

Дослідження генетичного поліморфізму зразків кабачка (*Cucurbita pepo* L.) методом ISSR аналізу

Ю. М. Ланкастер¹, С. І. Кондратенко¹, С. В. Лиманська^{2,3*},
Ю. М. Тереняк³, Г. Є. Чернишенко³, В. М. Попов^{2,3,4}

¹Інститут овочівництва і баштанництва НААН України, вул. Інститутська, 1, сел. Селекційне, Харківський р н, Харківська обл., 62478, Україна

²Харківський національний аграрний університет ім. В. В. Докучаєва, п/в «Докучаєвське 2», Харківський р н, Харківська обл., 62483, Україна, *e mail: svetlanalymanska@gmail.com

³Випробувальна лабораторія ТОВ «АГРОГЕН НОВО», вул. Шишківська, 2В, м. Харків, 61070, Україна

⁴Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна

Мета. Виявити генетичний поліморфізм та дивергенцію сортів і гібридів кабачка (*C. pepo* L.) різного географічного походження за ISSR маркерами. **Методи.** Для оцінки генетичного поліморфізму 29 сортів і гібридів *C. pepo* L. різного походження використовували ISSR аналіз. Коефіцієнт подібності між досліджуваними зразками кабачка визначали за формулою Nei–Li. Розрахунок коефіцієнтів подібності та побудовання філогенетичного дерева здійснювали за допомогою пакету програм Phylip 3.69. Кластерний аналіз проводили методом приєднання сусідів (Neighbor joining). Достовірність групування зразків у кластери перевіряли методом бутстреп аналізу. **Результати.** Використання 13 праймерів до міжмікросателітних ділянок дозволило виявити 129 локусів ДНК кабачка, серед яких 109 були поліморфними, 20 – монотипними, 11 – унікальними для певних зразків. Електрофореграми продуктів ампліфікації дослідних зразків різнилися кількістю і розміром ампліконів. Виявлено високий поліморфізм ДНК дослідних зразків кабачка, який варіював від 62,5% (праймер UBC 810) до 100% (праймери UBC 2, UBC 3 і UBC 846). Рівень молекулярно генетичного поліморфізму зразків кабачка варіював від 55,8 до 63,6% у гібридів 'Rimini' і 'Eight Ball' відповідно. Встановлено низьку генетичну дивергенцію між дослідними зразками *C. pepo* L., коефіцієнт подібності за Nei–Li становив 0,0005–0,0092. За допомогою кластерного аналізу зразки кабачка були згруповані у два кластери. Основним критерієм кластеризації був рівень генетичної дивергенції. Географічне походження зразків не впливало на особливості їх групування. **Висновки.** За результатами вивчення зразків кабачка різного географічного походження за допомогою ISSR аналізу встановлено високий генетичний поліморфізм і незначна генетична дивергенція між дослідними зразками. Виявлено унікальні фрагменти ДНК, які можуть бути використані для паспортизації відповідних зразків, а також для розробки інших молекулярно генетичних маркерів. Отримана інформація може бути корисною для оптимізації селекційного процесу кабачка і подальших досліджень в області молекулярної генетики цієї культури.

Ключові слова: *Cucurbita pepo* L.; поліморфізм ДНК; ISSR маркери; генетична дивергенція; кластерний аналіз.

Вступ

Кабачок (*Cucurbita pepo* L.) є овочевою культурою родини Cucurbitaceae, яку широко використовують в усьому світі для дієтичного і дитячого харчування, як сировину для консервної промисловості, у кормових та лікувально-профілактичних цілях [1–2]. Збільшення сортименту сортів і гібридів культури сьогодні залежить від успіхів генетико-селек-

ційних досліджень. Зокрема впровадження досягнень молекулярної генетики дозволять проводити ідентифікацію і паспортизацію генотипів, вести маркер-асоційовану селекцію, що сприятиме прискоренню селекційного процесу, підвищенню його ефективності та розширенню генофонду культури [3–6].

У сучасних умовах молекулярно-генетичний аналіз з використанням різних типів ДНК-маркерів є потужним методом вивчення генетичного різноманіття, філогенезу та реалізації різних селекційних і генетичних програм сільськогосподарських культур [7, 8]. Однак у кабачка багато питань з молекулярної генетики залишаються недостатньо вивченими. Більшість авторів використовують різні типи маркерів для вивчення генетичного поліморфізму кабачка різного походження [9, 10]. А. Xanthopoulou зі співавторами [11] при аналізі генетичного різноманіття кабачка грецької селекції показали ефективність застосування SCoT (Start codon targeted, цільовий стартовий кодон) і

Yuliya Lancaster

https://orcid.org/0000_0001_6408_4344

Serhii Kondratenko

https://orcid.org/0000_0002_8859_1604

Svetlana Lymanska

https://orcid.org/0000_0001_7049_4884

Yulia Tereniak

https://orcid.org/0000_0003_3832_0387

Galyna Chernyshenko

https://orcid.org/0000_0002_2241_2503

Vitalii Popov

https://orcid.org/0000_0002_1769_2432

ISSR (Intersimple Sequence Repeats, міжмікросателітні секвеновані повтори) маркерів. При цьому останні виявилися більш поліморфними. L. Gong та ін. [12] за результатами вивчення генетичних взаємозв'язків між 104 популяціями *C. pepo* L. з використанням SSR (Simple Sequence Repeats, прості секвеновані повтори) і SCAR (Sequence Characterized Amplified Region, ампліфікаційна область, охарактеризована нуклеотидною послідовністю) маркерів встановили, що культурні форми кабачка походять від спільного попередника, який еволюціонував у три підвиди – *subsp. fraterna*, *subsp. texana* і *subsp. pepo*.

Ефективність використання RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, випадкова ампліфікація поліморфних послідовностей ДНК), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів), ISSR та інших типів молекулярних маркерів у різних популяційних і генетико-селекційних програмах висвітлена в роботах різних авторів [13–20]. Але ISSR метод має низку переваг, серед яких основною є підвищення точності гібридизації праймера за рахунок збільшення його розміру та наявності заякореного ну-

клеотиду. Ефективність цього методу доведена для більшості видів рослин [21–24].

Сьогодні актуальними є дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму генотипів вихідного і селекційного матеріалу кабачка з метою його ідентифікації і диференціації, а також з'ясування рівня генетичної дивергенції між вихідними батьківськими формами для ефективного планування селекційної програми, зокрема підбору пар при гібридизації.

Мета досліджень – виявити генетичний поліморфізм та дивергенцію сортів і гібридів кабачка (*C. pepo* L.) різного географічного походження за ISSR маркерами.

Матеріали та методика досліджень

Дослідження проводили в 2018–2019 рр. на базі випробувальної лабораторії ТОВ «АГРОГЕН НОВО» (м. Харків, Україна). Вивчали 29 сортів і гібридів кабачка різного географічного походження (табл. 1), надані компанією Tozer Seeds (Великобританія).

Поліморфізм ДНК зразків кабачка вивчали з використанням праймерів до міжмікросателітних послідовностей, розроблених в Університеті Британської Колумбії (Канада) (табл. 2).

Таблиця 1

Характеристика дослідних зразків кабачка за походженням

№ з/п	Зразок	Сорт/гібрид	Країна походження
1	'Alfresco'	гібрид F1	Великобританія
2	'Best of British'		
3	'Defender'		
4	'Rimini'		
5	'Patriot'		
6	'Ambassador'		Чілі
7	'Eight Ball'		Великобританія
8	'Midnight'		
9	'Firenze'		
10	'Tuscany'		
11	'Parador'		
12	'TZ 3089' (stripe)	сорт	
13	'Gold Rush'	гібрид F1	США
14	'Afrodite'		
15	'7003'		
16	'7006'		Франція
17	'Celeste'		Іспанія
18	'Alexander'		
19	'TZ 6390'		
20	'TZ 6391'		
21	'TZ 6392 F1'		
22	'SV 1118 YG'		сорт
23	'Verde di Milan'	США (Пенсильванія)	
24	'Trieste white half long'		
25	'Verde di Italia'	Італія	
26	'Burpees Golden Zucchini'		
27	'Striada di Napoli'		
28	'Trombocino'	Україна	
29	'Чаклун'		

Таблиця 2

Нуклеотидні послідовності ISSR праймерів

Праймер	Нуклеотидна послідовність 5' 3'	Праймер	Нуклеотидна послідовність 5' 3'
UBC 2	(CA) ₈ AG	UBC 825	(AC) ₈ T
UBC 3	(CA) ₈ GG	UBC 826	(AC) ₈ C
UBC 4	(GA) ₈ T	UBC 834	(AG) ₈ CTT
UBC 5	(CA) ₈ AC	UBC 842	(GA) ₈ CTG
UBC 807	(AG) ₈ T	UBC 846	(CA) ₈ RT
UBC 810	(GA) ₈ T	UBC 857	(AC) ₈ YG
UBC 812	(GA) ₈ A		

Примітка. Y = pYrimidine (C або T); R = puRine (A або G).

ДНК виділяли із суміші 10 зрілих насінин кожного зразка за допомогою набору для виділення ДНК «Diatom DNA Prep100». Для цього використовували лізуючий реагент із гуанідінхлоридом для солюбізації клітинного дебрису та денатурації клітинних нуклеаз. У присутності лізуючого реагенту ДНК сорбували на сіліка-сорбенті, відмивали від білків та солей спиртовим розчином. Виділення ДНК проводили відповідно до протоколу, запропонованому в інструкції до комерційного набору «Diatom DNA Prep100» (http://www.galartdiag.ru/files/diatom_dna_prep_100.pdf). Чистоту виділеної ДНК визначали за коефіцієнтом співвідношення поглинання при довжині хвиль 260 і 280 нм, який склав не менше 1,73, що свідчило про відносно високу чистоту препаратів ДНК. Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометра Shimadzu UV-1280 (Японія) за довжиною хвилі 260 нм.

Ампліфікацію ДНК проводили з використанням наборів для ПЛР GenePaktm PCR Core (Росія). У пробірки із цих наборів, які містили ліофілізовані сухі реакційні суміші, готові для проведення ПЛР, додавали 20 нг виділеної ДНК, 0,2 мкМ праймера, потім реакційну суміш доводили до 20 мкл розчинником із наборів для ПЛР. ПЛР проводили в термоциклері ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (Росія) за таких умов: початкова денатурація ДНК при 94 °С – 5 хв; 40 циклів ампліфікації за таких умов для кожного циклу: денатурація при 94 °С – 40 с, гібридизація при 52 °С – 45 с, елонгація при 72 °С – 2 хв; фінальна елонгація при 72 °С – 7 хв.

Електрофорез продуктів ампліфікації проводили у 1,5% агарозному гелі з бромистим етидієм. У роботі використовували Тріс-ЕДТА-боратну буферну систему – 0,09 М Тріс, 0,09 М H₃BO₃, 0,0031 М ЕДТА (рН 8,3). Візуалізацію спектрів ампліфікованих ділянок ДНК здійснювали за допомогою транслюмінатора ТСП-20 МС (Франція) з подальшим фотографуванням гелів. Як маркер для

визначення розмірів ампліконів використовували M combi (розміри фрагментів: 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 п.н.) за допомогою демоверсії програмного пакету TotalLab TL120 (<http://www.totallab.com>).

Отримані електрофоретичні спектри перекладали в бінарний код – наявність амплікону у зразків кабачка певного розміру позначали як «+», а при відсутності амплікону позначали як «-». Рівень поліморфізму для кожного праймера визначали як частку поліморфних локусів від загальної кількості локусів на один праймер, виражену у відсотках. Внутрішньопопуляційний поліморфізм кабачка за ДНК маркерами розраховували як частку виявлених локусів у певного зразка кабачка від загальної кількості ідентифікованих локусів, виражену у відсотках. Як міру генетичного різноманіття використовували коефіцієнт подібності Nei-Li (Dij), який розраховували за допомогою пакету програм Phylip-3.69 [25]. Матрицю коефіцієнтів подібності за Nei-Li використовували для класифікаційного аналізу методом приєднання сусідів (Neighbor-joining, NJ). Статистичну оцінку отриманої дендрограми проводили за допомогою бутстреп-аналізу при створенні 1000 випадкових вибірок.

Результати досліджень

Молекулярно-генетичний аналіз зразків кабачка дозволив ідентифікувати 129 ISSR-локусів, серед яких 109 були поліморфними (84,5%). Продукти ампліфікації різнилися кількістю та розміром. Детектували 20 номорфних локусів для всіх досліджуваних зразків кабачка. Зокрема за праймером UBC 4 виявлений фрагмент розміром 523 п.н., за праймером UBC 5 – фрагменти розміром 438 і 614 п.н., за UBC 807 – 324, 491, 595 і 691 п.н., за UBC 810 – 277, 341 і 403 п.н., за UBC 812 – 504 і 579 п.н., за UBC 825 – 653 п.н., за UBC 826 – 393 і 515 п.н., за UBC 834 – 305 і 587 п.н., за UBC 842 – 328 і 394 п.н., за UBC 857 – 565 п.н. Також у деяких зразків були ідентифіковані унікальні амплікони. Наприклад, у гібриду 'Midnight' виявлено амплікон розміром 935 п.н. (UBC 2), у сорту 'Trieste white half-long' – 579 п.н. (UBC 5), у сорту 'Trombocino' – 756, 354 і 296 п.н. (UBC 2), 1260 п.н. (UBC 807), 1400 п.н. (UBC 812), 941 п.н. (UBC 826), 962 п.н. (UBC 842), 237 п.н. (UBC 846) і 681 п.н. (UBC 857). Ці амплікони можуть бути використані для розробки інших ДНК-маркерів, зокрема SCAR. Приклад електрофореграми наведено на рисунку 1.

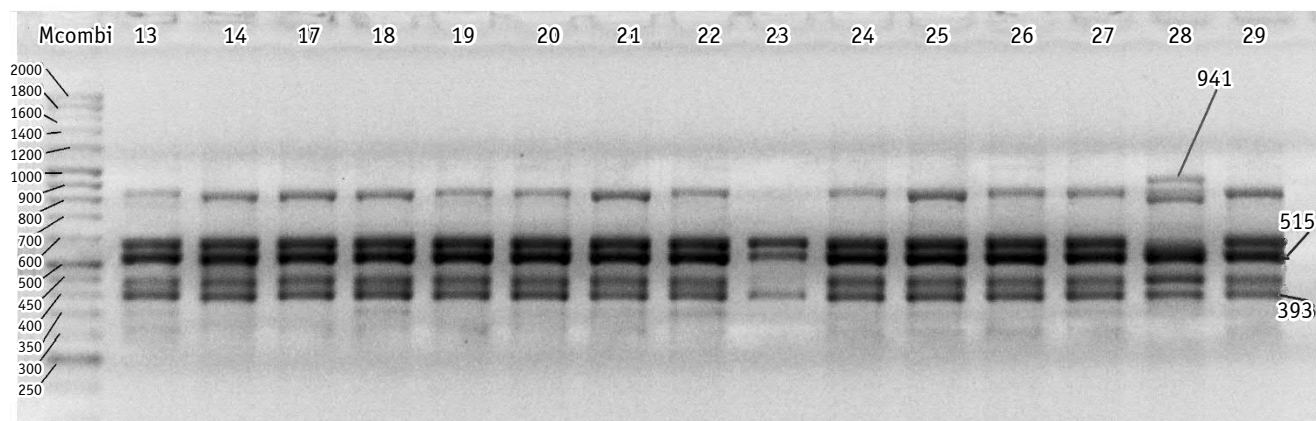


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК дослідних зразків кабачка з праймером UBC 826
Номери 13–29 відповідають зразкам у таблиці 1. М comбі – маркер розміру продуктів ампліфікації, п.н.
Цифрами позначено мономорфні й унікальний фрагменти, п.н.

Рівень поліморфізму дослідних зразків кабачка варіював від 62,5% (праймер UBC 810) до 100% (праймери UBC 2, UBC 3 і UBC 846). Рівень поліморфізму зразків при використанні

обраних у дослідженні праймерів склав 84,5%. Кількість та розміри виявлених ампліконів у зразків кабачка, а також рівень поліморфізму за кожним праймером наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Молекулярно генетичний поліморфізм зразків кабачка, виявлений з використанням ISSR аналізу

Праймер	Кількість виявлених ампліконів, шт.	Кількість поліморфних ампліконів, шт.	Рівень поліморфізму, %	Розмір ампліконів, п.н.
UBC 2	13	13	100,0	296–935
UBC 3	11	11	100,0	373–812
UBC 4	5	4	80,0	523–1195
UBC 5	10	8	80,0	438–1313
UBC 807	17	13	76,5	246–1260
UBC 810	8	5	62,5	277–835
UBC 812	13	11	84,6	378–1400
UBC 825	8	7	87,5	243–653
UBC 826	6	4	66,7	393–941
UBC 834	12	10	83,3	253–1178
UBC 842	9	7	77,8	250–962
UBC 846	9	9	100,0	237–851
UBC 857	8	7	87,5	361–681
Всього	129	109	84,5	–

Е. Esmailnia та ін. [8] і N. Katzir та ін. [10] також виявили високий рівень поліморфізму популяцій кабачка (70–93%), що залежало від використаних праймерів. Зазначимо також, що А. Xanthopoulou та ін. [3] за допомогою праймера UBC 834 ідентифікували лише 7 продуктів ампліфікації розміром 600–2700 п.н. і рівнем поліморфізму 42,8%, у той час як нами в результаті ампліфікації ДНК дослідних зразків кабачка із цим праймером виявлено 12 ампліконів розміром 253–1178 п.н. і рівнем поліморфізму 83,3%. Katzir N. та ін. [10] при використанні праймера UBC 807 виявили 17 локусів (що узгоджується з отриманими нами даними) з рівнем поліморфізму 70,6%. Тоді як у нашо-

му досліді поліморфізм за цим праймером становив 76,5%. Також автори роботи [10] при використанні праймера UBC 810 ідентифікували 11 локусів з поліморфізмом 81,8%, а праймера UBC 842 – 25 локусів з поліморфізмом 84,0%. У наших дослідженнях при використанні цих праймерів детектовано лише по 9 локусів з рівнем поліморфізму 62,5 і 77,8% відповідно. Розмір виявлених ампліконів автори роботи [10] не наводили. Розбіжності в одержаних результатах можуть бути пов'язані з генетичними особливостями та походженням досліджуваного матеріалу.

Молекулярно-генетичний поліморфізм дослідних зразків кабачка залежав від геноти-

пу і в середньому становив 58,9 %. Найбільше його значення (63,6%) відмічено в гібриду 'Eight Ball', у якого виявлено 82 із 129 мож-

ливих локусів, мінімальне – у 'Rimini' (55,8%, виявлено 72 локуси із 129 можливих) (табл. 4).

Таблиця 4

Поліморфізм зразків кабачка за ISSR маркерами

Зразок	Кількість виявлених локусів, шт.		Рівень поліморфізму, %
	загальна	у зразка	
'Alfresco'	129	76	58,9
'Best of British'		74	57,4
'Defender'		78	60,5
'Rimini'		72	55,8
'Patriot'		80	62,0
'Ambassador'		80	62,0
'Eight Ball'		82	63,6
'Midnight'		75	58,1
'Firenze'		77	59,7
'Tuscany'		76	58,9
'Parador'		77	59,7
'TZ 3089' (stripe)		80	62,0
'Gold Rush'		77	59,7
'Afrodite'		79	61,2
'7003'		77	59,7
'7006'		76	58,9
'Celeste'		74	57,4
'Alexander'		77	59,7
'TZ 6390'		74	57,4
'TZ 6391'		73	56,6
'TZ 6392 F1'		73	56,6
'SV 1118 YG'		73	56,6
'Verde di Milan'		75	58,1
'Trieste white half long'		74	57,4
'Verde di Italia'		75	58,1
'Burpees Golden Zucchini'		73	56,6
'Striado di Napoli'		77	59,7
'Trombocino'		74	57,4
'Чаклун'		77	59,7
Середнє значення		–	–

За результатами розрахунку коефіцієнта подібності Nei–Li встановлено незначну генетичну дивергенцію між дослідними зразками кабачка. Найбільш генетично спорідненими виявилися гібриди 'Patriot' (Великобританія) і 'Ambassador' (Чілі), коефіцієнт подібності між якими становив 0,0005. Найменш спорідненими зразками були сорт 'Trombocino' (Італія) і гібрид '7006' (США), для яких коефіцієнт подібності склав 0,0092. Слід зазначити, що сорт 'Trombocino' був найбільш генетично віддаленим від інших зразків кабачка ($D_{ij} = 0,0072$), тоді як коефіцієнти подібності між іншими зразками не перевищували 0,0060. Отримані результати можуть свідчити про значну генетичну подібність більшості досліджуваних сортів і гібридів кабачка.

За результатами кластерного аналізу побудували дендрограму на основі коефіцієнтів подібності між дослідними зразками кабачка (рис. 2).

Досліджувані сорти і гібриди кабачка розподілилися у два кластери. До першого кластеру увійшли усі зразки походженням із Великобританії ('Defender', 'Rimini', 'Patriot), а також сорти 'Trombocino' (Італія), 'Чаклун' (Україна), '7003' і '7006' (США) і гібрид 'Ambassador' (Чілі).

Другий кластер містив різні за географічним походженням зразки кабачка. Зокрема 4 зразки з США (сорт 'Burpees Golden Zucchini', гібриди 'Gold Rush', 'Afrodite', 'SV 1118 YG'), 4 гібриди з Іспанії (Alexander, TZ 6390, TZ 6391, TZ 6392), 4 сорти з Італії ('Striado di Napoli', 'Verde di Italia', 'Verde di Milano', 'Trieste white half-long') і гібрид 'Celeste' (Франція). Визначальним критерієм групування досліджуваних зразків кабачка у кластери був рівень генетичної подібності між ними. Географічне походження зразків мало менше значення для їх об'єднання у кластери.

Бутстреп-оцінка дозволила статистично перевірити вірогідність одержаної дендро-

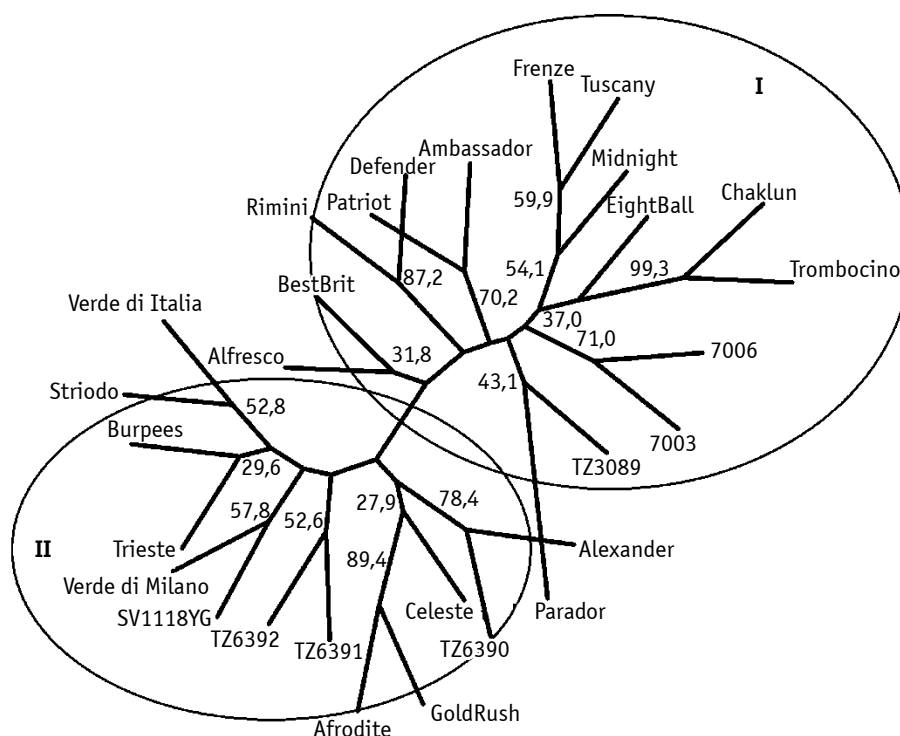


Рис. 2 Дендрограма філогенетичних відносин між зразками кабачка I і II – кластери. Достовірність сформованих гілок вказано поруч із ними, %

грамі. Для цієї дендрограми були характерними як низькі (< 70%), так і високі (> 70%) бутстреп-значення. Після бутстреп-аналізу склад кластерів не змінився.

Висновки

За результатами вивчення зразків кабачка різного географічного походження за допомогою ISSR аналізу встановлено високий генетичний поліморфізм і незначна генетична дивергенція між дослідними зразками. Виявлено унікальні фрагменти ДНК, які можуть бути використані для паспортизації відповідних зразків, а також для розробки інших молекулярно-генетичних маркерів. Отримана інформація може бути корисною для оптимізації селекційного процесу кабачка і подальших досліджень в області молекулярної генетики цієї культури.

Використана література

- Martínez Valdivieso D., Font R., Fernández Bedmar Z. et al. Role of Zucchini and Its Distinctive Components in the Modulation of Degenerative Processes: Genotoxicity, Anti Genotoxicity, Cytotoxicity and Apoptotic Effects. *Nutrients*. 2017. Vol. 9, Iss. 7. P. 755–777. doi: 10.3390/nu9070755
- Martínez Valdivieso D., Gómez P., Font R., Del Río Celestino M. Mineral composition and potential nutritional contribution of 34 genotypes from different summer squash morphotypes. *Eur. Food Res. Technol.* 2015. Vol. 240, Iss. 1. P. 71–81. doi: 10.1007/s00217 014 2308 7
- Xanthopoulou A., Montero Pau J., Mellidou I. et al. Whole genome resequencing of *Cucurbita pepo* morphotypes to discover genomic variants associated with morphology and horticulturally valuable traits. *Hortic. Res.* 2019. Vol. 6. P. 94–110. doi: 10.1038/s41438 019 0176 9
- Esteras C., Gómez P., Monforte A. J. et al. High throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. *BMC Genomics*. 2012. Vol. 13, Iss. 1. P. 80–100. doi: 10.1186/1471 2164 13 80
- Montero Pau J., Blanca J., Esteras C. et al. An SNP based saturated genetic map and QTL analysis of fruit related traits in Zucchini using Genotyping by sequencing. *BMC Genomics*. 2017. Vol. 18, Iss. 1. P. 94–114. doi: 10.1186/s12864 016 3439 y
- Gong L., Stift G., Kofler R. et al. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theor. Appl. Genet.* 2008. Vol. 117, Iss. 1. P. 37–48. doi: 10.1007/s00122 008 0750 2
- Леонова И. Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 2. С. 314–325.
- Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 1044–1054.
- Mady E. A., Helaly A. A., Abu El Hamd A. N. et al. Genetic diversity assessment of summer squash landraces using molecular markers. *Mol. Biol. Rep.* 2013. Vol. 40, Iss. 7. P. 4269–4274. doi: 10.1007/s11033 013 2510 x
- Blanca J., Cañizares J., Roig C. et al. Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *BMC Genomics*. 2011. Vol. 12, Iss. 1. P. 104–118. doi: 10.1186/1471 2164 12 104
- Xanthopoulou A., Ganopoulos I., Kalivas A. et al. Comparative analysis of genetic diversity in Greek Genebank collection of summer squash (*Cucurbita pepo*) landraces using start codon targeted (Scot) polymorphism and UBC markers. *Aust. J. Crop Sci.* 2015. Vol. 9, Iss. 1. P. 14–21.
- Gong L., Paris H. S., Nee M. H. et al. Genetic relationships and evolution in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms. *Theor.*

- Appl. Genet.* 2012. Vol. 124, Iss. 5. P. 875–891. doi: 10.1007/s00122 011 1752 z
13. Abd El Hamed K. E., Elwan M. W. M., Mohamed F. H. Genetic Diversity and Relationship in Squash Using Morphological, Chemical and Molecular Analyses. *Int. J. Hortic.* 2015. Vol. 5, Iss. 12. P. 1–10. doi: 10.5376/ijh.2015.05.0012
 14. Brown R. N. The Use and Development of Molecular Breeding Tools in *Cucurbita*: A Literature Review. *Cucurbit Gen. Coop. Rep.* 2001. Vol. 24. P. 87–90.
 15. Ferriol M., Pico B., Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 2003. Vol. 107, Iss. 2. P. 271–282. doi: 10.1007/s00122 003 1242 z
 16. Esmailnia E., Arefrad M., Shabani S. et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship of Iranian indigenous cucurbits investigated by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Biharean Biol.* 2015. Vol. 9, Iss. 1. P. 47–54.
 17. Hadia H. A., Abdel Razzak H. S., Hafez E. E. Assessment of Genetic Relationships among and Within *cucurbita* Species Using RAPD and ISSR markers. *J. Appl. Sci. Res.* 2008. Vol. 4, Iss. 5. P. 515–525.
 18. Katzir N., Tadmor Y., Tzuri G. et al. Further ISSR and preliminary SSR analysis of relationships among accessions of *Cucurbita pepo*. *Acta Hort.* 2000. Vol. 510, No. 69. P. 433–439. doi: 10.17660/ActaHortic.2000.510.69
 19. Ntuli N. R., Tongoonab P. B., Zobolo A. M. Genetic diversity in *Cucurbita pepo* landraces revealed by RAPD and SSR markers. *Sci. Hortic.* 2015. Vol. 189. P. 192–200. doi: 10.1016/j.scienta.2015.03.020
 20. Radwan S. A. Molecular discrimination and genetic relationships between some cultivars of *Cucurbita pepo* spp. *pepo* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Afr. J. Biotechnol.* 2014. Vol. 13, Iss. 11. P. 1202–1209. doi: 10.5897/AJB2012.3007
 21. Pandey A., Khan M. K., Isik R. et al. Genetic diversity and population structure of watermelon (*Citrullus* sp.) genotypes. *Biotech.* 2019. Vol. 9, Iss. 6. P. 210. doi: 10.1007/s13205 019 1736 2
 22. Muhammad R. W., Qayyum A., Ahmad M. Q. et al. Characterization of maize genotypes for genetic diversity on the basis of inter simple sequence repeats. *Genet. Mol. Res.* 2017. Vol. 16, Iss. 1. P. 1–9. doi: 10.4238/gmr16019438
 23. Raji M. R., Lotfi M., Tohidfar M. et al. Somatic embryogenesis of muskmelon (*Cucumis melo* L.) and genetic stability assessment of regenerants using flow cytometry and ISSR markers. *Protoplasma.* 2018. Vol. 255, Iss. 3. P. 873–883. doi: 10.1007/s00709 017 1194 9
 24. Bednarskaya I. A., Popov V. N., Dugar Y. N. et al. ISSR analysis of some species of angustifoliolate fescue. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48. P. 364–370. doi: 10.3103/S0095452714060024
 25. Nei M., Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. Vol. 76, Iss. 10. P. 5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- ## References
1. Martínez Valdivieso, D., Font, R., Fernández Bedmar, Z., Merinas Amo, T., Gómez, P., Alonso Moraga, A., & Del Río Celestino, M. (2017). Role of Zucchini and Its Distinctive Components in the Modulation of Degenerative Processes: Genotoxicity, Anti Genotoxicity, Cytotoxicity and Apoptotic Effects. *Nutrients*, 9(7), 755–777. doi: 10.3390/nu9070755
 2. Martínez Valdivieso, D., Gómez, P., Font, R., & Del Río Celestino, M. (2015). Mineral composition and potential nutritional contribution of 34 genotypes from different summer squash morphotypes. *Eur. Food Res. Technol.*, 240(1), 71–81. doi: 10.1007/s00217 014 2308 7
 3. Xanthopoulou, A., Montero Pau, J., Mellidou, I., Kissoudis, C., Blanca, J., Pico, B., ... Ganopoulos, I. (2019). Whole genome resequencing of *Cucurbita pepo* morphotypes to discover genomic variants associated with morphology and horticulturally valuable traits. *Hortic. Res.*, 6, 94–110. doi: 10.1038/s41438 019 0176 9
 4. Esteras, C., Gómez, P., Monforte, A. J., Blanca, J., Vicente Dolera, N., Roig, C., Nuez, F., & Pico, B. (2012). High throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. *BMC Genomics*, 13(1), 80–100. doi: 10.1186/1471 2164 13 80
 5. Montero Pau, J., Blanca, J., Esteras, C., Martínez Perez, E. M., Gomez, P., Monforte, A. J., Canizares, J., & Pico, B. (2017). An SNP based saturated genetic map and QTL analysis of fruit related traits in Zucchini using Genotyping by sequencing. *BMC Genomics*, 18(1), 94–114. doi: 10.1186/s12864 016 3439 y
 6. Gong, L., Stift, G., Kofler, R., Pachner, M., & Lelley, T. (2008). Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theor. Appl. Genet.*, 117(1), 37–48. doi: 10.1007/s00122 008 0750 2
 7. Leonova, I. N. (2013). Molecular markers: implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* [Vavilov J. Gen. Breed.], 17(2), 314–325. [in Russian]
 8. Khlestkina, E. K. (2013). Molecular markers in genetic studies and breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* [Vavilov J. Gen. Breed.], 17(4/2), 1044–1054. [in Russian]
 9. Mady, E. A., Helaly, A. A., Abu El Hamd, A. N., Abdou, A., Shanan, S. A., & Craker, L. E. (2013). Genetic diversity assessment of summer squash landraces using molecular markers. *Mol. Biol. Rep.*, 40(7), 4269–4274. doi: 10.1007/s11033 013 2510 x
 10. Blanca, J., Cañizares, J., Roig C., Ziarsolo P., Nuez F., & Pico B. (2011). Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *BMC Genomics*, 12(1), 104–118. doi: 10.1186/1471 2164 12 104
 11. Xanthopoulou, A., Ganopoulos, I., Kalivas, A., Nianiou Obeidat, I., Ralli, P., Moysiadis, T., Tsaftaris, A., & Madesis, P. (2015). Comparative analysis of genetic diversity in Greek Genebank collection of summer squash (*Cucurbita pepo*) landraces using start codon targeted (SCoT) polymorphism and ISSR markers. *Aust. J. Crop Sci.*, 9(1), 14–21.
 12. Gong, L., Paris, H. S., Nee, M. H., Stift, G., Pachner, M., Vollmann, J., & Lelley, T. (2012). Genetic relationships and evolution in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.*, 124(5), 875–891. doi: 10.1007/s00122 011 1752 z
 13. Abd El Hamed, K. E., Elwan, M. W. M., & Mohamed, F. H. (2015). Genetic Diversity and Relationship in Squash Using Morphological, Chemical and Molecular Analyses. *Int. J. Hortic.*, 5(12), 1–10. doi: 10.5376/ijh.2015.05.0012
 14. Brown, R. N. (2001). The Use and Development of Molecular Breeding Tools in *Cucurbita*: A Literature Review. *Cucurbit Gen. Coop. Rep.*, 24, 87–90.
 15. Ferriol, M., Pico, B., & Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 107(2), 271–282. doi: 10.1007/s00122 003 1242 z
 16. Esmailnia, E., Arefrad, M., Shabani, S., Karimi, M., Vafadar, F., & Dhestani, A. (2015). Genetic diversity and phylogenetic relationship of Iranian indigenous cucurbits investigated by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Biharean Biol.*, 9(1), 47–54.
 17. Hadia, H. A., Abdel Razzak, H. S., & Hafez, E. E. (2008). Assessment of Genetic Relationships among and Within *cucurbita* Species Using RAPD and ISSR markers. *J. Appl. Sci. Res.*, 4(5), 515–525.
 18. Katzir, N., Tadmor, Y., Tzuri, G., Leshxeshen, E., Mozes Daube, N., Danin Poleg, Y., & Paris, H. S. (2000). Further ISSR and preliminary SSR analysis of relationships among accessions of *Cucurbita pepo*. *Acta Hort.*, 510(69), 433–439. doi: 10.17660/ActaHortic.2000.510.69

19. Ntuli, N. R., Tongoonab, P. B., & Zobolo, A. M. (2015). Genetic diversity in *Cucurbita pepo* landraces revealed by RAPD and SSR markers. *Sci. Hortic.*, 189, 192–200. doi: 10.1016/j.sci.2015.03.020
20. Radwan, S. A. (2014). Molecular discrimination and genetic relationships between some cultivars of *Cucurbita pepo* spp. *pepo* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Afr. J. Biotechnol.*, 13(11), 1202–1209. doi: 10.5897/AJB2012.3007
21. Pandey, A., Khan, M. K., Isik, R., Turkmen, O., Acar, R., Seymen, M., & Hakkı, E. E. (2019). Genetic diversity and population structure of watermelon (*Citrullus* sp.) genotypes. *Biotech.*, 9(6), 210. doi: 10.1007/s13205 019 1736 2
22. Muhammad, R. W., Qayyum, A., Ahmad, M. Q., Hamza, A., Yousaf, M., Ahmad, B., ... Noor, E. (2017). Characterization of maize genotypes for genetic diversity on the basis of inter simple sequence repeats. *Genet. Mol. Res.*, 16(1), 1–9. doi: 10.4238/gmr16019438
23. Raji, M. R., Lotfi, M., Tohidfar, M., Zahedi, B., Carra, A., Abbate, L., & Carimi, F. (2018). Somatic embryogenesis of muskmelon (*Cucumis melo* L.) and genetic stability assessment of regenerants using flow cytometry and ISSR markers. *Protoplasma*, 255(3), 873–883. doi: 10.1007/s00709 017 1194 9
24. Bednarskaya, I. A., Popov, V. N., Dugar, Y. N., Akinina G. E., & Dolgova, T. A. (2014). ISSR analysis of some species of angustifoliate fescue. *Cytol. Genet.*, 48, 364–370. doi: 10.3103/S0095 452714060024
25. Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(10), 5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269

УДК 577.21:631.526.32:635.621.3

Ланкастер Ю. Н.¹, Кондратенко С. И.¹, Лиманская С. В.^{2,3*}, Тереняк Ю. Н.³, Чернышенко Г. Е.³, Попов В. Н.^{2,3,4} Исследование генетического полиморфизма образцов кабачка (*Cucurbita pepo* L.) методом ISSR анализа // Plant Varieties Studying and Protection. 2019. Т. 15, № 4. С. 442–450. <https://doi.org/10.21498/2518 1017.15.4.2019.189081>

¹Институт овощеводства и бахчеводства НААН Украины, ул. Институтская, 1, с. Селекционное, Харьковский р н, Харьковская обл., 62478, Украина

²Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, п/в «Докучаевское 2», Харьковский р н, Харьковская обл., 62483, Украина, *e mail: svetlanalymanska@gmail.com

³Испытательная лаборатория ООО «АГРОГЕН НОВО», ул. Шишковская, 2В, г. Харьков, 61070, Украина

⁴Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61022, Украина

Цель. Выявить генетический полиморфизм и дивергенцию сортов и гибридов кабачка (*C. pepo* L.) разного географического происхождения по ISSR маркерами. **Методы.** Для оценки генетического полиморфизма 29 сортов и гибридов *C. pepo* L. различного происхождения использовали ISSR анализ. Коэффициент сходства между исследуемыми образцами кабачка определяли по формуле Nei–Li. Расчет коэффициентов сходства и построение филогенетического дерева осуществляли с помощью пакета программ Phylip 3.69. Кластерный анализ проводили методом присоединения соседей (Neighbor joining). Достоверность группировки образцов в кластеры проверяли методом бутстреп анализа. **Результаты.** Использование 13 праймеров к межмикросателлитным участкам позволило выявить 129 локусов ДНК кабачка, среди которых 109 были полиморфные, 20 – мономорфные, 11 – уникальные для определенных образцов. Электрофореграммы продуктов амплификации опытных образцов отличались количеством и размером ампликонов. Выявлен высокий полиморфизм ДНК опытных образцов кабачка, который варьировал от 62,5% (праймер UBC 810) до 100% (праймеры UBC 2, UBC 3 и UBC 846). Уровень молекулярно генетического полиморфизма образцов кабачка варьировал

от 55,8 до 63,6% у гибридов ‘Rimini’ и ‘Eight Ball’, соответственно. Установлено низкую генетическую дивергенцию между опытными образцами *C. pepo* L., коэффициент сходства по Nei Li составил 0,0005–0,0092. С помощью кластерного анализа образцы кабачка были сгруппированы в два кластера. Основным критерием кластеризации был уровень генетической дивергенции. Географическое происхождение образцов не влияло на особенности их группировки. **Выводы.** По результатам изучения образцов кабачка разного географического происхождения с помощью ISSR анализа установлены высокий генетический полиморфизм и незначительная генетическая дивергенция между опытными образцами. Обнаружены уникальные фрагменты ДНК, которые могут быть использованы для паспортизации соответствующих образцов, а также для разработки других молекулярно генетических маркеров. Полученная информация может быть полезной для оптимизации селекционного процесса кабачка и по следующим исследованиям в области молекулярной генетики этой культуры.

Ключевые слова: *Cucurbita pepo* L.; полиморфизм ДНК; ISSR маркеры; генетическая дивергенция; кластерный анализ.

UDC 577.21:631.526.32:635.621.3

Lankaster, Yu. M.¹, Kondratenko, S. I.¹, Lymanska, S. V.^{2,3*}, Tereniak, Yu. M.³, Chernyshenko, H. E.³, & Popov, V. M.^{2,3,4} (2019). Studies on the genetic polymorphism of courgette (*Cucurbita pepo* L.) accessions by ISSR analysis. *Plant Varieties Studying and Protection*, 15(4), 442–450. https://doi.org/10.21498/2518_1017.15.4.2019.189081

¹Institute of Vegetables and Melon Growing, NAAS of Ukraine, 1 Instytutska St., Seleksiine, Kharkiv district, Kharkiv region, 62478, Ukraine

²Kharkiv National Agrarian University n. a. V. V. Dokuchaiev, "Dokuchaievske 2", Kharkiv district, Kharkiv region, 62483, Ukraine, *e mail: svetlanalymanska@gmail.com

³Testing laboratory LLC "AGROGEN NOVO", 2V Shyshkovska St., Kharkiv, 61070, Ukraine

⁴V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

Purpose. Identify genetic polymorphism and divergence of *C. pepo* L. varieties and hybrids of different geographical origin using ISSR markers. **Methods.** ISSR analysis was used to evaluate the genetic polymorphism of 29 *C. pepo* L. varieties and hybrids of different origin. The similarity coefficient between the investigated courgette accessions was calculated by the Nei–Li's formula. Calculating coefficients of similarity and phylogenetic tree construction was performed with the Phylip 3.69 software package. The cluster analysis was performed by the Neighbor joining method. The validity of the accessions grouping into clusters was tested by bootstrap analysis. **Results.** The use of 13 primers in the intermicrosatellite regions revealed 129 loci of courgette DNA, among them 109 were polymorphic, 20 were monomorphic, 11 were unique to certain accessions. Electrophoregrams of the amplification products of the investigated accessions differed in the number and size of the amplicons. High DNA polymorphism of the investigated courgette accessions was found, which ranged from 62.5% (primer UBC 810) to 100% (primers UBC 2, UBC 3, and UBC

846). The level of molecular genetic polymorphism of courgette accessions varied from 55.8 to 63.6% in the 'Rimini' and 'Eight Ball' hybrids correspondingly. Low genetic divergence was determined between the *C. pepo* L. specimens, the Nei–Li similarity coefficient was 0.0005–0.0092. Using the cluster analysis, courgette accessions were grouped into two clusters. The main criterion for clustering was the level of genetic divergence. The geographical origin of the accessions did not affect the peculiarities of their grouping.

Conclusions. The results of the study of courgette accessions of different geographical origin using ISSR analysis revealed high genetic polymorphism and little genetic divergence between the experimental accessions. Unique DNA fragments have been identified and can be used for the certification of relevant samples, as well as for the development of other molecular genetic markers. The obtained information may be useful for optimizing the courgette breeding process and further studies in the molecular genetics of this culture.

Keywords: *Cucurbita pepo* L.; polymorphism DNA; ISSR markers; genetic divergence; cluster analysis.

Надійшла / Received 23.10.2019

Погоджено до друку / Accepted 18.12.2019