортів черешні (рис. 3.5), 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. 3.7), що відносяться до рекомендовано переліку дозволило ідентифікувати 81 генотип. З їх використанням не вдалося розрізнити наступні пари близькоспоріднених сортів: Шанс – форма VAL/3, Прощальна Тараненко – Василиса прекрасна, Анонс – Крупноплідна – Етика, Зоряна – Легенда Млієва, та Тайна – Аннушка.

## Генетичні профілі МС маркерів для ідентифікації деяких сортів черешні

Сорт		МС локуси <sup>1</sup> (розмір фрагментів, нп)					
		ВРРСТ037	ЕМРА002	ЕМРА026	ЕМPaS02	ЕМPaS10	ЕМPaS14
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 (DON/1)	170:170	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	158:158	124:126	238	158:164	180	218:220
17	Престижна	164:172	124	238	158	170:180	218:220
18	Простір	172:172	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 (YAR/1)	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

Отже, використані МС локуси з рекомендованого переліку (табл. 3.7) мають обмежені дискримінаційні можливості та не в повній мірі придатні для ідентифікації великої кількості генотипів черешні.

### 3.3. Генетична конституція та спорідненість сортів черешні

#### 3.3.1. ISSR-ПЛР маркери

Із використанням восьми ISSR праймерів (193 маркерні смуги) було оцінено 24 сорти черешні. В результаті аналізу ISSR-ПЛР даних найвищим показником виявилось значення  $\ln P(D) = -1523,6$  при  $K=3$ . Графічне зображення приналежності окремих сортів до певних груп (генетичних пулів) було отримано в програмі STRUCTURE (рис. 3.6). Найбільш статистично вірогідною була приналежність досліджуваних сортів до трьох генетичних пулів ( $K = 3$ ). На бар-діаграмі добре видно, що всі сорти черешні (за винятком сорту Мелітопольська чорна), що походять із Мелітопольської ДСС (рис. Г.1), демонструють подібність між собою і можуть бути віднесені до одного генетичного пулу.

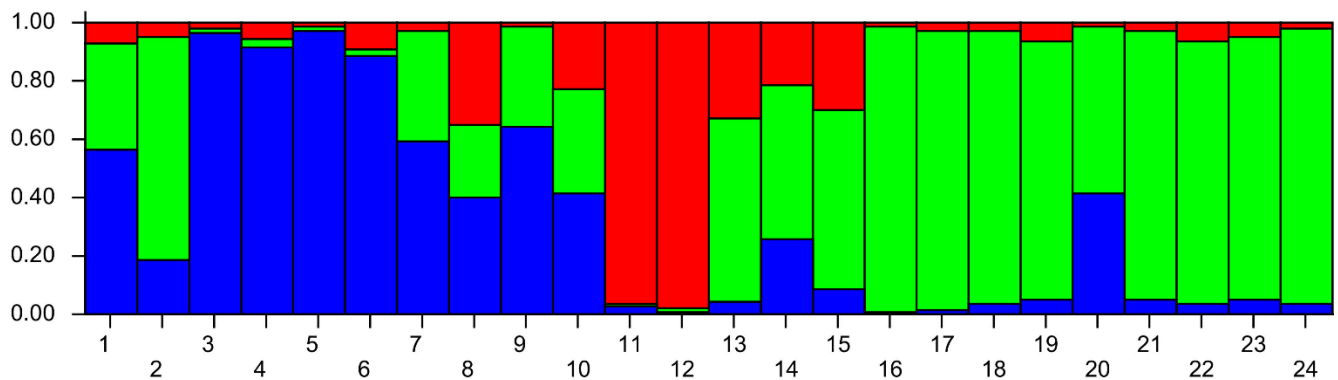


Рис. 3.6. Генетична конституція українських сортів черешні. Кожен сорт зображений окремою вертикальною колонкою, яка поділена на три частини, що відображають оцінену частку відношення до трьох генетичних пулів: 1 – Валерій Чкалов (VAL/3), 2 – Мелітопольська чорна, 3 – Анонс, 4 – Талісман, 5 – Крупноплідна, 6 – Казка, 7 – Мелітопольська мирна, 8 – Темпоріон, 9 – Аншлаг, 10 – Ласуня, 11 – Прощальна Тараненко, 12 – Василиса прекрасна, 13 – Донецька красавиця (DON/1), 14 – Отрада, 15 – Аннушка, 16 – Ярославна (YAR/1), 17 – Ніжність (NIJ/2), 18 – Любава, 19 – Китаївська чорна (KYT/3), 20 – Легенда Млієва, 21 – Дар Млієва, 22 – Регіна (REG/1), 23 – Бігарро Бурлат (BIG/2), 24 – Дрогана жовта (DRO/1).

До другого пулу можна віднести майже всі сорти (за винятком сортів Василиса прекрасна та Прощальна Тараненко) Артемівської ДСР, деякі інші сорти української селекції, які мають предкові форми європейського походження

(Мелітопольська чорна, Ярославна, Ніжність, Любава, Китаївська чорна, Легенда Млієва, Дар Млієва) та сорти із Західної Європи (Регіна, Бігарро Бурлат, Дрогана жовта). І, нарешті, два сорти – Василиса прекрасна і Прощальна Тараненко, які виявились подібними між собою та відмінними від решти досліджуваних сортів, відносяться до третього генетичного пулу. Більше половини досліджуваних сортів можна віднести до одного з трьох генетичних пулів, тоді як решта сортів мають суттєву частку генетичної інформації різних генетичних пулів, тобто є генетично гетерогенними.

Для визначення генетичної подібності між дослідженими сортами черешні застосовували метод UPGMA-кластеризації. Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти на п'ять кластерів – А–Е (рис. 3.7).

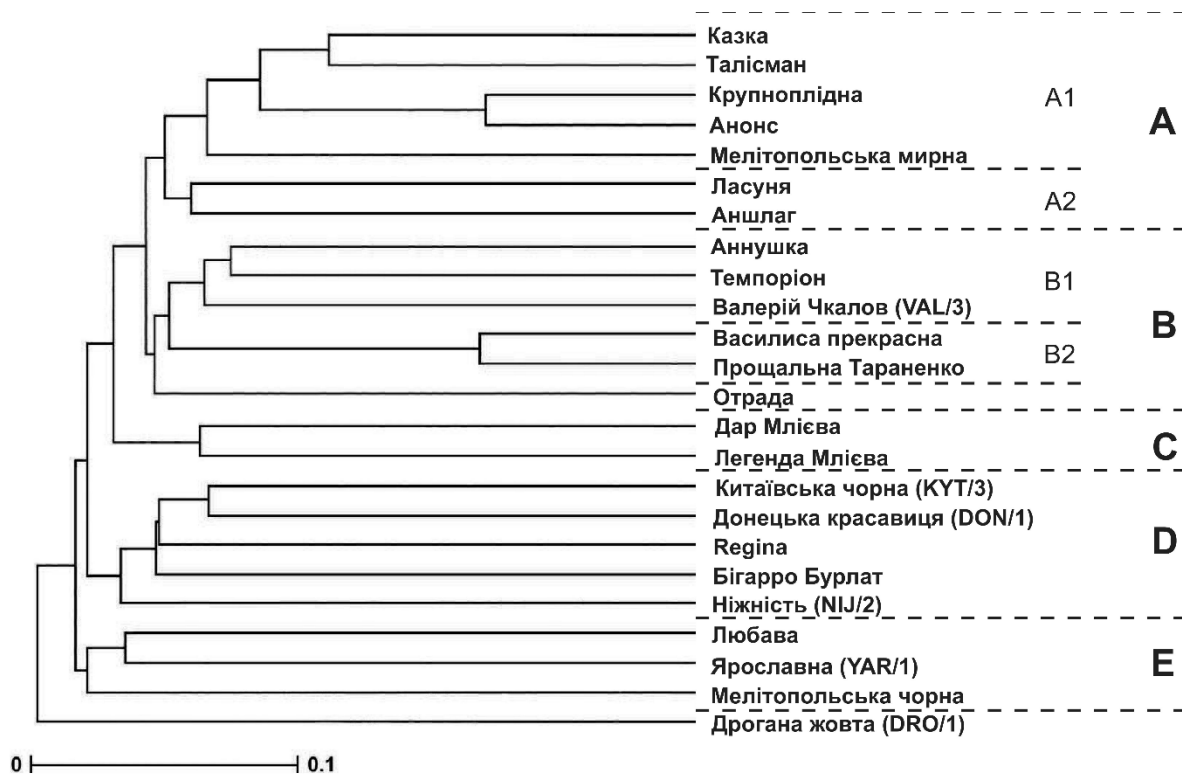


Рис. 3.7. Кладограма генетичної спорідненості 24 сортів черешні побудована методом UPGMA з використанням восьми ISSR праймерів.

### 3.3.2. Мікросателітні маркери

На першому етапі досліджень, із використанням праймерів без флуоресцентних міток (див. табл. 2.3) до дев'яти МС локусів (66 смуг) було оцінено 27 сортів черешні. Для визначення генетичної подібності між дослідженими

сортами черешні було застосовано метод UVGMA-кластеризації (рис. 3.8). 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 [66]. Важливим параметром, що показує ступінь узгодженості між значеннями дистанцій на дендрограмі та вихідною матрицею дистанцій є коефіцієнт кофенетичної кореляції [188]. В нашому дослідженні значення цього коефіцієнту ( $r = 0.898$ ) було значно вищим у порівнянні з подібним дослідженням ( $r = 0.659$ ), де проводилась ідентифікація 24 сортів черешні за допомогою 13 мікросателітних локусів [188].

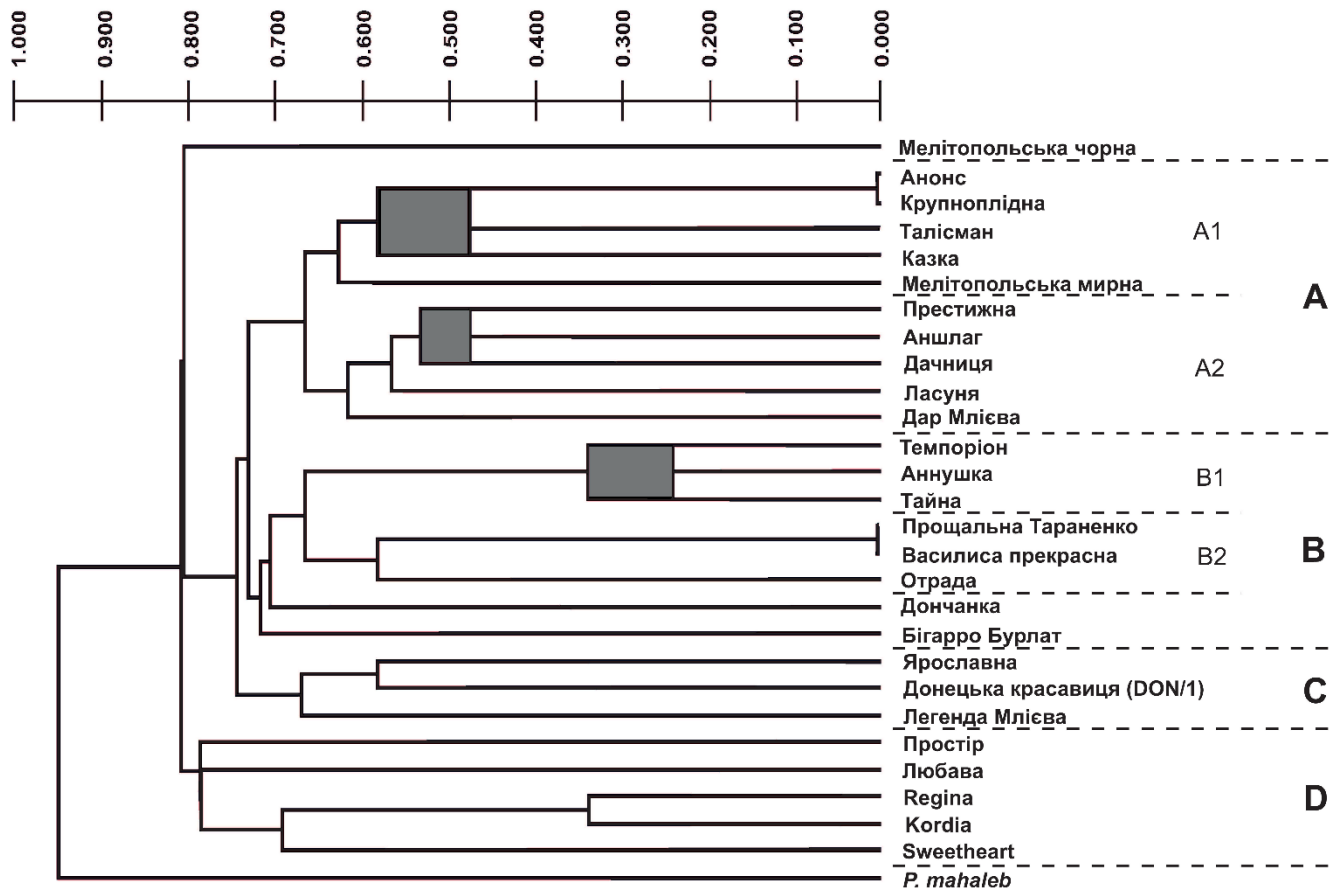


Рис. 3.8. Кладограма генетичної спорідненості 27 сортів черешні побудована методом UVGMA з використанням 66 МС маркерів.

Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти на чотири кластери – А-Д (рис. 3.8).

До кластерів А і В увійшли сорти, в яких однією з предкових форм у  $F_1$ - $F_2$  був сорт Валерій Чкалов, що є гібридом кавказького походження. Зокрема, до підкластера А1 належать п'ять сортів: Анонс, Крупноплідна, Талісман, Казка та Мелітопольська мирна. Три з них, Талісман, Казка та Мелітопольська мирна є гібридами від схрещування старого німецького сорту Дрогана жовта та Валерій Чкалов. Материнською формою двох інших сортів, Анонс і Крупноплідна є сорт Наполеон біла (*Bigarreau Napoleon blanc*), який є соматичним бруньковим мутантом сорту Дрогана жовта [248]. При створенні сортів Крупноплідна та Анонс материнську форму Наполеон біла було запилено сумішшю пилку декількох сортів, серед яких був і пилок сорту Валерій Чкалов (див. табл. 1). З огляду на розташування сортів Крупноплідна та Анонс на дендрограмі у кластері А1, логічно допустити, що батьківською формою для них був саме сорт Валерій Чкалов. При цьому чотири сорти – Анонс, Крупноплідна, Казка та Талісман - демонструють таку високу спорідненість, що однозначно з'ясувати їх взаємну ієрархію неможливо. Водночас, Мелітопольська мирна виявилась більш віддаленою формою в підкластері А1.

Підкластер А2 сформували сорти: Аншлаг, Ласуня, Престижна, Дачниця та Дар Млієва. Сорти Аншлаг та Ласуня походять від однієї батьківської пари Цешенська жовтнева (*Zöschener Oktober Knorpelkirsche*, старий німецький сорт) × Престижна. В свою чергу, Престижна є нащадком батьківської пари Наполеон біла та Валерій Чкалов [252]. Що стосується сорту Дачниця, то його було отримано шляхом запилення сорту Наполеон біла сумішшю пилку декількох сортів, серед яких був і пилок сорту Валерій Чкалов (див. табл. 1). Більш віддалене положення в кластері А2 займає сорт Дар Млієва, який було отримано шляхом вільного запилення сорту вишні Любская. Можна припустити, що батьківською формою сорту Дар Млієва міг бути один із сортів, що належать до підкластеру А2 або якась інша генетично близька форма. Отже, в цілому виявлена нами висока спорідненість сортів у підкластері А2 та їх подібність до сортів підкластера А1 добре узгоджується із наявною в літературі інформацією щодо походження цих сортів.

До підкластера В1 належать три сорти: Темпоріон, Аннушка і Тайна. Сорт Темпоріон виник від запилення сорту Дрогана жовта сумішшю пилку Валерій

Чкалов та Сонячний шар. Сорт Аннушка було створено шляхом гібридизації сортів Дончанка (який було отримано з насіння Дрогани жовтої) та Валерій Чкалов. Отже, висока спорідненість сортів Темпоріон та Аннушка пояснюється їх походженням від сортів, які мають спільний генетичний матеріал. Проте, несподіваним видається розміщення в цьому ж кластері сорту Тайна, що походить від схрещування сортів Китаївська чорна та Скороспілка та має в значній мірі західноєвропейське походження. Отже, приналежність дослідженого нами зразка сорту Тайна до підкластеру В1 потребує подальшого прояснення.

До підкластера В2 увійшли три сорти: Прощальна Тараненко (Д 54-82 (Дончанка × Валерій Чкалов) × Джерело), Василиса прекрасна (Донецький уголюк × Донецька красавиця) та Отрада (Аннушка × Анонс). Спорідненість цих сортів пояснюється тим, що батьківські форми, тобто, сорти Донецький уголюк, Донецька красавиця, Дончанка, Джерело, Анушка та Анонс – було отримано з участю сортів Валерій Чкалов та/або Дрогана жовта [244, 247, 253]. Більш віддалено відносно кластерів В1 та В2 розташовані сорти Донецька красавиця та Бігарро Бурлат. Таке розміщення сорту Донецька красавиця (Дрогана розова × Валерій Чкалов) узгоджується із гіпотезою про його походження від старого німецького сорту Наполеон рожева (Bigarreau Napoleon), клоном якого імовірно був сорт Дрогана розова.

Кластер С утворився із сортів Ярославна, Дончанка та Легенда Млієва. Спільним для цих сортів є те, що Ярославна та Дончанка виникли від вільного запилення сорту Дрогана жовта. Цей останній сорт приймав участь і в походженні сорту Легенда Млієва, який є сіянцем сорту Крупноплідна (Дрогана жовта × Валерій Чкалов; підкластер А1). Уточнення батьківських форм сортів, що належать до кластеру С, потребує подальших досліджень.

Ізольоване зовнішнє розташування відносно кластерів А, В та С показує сорт Мелітопольська чорна, що походить від вільного запилення сорту Французька чорна. Цей сорт видається найбільш генетично своєрідним з усіх досліджених форм.

Кластер D, який є зовнішньою групою для всіх решти досліджених сортів черешні, формують три європейські сорти: Регіна, Кордія, Світхарт та два сорти



української селекції: Простір і Любава. Сорти закордонної селекції розмістились підкластером, тоді як Простір і Любава є генетично віддаленими між собою та займають ізольовану позицію у кластері D. Причиною такого розміщення можна вважати їх походження: Простір утворився від схрещування сортів Франц Йосиф (Emperor Francis) та Валерій Чкалов, тоді як Любава є сіянцем сорту Дрогана жовта.

На загал, дендрограма, отримана на основі порівняння наборів SSR-ПЛР маркерів (рис. 3.8) за своєю структурою переважно узгоджується із нашим попереднім дослідженням (рис. 3.7), де використовувались ISSR-ПЛР маркери [242]. Відмінності у кластеризації зумовлені різницею в кількості досліджених генотипів, використанні різних типів маркерів, їх кількості, характеру успадкування та алгоритмами кластеризації відповідних методів. Зокрема, наші результати отримані з використанням MS маркерів на першому етапі досліджень, підтверджують високу генетичну подібність та взаємне розміщення на дендрограмі в першу чергу близько споріднених сортів, що входять до складу кластерів A і B 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. Також при дослідженні невеликої вибірки сортів, серед яких є декілька генетично віддалених генотипів під час кластеризації можливий прояв ефекту об'єднання довгих гілок (long-branch attraction, LBA), що є формою систематичних помилок у філогенетиці. Зважаючи на ці обставини, взаємне розміщення генотипів на дендрограмі завжди має імовірнісний характер.

На другому етапі досліджень із використанням флуоресцентно мічених праймерів (див. табл. 2.3) до 19 MS локусів (151 маркер) було оцінено 94 сорти та форми черешні. В результаті аналізу алельних даних, найвищим показником було значення  $\ln P(D) = -4214.2$  при  $K = 10$ . Графічне зображення приналежності окремих сортів та форм до певних груп (генетичних пулів) оцінювалось в програмі STRUCTURE (рис. 3.9). Найбільш статистично вірогідною була приналежність досліджуваних сортів до десяти генетичних пулів ( $K = 10$ ).

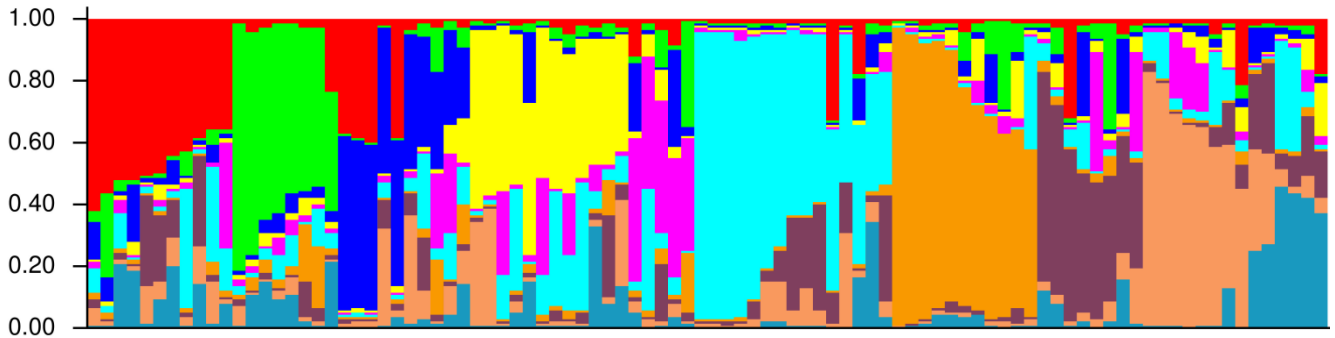


Рис. 3.9. Генетична структура 94 сортів та форм черешні

Додатково було оцінено також середню імовірність приналежності (average probability of assignment,  $Q$ ) кожного із 94 генотипів дослідженої вибірки до ідентифікованих десяти генетичних пулів (рис. 3.10). 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 ГСН.

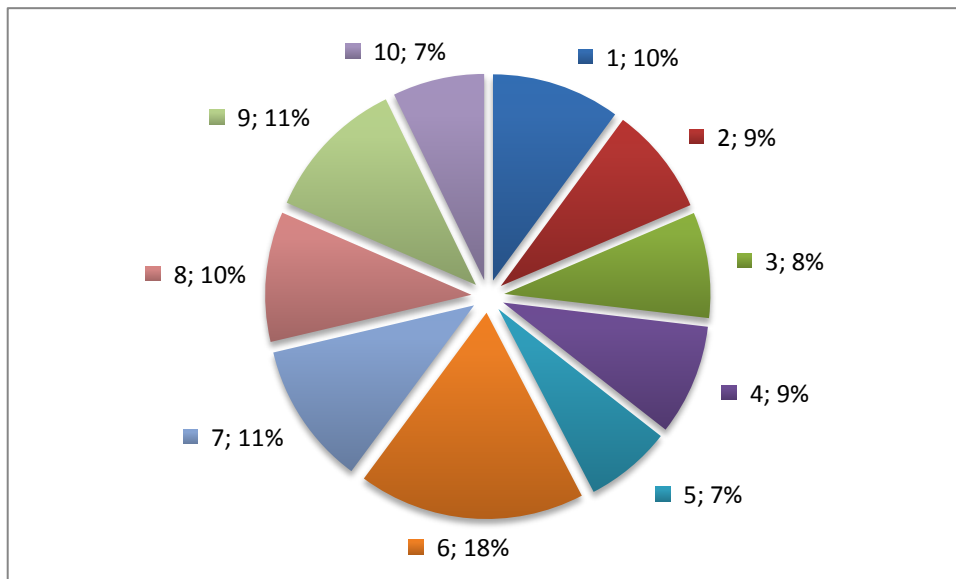


Рис. 3.10. Приналежність дослідженої вибірки сортів та форм черешні до кожного з 10 генетичних пулів. Відсотками показано середнє значення імовірності приналежності ( $Q$ ) до генетичних пулів.

Перший генетичний пул представлений переважно сортами та формами, батьківськими формами яких слугували західноєвропейські сорти (зокрема, Дрогана жовта та Денисена жовта). Сюди ввійшли Дончанка, Желточек, Амазонка,

Любава, Червнева, три західноєвропейські сорти Margit, Garnet та Lapins, а також форми KYT/3, AVCV7 та AVL1 ( $Q \geq 0,6$ ).

До другого генетичного пулу ввійшли сорти західноєвропейської селекції. Типовими представниками кластеру є сорти Folfer та Sato Nishiki ( $Q \geq 0,7$ ). До даного генетичного пулу ввійшли також сорти Scwecja A. та Bigarreau Hâtif Burlat ( $Q \geq 0,6$ ), Adriana, Napoleon, форма AVCV2 та сорт туніського походження.

До третього генетичного пулу ввійшли переважно сорти селекції Артемівської ДСС. Яскравих представників даного генетичного пулу в дослідженій вибірці сортів не виявилось, оскільки дана група сортів генетично гетерогенна. Найбільш типовими представниками є сорти Тайна, Руксандра, Аннушка, Темпоріон та Отрада. Також до даного пулу ввійшли сорти Донецька красавиця (DON/1), Донецька рання, Щедрість та Regina. Найвищий рівень генетичної гетерогенності виявлено у сорту Донецька рання, в геномі якого на домінуючий третій генетичний пул припадає лише 22,8 % (а частка кожного з інших 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 мліївські сорти Зоряна, Легенда Млієва та Бірюза. Також до даного пулу ввійшли сорти Присадибна, форма DRO/1, Сестрьонка, Джерело, Коралова, Леся, Показкова, Єдина та Студентка.

До п'ятого генетичного пулу ввійшли сорти Шанс, Мліївська чорна, Жабуле, Cristobalina та форма VAL/3. Чіткий зв'язок між сортами у даній групі прослідкувати важко, зокрема, через значний рівень генетичної гетерогенності 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 є гібридна форма Д

58-52, форма OLE/1, сорти Казка та Міраж ( $Q \geq 0,8$ ), Аншлаг ( $Q \geq 0,7$ ) та Електра ( $Q \geq 0,6$ ). Також до цієї групи було віднесено сорти Мелітопольська мирна, Ласуня, Талісман, Валерія, Престижна, Простір, форма DON/2 та Аеліта.

До сьомого генетичного пулу ввійшли ландраси Харата, Saint Georges, культивовані форми дикої черешні із Чернівецької та Київської області AVCV3, AVCV4, AVCV5, AVCV6, AVCV8, AVKV1, декоративний сорт Plena та форми NIJ/2 і GEN/1. 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  $Q \geq 0,6$ . Частково генетичний матеріал цього пулу було виявлено у сортів Cristobalina, Regina, Adriana, Донецька рання, Єдина та у форми AVCV2, що має західноєвропейське походження. Цей факт може свідчити про участь в селекційному процесі згаданих сортів дикорослих предкових форм, що відобразилось на їх генетичній конституції.

До восьмого генетичного пулу ввійшли сорти, батьківськими формами яких слугували різні західноєвропейські сорти. Найбільш типовими представниками пулу є Денисена жовта та Зодіак ( $Q \geq 0,6$ ). Інші представники даної групи виявили різний рівень генетичної гетерогенності. До кластеру було віднесено наступні сорти української селекції: Мелітопольська чорна, Ярославна, Рання розова, Дар Млієва, Нектарна та форма AVCV1.

До дев'ятого генетичного пулу ввійшли сорти Прощальна Тараненко ( $Q \geq 0,9$ ) та Василиса прекрасна ( $Q \geq 0,8$ ), які в значній мірі характеризуються генетично гомогенною структурою. Також до даної групи ввійшли сорти Анонс, Крупноплідна, Етика ( $Q \geq 0,6$ ), гібридна форма Д 44-15, Дачниця, Наяда, Донецький угольок та форма YAR/2.

До десятого генетичного кластеру ввійшли генетично гетерогенні сорти Ювілейна мліївська, Аборигенка, Веселка, форма SES/2.

В нещодавньому дослідженні [41], де вивчались 210 сортів (з них, 99 – ландраси, 27 – сорти ранньої селекції та 84 – сорти сучасної селекції) черешні в колекції генетичних ресурсів INRA (Франція) із 16 країн-оригінаторів було ідентифіковано дев'ять генетичних кластерів. Кількість кластерів ( $K = 9$ ) була визначена за результатами розрахунків з використанням STRUCTURE та

дискримінінтного аналізу головних компонент (Discriminant Analysis of Principal Components, DAPC). Проте, до цього дослідження не були включені ні сорти української селекції, ні селекції інших східноєвропейських країн.

Вихідні положення моделей популяційної генетики, що реалізовані в STRUCTURE можуть обмежувати їх використання при дослідження культурних рослин. На відміну від природних популяцій, культурні рослини зазнають інтродукції, селекції, клонального розмноження; для них не виконуються умови панміксії. Незважаючи на ці обмеження STRUCTURE та споріднені програми, в яких реалізована Баєсівська статистика, досить часто використовуються для з'ясування генетичної конституції та спорідненості не лише в природних популяціях [96], але й різних культурних рослин, плодкових культур і черешні [41, 65, 72, 80, 86] зокрема.

У додатку Д.1 наведено графічне порівняння результатів філогенетичного аналізу із конституцією сортів (результати STRUCTURE) та подібними, раніше опублікованими результатами [41]. Використовуючи референтні сорти (рис. Д.1.А) з нещодавнього дослідження [41] забарвлені лінії (філи) відповідають сортам, що належать до дев'яти генетичних пулів (рис. Д.1.Б). Порівняння результатів філогенетичного аналізу та конституції досліджених 94 сортів та форм черешні наведено на рис. Д.2.

В нашому дослідженні 15 референтних сортів з дев'яти генетичних пулів, виявлених попередньо [41], 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 кластеру 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<sub>1</sub>-F<sub>3</sub>), предковими формами яких були переважно західноєвропейський сорт Дрогана жовта, її клон Наполеон біла та український сорт Валерій Чкалов.

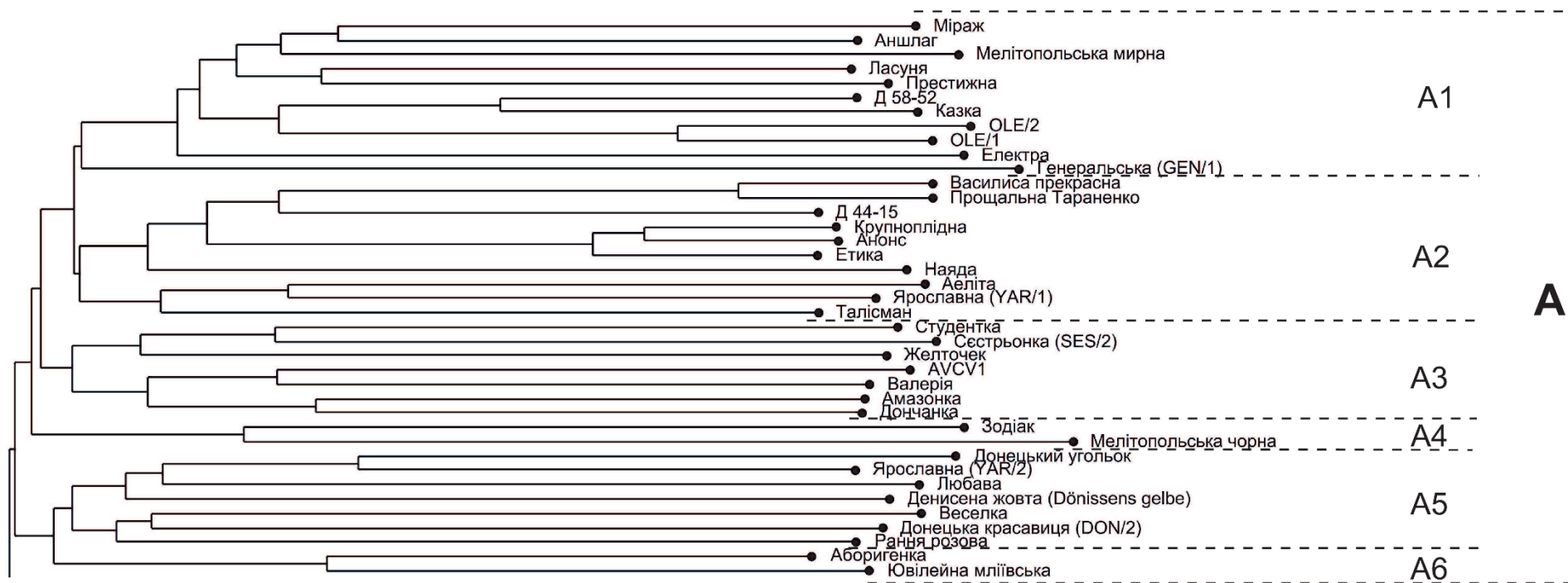


Рис. 3.11. Кладограма генетичної спорідненості 94 сортів та форм черешні побудована методом N-J на основі маркерів із 18 MS локусів та S-локусу.

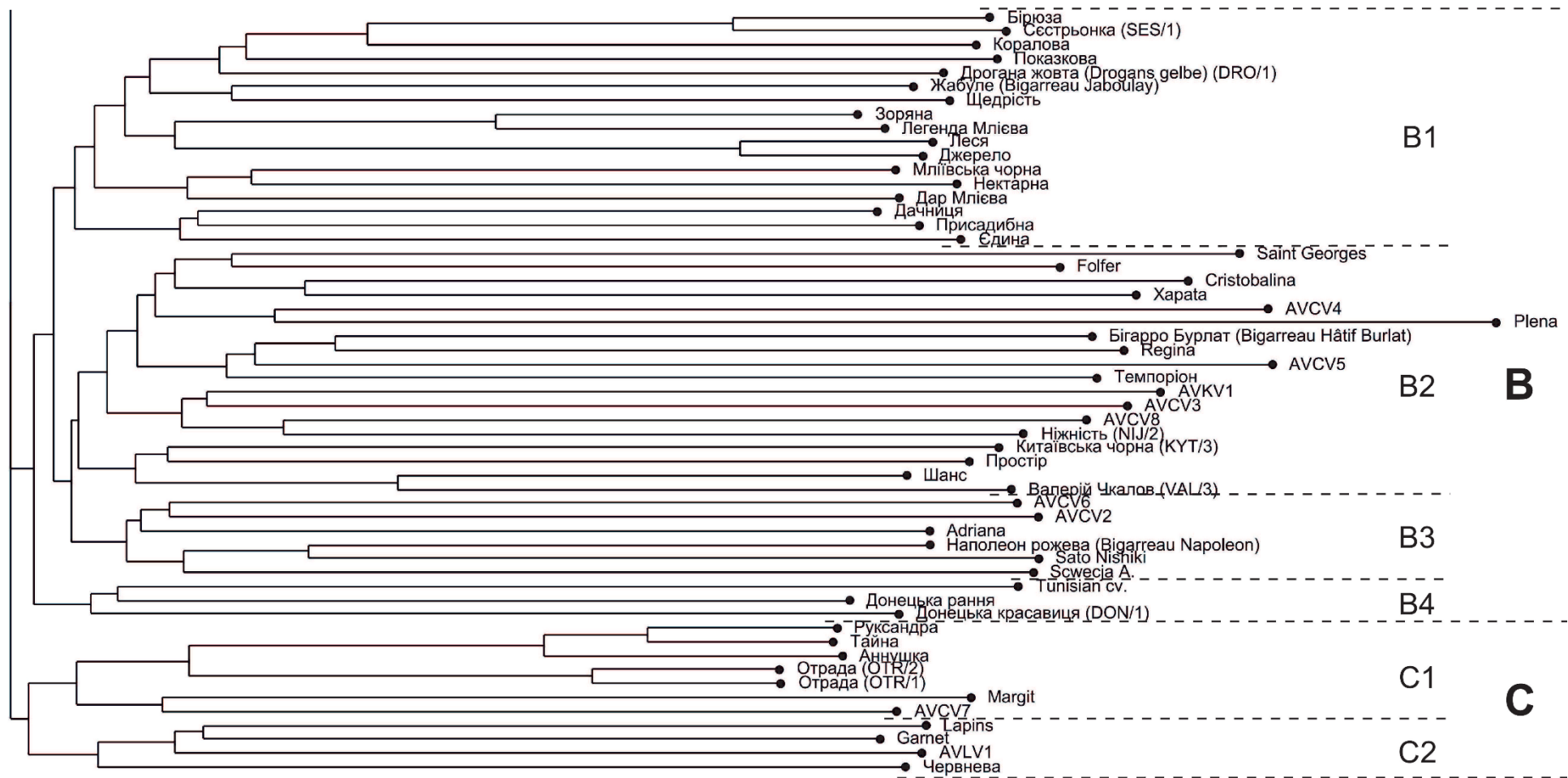


Рис. 3.11. Кладограма генетичної спорідненості 94 сортів та форм черешні побудована методом N-J на основі маркерів із 18 MS локусів та S-локусу.

Глибоке знання генетичної структури геноплазми та ідентифікація пулів можуть бути використані для добору батьківських форм у селекційних програмах. Також це сприятиме більш повному використанню генетичного різноманіття та підвищить потенційну вигоду від селекції в майбутньому [41].

На другому етапі досліджень, із використанням флуоресцентно мічених праймерів (див. табл. 2.3) до 18 МС локусів (151 маркер) та маркерів з *S*-локусу було оцінено 94 сорти та форми черешні. Генетичну спорідненість між дослідженими сортами та формами черешні (рис. 3.11) було оцінено використовуючи незважений метод об'єднання найближчих сусідів.

Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти та форми на три кластери – А-С (рис. 3.11).

До кластеру А переважно увійшли сорти, в яких однією з предкових форм у  $F_1$ - $F_2$  був сорт Валерій Чкалов або Дрогана жовта (чи його клон Наполеон біла). Зокрема, до підкластера А1 належать 11 сортів та форм: Міраж, Аншлаг, Мелітопольська мирна, Ласуня, Престижна, гібридна форма Д 58-52, Казка, форми OLE/1 та OLE/2, Електра. П'ять з них, Міраж, Мелітопольська мирна, Престижна, Казка та Електра є гібридами від схрещування старого німецького сорту Дрогана жовта (та його клону Наполеон біла) та Валерій Чкалов. Сорти Аншлаг та Ласуня походять від однієї батьківської пари Цешенська жовтнева × Престижна. Сорт Престижна, в свою чергу, є нащадком батьківської пари Наполеон біла та Валерій Чкалов. Форма GEN/1 займає дещо віддалене положення відносно підкластеру А1. Походження форм (OLE/1, OLE/2 та GEN/1), що увійшли до підкластера А1 достовірно не відомо.

До підкластера А2 увійшло 10 сортів та форм: Василиса прекрасна (Донецький угольок × Донецька красавиця), Прощальна Тараненко (Д 54-82 (Дончанка × Валерій Чкалов) × Джерело), гібридна форма Д 44-15, Крупноплідна та Анонс (Наполеон біла × суміш пилку), Етика (Дончанка × Валерій Чкалов), Наяда (Рожева мліївська в.з.), Аеліта (Дрогана жовта в.з.), Ярославна (YAR/1; Дрогана жовта в.з.) і Талісман (Дрогана жовта × Валерій Чкалов). Спорідненість цих сортів пояснюється тим, що ці сорти або їх



батьківські форми, тобто, сорти Донецький угольок, Донецька красавиця, Дончанка, Джерело – було отримано з участю сортів Валерій Чкалов та/або Дрогана жовта (та його клону Наполеон біла). Походження гібридної форми Д 44-15 невідомо. Розміщення сорту Наяда в підкластері А2 імовірно спричинене тим, що його батьківською формою є споріднений із переліченими сортами генотип.

До підкластера А3 увійшли сім сортів та форм: Студентка (Сестрьонка × Донецька красавиця), Сестрьонка (SES/2; Гібрид (Денисена жовта × Гріот Остгеймський) в.з.), Желточек, форма AVCV1 (ландраса), Валерія (Дончанка × Валерій Чкалов), Амазонка та Дончанка (Дрогана жовта в.з.).

Підкластер А4 займає віддалене положення на дендрограмі відносно підкластерів А1-А3, а формують його два сорти: Зодіак (Дрогана жовта × Тавричанка) та Мелітопольська чорна (Французька чорна в.з.). В свою чергу батьківськими формами сорту Тавричанка були Франц Йосиф (Emperor Francis) та Рання Маркі (Früheste der Mark).

Підкластери А5 та А6 дещо віддалені від А1-А4. До підкластера А5 увійшли сім сортів: Донецький угольок (Дрогана жовта × Валерій Чкалов), Ярославна (YAR/2; Дрогана жовта в.з.), Любава (Дрогана жовта в.з.), Денисена жовта (Dönissens gelbe Knorpel.), Веселка, Донецька красавиця (DON/2; Дрогана розова × Валерій Чкалов) та Рання розова (Дрогана жовта × Скороспілка). В свою чергу батьківськими формами сорту Скороспілка були Франц Йосиф та Рання Маркі. Походження сорту Веселка невідомо.

До підкластера А6 увійшли два сорти: Аборигенка та Ювілейна мліївська (Франц Йосиф в.з.). Походження сорту Аборигенка невідомо.

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, включав як ряд західноєвропейських сортів, так і сорти української селекції, створені за їх участі. До підкластера В1 увійшли 17 сортів, з яких 15 української селекції: Бірюза (Чорна Ільчишина × Гаврилівська

+ Гінь Мліїва + 2120), Сестрьонка (SES/1; Гібрид (Денисена жовта × Гріот Остгеймський) в.з.), Коралова (Форма 120 × Нектарна + Рожева мліївська + Чорна Ільчишина), Показкова, Щедрість, Зоряна (Форма 2120 × Нектарна + Чорна Ільчишина + Рожева мліївська), Легенда Млієва (Крупноплідна в.з.), Леся (Красна плотна × Валерій Чкалов), Джерело ((Дрогана жовта) в.з. × Валерій Чкалов), Мліївська чорна та Нектарна (Наполеон біла в.з.), Дар Млієва (Любская в.з.), Дачниця (Наполеон біла × суміш пилку), Присадибна (Денисена жовта × Жабуле), Єдина, а також два західноєвропейські сорти (Жабуле та Дрогана жовта, DRO/1). Походження сортів Показкова, Щедрість та Єдина невідомо. Водночас, Форма 2120 є дюком від схрещування сортів черешні Дрогана жовта та вишні Любская. На загал, сорти черешні Дар Млієва, Зоряна, Сестрьонка та імовірно Бірюза є або дюками, або походять від них. Існування таких сортів є цікавим прикладом гібридизації видів, які відрізняються рівнем плоїдності, а виникнути вони могли в результаті запилення після нерівномірного розходження хромосом при гаметогенезі.

До підкласера В2 увійшли 18 сортів та форм, сім з яких західноєвропейського походження: Saint Georges, Cristobalina та Харата (ландраси), Plena (дикоросла декоративна форма), Folfer, Regina та Бігарро Бурлат (Bigarreau hâtif Burlat). Решта з них: AVCV3, AVCV4, AVCV5, AVCV8, AVKV1 (ландраси), форми NIJ/2, KYT/3, VAL/3, сорти Темпоріон (Дрогана жовта × Валерій Чкалов + Сонячний шар), Простір (Франц Йосиф × Валерій Чкалов) та Шанс (Дрогана жовта в.з.) українського походження. Приналежність дослідженого нами зразка сорту Темпоріон до підкласеру В2 потребує подальшого прояснення.

До підкласера В3 увійшли чотири західноєвропейські сорти: Adriana, Наполеон рожева (Bigarreau Napoleon), Sato Nishiki, Scwecja A. та форми AVCV2 і AVCV6.

Підкласер В4 займає віддалене розміщення відносно підкласерів В1-В3. Увійшли до нього Донецька рання (Китаївська чорна × Скороспілка), Донецька красавиця (DON/1; Дрогана розова × Валерій Чкалов) та сорт туніського походження. Приналежність досліджених нами зразків сортів

Донецька рання та Донецька красавиця до підкластеру В4 потребує подальшого прояснення.

Кластер С є зовнішньою групою для всіх решти досліджених сортів черешні. До підкластера С1 увійшли сорти: Руксандра (Дончанка × Валерій Чкалов), Тайна (Китаївська чорна × Скороспілка), Аннушка (Дончанка × Валерій Чкалов) та Отрада (Аннушка × Анонс). Сорт Margit та форма AVCV7 генетично віддалені відносно решти сортів у підкластері С1. До підкластера С2 увійшли сорти Lapins та Garnet. Водночас, сорт Червнева (Денисена жовта в.з.) та форма AVLV/1 генетично віддалені відносно західноєвропейських сортів у підкластері С2.

Результати досліджень були опубліковані в:

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

2. 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.

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

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

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

6. 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. B. Aquitaine/A3C, Trans.) (pp. 1-13). Bordeaux: INRA. doi: 10.13140/RG.2.2.11739.98080.

7. 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. doi: 10.3103/S0095452717010066

8. 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. doi: 10.1080/14620316.2017.1342568.

## РОЗДІЛ 4. МАРКЕР-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ДОБІР СОРТІВ ЧЕРЕШНІ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

### 4.1. Вивчення варіації алельних станів гена *PavCNR12*

#### 4.1.1. 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, віртуальну (*in silico*) ПЛР із праймерами CNR12-C2-F та -R та наступне віртуальне (*in silico*) розщеплення ампліфікатів ендонуклеазами рестрикції (рестриктазами) з використанням SMS (The Sequence Manipulation Suite), BLAST® та Geneious 4.8.5 [4, 103, 192]. Метою цього аналізу було виявлення рестриктаз, застосування яких дозволяє отримувати відмінний набір фрагментів для трьох відомих алелів гена *PavCNR12* (рис. 4.1 та 4.2) [235, 238, 240, 254].

За підсумками проведеного пошуку було встановлено, що очікувана довжина ПЛР-продукту має становити 917 нп. Рестриктаза *AclI* (AA↓CGTT) має лише один сайт впізнавання в першому алельному варіанті, тобто має розщеплювати ПЛР-продукт на фрагменти з очікуваними розмірами 252 та 665 нп. При використанні *BsrGI* (T↓GTACA) для першого алельного варіанту мають утворюватись фрагменти 110/207/600 нп, а для другого та третього – 207/710 нп; при використанні *RsaI* (GT↓AC) очікувані розміри фрагментів рестрикції для першого алельного варіанту становлять 80/110/125/602 нп, а для другого та третього – 80/125/712 нп. Таким чином, застосування кожної з цих трьох рестриктаз дозволяє відрізнити алель *PavCNR12-1* від алелів *PavCNR12-2* та *PavCNR12-3*.

На противагу цьому за використання рестриктази *TaiI* (ACGT↓) (або її ізошизомеру *MaeII* - A↓CGT) можливо диференціювати всі три 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 (рис. 4.2).

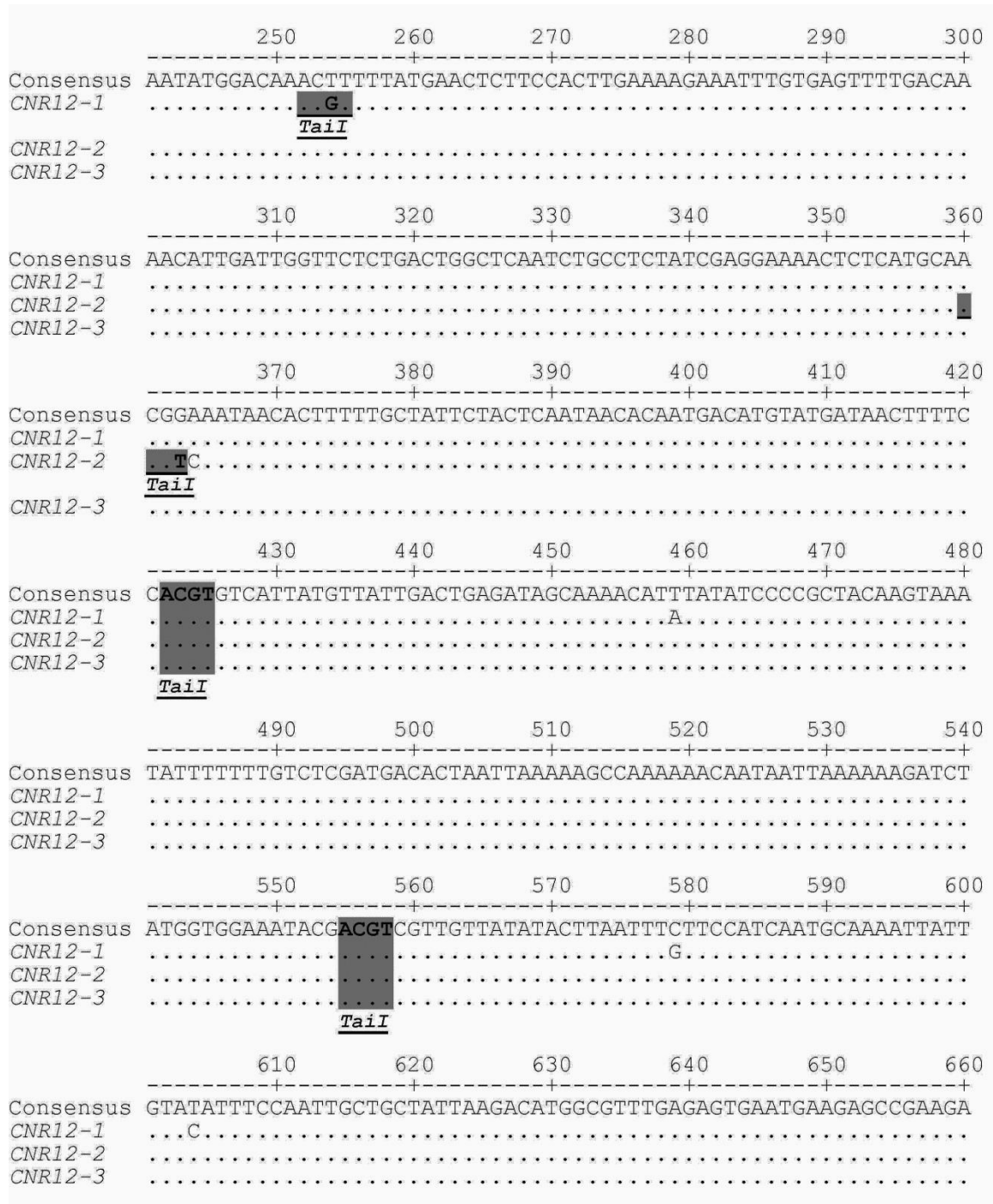


Рис. 4.1. Порівняння центральної частини промоторної ділянки алелів *PavCNR12-1*, -2 та -3; вказано локалізацію сайтів впізнавання рестриктази *TaiI*.

На етапі дослідження з використанням рестриктази *TaiI* було проведено визначення алельного стану гена *PavCNR12* у 70 сортів черешні української та закордонної селекції (рис. 4.3, табл. 4.1). В якості контролю до списку досліджених форм було включено чотири референтні сорти закордонної селекції, генотип яких був визначений раніше: Bigarreau Hâtif Burlat (*PavCNR12-1/1*), Bigarreau Napoleon, Regina (*PavCNR12-1/2*) та Cristobalina

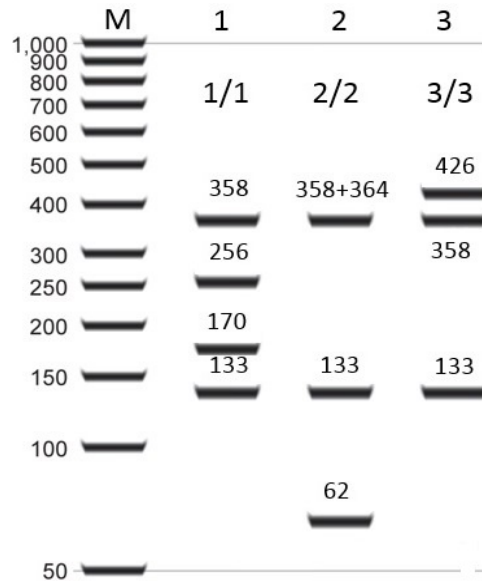


Рис. 4.2. Очікувані набори фрагментів ДНК після обробки ПЛР-ампліфікатів рестриктазою *TaiI*. Генотипи: 1 – *PavCNR12-1/1*, 2 – *PavCNR12-2/2*, 3 – *PavCNR12-3/3*; М – 50 bp DNA Ladder.

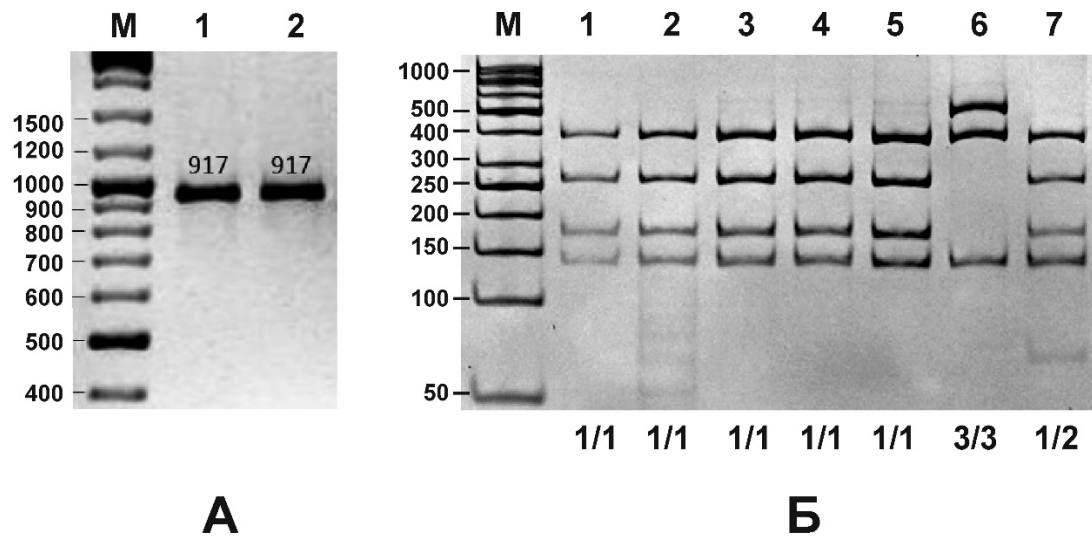


Рис. 4.3. (А) Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих з використанням праймерів CNR12-C2-F та -R та геномної ДНК сортів черешні Крупноплідна (1) та Казка (2), М – GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific); (Б) Електрофореграма фрагментів ДНК, отриманих після обробки ПЛР-ампліфікатів рестриктазою *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 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Під рисунком вказано варіанти алелів гена *PavCNR12*.

(*PavCNR12-1/3'*) [54]. Було встановлено, що отримані нами для цих сортів результати повністю співпадають із раніше оприлюдненими.

Таблиця 4.1

Алельний стан гена *PavCNR12* у сортів черешні

	Сорт	Довжина рестриктазних фрагментів, нп	Алелі <i>PavCNR12</i>
1	Аборигенка	62/133/170/256/358+364	1/2
2	Аеліта	133/170/256/358	1/1
3	Аннушка	133/170/256/358	1/1
4	Анонс	133/170/256/358	1/1
5	Аншлаг	62/133/170/256/358+364	1/2
6	Бірюза	133/170/255/358/386/426/446	1/В
7	Валерія	133/170/256/358	1/1
8	Василиса прекрасна	133/170/256/358	1/1
9	Веселка	133/170/256/358	1/1
10	Д 58-52	133/170/255/358/392/426	1/С
11	Дар Млієва	133/170/256/358	1/1
12	Дачниця	62/133/170/256/358+364	1/2
13	Джерело	133/170/256/358	1/1
14	Донецька рання	133/170/256/358	1/1
15	Донецький угольок	62/133/170/256/358+364	1/2
16	Дончанка	133/170/256/358	1/1
17	Електра	133/170/256/358	1/1
18	Етика	133/170/256/358	1/1
19	Єдина	62/133/170/256/358+364	1/2
20	Зодіак	133/170/256/358	1/1
21	Зоряна	133/170/255/358/386/426/446	1/В
22	Казка	133/170/256/358/426	1/3
23	Китайська чорна (КУТ/4)	133/170/255/358/406/436	1/А
24	Коралова	133/170/256/358	1/1
25	Крупноплідна	133/170/256/358	1/1
26	Ласуня	133/170/256/358/426	1/3
27	Легенда Млієва	133/170/256/358	1/1
28	Леся	133/170/256/358	1/1
29	Любава	62/133/170/256/358+364	1/2
30	Мелітопольська мирна	133/170/256/358	1/1
31	Мелітопольська чорна	133/170/256/358	1/1
32	Міраж	133/170/256/358	1/1
33	Мліївська чорна	133/170/255/358/406/436	1/А
34	Нектарна	133/170/255/358/406/436	1/А
35	Ніжність (НИ/3)	62/133/170/256/358+364	1/2
36	Отрада	133/170/256/358	1/1
37	Показкова	62/133/170/256/358+364	1/2
38	Престижна	133/170/256/358	1/1
39	Присадибна	133/170/256/358	1/1
40	Простір	62/133/170/256/358+364	1/2
41	Прощальна Тараненко	133/170/256/358	1/1
42	Рання розова	133/170/256/358	1/1
43	Сестрьонка (SES/2)	133/170/256/358	1/1



## Продовження Таблиці 4.1

44	Студентка	133/170/256/358	1/1
45	Тайна	133/170/256/358	1/1
46	Талісман	133/170/256/358	1/1
47	Темпоріон	133/170/256/358	1/1
48	Шанс	133/170/255/358/406/436	1/А
49	Форма DON/1	133/170/256/358	1/1
50	Форма DON/2	62/133/170/256/358+364	1/2
51	Форма DRO/1	133/170/256/358/426	1/3
52	Форма GEN/1	133/170/255/358/406/436	1/А
53	Форма GEN/2	133/170/256/358	1/1
54	Форма KYT/3	62/133/358+364/426	2/3
55	Форма NIJ/2	133/358/426	3/3
56	Форма REG/1	62/133/170/256/358+364	1/2
57	Форма VAL/3	133/170/256/358/426	1/3
58	Форма YAR/1	133/170/256/358	1/1
59	Форма YAR/2	62/133/170/256/358+364	1/2
60	Щедрість	133/170/256/358	1/1
61	Ювілейна мліївська	62/133/170/256/358+364	1/2
62	Bigarreau Hâtif Burlat	133/170/256/358	1/1
63	Bigarreau Napoleon	62/133/170/256/358+364	1/2
64	Cristobalina	133/170/255/358/406/436	1/А
65	Dönissens Gelbe	62/133/170/256/358+364	1/2
66	Jaboulay	133/170/255/358/406/436	1/А
67	Plena	135/358/426/917	3/D
68	Regina	62/133/170/256/358+364	1/2
69	Saint Georges	133/170/256/358	1/1
70	Xapata	133/170/255/358/406/436	1/А

Примітка: Наведено довжини фрагментів ДНК, отриманих після обробки ПЛР-ампліфікатів промоторної ділянки гена *PavCNR12* рестриктазою *TaiI*. Фрагменти довжиною 358 та 364 нп мають практично однакову рухливість у ПААГ.

Для додаткової перевірки надійності розробленого нами методу генотипування, отримані дані було підтверджено методом прямого секвенування ПЛР-ампліфікатів промоторної ділянки гена *PavCNR12*. Для цього було обрано три зразки черешні: Крупноплідна, Ласуня та форма NIJ/2, які відрізняються алельним станом цього гена (див. табл. 4.1). 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. Отже, розроблений

нами метод дозволяє швидко та надійно проводити ідентифікацію алельних варіантів *PavCNR12-1*, -2 та -3 без використання затратної та трудомісткої процедури секвенування. Отримані CAPS-маркери є кодомінантними та дозволяють чітко відрізнити у гомо- та гетерозиготні форми.

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.

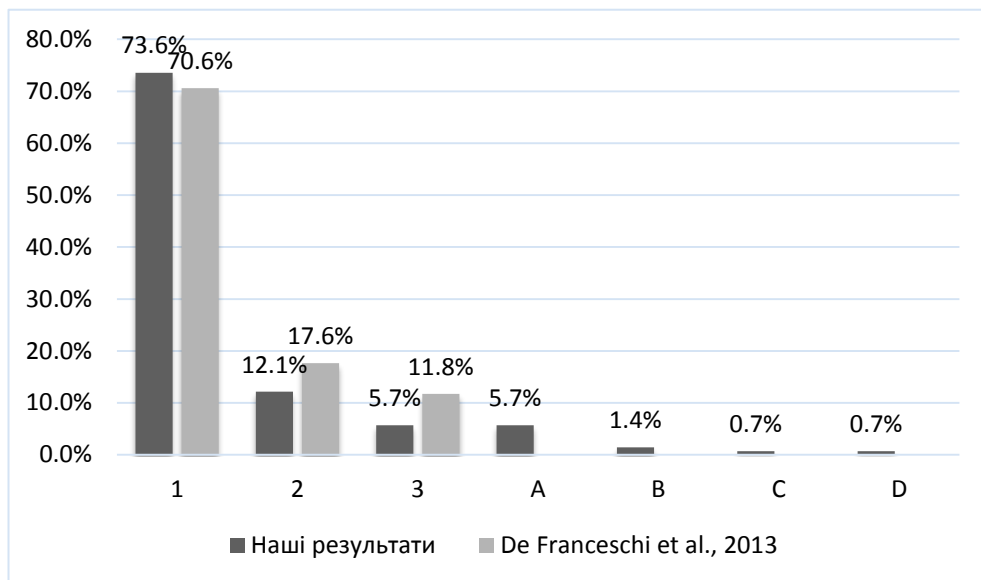


Рис. 4.4. Частоти зустрічальності алелів *PavCNR12-1* (1), -2 (2) та -3 (3) у сортів черешні у нашому дослідженні (70 форм) та згідно De Franceschi et al., 2013 (17 форм).

Розрахунок показує, що частоти алелів *PavCNR12-1*, -2 та -3 у нашій вибірці становлять 73.6, 12.1 та 5.7%, відповідно (рис. 4.4). Висока частота алеля *PavCNR12-1* (70.6%) у культурних форм черешні спостерігалась і у попередніх дослідженнях [54]. Цікаво, що у нашій вибірці частота зустрічальності бажаного алеля *PavCNR12-1* вище, а небажаних алелів *PavCNR12-2* та -3, відповідно, нижче, ніж повідомлялось раніше [54]. Враховуючи, що наша вибірка складається переважно з українських сортів, цю

різницю можна розглядати як приклад високого рівня селекції черешні в Україні.

#### **4.1.2. 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-маркери 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, імовірно, про існування додаткових, раніше не описаних алелів гена *PavCNR12*.

Подібні до охарактеризованих нами CAPS-маркерів були описані в ході пошуку маркерів з використанням специфічних генних EST-послідовностей (Expressed Sequence Tag) [32]. В згаданому дослідженні два маркери були картовані на другій парі хромосом (2: 19.2) та фізично локалізовані на TxE (*P. dulcis* Texas × *P. persica* Earlygold). Маркер PR96 (CAPS/dCAPS) передбачає використання ендонуклеази *Tail*, а PR98 (CAPS) – *RsaI*. Водночас лише маркер PR96 на узагальненій генетичній карті (consensus linkage map) чотирьох популяцій черешні (New York 54 × Emperor Francis; Regina × Lapins; Namati × Summit; Namati × Крупноплідна) розміщений в цільовому інтервалі, між мікросателітними локусами CPSCT038 та BPPCT034 та є найближчим маркером до QTL маси плодів qFRW.EN-ch2.1 (NY54×EF) [32, 73].

#### 4.1.3. Асоціації маркерів МС локусів CPST038 та BPPCT034 із CAPS-маркерами та алелями *PavCNR12*

Незважаючи на досить широке застосування МС локусів CPST038 (скорочено С38) та BPPCT034 (скорочено В34) в маркер-опосередкованій селекції черешні, у вільному доступі є інформація лише про 68 генотипів черешні [54, 73, 146]. В оригінальній публікації [226] для МС локусів С38/В34 було виділено чотири гаплотипи: а – 192/225, b – 190/255, с – 204/235 та d – 190/255. Було встановлено зв'язок цих гаплотипів із масою плодів, яка зростає у послідовності ас – ad – bc – bd (гетерозиготи). На сайті GDR було опубліковано розширений перелік гаплотипів та їх зв'язок із масою плодів [73]. Нещодавно були ідентифіковані алельні варіанти *PavCNR12*, які відомі лише у 17 сортів черешні [54] та показано їх зв'язок із МС, що фланкують локус.

Аналіз варіювання частот зустрічальності алелів МС локусів С38 та В34 свідчить про суттєве переважання у дослідженій вибірці з 94 сортів та форм черешні деяких алелів, які видаються асоційованими із більшою масою плоду (рис. 4.5 та 4.6).

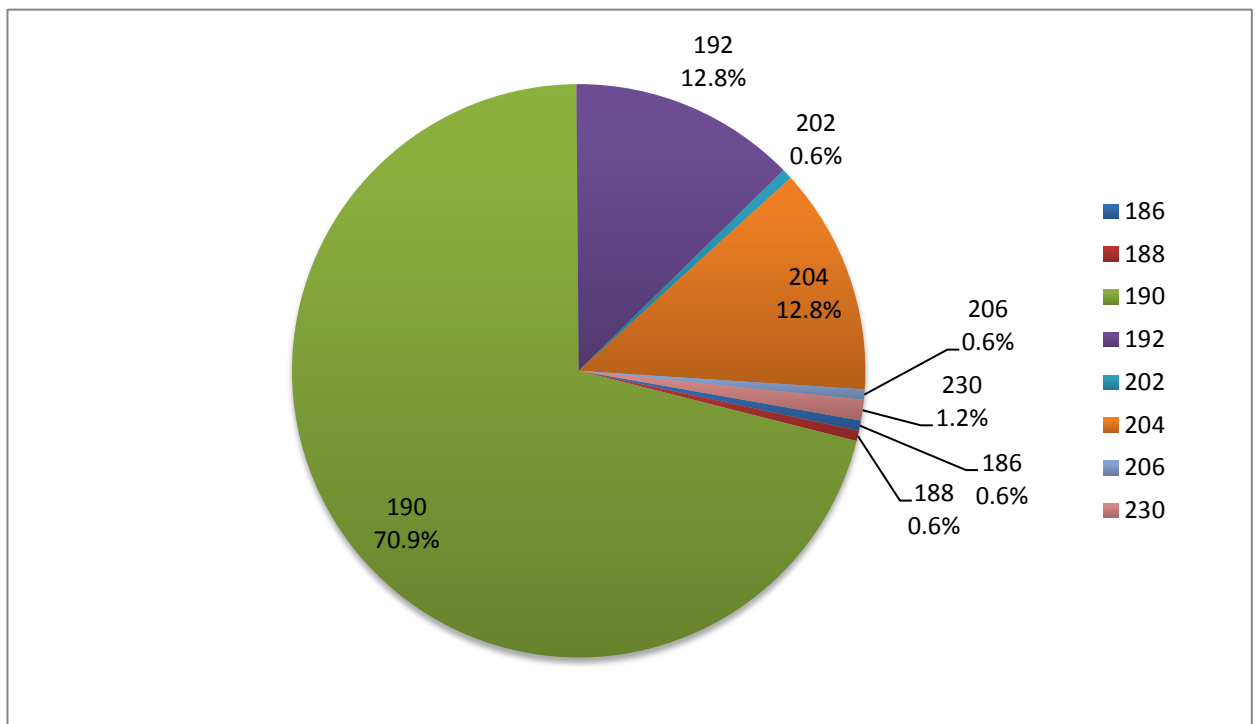


Рис. 4.5. Частоти зустрічальності алелів локусу CPST038 в дослідженій вибірці сортів (n=86).

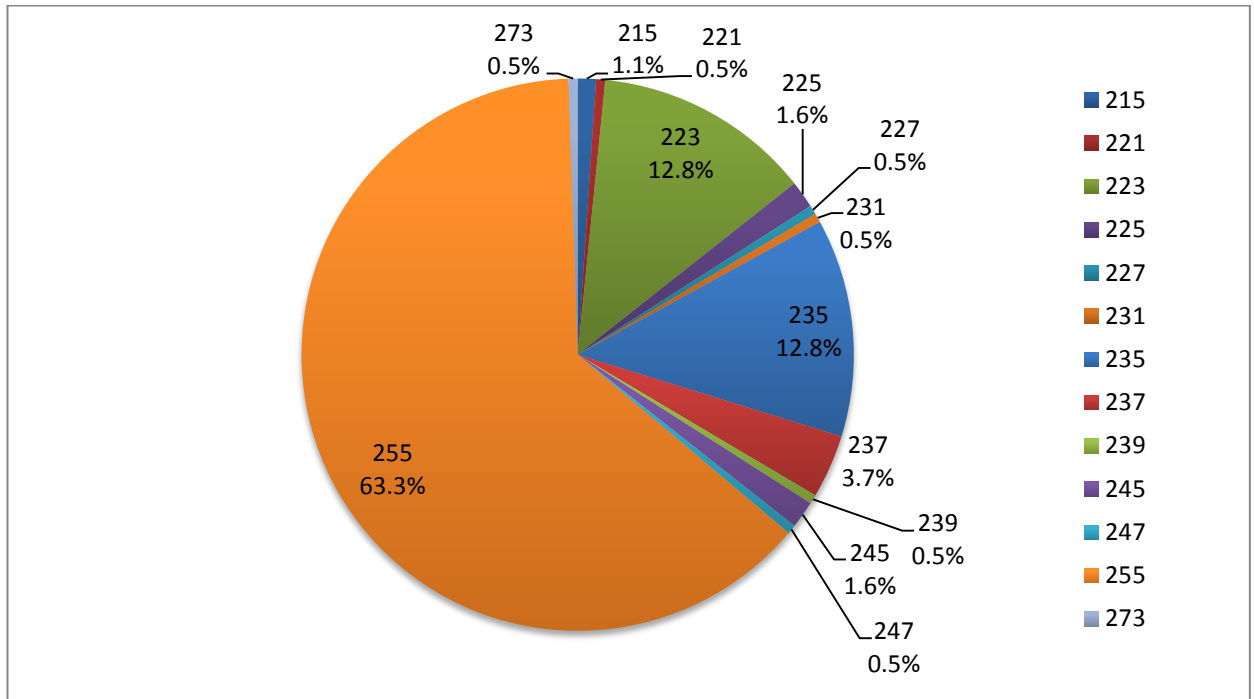


Рис. 4.6. Частоти зустрічальності алелів локусу VPPST034 в дослідженій вибірці сортів (n=94).

Серед 70 досліджених нами (табл. 4.1) генотипів черешні 37 виявились гомозиготами по *PavCNR12-1*, причому у 25 з них гомозиготний стан *PavCNR12-1* чітко корелював із С38/В34 гаплотипом 190/255. Проте дев'ять сортів, гомозиготних по *PavCNR12-1* виявились гетерозиготними за маркерами С38/В34 та мали окрім гаплотипу 190/255, наступні: 190/223 (Донецька рання, Присадибна, Burlat), 190/235 (Зодіак), 190/239 (Мелітопольська чорна), 204/255 (Електра). Окремим випадком є французька ландраса Saint Georges, в якій було виявлено гомозиготний алель *PavCNR12-1/1* та часткові гаплотипи (/215; /245). Серед раніше опублікованих результатів [54] також відомі окремі сорти із алелем *PavCNR12-1* з яким корелюють нестандартні С38/В34 гаплотипи: 190/223 (Ambrunes, Chelan, Tieton), обидва гаплотипи 190/223 (Cowiche), 190/225 (Windsor), 192/250 (Schmidt), 204/255 (Lapins), 206/221 (Cristobalina).

Другий алель *PavCNR12-2* було виявлено у 17 сортів, при цьому зчеплення із С38/В34 гаплотипом 204/235 було виявлено у 13 сортів. Крім того, у сортів Аншлаг та Regina було знайдено два нестандартні С38/В34 гаплотипи – 190/235 та 204/223, відповідно.

Третій алель *PavCNR12-3* виявлено у семи сортів; зчеплення із С38/В34 гаплотипами 192/223 та 192/225 було виявлено у п'яти з них. Нестандартні гаплотипи знайдено у декоративного (із подвійною чашечкою) сорту Plena та форми DRO/1 – 202/223, та єдиної гомозиготної по алелю *PavCNR12-3* форми NIJ/2.

Отже, в нашому дослідженні 4,6% (та 5,9% у [54]) С38/В34 гаплотипів виявили невідповідність ідентифікованим алелям *PavCNR12*. Імовірно причиною цього може бути порушення зчеплення, незважаючи на невелику відстань (10.9-14.9 сМ) між цими локусами.

Із чотирьох досліджених нами референтних зразків у трьох – Burlat (*PavCNR12-1/1*), Napoleon та Regina (*PavCNR12-1/2*) – алельні варіанти, ідентифіковані за патернами CAPS-маркерів, відповідають раніше опублікованим [54]. Натомість у сорту Cristobalina (*PavCNR12-1/3'*), що має додатковий SNP Т>А у позиції 15649528 на другій хромосомі, патерн CAPS-маркерів відповідав генотипу *PavCNR12-1/А*.

У восьми сортів черешні було виявлено імовірно новий алельний варіант *PavCNR12-А* (див. вище). У п'яти сортів (Мліївська чорна, Нектарна, Шанс, Jaboulay та Харата) алель *PavCNR12-А* виявився зчепленим із С38/В34 гаплотипом 192/223; у сорту Cristobalina - із гаплотипом 192/225; у форми GEN/1 - із гаплотипом 188/237. У двох сортів черешні, Бірюза та Зоряна, було виявлено імовірно новий алельний варіант *PavCNR12-В*. У сорту Бірюза алель *PavCNR12-В* зчеплений із гаплотипом 192/223, натомість у сорту Зоряна було виявлено порушення зчеплення (виявлено гомозиготу з гаплотипами 190/255, що притаманні для *PavCNR12-1*). У гібридної форми Д 58-52 було виявлено імовірно новий алельний варіант *PavCNR12-С*, що виявив зчеплення із гаплотипом 192/223. У декоративної форми черешні Plena [187] (*PavCNR12-3/Д*), було виявлено імовірно новий алель *Д* та нові гаплотипи МС локусів С38/В34 – 230/227 й 230/273.

Гаплотипи 192/223 та 192/225 як правило зчеплені із третім алелем *PavCNR12-3*, проте у нашому дослідженні були виявлені разом з алелями *PavCNR12-А*, *PavCNR12-В*, *PavCNR12-С*. Імовірним видається, що дані алелі є

різновидом *PavCNR12-3* із різними однонуклеотидними замінами, котрі змінили кількість сайтів рестрикції для *Tail*.

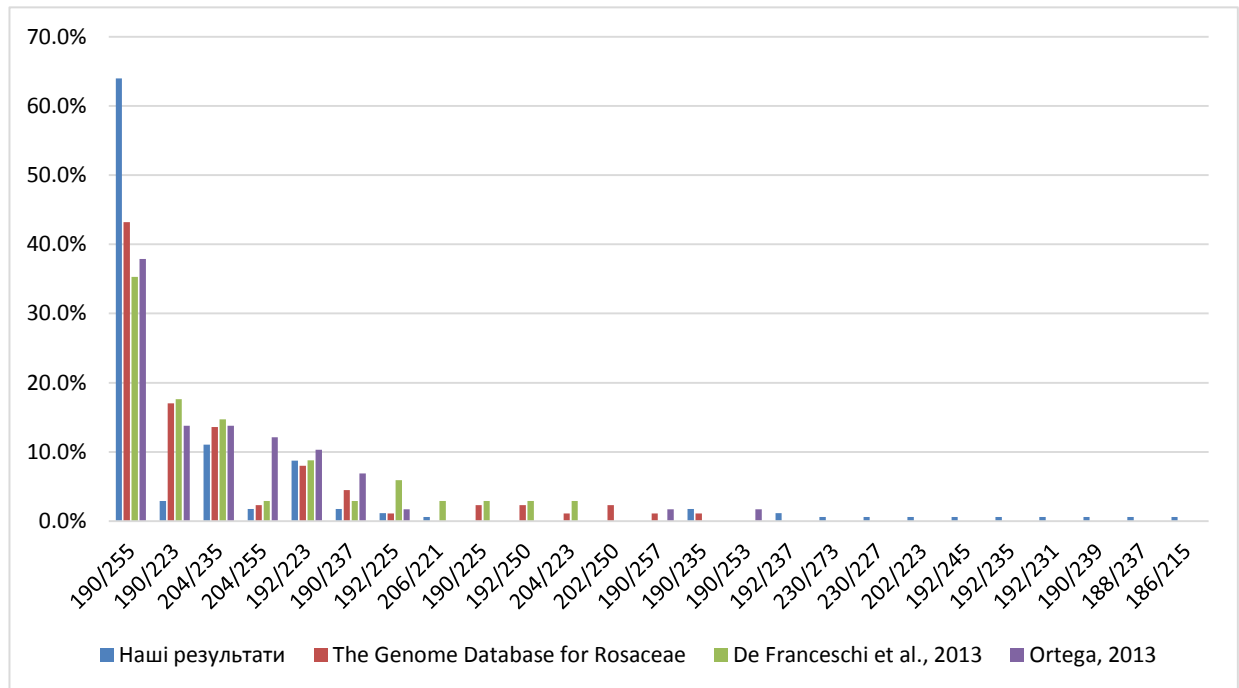


Рис. 4.7. Частоти зустрічальності CPST038-BPST034 гаплотипів

На загал, відсоткове співвідношення між алелями *PavCNR12* у нашому та попередньому дослідженні [54] виявляє подібність. У обох вибірках домінує перший алель, а частоти зустрічальності другого та третього алелів менша у порівнянні із попередніми даними [54]. Присутність та частота зустрічальності гаплотипів MC локусів С38 та В34 (рис. 4.7) у досліджених нами сортів варіює та дещо різниться із попередніми дослідженнями [54, 73, 146]. У нашому та раніше опублікованих дослідженнях було виявлено 25 варіантів С38/В34 гаплотипів. Серед них, у досліджуваній вибірці шість раніше ідентифікованих гаплотипів не було виявлено, проте охарактеризовано десять нових. Зокрема, частота зустрічальності гаплотипу 190/255, що корелює із *PavCNR12-1* у нашому дослідженні на 20-29% вища порівняно із раніше опублікованими [54, 73, 146]. Водночас, частота зустрічальності гаплотипу 190/223, що на наш погляд теж зчеплений із *PavCNR12-1*, в нашому дослідженні на 11-15% нижча. В попередньому дослідженні [146] було виявлено на 10% більшу частоту гаплотипу 204/255. Для більшості гаплотипів

було виявлено подібні частоти зустрічальності у нашому та попередніх дослідженнях.

Таблиця 4.2

Асоціації гаплотипів MC та CAPS-маркерів із алельними варіантами гена  
*PavCNR12*

Алелі <i>PavCNR12</i>	Патерни CAPS-маркерів	CPST038 – BPPCT034 гаплотипи	Маса плодів
<i>PavCNR12-1</i>	133/170/256/358	<b><u>190/255</u></b> , <b><u>190/223</u></b> , <b><u>190/237</u></b> , 190/239, 190/253 <sup>1</sup> , 186/215, -/215, -/245, 206/221, 190/225 <sup>1</sup> , 192/250 <sup>1</sup> , <u>190/235</u> , <u>204/255</u>	Велика
<i>PavCNR12-2</i>	62/133/358+364	<b><u>204/235</u></b> , 204/223, <u>190/235</u>	Середня
<i>PavCNR12-3</i>	133/358/426	<b><u>192/223</u></b> , <b><u>192/225</u></b> , 202/223, <u>204/255</u>	Мала
<i>PavCNR12-A</i>	406/436	<b><u>192/223</u></b> , 192/225, 188/237	Мала
<i>PavCNR12-B</i>	386/426/446	192/223, 190/255	Мала
<i>PavCNR12-C</i>	392/426	192/223	Невідомо
<i>PavCNR12-D</i>	135/917	230/227 або 230/273	Мала

Примітки: <sup>1</sup> – [54, 146, 165]. Жирним виділено мажорні гаплотипи, що частіше зустрічаються у сортів із відповідними алелями *PavCNR12*. Підкреслено гаплотипи у яких було виявлено порушення зчеплення із алелями *PavCNR12*.

Використовуючи існуючі моделі [73, 165, 226] асоціації функціональних гаплотипів MC локусів С38/В34 із розмірами плодів у черешні було запропоновано власну модель. В нашій моделі за основу було взято раніше ідентифіковані алельні варіанти *PavCNR12*, для яких показано зв'язок із масою плодів [54] та доповнено відомостями про зв'язок С38/В34 гаплотипів із масою плодів та розробленими нами CAPS-маркерами (табл. 4.2, табл. Е.1).

Сорт Крупноплідна раніше вже досліджувався [54, 166], проте наші результати не дозволили підтвердити у нього алельний стан MC локусів С38 та В34. Із раніше опублікованих даних відомо, що зразок сорту Крупноплідна характеризується гомозиготним станом алелю *PavCNR12-1/1* та гаплотипами 190/223 та 192/223, що властиві для *PavCNR12-1/3*. Імовірним видається порушення зчеплення гаплотипів MC локусів із алельними варіантами *PavCNR12* у даного досліджуваного зразка. Отримані нами дані дозволяють вважати, що досліджений раніше зразок сорту Крупноплідна не відповідає назві. Натомість досліджений нами зразок був отриманий від оригінатора і



характеризується гомозиготним станом алелю *PavCNR12-1/1*, патерном CAPS-маркерів специфічних для *PavCNR12-1/1* та гаплотипами MC локусів 190/255 та 190/255 асоційованими із гомозиготним станом даного гена.

## 4.2. Самонесумісність у сортів черешні

### 4.2.1. 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 переважної більшості досліджених генотипів (табл. 4.3, рис. 4.8). Це дозволило нам ідентифікувати 17 різних *S*-алелів та 243 *S*-гаплотипи по всій вибірці (рис. 4.10). 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 (табл. 4.4). Останні дві форми імовірно є поліплоїдами (триплоїдами або тетраплоїдами) [37] чи анеуплоїдами, які є досить поширеними як у сортів черешні, так і дикорослих форм [50]. Оскільки плоїдність досліджених нами форм GEN/1 і AVCV4, а також дикої черешні С-1 [37] достовірно невідома, не виключеною видається також їх тетраплоїдність. В такому випадку один із *S*-гаплотипів має бути представлений двічі (double dosage). При дослідженні дикої черешні з Німеччини в однієї із форм було ідентифіковано лише один *S*-гаплотип [170]; при дослідженні триплоїдних форм дикої черешні із Франції, у двох із них було охарактеризовано лише по два *S*-алелі [176]. Відсутній *S*-гаплотип в такому випадку прийнято позначати  $S_{null}$  (чи  $S_n$  і т.п.) [179]. Таким був, наприклад, «вишневий» алель  $S_{35}$ , який не вдавалося ампліфікувати за допомогою вироджених, «консенсусних» праймерів [202, 203].

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. 4.4). Згідно до встановленої номенклатури *S*-алелів у черешні та вишні [183, 184, 195, 202, 203, 215, 217], 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  $S_{null}$  [92, 95, 241, 254].

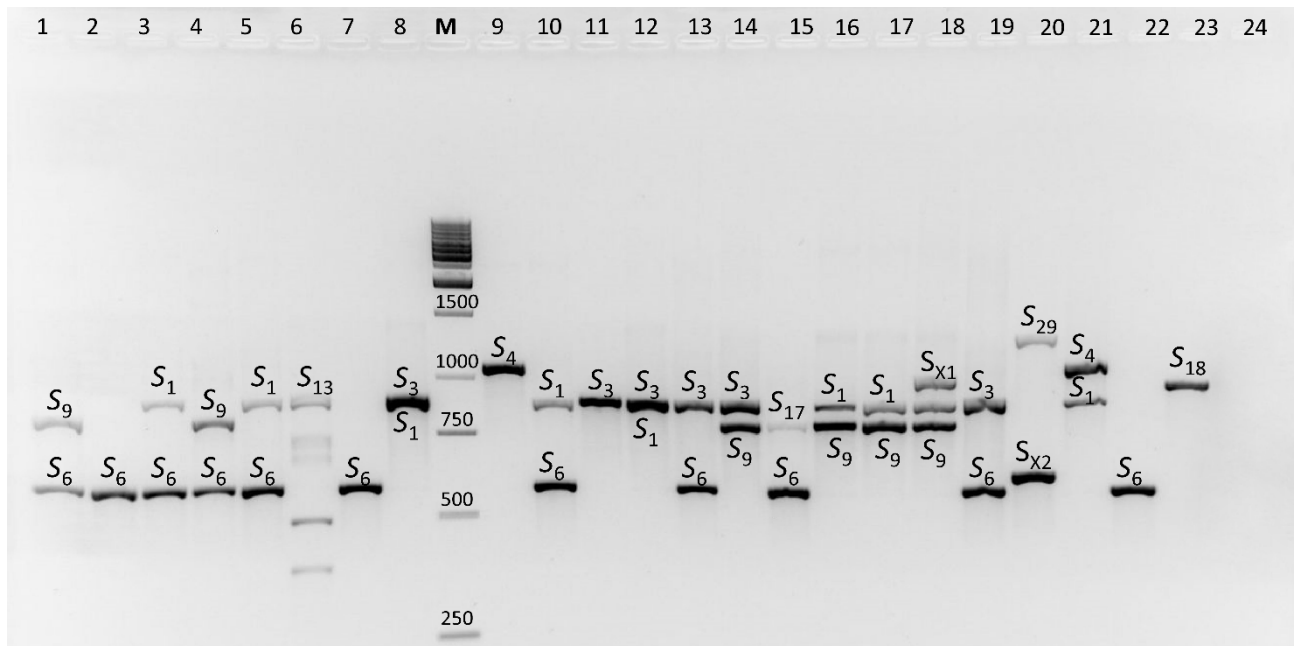


Рис. 4.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації праймерів PaConsII-F & R до другого інтрону гена *S-PHKazi*. 1 – Легенда Млієва, 2 – Дар Млієва, 3 – Коралова, 4 – Зоряна, 5 – Бірюза, 6 – Наяда, 7 – Нектарна, 8 – Ювілейна мліївська, 9 – Червнева, 10 – Мліївська чорна, 11 – Веселка, 12 – Аборигенка, 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 – К- (негативний контроль); М – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

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. Симиценка ІС НААН (с. Мліїв, Черкаська обл.). Для алеля  $S_{X1}$  характерні наступні довжини продуктів ампліфікації, отриманих з використанням пар праймерів PaConsI F/R2, PaConsII F/R та F-BOX – 367/1000/183 нп, відповідно. Алель  $S_{X2}$  було виявлено у декоративної форми черешні Plena отриманої із Ботанічного саду Львівського національного університету ім. Івана Франка. Алель  $S_{X2}$  характеризується розмірами продуктів ампліфікації для праймерів PaConsI F/R2, PaConsII F/R та F-BOX – 283/625/193(або 195) нп, відповідно. Алель  $S_{X3}$  було виявлено у

форми черешні (AVCV2) із Чернівецької обл., для якої характерною є довжина продукту ампліфікації праймерів PaConsI F/R2 – 370 нп; продукти ампліфікації праймерів PaConsII F/R та F-BOX відсутні.

Таблиця 4.3

## S-алель генотипи сортів черешні української та закордонної селекції

Сорт	Довжина продуктів ампліф. (нп) праймерів PaConsI	Довжина продуктів ампліф. (нп) праймерів PaConsII	Довжина продуктів ампліф. (нп) праймерів F-BOX	Походження
<b>Група несумісності II – S<sub>1</sub>S<sub>3</sub></b>				
Regina	234/380	898	189/202	Німеччина
Аборигенка	234/380	898	189/202	ДСП
Ювілейна мліївська	234/380	898	189/202	ДСП
<b>Група несумісності III – S<sub>3</sub>S<sub>4</sub></b>				
Napoleon	234/451	898/1064	189/202	Німеччина
Аннушка	234/451	898/1064	189/202	АДСР
Руксандра	234/451	898/1064	189/202	АДСР
Тайна	234/451	898/1064	189/202	АДСР/ІС
Темпоріон	234/451	898/1064	189	МДСС
<b>Група несумісності V – S<sub>4</sub>S<sub>5</sub></b>				
Амазонка	393/451	1064	189	АДСР
Дончанка	393/451	1064	189	АДСР
Любава	393/451	1064	189	ІС НААН
Ніжність	393/451	1064	-	ІС НААН
<b>Група несумісності VI – S<sub>3</sub>S<sub>6</sub></b>				
Dönissens Gelbe	234/443	577/898	202	Німеччина
Sato Nishiki	234/443	577/898	202	Японія
Scwecja A.	234/443	577/898	202	Польща
Показкова	234/443	577/898	180/202	ДСП
Шанс	234/443	577/898	202	МДСС
<b>Група несумісності VII – S<sub>3</sub>S<sub>5</sub></b>				
Веселка	234/393	898	190/202	ДСП
Донецький угольок	234/393	898	190/202	АДСР
Желточек	234/393	898	190/202	АДСР
Отрада	234/393	898	190/202	АДСР
Рання розова	234/393	898	190/202	АДСР
Сестрьонка	234/393	898	190/202	АДСР
Ярославна	234/393	898	190/202	АДСР
<b>Група несумісності IX – S<sub>1</sub>S<sub>4</sub></b>				
Garnet	380/451	874/1064	189	США
Валерія	380/451	874/1064	189	АДСР
<b>Група несумісності X – S<sub>6</sub>S<sub>9</sub></b>				
Folfer	357/443	577/798	180	Франція
Jaboulay	357/443	577/798	180	Франція
Джерело	357/443	577/798	180	АДСР
Зоряна (Возвращеніє)	357/443	577/798	180	ДСП

Китаївська чорна	357/443	577/798	-	ІС НААН
Легенда Млієва	357/443	577/798	180	ДСП
Леся	357/443	577/798	180	АДСР
Присадибна	357/443	577/798	180	МДСС
<b>Група несумісності XV – S<sub>5</sub>S<sub>6</sub></b>				
Saint Georges	393/443	577	180/190	Франція
Дар Млієва	393/443	577	180/190	ДСП
Нектарна	393/443	577	180/190	ДСП
<b>Група несумісності XVI – S<sub>3</sub>S<sub>9</sub></b>				
Burlat	234/357	798/898	189/202	Франція
Донецька красавиця	234/357	798/898	202	АДСР
Простір	234/357	798/898	202	МДСС
Щедрість	234/357	798/898	202	ДСП
<b>Група несумісності XVIII – S<sub>1</sub>S<sub>9</sub></b>				
Аншлаг	357/380	798/874	189	МДСС
Д 58-52	357/380	798/874	189	АДСР
Електра	357/380	798/874	189	МДСС
Казка	357/380	798/874	189	МДСС
Мелітопольська мирна	357/380	798/874	189	МДСС
Міраж	357/380	798/874	189	МДСС
<b>Група несумісності XX – S<sub>1</sub>S<sub>6</sub></b>				
Бірюза	380/443	577/874	180/189	ДСП
Коралова	380/443	577/874	180/189	ДСП
Мліївська чорна	380/443	577/874	180/189	ДСП
<b>Група несумісності XXVI – S<sub>5</sub>S<sub>13</sub></b>				
Зодіак	393/452	874	190	МДСС
Мелітопольська чорна	393/452	874	190/365	МДСС
Наяда	393/452	874	190	ДСП
<b>Група несумісності XXVII – S<sub>4</sub>S<sub>12</sub></b>				
Margit	346/451	1064	185/189	Угорщина
Червнева (Іюнська)	346/451	1064	189	ДСП
<b>Група несумісності XXXIII – S<sub>1</sub>S<sub>14</sub></b>				
Adriana	334/380	719/874	191	Італія
<b>Група несумісності XXXIV – S<sub>3</sub>S<sub>14</sub></b>				
Харата	234/334	719/898	191/202	Франція
<b>Група несумісності XXXVII – S<sub>5</sub>S<sub>9</sub></b>				
Аеліта	357/393	798	189/190	АДСР
Анонс (Спутник)	357/393	798	189/190	МДСС
Василиса прекрасна	357/393	798	189/190	АДСР
Д 44-15	357/393	798	189/190	АДСР
Дачниця	357/393	798	189/190	МДСС
Етика	357/393	798	189/190	АДСР
Крупноплідна	357/393	798	189/190	МДСС
Ласуня	357/393	798	189/190	МДСС
Престижна (Успіх)	357/393	798	189/190	МДСС
Прощальна Тараненко	357/393	798	189/190	АДСР
Студентка	357/393	798	189/190	АДСР
Талісман (Наdejда)	357/393	798	189/190	МДСС
<b>Група несумісності XLIII – S<sub>2</sub>S<sub>9</sub></b>				
Донецька рання	345/357	798	187/202	АДСР
<b>Група несумісності O</b>				
Єдина – S <sub>6</sub> S <sub>17</sub>	396/443	577/788	180/190	ДСП

Самоплідні сорти				
Cristobalina – $S_3S_6$	234/443	577/898	180/202	Іспанія
Lapins – $S_1S_4'$	380	874/1064	189	Канада

Примітки. Наведено розміри отриманих ампліфікатів. ІС НААН – Інститут садівництва НААН, ДСП – Дослідна станція помології ім. Л.П. Симиренка ІС НААН, АДСР – Артемівська дослідна станція розсадництва ІС НААН, МДСС – Мелітопольська дослідна станція садівництва ім. М.Ф. Сидоренко ІС НААН

Таблиця 4.4

## S-генотипи досліджених форм черешні

Форма	Генотип	ГПН (CIG)	Довжина продуктів амліф. (нп) праймерів PaConsI	Довжина продуктів амліф. (нп) праймерів PaConsII	Довжина продуктів амліф. (нп) праймерів F-BOX	Походження
AVCV1	$S_1S_4$	IX	380/451	874/1064	189	Чернівецька обл.
AVCV2	$S_6S_{X3}$	–	<b>370</b> /443	577	180	Чернівецька обл.
AVCV3	$S_{18}S_{null}$	–	342	935	183	Чернівецька обл.
AVCV4	$S_6S_{14}S_{X1}$	–	334/ <b>367</b> /443	577/719/ <b>1000</b>	180/ <b>183</b>	Чернівецька обл.
AVCV5	$S_{10}S_{null}$	–	365	734	<b>138</b> /175	Чернівецька обл.
AVCV6	$S_3S_{null}$	–	234	898	202	Чернівецька обл.
AVCV7	$S_3S_4$	III	234/451	898/1064	189/202	Чернівецька обл.
AVCV8	$S_6S_7$	XXX	345/443	577	180/202	Чернівецька обл.
AVLV1	$S_1S_4$	IX	380/451	874/1064	189	Львівська обл.
AVKV1	$S_{12}S_{17}$	O	346/396	788	185	Київська обл.
KYT/3	$S_4S_6$	XVII	443/451	577/1064	189	Київська обл.
NIJ/2	$S_6S_{17}$	O	396/443	577/788	180/190	Київська обл.
GEN/1	$S_1S_9S_{X1}$	–	357/ <b>367</b> /380	798/874/ <b>1000</b>	189	Черкаська обл.
Plena	$S_{29}S_{X2}$	–	<b>283</b> /342	<b>625</b> /1256	193/195	Великобританія

Для остаточного з'ясування статусу описаних алелів планується провести часткове секвенування гена *S-PHKazi* у чотирьох досліджених форм черешні (AVCV2, AVCV4, GEN/1 та PLE/1) та гена *SFB* у одного сорту (Мелітопольська чорна) і трьох форм (AVCV4, AVCV5 та Plena). Алель  $S_{X1}$  можливо є дублікатом раніше виявленого алелю  $S_{34}$  у черешні та вишні. Згаданий алель характеризується наступними розмірами продуктів амліфікації праймерів PaConsI F/R та PaConsII F/R – 454/1100 нп, відповідно [195]. Імовірною причиною ампліфікації фрагменту гена *SFB* розміром 365 нп у сорту Мелітопольська чорна є інсерція. У досліджених зразків із неописаними раніше розмірами інтрону гена *SFB* необхідно дослідити його експресію та

здатність до самозапилення, оскільки відомо, що часткові мутації пилку (part-pollen mutation, PPM) в черешні, вишні, мигдалю та інших кісточкових є однією з причин їх самоплідності [70, 82, 84].

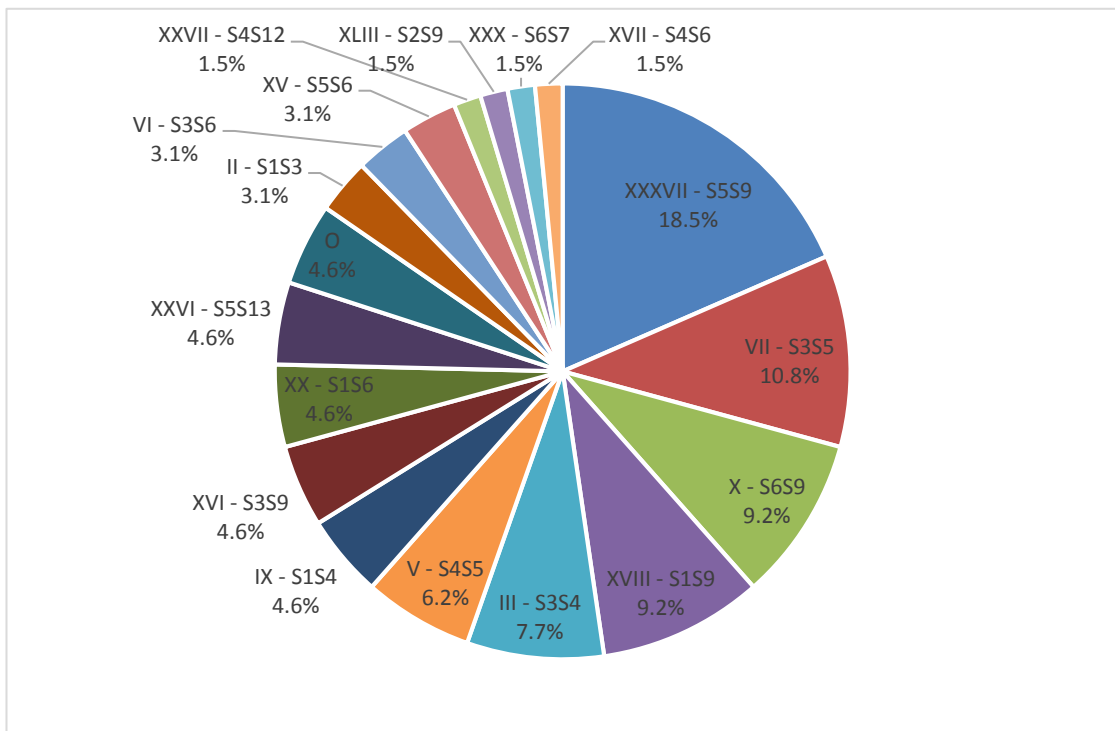


Рис. 4.9. Розподіл українських сортів та форм черешні по групах перехресної несумісності.

Проаналізовані сорти черешні було віднесено до 17 вже відомих груп перехресної несумісності. Винятком є лише сорт Єдина із генотипом  $S_6S_{17}$ , що було віднесено до групи O (універсальні запилювачі). Найбільш численною групою (рис. 4.9) є 12 сортів, котрі належать до XXXVII ( $S_5S_9$ ) групи перехресної несумісності, а також сім до VII ( $S_3S_5$ ), по шість до X ( $S_6S_9$ ) та XVIII ( $S_1S_9$ ) груп перехресної несумісності. 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 ( $S_4S_6$ ) груп перехресної несумісності.

#### 4.2.2. Нерівномірність розповсюдження $S$ -алелів

Із відомих 33  $S$ -алелів, у сортів черешні найбільш поширеними у світі є лише 13 з них ( $S_1$ - $S_7$ ,  $S_9$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{12}$ - $S_{14}$ ,  $S_{16}$ ), а решта є рідкісними. Розподіл алелів демонструє залежність від географічного походження сортів черешні [172].

Рідкісні алелі переважно поширені у дикорослих форм черешні, місцевих сортів (ландрас) та сортів із країн, що належать до центру походження (напр. Туреччина, Іран) [63, 90, 195]. Для сортів черешні європейського походження найбільш характерними є  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$ ,  $S_6$ ,  $S_9$  і в меншій мірі  $S_7$  та  $S_{12}$ . Натомість для сортів, що походять із Західної та Середньої Азії (Туреччина, Іран) типовими є  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_6$ ,  $S_7$ ,  $S_9$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{12}$ ,  $S_{14}$  і в меншій мірі  $S_1$  та  $S_5$  [172].

Ідентифікація  $S$ -генотипів проводилась у популяціях дикої черешні із Великобританії, Бельгії, Греції, Іспанії та Чехії [36, 37, 53, 68, 179, 215]; вивчалися культивовані сорти черешні із країн Західної та Центральної Європи [17, 25, 75, 128, 131, 132, 172, 174, 177], місцеві сорти (ландраси) із Іспанії, Італії, Греції, Туреччини, Хорватії та генбанків Латвії, Швеції та Угорщини [18, 19, 36, 62, 69, 90, 113, 128, 129, 195].

Проведене нещодавно дослідження [132] включало результати вивчення  $S$ -локусних генів (інтрон гена *SFB* та перший інтрон гена *S-PHKazi*) у 142 ландрас черешні і 66 культивованих сортів із трьох банків генетичних ресурсів (INRA Bordeaux *Prunus* Genetic Resources Centre, INRA Bordeaux sweet cherry breeding collection та Interprofessional Technical Centre for Fruits and Legumes, STIFL) та 211 зразків дикої черешні з більшості регіонів Франції (в колекції INRA Orléans) проте перелік ідентифікованих  $S$ -алелів та їх відсоткових розподіл залишився невідомим. Повідомляється, що згадана група ландрас в значній мірі має невідоме походження, проте частина вибірки походить із Франції, Бельгії, Чехії, Німеччини, Угорщини, Іспанії, Італії, Ірану, Румунії та Туреччини [132].

Досліджувались також сорти та форми із декількох країн Центральної та Сх. Європи, переважно Латвії, Угорщини та України, тоді як сорти із Польщі, Чехії, Румунії, Литви, Естонії та Росії все ще досліджені недостатньо [18, 19, 113, 123, 172, 174]. В цілому інформація про сорти черешні зі Сх. Європи дуже обмежена, а нерівномірність розповсюдження  $S$ -алелів не вивчалась.  $S$ -генотипи з'ясовані лише у 26 сортів із Литви, Латвії, Естонії, Білорусі, Росії та 46 сортів та гібридних форм з України [17, 34, 85, 113, 123, 172, 174, 178].

Перша спроба вивчення нерівномірності поширення *S*-алелів у східноєвропейських сортів черешні була зроблена нещодавно [123]. Порівнюючи 27 українських сортів та гібридних форм з вибіркою із 247 сортів черешні [200], було показано, що в українських сортів алелі  $S_4$  (11,1%) та  $S_6$  (12,9%) зустрічаються із подібною частотою, а  $S_1$  (5,5%),  $S_2$  (7,4%) та  $S_3$  (16,6%) є менш поширеними. Натомість алелі  $S_5$  (25,9%) та  $S_9$  (20,4%) зустрічаються значно частіше порівняно із референтною групою сортів. Дослідження інших авторів показують, що алель  $S_5$  зустрічається з низькою частотою (від 2,5 до 7%) у сортів із Сицилії, Швеції, Угорщини, Греції, Туреччини, Чехії та Хорватії [19, 62, 69, 90, 113, 129, 178]. Алель  $S_5$  не було виявлено в бельгійських популяціях дикої черешні та іспанських місцевих сортів черешні [36, 53, 75]. Проте алель  $S_5$  має високу частоту зустрічальності (22%) у Латвійських сортів та форм черешні [113]. Порівняно з іншими алелями,  $S_9$  у європейських сортів малопоширений; частота зустрічання варіює від 2 до 10% у бельгійських форм дикої черешні, сортів із Сицилії, Угорщини, Туреччини, Іспанії, Хорватії [19, 36, 53, 62, 75, 90, 129]. Лише в невеликій вибірці із 19 грецьких сортів частота зустрічання алелю  $S_9$  склала 19% [69].

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 загальний такий «алельний профіль» узгоджується із описаною раніше картиною розповсюдження алелів серед культивованих у Європі сортів черешні. В цілому, наші результати узгоджуються із попередніми дослідженнями [123], 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 [123].

При порівнянні результатів нашого дослідження із попередніми даними про поширення *S*-алелів серед українських [17, 34, 85, 123, 172, 174, 178], східноєвропейських [17, 34, 85, 113, 123, 172, 174, 178] та європейських [172] 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 східноєвропейськими сортами 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.

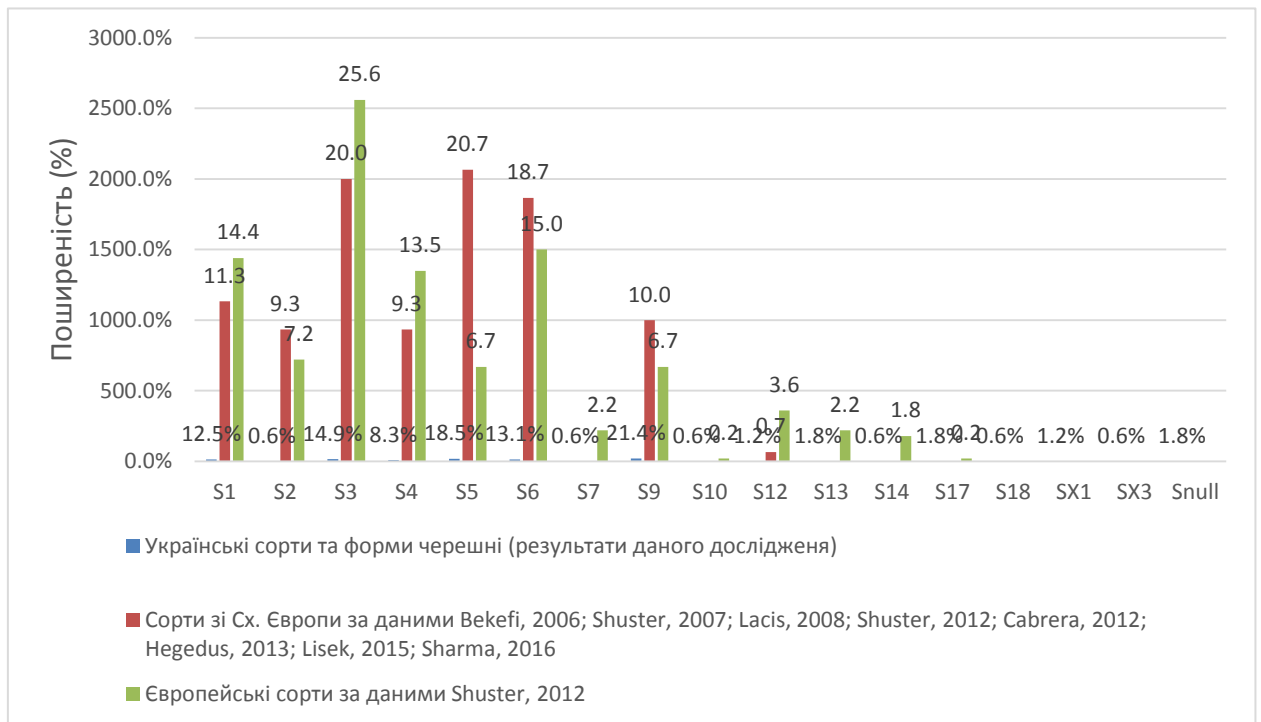


Рис. 4.10. Частоти зустрічальності  $S$ -алелів

Примітки: До групи східноєвропейських було включено опубліковані раніше дані про 75 сортів та форм із України, Росії, Білорусі, Литви, Латвії та Естонії. Референтна група налічує 545 європейських сортів за даними Schuster, 2012.

Припускається, що причиною відмінностей у поширенні  $S$ -гаплотипів в різних регіонах Європи може бути спільне походження сортів на обмеженій території або зв'язок специфічних  $S$ -гаплотипів із адаптивними характеристиками та кліматичними умовами різних регіонів [36].

У той час, як теоретичні моделі прогнозують існування великої кількості  $S$ -гаплотипів з рівними частотами при рівновазі, неодноразово повідомлялось про нерівномірність частот алелів, а до причин цього відносили ефект відбору

проб, популяційну структуру, демографічні події, мовчазні та шкідливі мутації або тиск відбору на зчеплені гени. Все ж таки залишалось незрозумілим, до якої міри нерівномірність розподілу є результатом гаметофітного чи статевого відбору.

Крім того, нещодавно було висунуто нову гіпотезу [83], яка пояснює нерівномірність поширенні *S*-гаплотипів. Отримані докази свідчать про існування порушення передачі батьківського *S*-гаплотипу. Проводився порівняльний аналіз між розподілом *S*-алелів та їх передачею після змішаного запилення, на основі динаміки зав'язування плодів та життєздатності пилку. Отримані докази дозволили стверджувати, що найімовірніше за порушення моделі передачі пилку відповідає відбір, що має місце в проміжку між запиленням та заплідненням (post-pollination preferential). Ці результати свідчать на користь гіпотези, що саме післязапильний статевий відбір як селективна сила є причиною частото-залежного відбору. Таким чином, було виявлено новий механізм, що лежить в основі нерівного поширення *S*-алелів в природніх популяціях [83].

Результати досліджень були опубліковані в:

1. 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.
2. 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. B. Aquitaine/A3C, Trans.) (p. 1-13). Bordeaux: INRA. doi: 10.13140/RG.2.2.11739.98080.
3. 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".

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

5. 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.

6. 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.

7. 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.

## РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

### 5.1. Генетичне профілювання сортів черешні та аналіз генетичного різноманіття

В проведених нами дослідженнях вперше оцінено дискримінаційні можливості різних типів молекулярних маркерів (IRAP, REMAP, ISSR, SSR) для генетичного профілювання українських сортів черешні. Оцінка дискримінаційних можливостей восьми IRAP і REMAP праймерів показала обмежену їх придатність для генетичного профілювання сортів черешні. Для оцінки поліморфізму генотипів черешні, серед випробуваних ISSR-маркерів, кращими виявились праймери UBC 835, 836 та 881, з високими статистичними показниками дискримінаційних можливостей. Найбільш інформативними серед випробуваних MC виявились маркери таких мікросателітних локусів: EMPA015, EMPAS02, EMPAS06, PseGA34, PS12A02 (в I частині досліджень) та CPSCT034, CPSCT034, BPPCT040, EPPB4230, BPPCT037, pchgms55 (в II частині досліджень). Сформовано референтну колекцію ДНК сортів та форм черешні. За підсумками генетичного профілювання сортів було створено базу даних ДНК-типування та створено генетичні профілі сортів з використанням IRAP-, REMAP-, ISSR-, CAPS- та MC маркерів. Отримані молекулярні маркери можуть бути використані для доповнення традиційних паспортів сортів черешні.

В дослідженні вперше обширно охарактеризовано генетичне різноманіття українських сортів черешні в порівнянні із сортами закордонної селекції, ландрасами та дикорослими формами черешні, а також прояснено генетичну структуру та проведено оцінку рівня філогенетичної спорідненості українських сортів черешні із врахуванням їх батьківських форм.

При з'ясуванні генетичної конституції сортів та форм в нашому дослідженні було виявлено десять генетичних пулів. Неописаними раніше виявились пули 4 та 10, 6 та 9. Батьківськими формами сортів в яких домінують 4 та 10 генетичні пули є форми селекції Дослідної станції

помології, частина сортів невідомого походження, частина отримані від вільного запилення. Нами було висунуто припущення, що при отриманні оригінальних сортів на Дослідній станції помології було використано ряд ландрас та інших форм місцевого походження. Шостий та дев'ятий генетичні пули сформовані переважно  $F_1$ - $F_3$  сортами, предковими формами яких були західноєвропейський сорт Дрогана жовта (в т. ч. клон Наполеон біла) та український сорт Валерій Чкалов. Глибоке знання генетичної структури геноплазми та ідентифікація пулів має теоретичне значення, а також може бути використано для добору батьківських форм у селекційних програмах. Окрім того, відомості про приналежність до генетичних пулів сприяють повнішому використанню генетичного різноманіття та підвищує потенційну вигоду від селекції в майбутньому [41].

Аналіз кладограми генетичної спорідненості (рис. 3.11) дозволив виявити три кластери та 12 підкластерів. Отримані в результаті відомості щодо спорідненості можуть бути використані для спрощення добору вихідних форм при схрещуванні. Підхід, що передбачає використання для селекції матриці генетичної спорідненості (графічним зображенням є напр. дендрограма) створеної на основі 10-20 нейтральних поліморфних маркерів називають «селекція без селекції» (Breeding without Breeding, BwB). Наразі цей метод є альтернативою MAS та геномній селекції і знайшов практичне застосування у селекційних програмах в лісництві [109].

В процесі генетичного профілювання для кількох сортів черешні української та закордонної селекції нами було досліджено по декілька зразків. В результаті для ряду сортів, що підтримуються в колекціях, використовуються в селекційних та комерційних цілях, досліджені клони виявили розбіжність при використанні різних типів молекулярних маркерів (ISSR, MC, CAPS, S-locus). Це свідчить про недостовірне маркування проаналізованих генотипів сортів. Кожен досліджений зразок (напр., DON/1 та DON/2 та ін.) має адресу дерева локалізованого у колекційному насадженні, а встановлення достовірності потребує помологічної експертизи таких клонів.

Важливість зберігання та вивчення генетичного різноманіття сортів добре демонструє наступний приклад. До нещодавнього минулого кожен регіон Італії характеризувався власним асортиментом локальних сортів черешні. В 1980-х роках сорти, що не відповідали сучасним вимогам промисловості поступово припиняли культивуватись. Незважаючи на цінні ознаки, як адаптивність та якість плодів, більшість локальних сортів перестали підтримуватись в колекціях, внаслідок чого постав серйозний ризик генетичної ерозії (genetic erosion). У різних громадських установах були започатковані програми з відновлення, консервації та оцінки спадщини сортів черешні з метою як збереження їх історичної та культурної цінності, так і потенційних джерел цінних ознак для селекції. Оскільки походження більшості цих старих сортів є невідомим, могли мати місце омоніми та синоніми. Відповідно, для упорядкування знань була необхідною їх достовірна ідентифікація з використанням молекулярних маркерів [128].

На сьогодні вже усталеною є позиція щодо необхідності генетичного профілювання культивованих сортів рослин. Протягом роботи робочої групи (WG1) з питань використання молекулярних маркерів для дослідження різноманіття в рамках програми COST FA1104 “Sustainable production of high-quality cherries for the European market” Gustavsson та Lacis обговорювалось обов’язкове використання МС маркерів для генетичного профілювання, виявлення дублікатів і недостовірного маркування (mislabeling) культивованих сортів в колекціях генетичних ресурсів [112].

Водночас, за результатами проведених літературних пошуків було сформовано базу даних, що включила 232 описаних генотипи черешні українського походження із їх генеалогічною інформацією. З них 210 культивованих сортів черешні, 11 перспективних гібридних форми, 7 ландрас та декілька сортів невідомого походження. Ряд сортів раннього періоду селекції, деякі батьківські форми та сорти, що не набули популярності не було знайдено в колекціях генетичних ресурсів. Існує небезпека повної втрати таких сортів. До референсної колекції ввійшла ДНК 77 сортів черешні, водночас ідентичність і достовірність деяких зразків потребує уточнення.

## 5.2. Господарсько-цінні ознаки у черешні та перспективи впровадження маркер-опосередкованого добору у селекційні програми

Проведені нами дослідження дозволили розробити новий швидкий та надійний метод ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12* із застосуванням кодомінантних CAPS-маркерів, що дозволяють відрізнити гомо- та гетерозиготні форми. Проведено порівняння мікросателітних та CAPS-маркерів пов'язаних із ознакою маси плоду на прикладі сортів черешні української селекції. З використанням цього методу встановлено алельний стан гена *PavCNR12* у 70 сортів черешні української та закордонної селекції та виявлено суттєве переважання частоти бажаного алеля *PavCNR12-1*, асоційованого із більшою масою плодів над алелями -2 та -3 [240].

Ідентифіковано імовірно нові алельні варіанти гена *PavCNR12*, які тимчасово було названо *PavCNR12-A*, *-B*, *-C*, *-D* та потребують подальшого вивчення та детальної характеристики. Відомо, що у черешні досить поширеним явищем є анеуплоїдія [50]. Наявність у окремих, імовірно анеуплоїдних сортів надкомплектної другої хромосоми з локалізованим в ній геном *PavCNR12* може бути причиною наявності додаткової (-их) копії гена відмінного алелю. Можлива також поліплоїдія в окремих сортів, проте, це явище вважається малопоширеним у черешні. Невивченим залишається варіювання кількості копій гена та/чи алелів *PavCNR12*, що також може мати додатковий вплив на масу плодів. Оптимальним шляхом з'ясування рівня плоїдності, кількості надкомплектних хромосом та встановлення кількості копій конкретного гена чи його алелів може бути застосування кількісної ПЛР у реальному часі (qRT-PCR, quantitative real-time PCR) [1].

Для значної частини сортів черешні вперше визначено алелі самонесумісності (самобезплідності, *S-*) та групи перехресної несумісності. Встановлено алельний стан *S*-локусу та групи перехресної несумісності у 110 зразків сортів черешні та форм дикої черешні. З'ясовано, що серед українських сортів черешні найбільшпоширеними є алелі *S*<sub>1</sub>, *S*<sub>3</sub>, *S*<sub>4</sub>, *S*<sub>5</sub>, *S*<sub>6</sub> та *S*<sub>9</sub>. Характерним є домінування алелів *S*<sub>5</sub> та *S*<sub>9</sub>, що відрізняє українські сорти від інших

європейських. Водночас, висока частота зустрічання алеля  $S_9$  виділяє українські сорти як від східноєвропейських так і від європейських в цілому. Проаналізовані сорти було віднесено до 17 вже відомих груп перехресної несумісності. Винятком є лише сорт Єдина із генотипом  $S_6S_{17}$ , що було віднесено до групи O (універсальні запилювачі). Показано, що найбільш численними є сорти котрі належать до XXXVII ( $S_5S_9$ ) групи перехресної несумісності, а також VII ( $S_3S_5$ ), X ( $S_6S_9$ ) та XVIII ( $S_1S_9$ ). Ідентифіковано імовірно нові алельні варіанти  $S$ -локусу, їх було тимчасово було названо  $S_{X1}$ ,  $S_{X2}$ ,  $S_{X3}$  та  $S_{null}$ . Останні потребують подальшого вивчення та детальної характеристики.

Визначення груп перехресної несумісності використовуючи молекулярні маркери повністю вирішує проблему підбору запилювачів через польові випробування. Окрім того, знання  $S$ -алелів у геноплазми українських сортів та груп перехресної несумісності є критично важливим як у селекційних програмах при плануванні схрещувань, так і при підборі сортів для створення промислових насаджень. Від правильного підбору сортів-запилювачів з урахуванням строків цвітіння залежить урожайність насадження. Інші автори [128] вказують також на важливість знання  $S$ -алелів для консервації сортів-донорів рідкісних алелів та їх використання в популяційно-генетичних дослідженнях.

За підсумками аналізу літературних джерел для ряду культивованих сортів, ландрас і гібридних форм черешні та вишні українського походження закордоном вже проводились дослідження  $S$ -локусу та ідентифікація алелів. Проте для деяких сортів (напр. Валерій Чкалов, Донецький угольок, Китаївська чорна, Крупноплідна, Транспортабельна) були виявлені противорічливі дані [17, 85, 123, 172, 174, 177]. В деяких випадках причиною цьому було не цілком зрозуміле походження досліджуваного рослинного матеріалу [85, 123] та очевидно проблеми, пов'язані із невірною транслітерацією чи маркуванням. З іншого боку в ряді проаналізованих клонів сортів черешні української селекції, отриманих нами із наукових установ було виявлено розбіжності в ідентифікованих  $S$ -генотипах як між собою, так і з вже



описаними в попередніх дослідженнях закордоном. Наприклад, у різних публікаціях сорт Валерій Чкалов характеризується *S*-генотипами  $S_1S_6$  [17, 172, 174],  $S_1S_9$  [17], тоді як проаналізовані нами чотири зразки цього сорту продемонстрували наступні генотипи  $S_1S_9$ ,  $S_3S_6$  та  $S_5S_9$ . В подальшому аналізі було використано *S*-генотип  $S_1S_9$  як найбільш імовірний для сорту Валерій Чкалов, проте не виключена можливість використання в селекції в минулому декількох омонімів («псевдоклонів») даного сорту. Проблеми такого роду, виявлені у нашому дослідженні, мають непоодинокий характер.

Поглиблений аналіз батьківства деяких сортів з використанням *S*-генотипів був використаний для пошуку імовірних батьківських форм сортів, при створенні яких було використано суміш пилку. Зокрема, материнською формою сорту Крупноплідна ( $S_5S_9$ ) був сорт Наполеон біла (клон сорту Дрогана жовта,  $S_1S_5$ ), а батьківською формою імовірно були Валерій Чкалов ( $S_1S_9$ ) або Жабуле ( $S_6S_9$ ); проте не міг бути сорт Ельтон ( $S_1S_3$ ). Аналогічно, сорти Анонс та Дачниця ( $S_5S_9$ ) було отримано від суміші пилку, однак не всі імовірні батьківські форми були проаналізовані. Материнською формою цих сортів є Наполеон біла ( $S_1S_5$ ), а імовірною батьківською є Валерій Чкалов ( $S_1S_9$ ), Жабуле ( $S_6S_9$ ), або інша недосліджена форма, проте не могли бути Ельтон ( $S_1S_3$ ), Франц Йосиф ( $S_3S_4$ ), Наполеон рожева ( $S_3S_4$ ).

Невідповідність зазначеному походженню продемонстрував сорт Темпоріон ( $S_3S_4$ ), що не міг бути отриманий в результаті схрещування Дрогана жовта ( $S_1S_5$ ) × Валерій Чкалов ( $S_1S_9$ ) + Сонячний шар (син. 1039; Франц Йосиф ( $S_3S_4$ ) × Вільгельміна Клейдінст), оскільки один алель повинен бути успадкований від материнської форми. Імовірним видається використання в якості материнської форми одного з омонімів сорту Дрогана жовта (DRO/1 чи DRO/2) із *S*-генотипом  $S_3S_6$ , проаналізованих у нашому дослідженні. Окрім того, на всіх дендрограмах сорт Темпоріон привертає увагу, оскільки кластеризується (рис. 3.11) переважно із сортами закордонної селекції. Подібну невідповідність було виявлено у сорту Зодіак ( $S_5S_{13}$ ), де материнською формою був сорт Дрогана жовта ( $S_1S_5$ ), проте батьківською формою не міг бути сорт Тавричанка (Франц Йосиф ( $S_3S_4$ ) × Рання Маркі

( $S_2S_3$ ). Імовірною батьківською формою є сорт Мелітопольська чорна ( $S_5S_{13}$ ), з яким останній кластеризується на дендрограмі (рис. 3.11), або інший донор рідкісного алелю  $S_{13}$ .

Виходячи із вищесказаного, на сучасному етапі створення, підтримання та ефективного управління колекціями генетичних ресурсів черешні та інших плодових культур важливим є розробка вичерпного протоколу, що б включав помологічну характеристику, ідентифікацію та автентифікацію геноплазми сортів з використанням кодомінантних молекулярних маркерів. Розробка такого алгоритму сприяла б створенню в кінцевому результаті репозиторію сортів із підтвердженою (true-to-type) ідентичністю. Зокрема, успішною ілюстрацією впровадження такого алгоритму є створення одного з найбільших у світі генетичних банків оливок з підтвердженою ідентичністю в Іспанії [201].

## ВИСНОВКИ

1. Визначення дискримінаційних можливостей досліджених IRAP-, REMAP-, ISSR-праймерів та MC 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 MC локуси (EMPA015, EMPAS02, EMPAS06, PceGA34, PS12A02, CPSC034, CPSC034, 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-типування та генетичні профілі з використанням IRAP-, REMAP-, ISSR-, CAPS-, MC 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 переважання 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.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Akagi, T., Kanzaki, S., Gao, M., Tao, R., Parfitt, D. E., & Yonemori, K. (2009). Quantitative real-time PCR to determine allele number for the astringency locus by analysis of a linked marker in *Diospyros kaki* Thunb. *Tree Genet. Genomes*, 5(3), 483-492. doi: 10.1007/s11295-009-0202-4
2. Alkio, M., Jonas, U., Declercq, M., Van Nocker, S., & Knoche, M. (2014). Transcriptional dynamics of the developing sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit: sequencing, annotation and expression profiling of exocarp-associated genes. *Hort. Res.*, 1(11). doi: 10.1038/hortres.2014.11
3. Alkio, M., Jonas, U., Sprink, T., van Nocker, S., & Knoche, M. (2012). Identification of putative candidate genes involved in cuticle formation in *Prunus avium* (sweet cherry) fruit. *Ann. Bot.*, 1-12. doi: 10.1093/aob/mcs087
4. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410. doi: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2
5. Antonius-Klemola, K., Kalendar, R., & Schulman, A. H. (2006). TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. *Theor. Appl. Genet.*, 112(6), 999-1008.
6. Aradhya, M. K., Weeks, C., & Simon, C. J. (2004). Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. *Sci. Hortic.*, 103(1), 131-144. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.05.004>
7. Aranzana, M. J., Pineda, A., Cosson, P., Dirlewanger, E., Ascasibar, J., Cipriani, G., . . . Arus, P. (2003). A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theor Appl Genet*, 106(5), 819-825. doi: 10.1007/s00122-002-1094-y
8. Arumuganathan, A., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9(3), 208-218.
9. Avramidou, E., Ganopoulos, I. V., & Aravanopoulos, F. A. (2010). DNA fingerprinting of elite Greek wild cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using microsatellite markers. *Forestry*, 83(5), 527-533. doi: 10.1093/forestry/cpq035
10. Badenes, M. L. (2011). *Fruit breeding*. New York, NY: Springer.
11. Badenes, M. L., Fernández i Martí, A., Ríos, G., & Rubio-Cabetas, M. J. (2016). Application of genomic technologies to the breeding of trees. *Front Genet*, 7(198). doi: 10.3389/fgene.2016.00198
12. Balas, F., López-Corrales, M., Serradilla, M., Cai, L., Iezzoni, A., & Wünsch, A. (2017). *Firmness QTL mapping using an 'Ambrunés' x 'Sweetheart' sweet cherry population*. Paper presented at the 8<sup>th</sup> International Cherry Symposium, Yamagata, Japan.
13. Balbontín, C., Ayala, H., Carrasco, J., & Avilés, D. (2012). *Transcriptional analysis of genes involved in cherry fruit cracking*. Paper presented at the VII Reunión Anual de Biología Vegetal, Pucón.

14. Balbontín, C., Ayala, H., M. Bastías, R., Tapia, G., Ellena, M., Torres, C., . . . Silva, H. (2013). Cracking in sweet cherries: A comprehensive review from a physiological, molecular, and genomic perspective. *ChileanJAR*, 73, 66-72.
15. Baldo, A. M., Volk, G. M., Iezzoni, A., Olmstead, J. W., Aldwinckle, H. S., Weber, C. A., . . . Malnoy, M. A. (2008). *Resistance gene analogs in Rosaceae: family-wide classification including raspberry, cherry, and wild apples*. Paper presented at the 4<sup>th</sup> International Rosaceae Genomics Conference, Pucon, Chile.
16. Barac, G., Ognjanov, V., Obreht, D., Ljubojevic, M., Bosnjakovic, D., Pejic, I., & Gasic, K. (2014). Genotypic and phenotypic diversity of cherry species collected in Serbia. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 32(1), 92-108. doi: 10.1007/s11105-013-0601-4
17. Bekefi, Z. (2006). Review of sweet and sour cherry incompatibility. *Int. J. Hortic. Sci.*, 12(2), 111-116.
18. Békefi, Z., Tobutt, K. R., & Sonneveld, T. (2003). Determination of (in)compatibility genotypes of Hungarian sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions by PCR based methods. *Int. J. Hortic. Sci.*, 9, 37-42.
19. Békefi, Z., Vaughan, S. P., & Tobutt, K. R. (2010). Determination of incompatibility (S) genotypes of sweet cherries in the Hungarian gene-bank by a PCR-based method. *Acta Agr. Hung.*, 58, 377-384.
20. Bellamkonda, M., Peace, C., Oraguzie, N., McFerson, J., Rosyara, U., Iezzoni, A., . . . van de Weg, E. (2012). *Functional haplotypes for fruit firmness in sweet cherry using pedigree-based analysis*. Paper presented at the Sustaining Life through Plant Improvement, Indianapolis.
21. Biscarini, F., Nazzicari, N., Bink, M., Arús, P., Aranzana, M. J., Verde, I., . . . Rossini, L. (2017). Genome-enabled predictions for fruit weight and quality from repeated records in European peach progenies. *BMC Genomics*, 18(1), 432. doi: 10.1186/s12864-017-3781-8
22. Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., & Jansen, C. L. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 28(3), 495-503.
23. Borlaug, N. E. (2000). Ending world hunger. The promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant Physiol*, 124, 487-490.
24. Bortiri, E., Oh, S.-H., Jiang, J., Baggett, S., Granger, A., Weeks, C., . . . Parfitt, D. E. (2001). Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast trnL-trnF spacer DNA. *Syst. Bot.*, 26(4), 797-807. doi: 10.1043/0363-6445-26.4.797
25. Boskovic, R., & Tobutt, K. R. (2001). Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theor Appl Genet*, 103, 475-485.
26. Bošković, R., Tobutt, K. R., & Nicoll, F. J. (1997). Inheritance of isoenzymes and their linkage relationships in two interspecific cherry progenies. *Euphytica*, 93(2), 129-143. doi: 10.1023/a:1002959425639
27. Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32(3), 314-331.

28. Botu, M. (2012). *Stone fruit germplasm resource and exploitation and links with ECPGR and EUFRIN*. Paper presented at the Join meeting of European COST&ISHS – 1<sup>st</sup> international congress for bacterial diseases of stone fruits and nuts, Zurich.
29. Boucheffa, S., Miazzi, M. M., di Rienzo, V., Mangini, G., Fanelli, V., Tamendjari, A., . . . Montemurro, C. (2017). The coexistence of oleaster and traditional varieties affects genetic diversity and population structure in Algerian olive (*Olea europaea*) germplasm. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 64(2), 379-390. doi: 10.1007/s10722-016-0365-4
30. Brant, B., Witherspoon, J., Granger, A. R., & Collins, G. G. (1999). Identification of pollen donors for the sweet cherry cultivars ‘Stella’ and ‘Summit’ by isozyme analysis. *Aust J Exp Agric*, 39, 473-477.
31. Brummell, D. A., & Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 47, 311-339.
32. Cabrera, A. (2011). *Genetic analysis and fruit weight QTL fine mapping in sweet cherry (Prunus avium L.)*. (Doctoral (PhD)), The Ohio State University, Ohio.
33. Cabrera, A., Kozik, A., Sooriyapathirana, S. S., Sebolt, A., Hammar, S., Olmstead, J. W., . . . Iezzoni, A. F. (2008). *Development of gene-based markers for linkage map construction and QTL analysis in sweet cherry (Prunus avium L.)*. Paper presented at the 4<sup>th</sup> International Rosaceae Genomics Conference, Pucon, Chile.
34. Cabrera, A., Rosyara, U. R., De Franceschi, P., Sebolt, A., Sooriyapathirana, S. S., Dirlewanger, E., . . . van der Knaap, E. (2012). Rosaceae conserved orthologous sequences marker polymorphism in sweet cherry germplasm and construction of a SNP-based map. *Tree Genet. Genomes*, 8(2), 237-247. doi: 10.1007/s11295-011-0436-9
35. Cachi, A. M., & Wunsch, A. (2011). Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium L.*). *J. Exp. Bot.*, 62(6), 1847-1856. doi: 10.1093/jxb/erq374
36. Cachi, A. M., & Wunsch, A. (2014). S-genotyping of sweet cherry varieties from Spain and S-locus diversity in Europe. *Euphytica*, 197(2), 229-236. doi: 10.1007/s10681-014-1061-0
37. Cachi, A. M., Wünsch, A., Vilanova, A., Guàrdia, M., Ciordia, M., Aletà, N., & Flachowsky, H. (2017). S-locus diversity and cross-compatibility of wild *Prunus avium* for timber breeding. *Plant Breed.*, 136(1), 126-131. doi: 10.1111/pbr.12450
38. Cai, L., Voorrips, R. E., van de Weg, E., Peace, C., & Iezzoni, A. (2017). Genetic structure of a QTL hotspot on chromosome 2 in sweet cherry indicates positive selection for favorable haplotypes. *Mol. Breed.*, 37, 1-10. doi: 10.1007/s11032-017-0689-6
39. Cai, Y., Hrotko, K., Gao, P., & Feng, Y. (2011). *Genetic analysis on cherry germplasms using molecular markers and cherry technology development*. Paper presented at the Chinese-European Cooperation for a Long-Term Sustainability, Budapest.

40. Campoy, J. A., Le Dantec, L., Barreneche, T., Dirlewanger, E., & Quero-García, J. (2015). New insights into fruit firmness and weight control in sweet cherry. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 33(4), 783-796. doi: 10.1007/s11105-014-0773-6
41. Campoy, J. A., Lerigoleur-Balsemin, E., Christmann, H., Beauvieux, R., Girollet, N., Quero-García, J., . . . Barreneche, T. (2016). Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars. *BMC Plant Biol.*, 16, 49. doi: 10.1186/s12870-016-0712-9
42. Cantini, C., Iezzoni, A. F., Lamboy, W. F., Boritzki, M., & Struss, D. (2001). DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 126(2), 205-209.
43. Castede, S., Campoy, J. A., Garcia, J. Q., Le Dantec, L., Lafargue, M., Barreneche, T., . . . Dirlewanger, E. (2014). Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytol*, 202(2), 703-715. doi: 10.1111/nph.12658
44. Castede, S., Campoy, J. A., Lafargue, M., Quero-Garcia, J., Le Dantec, L., Wenden, B., & Dirlewanger, E. (2012). *Genetic determinism and candidate genes for chilling requirement and flowering date in sweet cherry (Prunus avium)*. Paper presented at the 6<sup>th</sup> Rosaceous Genomics Conference, Mezzocorona.
45. Castède, S., Campoy, J. A., Le Dantec, L., Quero-García, J., Barreneche, T., Wenden, B., & Dirlewanger, E. (2015). Mapping of candidate genes involved in bud dormancy and flowering time in sweet cherry (*Prunus avium*). *PLOS ONE*, 10(11), e0143250. doi: 10.1371/journal.pone.0143250
46. Clarke, J. B., Sargent, D. J., Bošković, R. I., Belaj, A., & Tobutt, K. R. (2009). A cherry map from the inter-specific cross *Prunus avium* ‘Napoleon’ × *P. nipponica* based on microsatellite, gene-specific and isoenzyme markers. *Tree Genet. Genomes*, 5(1), 41-51. doi: 10.1007/s11295-008-0166-9
47. Clarke, J. B., & Tobutt, K. R. (2003). Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* ‘Napoleon’. *Mol. Ecol. Notes*, 3(4), 578-580. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00517.x
48. Clarke, J. B., & Tobutt, K. R. (2009). A standard set of accessions, microsatellites and genotypes for harmonizing the fingerprinting of cherry collections for the ECPGR. *Acta Horticulture (ISHS)*, 814, 615-618. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.814.104
49. Čolić, S., Rakonjac, V., Fotirić-Akšić, M., Nikolić, D., Ognjanov, V., & Rahović, D. (2012). Dehydrogenase isoenzyme polymorphism in genus *Prunus*, subgenus *Cerasus*. *Genetika*, 44(3), 619-632. doi: 10.2298/GENSR1203619C
50. Darlington, C. D. (1928). Studies in *Prunus*, I and II. *Journal of Genetics*, 19(2), 213-256. doi: 10.1007/BF02984238
51. Das, B., Ahmed, N., & Singh, P. (2011). *Prunus* diversity – early and present development: A review *Int. J. Biodivers. Conserv.*, 3(14), 721-734.



52. De Cuyper, B. (2007). *A new generation of clonal seed orchards of wild cherry. Selection of clones and spatial design*. Paper presented at the Seed orchards, Umeå, Sweden.
53. De Cuyper, B., Sonneveld, T., & Tobutt, K. R. (2005). Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Mol Ecol*, *14*(4), 945-955. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02460.x
54. De Franceschi, P., Stegmeir, T., Cabrera, A., van der Knaap, E., Rosyara, U. R., Sebolt, A. M., . . . Iezzoni, A. F. (2013). Cell number regulator genes in provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry. *Mol. Breed.*, *32*, 311-326. doi: 10.1007/s11032-013-9872-6
55. De Rogatis, A., Ferrazzini, D., Ducci, F., Guerri, S., Carnevale, S., & Belletti, P. (2013). Genetic variation in Italian wild cherry (*Prunus avium* L.) as characterized by nSSR markers. *Forestry*, *86*(3), 391-400. doi: 10.1093/forestry/cpt009
56. Dirlewanger, E., Claverie, J., Wünsch, A., & Iezzoni, A. F. (2007). *Cherry Fruits and nuts* (Vol. 4, pp. 103-118). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
57. Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, J., Poizat, C., Zanetto, A., . . . Laigret, F. (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.*, *105*(1), 127-138. doi: 10.1007/s00122-002-0867-7
58. Dirlewanger, E., Le Dantec, L., Campoy, J. A., & Barreneche, T. (2012). *The genetic control of fruit quality traits in two Prunus species: peach and cherry*. Paper presented at the 6<sup>th</sup> Rosaceous Genomics Conference, Mezzocorona.
59. Dirlewanger, E., Quero-Garcia, J., Le Dantec, L., Lambert, P., Ruiz, D., Dondini, L., . . . Arus, P. (2012). Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity*, *109*(5), 280-292. doi: 10.1038/hdy.2012.38
60. Downey, S. L., & Iezzoni, A. F. (2000). Polymorphic DNA Markers in Black Cherry (*Prunus serotina*) Are Identified Using Sequences from Sweet Cherry, Peach, and Sour Cherry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, *125*(1), 76-80.
61. Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, *19*, 11-15.
62. Ercisli, S., Radunic, M., Gadze, J., Ipek, A., Skaljic, M., & Cmelik, Z. (2012). S-RNase based S-genotyping of Croatian sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes. *Sci. Hortic.*, *139*, 21-24.
63. Ershadi, A., & Moghadam, E. H. (2009). Identification of S-alleles in 25 sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars by allele-specific PCR amplification. *Acta Horticulture (ISHS)*, *814*, 619-622.
64. FAOSTAT database collections. Retrieved 25 October 2016, from Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://faostat3.fao.org/>
65. Farsad, A., & Esna-Ashari, M. (2016). Genetic diversity of some Iranian sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars using microsatellite markers and morphological traits. *Tsitol Genet*, *50*(1), 12-25.

66. Fernández, A., & Gómez, S. (2008). Solving non-uniqueness in agglomerative hierarchical clustering using Multidendrograms. *J. Classif.*, 25(1), 43-65. doi: 10.1007/s00357-008-9004-x
67. Fernandez i Marti, A., Athanson, B., Koepke, T., Font i Forcada, C., Dhingra, A., & Oraguzie, N. (2012). Genetic diversity and relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars based on single nucleotide polymorphic markers. *Front Plant Sci*, 3(116). doi: 10.3389/fpls.2012.00116
68. Ganopoulos, I., Aravanopoulos, F. A., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2012). Genome and population dynamics under selection and neutrality: an example of S-allele diversity in wild cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genet. Genomes*. doi: 10.1007/s11295-012-0504-9
69. Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2010). Determination of self-incompatible genotypes in 21 cultivated sweet cherry cultivars in Greece and implications for orchard cultivation. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 85(5), 444-448.
70. Ganopoulos, I., Madesis, P., Aravanopoulos, F. A., Tsaftaris, A., Sotiropoulos, T., & Kazantzis, K. (2016). A mini review on morphological and genetic diversity of sweet (*Prunus avium* L.) and sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cultivars: Nova Publisher.
71. Ganopoulos, I., Tsaballa, A., Xanthopoulou, A., Madesis, P., & Tsaftaris, A. (2013). Sweet cherry cultivar identification by High-Resolution-Melting (HRM) analysis using gene-based SNP markers. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 31(3), 763-768. doi: 10.1007/s11105-012-0538-z
72. Ganopoulos, I. V., Kazantzis, K., Chatzicharisis, I., Karayiannis, I., & Tsaftaris, A. S. (2011). Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morphophysiological markers. *Euphytica*, 181(2), 237-251. doi: 10.1007/s10681-011-0416-z
73. Genome Database for Rosacea (GDR). Retrieved 10 June 2017 <https://www.rosaceae.org/>
74. *Prunus*-specific standards (PGS) for genebank management, V1 C.F.R. (2016).
75. Gisbert, A. D., Badenes, M. L., Tobutt, K. R., Llacer, G., & Romero, C. (2008). Determination of the S-allele composition of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in the southeast of Spain by PCR analysis. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 83(2), 246-252.
76. Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Retrieved 10 June 2017 <http://www.gbif.org/species>
77. Granger, A. R. (2004). Gene flow in cherry orchards. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 497-500. doi: 10.1007/s00122-003-1426-6
78. Gratacós, E., Mansur, L., Meisel, L. A., & Silva, H. (2009). *Breeding new sweet cherry cultivars for Chile via molecular and traditional methods*. Paper presented at the 6<sup>th</sup> International Cherry Symposium, Reñaca, Chile.
79. Guajardo, V., Solís, S., Sagredo, B., Gainza, F., Muñoz, C., Gasic, K., & Hinrichsen, P. (2015). Construction of high density sweet cherry (*Prunus avium* L.) linkage maps using microsatellite markers and SNPs detected by

- genotyping-by-sequencing (GBS). *PLOS ONE*, 10(5), e0127750. doi: 10.1371/journal.pone.0127750
80. Guarino, C., Santoro, S., De Simone, L., & Cipriani, G. (2009). *Prunus avium*: nuclear DNA study in wild populations and sweet cherry cultivars. *Genome*, 52(4), 320-337. doi: 10.1139/g09-007
  81. Gulen, H., Ipek, A., Ergin, S., Akcay, E., & Eris, A. (2010). Assessment of genetic relationships among 29 introduced and 49 local sweet cherry accessions in Turkey using AFLP and SSR markers. *J Hortic Sci Biotechnol*, 85(5), 427-431. doi: 10.1080/14620316.2010.11512692
  82. Halász, J. (2014). S-locus genotyping on stone fruits in Hungary: a review of the most recent achievements. *Int. J. Hortic. Sci.*, 20(1-2), 39-43.
  83. Hedhly, A., Wunsch, A., Kartal, O., Herrero, M., & Hormaza, J. I. (2016). Paternal-specific S-allele transmission in sweet cherry (*Prunus avium* L.): the potential for sexual selection. *J Evol Biol*, 29(3), 490-501. doi: 10.1111/jeb.12790
  84. Hegedűs, A., & Halász, J. (2007). Recent findings of the tree fruit self-incompatibility studies. *Int. J. Hortic. Sci.*, 13(2), 7-15.
  85. Hegedűs, A., Taller, D., Papp, N., Szikriszt, B., Ercisli, S., Halász, J., & Stefanovits-Bányai, É. (2013). Fruit antioxidant capacity and self-incompatibility genotype of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars highlight their breeding prospects. *Euphytica*, 191(1), 153-164. doi: 10.1007/s10681-013-0919-x
  86. Hewitt, S., Kilian, B., Hari, R., Sharpe, R., & Dhirra, A. (2017). Evaluation of multiple approaches to identify genome-wide polymorphisms in closely related genotypes of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Computational and Structural Biotechnology Journal*. doi: 10.1016/j.csbj.2017.03.002
  87. Howad, W., Yamamoto, T., Dirlewanger, E., Testolin, R., Cosson, P., Cipriani, G., . . . Arús, P. (2005). Mapping With a Few Plants: Using Selective Mapping for Microsatellite Saturation of the *Prunus* Reference Map. *Genetics*, 171(3), 1305-1309. doi: 10.1534/genetics.105.043661
  88. Iezzoni, A. F. (2008). Cherries. In J. F. Hancock (Ed.), *Temperate Fruit Crop Breeding* (pp. 151-175). Ruel-Malmaison: Springer Science+Business Media B.V.
  89. Ikeda, K., Watari, A., Ushijima, K., Yamane, H., Hauck, N. R., Iezzoni, A. F., & Tao, R. (2004). Molecular markers for the self-compatible S<sub>4</sub>'-haplotype, a pollen-part mutant in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 129(5), 724-728.
  90. Ipek, A., Gulen, H., Akcay, M. E., Ipek, M., Ergin, S., & Eris, A. (2011). Determination of self-incompatibility groups of sweet cherry genotypes from Turkey. *Genet. Mol. Res.*, 10(1), 253-260. doi: 10.4238/vol10-1gmr1024
  91. Ivanovych, Y., & Volkov, R. (2017). Genetic relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from Ukraine determined by microsatellite markers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 0(0), 1-9. doi: 10.1080/14620316.2017.1342568
  92. Ivanovych, Y. I. (2016). Sweet cherry genetic fingerprinting: methods and techniques. Marker-assisted selection (MAS) approaches for selection of

- sweet cherry varieties (C. B. Aquitaine/A3C, Trans.) (pp. 1-13). Bordeaux: INRA.
93. Ivanovych, Y. 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. doi: 10.3103/S0095452717010066
  94. Ivanovych, Y. I., Volkov, R., Triapitsyna, N., & Udovychenko, K. (2015). *Microsatellite fingerprinting of perspective Ukrainian sweet cherry varieties (Prunus avium L.)*. Paper presented at the 5<sup>th</sup> IMBG International Conference of Young Scientists and the 1<sup>st</sup> Conference of Young Scientists of the Department BioPhMB NAS of Ukraine «CYS-2015», Kyiv.
  95. Ivanovych, Y. I., & Volkov, R. A. (2017). *Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry cultivars of Ukrainian origin*. Paper presented at the 3<sup>rd</sup> Conference of Young Scientist "Plant Biology and Biotechnology", Kyiv.
  96. Jarni, K., De Cuyper, B., & Brus, R. (2012). Genetic variability of wild cherry (*Prunus avium* L.) seed stands in Slovenia as revealed by nuclear microsatellite loci. *PLOS ONE*, *7*(7), e41231. doi: 10.1371/journal.pone.0041231
  97. Jin, W., Wang, H., Li, M., Wang, J., Yang, Y., Zhang, X., . . . Zhang, K. (2016). The R2R3 MYB transcription factor PavMYB10.1 involves in anthocyanin biosynthesis and determines fruit skin colour in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Biotech. J.*, *14*(11), 2120-2133. doi: 10.1111/pbi.12568
  98. Jiwan, D. (2011). *Identification, isolation and characterization of mildew resistance locus O in Rosaceae*. (PhD), Washington state university.
  99. Jiwan, D., Yang, T., Dhingra, A., Abbott, B., & Main, D. (2008). *Comparative and functional genomics of powdery mildew resistance in Rosaceae*. Paper presented at the 4<sup>th</sup> International Rosaceae Genomics Conference, Pucon, Chile.
  100. Kalendar, R., Antonius, K., & Smýkal, P. (2010). iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.*, *121*(8), 1419-1430.
  101. Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*, *16*(5), 1099-1106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x
  102. Kappel, F., Granger, A., Hrotkó, K., & Schuster, M. (2012). Cherry. In M. L. Badenes & D. H. Byrne (Eds.), *Fruit Breeding* (pp. 459-504). Ruel-Malmaison: Springer Science+Business Media LLC.
  103. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647-1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
  104. Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*, *35*(Web Server issue), W43-46. doi: 10.1093/nar/gkm234

105. Klagges, C., Campoy, J. A., & Quero-Garcia, J. (2013). Construction and comparative analyses of highly dense linkage maps of two sweet cherry intra-specific progenies of commercial cultivars. *PLOS ONE*, 8(1), 1-12.
106. Klagges, C., Campoy, J. A., Quero-García, J., Guzmán, A., Mansur, L., Gratacós, E., . . . Dirlwanger, E. (2013). Construction and comparative analyses of highly dense linkage maps of two sweet cherry intra-specific progenies of commercial cultivars. *PLOS ONE*, 8(1), e54743. doi: 10.1371/journal.pone.0054743
107. Koepke, T., Schaeffer, S., Krishnan, V., Jiwan, D., Harper, A., Whiting, M., . . . Dhingra, A. (2012). Rapid gene-based SNP and haplotype marker development in non-model eukaryotes using 3'UTR sequencing. *BMC Genomics*, 13(1), 18. doi: 10.1186/1471-2164-13-18
108. Kole, C. (2014). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Temperate Fruits*. Berlin: Springer Berlin.
109. Korecký, J., Tomášková, I., & Lstibůrek, M. (2017). *Breeding without breeding: confirmation of theoretical concept using real-world tree improvement program*. Paper presented at the 34<sup>th</sup> Southern Forest Tree Improvement Conference, Melbourne.
110. Kovács, E., Kristóf, Z., Perlaki, R., & Szöllösi, D. (2008). Cell wall metabolism during ripening and storage of nonclimacteric sour cherry (*Prunus cerasus* L., cv. Kántorjánosi). *Acta Aliment. Hung.*, 37, 415-426.
111. Lācis, G. (2010). *Characterisation of the Latvian and Swedish sweet and sour cherry genetic resources*. (Doctoral), Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp. (2010:89)
112. Lācis, G. (2014). *Cost action FA1104 on Sustainable production of high-quality cherries for Europe market*. Paper presented at the The WG 1 meeting on the use of molecular markers for diversity studies, Budapest.
113. Lācis, G., Kaufmane, E., Rashal, I., Trajkovski, V., & Iezzoni, A. (2008). Identification of self-incompatibility (S) alleles in Latvian and Swedish sweet cherry genetic resources collections by PCR based typing. *Euphytica*, 160, 155-163. doi: 10.1007/s10681-007-9496-1
114. Lācis, G., & Kota, I. (2013). SSR marker-based fingerprinting for sour cherry (*Prunus cerasus*) genetic resources identification and management. *Acta Horticulture (ISHS)*, 976, 251-256.
115. Laidò, G., Mangini, G., Taranto, F., Gadaleta, A., Blanco, A., Cattivelli, L., . . . De Vita, P. (2013). Genetic diversity and population structure of tetraploid wheats (*Triticum turgidum* L.) estimated by SSR, DArT and pedigree data. *PLOS ONE*, 8(6), e67280. doi: 10.1371/journal.pone.0067280
116. Lande, R., & Thompson, R. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124, 743-756.
117. Le Dantec, L., Quero-Garcia, J., & Dirlwanger, E. (2012). *De novo assembly of sweet cherry (Prunus avium) transcriptome from 454 sequencing data*. Paper presented at the 6<sup>th</sup> Rosaceous Genomics Conference, Mezzocorona.
118. Li, J.-F., & Sheen, J. (2012). DNA purification from multiple sources in plant research with homemade silica resins. In N. J. Sucher (Ed.), *Plant DNA*

*Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols* (Vol. 862). Ruel-Malmaison: Springer Science+Business Media LLC.

119. Lin-Wang, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T. K., . . . Allan, A. C. (2010). An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biol.*, *10*(1), 50. doi: 10.1186/1471-2229-10-50
120. Lisek, A., Korbin, M., & Rozpara, E. (2006). Simple identification of sweet cherry rootstocks PHL using RAPD markers. *Sci. Works of the Lithuanian Inst. of Hort. and Lithuanian Univ. of Agricult.*, *25*(3), 316-321.
121. Lisek, A., Korbin, M., & Rozpara, E. (2006). Using simply generated rapid markers to distinguish between sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *J. Fruit Ornam. Plant Res.*, *14*(1), 53-59.
122. Lisek, A., & Rozpara, E. (2009). Identification and genetic diversity assessment of cherry cultivars and rootstocks using the ISSR-PCR technique. *J. Fruit Ornam. Plant Res.*, *17*(2), 95-106.
123. Lisek, A., Rozpara, E., Głowacka, A., Kucharska, D., & Zawadzka, M. (2015). Identification of S-genotypes of sweet cherry cultivars from central and Eastern Europe. *Hort. Sci.*, *42*(1), 13-21. doi: 10.17221/103/2014-HORTSCI
124. Long, L. E. (2009). Sweet cherry rootstock traits. *Good Fruit Grower*, 1-6.
125. Mackova, L., Vit, P., Durisova, L. u., Elias Jr, P., & Urfus, T. (2017). Hybridization success is largely limited to homoploid *Prunus* hybrids: a multidisciplinary approach. *Plant Syst Evol*, *303*, 481-495. doi: 10.1007/s00606-016-1385-4
126. Marchese, A., Giovannini, D., Leone, A., Mafrica, R., Palasciano, M., Cantini, C., . . . Marra, F. P. (2017). S-genotype identification, genetic diversity and structure analysis of Italian sweet cherry germplasm. *Tree Genet. Genomes*, *13*(5), 93. doi: 10.1007/s11295-017-1176-2
127. Marchese, A., Marra, F. P., Giovannini, D., Leone, A., Costa, F., Mafrica, R., . . . Caruso, T. (2013, 15-17 October). *Assessment of the genetic diversity and structure of local Italian sweet cherry cultivars based on SSR markers and the S-locus*. Paper presented at the COST FA1104 meeting, Pitesti.
128. Marchese, A., Marra, F. P., Priolo, D., Caruso, T., Giovannini, D., Leone, A., . . . De Salvador, F. R. (2017). Identification of (in)compatible S-genotypes and molecular characterisation of Italian sweet cherry cultivars. *Acta Horticulture (ISHS)*, *1161*, 41-46. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1161.6
129. Marchese, A., Tobutt, K. R., Raimondo, A., Motisi, A., Bošković, R. I., Clarke, J., & Caruso, T. (2007). Morphological characteristics, microsatellite fingerprinting and determination of incompatibility genotypes of Sicilian sweet cherry cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, *82*, 41-48.
130. Marchese, A., Tobutt, K. R., Raimondo, A., Motisi, A., Bošković, R. I., Clarke, J., & Caruso, T. (2007). Morphological characteristics, microsatellite fingerprinting and determination of incompatibility genotypes of Sicilian sweet cherry cultivars. *J Hortic Sci Biotechnol*, *82*(1), 41-48. doi: 10.1080/14620316.2007.11512197
131. Marić, S., Radičević, S., Lukić, M., Cerović, R., & Paunović, S. A. (2017). Determination of S-genotype in apple and sweet cherry cultivars released at

- Fruit Research Institute, Čačak. *Genetika*, 49(1), 127-138. doi: 10.2298/GENSR1701127M
132. Mariette, S., Tavaud, M., Arunyawat, U., Capdeville, G., Millan, M., & Salin, F. (2010). Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genet*, 11, 77-77. doi: 10.1186/1471-2156-11-77
  133. Martínez-Gómez, P., Sánchez-Pérez, R., Rubio, M., Dicenta, F., Gradziel, T. M., & Sozzi, G. O. (2005). Application of recent biotechnologies to *Prunus* tree crop genetic improvement. *Cien. Inv. Agr.*, 32(2), 24. doi: 10.7764/rcia.v32i2.308
  134. Measham, P. (2011). *Rain-induced fruit cracking in sweet cherry (Prunus avium L.)*. (PhD), University of Tasmania, Tasmania.
  135. Meksen, K., & Kahl, G. (2005). *The handbook of plant genome mapping : genetic and physical mapping*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
  136. Meneses, C., & Orellana, A. (2013). Using genomics to improve fruit quality. *Biol. Res.*, 46, 347-352.
  137. Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Badenes, M. L., & Arús, P. (2004). Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Mol. Ecol. Notes*, 4(2), 163-166. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00603.x
  138. Mohanty, A., Martín, J. P., & Aguinagalde, I. (2001). Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. *Theor. Appl. Genet.*, 103(1), 112-117. doi: 10.1007/s001220000532
  139. Moreno, J., & Trujillo, I. (2005). Genetic characterization and relatedness among cherry cultivars in a germplasm bank by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Agric. Consp. Sci.*, 70(4), 105-111.
  140. Najafzadeh, R., Arzani, K., Bouzari, N., & Saei, A. (2014). Genetic diversity assessment and identification of new sour cherry genotypes using intersimple sequence repeat markers. *Int. J. of Biodiversity*, 2014, 8. doi: 10.1155/2014/308398
  141. Narain, P. (2010). Statistical genomics and bioinformatics. *J. Hortl. Sci.*, 5(2), 85-93.
  142. Nei, M., & Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273.
  143. Olmstead, J. W., & Lang, G. A. (2002). *Pmr1*, a gene for resistance to powdery mildew in sweet cherry. *HortScience*, 37(7), 1098-1099.
  144. Olmstead, J. W., & Lang, G. A. (2004). *Gene action of Pmr1 and other potential sources of resistance to sweet cherry powdery mildew*. Paper presented at the XXVI<sup>th</sup> International Horticultural Congress, Toronto.
  145. Oraguzie, N., Bellamkonda, M., Peace, C., Dhingra, A., Glawe, D., & Grove, G. (2011). Identification of QTLs associated with powdery mildew resistance in sweet cherry (*Prunus avium* L.). In C. Miles & J. King (Eds.), *Washington State Annual Report to the W-6 Technical Advisory Committee* (pp. 20): Washington State University.

146. Ortega, G. L. (2013). Pomological characterization and introduction to the use of molecular genotyping techniques *STSM Scientific Report* (pp. 1-13).
147. Oz, M. H., Vurgun, H., Bakir, M., Buyuk, I., Yuksel, C., Unlu, H. M., . . . Ergul, A. (2013). Molecular analysis of East Anatolian traditional plum and cherry accessions using SSR markers. *Genet Mol Res*, 12(4), 5310-5320. doi: 10.4238/2013.November.7.6
148. Panda, S., Martín, J. P., & Aguinalalde, I. (2003). Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 50(5), 489-495. doi: 10.1023/a:1023986416037
149. Paneva, E. G., Zacharieva, S. I., & Yaneva, J. N. (2000). A simplified procedure for DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences: Biologie moleculaire*, 52(10), 95-98.
150. Parker, J.-L. (2010). *An investigation into flavonoid pathway regulation in sweet cherry (Prunus avium L.) fruit.* (PhD), The University of Adelaide, Adelaide, Australia.
151. Peace, C., Bassil, N., Main, D., Ficklin, S., Rosyara, U. R., Stegmeir, T., . . . Iezzoni, A. (2012). Development and evaluation of a genome-wide 6K SNP array for diploid sweet cherry and tetraploid sour cherry. *PLOS ONE*, 7(12), e48305. doi: 10.1371/journal.pone.0048305
152. Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
153. Pedersen, B. H. (2006). DNA fingerprints of 51 sweet and sour *Prunus* accessions using simple sequence repeats. *J Hortic Sci Biotechnol*, 81(1), 118-124. doi: 10.1080/14620316.2006.11512037
154. Perrier, X., Flori, A., & Bonnot, F. (2003). Data analysis methods. In P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier & J. C. Glaszmann (Eds.), *Genetic diversity of cultivated tropical plants* (pp. 43-76). Enfield, NH; [Montpellier]: Science Publishers ; Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.
155. Pinosio, S., Cattonaro, F., Felice, N., Vendramin, G. G., & Morgante, M. (2012). *Evolution of diversity in Prunus avium: assembly of its genome using next generation sequencing.* Paper presented at the Tree breeding, genomics and evolutionary biology: New synergies to tackle the impact of climate change in the 21<sup>th</sup> century, Helsinki, Finland.
156. Prevost, A., & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 98(1), 107-112.
157. Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
158. Quero-García, J., Campoy, J. A., Joly, J., Tauzin, Y., Rosyara, U. R., Iezzoni, A., & Dirlwanger, E. (2012). *QTL detection for fruit weight, fruit firmness and fruit cracking tolerance in sweet cherry.* Paper presented at the Plant and Animal Genome XX Conference, San Diego.



159. Quero-Garcia, J., Fodor, A., Reignier, A., Capdeville, G., Joly, J., Tauzin, Y., . . . Dirlewanger, E. (2014). QTL detection of important agronomic traits for sweet cherry breeding. *Acta Horticulture (ISHS)*, 1020, 57-64.
160. Quero-Garcia, J., Lalanne-Tisné, G., Cocureau, V., Campoy, J. A., Gibon, Y., & Dirlewanger, E. (2014). *Metabolomic analyses in sweet cherry*. Paper presented at the 7<sup>th</sup> International Rosaceae Genomics Conference.
161. Rasheed, A., Hao, Y., Xia, X., Khan, A., Xu, Y., Varshney, R. K., & He, Z. (2017). Crop breeding chips and genotyping platforms: progress, challenges and perspectives. *Mol. Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2017.06.008
162. Rehder, A. (1940). *Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America : exclusive of the subtropical and warmer temperate regions*. Portland, OR: Dioscorides.
163. Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques*, 42(3), 343-352.
164. Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Vanbockstaele, E., Depicker, A., & De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed.*, 6(2), 125-134.
165. RosBREED: Enabling marker-assisted breeding in Rosaceae. Retrieved 10 June 2017 <https://www.rosbreed.org/>
166. Rosyara, U. R., Bink, M. C. A. M., Weg, E., Zhang, G., Wang, D., Sebolt, A., . . . Iezzoni, A. F. (2013). Fruit size QTL identification and the prediction of parental QTL genotypes and breeding values in multiple pedigreed populations of sweet cherry. *Mol. Breed.*, 32(4), 875-887. doi: 10.1007/s11032-013-9916-y
167. Salazar, J. A., Ruiz, D., Campoy, J. A., Sánchez-Pérez, R., Crisosto, C. H., Martínez-García, P. J., . . . Rubio, M. (2014). Quantitative trait loci (QTL) and mendelian trait loci (MTL) analysis in *Prunus*: a breeding perspective and beyond. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 32(1), 1-18. doi: 10.1007/s11105-013-0643-7
168. Sandefur, P., Oraguzie, N., & Peace, C. (2016). A DNA test for routine prediction in breeding of sweet cherry fruit color, Pav-Rf-SSR. *Mol. Breed.*, 36(3), 33. doi: 10.1007/s11032-016-0458-y
169. Sansavini, S., & Lugli, S. (2008). Sweet cherry breeding programs in Europe and Asia. *Acta Horticulture (ISHS)*, 795, 41-58. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.795.1
170. Schueler, S., Tusch, A., & Scholz, F. (2006). Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. *Mol. Ecol.*, 15(11), 3231-3243. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03029.x
171. Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.*, 18, 233-234.
172. Schuster, M. (2012). Incompatible (S-) genotypes of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Sci. Hortic.*, 148, 59-73. doi: 10.1016/j.scienta.2012.09.012
173. Schuster, M. (2017). Self-incompatibility (S) genotypes of cultivated sweet cherries – An overview 2017. *OpenAgrar*. doi: 10.5073/20171213-111734

174. Schuster, M., Flachowsky, H., & Köhler, D. (2007). Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions and cultivars of the German Fruit Gene Bank and from private collections. *Plant Breed.*, *126*(5), 533-540. doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01401.x
175. Serra, O., Donoso, J. M., Picañol, R., Batlle, I., Howad, W., Eduardo, I., & Arús, P. (2016). Marker-assisted introgression (MAI) of almond genes into the peach background: a fast method to mine and integrate novel variation from exotic sources in long intergeneration species. *Tree Genet. Genomes*, 1-13. doi: 10.1007/s11295-016-1056-1
176. Serres-Giardi, L., Dufour, J., Rusell, K., Buret, C., Laurens, F., & Santi, F. (2010). Natural triploids of wild cherry. *Can. J. For. Res.*, *40*, 1951-1961. doi: 10.1139/X10-100
177. Sharma, K., Cachi, A. M., Sedlák, P., Skřivanová, A., & Wünsch, A. (2015). S-genotyping of 25 sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from the Czech Republic. *J Hortic Sci Biotechnol*, *91*(2), 117-121. doi: 10.1080/14620316.2015.1110997
178. Sharma, K., Cachi, A. M., Sedlák, P., Skřivanová, A., & Wünsch, A. (2016). S-genotyping of 25 sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from the Czech Republic. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, *91*(2), 117-121. doi: 10.1080/14620316.2015.1110997
179. Sharma, K., Korecký, J., Soldateschi, E. D. P., & Sedlák, P. (2017). S-genotype diversity in wild cherry populations in the Czech Republic. *Sci. Agric. Bohemica*, *48*(1), 92-97. doi: 10.1515/sab-2017-0015
180. Sharma, K., Sedlák, P., Zeka, D., Vejl, P., & Soukup, J. (2014). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility alleles S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> and S<sub>9</sub> using consensus and allele-specific primers in the Czech Republic. *Hortic. Sci.*, *41*(4), 153-159.
181. Shirasawa, K., Isuzugawa, K., Ikenaga, M., Saito, Y., Yamamoto, T., Hirakawa, H., & Isobe, S. (2017). The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics-assisted breeding. *DNA Res.* doi: 10.1093/dnares/dsx020
182. Silva, H., Rios, J. C., Maldonado, J., Duchens, H., Lang, E., & Carrasco, B. (2012). *A functional genomics approach to understand cracking susceptibility in sweet cherry (Prunus avium)*. Paper presented at the 6<sup>th</sup> Rosaceous Genomics Conference, Mezzocorona.
183. Sonneveld, T., Robbins, T. P., & Tobutt, K. R. (2006). Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. *Plant Breed.*, *125*(3), 305-307. doi: 10.1111/j.1439-0523.2006.01205.x
184. Sonneveld, T., Tobutt, K. R., & Robbins, T. P. (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S<sub>1</sub> to S<sub>16</sub> using consensus and allele-specific primers. *Theor Appl Genet*, *107*(6), 1059-1070. doi: 10.1007/s00122-003-1274-4
185. Sooriyapathirana, S. S., Khan, A., Sebolt, A., Wang, D., Bushakra, J. M., Lin-Wang, K., . . . Iezzoni, A. F. (2010). QTL analysis and candidate gene

- mapping for skin and flesh color in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Tree Genet. Genomes*, 6, 821-832. doi: 10.1007/s11295-010-0294-x
186. Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, D. L., Beck, E. L., King, G. J., Ryder, D. C., . . . Abbott, G. A. (2000). Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.*, 101(3), 421-428. doi: 10.1007/s001220051499
187. Spencer, R., & Pearson, S. (2002). *Flowering plants: Dicotyledons. Part 2. The identification of garden and cultivated plants*. Sydney: University of New South Wales Press.
188. Stanys, V., Frercks, B., Šikšnianienė, J. B., Stepulaitienė, I., Gelvonauskienė, D., Stanienė, G., & Bobinas, Č. (2012). Identification of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using AFLP and SSR markers. *Agriculture*, 99(4), 437–444.
189. Stegmeir, T., Cai, L., Basundari, F. R. A., Sebolt, A. M., & Iezzoni, A. F. (2015). A DNA test for fruit flesh color in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Mol. Breed.*, 35(7), 1-10. doi: 10.1007/s11032-015-0337-y
190. Stockinger, E. J., Mulinix, C. A., Long, C. M., Brettin, T. S., & Iezzoni, A. F. (1996). A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *J Hered*, 87(3), 214-218.
191. Stoeckel, S., Grange, J., Fernández-Manjarres, J. F., Bilger, I., Frascaria-Lacoste, N., & Mariette, S. (2006). Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species - *Prunus avium* L. *Mol. Ecol.*, 15(8), 2109-2118. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02926.x
192. Stothard, P. (2000). The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28, 1102-1104.
193. Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S. M., & Boritzki, M. (2003). Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 128(6), 904-909.
194. Suprun, I., Eremin, G., Ulyanovskaya, E., Lugovskoy, A., & Kochetkov, V. (2012). *Genetic resources of Rosaceae fruit crops in Southern Russia and their use in the breeding*. Paper presented at the 6<sup>th</sup> Rosaceous Genomics Conference, Mezzocorona.
195. Szikriszt, B., Doğan, A., Ercisli, S., Akcay, M. E., Hegedűs, A., & Halász, J. (2012). Molecular typing of the self-incompatibility locus of Turkish sweet cherry genotypes reflects phylogenetic relationships among cherries and other *Prunus* species. *Tree Genet. Genomes*, 9(1), 155-165. doi: 10.1007/s11295-012-0543-2
196. Tavaud, M., Zanetto, A., David, J. L., Laigret, F., & Dirlewanger, E. (2004). Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus x gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity (Edinb)*, 93(6), 631-638. doi: 10.1038/sj.hdy.6800589
197. Tavaud, M., Zanetto, A., Santi, F., & Dirlewanger, E. (2001). Structuration of genetic diversity in cultivated and wild cherry trees using AFLP markers. *Acta Horticulture (ISHS)*, 546, 263-269.

198. Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, M. T., . . . Sansavini, S. (2000). Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, *43*(3), 512-520.
199. Theiler-Hedtrich, R. (1994). Inheritance of tree and fruit characters in progenies from crosses of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Euphytica*, *77*(1), 37-44. doi: 10.1007/bf02551458
200. Tobutt, K. R. (2004). Cherry (in)compatibility genotypes – an updated cultivar table. *Acta Horticulture (ISHS)*, *663*, 667-672.
201. Trujillo, I., Ojeda, M. A., Urdiroz, N. M., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., & Diez, C. M. (2014). Identification of the worldwide olive germplasm bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genet. Genomes*, *10*(1), 141-155. doi: 10.1007/s11295-013-0671-3
202. Tsukamoto, T., Potter, D., Tao, R., Vieira, C. P., Vieira, J., & Iezzoni, A. F. (2008). Genetic and molecular characterization of three novel S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *J. Exp. Bot.*, *59*(11), 3169-3185. doi: 10.1093/jxb/ern172
203. Tsukamoto, T., Tao, R., & Iezzoni, A. F. (2008). PCR markers for mutated S-haplotypes enable discrimination between self-incompatible and self-compatible sour cherry selections. *Mol. Breed.*, *21*, 67-80. doi: 10.1007/s11032-007-9109-7
204. U.S. National Plant Germplasm System. Retrieved 10 June 2017 <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysimple.aspx>
205. Uğurtan Yılmaz, K., Ercişli, S., Asma, B. M., Doğan, Y., & Kafkas, S. (2009). Genetic relatedness in *Prunus* genus revealed by inter-simple sequence repeat markers. *HortScience*, *44*(2), 293-297.
206. UPOV. (2001). Fingerprinting peach varieties using molecular markers *Working group on biochemical and molecular techniques and DNA profiling in particular* (Vol. BMT/7/17, pp. 4). Hanover, Germany.
207. UPOV. (2003). SSR markers and the application to cultivar profiling in peach *Working group on biochemical and molecular techniques and DNA profiling in particular* (Vol. BMT/8/21, pp. 6). Tsukuba, Japan.
208. UPOV. (2008). Preparation of guideline for method validation of DNA identification for the enforcement of plant breeder's rights in Japan *Working group on biochemical and molecular techniques and DNA profiling in particular* (Vol. BMT/11/15, pp. 8). Madrid.
209. UPOV. (2010). Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction ("BMT guidelines") (Vol. UPOV/INF/17/1, pp. 13). Geneva: UPOV.
210. UPOV. (2011). Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS) (Vol. UPOV/INF/18/1, pp. 26). Geneva: UPOV.
211. van Aken, J. (2009). Marker-Assisted Selection: A noninvasive biotechnology alternative to genetic engineering of plant varieties. In S. Erwood & N. Truchi (Eds.), *'Smart Breeding' Executive Summary*. Amsterdam, The Netherlands.

212. Van Nocker, S., Sebolt, A., & Iezzoni, A. (2004). *SSR markers for Prunus developed from a small EST data set*. Paper presented at the XXVI<sup>th</sup> International Horticultural Congress, Toronto.
213. Varshney, R. K., Chabane, K., Hendre, P. S., Aggarwal, R. K., & Graner, A. (2007). Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Sci.*, *173*(6), 638-649.
214. Vartia, S., Villanueva-Cañas, J. L., Finarelli, J., Farrell, E. D., Collins, P. C., Hughes, G. M., . . . Carlsson, J. (2016). A novel method of microsatellite genotyping-by-sequencing using individual combinatorial barcoding. *R Soc Open Sci*, *3*(1). doi: 10.1098/rsos.150565
215. Vaughan, S. P., Bošković, R. I., Gisbert-Climent, A., Russell, K., & Tobutt, K. R. (2008). Characterisation of novel S-alleles from cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genet. Genomes*, *4*(3), 531-541. doi: 10.1007/s11295-007-0129-6
216. Vaughan, S. P., & Russell, K. (2004). Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Mol. Ecol. Notes*, *4*(3), 429-431. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00673.x
217. Vaughan, S. P., Russell, K., Sargent, D. J., & Tobutt, K. R. (2006). Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. *Theor Appl Genet*, *112*(5), 856-866. doi: 10.1007/s00122-005-0187-9
218. Verde, I., Abbott, A. G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., . . . Rokhsar, D. S. (2013). The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat. Genet.*, *45*, 487-494. doi: 10.1038/ng.2586
219. Wang, D., Karle, R., Brettin, T. S., & Iezzoni, A. F. (1998). Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, *97*(8), 1217-1224. doi: 10.1007/s001220051013
220. Wang, D., Karle, R., & Iezzoni, A. F. (2000). QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. *Theor. Appl. Genet.*, *100*(3), 535-544. doi: 10.1007/s001220050070
221. Wang, J., Zhang, K., Zhang, X., Yan, G., Zhou, Y., Feng, L., . . . Duan, X. (2015). Construction of commercial sweet cherry linkage maps and QTL analysis for trunk diameter. *PLOS ONE*, *10*(10), e0141261. doi: 10.1371/journal.pone.0141261
222. Webster, A. D., & Looney, N. E. (1996). *Cherries : crop physiology, production and uses* (First edition ed.). Wallingford: CAB International.
223. Wunsch, A., Lin-Wang, K., & Allan, A. C. (2014). *Differential expression of cherry MYB10 in white and red varieties is responsible for anthocyanin levels*. Paper presented at the 7<sup>th</sup> International Rosaceae Genomics Conference, Seattle.
224. Yamamoto, T., Mochida, K., Imai, T., Shi, Y. Z., Ogiwara, I., & Hayashi, T. (2002). Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. *Mol. Ecol. Notes*, *2*(3), 298-301. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00242.x

225. Zamani, Z., Shahi-Gharahlar, A., Fatahi, R., & Bouzari, N. (2012). Genetic relatedness among some wild cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) genotypes native to Iran assayed by morphological traits and random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Syst. Evol.*, 298(2), 499-509.
226. Zhang, G., Sebolt, A. M., Sooriyapathirana, S. S., Wang, D., Bink, M. C., Olmstead, J. W., & Iezzoni, A. F. (2009). Fruit size QTL analysis of an F1 population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry. *Tree Genet. Genomes*, 6(1), 25-36. doi: 10.1007/s11295-009-0225-x
227. Zhang, Q.-j., Zhang, X.-z., Dai, H.-y., Gu, D.-j., Yan, G.-j., Li, C.-m., & Zhang, Z.-h. (2008). Development of fingerprinting key and analysis of genetic diversity with SSR marker for sweet cherry cultivars. *Acta Hort. Sinica*, 35(3), 329-336.
228. Zhao, Y., Athanson, B., Whiting, M., & Oraguzie, N. (2013). Pedicel-fruit retention force in sweet cherry (*Prunus avium* L.) varies with genotype and year. *Sci. Hortic.*, 150, 135-141. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.028>
229. Zhao, Y., Rosyara, U. R., Iezzoni, A. F., Peace, C., Whiting, M., Dhingra, A., & Oraguzie, N. (2014). *Identification of QTL underlying soluble solids content and titratable acidity in sweet cherry (Prunus avium L.)*. Paper presented at the 7<sup>th</sup> International Rosaceae Genomics Conference, Seattle.
230. Zhou, L., Kappel, F., Hampson, C., Wiersma, P. A., & Bakkeren, G. (2002). Genetic analysis and discrimination of sweet cherry cultivars and selections using amplified fragment length polymorphism fingerprints. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 127(5), 786-792.
231. Витковский, В. Л. (2003). *Плодовые растения мира*. СПб.: Лань.
232. Гааль, Э., Мадъеши, Г., & Верецкеи, Л. (1982). *Электрофорез в разделении биологических макромолекул*. Москва: Мир.
233. Жуковский, П. М. (1971). *Культурные растения и их сородичи* (3 ed.). Ленинград: Колос.
234. Іванович, Я. І. (2013). *Використання ретротранспозонів для паспортизації сортів черешні*. Paper presented at the Біологія: від молекули до біосфери, Харків.
235. Іванович, Я. І. (2015). *Метод ідентифікації алелів гена *PavCNR12*, пов'язаного із розміром плодів черешні*. Paper presented at the Молодь і поступ біології, Львів.
236. Іванович, Я. І. (2015). *Полілокусні маркерні системи для генотипування сортів черешні*. Paper presented at the Біологічні дослідження – 2015, Житомир.
237. Іванович, Я. І. (2015). Сучасний стан вивчення геному (*Prunus avium* (L.) L.) черешні. *Наук. доп. НУБіП України*, 51(2), 1-20.
238. Іванович, Я. І., & Волков, Р. А. (2017). Алельний стан гена *PavCNR12* у сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції. *Вісн. УТГіС*, 15(1), 40-46.

239. Іванович, Я. І., & Тряпїцина, Н. В. (2014). Профїлювання геному сортів черешні української селекції за допомогою IRAP-ПЛР та REMAP-ПЛР маркерів. *Наук. вісник ЧНУ. Біологія (Біологічні системи)*, 6(2), 115-119.
240. Іванович, Я. І., Тряпїцина, Н. В., & Удовиченко, К. М. (2017). *Маркер-опосередкований добір та генетичне профїлювання кісточкових культур в Україні*. Paper presented at the Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин, Одеса.
241. Іванович, Я. І., Тряпїцина, Н. В., Удовиченко, К. М., & Волков, Р. А. (2017). Ідентифікація алелів самонесумісності в сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції. *Вісн. УТГіС*, 15(2), 150-158.
242. Іванович, Я. І., Удовиченко, К. М., Бублик, М. О., & Волков, Р. А. (2017). Генетичне профїлювання українських сортів черешні (*Prunus avium* L.) з використанням ISSR-ПЛР маркерів. *Цитологія і генетика*, 51(1), 61-68. doi: 10.3103/S0095452717010066
243. Календарь, Р. Н., & Глазко, В. И. (2002). Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. *Физиол. и биох. культ. растений*, 34(4), 279-296.
244. Литовченко, О. М., Павлюк, В. В., & Омельченко, І. К. (2011). *Кращі сорти плодкових і горіхоплідних культур української селекції*. Київ: Преса України.
245. Маниатис, Т., Фрич, Э., & Сэмбрук, Д. (1984). *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. Москва: Мир.
246. Матвеева, Т. В., Павлова, О. А., & Богомаз, Д. И. (2011). Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. *Экол. генетика*, 9(1), 32-43.
247. Немичева, Н. В., Чигринин, Н. Ф., & Ярушников, В. В. (2007). *Плодовые деревья: лучшие сорта*. Москва: Мир книги.
248. Симиренко, Л. П. (1963). *Помология. Косточковые породы, айва, рябина южная, кизил, мушмула, фундуки садовые и лесной лещинный орех (Vol. 3)*. Киев: Гос. изд-во сельскохоз. лит. УССР.
249. Сулимова, Г. Е. (2004). ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. *Успехи соврем. биологии*, 124(3), 260-271.
250. Супрун, И. И., Токмаков, С. В., Малюченко, О. П., Ушакова, Я. В., & Бабаков, А. В. (2011). Генотипирование сортов яблони российской селекции с использованием микросателлитных маркеров. *Известия ТСХА*, 6, 162.
251. Тараненко, Л. И. (2009). Сорта косточковых культур для Донбасса и северных регионов Украины. *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин*, 2(10), 85-95.
252. Туровцев, М. І., Туровцева, В. О., & Туровцева, Н. М. (2009). Селекція черешні (*Cerasus avium* Moench.) в інституті зрошуваного садівництва ім. М.Ф. Сидоренка УААН *Наук. вісн. НУБіП України*, 113, 51-58.
253. Туровцев, Н. И., Тараненко, Л. И., Павлюк, В. В., Ласкавый, В. Ф., Мищенко, В. Ф., Мойсейченко, Н. В., . . . Орехова, В. П. (2004).

- Помология. Слива, вишня, черешня* (В. В. Павлюк Ed. Vol. 4). Киев: Урожай.
254. Удовиченко, К. М., Тряпціна, Н. В., Медведєва, Т. В., & Іванович, Я. І. (2016). Біотехнології в садівництві. In І. В. Гриник & М. О. Бублик (Eds.), *Актуальні дослідження і розробки Інституту садівництва НААН та його мережі* (pp. 53-62). Київ: КТ "Забеліна-Фільковська Т. С. і компанія Київська нотна фабрика".
255. Фортэ, А. В., Савельєв, Н. И., & Дорохов, Д. Б. (2004). *Применение ДНК-маркеров для оценки генетического полиморфизма яблони* (И. П. Спицын & Н. С. Самигуллина Eds.). Мичуринск: Изд-во ГНУ ВНИИГиСПР им. И. В. Мичурина.



## ДОДАТОК А

## Список наукових праць здобувача:

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 *RavCNR12* 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., Тряпїцина 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 "Забелїна-Фїльковська 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. *Форма участі – заочна.*

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. *Форма участі – заочна.*

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

12. Іванович Я.І. (2015). *Метод ідентифікації алелів гена PvcCNR12, пов'язаного із розміром плодів черешні.* Тези представлені на XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів. *Форма участі – очна.*

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 5<sup>th</sup> IMBG International Conference of Young Scientists and the 1<sup>st</sup> Conference of Young Scientists of the Department BioPhMB NAS of Ukraine “CYS-2015”, Kyiv. *Форма участі – очна.*

14. Ivanovych Ya.I., Volkov R.A. (2017). *Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry cultivars of Ukrainian origin*. Paper presented at the 3<sup>rd</sup> Conference of Young Scientist “Plant Biology and Biotechnology”, Kyiv. *Форма участі – заочна.*

15. Іванович Я.І., Тряпїцина 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. *Форма участі – заочна.*

## ДОДАТОК Б

Таблиця Б.1

## Перелік досліджуваних сортів та форм черешні

№	Сорт	Батьківські форми	Оригінатор
1	Аборигенка	Інформація відсутня <sup>1</sup>	ДСП
2	Аеліта	Дрогана жовта в.з. <sup>2</sup> (× мелітоп. гібриди)	АДСР
3	Амазонка	Інформація відсутня	АДСР
4	Аннушка	Дончанка × Валерій Чкалов	АДСР
5	Анонс	Наполеон біла × (Валерій Чкалов + Жабуле + Ельтон + 713 + Присадибна + 4324 + 4326 + Червнева рання + Францис + Сонячний шар + 1042 + Наполеон біла + Наполеон рожева)	МДСС
6	Аншлаг	Цешенська жовтнева × Престижна	МДСС
7	Бірюза	Чорна Ільчишина × (Гаврилівська + Гінь Мліїва + 2120)	ДСП
8	Валерій Чкалов	Розова в.з.	МДСС
9	Валерія	Дончанка × Валерій Чкалов	АДСР
10	Василиса прекрасна	Донецький угольок × Донецька красавиця	АДСР
11	Веселка	Інформація відсутня	ДСП
12	Генеральська	Золота × Франц Йосиф	ННЦ НБС
13	Д 44-15	Інформація відсутня	АДСР
14	Д 58-52	Інформація відсутня	АДСР
15	Дар Млієва	Любская в.з.	ДСП
16	Дачниця	Наполеон біла × (Валерій Чкалов + Жабуле + Ельтон + 713 + 4324 + 4326 + 2125 + Франц Йосиф + Наполеон біла + Наполеон рожева + 1039 + 1042)	МДСС
17	Джерело	(Дрогана жовта в.з.) × Валерій Чкалов	АДСР
18	Донецька красавиця	Дрогана рожева × Валерій Чкалов	АДСР
19	Донецька рання	Китаївська чорна × Скороспілка	АДСР
20	Донецький угольок	Дрогана жовта × Валерій Чкалов	АДСР
21	Дончанка	Дрогана жовта в.з.	АДСР
22	Електра	Дрогана жовта × Валерій Чкалов	МДСС
23	Етика	Дончанка × Валерій Чкалов	АДСР

24	Єдина	Інформація відсутня	ДСП
25	Желточек	Інформація відсутня	АДСР
26	Зодіак	Дрогана жовта × Тавричанка	МДСС
27	Зоряна (Возвращеніє)	Форма 2120 (Дрогана жовта × Любская) × (Нектарна + Чорна Ільчишина + Рожева мліївська)	ДСП
28	Казка	Дрогана жовта × Валерій Чкалов	МДСС
29	Китаївська чорна	Невідомо	ІС
30	Коралова	Форма 120 × (Нектарна + Рожева мліївська + Чорна Ільчишина)	ДСП
31	Крупноплідна	Наполеон біла × (Валерій Чкалов + Ельтон + Жабуле)	МДСС
32	Ласуня	Цешенська жовтнева × Престижна	МДСС
33	Легенда Млієва	Крупноплідна в.з.	ДСП
34	Леся	Красна плотна × Валерій Чкалов	АДСР
35	Любава	Дрогана жовта в.з.	ІС
36	Мелітопольська мирна	Дрогана жовта × Валерій Чкалов	МДСС
37	Мелітопольська чорна	Французька чорна в.з.	МДСС
38	Міраж	Дрогана жовта × Валерій Чкалов	МДСС
39	Мліївська чорна	Наполеон біла в.з.	ДСП
40	Наяда	Рожева мліївська в.з.	ДСП
41	Нектарна	Наполеон біла в.з.	ДСП
42	Ніжність	Дрогана жовта × Франц Йосиф	ІС
43	Отрада	Аннушка × Анонс	АДСР / ІС
44	Показкова	Інформація відсутня	ДСП
45	Престижна (Успіх)	Наполеон біла × Валерій Чкалов	МДСС
46	Присадибна	Денисена жовта × Жабуле	МДСС
47	Простір	Франц Йосиф × Валерій Чкалов	МДСС
48	Прощальна Тараненко (Прощальна)	Д-54-82 (Дончанка × Валерій Чкалов) × Джерело	АДСР
49	Рання розова (Рання розовинка)	Дрогана жовта × Скороспілка	АДСР
50	Руксандра	Дончанка × Валерій Чкалов	АДСР
51	Сестрьонка	Гібрид (Денисена жовта × Гріот Остгеймський) в.з. Уманська скороспілка в.з.	АДСР

52	Студентка	Сестрьонка × Донецька красавиця	АДСР
53	Тайна	Китаївська чорна × Скороспілка	АДСР
54	Талісман	Дрогана жовта × Валерій Чкалов	МДСС
55	Темпоріон	Дрогана жовта × (Валерій Чкалов + Сонячний шар)	МДСС
56	Червнева (Іюнська)	Денисена жовта в.з.	ДСП
57	Шанс	Дрогана жовта в.з.	МДСС
58	Щедрість	Інформація відсутня	ДСП
59	Ювілейна мліївська (Ювілейна 106)	Франц Йосиф в.з.	ДСП
60	Ярославна	Дрогана жовта в.з. (× мелітоп. гібриди)	АДСР
61	Adriana	Mora di Cazzano × ISF 123	Італія
62	Bigarreau Hâtif Burlat (Бігарро Бурлат)	Невідомо	Франція
63	Bigarreau Jaboulay (Жабуле)	Невідомо	Франція
64	Cristobalina	Невідомо; ландраса	Іспанія
65	Dönissens gelbe Knorpelkirsche (Денисена жовта)	Невідомо	Німеччина
66	Drogans gelbe Knorpelkirsche (Дрогана жовта)	Невідомо	Німеччина
67	Folfer (V3387)	Інформація відсутня	Франція
68	Garnet	Інформація відсутня	США
69	Kordia	Невідомо	Чеська Республіка
70	Lapins (13S-28-26)	Van × Stella	Канада
71	Margit (Margit 66)	Germersdorf Orias cl.3 × Békéscsaba Schneiders Späte K. o.p.	Угорщина
72	Bigarreau Napoleon (Наполеон рожева)	Невідомо	Німеччина
73	Plena (Multiplex, Grandiflora)	Невідомо; декоративна форма дикої черешні	Великобританія
74	Regina	Schneiders späte Knorpelkirsche × Rube	Німеччина
75	Saint Georges	Невідомо; ландраса	Франція

76	Sato Nishiki	Governor Wood × Napoleon Невідомо; ландраса	Японія
77	Scwecja A.	Інформація відсутня	Польща / Швеція
78	Sweetheart	Van × Newstar	Канада
79	Xapata	Невідомо; ландраса	Франція
80	AVCV1	Невідомо; ландраса	Чернівецька обл.
81	AVCV2	Невідомо; ландраса	Чернівецька обл.
82	AVCV3	Невідомо; ландраса	Чернівецька обл.
83	AVCV4	Невідомо; ландраса	Чернівецька обл.
84	AVCV5	Невідомо; ландраса	Чернівецька обл.
85	AVCV6	Невідомо; ландраса	Чернівецька обл.
86	AVCV7	Невідомо; ландраса	Чернівецька обл.
87	AVCV8	Невідомо; ландраса	Чернівецька обл.
88	AVLV1	Невідомо; ландраса	Львівська обл.
89	AVKV1	Невідомо; ландраса	Київська обл.

Примітки. <sup>1</sup> – інформація про походження відсутня, <sup>2</sup> – вільне запилення, МДСС – Мелітопольська ДСС, АДСР – Артемівська ДСР, ІС – Інститут садівництва, ДСП – Дослідна станція помології.

## ДОДАТОК В

## Таблиця В.1

Розміри алелів ампліфікованих із набору 16 стандартних SSR локусів кісточкових (*Prunus*) в порядку їх пріоритетності для восьми референтних генотипів з підроду *Cerasus* Pers. [48]

Primer	Dye	LG:cM <sup>†</sup>	Rank	Size range <sup>‡</sup>	<i>P. avium</i> FI2/1 (AFT)	<i>P. avium</i> 'Goodnestone Black' (AGB)	<i>P. avium</i> 'Napoleon' (ANA)	<i>P. avium</i> 'Noble' (ANB)	<i>P. avium</i> 'Noir de Meched' (ANM)	<i>P. incisa</i> E621 (INE)	<i>P. mahaleb</i> SL64 (NIF)	<i>P. nipponica</i> FI292 (NIF)
EMPA002*	6-FAM	G1:46	4	103-131	105	103/105	103/105	105	103/105	119/121	121	115/131
EMPA003	VIC	G1:115	16	157-175	175	175	171/175	175	157/171	175	166	167/175
EMPA017*	6-FAM	G2:00	3	221-242	238/242	238	238 <sup>§</sup>	232/238	238	223/228	221/223	223/ <i>n</i>
PceGA34	NED	G2:87	9	100-237	140	138/214	160/203	132/143	140/154	100/237	139	100/237
EMPaS12	6-FAM	G3:38	6	108-144	122/144	136/138	138 <sup>§</sup>	138/144	138/144	110/136	108	122/124
EMPaS02	6-FAM	G3:78	11	129-159	143	129/137	137/139	139/143	137/145	142/187	139/156	159 <sup>§</sup>
EMPaS06	6-FAM	G4:25	10	159-218	201	203/211	203/205	205/221	201	159/209	218	160/207
EMPaS10	VIC	G4:51	5	134-184	166/184	164/166	151 <sup>§</sup>	151/166	151/166	142/152	134/166	145/172
BPPCT037	6-FAM	G5:31	8	120-172	150	131/144	137/144	137	139/144	126	172	120/126
EMPaS14	NED	G5:46	13	164-208	194/208	196	196/208	194/208	194/196	164	174/176	168/188
EMPaS01	6-FAM	G6:28	7	210-250	220/226	226/228	228/230	226/230	226/230	210/250	211	198/212
UDP98-412	6-FAM	G6:77	12	098-157	116/123	100/123	119 <sup>§</sup>	116	119/125	101/116	98	157/ <i>n</i>
CPPCT022*	VIC	G7:25	2	228-327	253	255/259	253/255	245	245	261	228	247/327
PS05C03	NED	G7:75	15	101-159	144	118/125	142/159	127/146	125/127	109/129	101	125/127
EMPA026	NED	G8:00	14	189-217	200	200/214	200/214	200/214	200/214	189/205	211/217	201/217
CPPCT006*	VIC	G8:31	1	173-203	182	182/184	184/200	184	184/200	173	174	176/203

\*'Universal' primers

<sup>†</sup> Linkage group and map position in *Prunus avium* 'Napoleon' × *P. nipponica*

<sup>‡</sup> Alleles in base pairs sized using an ABI 3100 sequencer

<sup>§</sup> Homozygous at loci in EMR's interspecific mapping population



## ДОДАТОК Г

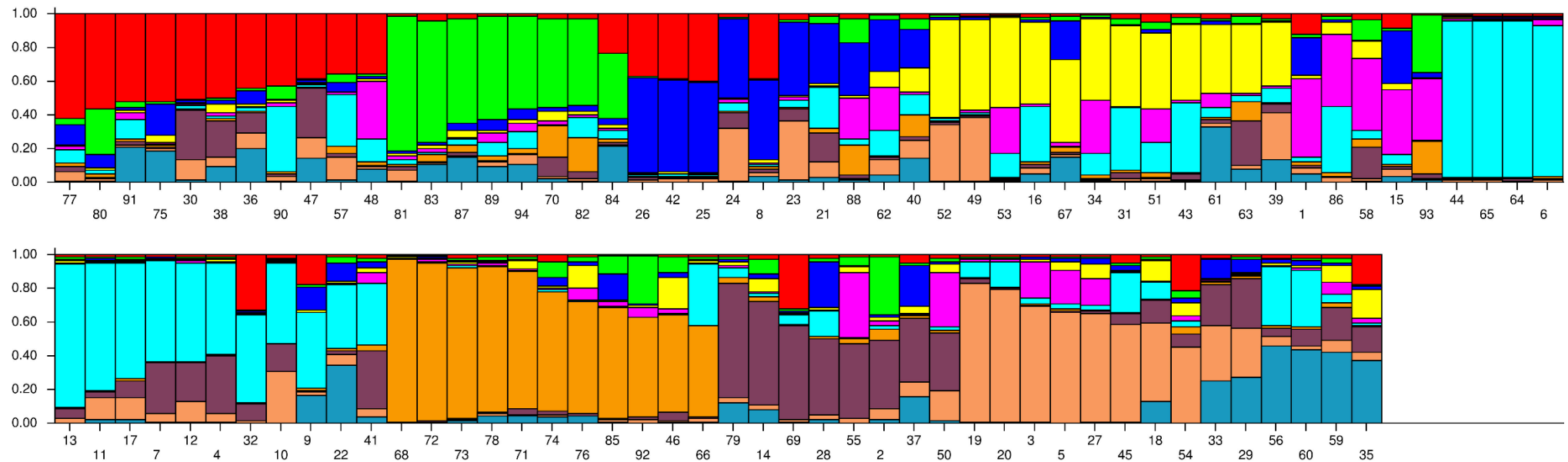


Рис. Г.1. Детальна генетична структура 94 сортів та форм черешні.

1 – форма VAL/3, 2 – Мелітопольська чорна, 3 – Анонс, 4 – Талісман, 5 – Крупноплідна, 6 – Казка, 7 – Мелітопольська мирна, 8 – Темпоріон, 9 – Простір, 10 – Престижна, 11 – Аншлаг, 12 – Ласуня, 13 – Міраж, 14 – Зодіак, 15 – Шанс, 16 – Присадибна, 17 – Електра, 18 – Дачниця, 19 – Прощальна Тараненко, 20 – Василиса прекрасна, 21 – форма DON/1, 22 – форма DON/2, 23,24 – Отрада, 25 – Аннушка, 26 – Тайна, 27 – Етика, 28 – форма YAR/1, 29 – форма YAR/2, 30 – Дончанка, 31 – Джерело, 32 – Валерія, 33 – Донецький уголюк, 34 – форма SES/1, 35 – форма SES/2, 36 – Желточек, 37 – Рання розова, 38 – Амазонка, 39 – Студентка, 40 – Донецька рання, 41 – Аеліта, 42 – Руксандра, 43 – Леся, 44 – Д 58-52, 45 – Д 44-15, 46 – форма NIJ/2, 47 – Любава, 48 – форма КУТ/3, 49 – Легенда Млієва, 50 – Дар Млієва, 51 – Коралова, 52 – Зоряна, 53 – Бірюза. 54 – Наяда, 55 –

Нектарна, 56 – Ювілейна мліївська, 57 – Червнева, 58 – Мліївська чорна, 59 – Веселка, 60 – Аборигенка, 61 – Показкова, 62 – Щедрість, 63 – Єдина, 64 – форма OLE/1, 65 – форма OLE/2, 66 – форма GEN/1, 67 – форма DRO/1, 68 – Plena, 69 – AVCV1, 70 – AVCV2, 71 – AVCV3, 72 – AVCV4, 73 – AVCV5, 74 – AVCV6, 75 – AVCV7, 76 – AVCV8, 77 – AVLV1, 78 – AVKV1, 79 – Денисена жовта, 80 – Margit, 81 – Folfer, 82 – Adriana, 83 – Sato Nishiki, 84 – Napoleon, 85 – Харата, 86 – Жабуле, 87 – Scwecja A., 88 – Regina, 89 – Burlat, 90 – Garnet, 91 – Lapins, 92 – Saint Georges, 93 – Cristobalina, 94 – Tunisian cv.

## ДОДАТОК Д

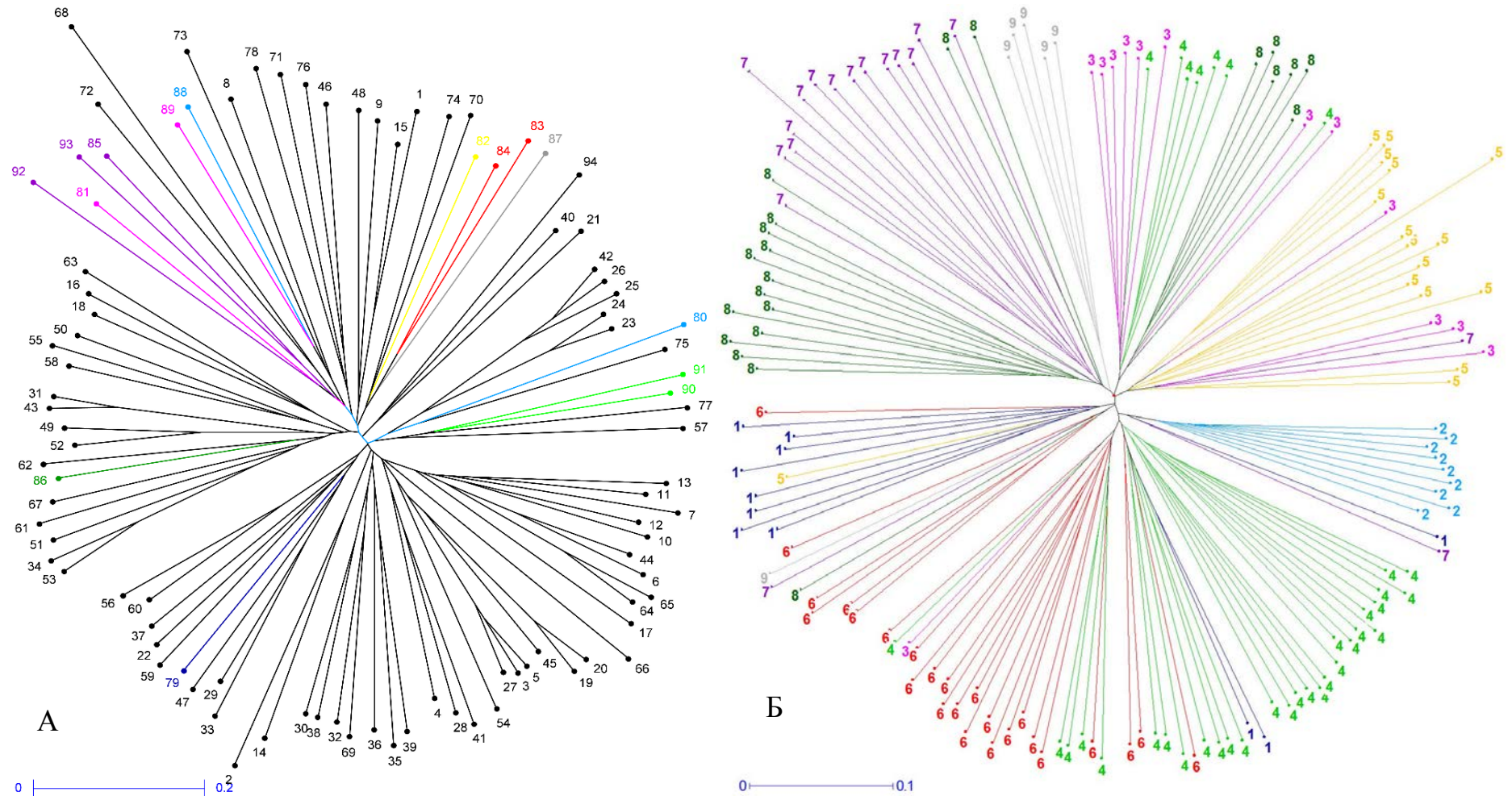


Рис. Д.1. Порівняння N-J-кладограм. А – Порівняння дерева на основі SSR-маркерів та S-локусу із результатами STRUCTURE (94 сортів черешні, наше дослідження). Б – Порівняння дерева на основі SNP-маркерів із результатами DAPC (210 сортів черешні, INRA). На рис. А кольорами ідентичними до рис. Б відмічено референтні сорти з девяти генетичних пулів.

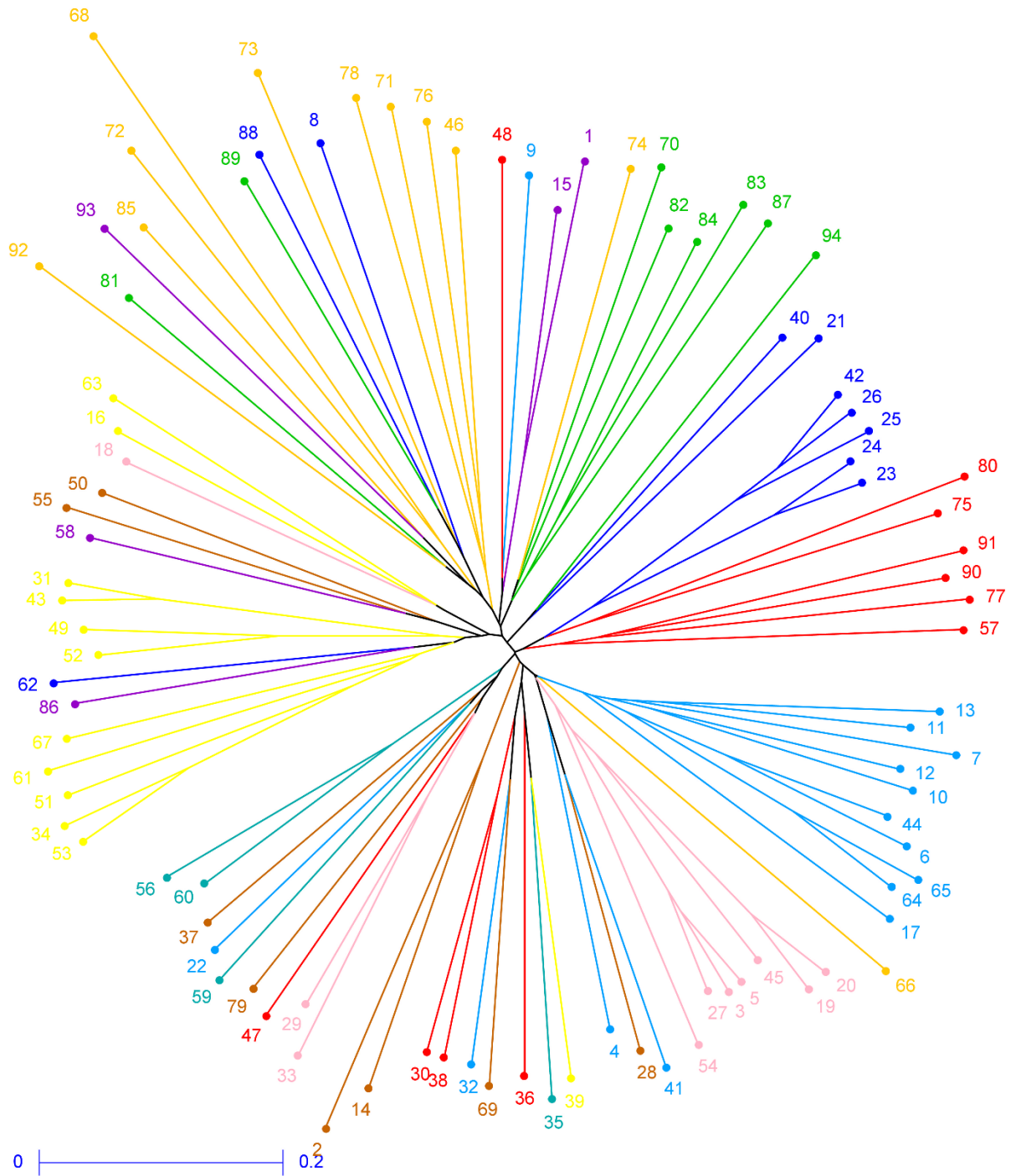


Рис. Д.2. Порівняння N-J-кладограм на основі SSR-маркерів та *S*-локусу (94 сортів та форм черешні із нашого дослідження) із результатами STRUCTURE. Кольорами виділено генетичні пули ( $K = 10$ ) ідентифіковані за допомогою STRUCTURE. Кластер 1 – червоний, 2 – зелений, 3 – синій, 4 – жовтий, 5 – фіолетовий, 6 – блакитний, 7 – помаранчевий, 8 – коричневий, 9 – рожевий, 10 – бірюзовий. Підписи назв сортів див. рис. Г.1.

## ДОДАТОК Е

Таблиця Е.1

Алельні варіанти мікросателітних локусів CPSCT038, BPPCT034 та алелі гена *PavCNR12* у досліджених генотипів черешні

Сорт	Алелі <i>PavCNR12</i>	CPSCT038	BPPCT034
Аборигенка	1/2	190:204	235:255
Аеліта	1/1	190:190	255:255
Аннушка	1/1	190:190	255:255
Анонс	1/1	190:190	255:255
Аншлаг	1/2	190:190	235:255
Бірюза	1/В	190:192	223:255
Валерія	1/1	190:190	255:255
Василиса прекрасна	1/1	190:190	255:255
Веселка	1/1	190:204	235:255
Д 58-52	1/С	190:192	223:255
Дар Млієва	1/1	190:190	255:255
Дачниця	1/2	190:204	235:255
Джерело	1/1	190:190	255:255
Донецька рання	1/1	190:190	223:255
Донецький угольок	1/2	190:204	235:255
Дончанка	1/1	190:190	255:255
Електра	1/1	190:204	255:255
Етика	1/1	190:190	255:255
Єдина	1/2	190:204	223:235
Зодіак	1/1	190:190	235:255
Зоряна	1/В	190:190	255:255
Казка	1/3	190:192	255:255
Китаївська чорна (КУТ/4)	1/А	-:-	-:-
Коралова	1/1	190:192	223:255
Крупноплідна	1/1	190:190	255:255
Ласуня	1/3	190:192	223:255
Легенда Млієва	1/1	190:190	255:255
Леся	1/1	190:190	255:255
Любава	1/2	190:204	235:255
Мелітопольська мирна	1/1	190:190	255:255
Мелітопольська чорна	1/1	190:190	239:255
Міраж	1/1	190:190	255:255
Мліївська чорна	1/А	190:192	223:255
Нектарна	1/А	190:192	223:255
Ніжність (НИ/3)	1/2	-:-	-:-
Отрада	1/1	190:190	255:255
Показкова	1/2	190:204	235:255
Престижна	1/1	190:190	255:255
Присадибна	1/1	190:190	223:255
Простір	1/2	190:204	235:255
Прощальна Тараненко	1/1	190:190	255:255
Рання розова	1/1	190:190	255:255
Сестрьонка (SES/2)	1/1	190:190	255:255

Студентка	1/1	190:190	255:255
Тайна	1/1	190:190	255:255
Талісман	1/1	190:190	255:255
Темпоріон	1/1	–:–	255:255
Форма (DON/1)	1/1	190:190	255:255
Форма (DON/2)	1/2	190:204	235:255
Форма (DRO/1)	1/3	190:202	223:255
Форма (GEN/1)	1/A	188:190	237:255
Форма (GEN/2)	1/1	–:–	–:–
Форма (KYT/3)	2/3	192:204	223:235
Форма (NIJ/2)	3/3	192:204	223:255
Форма (REG/1)	1/2	–:– <sup>1</sup>	–:–
Форма (VAL/3)	1/3	–:–	225:255
Форма (YAR/1)	1/1	190:190	255:255
Форма (YAR/2)	1/2	190:204	235:255
Чудо (P.×gondouinii)	1/3	–:–	–:–
Шанс	1/A	190:192	223:255
Щедрість	1/1	190:192	223:255
Ювілейна мліївська	1/2	190:204	235:255
Burlat	1/1	–:–	223:237
Cristobalina	1/A	192:206	221:225
Dönissens Gelbe	1/2	190:204	235:255
Jaboulay	1/A	190:192	223:223
Napoleon	1/2	190:204	235:255
Plena	3/D	230:230	227:273
Regina	1/2	–:–	223:255
Saint Georges	1/1	–:–	215:245
Xapata	1/A	186:192	215:223

Примітки. <sup>1</sup> – прочерком відмічено відсутні дані щодо розміру МС маркерів.

## ДОДАТОК Ж

## Таблиця Ж.1

Опубліковані відомості про S-генотипи сортів та форм черешні української селекції

Сорт	S-генотип	ГПН	Посилання	Оригігатор
19-21Б	S2S9	XLIII	Cabrera, 2012	МДСС
Альонушка	S2S5	VIII	Lisek, 2015	АДСР
Амазонка	S4S5	V	Sharma, 2014; Sharma, 2016	АДСР
Аннушка	S3S4	III	Lisek, 2015; Sharma, 2016	АДСР
Анонс	S5S9	XXXVII	Lisek, 2015	МДСС
Валерій Чкалов	S1S9	XVIII	Bekefi, 2006; Shuster, 2007; Shuster, 2012; Shuster, 2017	МДСС
Валерій Чкалов	S1S6	XX	Bekefi, 2006	МДСС
Василиса прекрасна	S3S9	XVI	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Вахтанка	S1S4	IX	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Винка	S3S6	VI	Shuster, 2007; Shuster, 2012; Shuster, 2017	МДСС
Г-д 2115	S6S9	X	Hegedus, 2013	Невідомо
Генеральська	S2S4	XIII	Shuster, 2007; Shuster, 2012; Shuster, 2017	Нікіт. БС
Д 44-1	S4S5	V	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Д 48-52	S2S5	VIII	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Д 49-1	S3S5	VII	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Донецька красивиця	S3S9	XVI	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Донецький угольок	S5S9	XXXVII	Lisek, 2015	АДСР
Донецький угольок	S3S5	VII	Sharma, 2016; Shuster, 2017	АДСР
Дончанка	S3S6	VI	Sharma, 2016; Shuster, 2017	АДСР
Казка	S1S9	XVIII	Lisek, 2015; Shuster, 2017	МДСС
Київлянка	S6S9	X	Lisek, 2015; Shuster, 2017	IC
Китаївська чорна	S2S5	VIII	Lisek, 2015; Shuster, 2017	IC
Китаївська чорна	S6S9	X	Lisek, 2015; Shuster, 2017	IC
Красуня Києва	S6S9	X	Lisek, 2015; Shuster, 2017	IC
Кримська ніч	S1S3	II	Hegedus, 2013; Shuster, 2017	Нікіт. БС
Крупноплідна	–	–	Sharma, 2014	МДСС
Крупноплідна	S4S5	V	Hegedus, 2013	МДСС
Крупноплідна	S5S9	XXXVII	Bekefi, 2006; Shuster, 2007; Shuster, 2012; Cabrera, 2012; Shuster, 2017	МДСС
Кутузовка	S3S5	VII	Hegedus, 2013; Shuster, 2017	Нікіт. БС
Любава	S1S3	II	Lisek, 2015; Shuster, 2017	IC/АДСР
Мелітопольська крапчаста	S3S5	VII	Hegedus, 2013; Shuster, 2017	МДСС
Мелітопольська рання	S5S14	XXXV	Shuster, 2007; Shuster, 2012; Shuster, 2017	МДСС
Нектарна	S5S6	XV	Lisek, 2015; Shuster, 2017	III
Ніжність	S4S5	V	Lisek, 2015; Shuster, 2017	IC
Перспективна	S1S2	I	Hegedus, 2013; Shuster, 2017	Нікіт. БС
Престижна	S5S9	XXXVII	Lisek, 2015; Shuster, 2017	МДСС

Присадибна	S6S9	X	Lisek, 2015; Shuster, 2017	МДСС
Прошальна Тараненко	S2S9	XLIII	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Рання розова (Р. розовинка)	S3S5	VII	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Рекордистка	S2S6	XXV	Shuster, 2007; Shuster, 2012	Нікіт. БС
Руксандра	S3S4	III	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Самоцвіт	S5S6	XV	Lisek, 2015; Shuster, 2017	МДСС
Сестрьонка	S3S5	VII	Sharma, 2016; Shuster, 2017	АДСР
Татарська чорна	S1S2	I	Bekefi, 2006; Shuster, 2007; Shuster, 2012	Ландраса
Транспортабельна	S1S3	II	Hegedus, 2013; Shuster, 2017	Нікіт. БС
Транспортабельна	S3S4	III	Shuster, 2007; Shuster, 2012; Shuster, 2017	Нікіт. БС
Трудівниця степу	S2S5	VIII	Hegedus, 2013; Shuster, 2017	Нікіт. БС
Червнева рання	S4S5	V	Hegedus, 2013; Shuster, 2017	МДСС
Ярославна	S3S5	VII	Lisek, 2015; Shuster, 2017	АДСР
Wspleska	S3S6	VI	Lisek, 2015; Shuster, 2017	Невідомо
Debanka	S1S6	XX	Shuster, 2007; Shuster, 2012; Shuster, 2017	Невідомо