



Ю. М. Юсупович, В. К. Магуран

Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна

ВИЗНАЧЕННЯ ВНУТРІШНЬОВИДОВОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ГЕНОТИПІВ ГОРІХА ГРЕЦЬКОГО (*JUGLANS REGIA* L.)

Диференціація сортів і гібридних форм горіха грецького за морфологічним описом є недостатньою для генетичного контролю саджанців щодо їх відповідності сорту. Наразі існує потреба у створенні системи генетичної ідентифікації та ДНК-паспортизації сортів і гібридних форм *J. regia*. Наведено метод полімеразно-ланцюгової реакції для диференціації генотипів горіха грецького з використанням чотирьох ISSR-праймерів такого складу: (GA)₈TC, (CA)₈TG, (GA)₈CG, (GA)₈GT. Оптимізовано умови ПЛР та здійснено електрофоретичне розділення ампліконів у 6 % поліакриламідному гелі, фарбованого азотнокислим сріблом. За цими праймерами було проаналізовано 12 генотипів *J. regia* та отримано 50 ампліконів різної довжини, з яких 30 поліморфних та 20 мономорфних. Визначено значну частку поліморфності у праймера CR-252-80 %. Найменшу частку поліморфності – 65 %, виявлено у праймера CR-253. Визначено мономорфні амплікони із довжинами: 120 п.н., 125 п.н., 230 п.н., 275 п.н., 300 п.н., 375 п.н., 380 п.н., 510 п.н., 580 пар нуклеотидів і поліморфні амплікони із довжинами: 135-170 п.н., 190-225 п.н., 240-260 п.н., 320-360 п.н., 400-500 п.н., 520-560 п.н., 590-1010 п.н. Продемонстровано практичне застосування ISSR-аналізу для порівняння генотипів горіха грецького на відповідність заявлених сортів восьми саджанців, придбаних на українському ринку. Здійснено кластерний аналіз генотипів саджанців і визначено їх коефіцієнти розбіжності. З'ясовано, що саджанці заявленого сорту Вебу-6 № 1 та Вебу-6 № 2 – це різні гібридні форми насіннєвого походження, коефіцієнт розбіжності становить 0,46. Саджанці заявленого сорту Юкалівський крепиш № 1 та Юкалівський крепиш № 2 є генетично близькоспоріднені з найменшим коефіцієнтом розбіжності – 0,04, але мають насіннєве походження. Встановлено, що заявлені саджанці сорту Чандлер № 1 та Чандлер № 2, які походять від різних постачальників – це також різні генотипи з коефіцієнтом розбіжності 0,24. Запропоновано молекулярно-генетичне маркування генотипів горіха грецького з метою ДНК-паспортизації на підставі апробованих чотирьох ISSR-праймерів.

Ключові слова: горіх грецький; праймери; генотипи; ISSR-маркери; полімеразно-ланцюгова реакція; ДНК-паспортизація.

Вступ / Introduction

Горіх грецький (*Juglans regia* L.) є цінною горіхолюбною культурою, яка поширена по всій території України і не втрачає своєї популярності як у приватних садибах, так і в харчовій промисловості. Селекція горіха грецького в Україні інтенсивно розвивається, виведено нові вітчизняні гібридні форми, а також гібридні форми за участю закордонних інтродукованих сортів. Станом на серпень 2024 р. у державному реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні, нараховується 43 сорти горіха грецького [28]. Характеристику та опис цих сортів здійснюють за низкою морфологічних ознак. Незважаючи на це, інколи неможливо морфологічно диференціювати окремі генотипи дерев, які виведені насіннєвим шляхом. Такі гібриди можуть тільки з часом проявляти істотну відмінність від материнської форми за урожайністю, якістю плодів, зимостійкістю, стійкістю до хвороб та за іншими показниками. Окрім цього, наразі не існує стандартизованої генетичної системи державного контролю саджанців щодо їх відповід-

ності сорту з метою захисту прав власності на сорт та уникнення пересорту. З огляду на це, виникає потреба у створенні системи генетичної ідентифікації та диференціації сортів і гібридних форм *J. regia*. Цього можна було б досягти за допомогою розроблення та формування бази даних ДНК-паспортизації гібридних форм і сортів горіха грецького. У світовій практиці з цією метою широко використовуються молекулярні маркери. Зокрема, повторювані послідовності, такі як ISSR (англ. *Inter Simple Sequence Repeat* – інвертовані прості повторювані послідовності), SSR (прості повторювані послідовності) [1, 26, 32], RAPD (англ. *Random Amplification of Polymorphic DNA* – випадково ампліфікована поліморфна ДНК), молекулярними маркерами можуть слугувати також окремі гени з інтронними ділянками та ін. [16]. Найчастіше ISSR та SSR успішно застосовують у філогенетичних дослідженнях для паспортизації сортів рослин або порід тварин.

Об'єкт дослідження – внутрішньовидова диференціація генотипів горіха грецького.

Предмет дослідження – методи і засоби визначення

Інформація про авторів:

Юсупович Юрій Михайлович, канд. біол. наук, завідувач відділу благоустрою та репродукції рослин Ботанічного саду.

Email: jousse@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0013-6699>

Магуран Володимир Костянтинович, здобувач вищої освіти доктора філософії, асистент, кафедра ботаніки, деревинознавства та недревних ресурсів лісу. Email: vol.mahuran20@nltu.lviv.ua; <https://orcid.org/0009-0007-7786-3874>

Цитування за ДСТУ: Юсупович Ю. М., Магуран В. К. Визначення внутрішньовидової диференціації генотипів горіха грецького (*Juglans regia* L.). Науковий вісник НЛТУ України. 2024, т. 34, № 6. С. 26–32.

Citation APA: Yushpovych, Yu. M., & Mahuran, V. K. (2024). Determination of intraspecific differentiation of walnut genotypes (*Juglans regia* L.). *Scientific Bulletin of UNFU*, 34(6), 26–32. <https://doi.org/10.36930/40340604>

генетичного різноманіття саджанців горіха грецького.

Мета роботи – провести молекулярно-генетичний аналіз гібридних форм і сортів горіха грецького для встановлення диференціації генотипів, що дасть змогу генетично диференціювати окремі особини дерев горіха грецького.

Для досягнення зазначеної мети визначено такі основні завдання дослідження:

- 1) розробити методику молекулярно-генетичного аналізу для диференціації генотипів горіха грецького за участю ISSR-праймерів, що дасть змогу отримувати унікальні спектри ампліконів ДНК для окремих аналізованих дерев, або саджанців;
- 2) проаналізувати її ефективність для визначення генетичної спорідненості між заявленими сортами саджанців горіха грецького, які реалізуються на ринку, що допоможе уникати пересорту.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Одні з перших спроб застосування ISSR-маркерів для визначення генетичної спорідненості між культиварами горіха грецького з різних країн світу здійснили Д. Поттер спільно з колегами в США та П. Полегіоні в Італії [25, 24]. З часом чимало уваги було приділено іншим маркерним системам аналізу. Нещодавно А. Меджидж та М. Гуні для вивчення популяцій *J. regia* використали SSR-маркери [6, 18]. На відміну від SSR-маркерів, ISSR-аналіз дає змогу одночасно оцінювати поліморфізм декількох десятків локусів. При цьому відбувається ампліфікація ДНК-фрагментів, розташованих між інвертованими послідовностями мікросателіта, зазвичай, це структурні і регуляторні ділянки генів [29]. ISSR-маркери вважаються більш інформативними для оцінювання рівня генетичного різноманіття в середині виду, ніж локус-специфічні маркери [2]. ISSR-аналіз широко застосовують для генетичних досліджень сільськогосподарських рослин. Наразі ISSR-праймери застосовано для виявлення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів картоплі та кабачка [17, 21]. Вивчення генетичної структури деревних рослин за участю ISSR-аналізу здійснено для павловнії, магнолії кобус, евкаліпта та для інших тропічних деревних видів [3, 22, 23, 30]. Серед плодових дерев аналогічні дослідження здійснювали для культиварів сливи та яблуні звичайної, шовковиці та маслини європейської [11, 12, 13, 33].

Застосування ISSR-маркерів в аналізі генотипів деревних рослин також здійснили вітчизняні науковці. Зокрема, Р. Т. Гут спільно зі співавторами для виявлення філогенетичних зв'язків між представниками роду *Fagus* здійснили ISSR-аналіз каштана кінського, дуба звичайного та бука лісового [5]. Окрім цього, з метою внутрішньовидової диференціації плодових дерев цей метод успішно застосували Я. І. Іванович зі співавторами на українських культиварах черешні *Prunus avium* L. [9]. Очевидно, що використання мультилокусних маркерів у генетичному аналізі для плодових дерев та лісових культур матиме дедалі ширше застосування.

Матеріали та методи дослідження. Для дослідження використано черешки молодого листя та кору одnorічних пагонів горіха грецького. Сумарну ДНК виділяли ЦТАБ-методом з незначною модифікацією [4]. ПЛР здійснювали за допомогою ампліфikatorа Thermal Cycler TC020A (Labnet International Inc., США). У роботі використано праймери виробництва фірми Sigma (США), характеристику яких наведено у табл. 1. Продукти ПЛР розділяли електрофоретично у 2 % агарозі

та у 6 % поліакриламідному гелі в однократному трис-боратному буфері, рН 8,3. Усі досліди проводили у трикратній повторності. Довжину ампліфікованих фрагментів (ампліконів) визначали за допомогою комп'ютерної програми GelProAnalyzer 4.0 ("MediaCybernetics", США), як стандарти використано так звані маркери довжини ДНК GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Результати дослідження та їх обговорення / Research results and their discussion

За допомогою ПЛР було проаналізовано 19 ISSR-праймерів для отримання унікальних ДНК-спектрів у різних генотипів горіха грецького. Продукти ампліфікації ми отримали тільки із чотирма праймерами із такими мотивами повторів: (GA)₈TC, (CA)₈TG, (GA)₈CG та (GA)₈GT. Реакційна суміш для ПЛР містила 2,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ дНТФ (Fermentas); 0,3 мкМ одного з праймерів, 20 нг ДНК та 0,8 од. акт. TaqPol ДНК-полімерази (Fermentas). Умови ПЛР: початкова денатурація 95 °C, 5 хв та 40 циклів: денатурація 94 °C, 1 хв; відпал від 40 до 50 °C, 1 хв; елонгація 72 °C 1 хв і після останнього циклу ще 7 хв елонгації за температури 72 °C. На першому етапі досліджень продукти ПЛР розділяли у 2 % агарозному гелі в однократному трис-боратному буфері, рН 8,3 та забарвлювали бромистим етидієм (0,5 мкг/мл).

Генетичним матеріалом слугувала сумарна ДНК, виділена із 12-ти гібридних форм і сортів горіха грецького. У роботі використано морфологічно різні гібридні форми горіха грецького природного походження, які утворені від вільного схрещування між різними культиварами горіха грецького і які відрізняються за інтенсивністю росту та типом плодоношення. Гібридна форма № 1 – низькоросла з латеральним плодоношенням, гібридна форма № 2 – середньоросла з латеральним плодоношенням, гібридна форма № 3 – середньоросла з термінальним плодоношенням, гібридна форма № 5 – сильноросла з термінальним плодоношенням. Саджанці горіха грецького, які були придбані на українському ринку: заявлений сорт Чандлер № 1 – це щеплений одnorічний саджанець, придбаний в Інтернет-магазині "Agromarket". Інші саджанці заявлені як сорт Чандлер № 2, а також як сорт Юкалівський Крепиш – одnorічний та дворічний саджанці походять від приватного господарства "Твій горіх", проте з різних партій. Обидва саджанці заявленого сорту Вебу-6 також походять з різних партій від господарства "Твій горіх". Взірці гібридної форми, середньорослої з термінальним плодоношенням, Рихтицький № 1 та Рихтицький № 2 – це щеплені 5-річні саджанці, які відібрано з приватної колекції як контрольні ідентичні генотипи.

Відомо, що на результати ПЛР значно впливає якість виділеної ДНК. Після виділення сумарної ДНК ЦТАБ-методом, ДНК додатково очищали на колонках із ДНК-зв'язуваними фільтрами (GeneJET Spin Columns & Collection Tubes, Fermentas, Литва). У кожній ПЛР суміші використовували один праймер. Експериментальним шляхом визначено оптимальну температуру відпалу для кожного із праймерів (див. табл. 1).

Для розділення продуктів ПЛР використано електрофорез у 2 % агарозному гелі. На цьому етапі отримано диференційовані спектри ампліфікованої ДНК. Унаслідок ПЛР, після електрофорезу, було детектовано від 4-х до 9-ти продуктів різної довжини (рис. 1,а,б).

Табл. 1. Характеристика ISSR-праймерів / Characterization of ISSR-primers

№ з/п	Назва праймера	Послідовність праймера, 5'-3'	Мотив послідовності	Температура відпалу, °C
1	CR-250	GAGAGAGAGAGAGATC	(GA) ₈ TC	45
2	CR-251	CACACACACACACATG	(CA) ₈ TG	45
3	CR-252	GAGAGAGAGAGAGACG	(GA) ₈ CG	50
4	CR-253	GAGAGAGAGAGAGAGT	(GA) ₈ GT	50

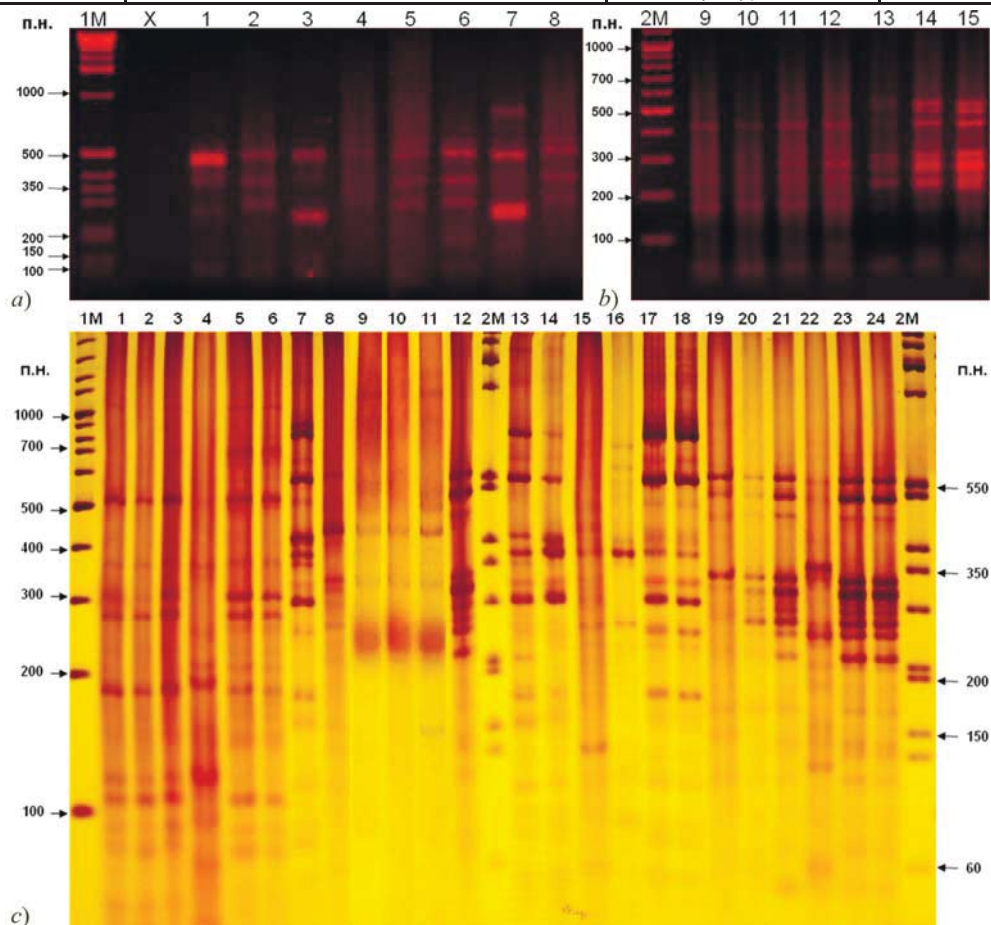


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації / Electrophoregram of amplification products: a), b) праймерів CR-250, CR-251, CR-252 та CR-253 із геномною ДНК гібридних форм горіха грецького / of primers CR-250, CR-251, CR-252 and CR-253 with genomic DNA of walnut hybrid forms; c) за участю ISSR-праймерів із геномною ДНК заявлених сортів горіха грецького / using ISSR-primers with genomic DNA of walnut declared variety

На рис. 1,а,б амплікони розділено в 2 % агарозі. Також введено такі позначення: п.н. – пар нуклеотидів; 1М – молекулярні маркери 1 kb DNA Ladder Gibco BRL (Invitrogen Tech-Line, США); 2М – молекулярні маркери 1 kb DNA Ladder #0313 (Fermentas, Литва); доріжки 1-4 – амплікони гібридних форм з праймером CR-251; доріжки 5-8 – амплікони ДНК з праймером CR-252; доріжки 9-12 – амплікони ДНК з праймером CR-250; доріжки 13-15 – амплікони ДНК з праймером CR-253. X – реакційна суміш без матричної ДНК; доріжки: 1, 5, 9 – гібридна форма № 1; доріжки: 2, 6, 10 – гібридна форма № 2; доріжки: 3, 7, 11 – гібридна форма № 3; доріжки: 4, 8, 12 – гібридна форма № 5; доріжки: 14, 15 – гібридна форма Рихтицький № 1 та № 2; доріжка 13 – саджанець заявлений як сорт Чандлер № 2.

На електрофореграмі видно диференційовані спектри ампліфікованих продуктів аналізованих гібридних форм горіха грецького, що вказує на їх різні генотипи. Проте, варто зазначити, що електрофорез у 2 % агарозному гелі мав низьку роздільну здатність для виокремлення індивідуальних продуктів ампліфікації. Такі нерозділені продукти в одній смужі, з інтенсивною люмінесценцією, можна побачити на доріжках 1, 3, 7, 14 та

15 (див. рис. 1,а,б). Надалі для підвищення інформативності електрофоретичного методу аналізу продуктів ампліфікації, під час порівняння генотипів саджанців заявлених сортів, було використано 6 % поліакриламідний гель, який зафарбовували азотнокислим сріблом. За такого фракціонування у спектрах було виявлено від 8 до 23 ампліфікованих фрагментів залежно від генотипу і від застосованого праймера (рис. 1,с).

На рис. 1,с під * показано 6 % поліакриламідний гель, фарбування азотнокислим сріблом. Стрілками позначено довжини стандартних молекулярних маркерів; п.н. – пар нуклеотидів; 1М – молекулярні маркери GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва); 2М – молекулярні маркери 1 kb DNA Ladder Gibco BRL (Invitrogen Tech-Line, США). Доріжки 1-6 – амплікони із праймером CR-250; доріжки 8-11 – амплікони із праймером CR-252; доріжки 7, 13-18 – амплікони ДНК із праймером CR-251; доріжки 12, 19-24 – амплікони із праймером CR-253; доріжки 1, 11, 13, 19 – Чандлер № 1; доріжки 2, 14, 20 – Чандлер № 2; доріжки 5, 10, 17 – Юкалівський крепиш № 1; доріжки 6, 18 – Юкалівський крепиш № 2; доріжки 3, 9, 15, 21 – Вебу-6 № 1; доріжки 4, 16, 22 – Вебу-6 № 2; доріжки 7, 8, 23 – Рихтицький № 1; та 12, 24 – Рихтицький № 2.

У спектрах фракціонованих ампліконів аналізованих заявлених сортів і гібридних форм з електрофореграм визначено мономорфні (конститутивні) та поліморфні амплікони. Окремо за кожним із праймерів проаналізовано кількість його мономорфних і поліморфних ампліконів, а також загальну їх кількість та рівень поліморфізму (табл. 2).

Табл. 2. Характеристика праймерів за генетичним профілюванням генотипів горіха грецького / Characterization of primers by genetic profiling of walnut genotypes

№ з/п	ISSR-праймер	Розмір ампліконів, п.н.	Загальна кількість ампліконів	Мономорфні амплікони	Поліморфні амплікони	Частка поліморфності, %
1	CR-250	110-1010	17	5	12	71
2	CR-251	120-900	22	5	17	77
3	CR-252	120-830	8	2	6	80
4	CR-253	125-650	23	8	15	65

Рівень поліморфізму оцінювали у відсотках – як відношення поліморфних ПЛР-локусів до загального числа детектованих ПЛР-локусів: $P = n_p / (n_p + n_{np}) \times 100 \%$, де n_p – кількість поліморфних ПЛР-локусів, n_{np} – кількість неполіморфних ПЛР-локусів [27].

Значна частка поліморфності – 80 % – характерна для праймера CR-252. Найбільша кількість ампліконів – 23 – утворювалася з праймером CR-253, але водночас він мав найменшу частку поліморфності – 65 %. Кожен із праймерів характеризувався широким спектром продуктів ампліфікації, завдовжки від 110 п.н. до 1010 п.н. Визначено мономорфні амплікони з довжиною: 120, 125, 230, 275, 300, 375, 380, 510, 580 пар нуклеотидів. Поліморфні амплікони характеризувалися довжинами: 135-170 п.н., 190-225 п.н., 240-260 п.н., 320-360 п.н., 400-500 п.н., 520-560 п.н. та 590-1010 п.н. Окрім цього, у спектрах ампліфікації кожного із трьох праймерів (CR-250, CR-251 та CR-252) виявлено продукти однакової довжини: 260 п.н. і 500 п.н. Подібний амплікон із довжиною 160 п.н. детектовано з праймерами CR-251, CR-252 і CR-253. У спектрах ампліфікації всіх чотирьох праймерів виявлено продукт завдовжки 300 п.н. Загалом за 4-ма праймерами у спектрах ампліфікації було отримано 50 ампліконів різної довжини, з яких 30 поліморфних та 20 мономорфних.

Дані електрофоретичного аналізу ампліконів кожного генотипу було переведено в бінарні матриці, де "1" або "0" позначали, відповідно, присутність чи відсутність ампліфікованого фрагмента певної довжини. Рівень геномної спорідненості різних генотипів оцінювали за значеннями генетичних відстаней Нея [20]. Генетичні відстані обчислювали на підставі отриманої матриці даних, використовуючи коефіцієнт розбіжності. Для побудови дендрограми проводили кластерний аналіз для парних груп із середнім арифметичним, бутстреп-тест із пакету прикладних програм "Statistica 10" (пробна версія).

Для практичного застосування молекулярно-генетичного аналізу з метою визначення рівня геномної спорідненості між заявленими сортами було проаналізовано вісім саджанців горіха грецького. За результатами ISSR-аналізу побудовано дендрограму генетичних взаємозв'язків між генотипами саджанців горіха грецького (рис. 3).

З дендрограми видно, що саджанці заявленого сорту Вебу-6 № 1 та Вебу-6 № 2 перебувають в одному кластері, але на різних гілках, і мають між собою високий коефіцієнт розбіжності – 0,46. Отже, це різні гібридні форми. Низький коефіцієнт розбіжності – 0,04 мають саджанці заявленого сорту Юкалівський крепиш № 1 і Юкалівський крепиш № 2. Ці генотипи близькоспоріднені, але неідентичні, що вказує на їх насіннєве походження. Генотип Вебу-6 № 1 є найбільш спорідненим до генотипів Юкалівський крепиш із коефіцієнтом розбіжності 0,3. Контрольні генотипи Рихтицький № 1 та Рихтицький № 2, як і очікувалось, є ідентичними, а коефіцієнт розбіжності між ними дорівнює 0. Це одна і та сама генетична форма, яка щеплена на різних підщепах. Окрім цього, цікавим є те, що обидва щеплені саджанці заявлені як сорт Чандлер, названі нами відповідно Чандлер № 1 та Чандлер № 2, були придбані у різних постачальників, виявилися різними генотипами. На дендрограмі вони перебувають в одному кластері, що вказує на їх деяку генетичну спорідненість, проте коефіцієнт розбіжності між ними становить 0,24. Важливо зазначити, що жоден із придбаних нами саджанців не мав документального підтвердження відповідної сортності, тому не міг вважатися еталонним (материнським) для генетичного порівняння. Отже, за результатами генетичного аналізу, майже усі саджанці горіха грецького, окрім контрольної гібридної форми Рихтицький, генотипово відрізняються один від одного.

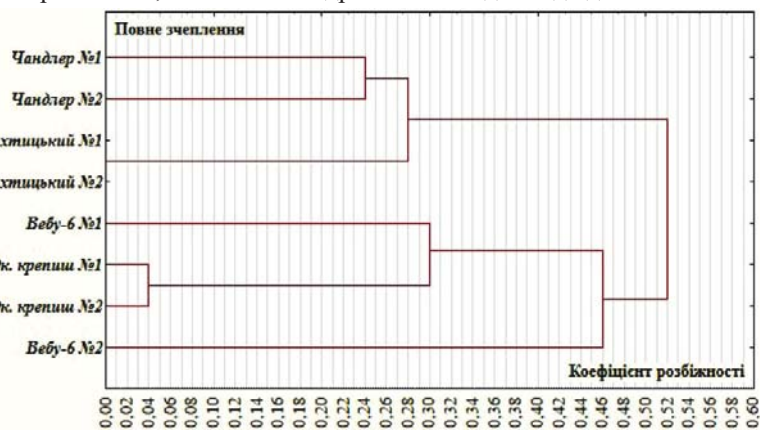


Рис. 3. Дендрограма генетичних взаємозв'язків між генотипами саджанців горіха грецького / Dendrogram of genetic relationships between walnut genotypes of seedlings (авторська розробка / authors' development)

Кожен із застосованих праймерів формує унікальний спектр ампліконів, які в сумі дають молекулярно-генетичну характеристику гібридній формі або сорту. Ці унікальні спектри ампліконів можна перевести у молекулярно-генетичні формули для ДНК-паспортизації генотипів *J. regia* (табл. 3).

Літерами латинського алфавіту (A-Q) було позначено умовні групи ампліконів. Кожен амплікон розглядали як один локус. У межах кожної групи в індексах позначено довжини окремих детектованих ампліконів (локусів), які в кожній групі відрізняються між собою не більше ніж на 35 п.н. Така формула відображатиме унікальний набір продуктів ампліфікації сумарно за чотирма ISSR-праймерами для окремих генотипів або сортів горіха грецького. Аналогічний спосіб маркування може спрощувати процес формування бази генотипів як еталонних взірців для майбутнього порівняння з дослідними взірцями.

Табл. 3. Молекулярно-генетичні формули маркування генотипів горіха грецького за чотирма ISSR-праймерами /
Molecular genetic formula for marking walnut genotypes using four ISSR-primers

№ з/п	Сорт, гібридна форма	Молекулярно-генетична формула* генотипів
1	Чандлер № 1	A _{110,120,125,140} B _{160,180} C _{220,225} D _{230,260} E _{275,280,300} F _{320,325,330,340} G _{375,380} H _{400,420} I ₄₆₀ J _{500,510} K _{580,590} L ₆₀₀ O ₈₀₀ Q ₁₀₁₀
2	Чандлер № 2	A _{110,120,125} B _{160,170,180} C ₂₂₅ D _{230,250} E _{275,280,300} F _{320,325,340,350} G _{375,380} H _{410,420} I ₄₆₀ J _{500,510} K _{580,590} O ₈₀₀ P ₉₀₀
3	Вебу-6 № 1	A _{110,120,125,140} B _{150,160,170,180} C ₂₂₅ D _{230,250,260} E _{275,285,300} F _{320,325,330,350} G _{375,380} H _{400,420} I ₄₆₀ J _{510,520} K _{580,590} L ₆₀₀ M _{650,680} N ₇₀₀ Q ₁₀₁₀
4	Вебу-6 № 2	A _{120,125,135} B _{155,180} C _{190,210,220} D _{230,240,250,260} E _{275,300} F _{340,350} G _{375,380} H ₄₀₀ J _{510,520} K ₅₈₀ M _{650,680} N ₇₀₀
5	Юкалівський крепиш № 1	A _{110,120,125,135,140} B _{150,170,180} C _{210,225} D _{230,250,260} E _{275,280,285,300} F _{320,325,340} G _{375,380} H ₄₀₀ I _{460,495} J _{500,510} K _{560,580} L _{600,620} M _{650,680} N ₇₀₀ O ₈₀₀ Q ₁₀₁₀
6	Юкалівський крепиш № 2	A _{110,120,125,135,140} B _{150,180} C _{210,225} D _{230,250,260} E _{275,280,285,300} F _{320,325,330,340} G _{375,380} H ₄₀₀ I _{460,495} J _{500,510} K _{560,580} L _{600,620} M _{650,680} N ₇₀₀ O ₈₀₀ Q ₁₀₁₀
7	Рихтицький № 1 та 2	A _{110,120,125,135,140} B _{155,160,180} C ₂₂₅ D _{230,250,260} E _{275,285,300} F _{320,325,340,350} G _{360,375,380} H _{400,420} I ₄₆₀ J _{500,510} K ₅₈₀ L ₆₀₀ N ₇₀₀ O _{800,830} P ₉₀₀

Примітка: * – діапазон значень в індексах умовних груп ампліконів (A-Q) визначено за довжиною продуктів ампліфікації, які в межах кожної групи відрізняються між собою не більше ніж на 35 п.н.

Обговорення результатів дослідження. Спроби маркування генотипів здійснювали О. Колесник спільно з колегами для зернових культур, застосовуючи SSR-аналіз [15]. Окремими літерами у молекулярно-генетичних формулах автори позначають амплікони конкретних локусів, а індексами – довжини цих ампліконів. Проте у ISSR-аналізі ампліфікуються ділянки геномної ДНК, нуклеотидні послідовності яких можливо визначити тільки методом секвенування. З огляду на це, ми запропонували літерами латинського алфавіту позначати умовні групи локусів за чотирма праймерами, довжини яких можуть змінюватися в різних генотипів горіха грецького.

Деніел Поттер спільно з авторами для генетичної диференціації світових культиварів горіха грецького протестували 47 варіантів ISSR-праймерів, з яких тільки вісім продемонстрували поліморфізм у дослідних генотипів – (AG)₈YC, (AG)₈Y, (AG)₈YT, HVH(CA)₇T, (CT)₉RC, (GT)₈YA, (TCC)₅RY та (AGAA)₄AG [25]. Сім із восьми ISSR-праймерів містять мотив послідовності із нуклеотидною заміною, яка не є цілком комплементарною до відповідних азотистих основ, які можуть траплятися у геномі горіха. Аналогічний тип праймерів із нуклеотидною заміною, з метою підвищення їх поліморфності, також застосовували Г. Кабірі зі співавторами [10]. За допомогою серверної програми BLAST (англ. *Basic Local Alignment Search Tool*) було проаналізовано 19 варіантів праймерів, порівнюючи їх із послідовностями у міжнародному банку генів GenBank, на присутність комплементарних ділянок мікросателітних повторів у депонованих нуклеотидних послідовностях горіха грецького [19]. Унаслідок пошуку на кожен варіант із таких праймерів: (CT)₈AC, (GA)₆GG, (GA)₆CC, (CT)₈GC, (GAG)₃GC, (CTC)₃GC, (GTG)₃GC, (GA)₈TC, (GA)₈CG та (GA)₈GT виявлено близько ста і більше клонів із комплементарними до них ділянками, що вказувало на їх перспективність застосування як маркерів. Проте у ПЛР нам вдалося отримати поліморфні амплікони тільки із (GA)₈CG та (GA)₈GT. Також поліморфні амплікони було отримано з іншими мікросателітними повторами – (GA)₈TC та (CA)₈TG. Усі застосовані нами ISSR-праймери не містять нуклеотидних замін і є цілком комплементарні ділянкам ДНК, які можуть траплятися у геномі *J. regia*. Перевага їх у тому, що вони можуть забезпечувати пошук більш унікальних ампліконів, які характерні тому чи іншому генотипу. К. Гоумана з колегами у своїй роботі, в аналізі 41 генотипу горі-

ха грецького, серед 12 мікросателітних повторів, також застосували праймери – (CA)₈TG та (GA)₈CG.

Ці праймери показали частки поліморфності 69,2 та 71,43 % відповідно [7]. Зіставляючи наші результати, частка поліморфності для (CA)₈TG становила 77 % і де-що вище, для (GA)₈CG – 80 %, оскільки ми аналізували значно меншу кількість генотипів і використали для розділення фрагментів гель з більшою концентрацією. Окрім цього, у порівняльному аналізі взято до уваги спектр ампліконів у межах від 1010 до 110 п.н. Все ж таки, висока поліморфність цих праймерів зберігається. Визначена нами кількість мономорфних ампліконів, порівняно із результатами К. Гоумана, збігається в межах похибки ± 1 .

Варто зазначити, що на визначення поліморфності праймерів впливає метод фракціонування фрагментів в електрофорезі та чутливість методу візуалізації їх у гелі. Український інститут експертизи сортів рослин у затвердженій методиці проведення ПЛР для вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів рослин за допомогою ISSR- і SSR- маркерів рекомендує візуалізацію продуктів ампліфікації у 2 % гелі та фарбування етидид бромідом [31]. Електрофоретичне розділення ампліконів у 2 % агарозі використовували Д. Поттер [25], Р. Т. Гут [5], а також К. Гоумана [7] в аналізі генотипів горіха грецького та інших деревних рослин за ISSR-маркерами. Такий спосіб розділення ДНК фрагментів дає змогу ідентифікувати невелику кількість продуктів ампліфікації на один генотип (від 3 до 7). Було показано, що для ефективного розділення ампліконів, утворених за ISSR-маркерами для генотипів горіха грецького, варто використовувати поліакриламідний гель концентрацією не менше 6 %. У своїй праці із вивчення культиварів черешні Я. І. Іванович разом із авторами для розділення ампліконів застосовували 10 % поліакриламідний гель, унаслідок чого їм вдалося ідентифікувати більше 40 ДНК-продуктів з одним праймером [9]. У методі фарбування гелю автори застосовували етидид бромід. У нашому випадку, було застосовано азотнокисле срібло, що дає більш високу чутливість за візуалізації фрагментів ДНК, на відміну від фарбування етидид бромідом.

Унаслідок виконаного дослідження було розроблено методику ISSR-аналізу для диференціації генотипів *J. regia*, запропоновано їх маркування за молекулярно-генетичними формулами та показано практичне застосування ISSR-аналізу у генетичному порівнянні сортів горіха грецького, які реалізуються на ринку.

Отже, за результатами виконаної роботи можна сформулювати такі наукову новизну та практичну значущість результатів дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів дослідження – вперше здійснено диференціацію генотипів горіха грецького за участю нових ISSR-праймерів із такими послідовностями: (GA)₈TC та (GA)₈GT, а також складено молекулярно-генетичні формули для маркування генотипів горіха грецького за чотирма ISSR-праймерами, що дало змогу генетично диференціювати та порівнювати між собою гібридні форми і сорти горіха грецького.

Практична значущість результатів дослідження – розроблена методика ISSR-аналізу дає змогу визначати геномну спорідненість між саджанцями *J. regia* з метою підтвердження їх ідентичності або генетичної відмінності та здійснювати маркування генотипів для ДНК-паспортизації сортів.

Висновки / Conclusions

Проведено молекулярно-генетичний аналіз саджанців горіха грецького, що дало змогу визначити генетичне різноманіття та структуру генотипів *Juglans regia* L. За результатами виконаного дослідження можна зробити такі основні висновки.

1. Встановлено, що за допомогою ISSR-аналізу, із використанням чотирьох праймерів, можна оцінювати внутрішньовидову різноманітність генотипів горіха грецького. У спектрах ампліфікації із цими праймерами було отримано 50 ампліконів різної довжини, з яких 30 поліморфних та 20 мономорфних. Значна частка поліморфності – 80 % – характерна для праймера CR-252. Найменша частка поліморфності – 65 % – у праймера CR-253. ISSR-аналіз застосовано для порівняння геномної спорідненості саджанців горіха грецького на відповідність заявлених сортів.
2. Визначено, що саджанці заявленого сорту Вебу-6 № 1 та Вебу-6 № 2 мають високий коефіцієнт розбіжності між собою – 0,46. Це різні генотипи насінневого походження.
3. З'ясовано, що найменший коефіцієнт розбіжності – 0,04 – між заявленим сортом Юкалівський крепиш № 1 та Юкалівський крепиш № 2. Ці генотипи близькоспоріднені, але не ідентичні. Коефіцієнт розбіжності між заявленим сортом Чандлер № 1 та Чандлер № 2 становить 0,24, що вказує на їх генетичну відмінність.
4. Для ДНК-паспортизації генотипів *J. regia* запропоновано молекулярно-генетичні формули, що відповідають продуктам ампліфікації чотирьох ISSR-праймерів, які формують унікальний спектр ампліконів окремих генотипів.

References

1. Bernard, A., Barreneche, T., Lheureux, F., & Dirlwanger, E. (2018). Analysis of genetic diversity and structure in a worldwide walnut (*Juglans regia* L.) germplasm using SSR markers. *PLoS ONE*, 13(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208021>
2. Christopoulos, M. V., Rouskas, D., Tsantili, E., & Bebeli, P. J. (2010). Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*, 125(4), 584–592. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.006>
3. Dubin, O., V., & Boboshko-Bardyn, I. M. (2013). ISSR-analysis of genetic homogeneity of plants regenerants of magnolia kobus (*Magnolia kobus* DC.). *Ukrainian journal of forest and wood science*, 187, part 3, 231–236. [In Ukrainian]. URL: <https://forestscience.com.ua/uk/journals/187-chastina-3-2013/issr-analiz-gyenyetichnoyi-odnorodnosti-roslin-ryegyenyerantiv-magnoliyi-kobus-magnolia-kobus-dc>
4. Fallah, F., Minaei Chenar H., Amiri, H., Omodipour, S., Shirbande Ghods, F., Kahrizi, D., Sohrabi, M., Ghorbani, T., & Kazemi, E. (2017). Comparison of two DNA extraction protocols from leaved samples of *Cotinus coggygia*, *Citrus sinensis* and Genus *Juglans*. *Cell Mol Biol (Noisy le Grand)*, 63(2), 76–78. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.2.11>
5. Gout, R. T., Radchenko, M. V., & Krynytskyi, G. T. (2004). Application of ISSR markers to determine convergent evolutionary relationships of the genus *Fagus*. *Cytology and genetics*, 38(3), 60–65. [In Ukrainian]. URL: <https://cytgen.com/ru/2004/60-65N3V38.htm>
6. Guney, M., Kafkas, S., Keles, H., Zarifikhosroshahi, M., Gundesli, M. A., Ercisli, S., Necas, T., & Bujdoso, G. (2021). Genetic Diversity among Some Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes by SSR Markers. *Sustainability*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/su13126830>
7. Houmanat, K., Abdellah, K., Hssaini, L., Razouk, R., Hanine, H., Jaafary, S., & Charafi, J. (2021). Molecular Diversity of Walnut (*Juglans regia* L.) Among Two Major Areas in Morocco in Contrast with Foreign Varieties. *International Journal of Fruit Science*, 21(1), 180–192. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1862734>
8. Hrynyk, H. H., Zadorozhnyy, A. I., & Hrynyk, O. M. (2021). The trunk bioproductivity of spruce stands of the Polonyn ridge of the Ukrainian Carpathians. *Scientific Bulletin of UNFU*, 31(6), 26–34. <https://doi.org/10.36930/40310603>
9. Ivanovych, Ya. I., Udovychenko, K. M., Bublyk, M. O., & Volkov, R. A. (2017). ISSR-PCR fingerprinting of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Cytology and Genetics*, 51(1), 40–47. <https://doi.org/10.3103/S0095452717010066>
10. Kabiri, G., Bouda, S., Elhansali, M., & Haddioui, A. (2019). Genetic diversity and structure of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Middle and High Atlas mountains of Morocco as investigated by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Australian Journal of Crop Science*, 13(12), 1983–1991. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.12.p1932>
11. Kaya, E. (2015). ISSR Analysis for Determination of Genetic Diversity and Relationship in Eight Turkish Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *Not Bot Horti Agrobo*, 43(1), 96–99. <https://doi.org/10.15835/nbha4319818>
12. Keskin, S., Akca, Y., & Ercisli, S. (2022). Analysis of Genetic Relationships of Mulberry (*Morus* L.) Genotypes Using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers. *Erwerbs-Obstba*, 64, 75–83. <https://doi.org/10.1007/s10341-021-00614-1>
13. Khachtib, Y., Bouda, S., Bella, Y. A., Zinelabidine, L. H., & Haddioui, A. (2023). Use of ISSR markers for assessing genetic diversity of apple (*Malus x domestica*) cultivars growing in Morocco. *International Journal of Plant Research*, 36(3). <https://doi.org/10.1007/s42535-023-00712-3>
14. Kyslyuk, V. V., & Hrynyk, H. H. (2024). The breast height form factors of scots pine trees in fresh mixed broad-leaf forests on the border of the distribution of pine forest types in the Volhynian Upland. *Scientific Bulletin of UNFU*, 34(2), 7–16. <https://doi.org/10.36930/40340201>
15. Kolesnyk, O. O., Chebotar, S. V., Volkova, N. E., Balvinska, M. S., Solodenko, A. E., & Galaev, I. V. (2015). DNA typing of agricultural crops by microsatellite analysis for the purposes of genotype differentiation, identification and registration. *Collection of scientific papers of the SGEI-NCSC*, 25(65), 213–226. URL: <https://sgi.in.ua/data/documents/Zbirnik-naukovih-prac-SGI-NCNS-no-2565.pdf>
16. Kovaleva, V. A., Yusypovych, Yu. M., Shalovylo, Y. I., Hrunyk, N. I., & Gout, R. T. (2018). Differentiation of scots pine genotypes by intron length polymorphism of defensin genes. *Scientific Bulletin of UNFU*, 28(8), 40–44. <https://doi.org/10.15421/40280808>
17. Lankaster, Y. M., Kondratenko, S. I., Lymanska, S. V., Tereniak, Y. M., Chernyshenko, G. E., & Popov, V. M. (2019). Studies on the genetic polymorphism of courgetti (*Cucurbita pepo* L.) accessions by ISSR analysis. *Plant Varieties Studying and Protection*, 15(4), 442–450. [In Ukrainian]. URL: <https://journal.sops.gov.ua/article/view/189081>

18. Magige, E. A., Fan, P.-Z., Wambulwa, M. C., Milne, R., Wu, Z.-Y., Luo, Y.-H., Khan, R., Wu, H.-Y., Qi, H.-L., Zhu, G.-F., Maity, D., Khan, I., Gao, L.-M., & Liu, J. (2022). Genetic Diversity and Structure of Persian Walnut (*Juglans regia* L.) in Pakistan. *Implications for Conservation*. *Plants*, 11. <https://doi.org/10.3390/plants11131652>
19. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. USA. Basic Local Alignment Search Tool. (2023). URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=BLASTHome> (accessed on 31 August 2024)
20. Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction end nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
21. Oliynyk, T. M., Slobodian, S. O., & Grytsai, R. V. (2012). Application of potato microsatellite markers for phylogenetic analysis of varieties of domestic and foreign breeding. *Potato farming*, (41), 41–48. [In Ukrainian]. URL: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/1041690/mod_resource/content/0/karto_2012_41_8.pdf
22. Petolescu, C., Velicevici, G., Petrescu, I., Sărac, I., & Gorinoiu, G. (2023). Paulownia *in vitro* plant regeneration and evaluation of genetic fidelity using ISSR marker. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 27(1), 48–53. URL: <https://www.cabi-digitalibrary.org/doi/pdf/10.5555/20230301430>
23. Phong, D. T., Thu Hien, V. T., Viet Thanh, T. T., Van, N. T., & Quoc, N. B. (2011). Genetic diversity on the tropical rare wood species of *Dalbergia* in Vietnam revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(55), 11397–11408. URL: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/96143>
24. Pollegioni, P., S. Bartoli, F. Cannata, & Malvolti. M., E. (2003). Genetic differentiation of four Italian walnut (*Juglans regia* L.) varieties by inter simple sequence repeat (ISSR). *J. Genet Plant. Breed*, 57, 231–240. URL: https://www.researchgate.net/publication/279562513_Genetic_differentiation_of_four_Italian_walnut_Juglans_regia_L_varieties_by_inter_simple_sequence_repeat_ISSR
25. Potter, D., Gao, F., Aiello, G., Leslie, C., & McGranahan, G. (2002). Intersimple Sequence Repeat Markers for Fingerprinting and Determining Genetic Relationships of Walnut (*Juglans regia*) Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(1), 75–81. <https://doi.org/10.21273/JASHS.127.1.75>
26. Prysiachniuk, L. M., Chernii, S. O., Tagantsova, M. M., & Tkachyk, S. O. (2019). Application of SSR markers for evaluation of maize (*Zea mays* L.) polymorphism in the examination for difference, homogeneity, stability. *Plant Physiology and Genetics*, 51 (6), 529–540. <https://doi.org/10.15407/frg2019.06.529>
27. Shevchuk, Yu. H. (2015). Molecular genetic analysis of species of the genus *Sorghum Moench*. Collection of scientific papers of SGI-NCSSVR, 25(65), 129–134. [In Ukrainian]. URL: <https://sgi.in.ua/data/documents/Zbirnik-naukovih-prac-SGI-NCNS-no-2565.pdf>
28. State register of plant sorts suitable for distribution in Ukraine. URL: <https://sops.gov.ua/ua/derzavnij-reestr> (accessed on 31 August 2024)
29. Stefanenko, M. S. (2009). Analysis of cattle by ISSR markers. *Scientific Bulletin of LNUVMBT named after S. Z. Grzycki*, 11, 2(41), part 3, 205–209. [In Ukrainian]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-tvarin-velikoyi-rogatoyi-hudobi-za-issr-markera>
30. Teixeira, G. C., Konzen, E. R., Faria, J. C. T., Gonçalves, D. S., Carvalho, D., & Brondani, G. E. (2020). Genetic diversity analysis of two *Eucalyptus* species using ISSR markers. *Ci. Fl., Santa Maria*, 30(1), 270–278. URL: <https://www.scielo.br/j/cflo/a/8FM584pCfJ4tKn4HXnZ5RRk/?lang=en>
31. Tkachyk, S. O. (Ed.). (2017). Methodology for the qualification examination of plant varieties for suitability for distribution in Ukraine. Methods of determining quality indicators of crop production (3rd ed.). Vinnytsia: FPE Korzun, 159. [In Ukrainian]. URL: <https://sops.gov.ua/uploads/page/5b7e67fb8d4b9.pdf>
32. Vischi, M., Chiabà, C., Raranciuc, S., Poggetti, L., Messina, R., Ermacora, P., Cipriani, G., Paffetti, D., Vettori, C., & Testolin, R. (2017). Genetic Diversity of Walnut (*Juglans regia* L.) in the Eastern Italian Alps. *Forests*, 8(3), 81–96. <https://doi.org/10.3390/f8030081>
33. Wu, W., Chen, F., Yeh, K., & Chen, J. (2019). ISSR Analysis of Genetic Diversity and Structure of Plum Varieties Cultivated in Southern China. *Biology*, 8(1), 2–13. <https://doi.org/10.3390/biology8010002>

Yu. M. Yusypovych, V. K. Mahuran

Ukrainian National Forestry University, Lviv, Ukraine

DETERMINATION OF INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION OF WALNUT GENOTYPES (*JUGLANS REGIA* L.)

Differentiation of varieties and hybrid forms of walnut by morphological description is insufficient for genetic control of seedlings regarding their conformity to the variety. Today, there is a need to create a system of genetic identification and DNA passporting of *J. regia* varieties and hybrid forms. The article presents the polymerase chain reaction method for differentiation of walnut genotypes using four ISSR primers with the following sequences: (GA)₈TC, (CA)₈TG, (GA)₈CG and (GA)₈GT. PCR conditions were optimized and amplicons were electrophoretically separated in 6 % polyacrylamide gel and visualized with silver nitrate. Using these primers, 12 genotypes of *J. regia* were analyzed and 50 amplicons of different lengths were obtained, of which 30 were polymorphic and 20 were monomorphic. A high percentage of polymorphism was determined in the primer CR-252-80 %. The primer CR-253 the lowest percentage of polymorphism – 65 % were revealed. Monomorphic amplicons with lengths of 120 bp, 125 bp, 230 bp, 275 bp, 300 bp, 375 bp, 380 bp, 510 bp, 580 nucleotide pairs and polymorphic amplicons with lengths of 135-170 bp, 190-225 bp, 240-260 bp, 320-360 bp, 400-500 bp, 520-560 bp and 590-1010 bp were determined. In the course of research, we have demonstrated practical ISSR analysis for comparing walnut genotypes for the conformity of declared varieties of eight seedling purchased on the Ukrainian market. A cluster analysis of seedling genotypes was carried out and their coefficients of divergence were determined. It was found that seedlings of the declared variety Vebu-6 № 1 and Vebu-6 № 2 are different genotypes of seed origin, the coefficient of divergence is 0.46. Seedlings of the declared variety Yukalivskyi krepysch № 1 and Yukalivskyi krepysch № 2 are genetically closely related with the lowest coefficient of divergence – 0.04, but they are of seed origin. Seedlings of the declared variety Chandler № 1 and Chandler № 2 from different suppliers were also found to be different genotypes with a coefficient of variation of 0.24. For DNA passporting of walnut genotypes, molecular genetic labeling based on tested four ISSR primers is proposed.

Keywords: walnut; primers; genotypes; ISSR-markers; polymerase chain reaction; DNA passporting.