

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МІЩЕНКО АНДРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 577.21:634.54

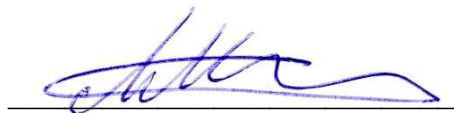
ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗРОБКА І ВИКОРИСТАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ ДЛЯ
ІДЕНТИФІКАЦІЇ СОРТІВ ЛІЩИНИ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ**

Спеціальність 091 «Біологія»

Галузь знань 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне
джерело.

 А. М. Міщенко

Науковий керівник: Андрєєв Ігор Олегович, кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник
відділу генетики клітинних популяцій ІМБГ НАН України.

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Мищенко А. М. Розробка і використання ДНК-маркерів для ідентифікації сортів ліщини української селекції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2026.

Культурна ліщина європейська (*Corylus avellana* L.) або фундук є важливою горіхоплідною культурою з високим комерційним потенціалом, промислове виробництво якої неможливе без точного контролю сортового складу насаджень. Помилки при розмноженні садивного матеріалу призводять до значних економічних втрат для виробників і селекціонерів. Тривалий час єдиним інструментом сортової ідентифікації залишався морфологічний аналіз за дескрипторами UPOV, проте значна фенотипова мінливість морфологічних ознак фундука під впливом умов вирощування та вікових змін суттєво обмежує його надійність, особливо при ідентифікації близькоспоріднених генотипів. Вирішення цієї проблеми в сучасній практиці пов'язане з використанням ДНК-маркерів, які характеризуються стабільністю результатів незалежно від умов вирощування та стадії розвитку рослини. Незважаючи на успіхи молекулярної ідентифікації фундука у світовій практиці, генетична характеристика та паспортизація сортів вітчизняної селекції до початку даного дослідження не проводилася, що обумовило актуальність та практичну значущість роботи.

Дисертаційне дослідження відповідає плану науково-дослідних робіт відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалося в рамках бюджетних тем відділу: «Генетичні і фізіолого-біохімічні механізми адаптації рослин до екстремальних умов довкілля» (номер держреєстрації 0120U105249, 2021-2025 рр.), «Геномна мінливість і особливості накопичення специфічних біологічно активних сполук

у культурі тканин лікарських рослин» (номер держреєстрації 0125U002734, 2026-2030 рр.), а також при співвиконанні НДР «Теоретичні основи селекції фундука з використанням молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації видової приналежності вихідних матеріалів і отримуваних гібридів» (номер держреєстрації 0120U103133, 2020-2022 рр.).

Об'єкт дослідження – сорти фундука української селекції та види *Corylus*.

Предмет дослідження – ДНК-маркери для характеристики та ідентифікації українських сортів фундука.

Мета дослідження – пошук ДНК-маркерів, придатних для генетичного аналізу українських сортів фундука, аналіз їхньої інформативності та використання для генетичної характеристики сортів фундука.

Завдання дослідження:

1. Оптимізувати методику виділення та очищення ДНК, придатної для ПЛР-аналізу, з листя ліщини.
2. Визначити інформативність існуючих SSR-маркерів для ідентифікації та диференціації сортів фундука української селекції.
3. Охарактеризувати алельний склад та проаналізувати молекулярну структуру відібраних мікросателітних локусів.
4. Дослідити алельні профілі сортів фундука української селекції з використанням відібраних SSR-маркерів.
5. Провести пошук поліморфних iPBS-маркерів, придатних для молекулярно-генетичної характеристики українських сортів фундука.
6. Визначити інформативність відібраних iPBS-праймерів для ідентифікації та диференціації українських сортів фундука.
7. Порівняти ефективність iPBS-маркерів та SSR-маркерів для диференціації сортів фундука української селекції.

Методи дослідження: Виділення ДНК з висушеного листя ліщини за модифікованою ЦТАБ-методикою, мультиплексна ПЛР із флуоресцентно міченими праймерами та фрагментний аналіз SSR-локусів, ПЛР із iPBS-

праймерами та електрофорез у агарозному гелі, клонування та сиквенування за Сенгером, біоінформатичні та статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів: Вперше проведено оптимізацію методу виділення та очищення ДНК з ЦТАБ для отримання придатних для ПЛР препаратів ДНК зі зразків висушеного листа ліщини. Вперше охарактеризовано генетичне різноманіття 25 українських сортів фундука за допомогою 9 SSR-локусів та складено індивідуальні алельні профілі для кожного сорту. Визначено інформативність використаних маркерів та мінімальний набір маркерів, достатній для диференціації генотипів у вибірках до 1000 зразків. Визначено структуру використаних мікросателітних локусів у представників роду *Corylus*, встановлено зв'язок між молекулярною структурою та розміром алелів, виявлено видоспецифічні варіанти деяких мікросателітних локусів. Вперше застосовано iPBS-маркери для диференціації сортів фундука. Показано, що одного з відібраних iPBS-праймерів (2402) достатньо, щоб розрізнити 25 досліджених сортів. Вперше побудовано дендрограми генетичної подібності на основі SSR та iPBS-маркерів для сортів фундука української селекції.

Практична значущість: Складені алельні профілі 25 сортів фундука української селекції за 9 SSR-локусами можуть бути використані як основа для генетичної паспортизації та верифікації садивного матеріалу цих сортів. Оптимізований протокол виділення ДНК з сухого листа ліщини дозволяє відокремити в часі етап збору матеріалу та його наступного молекулярно-генетичного аналізу. Умови мультиплексної ПЛР, розроблені для мікросателітного аналізу, дозволяють аналізувати три SSR-локуси одночасно з використанням праймерів, мічених одним барвником, що дозволяє скоротити час і витрати матеріалів на проведення аналізу. Підібрано інформативні iPBS-праймери для рутинного генетичного аналізу зразків фундука в умовах слабо оснащених лабораторій. Запропоновані на основі оцінки інформативності набори маркерів (5 SSR-локусів або 1–2 iPBS-праймери) можуть бути безпосередньо впроваджені в практику ідентифікації сортів фундука в

селекційних господарствах та розплідниках, що забезпечить значне скорочення часових та матеріальних витрат на проведення аналізу.

У дисертаційному дослідженні проведено підбір та визначення інформативності двох типів ДНК-маркерів для молекулярно-генетичної ідентифікації та диференціації сортів фундука української селекції. Зокрема було використано мікросателітні або SSR-маркери, які широко застосовують в практиці для типізації культурних рослин, а також iPBS-маркери, створені на основі консервативних послідовностей ретротранспозонів, для яких було показано універсальність та високу ефективність для молекулярно-генетичного аналізу на багатьох видах рослин, включно із культурними. Для оцінки інформативності цих маркерів використали вибірку рослин, до складу якої увійшли 25 українських сортів фундука та п'ять рослин трьох видів *Corylus* з помологічної колекції Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України.

Обов'язковою передумовою молекулярно-генетичного аналізу є якісні препарати геномної ДНК, однак листкова тканина ліщини містить значну кількість вторинних метаболітів, подібних за фізико-хімічними властивостями до ДНК, що ускладнює виділення та очищення останньої за допомогою стандартних процедур. Тому першим етапом роботи стали підбір та оптимізація методики виділення ДНК із листкової тканини ліщини. В результаті перевірки трьох різних методик, що передбачають використання ЦТАБ-екстракції, було обрано одну, що включає попередню відмивку подрібненого рослинного матеріалу високосольовим буфером від розчинних сполук. Ця методика з внесеними нами модифікаціями дозволяє отримувати препарати ДНК достатньої якості із зразків сухого листа ліщини в кількості до 1,5–2,5 мкг із 100 мг сухої листкової тканини, що є достатнім для ПЛР-аналізу.

Для оцінки інформативності використали дев'ять SSR-локусів з числа розроблених раніше для типування зразків фундука з колекції USDA Університету штату Орегон. Розташування цих локусів охоплює сім із

одинадцяти груп зчеплення геному *C. avellana*, що мінімізує ймовірність зчепленого наслідування аналізованих ознак. Встановлено, що 8 із 9 досліджених SSR-локусів мають високі показники інформативності для аналізу українських сортів фундука. За результатами теоретичних розрахунків, 5 маркерів з числа використаних може бути достатньо для диференціації генотипів у вибірках до 1000 зразків. Розроблено умови мультиплексної ПЛР, яка дозволяє аналізувати три SSR-локуси в одній реакції з використанням праймерів, мічених одним барвником, що суттєво скорочує витрати часу та матеріалів. Для 25 досліджених сортів фундука складено мікросателітні профілі за 9 локусами, придатні для використання з метою їхньої ідентифікації та паспортизації.

Шляхом порівняльного аналізу нуклеотидних послідовностей, отриманих шляхом клонування та сиквенування, а також знайдених в базах даних NCBI, визначено молекулярну організацію досліджених SSR-локусів у представників п'яти видів роду *Corylus*. П'ять з дев'яти локусів мають просту структуру і утворені одним тринуклеотидним повтором, а їхні алелі передбачувано відрізняються за розміром на величину кратну трьом. Решта чотири локуси мають складну структуру, містять перервані повтори або два типи повторів, у них виявлено інсерції та делеції. Ці локуси мають різноманітніший набір варіантів, але їх розмір не завжди можна напряму пов'язати з кількістю одиниць простого повтору.

Попри низку переваг, необхідність використання спеціалізованого обладнання та флуоресцентно мічених праймерів суттєво обмежує використання SSR-маркерів в лабораторіях із недостатнім технічним оснащенням. Практичною альтернативою для таких лабораторій може стати метод іPBS-аналізу, який полягає в ампліфікації ділянок між консервативними ділянками LTR-ретротранспозонів і завдяки значній розповсюдженості останніх в геномі рослин не потребує попереднього аналізу геномних послідовностей. Було проведено скринінг 24-х іPBS-праймерів з використанням чотирьох зразків ліщини. В результаті відібрали шість праймерів, продукти ампліфікації яких

характеризувалися найбільшим поліморфізмом та були представлені чіткими смугами. Подальша оцінка цих праймерів з використанням повної вибірки з 30 зразків встановила їхню високу інформативність, зокрема можливість диференціювати всі 25 досліджених сортів фундука за допомогою одного iPBS-праймера (2402).

Було проведено порівняльний аналіз SSR- та iPBS-маркерів за показниками інформативності, розрахованими за результатами дослідження однієї вибірки зразків. Роздільна здатність iPBS-маркерів була в середньому майже втричі вища ніж у SSR-маркерів: 6,76 проти 2,23. Дискримінаційна здатність iPBS-маркерів також більша: в середньому 0,948 проти 0,805 для SSR-маркерів. Така перевага в інформативності разом із меншими часовими і матеріальними витратами на проведення iPBS-аналізу робить його привабливою альтернативою для невеликих лабораторій з мінімальним обладнанням. Водночас, певні недоліки iPBS-аналізу, зокрема домінантний тип успадкування та низька міжлабораторна відтворюваність, суттєво обмежують можливість його використання для типізації культурних рослин у широкому контексті. Таким чином, обидва типи маркерів можуть бути взаємодоповнювальними: iPBS-маркери дозволяють швидко й економічно диференціювати зразки у рутинних задачах польової селекції, а SSR-маркери забезпечують молекулярні дані для паспортизації сортів та інтеграції в міжнародні системи генетичної ідентифікації.

Для характеристики генетичного складу досліджених українських сортів фундука методом UPGMA було проведено кластерний аналіз матриць попарних генетичних відстаней, розрахованих за результатами молекулярно-генетичного аналізу для обох типів маркерів, і побудовано дендрограми генетичної подібності. На дендрограмі, побудованій за даними мікросателітного аналізу, зразки розділилися на один великий кластер з кількома підкластерами та два невеликих кластери з двох-трьох зразків. Один з підкластерів був утворений переважно сортами, що походять з НДІ квітництва та субтропічних культур (м. Сочі), що свідчить про їхню значну спорідненість. Натомість сорти, створені в

Інституті лісового господарства та агролісомеліорації імені Г. М. Висоцького, які становлять більшість у проаналізованій вибірці, характеризуються значним різноманіттям і формують кілька груп, які можна розглядати як самостійні при включенні в селекційний процес. Характер кластеризації зразків на основі даних іPBS-аналізу відрізняється від такого, отриманого за даними SSR-аналізу, хоча окремі зразки і групуються подібним чином. Крім того, в цьому випадку відстані між зразками відносно більші. Такі особливості кластеризації імовірно пов'язані з тим, що іPBS-аналіз охоплює іншу частину геному, яка до того ж є поліморфнішою.

В результаті проведеної роботи підібрано інформативні ПЛР-маркери для ідентифікації та диференціації зразків фундука, створено базу мікросателітних профілів 25 сортів фундука, яка може бути використана для генетичної паспортизації та сортової верифікації садивного матеріалу. Оптимізовано протокол виділення ДНК із сухого листа та розроблено умови мультиплексної ПЛР для аналізу мікросателітних локусів. Розроблені SSR- та іPBS-маркери придатні для практичного використання у селекції й розсадництві та створюють основу для сертифікації сортів, захисту прав селекціонерів і подальших генетичних досліджень.

Ключові слова: фундук, *Corylus spp.*, молекулярні маркери, ПЛР-маркери, ген, іPBS-аналіз, молекулярно-генетичний аналіз, генетична мінливість, поліморфізм, мікросателітні профілі, стійкість рослин, алель-специфічна ПЛР, флуоресцентний аналіз, маркер-асоційована селекція, селекція.

Список публікацій здобувача

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Міщенко А. М.**, Андреев І. О. Підбір та оптимізація методу виділення та очищення ДНК з видів роду *Corylus* для ПЛР аналізу. Фактори експериментальної еволюції організмів, 2023; 32:53-58. DOI: 10.7124/FEEO.v32.1535 (Особистий внесок здобувача – опрацювання

літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).

2. **Міщенко А. М.**, Андрєєв І. О., Косенко І. С. Характеристика нових сортів фундука Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України із використанням мікросателітних маркерів. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2025; 36:98-104. DOI:10.7124/FEEO.v36.1754 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).
3. **Mishchenko A.M.**, Andreev I.O., Hryshchenko N.V. Kravchenko S.A., Kunakh V.A. Assessment of the Informativeness of SSR Markers for the Identification and Differentiation of Ukrainian Hazelnut Varieties. Cytol. Genet. 2026; 60:136–144. DOI:10.3103/S0095452726020064 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).
4. **Міщенко А. М.**, Андрєєв І. О., Кунах В. А. Оцінка інформативності iPBS-маркерів для ідентифікації та диференціації українських сортів фундука. Біополімери і клітина. 2025; 41(4):266-274. DOI: 10.7124/bs.000B2A (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).
5. **Міщенко А. М.**, Андрєєв І. О., Мельник В. М., Кунах В. А. Структурна організація деяких мікросателітних локусів у представників роду *Corylus*. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2025; 23:12-23. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.22.1-2.1684 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Prospective DNA markers for the identification of hazelnut varieties of Ukrainian selection / Mishchenko A. M. // Biopolymers and Cell. 2023. Vol. 39. N 4. P. 311–322. doi: 10.7124/bc.000AA8
2. Application of SSR markers for identification of hazelnut varieties of Ukrainian breeding / Mishchenko A. M., Andreev I. O. // Book of abstracts XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Institute of molecular biology and genetics National Academy of Sciences of Ukraine 21–22.05.2024. – Kyiv, 2024. – P. 37.
3. Мікросателітний аналіз сортів фундука (*Corylus* spp.) селекції національного дендрологічного парку «Софіївка» / Міщенко А. М., Андрєєв І. О. // Матеріали IV конференції молодих вчених «Біологія рослин і біотехнологія», Київ, Україна, 18.05.2024. – Київ, 2024. – С. 17.
4. Potential of retrotransposon-based iPBS-markers in the identification of ukrainian hazelnut varieties / Mishchenko A. M., Andreev I. O. // Book of abstracts XIX All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Institute of molecular biology and genetics National Academy of Sciences of Ukraine, 20–21.05.2025. – Kyiv, 2025. – P. 38.

SUMMARY

Mishchenko A. M. Development and application of DNA markers for epy identification of Ukrainian-bred hazelnut varieties. – The qualifying academic work with the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 "Biology", specialty 091 "Biology". – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

European hazelnut (*Corylus avellana* L.) is an important nut crop with high commercial potential, the industrial production of which is impossible without precise control of variety composition in plantations. Errors in propagation of planting material

lead to significant economic losses for producers and breeders. For a long time, the only tool for variety identification was morphological analysis based on UPOV descriptors. However, the considerable phenotypic variability of hazelnut morphological traits under the influence of growing conditions and age-related changes substantially limits its reliability, particularly when identifying closely related genotypes. In modern practice, the solution to this problem is associated with the use of DNA markers, which produce stable results regardless of the growth conditions and developmental state of a plant. Despite advances in molecular identification of hazelnut in global practice, the genetic characterisation and certification of Ukrainian hazelnut varieties had not been carried out until this study, which determined the relevance and practical significance of the work.

The dissertation research corresponds to the research plan of the Department of Cell Population Genetics of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine and was carried out within the framework of state budget funding projects of the department: "Genetic, physiological, and biochemical mechanisms for plant adaptation to extreme environmental conditions" (state registration number 0120U105249, 2021–2025), "Genomic variability and peculiarities of accumulation of specific biologically active compounds in tissue culture of medicinal plants" (state registration number 0125U002734, 2026–2030), as well as in co-execution of the R&D project "Theoretical fundamentals of hazelnut breeding using molecular genetic markers for identification of species belonging of initial materials and hybrids generated" (state registration number 0120U103133, 2026–2030).

Object of the study – Ukrainian-bred varieties of hazelnut and *Corylus* species.

Subject of the study – DNA markers for the characterisation and identification of Ukrainian hazelnut varieties.

Aim of the study – to identify DNA markers suitable for genetic analysis of Ukrainian hazelnut varieties, to evaluate their informativeness, and to apply them for genetic characterisation of hazelnut varieties.

Research objectives:

1. To optimise the protocol for extraction and purification of DNA from hazelnut leaf tissue that is suitable for PCR analysis.
2. To determine the informativeness of existing SSR markers for identification and differentiation of Ukrainian-bred hazelnut varieties.
3. To characterise the allele composition and analyse the molecular structure of the selected microsatellite loci.
4. To investigate the allelic profiles of Ukrainian-bred hazelnut varieties using the selected SSR markers.
5. To screen for polymorphic iPBS markers suitable for molecular-genetic characterisation of Ukrainian hazelnut varieties.
6. To assess the informativeness of the selected iPBS primers for identification and differentiation of Ukrainian hazelnut varieties.
7. To compare the efficiency of iPBS- and SSR markers for differentiation of Ukrainian-bred hazelnut varieties.

Methods: DNA extraction from dried hazelnut leaves using a modified CTAB protocol; multiplex PCR with fluorescently labelled primers and fragment analysis of SSR loci; PCR with iPBS primers and agarose gel electrophoresis; cloning and Sanger sequencing; bioinformatic and statistical methods.

Scientific novelty of the results: For the first time, a CTAB-based DNA extraction and purification protocol was optimised to obtain PCR-grade DNA preparations from dried hazelnut leaf specimens. For the first time, the genetic diversity of 25 Ukrainian hazelnut varieties was assessed using 9 SSR loci, and individual allelic profiles were compiled for each variety. The informativeness of the markers used and the minimum marker set sufficient for genotyping of large samples of up to 1,000 specimens were determined. The molecular structure of the microsatellite loci used was examined in *Corylus* species; the relationship between molecular structure and allele size was established, and species-specific variants of certain microsatellite loci were identified. iPBS markers were applied for hazelnut variety differentiation for the first time. It was demonstrated that one of the selected iPBS primers (2402) is sufficient to

differentiate all 25 studied varieties. For the first time, dendrograms of genetic similarity based on SSR- and iPBS markers were constructed for Ukrainian-bred hazelnut varieties.

Practical significance: The compiled allelic profiles of 25 Ukrainian-bred hazelnut varieties at 9 SSR loci can serve as a base for genetic certification and verification of planting material of these varieties. The optimised protocol for DNA extraction from dried hazelnut leaves allows the sample collection stage to be separated in time from subsequent molecular-genetic analysis. The multiplex PCR conditions developed for microsatellite analysis enable the simultaneous analysis of three SSR loci using primers labelled with a single fluorescent dye, significantly reducing time and material costs. Informative iPBS primers were identified for routine genetic analysis of hazelnut specimens in minimally equipped laboratories. The marker sets proposed on the basis of informativeness assessment (5 SSR loci or 1-2 iPBS primers) can be directly implemented in the practice of hazelnut variety identification in breeding facilities and nurseries, providing significant reductions in time and material expenditure.

The dissertation research involved the selection and informativeness assessment of two types of DNA markers for molecular-genetic identification and differentiation of Ukrainian-bred hazelnut varieties. Specifically, microsatellite (SSR) markers, which are widely used in practice for genotyping cultivated plants, and iPBS markers, developed on the basis of conserved retrotransposon sequences and shown to be universal and highly effective for molecular-genetic analysis across many plant species including cultivated ones, were examined. To assess the informativeness of these markers, a sample comprising 25 Ukrainian hazelnut varieties and five plants of three *Corylus* species from the pomological collection of the National Dendrological Park "Sofiyivka" of the NAS of Ukraine was used.

A prerequisite for molecular-genetic analysis is the availability of high-quality genomic DNA preparations. However, hazelnut leaf tissue contains a substantial quantity of secondary metabolites that have physicochemical properties similar to

those of DNA, which complicates its extraction and purification using standard procedures. Therefore, the first stage of the work involved the selection and optimisation of a DNA extraction protocol from hazelnut leaf tissue. Following evaluation of three different CTAB-based extraction protocols, one was selected that includes a preliminary high-salt buffer wash of ground plant material to remove soluble compounds. With the modifications we introduced, this protocol enables the preparation of sufficient quality DNA from dried hazelnut leaves in quantities of up to 1.5–2.5 µg per 100 mg of dry leaf tissue, which is a sufficient amount for PCR analysis.

Nine SSR loci, previously developed for genotyping hazelnut specimens from the USDA collection at Oregon State University, were used to assess their informativeness. The positions of these loci span seven of the eleven linkage groups of the *C. avellana* genome, minimising the probability of linked inheritance among the analysed traits. It was established that 8 of the 9 examined SSR loci display high informativeness for the analysis of Ukrainian hazelnut varieties. According to theoretical calculations, 5 of the markers used may be sufficient for genotype differentiation in samples of up to 1,000 specimens. Multiplex PCR conditions were developed that allow three SSR loci to be analysed in a single reaction using primers labelled with a single fluorescent dye, substantially reducing time and material costs. Microsatellite profiles at 9 loci were compiled for 25 studied hazelnut varieties, which can be used for their identification and certification purposes.

The molecular organisation of the studied SSR loci in representatives of five *Corylus* species was examined by comparative analysis of nucleotide sequences obtained by cloning and Sanger sequencing, as well as sequences retrieved from NCBI databases. Five of the nine loci were found to have a simple structure, consisting of a single trinucleotide repeat, and their alleles predictably differ in size by multiples of three base pairs. The remaining four loci have a complex structure, containing interrupted repeats or two types of repeats, with insertions and deletions detected. These loci exhibit a more diverse set of variants, but their size cannot always be directly linked to the number of simple repeat units.

Despite their advantages, the need for specialised equipment and fluorescent labelled primers significantly limits the application of SSR markers in laboratories that lack the necessary technical resources. A practical alternative for such laboratories is the iPBS analysis method, which is based on amplification of regions between conserved LTR retrotransposon sequences. Owing to the widespread distribution of these sequences in plant genomes, prior analysis of genomic sequences is not required. A screening of 24 iPBS primers was carried out using four hazelnut specimens, resulting in the selection of six primers whose amplification profiles displayed the greatest polymorphism and were represented by clear, sharp bands. Subsequent evaluation of these primers using the full sample of 30 specimens confirmed their high informativeness, including the ability to differentiate all 25 studied hazelnut varieties using a single iPBS primer (2402).

A comparative analysis of SSR and iPBS markers was conducted based on informativeness indicators calculated from the results of analysing the same sample. The resolving power of iPBS markers was on average nearly three times higher than that of SSR markers: 6.76 versus 2.23. The discriminating power of iPBS markers was also greater: 0.948 versus 0.805 on average for SSR markers. This advantage in informativeness, combined with lower time and material costs for iPBS analysis, makes it an attractive alternative for small laboratories with limited equipment. However, the limitations of iPBS analysis, particularly with regard to the dominant mode of inheritance and low interlaboratory reproducibility, substantially restrict its application for variety typing in a broader context. Thus, the two markers can be considered complementary: iPBS markers enable rapid and cost-effective differentiation of specimens in routine field breeding tasks, while SSR markers provide molecular data for variety certification and integration into international genetic identification systems.

To characterise the genetic composition of the studied Ukrainian hazelnut varieties, UPGMA cluster analysis of pairwise genetic distance matrices calculated from the results of molecular-genetic analysis for both marker types was performed,

and dendrograms of genetic similarity were constructed. On the dendrogram constructed from microsatellite analysis data, the specimens were grouped into one large cluster with several sub-clusters and two small clusters of two to three specimens. One of the sub-clusters was formed predominantly by varieties originating from the Scientific Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops (Sochi), indicating their close genetic relatedness. In contrast, varieties developed at the Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after G. M. Vysotsky, which constitute the majority of the analysed sample, display considerable diversity and form several groups that can be considered independent when included in the breeding process. The clustering pattern of specimens based on iPBS analysis data differs from that obtained from SSR analysis data, although some specimens do group in a similar manner. In addition, the distances between specimens are relatively greater in this case. This is likely because iPBS analysis covers a different and more polymorphic portion of the genome.

As a result of this work, informative PCR markers were selected for identification and differentiation of hazelnut specimens, a database of microsatellite profiles was compiled for 25 hazelnut varieties, which can be used for genetic certification and variety verification of planting material. The DNA extraction protocol from dried leaves was optimised and multiplex PCR conditions for microsatellite locus analysis were developed. The developed SSR and iPBS markers are suitable for practical application in breeding and nursery production, and provide a foundation for variety certification, protection of breeders' rights, and further genetic research.

Keywords: hazelnut, *Corylus* spp., molecular markers, PCR markers, gene, iPBS analysis, molecular-genetic analysis, genetic diversity, polymorphism, microsatellite profiles, plant resistance, allele-specific PCR, fluorescent analysis, marker-assisted breeding, breeding.

List of publications of the applicant

Publications in which the main scientific results of the dissertation are published:

- 1. Mishchenko A. M.,** Andreev I. O. Selection and optimization of the method for DNA isolation and purification from *Corylus* species for PCR analysis. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 2023; 32:53-58. DOI: 10.7124/FEEO.v32.1535
- 2. Mishchenko A. M.,** Andreev I. O., Kosenko I. S. Characterization of new hazelnut varieties of the National Dendrological Park “Sofiyivka” of NAS of Ukraine using microsatellite markers. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*. 2025; 36:98-104. DOI:10.7124/FEEO.v36.1754.
- 3. Mishchenko A.M.,** Andreev I.O., Hryshchenko N.V. Kravchenko S.A., Kunakh V.A. Assessment of the Informativeness of SSR Markers for the Identification and Differentiation of Ukrainian Hazelnut Varieties. *Cytology and Genetics*. 2026; 60:136–144. DOI:10.3103/S0095452726020064.
- 4. Mishchenko A. M.,** Andreev I. O., Kunakh V. A. Assessment of the informativeness of iPBS markers for identifying and differentiating Ukrainian hazelnut varieties. *Biopolymers and Cell*. 2025; 41(4):266-274. DOI: 10.7124/bc.000B2A.
- 5. Mishchenko A. M.,** Andreev I. O., Mel'nyk V. M., Kunakh V. A. Structure of microsatellite loci for genetic analysis of Ukrainian hazelnut varieties. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetikeriv i selekcioneriv*. 2025; 23:12-23. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.22.1-2.1684 .

Abstracts of reports at scientific conferences:

- 1.** Prospective DNA markers for the identification of hazelnut varieties of Ukrainian selection / Mishchenko A. M. // *Biopolymers and Cell*. 2023. Vol. 39. N 4. P. 311–322. doi: 10.7124/bc.000AA8
- 2.** Application of SSR markers for identification of hazelnut varieties of Ukrainian breeding / Mishchenko A. M., Andreev I. O. // *Book of abstracts XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Institute of molecular biology and*

- genetics National Academy of Sciences of Ukraine 21–22.05.2024. – Kyiv, 2024. –P. 37.
3. Microsatellite analysis of hazelnut varieties (*Corylus* spp.) selected from the National Dendrological Park "Sofiyivka" / Mishchenko A. M., Andreev I. O. // Book of abstracts IV Conference of Young Scientists "Plant Biology and Biotechnology", 18.05.2024. – Kyiv, 2024. – P. 17.
 4. Potential of retrotransposon-based iPBS-markers in the identification of ukrainian hazelnut varieties / Mishchenko A. M., Andreev I. O. // Book of abstracts XIX All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Institute of molecular biology and genetics National Academy of Sciences of Ukraine, 20–21.05.2025. – Kyiv, 2025. – P. 38.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	30
1.1 Розвиток фундукарства.....	30
1.1.1 Напрямки селекції ліщини в світі	31
1.1.2 Селекція фундука в Україні	32
1.2 ДНК-маркери в молекулярно-генетичному аналізі.....	34
1.2.1 Молекулярні маркери першого покоління	35
1.2.2 Молекулярні маркери на основі мобільних генетичних елементів.....	41
1.2.2.1. iPBS маркери.	43
1.2.3 Молекулярні маркери в селекції фундука.....	45
1.2.3.1. Розробка SSR маркерів для фундука.	50
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	52
2.1 Рослинний матеріал	52
2.2 Реактиви, розчини та обладнання.....	53
2.3 Методи роботи з ДНК.....	56
2.3.1 Виділення ДНК з рослинного матеріалу	56
2.3.1.1. Модифікована методика виділення ДНК із рослинного матеріалу із цетавлоновим буфером і осадженням спиртом [82].	56
2.3.1.2. Модифікована методика виділення ДНК із цетавлоновим буфером і наступною очисткою ДНК із використанням мікрогранул кремнезему (SiO ₂) (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit) [77].	57
2.3.1.3. Модифікована методика виділення ДНК із цетавлоновим буфером і попередньою відмивкою матеріалу високосолевым буфером та проміжним осадженням ізопропіловим спиртом в присутності 1M NaCl [83].	58

2.3.2 Полімеразна ланцюгова реакція з SSR-праймерами	59
2.3.3 Полімеразна ланцюгова реакція з iPBS-праймерами	61
2.3.4 Електрофоретичне фракціонування продуктів ампліфікації в агарозному гелі	61
2.3.5 Електрофоретичне фракціонування продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі	62
2.4 Клонування та сиквенування ДНК	63
2.4.1 Очищення фрагментів ДНК з агарозного гелю	63
2.4.2 Клонування виділених фрагментів ДНК	63
2.4.3 Виділення плазмідної ДНК із трансформованих клітин <i>E. Coli</i>	64
2.4.4 Сиквенування фрагментів ДНК	65
2.4.5 Біоінформатичний аналіз	65
2.5 Аналіз результатів	66
2.5.1 Популяційні характеристики дослідженої вибірки	67
2.5.2 Показники інформативності ПЛР-маркерів	68
2.5.3 Побудова дендрограм генетичної подібності	70
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	71
3.1 Оптимізація методики виділення ДНК з гербарних зразків <i>Corylus spp</i> ...	71
3.2 Аналіз поліморфізму та структурної організації мікросателітних локусів	74
3.2.1 Підбір умов для мультиплексної ПЛР мікросателітних локусів	75
3.2.2 Алельний склад та діапазони розмірів алелів досліджених мікросателітних локусів	77
3.2.3 Частотний розподіл алелів та мікросателітні профілі досліджених сортів фундука	79
3.2.4 Оцінка інформативності SSR-маркерів	83
3.2.5 Відхилення частот алелів досліджених SSR-локусів від рівноваги Харді–Вайнберга	88
3.2.6 Ефективні комбінації SSR-маркерів для диференціації сортів	89

3.2.7 Структурна організація SSR-локусів	91
3.3 Аналіз поліморфізму iPBS-маркерів	102
3.3.1 Скринінг та відбір інформативних iPBS-праймерів.....	102
3.3.2 Показники інформативності відібраних iPBS-праймерів.....	104
3.3.3 Ефективні комбінації iPBS-праймерів для диференціації зразків фундука	106
3.3.4 Порівняння інформативності iPBS та SSR-маркерів	107
3.4 Кластерний аналіз сортів фундука з використанням iPBS та SSR-маркерів.....	108
3.4.1 Дендрограма на основі SSR-маркерів.....	109
3.4.2 Дендрограма на основі iPBS-маркерів.....	111
3.4.3 Генетичний статус зразка <i>C. chinensis</i> з помологічної колекції НДП «Софіївка» НАН України.....	113
РОЗДІЛ 4 УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	115
ВИСНОВКИ.....	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	123
ДОДАТКИ.....	137

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

AFLP – поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів (amplified fragment length polymorphism);

дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфат;

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота;

EFB – фітофтороз фундука (Eastern Filbert Blight);

EST – мітка експресованої послідовності (expressed sequence tag);

iPBS-аналіз – метод аналізу поліморфізму ділянок ДНК, розташованих між сайтами зв'язування праймерів (inter-priming binding sites);

ISSR-аналіз – аналіз поліморфізму ділянок, розташованих між сусідніми простими повторюваними послідовностями (inter simple sequence repeats);

LB – живильне середовище Лурія-Бертані;

LG – група зчеплення (linkage group);

MAS – маркер-опосередкована селекція (marker-assisted selection);

PBS – сайт зв'язування праймера (priming binding sites) – ділянка, до якої приєднується тРНК при зворотній транскрипції ретротранспозонів;

PIC – вміст інформації про поліморфізм (polymorphism information content) показник здатності праймера виявляти поліморфізм;

RAPD – випадково ампліфікована поліморфна ДНК (random amplified polymorphic DNA);

ПДРФ – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;

SNP – однонуклеотидний поліморфізм (single nucleotide polymorphism);

SSR – прості повторювані послідовності, мікросателіти (simple sequence repeats);

Трис – трис(гідроксиметил)амінометан;

UPGMA – метод незваженого попарного середнього арифметичного (unweighted pair-group method with arithmetic mean);

QTL – локус кількісної ознаки (quantitative trait locus).

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Культурна ліщина європейська (*Corylus avellana* L.) або фундук є важливою горіхоплідною культурою, що займає провідні позиції у світовому садівництві завдяки високій харчовій цінності плодів та значному комерційному потенціалу. Промислове горіхівництво не може ефективно функціонувати без точного контролю сортового складу насаджень: помилки при розмноженні садивного матеріалу призводять до значних економічних втрат як для виробників, так і для споживачів [1]. Тривалий час єдиним інструментом сортової ідентифікації залишався морфологічний аналіз за дескрипторами UPOV, однак висока фенотипова мінливість морфологічних ознак фундука під впливом умов вирощування та вікових змін, суттєво обмежує його надійність, особливо при ідентифікації близькоспоріднених генотипів [2].

Вирішення проблем ідентифікації в останні десятиліття пов'язане із використанням ДНК-маркерів, які характеризуються високою частотою успадкування та стабільністю результатів незалежно від умов вирощування та стадії розвитку рослин [3]. Серед різних типів маркерів мікросателітні маркери (SSR) набули статусу «золотого стандарту» завдяки кодомінантній природі та високій відтворюваності результатів [4]. Для фундука розроблено понад 700 SSR-маркерів, які послужили основою для створення наборів маркерів для аналізу колекцій у країнах – провідних виробниках фундука: Туреччині, Італії, США. Водночас SSR-типізація є трудомісткою та вартісною, що стимулює пошук більш універсальних маркерних систем [5].

Перспективною альтернативою є маркери, створені на основі ретротранспозонів – мобільних генетичних елементів, що складають до 70% геному більшості рослин, мають велику кількість копій та широко розподілені по хромосомах [6]. Метод iPBS-аналізу (inter-Primer Binding Site) використовує консервативні сайти зв'язування праймера (PBS) LTR-ретротранспозонів для

ампліфікації міжретротранспозонних ділянок, розмір і наявність яких є індивідуальними для кожного генотипу. Завдяки еволюційній консервативності нуклеотидної послідовності PBS однакові праймери можна використовувати для генетичного аналізу різноманітних організмів без попереднього знання геномних послідовностей, що робить метод iPBS-аналізу привабливим для генотипування нових об'єктів [7].

Незважаючи на успіхи молекулярної ідентифікації фундука у світовій практиці, генетична характеристика та паспортизація сортів вітчизняної селекції дотепер не проводилася. Відсутність ДНК-маркерів, адаптованих для сортів української селекції не дозволяє повноцінно здійснювати оцінку їхнього генетичного різноманіття, захист прав селекціонерів та контроль сортової відповідності садивного матеріалу у промислових розсадниках. Це обумовлює актуальність пошуку та аналізу інформативності ДНК-маркерів, придатних для генетичного аналізу українських сортів фундука.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження відповідає плану науково-дослідних робіт відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалося в рамках бюджетних тем відділу: «Генетичні і фізіолого-біохімічні механізми адаптації рослин до екстремальних умов довкілля» (номер держреєстрації 0120U105249, 2021-2025 рр.), «Геномна мінливість і особливості накопичення специфічних біологічно активних сполук у культурі тканин лікарських рослин» (номер держреєстрації 0125U002734, 2026-2030 рр.), а також при співвиконанні НДР «Теоретичні основи селекції фундука з використанням молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації видової приналежності вихідних матеріалів і отримуваних гібридів» (номер держреєстрації 0120U103133, 2020-2022 рр.).

Об'єкт дослідження – сорти фундука української селекції та види *Corylus*.

Предмет дослідження – ДНК-маркери для характеристики та ідентифікації українських сортів фундука.

Мета дослідження – пошук ДНК-маркерів, придатних для генетичного аналізу українських сортів фундука, аналіз їхньої інформативності та використання для генетичної характеристики сортів фундука.

Завдання дослідження:

1. Оптимізувати методику виділення та очищення ДНК, придатної для ПЛР-аналізу, з листя ліщини.
2. Визначити інформативність існуючих SSR-маркерів для ідентифікації та диференціації сортів фундука української селекції.
3. Охарактеризувати алельний склад та проаналізувати молекулярну структуру відібраних мікросателітних локусів.
4. Дослідити алельні профілі сортів фундука української селекції з використанням відібраних SSR-маркерів.
5. Провести пошук поліморфних iPBS-маркерів, придатних для молекулярно-генетичної характеристики українських сортів фундука.
6. Визначити інформативність відібраних iPBS-праймерів для ідентифікації та диференціації українських сортів фундука.
7. Порівняти ефективність iPBS-маркерів та SSR-маркерів для диференціації сортів фундука української селекції.

Методи дослідження: Виділення ДНК з висушеного листя ліщини за модифікованою ЦТАБ-методикою, мультиплексна ПЛР із флуоресцентно міченими праймерами та фрагментний аналіз SSR-локусів, ПЛР із iPBS-праймерами та електрофорез у агарозному гелі, клонування та сиквенування за Сенгером, біоінформатичні та статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів: Вперше проведено оптимізацію методу виділення та очищення ДНК з ЦТАБ для отримання придатних для ПЛР препаратів ДНК зі зразків висушеного листя ліщини. Вперше охарактеризовано генетичне різноманіття 25 українських сортів фундука за допомогою 9 SSR-локусів та складено індивідуальні алельні профілі для кожного сорту. Визначено інформативність використаних маркерів та мінімальний набір

маркерів, достатній для диференціації генотипів у вибірках до 1000 зразків. Визначено структуру використаних мікросателітних локусів у представників роду *Corylus*, встановлено зв'язок між молекулярною структурою та розміром алелів, виявлено видоспецифічні варіанти деяких мікросателітних локусів. Вперше застосовано iPBS-маркери для диференціації сортів фундука. Показано, що одного з відібраних iPBS-праймерів (2402) достатньо, щоб розрізнити 25 досліджених сортів. Вперше побудовано дендрограми генетичної подібності на основі SSR та iPBS-маркерів для сортів фундука української селекції.

Практична значущість: Складені алельні профілі 25 сортів фундука української селекції за 9 SSR-локусами можуть бути використані як основа для генетичної паспортизації та верифікації садивного матеріалу цих сортів. Оптимізований протокол виділення ДНК з сухого листа ліщини дозволяє відокремити в часі етап збору матеріалу та його наступного молекулярно-генетичного аналізу. Умови мультиплексної ПЛР, розроблені для мікросателітного аналізу, дозволяють аналізувати три SSR-локуси одночасно з використанням праймерів, мічених одним барвником, що дозволяє скоротити час і витрати матеріалів на проведення аналізу. Підібрано інформативні iPBS-праймери для рутинного генетичного аналізу зразків фундука в умовах слабо оснащених лабораторій. Запропоновані на основі оцінки інформативності набори маркерів (5 SSR-локусів або 1–2 iPBS-праймери) можуть бути безпосередньо впроваджені в практику ідентифікації сортів фундука в селекційних господарствах та розплідниках, що забезпечить значне скорочення часових та матеріальних витрат на проведення аналізу.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційного дослідження самостійно опрацьовано наукову літературу, на основі якої спільно з науковим керівником сформульовано мету та завдання дослідження. Самостійно виконано всі експериментальні роботи: виділення ДНК, ПЛР-ампліфікацію SSR та iPBS-маркерів, електрофорез в агарозному гелі, клонування, а також обробку та аналіз результатів. Разом з науковим керівником та співавторами статей обговорювали

структуру експериментів, хід дослідження та інтерпретацію отриманих результатів. Автор щиро вдячний к.б.н. Андрєєву Ігорю Олеговичу за допомогу у відборі та підготовці листя ліщини, адаптуванні методики виділення ДНК, плануванні роботи, підборі та опануванні використаних методів, аналізі та інтерпретації отриманих результатів, редагуванні та коригуванні всіх написаних текстів. Розробка стратегії ампліфікації мікросателітних локусів та фрагментний аналіз із використанням лазерного флуориметра проводилися спільно з к.б.н. Кравченко Сергієм Афанасійовичем та к.б.н. Грищенко Наталією Володимирівною. Клонування фрагментів ДНК та підготовка компетентних клітин проводилися спільно з к.б.н. Мельником Віталієм Миколайовичем.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційного дослідження представлені на: XVIII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м. Київ, 26.09.2023); Конференції молодих вчених в рамках XVIII Міжнародної конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченої 50-річчю заснування Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ (м. Київ, 26.09.2023); XVIII Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, 21–22.05.2024); IV Конференції молодих вчених «Біологія рослин і біотехнологія» (м. Київ, 18.05.2024); XIX Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, 20–21.05.2025); круглому столі «Актуальні проблеми молекулярної біології» в рамках заходів «Дні науки в НаУКМА». (м. Київ, 05.03.2025); круглому столі «Актуальні питання сучасної молекулярної біології» в рамках заходів «Дні науки в НаУКМА» (м. Київ, 04.03.2026).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 наукових праць, з яких 5 статей в українських та зарубіжних наукових виданнях та 4 тези у збірниках матеріалів всеукраїнських та міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Робота складається зі вступу, розділів «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати та їх обговорення», «Узагальнення результатів дослідження», висновків, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел налічує 112 найменувань. Дисертацію викладено на 147 сторінках стандартного машинописного тексту, вона містить 12 рисунків, 12 таблиць та 3 додатка.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Розвиток фундукарства

Рід *Corylus* об'єднує диплоїдні багаторічні вітрозапильні рослини, поширені в помірних широтах Північної півкулі. Найбільше економічне значення має культурна ліщина європейська або фундук, яку культивують як цінну горіхоплідну, лісотехнічну та декоративну культуру [1]. Використання фундука людиною має глибокі історичні корені: археологічні знахідки в Європі, Північній Америці та Китаї датують вживання горіхів періодом мезоліту та неоліту (близько 8400 р. до н. е.). Після завершення останнього зледеніння ліщина стала однією з перших чагарникових порід, які мігрували з півдня на північ Європи і стали важливим елементом раціону тогочасного населення [1,8].

Етимологія назви роду пов'язана з грецьким словом *córys* (шолом), що вказує на характерну форму плюски, яка оточує горіх. Перші письмові згадки про культуру зустрічаються у працях Катона (II ст. до н. е.) та Плінія Старшого (I ст. н. е.). За історичними даними, центри походження культивованого фундука розташовуються на Близькому Сході, звідки рослини поширювалися через Чорноморський регіон до Греції, а згодом – до Італії. Туреччина вважається найдавнішим центром комерційної торгівлі фундуком, а в Італії сільськогосподарське вирощування ліщини документально зафіксоване з періоду раннього середньовіччя [1,9,10].

Сьогодні світове виробництво фундука зосереджене переважно в Середземноморському басейні (Туреччина, Італія, Іспанія) і базується на використанні традиційних сортів місцевого походження, таких як Томбул, Негрет, Tonda Gentile delle Langhe та інші. Стрімкий розвиток промислового культивування у XX столітті був продиктований високим попитом з боку кондитерської галузі, яка встановила чіткі стандарти якості сировини [1,9,10].

Сучасні селекційні програми спрямовані на вирішення комплексу завдань, зумовлених екологічними викликами та вимогами ринку. Основними пріоритетами є:

1. Адаптація до умов середовища: виведення штамбових форм, підвищення морозостійкості (особливо генеративних органів), стійкість до посухи та несприятливих ґрунтових умов.
2. Оптимізація репродуктивних ознак: скороспілість, висока стабільна врожайність, придатність до механізованого збирання та покращення технологічних якостей ядра (округла форма, легкість видалення плівки після смаження, тривалий термін зберігання).
3. Фітосанітарна стійкість: пошук генотипів, толерантних до основних шкідників (бруньковий кліщ, горіховий довгоносик) та патогенів (фітофтороз, бактеріальний опік, борошниста роса).

Генетичний контроль більшості господарсько цінних ознак фундука є полігенним. Проте такі характеристики, як самонесумісність, антоціанове забарвлення листя та стійкість до окремих хвороб, успадковуються за законами Менделя як домінантні або рецесивні ознаки, що спрощує їх відбір у селекційному процесі [1].

1.1.1 Напрямки селекції ліщини в світі. З переходом до інтенсивного промислового виробництва у XX столітті виникла потреба в цілеспрямованому генетичному вдосконаленні фундука. Перші значні зусилля у цьому напрямі були зосереджені в США, де ще на початку 1900-х років селекціонери почали працювати над поєднанням високих смакових якостей європейської ліщини з адаптивними властивостями місцевих видів. Зокрема, експериментальні схрещування *C. americana* × *C. avellana*, започатковані Дж. Ф. Джонсом та продовжені іншими дослідниками, мали на меті створення гібридів, стійких до низьких температур та патогену *Anisogramma anomala*, збудника фітофторозу фундука (EFB). Хоча ранні етапи цієї роботи не завжди приводили до створення комерційних сортів, вони заклали генетичну базу для сучасних програм в

університетах Орегону та Ратгерса, які на сьогодні створили десятки високопродуктивних сортів та запилювачів [1,11–13].

Паралельно з американським вектором, селекційні програми активно розвивалися в інших частинах світу, адаптуючись до регіональних викликів. У Канаді зусилля були спрямовані на використання *C. colurna* для створення деревоподібних форм без кореневої порості та залучення ендемічного виду *C. cornuta* для досягнення екстремальної морозостійкості [14]. Водночас у Туреччині та Італії селекціонери фокусувалися на вдосконаленні класичних промислових сортів шляхом внутрішньовидової гібридизації, що дозволило покращити вихід ядра та технологічність плодів для кондитерської галузі. Важливим науковим досягненням італійських вчених стало дослідження стерильності пилку та розробка нових генотипів, таких як EVG-d, що здатні до вегетації в умовах теплого клімату без потреби в періоді спокою [1,15].

Світовий досвід також доповнюється досягненнями Франції та Китаю, де селекційні програми пройшли шлях від збору колекцій зародкової плазми до створення міжвидових гібридів, адаптованих до специфічних екологічних ніш. Попри відмінності у географії, всі сучасні програми об'єднані спільними цілями: підвищенням стійкості до шкідників (зокрема брунькового кліща), оптимізацією термінів цвітіння для уникнення заморозків та покращенням якості олії для подовження терміну зберігання горіхів. Оскільки більшість господарсько цінних ознак фундука мають полігенну природу, селекційний процес залишається тривалим і складним, вимагаючи інтеграції класичних методів із сучасним маркерним аналізом [1,13].

1.1.2 Селекція фундука в Україні. У природній флорі України ліщина звичайна – єдиний представник роду. Даний вид, хоча і є еволюційно молодим, але посідає перше місце з поширеності серед всіх видів роду *Corylus*. Ареал ліщини звичайної охоплює майже всю Європу, Кавказ і Малу Азію. Вважається, що саме Чорноморська частина Малої Азії була місцем походження ліщини звичайної, адже дана територія характеризується великим розмаїттям форм

ліщини, а Мала Азія, загалом, була джерелом розповсюдження культурної форми ліщини звичайної та інших її різновидів [16].

Класичним методом селекції фундука здавна був добір з природних популяцій. Даним методом створено більшу частину сортів фундука, які наразі використовуються в промисловому виробництві. Більша частина всіх природних популяцій ліщини утворена випадковими схрещуваннями різних особин, чи навіть видів роду *Corylus*. Через це буває дуже складно відрізнити внутривидові гібриди від міжвидових при класифікації сортів фундука, або особин, отриманих з природних популяцій [17,18].

Зокрема, через переважання вегетативного розмноження серед усіх типів розмноження ліщини, окремий напрямок селекційної роботи, що полягає в отриманні рослин, здатних ефективно прищеплюватись до особин стійких до певних хвороб та шкідників, що пошкоджують коріння [16].

Найважливішою метою селекції фундука, як і будь-якої культури, є висока врожайність, тобто маса горіхів, яку можна зібрати з одного гектара кущів фундука. Дана характеристика є одною з основних, оскільки дозволяє підвищити об'єми виробництва при тій самій площі плантації. Крім того, важливою метою селекції фундука є виведення сортів з бажаною формою горіха. Пріоритетною формою горіха при проведенні селекції є кругла. Дана форма має велике промислове значення, оскільки автоматичні засоби обробки горіхів більш ефективні при обробці горіхів саме круглої форми. Іншою, не менш важливою характеристикою є стійкість до підмерзання вегетативних бруньок. Дана ознака забезпечить збереження потенційних гілок при весняних приморозках. Особливе місце посідає стійкість до хвороб, зокрема борошнистої роси і брунькового кліща. Підвищення якості ядра та створення сортів з певними заданими характеристиками плодів також є одним з напрямків селекції. Плоди подібних сортів володіють специфічними характеристиками, що роблять їх придатними до обсмажування, зацукрювання та виготовлення певних кондитерських виробів.

Важливим напрямом селекції є створення самофертильних сортів. Такі

сортів можна вирощувати в насадженнях одного сорту фундука, що забезпечує зручність збирання та обробки. Селекція фундука також працює в напрямку виведення сортів з різними строками збирання врожаю, але з одночасним цвітінням, що забезпечило б перехресне запилення, але дозволило збирати врожай в різний період. Також проводиться селекція сортів фундука, кущі яких не потребують проріджування, що значно зменшує потреби в догляді за рослинами [16,19,20].

Крім загальних, є і специфічні напрями селекції. Зокрема, це отримання сортів, плоди яких мають гладеньке чисте ядро без лусок пеликули, зменшення частки горіхів без ядер, легкість видалення горіха з обгортки. Остання характеристика особливо важлива при проведенні селекції на придатність до збирання за допомогою спеціальних пристроїв. Через це при плануванні майбутніх схрещувань перевагу надають зразкам, що характеризуються раннім досяганням обгортки, що дозволяє горіхам самим вчасно звільнитися від обгортки [20,21].

1.2 ДНК-маркери в молекулярно-генетичному аналізі

Верифікація сортності на основі фенотипового аналізу наразі є методологічно складною через явище епістазу, а також значну частку некодуючих послідовностей у структурі ДНК. Крім того, морфологічні маркери суттєво залежать від стадії розвитку особини та комплексу екологічних факторів, що знижує точність ідентифікації [2].

Альтернативним і більш надійним інструментом є ДНК-маркери – специфічні ділянки геному, здатні до мутацій та варіативності, що дозволяє диференціювати окремі генотипи або алелі в межах популяції. Такі маркери чітко локалізовані в геномі та ідентифікуються за допомогою молекулярних

методів. На відміну від класичних підходів, ДНК-маркери характеризуються високою частотою успадкування, рівномірним розподілом по геному та стабільністю результатів, оскільки вони не піддаються модифікаційній мінливості під впливом навколишнього середовища [2,3].

Застосування молекулярних методів дозволяє виявляти внутрішньопопуляційні варіації та поліморфізм конкретних локусів, що є фундаментальним для побудови генетичних карт, оцінки рівнів експресії та аналізу факторів, що впливають на формування ознак. Впровадження технологій молекулярного маркування в біологічні дослідження сприяло інтенсифікації процесу ідентифікації нових генів (gene discovery), що, своєю чергою, стимулювало розробку інноваційних типів маркерів [2].

Для детекції генетичного поліморфізму традиційно застосовують два базові підходи: блот-гібридизацію за Саузерном та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Використання ПЛР або молекулярної гібридизації у поєднанні з різними видами електрофорезу: в агарозних гелях, в поліакріламідних гелях (ПААГ) або капілярним електрофорезом, дозволяє достатньо точно аналізувати варіабельність ДНК. Окрім класичних методів, стрімкий розвиток технологій секвенування нового покоління (NGS) відкриває можливості для аналізу поліморфізму безпосередньо через розшифрування нуклеотидних послідовностей [3].

У сучасній генетиці молекулярні маркери класифікують за декількома критеріями: за типом успадкування (домінантні або кодомінантні), за методологією виявлення (гібридизаційні або засновані на ПЛР) та за місцем локалізації в клітині, а саме в ядерному чи органельному геномі [4].

1.2.1 Молекулярні маркери першого покоління. Серед маркерних систем, що базуються на принципах молекулярної гібридизації ДНК, особливе

місце посідає аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Цей метод дозволяє опосередковано ідентифікувати мутації, локалізовані у специфічних коротких ділянках геному – сайтах рестрикції. Методологічна основа підходу полягає у розщепленні геномної ДНК ендонуклеазами рестрикції – ферментами, що розрізають ланцюг ДНК у сайтах розпізнавання з певною нуклеотидною послідовністю. Оскільки такі сайти не асоційовані з конкретним типом генів і розподілені по всьому геному випадковим чином, розщеплення ДНК рестриктазами призводить до утворення набору фрагментів різної довжини [4,22].

Відмінності у відстані між сайтами розпізнавання конкретної ендонуклеази у двох різних організмів зумовлюють варіативність довжини фрагментів, що утворюються. Отримані профілі (моделі рестрикції) слугують надійним інструментом для диференціації не лише біологічних видів, а й окремих штамів. Основними чинниками виникнення такого поліморфізму є генетичні перебудови: мутації, делеції, інверсії, транслокації та транспозиції. Ці процеси спричиняють появу нових або втрату наявних сайтів розпізнавання, що безпосередньо трансформується у варіабельність довжини фрагментів. Слід зазначити, що навіть одинична заміна пари основ у межах сайту розпізнавання робить його недоступним для розрізання ферментом. У випадках, коли така точкова мутація присутня лише в одній із гомологічних хромосом, маркер класифікується як гетерозиготний, оскільки на електрофореграмі візуалізуються смуги обох типів [2,4,23].

Технологія випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD) базується на ПЛР-ампліфікації геномних локусів із використанням єдиного короткого (зазвичай 10 нуклеотидів) праймера з довільною послідовністю. Процес синтезу фрагментів відбувається за умови наявності в геномі двох сайтів гібридизації, що мають ідентичну або близьку послідовність і розташовані в інвертованій орієнтації один до одного. Спектр та розмір ампліфікованих ділянок безпосередньо залежать від структурних особливостей досліджуваного геному.

Важливою вимогою до побудови праймерів є вміст GC-пар на рівні не менше 40%, оскільки за меншого показника нуклеотидний дуплекс може бути термічно нестабільним при температурі елонгації (72°C). Візуалізація результатів RAPD-аналізу здійснюється шляхом електрофоретичного розділення продуктів у агарозному гелі з подальшим забарвленням бромистим етидієм [4].

Обмеження, характерні для RAPD та ПДРФ, були значною мірою подолані завдяки впровадженню методу поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP). Даний підхід поєднує особливості рестрикційного аналізу та ПЛР, передбачаючи попереднє ферментативне розщеплення ДНК перед етапом ампліфікації. AFLP є простим у застосуванні, оскільки не потребує попередньої інформації про нуклеотидну послідовність досліджуваного генома. Для аналізу можна використовувати як нативну, так і частково деградовану ДНК, проте критично важливою є відсутність у зразках інгібіторів ПЛР або сторонніх рестриктаз [4].

Метод AFLP базується на використанні двох типів ендонуклеаз рестрикції: часто ріжучої (frequent cutter) та рідко ріжучої (rare cutter). Отримані в результаті рестрикції фрагменти лігують зі специфічними адаптерами – короткими синтетичними олігонуклеотидами. Ці адаптери слугують місцем гібридизації для праймерів, що дозволяє селективно ампліфікувати лише ті фрагменти, які мають на своїх кінцях сайти розпізнавання обох використаних рестриктаз. Дизайн праймерів базується на відомих послідовностях адаптерів та прилеглих до них фермент-специфічних ділянок. Фракціонування продуктів проводять за допомогою електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелях з наступною візуалізацією забарвлення нітратом срібла або методом авторентгенографії у разі використання мічених праймерів [4].

Мікросателіти, відомі також як прості тандемні повтори (SSR), становлять собою тандемно повторювані мотиви розміром від одного до шести нуклеотидів. Ці елементи у великій кількості представлені в геномах найрізноманітніших таксонів, та поширені як у ядерній ДНК, так і в генетичному матеріалі

хлоропластів і мітохондрій. Високий рівень поліморфізму SSR-локусів зумовлений варіативністю кількості повторів у певній області геному, що легко ідентифікується за допомогою ПЛР. SSR-маркери характеризуються високою відтворюваністю результатів, значною щільністю розташування в геномі та, як правило, домінантним або кодомінантним типом успадкування. [2,4].

Специфічним різновидом мікросателітних маркерів є мікросателіти хлоропластної ДНК (cpSSR). Хоча хлоропластний геном характеризується відносно повільним темпом молекулярної еволюції, що може ускладнювати виявлення достатнього рівня варіацій, cpSSR вирізняються зручністю генотипування і тому широко застосовуються у популяційно-генетичних дослідженнях. Зазвичай cpSSR представлені мононуклеотидними тандемними повторами з числом копій від 8 до 15, розташованими переважно в некодуючих міжгенних ділянках хлоропластного геному, де варіабельність числа повторів і формує спостережуваний поліморфізм. Рівень мінливості cpSSR суттєво залежить від конкретного виду та локусу.

Від ядерних мікросателітів cpSSR відрізняються двома ключовими ознаками. По-перше, хлоропласти мають уніпарентальне, у більшості покритонасінних материнське, успадкування, завдяки чому cpSSR відображають виключно материнську лінію передачі генетичної інформації. По-друге, хлоропластна хромосома не бере участі у мейотичній рекомбінації, через що всі її SSR-локуси є генетично зчепленими і успадковуються як єдиний нерекomboнований блок, відображаючи одну лінію еволюційної історії. Як наслідок, ефективний розмір популяції для хлоропластного геному є значно меншим порівняно з ядерним, що підвищує чутливість cpSSR до таких популяційних процесів, як генетичний дрейф між популяціями. Материнський тип успадкування також відкриває можливість встановлення напрямку міжвидової гібридизації: хлоропластний гаплотип гібридної особини однозначно вказує на материнську особину. Завдяки цим властивостям cpSSR є ефективним

доповненням до ядерних маркерів у дослідженнях філогеографії, популяційної генетики та селекції рослин. [24].

Також у генетичному аналізі використовують мікросателіти мітохондріальної ДНК (mtSSR). Мітохондріальний геном рослин вирізняється значною динамічністю: його розмір варіює в межах 200–2500 тис. пар нуклеотидів а структура включає численні повторювані елементи та інтрони. Рослинна мтДНК, яка існує у вигляді групи кільцевих хромосом різного розміру, на відміну від тваринної має більші розміри і характеризується молекулярною гетерогенністю. Проте через дуже низьку швидкість еволюції мітохондріальних послідовностей, застосування mtSSR у популяційній генетиці наразі є досить обмеженим [4].

Для подолання недоліків окремих методів – зокрема високої трудомісткості розробки SSR та відносно низького рівня поліморфізму RAPD – було запропоновано систему RAMP (випадково ампліфікований мікросателітний поліморфізм). Ця гібридна технологія передбачає використання SSR-праймера для ампліфікації геномної ДНК як самостійно, так і в комбінації з RAPD-праймерами. Продукти реакції розділяють за допомогою агарозного електрофорезу. Важливою перевагою RAMP є вища температура відпалу (на 10–15 °C вища порівняно з RAPD), що забезпечує стабільніший та ефективніший відпал гібридизованого праймера. Маркери RAMP є економічно вигідними, характеризуються високим рівнем поліморфізму та охоплюють значні ділянки геному. Однак, попри високий рівень поліморфізму, який забезпечували RAMP-маркери на початкових етапах досліджень, вони поступово були витіснені більш стабільними ISSR-маркерами через низьку відтворюваність результатів та складність синхронізації температурних режимів для праймерів різної природи [3,4].

Метод ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) базується на ПЛР-ампліфікації ділянок ДНК, що розташовані між двома ідентичними мікросателітними локусами, які мають протилежну орієнтацію. У цій техніці застосовуються

спеціалізовані праймери довжиною від 15 до 30 нуклеотидів, що складаються з тандемних повторів. Такі олігонуклеотиди можуть бути як вільними, так і «якірними» (anchored) – тобто закріпленими на 3'- або 5'-кінці за допомогою 1–4 вироджених основ, які забезпечують точне зв'язування з фланкуючими послідовностями геному [3,4].

Завдяки більшій довжині праймерів, метод ISSR дозволяє встановлювати високу температуру відпалу (в діапазоні 45–60 °C), що суттєво підвищує специфічність реакції. Продукти ампліфікації зазвичай мають довжину від 200 до 2000 пар нуклеотидів, а їхня детекція здійснюється шляхом електрофоретичного розділення в агарозному або поліакриламідному гелях. Порівняно з RAPD-аналізом, методика ISSR відрізняється кращою відтворюваністю результатів і так само не потребує інформації про нуклеотидну послідовність досліджуваного геному, оскільки базується на використанні універсальних мікросателітних мотивів [3,4].

Маркерні системи на основі мікросателітів на сьогодні залишаються одними з найбільш поширених методів молекулярно-генетичного аналізу рослин. Їхня популярність зумовлена передусім високою насиченістю в геномах, значним рівнем поліморфізму та відносною доступністю аналізу. При цьому саме SSR-маркери досі посідають провідне місце і вважаються «золотим стандартом» у генотипуванні завдяки високій відтворюваності результатів, що дозволяє отримувати уніфіковані дані, придатні для порівняння в межах широких міжнародних дослідницьких проєктів та селекційних програм [4,25].

Тривалий час широкому впровадженню SSR-маркерів у практику перешкоджала необхідність попередньої ідентифікації відповідних локусів із простими повторами, що вимагало значних часових і ресурсних витрат на клонування та скринінг геномних бібліотек. З розвитком технологій сиквенування нового покоління (NGS) ця проблема значною мірою втратила актуальність. Масове сиквенування геномів надає можливість ідентифікувати тисячі потенційних SSR-локусів *in silico*, суттєво прискорюючи розробку нових

маркерних систем для будь-якого виду. Разом з тим метод SSR-аналізу не є повністю універсальним з точки зору технічної доступності: проведення фрагментного аналізу потребує флуоресцентно мічених праймерів та спеціалізованого обладнання для розділення і детекції продуктів ампліфікації, що обмежує його застосування у лабораторіях із недостатнім технічним оснащенням. Саме ця обставина стимулює пошук альтернативних маркерних систем, здатних забезпечити порівнянний рівень інформативності за менших технічних вимог. [4,25].

1.2.2 Молекулярні маркери на основі мобільних генетичних елементів.

Окрім мікросателітних локусів, ефективним інструментом молекулярно-генетичного аналізу є методи, які ґрунтуються на широкому розповсюдженні в геномі рослин мобільних генетичних елементів МГЕ. Згідно з класифікацією, МГЕ поділяють на два класи. До I класу належать ретроелементи (ретротранспозони), в результаті кожного переміщення яких в геномі утворюється нова копія елемента, а вихідна зберігається в початковому локусі. II клас складають ДНК-транспозони, переміщення яких відбувається за принципом вирізання і наступної вставки в новому положенні [26].

Ретротранспозони, своєю чергою, поділяють на два підкласи залежно від особливостей їхньої структури та циклу реплікації. За ознакою наявності довгих кінцевих повторів (LTR) їх поділяють на не-LTR елементи, до яких належать LINE (довгі дисперговані ядерні елементи) та SINE (короткі дисперговані ядерні елементи), а також власне LTR-ретротранспозони. Ретротранспозони складають невід'ємну та домінуючу частку повторюваної ДНК у рослинних геномах, що зумовлено їхньою здатністю до постійної експансії та вбудовування нових копій через РНК-посередник. Завдяки тому, що під час переміщення ретротранспозону повторна інтеграція в один і той самий локус відбувається вкрай рідко. Тому ці мобільні елементи розподіляються по геному відносно гомогенно і слугують надійним джерелом генетичних маркерів [7]. У багатьох важливих сільськогосподарських культур частка LTR-ретротранспозонів може становити

від 40% до 70% усього обсягу ядерної ДНК. Така надзвичайно висока копійність у поєднанні з рівномірним розподілом в геномі робить їх ідеальним об'єктом для розробки та впровадження високоефективних систем молекулярного маркування [2,4,6,27].

Одним з поширених методів, оснований на використанні ретротранспозонів, є IRAP-аналіз (inter-retrotransposons amplified polymorphism). Ця методика передбачає ампліфікацію ділянок, розташованих між двома сусідніми LTR-ретротранспозонами, із використанням праймерів, комплементарних до 3'-кінцевих послідовностей LTR. Можливі три типи орієнтації сусідніх LTR-елементів: 1) «хвіст–хвіст», 2) «голова–голова» та 3) «голова–хвіст». Для аналізу конфігурації «голова до хвоста» застосовують комбінацію 5'- та 3'-праймерів, тоді як для інших типів орієнтації можливе використання одного типу праймера. В результаті ПЛР з IRAP-праймерами утворюється значна кількість ампліконів розміром 300-3000 п.н., що забезпечує високу інформативність методу [2,4].

Іншим підходом є метод RBIP-аналізу (retrotransposon-based insertion polymorphism). У цьому методі для ПЛР використовують праймери, які компліментарні фланкуючим 3'- та 5'-ділянкам сайту вставки (інсерції) ретротранспозона. Виявлення інсерції забезпечується використанням додаткового праймера на основі LTR-послідовності. Слід зазначити, що техніка RBIP вимагає попереднього знання послідовностей, що оточують сайти вставки, і зазвичай спрямована на типізацію окремих локусів, що відрізняє її від інших мультилокусних систем на основі ретротранспозонів. Для фракціонування продуктів ПЛР в даному методі використовують агарозний електрофорез [4].

Незважаючи на значний потенціал, створення ефективних маркерних систем на основі ретротранспозонів тривалий час стримувала потреба точної інформації про нуклеотидну послідовність ділянок, які представлені в транспозонах з достатньою частотою. Традиційні методи вирішення цієї проблеми базувалися на ампліфікації ділянок із використанням специфічних

праймерів до консервативних доменів поліпротеїнів (інтегрази або зворотної транскриптази) з подальшим визначенням послідовностей LTR-кінців методом «прогулянки по геному» (genome walking). Проте такий підхід є надзвичайно трудомістким через значну відстань між консервативними доменами та LTR, а також через необхідність розшифрування послідовності обох кінців термінальних повторів [4,6,7,28–30].

1.2.2.1. *iPBS* маркери. Ефективним розв'язанням вартісної проблеми, пов'язаної з необхідністю детального вивчення нуклеотидних послідовностей ретротранспозонів для кожного окремого виду, стало впровадження системи *iPBS*-маркерів (inter-Primer Binding Site). Оскільки традиційні підходи до створення специфічних маркерів вимагають складних процедур клонування та сиквенування термінальних повторів, виникла потреба в універсальній методиці, яку можна було б застосувати до різних об'єктів, незалежно від наявності інформації про послідовність геному. *iPBS*-аналіз став саме таким методом швидкого та високоінформативного генетичного аналізу, в якому використано значну еволюційну консервативність механізмів реплікації ретротранспозонів [7].

Фундаментальною особливістю LTR-ретротранспозонів, яка ріднить їх із ретровірусами, є використання клітинних тРНК як праймера для початку процесу зворотної транскрипції. Це відбувається у специфічних точках – сайтах зв'язування праймера (PBS), які розташовані поруч із 5'-кінцем довгих термінальних повторів. Саме повсюдність цих консервативних сайтів стала основою для розробки методу *iPBS* (inter-Primer Binding Site). На відміну від багатьох інших систем молекулярного маркування, *iPBS*-аналіз не потребує попередніх знань про послідовність геному конкретного виду, оскільки базується на використанні універсальних праймерів, комплементарних до сайтів PBS [7,27].

Це забезпечує методу значні переваги у порівнянні з традиційними ретротранспозонними маркерами: він має високу роздільну здатність і дозволяє

диференціювати навіть близькоспоріднені генотипи. Недоліком даних маркерів є низька відтворюваність, однак її можливо підвищити завдяки використанню жорсткішого температурного режиму на етапі гаїбридизації праймерів, що зменшує помилки під час ампліфікації [31,32].

Цей метод також відрізняється від попередніх маркерів на основі ретротранспозонів тим, що його можна застосовувати не лише до ендегенних ретровірусів, а й до ретротранспозонів типів Gypsy та Copia [31,33].

Для ампліфікації ПЛР-продукту з використанням іPBS-праймерів необхідно, щоб ретротранспозони знаходилися на невеликій відстані та мали антипаралельну орієнтацію або були вбудовані один в одний. В ході ПЛР праймери гібридизуються з відповідними PBS-сайтами у складі транспозонів, після чого утворюється продукт ампліфікації, який охоплює ці регуляторні послідовності разом із ділянкою геному між ними, як показано на рис.1.1.

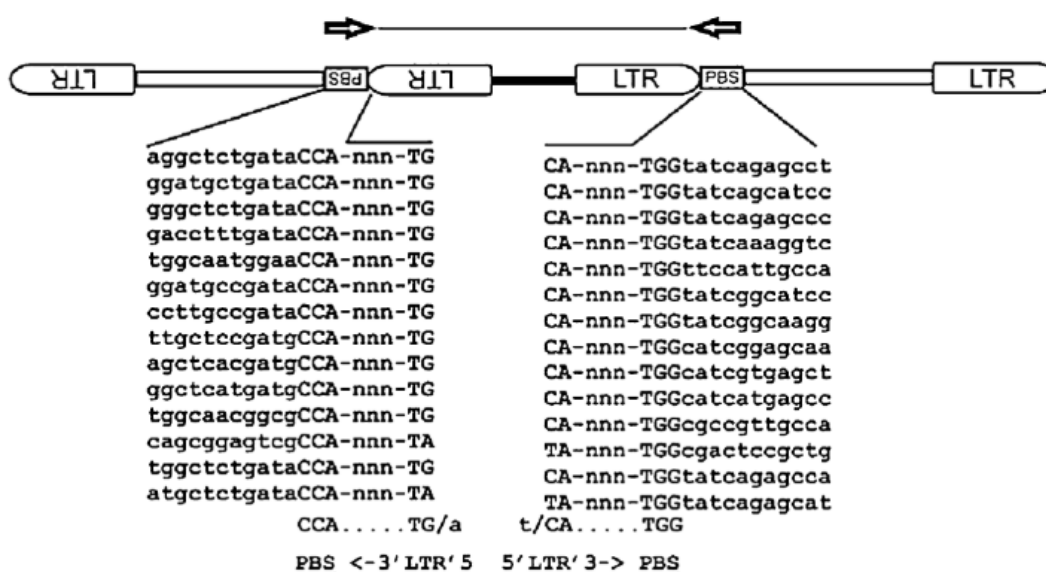


Рис 1.1 Схематичне зображення продуктів ампліфікації, які утворюються з іPBS-праймерами [7]: ділянку між двома МГЕ виділено потовщеною лінією, очікуваний амплікон – тонкою, а стрілки вказують на орієнтацію іPBS-праймерів

Ефективність іPBS-маркерів як інструменту для сортової ідентифікації та верифікації генотипів була підтверджена у низці досліджень на різних

рослинних об'єктах. Зокрема, результати застосування методу для молекулярно-генетичного аналізу картоплі показали його беззаперечну придатність для точного розрізнення сортів, що є критично важливим для сертифікації та захисту прав інтелектуальної власності [34].

Висока інформативність маркерної системи iPBS була також доведена при вивченні генетичного різноманіття гуави. У дослідженні 100 популяцій гуави з використанням всього шести iPBS-маркерів було отримано 113 смуг, в яких відсоток поліморфних смуг варіював від 52.38 до 100%, що забезпечило чітку диференціацію досліджених генотипів [35].

Аналогічні результати, які підтверджують високу чутливість методу, були отримані при аналізі філогенетичної спорідненості диких та культурних представників гуави (*Psidium*). Використання iPBS-маркерів дозволило згрупувати 70 зразків у кластери, структура яких повністю відповідала їхньому генетичному походженню та чинній таксономічній класифікації. Завдяки високій чутливості цієї системи вдалося успішно відрізнити 64 культурні зразки *P. guajava* від видів дикої флори не лише на родовому (*P. cattleianum*), а й на видовому рівнях (*A. sellowiana*; *U. myricoides*). Таким чином, значний рівень інформативності методу iPBS підтверджує його перспективність для глибокого вивчення біорізноманіття та встановлення еволюційних зв'язків у межах різних родів і видів рослин [36].

1.2.3 Молекулярні маркери в селекції фундука. Як і більшість деревних рослин, ліщина має тривалий цикл розвитку (до 8 років для досягнення повної продуктивності), водночас для неї властива спорофітна самонесумісність, тобто генетично подібні особини не здатні запилювати одна одну. Ці фактори надзвичайно ускладнюють відбір багатьох важливих ознак за допомогою класичних підходів селекції. Таким чином, геномні дані, які дозволяють ідентифікувати та виділити багато генетичних локусів одночасно, мають величезний потенціал для прискорення досліджень з селекції фундука [37,38].

На початку, методи ДНК-аналізу застосовували для генетичної характеристики різних видів ліщини. Зокрема було проведено дослідження філогенетичних взаємовідносин представників роду *Corylus*, шляхом аналізу послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера (ВТС) ядерних генів рибосомних РНК. Було проаналізовано 29 генотипів 12-ти видів ліщини. ВТС-фрагмент довжиною 666 п.н. містив 22 ділянки, які були інформативними для еволюційних досліджень. За результатами аналізу види *Corylus* вдалося розділити на кілька добре окреслених клад, які загалом відповідали морфологічній класифікації та даним міжвидових гібридизацій [39].

У дослідженні історії розповсюдження *C. avellana* було застосовано хлоропластні молекулярні маркери різних типів, зокрема ПЛР-ПДРФ, хлоропластні мікросателіти та сиквенування ділянки *matK*, що дозволило оцінити просторову структуру генетичної мінливості виду в масштабах усього європейського ареалу. Аналіз 248 індивідів із 26 природних популяцій показав надзвичайно низьку мінливість хпДНК, тоді як за використання трьох поліморфних хлоропластних SSR-локусів було виділено сім гаплотипів і виявлено чітку філогеографічну диференціацію між південно-східною (Італія та Балкани) та північно-західною частинами ареалу [40].

Перші цілеспрямовані дослідження з використання молекулярних маркерів у селекції фундука були проведені в Університеті штату Орегон і були зосереджені на вивченні генетичної основи стійкості до фітофторозу фундука (EFB). Встановлено, що ця ознака контролюється домінантним алелем одного локусу, ідентифікованого у сорту Gasaway. З метою клонування відповідного гена було створено картувальну популяцію з 138 сіянців, отриманих від схрещування OSU 252.146 × OSU 414.062, які розділяли за ознакою стійкості [41].

На основі цієї популяції було побудовано першу генетичну карту, на якій локус самонесумісності (S) та ген стійкості до EFB у сорту Gasaway було локалізовано у групах зчеплення LG5 та LG6 відповідно. Надалі карта поступово

уточнювалася і розширювалася, що зрештою дозволило створити для обох батьківських форм генетичні карти, насичені молекулярними маркерами. Карта материнської рослини включала понад 270 SSR і RAPD-маркерів та 1741 SNP, тоді як карта батьківської рослини містила 199 SSR/RAPD-маркерів і 1468 SNP. Такий рівень насиченості значно підвищив роздільну здатність картування та створив передумови для точнішої локалізації гена стійкості. [1,41,42].

Паралельно з генетичним картуванням було ініційовано фізичне картування регіону стійкості методом «прогулянки по хромосомі» з використанням праймерів, розроблених на основі RAPD-маркерів, зчеплених з ознакою стійкості до EFB. Було побудовано високоточну фізико-генетичну карту регіону стійкості, яка включала 51 маркер та проведено анотацію кодувальних послідовностей дали змогу ідентифікувати 233 потенційні гени, з яких кілька було віднесено до родин Р-іоор-нуклеозидтрифосфатгідролаз (НТФаз) та білків F-box, залучених до механізмів стійкості рослин до хвороб. У результаті подальшого аналізу регіон стійкості до EFB було звужено до одного ВАС-клону, у межах якого п'ять генів мали повну відповідність транскриптомним даним. На цій основі було створено 44 нові ДНК-маркери, тісно зчеплені з геном стійкості до EFB. Водночас автори наголошують, що остаточне підтвердження функціональної ролі цих генів потребує додаткових досліджень, зокрема аналізу експресії та тестів комплементції [43].

Komaei Koma et al. (2021) розробили 42 нових SSR-маркери для геномної ділянки стійкості до збудника EFB на групі зчеплення LG6 фундука, дев'ять із яких були картовані безпосередньо в регіоні стійкості. Також проведено детальний генетичний аналіз нових джерел стійкості серед зразків фундука, що походять переважно зі Східної Європи та Чорноморського басейну. Дослідниками було встановлено, що виявлена у східноєвропейських зразках стійкість контролюється одиничними домінантними генами. Важливо, що ці локуси розташовані в тій же геномній ділянці, що й класичний ген стійкості сорту Gasaway, проте вони походять від відмінних філогенетичних ліній, що

забезпечує додаткове генетичне різноманіття для селекції. Результатом роботи стало виявлення набору високоінформативних SSR-маркерів (зокрема B610, B609 та B611), які характеризуються тісним зчепленням з алелями стійкості [44].

Для оцінки генетичних взаємин та ідентифікації сортів фундука, крім маркерів RAPD, також широко застосовувалися домінантні маркерні системи ISSR та AFLP. У дослідженні 18 сортів *C. avellana* турецького походження з використанням 25 RAPD-праймерів, 25 ISSR-праймерів і 8 AFLP-комбінацій було отримано загалом 434 поліморфні маркерні локуси, що забезпечило повну диференціацію всіх досліджених генотипів. Крім того, для 10 сортів було ідентифіковано специфічні маркерні фрагменти, що підтвердило можливість використання RAPD, ISSR та AFLP для сортової ідентифікації та аналізу генетичного різноманіття ліщини [45].

Використання спільного набору SSR-маркерів дало змогу зіставити генетичні карти, отримані для різних популяцій фундука. Зокрема, карти для схрещування Tonda Gentile delle Langhe $\times$ Hall's Giant, а також для потомства з півдня Росії, що сегрегує за стійкістю до EFB, були узгоджені з референтною картою OSU 252.146 $\times$ OSU 414.062. Це підтвердило стабільність положення ключових локусів у різних генетичних фонах і розширило можливості порівняльного аналізу [1,46].

Окрім генів стійкості, на основі цих же популяцій було проведено QTL-аналіз низки вегетативних та репродуктивних ознак. Зокрема, ідентифіковано QTL-локус, тісно пов'язаний з термінами розпускання вегетативних бруньок, а також отримано попередні дані щодо генетичного контролю часу цвітіння та характеристик горіха і ядра. Для цих досліджень було побудовано насичені карти обох батьківських форм із використанням приблизно 1200 SNP та набору SSR-маркерів для ідентифікації груп зчеплення [1,46].

Першу спробу асоціативного картування ліщини здійснили Öztürk et al. (2017) на 54 дикорослих зразках і 48 сортах із словенської національної колекції ліщини з використанням маркерів AFLP і SSR. Фенотипові та молекулярні дані

були узагальнені для ідентифікації маркерів, пов'язаних із ознаками. Отримані результати дозволили виявити 49 маркерів SSR, значною мірою пов'язаних із властивостями горіхів. Подальша робота з асоціативного картування була проведена для визначення генетичного контролю 44 агроморфологічних ознак і 25 ознак горіхів у 390 рослин *C. avellana* з усього чорноморського регіону Туреччини [1,47–49].

Сиквенування геному та транскриптому американського сорту «Jefferson», разом з даними повторного сиквенування з семи інших сортів заклало початок розробці маркерів для ліщини *in silico* [50]. Послідовності транскриптомів також були отримані для двох видів дикого фундука, *Corylus heterophylla* та *Corylus mandshurica* [51]. Для культурних сортів *C. avellana* також розроблена карта генетичного зчеплення, яка була покращена шляхом використання маркерів SSR, розроблених на базі двох геномних бібліотек та доступних даних сиквенування геномів і транскриптомів різних видів ліщини. Крім того, з використанням часткового сиквенування геному, були розроблені маркери SSR для характеристики відмінностей між турецькими та європейськими сортами фундука [37,52].

Сиквенування геному *C. avellana* та створення численних генетичних бібліотек дозволило створити ще більше ДНК-маркерів, використання яких потребувало знань про послідовність, що забезпечило основу для ідентифікації важливих генів, у тому числі пов'язаних з якістю горіхів, ознаками стійкості до хвороб та багатьма іншими. Серед досліджених зразків було виявлено низку нових генотипів, стійких до ЕФВ. Це дозволило розробити специфічні ДНК-маркери, зчеплені з ознакою стійкості, для подальшого впровадження маркер-орієнтованої селекції фундука. [53].

Важливим етапом розвитку молекулярного типування фундука стало створення функціональних EST-SSR маркерів на основі транскриптомних даних родини Betulaceae. У результаті аналізу 38454 EST-послідовностей з бази даних NCBI було ідентифіковано 1282 унікальні послідовності EST-SSR. На основі цих

даних було розроблено 119 пар праймерів, частина з яких забезпечувала стабільну ампліфікацію 36 EST-SSR локусів у зразках *C. avellana*. Подальший аналіз цих локусів у 18 сортах фундука виявив 20 поліморфних EST-SSR. Частина цих маркерів виявилася придатною для побудови генетичних карт в межах роду *Corylus*, що суттєво розширило наявний набір молекулярних маркерів для генетичних досліджень та селекції фундука [54].

1.2.3.1. Розробка SSR маркерів для фундука. Історія розробки мікросателітних маркерів для фундука розпочалася наприкінці двадцятого століття, коли були побудовані перші мікросателітні бібліотеки: одну бібліотеку тринуклеотидних повторів (GAA) та дві бібліотеки динуклеотидних повторів (CA, GA). На основі цих бібліотек італійськими дослідниками були створені праймери до 51 маркерного локусу SSR [55]. У подальшому значний внесок у розвиток цього напрямку зробили науковці Університету штату Орегон (OSU) та Університету Турину, що сприяло широкому впровадженню маркерів у фундаментальну та прикладну фітопатологію та селекцію [41,56].

Завдяки високій щільності та відносно рівномірному розподілу по геному, SSR-маркери стали ключовим інструментом для паспортизації сортів та підтримки селекційних програм. Їхня практична ефективність була багаторазово підтверджена у дослідженнях з оцінки генетичного різноманіття ліщини [55,57–65]. Окрім загального аналізу, мікросателіти дозволяють успішно вирішувати завдання ідентифікації синонімів та гомонімів у колекціях зародкової плазми [1,56,66], аналізу генетичних зв'язків та походження конкретних сортів [52,67–70], а також вивчення структури популяцій через порівняння диких генотипів із місцевими сортами [71,72]. Крім цього, SSR-локуси широко використовуються для побудови генетичних карт і проведення асоціативного аналізу [47,73].

Станом на сьогодні, використання SSR-локусів у світі стає дедалі розповсюдженим. Європейські дослідники застосували 16 локусів для ідентифікації 78 італійських та 18 іспанських сортів фундука [66]. В роботі [52] використали 21 локус для аналізу 270 зразків з колекції Орегону. В іншій роботі

[74] дослідили 29 сортів каліфорнійської колекції за допомогою 12 локусів. Важливим кроком стало розміщення 30 таких локусів на карті зчеплення, побудованій на основі RAPD-маркерів [41,56]. Для виявлення простих повторів використовують не лише послідовності SSR, а й ISSR [75], отримані з транскриптомів та повногеномних послідовностей. Загалом розроблено близько 720 SSR-маркерів, з яких понад 430 інтегровано до референсної генетичної карти. Ці ресурси активно використовують для аналізу родоводів, маркер-опосередкованої селекції (MAS) та локалізації локусів кількісних ознак (QTL), що було показано у роботі Beltramo et al. (2016) при визначенні QTL вегетативних ознак [13,76].

Паралельно з ядерними мікросателітними маркерами, надзвичайно корисними для вивчення еволюційного розвитку ліщини виявилися хлоропластні SSR. Вони дозволили простежити генетичну динаміку виду з часів останнього льодовикового періоду. Встановлено, що найпоширеніший у Центральній та Північній Європі хлоропластний гаплотип А, ймовірно, мігрував із Піренеїв. Висока різноманітність хлоропластів у південній Італії, на Балканах та в Португалії дає підстави вважати, що *C. avellana* мала три основні центри одомашнення: Середземномор'я, Туреччину та Іран. При цьому найбільша видова різноманітність роду *Corylus* спостерігається в Азії, зокрема на території Китаю [13].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Рослинний матеріал

Для виконання дисертаційного дослідження використано 30 зразків фундука (*Corylus spp.*), до числа яких увійшли 25 рослин сортів фундука української селекції та 5 рослин трьох видів ліщини *C. avellana*, *C. colurna* та *C. chinensis*, наданих Національним дендрологічним парком «Софіївка» НАН України (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Культурні сорти фундука і рослини роду *Corylus* із колекції НДП «Софіївка»
НАН України

№	Вид / сорт	№	Вид / сорт
1	<i>C. avellana</i> f. <i>fuscorubra</i>	16	Шедевр
2	<i>C. chinensis</i>	17	Грандіозний
3	<i>C. colurna</i>	18	Бадіус
4	Софіївський 15	19	Дохідний
5	Гарібальді	20	Фундук 85
6	Софіївський 1	21	Перемога 74
7	Софіївський 2	22	Лозівський булавовидний
8	Дар Павленка	23	Пиріжок
9	Україна - 50	24	Жовтневий
10	Черкеський 2	25	Фундук 45
11	Лозівський шаровидний	26	Дарунок юнатам
12	Корончастий	27	Свічковий
13	Морозівський	28	Трапезунд
14	Гордієнко	29	<i>C. avellana</i>
15	Караманівський	30	<i>C. avellana</i>

Для виділення геномної ДНК та подальшого ПЛР-аналізу відбирали молоді листки діаметром 3–5 см із молодих пагонів у весняний період. Зібране листя поміщали в паперові конверти, які розкладали у поліетиленові пакети з силікагелем із розрахунку 2–3 столові ложки гігроскопічних гранул на 3 г листя. В один пакет закладали по 5–10 конвертів залежно від кількості наявного матеріалу. Насиченість силікагелю вологою контролювали візуально за зміною кольору гранул від синього до рожевого; за необхідності силікагель замінювали. Як альтернативний спосіб, листя висушували в умовах лабораторного приміщення за температури 25–27 °C на горизонтальній поверхні.

2.2 Реактиви, розчини та обладнання

1. Для виділення ДНК:

- розчин РНКаз А (10 мг/мл) (2.2.1.1);
- 70% та 96% водний розчин етилового спирту;
- ізопропіловий спирт;
- 4 М NaCl;
- суміш хлороформ : ізоаміловий спирт (24:1) (2.2.1.2);
- 1 М Трис-HCl (pH 8,0);
- 1 мМ ЕДТА (pH 8,0);
- буфер ЦТАБ (2.2.1.3): 2% ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 20 мМ ЕДТА, 100 мМ Трис-HCl pH 8,0;
- ТЕ-буфер (для розчинення ДНК) (2.2.1.4): 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЕДТА;
- буфер для відмивання (2.2.1.5) [77]: 52% етанол, 10 мМ Tris-HCl pH 8.0, 125 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА;

– TNE-буфер (для видалення полісахаридів) (2.2.1.6): 1M Тріс, 5M NaCl, 0,5M EDTA.

2. Для проведення ПЛР:

- Taq-ДНК-полімераза (Thermo Fisher Scientific);
- суміш дНТФ (по 2,5 мМ кожного дНТФ);
- 25 мМ водний розчин $MgCl_2$;
- 10×Taq-буфер (Thermo Fisher Scientific): 750 мМ Тріс-HCl, 200 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Tween 20;
- олігонуклеотидні праймери та праймери, флуоресцентно мічені індодикарбоціаніном (Cy5) (концентрація праймерів наведена в *табл. 2.2*).

3. Для електрофоретичного фракціонування ДНК в агарозному гелі:

- агароза (Sigma, США);
- 20× SB-буфер: 0,1 М $Na_2B_4O_7$ рН 8,5 (2.2.3.1);
- 10 мг/мл водний розчин бромистого етидію (2.2.3.1);
- 6× буфер для нанесення зразків у гель на основі деіонізованої води: 0,25 % бромфеноловий синій, 30 % об. гліцерин (2.2.3.3);
- 1,0-2,0 % агарозний гель на основі 1× SB-буфера.

4. Для електрофоретичного фракціонування ДНК в поліакриламідному гелі:

- 8% поліакриламідний гель: акриламід : бісакриламід (24:1), 0,6×TBE-буфер, 7 М сечовини;
- буфер для нанесення зразків: 95% формамід, 5 мг/л декстран синій (2.2.4.1);

5. Для виділення фрагментів ДНК з гелю та клонування:

- набір реагентів для очищення ДНК Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific);
- вектор pGEM-T;
- 10× буфер для ДНК-лігази;
- поліетиленгліколь (ПЕГ);
- 50 мкг/мл водний розчин ампіциліну;

- 12,5 мкг/мл водний розчин тетрацикліну;
- Т4 ДНК-лігаза (Thermo Scientific);
- клітини *Escherichia coli* штаму XL1-Blue;
- живильне середовище Лурія-Бертані (LB): 10 г/л бакто-триптон, 5 г/л бакто-дріжджовий екстракт, 10 г/л NaCl (2.2.5.1);
- LB-агар: 10 г/л бакто-триптон, 5 г/л бакто-дріжджовий екстракт, 10 г/л NaCl 15г/л агароза (2.2.5.2);
- 20 мг/мл X-Gal (5-бром-4-хлор-3-індоліл-β-D-галактопіранозид) (2.2.5.3);
- 20 мг/мл IPTG (ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид) (2.2.5.4);
- 50 мМ буфер для приготування компетентних клітин CaCl₂ + Трис-HCl (рН 8,0) (2.2.5.5).

6. Для виділення плазмідної ДНК з культури бактерій:

- 3 М ацетат калію, рН 4,8;
- розчин I (50 мМ глюкоза, 25 мМ Трис-HCl, рН 8,0, 10 мМ ЕДТА) (2.2.6.1);
- розчин II (0,2 М NaOH, 1% SDS) (2.2.6.2);

7. Програмне забезпечення для аналізу даних: Unipro Ugene; GeneDoc; GenAlEx 6.5 [78]; Fragment Manager v.2.1 (Pharmacia Biotech); MEGA 6 [79]; Totallab TL120 v2008 (Nonlinear Dynamics Ltd.); Open Source Statistics for Public Health [80]; BLAST [81].

8. Обладнання: термоциклер 5PRIMEG (Techne), автоматичний сиквенатор з лазерним флуориметром ALF Express II (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.), спектрофотометр NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), центрифуга MiniSpin Plus (Eppendorf), УФ-трансілюмінатор (302 нм), камера для горизонтального електрофорезу, джерело постійного струму, термостат, шейкер-інкубатор, кельвінатор (–70 °C), холодильник, персональний комп'ютер.

Використано реактиви та ферменти компаній «Sigma», «Thermo Fisher Scientific», а також реактиви вітчизняного виробництва з класом чистоти «чистий для аналізу», «хімічно чистий» та «особливо чистий».

2.3 Методи роботи з ДНК

2.3.1 Виділення ДНК з рослинного матеріалу. Для екстракції ДНК з сухого листя ліщини було використано три описані нижче методики.

2.3.1.1. Модифікована методика виділення ДНК із рослинного матеріалу із цетавлоновим буфером і осадженням спиртом [82]. 1. Наважку сухої листкової тканини масою 50-100 мг розтирали у фарфоровій ступці зі скляним порошком до порошковидного стану та переносили у пластикову пробірку об'ємом 2 мл або подрібнювали за допомогою кульового млина з кульками діаметром 3 мм у пластикових пробірках об'ємом 2 мл.

2. Додавали 750 мкл ЦТАБ-буферу (2.2.1.3), старанно перемішували до утворення гомогенної суспензії та інкубували на водяній бані при 65°C протягом 40–60 хв.

3. Додавали рівний об'єм суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (2.2.1.2), перемішували до утворення білої емульсії та продовжували екстракцію з перемішуванням протягом 5 хв. Для розділення фаз центрифугували 5 хв при 10–12 тис. об./хв. Водну фазу переносили в чисту пробірку та повторювали екстракцію хлороформом.

4. До водної фази додавали рівний об'єм ізопропанолу, швидко перемішували та осаджували ДНК центрифугуванням при 10–12 тис. об./хв впродовж 5 хв. Надосадову рідину зливали, осад двічі промивали 70% етанолом. Осад підсушували 20–30 хв та розчиняли в 200–500 мкл ТЕ-буферу, за необхідності нагріваючи при 55°C протягом 10–30 хв.

5. Для видалення РНК розчин обробляли РНКазою А (2.2.1.1) (до кінцевої концентрації 50 мкг/мл) протягом 15–30 хв при 37°C. Після цього розчин ДНК двічі екстрагували рівним об'ємом суміші хлороформ/ізоаміловий спирт як описано вище.

6. ДНК осаджували двома об'ємами етанолу з 0,3 М NaCl протягом 1–16 год при кімнатній температурі. Утворений розчин центрифугували при 10–12 тис.

об./хв, осад двічі промивали 70% етанолом, підсушували та розчиняли в 50–100 мкл 1×TE-буферу (2.2.1.4).

2.3.1.2. Модифікована методика виділення ДНК із цетавлоновим буфером і наступною очисткою ДНК із використанням мікрогранул кремнезему (SiO_2) (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit) [77]. 1. Наважку сухої листкової тканини масою 50–100 мг розтирали у фарфоровій ступці зі скляним порошком до порошковидного стану та переносили у пластикову пробірку об'ємом 2 мл або подрібнювали за допомогою кульового млина з кульками діаметром 3 мм у пластикових пробірках об'ємом 2 мл.

2. Додавали 750 мкл ЦТАБ-буферу, старанно перемішували до утворення гомогенної суспензії та інкубували на водяній бані при 65°C протягом 40–60 хв.

3. Додавали РНКазу А до кінцевої концентрації 50 мкг/мл та інкубували 15–30 хв при 37°C.

4. Додавали рівний об'єм суміші хлороформ/ізоаміловий спирт, перемішували до утворення білої емульсії та продовжували екстракцію з перемішуванням протягом 5 хв. Для розділення фаз центрифугували 5 хв при 10–12 тис. об./хв. Водну фазу переносили в чисту пробірку та повторювали екстракцію хлороформом.

5. До водної фази додавали 2 об'єми 4 М NaCl та 10–20 мкл суспензії SiO_2 концентрації 10 мг/мл (із розрахунку, що 1 мг діоксиду кремнію здатний зв'язувати 2,5–3,5 мкг ДНК), старанно перемішували та інкубували 5–15 хв при кімнатній температурі за постійного перемішування.

6. Частинки SiO_2 осаджували коротким центрифугуванням 5–10 с при 10–12 тис. об./хв. Осад промивали 4 М NaCl, ресуспендували та повторно осаджували центрифугуванням.

7. До осаду додавали 0,5–1 мл буферу для відмивання, ресуспендували, осаджували SiO_2 центрифугуванням та після видалення супернатанту повторювали процедуру промивки. Осад підсушували 15 хв при кімнатній температурі.

8. До осаду додавали 10–20 мкл 1×TE-буферу (залежно від кількості осаду) та інкубували 5–15 хв при кімнатній температурі. Діоксид кремнію осаджували центрифугуванням при 10–12 тис. об./хв впродовж 1–2 хв. Супернатант переносили в чисту пробірку та повторювали процедуру елюції ДНК з половинним від попереднього об'ємом 1×TE-буферу. Супернатанти об'єднували та додатково центрифугували 2–4 хв при 10–12 тис. об./хв для видалення залишків діоксиду кремнію.

2.3.1.3. Модифікована методика виділення ДНК із цетавлоновим буфером і попередньою відмивкою матеріалу високосолевым буфером та проміжним осадженням ізопропіловим спиртом в присутності 1M NaCl [83]. 1. Наважку сухої листкової тканини масою 50–100 мг розтирали в ступці зі склом та переносили розтертий матеріал у пробірку об'ємом 2 мл або подрібнювали за допомогою кульового млина з кульками діаметром 3 мм у пластикових пробірках об'ємом 2 мл.

2. Додавали 1–1,6 мл буфера TNE (2.2.1.6), охолодженого до +4°C, ретельно перемішували й інкубували на льодяній бані 5–10 хв., періодично перемішуючи. Після цього пробірки центрифугували протягом 5 хв при 10–12 тис. об./хв. Надосадову рідину відбирали і повторно відмивали осад буфером TNE. У випадку великої в'язкості надосадової рідини процедуру повторювали ще раз.

3. До осаду додавали 800 мкл 2×ЦТАБ-буферу (2.2.1.3), ретельно перемішували й інкубували 40–90 хв. при температурі 65°C з періодичним обережним перемішуванням.

4. У пробірки додавали приблизно 700 мкл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт і обережно перемішували протягом декількох хвилин. Пробірки центрифугували 10 хв. при 10–12 тис. об./хв, після чого надосадову рідину відбирали в чисту пробірку.

5. У пробірку додавали розчин РНКаз А (2.2.1.1) до кінцевої концентрації 15–50 мкг/мл й інкубували протягом 30 хв. при 37°C. Після чого повторювали вищеописаний крок очищення хлороформом з ізоаміловим спиртом.

6. У пробірку з надосадовою рідиною додавали 0,5 об'єму 5 М NaCl та 0,7 об'єму холодного ізопропанолу. Вміст пробірок ретельно перемішували перевертанням і осаджували ДНК при 4°C впродовж 40 хв. Після цього пробірки центрифугували 10 хв. при 10–12 тис. об./хв та обережно зливали надосадову рідину. Осад двічі промивали 500 мкл холодного 70% етанолу і підсушували 20–30 хв.

7. Висушений осад розчиняли в 200 мкл буфера TNE і осаджували ДНК додаванням двох об'ємів охолодженого 96% етанолу з наступним перемішуванням перевертанням пробірок. Пробірки центрифугували 10 хв. при 10–12 тис. об./хв, осад двічі промивали 500 мкл холодного 70% етанолу і висушували при кімнатній температурі.

8. Висушений осад розчиняли в 50–100 мкл буфера TE.

Якість та концентрацію виділеної ДНК контролювали порівнянням зі стандартною ДНК фага λ відомої концентрації, а також спектрофотометричним аналізом на приладі NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Для перевірки придатності виділеної ДНК проводили тестову ПЛР з використанням iPBS праймерів згідно з протоколом Kalendar et al., 2010 [7].

2.3.2 Полімеразна ланцюгова реакція з SSR-праймерами. Для SSR-аналізу використовували дев'ять пар мікросателітних праймерів, описаних у роботі Akin et al. (2016). Послідовності праймерів наведено в *табл. 2.2.*

Таблиця 2.2

Використані мікросателітні локуси, їх групи зчеплення та послідовності
праймерів

Локус	Група зчеп- лення* *	Послідовність праймерів	Концентрація праймерів в реакц. суміші, мкМ
BR270	1S	F – AGCACCTCCTCTGCTTCCTA R – TTCCTCCTCTGCTCCAAATG	1
BR414	9S, 9R	F – ATCGCATCACGGAAGAGAAG R – TGACGAGAACCTAGGGATCTATTT	1
BR438	11S	F – ATCTCTGCCCCTCTCTCTCTCT R – AACTAACACCGTTGCTGATCCT	1
BR322	8S	F – TCTCTTCCTTGCCACCTCAG R – AAGATGGGGTTCGAGGAGAC	1
GB949	10S	F – TTTGGAGGGAGACAGTTTGG R – GGTGCGCCAAGAATGAGAGA	1
CAC- C008	4	F – TTTCCGCAGATAATACAGGG R – TCCTTTGCTTTGGACCAG	1,3
GB950	7S	F – GAAGAAGACGAGGAGCACATTT R – ACTGAGCATTTCCAACCCATAC	2
BR259	5S	F – GAAGGATGAATGGAAGTTGGAG R – AAGATCGGCTTCGAGAATATCA	1
BR464	3S	F – GTGCAAACAGTCGCTATCATCT R – CGAGGACCCATAAGAGAACATC	1

ПЛР проводили за стандартною програмою, що включала початкову денатурацію: 95°C – 5 хв; 10 циклів: 95°C – 30 с, 62°C зі зниженням температури

на 1°C у кожному циклі – 90 с, 72°C – 30 с; 15 циклів: 95°C – 20 с, 52°C – 45 с, 72°C – 30 с; заключну елонгацію: 72°C – 6 хв.

2.3.3 Полімеразна ланцюгова реакція з iPBS-праймерами. Для iPBS-аналізу застосовували праймери, розроблені на основі консервативних послідовностей сайтів зв'язування тРНК Kalendar et al., 2010 (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Характеристики iPBS-праймерів, застосованих у дослідженні

Назва	Послідовність	T	B	PB	PB%
2232	AGAGAGGCTCGGATACCA	55.4	13	12	92,3
2277	GGCGATGATACCA	52	15	14	93,3
2252	TCATGGCTCATGATACCA	51.6	12	12	100
2402	TCTAAGCTCTTGATACCA	50	22	21	95,4
2229	CGACCTGTTCTGATACCA	53.5	17	16	94,1
2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	52.8	12	12	100

Примітки: 1 - T – Температура гібридизації (°C); 2 - B Кількість ПЛР-фрагментів; 3 - PB – Кількість поліморфних ПЛР-фрагментів; 4 - PB% – Частка поліморфних ПЛР-фрагментів (%).

ПЛР проводили з використанням наступної програми: 1 цикл: 94°C – 3 хв; 28–35 циклів: 94°C – 15 секунд, T гібридизації (див. табл. 2.3.) – 60 секунд і 72°C – 60 секунд; Кінцева елонгація проходила при 72°C протягом 5 хв.

2.3.4 Електрофоретичне фракціонування продуктів ампліфікації в агарозному гелі. Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу в 1,4% агарозному гелі, приготованому на основі 1×SB-буфера (2.2.3.1). Розчин агарози готували нагріванням у 1×SB-буфері до повного розплавлення, після охолодження до 60°C додавали бромистий етидій та заливали у форму з гребінкою. Після полімеризації гель переносили до електрофоретичної камери з 1×SB-буфером, об'єм якого був

достатнім, щоб гель був зануреним на глибину 1-2 мм. ПЛР-продукти змішували з буфером для нанесення (2.2.3.3) та вносили до лунок.

Фракціонування продуктів ПЛР проводили у камері для горизонтального електрофорезу при напрузі 30 В до виходу барвника (бромфеноловий синій) з лунок на 1 см, після чого підвищували напругу до 100 В і продовжували розділення протягом 5–6 годин. Розділені фрагменти ДНК візуалізували в ультрафіолетовому світлі після забарвлення бромистим етидієм та фотографували за допомогою цифрової камери Canon з оранжевим світлофільтром.

2.3.5 Електрофоретичне фракціонування продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі

Фрагментний аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою автоматичного сиквенатора з лазерним флуориметром ALF Express II (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.). Для підготовки зразків до електрофорезу 1 мкл міченого ПЛР-продукту змішували з 3 мкл буфера для нанесення на гель, що містив мічені фрагменти ДНК розміром 84 та 317 п.н. для використання в якості внутрішнього маркера і визначення розміру фрагментів. Отриману суміш інкубували при 95°C протягом 3 хв для денатурації ДНК, після чого негайно охолоджували на льоду для запобігання ренатурації.

Електрофоретичне розділення проводили у 8% денатуруючому поліакриламідному гелі у присутності 7 М сечовини, що забезпечувала підтримання ДНК у одноланцюговому стані упродовж усього розділення. Як електродний буфер використовували 0,6×TBE. Електрофорез здійснювали за температури 55°C, напруги 700 В та сили струму 50 мА протягом 90 хв. Реєстрацію та аналіз флуоресцентних сигналів, а також визначення розмірів фрагментів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Fragment Manager v.2.1.

2.4 Клонування та сиквенування ДНК

2.4.1 Очищення фрагментів ДНК з агарозного гелю. Після електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації в 1,4% агарозному гелі смуги, що відповідають цільовим фрагментам, вирізали скальпелем та переносили до 2 мл пластикових мікропробірок. Очищення ДНК від агарози здійснювали за допомогою набору реагентів Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США) відповідно до інструкції виробника, яка включає розплавлення гелю в хаотропному буфері, зв'язування ДНК з мікрогранулами кремнезему, промивання та елюцію очищених фрагментів ДНК до ТЕ-буферу.

2.4.2 Клонування виділених фрагментів ДНК. Очищені фрагменти ДНК лігували у вектор pGEM-T, який у лінеаризованому вигляді має одноланцюгові 3'-виступаючі кінці з тимідином, що забезпечує ефективне ТА-клонування ПЛР-продуктів, синтезованих Taq-ДНК-полімеразою.

Реакцію лігування проводили в суміші загальним об'ємом 15 мкл: 4 мкл очищеного фрагмента ДНК (~40 нг), 4 мкл вектора pGEM-T (200 нг), 1,5 мкл 10×буфера для ДНК-лігази, 1,5 мкл поліетиленгліколя (ПЕГ) та 0,8 мкл ДНК-лігази. Приготовану суміш інкубували протягом 14 год при температурі 4–7°C [84].

Компетентні клітини *Escherichia coli* штаму XL Blue готували класичним хімічним методом на основі хлориду кальцію [84].

1. Вирощували нічну культуру бактерій протягом 14 год при 37 °C на шейкері у 5 мл рідкого середовища LB (2.2.5.1) з тетрацикліном (12,5 мкг/мл) при співвідношенні середовища до повітря 1:1.

2. Наступного дня нічну культуру переносили у 50 мл свіжого середовища LB та інкубували при 37°C протягом 4 год. Для зупинки росту культуру швидко охолоджували на льоду протягом 10 хв.

3. Культуру центрифугували при 2000 об/хв протягом 10 хв.

4. Осад ресуспендували у 10 мл холодного 50 мМ буферу для приготування компетентних клітин (2.2.5.5) та інкубували при 4 °С протягом 10 хв, після чого знову центрифугували за тих самих умов. Повторно ресуспендували осад у 2 мл холодного буферу.

5. Суспензію компетентних клітин розливали по 100 мкл у стерильні мікропробірки та заморожували при -70°С.

Для трансформації 100 мкл розмороженої на льоду суспензії компетентних клітин змішували з 2 мкл лігваної плазмідни та інкубували при 4°С протягом 30 хв. Потім проводили тепловий шок при 42 °С протягом 1,5 хв з негайним охолодженням і інкубацією при 4 °С протягом 5 хв. Для нарощування трансформантів до суміші додавали 400 мкл середовища LB та інкубували при 37°С на шейкері протягом 1 год.

Частину нарощених клітин висаджували газоном на чашки Петрі з агаризованим середовищем LB (2.2.5.2), яке містило ампіцилін (50 мкг/мл) та тетрациклін (12,5 мкг/мл). Для детекції трансформованих клітин, що містили плазмиду зі вставкою, в поверхню середовища перед інокуляцією втирали X-Gal (40 мкл, 20 мг/мл) та IPTG (40 мкл, 20 мг/мл).

Відбір рекомбінантних клонів проводили методом добору колоній за кольором. Після 14-годинної інкубації при 37°С після появи забарвлених колоній відбирали білі колонії.

2.4.3 Виділення плазмідної ДНК із трансформованих клітин *E. Coli*.

Виділення плазмідни здійснювали методом лужного лізису за Дж. Самбруком та ін. [84]. Нічну культуру бактерій, вирощену в рідкому середовищі LB з додаванням 50 мкг/мл ампіциліну та 12,5 мкг/мл тетрацикліну, осаджували центрифугуванням при 5 000 об/хв протягом 5 хв. Отриманий осад ресуспендували в охолоджену розчині I (2.2.6.1) з додаванням 1 мкл РНКази А (10мкг/мкл). Лізис бактерій проводили шляхом додавання свіжоприготованого розчину II (2.2.6.2) з наступною інкубацією суміші на льоду протягом 5 хв до утворення прозорого в'язкого лізату. Для нейтралізації лугу та преципітації

хромосомної ДНК і клітинних білків до суміші додавали розчин 3 М ацетату калію, рН 4,8. Після інкубації на льоду протягом 10–15 хв, суміш центрифугували при 12 тис. об/хв, 5 хв при 4°C.

До лізату додавали рівний об'єм суміші хлороформ/ізоаміловий спирт, перемішували до утворення білої емульсії та продовжували екстракцію з перемішуванням протягом 5 хв. Для розділення фаз центрифугували 5 хв при 10–12 тис. об./хв. Водну фазу переносили в нову пробірку та повторювали екстракцію хлороформом.

Плазмідну ДНК із супернатанту осаджували двома об'ємами охолодженого 96% етанолу з центрифугуванням при 12 тис. об/хв, 5 хв. Сформований осад промивали 70% етанолом для видалення залишків солей, висушували при кімнатній температурі та розчиняли у ТЕ-буфері.

Концентрацію та чистоту отриманої плазмідної ДНК оцінювали спектрофотометрично та шляхом електрофоретичного розділення в агарозному гелі.

2.4.4 Сиквенування фрагментів ДНК. Сиквенування клонованих фрагментів ДНК за Сенгером проводили в спеціалізованих комерційних установах. Для сиквенування використовували зворотний M13-праймер, що гібридизується з ділянкою вектора pGEM-T, прилеглою до сайту клонування.

Отримані нуклеотидні послідовності верифікували за допомогою бази даних NCBI GenBank шляхом пошуку гомологічних послідовностей інструментом BLAST та після підтвердження специфічності депонували в базі даних NCBI GenBank [81].

2.4.5 Біоінформатичний аналіз. Біоінформатичний аналіз включав пошук нуклеотидних послідовностей мікросателітних локусів, їхню характеристику та порівняльний аналіз алельних варіантів. Для цього використали окремі послідовності знайдені у базі даних NCBI GenBank, та геномні збірки видів *Corylus*, зазначені у таблиці 2.4. Вирівнювання та аналіз проводили вручну в програмі Ugene.

Таблиця 2.4

Перелік використаних у дослідженні повногеномних сиквенсів

Вид/сорт	Номер геномної збірки у базі даних NCBI Genome
<i>C. avellana/Tombul</i>	GCA_901000735.2
<i>C. avellana</i>	GCA_965113065.2
<i>C. avellana</i>	GCA_965113165.2
<i>C. chinensis</i>	GCA_048127625.1
<i>C. colurna</i>	GCA_965233425.1
<i>C. colurna</i>	GCA_965233385.1
<i>C. americana/Rush</i>	GCA_036287905.1
<i>C. americana/Winkler</i>	GCA_036287885.1
<i>C. heterophylla</i>	GCA_016403345.1
<i>C. heterophylla</i>	GCA_019343435.1

2.5 Аналіз результатів

Розмір продуктів ПЛР, отриманих з SSR-праймерами, після фракціонування визначали за допомогою програми Fragment Manager v.2.1 (Pharmacia Biotech). З метою мінімізації похибок автоматичного підрахунку розмірів алелів результати програмної обробки в обов'язковому порядку верифікували шляхом візуального порівняння з вихідними флуорограмами, на яких кожен алель був зображений у вигляді окремого піку. Такий підхід дозволив своєчасно виявити та виключити артефакти, зумовлені попаданням ДНК із сусідніх доріжок або утворенням додаткових продуктів внаслідок проковзування ДНК-полімерази. Таблиці розподілу алелів для кодомінантних

SSR-маркерів формували у вигляді матриць, де кожен алель кожного локусу представлений своїм розміром у парах основ.

Цифрові зображення електрофоретичних спектрів продуктів ампліфікації, отриманих із застосуванням iPBS-праймерів, обробляли за допомогою програми Totallab TL120 v.2008 (Nonlinear Dynamics Ltd.). На основі отриманих даних аналізу електрофореграм формували бінарні матриці, у яких наявність або відсутність фрагмента певного розміру для кожного зразка кодувалася як «1» або «0» відповідно.

2.5.1 Популяційні характеристики дослідженої вибірки. Для SSR-маркерів розраховували: очікувану (H_e) та спостережувану (H_o) гетерозиготність, індекс Шеннона (I). Для iPBS-маркерів, з огляду на їх домінантний характер, додатково визначали загальну кількість ПЛР-продуктів для кожного праймера (B) та відсоток поліморфних фрагментів, а також незважену очікувану гетерозиготність (uH_e). Показники H_e , H_o , uH_e , індекс Шеннона та попарні генетичні відстані за Жакардом між зразками розраховували за допомогою програмного забезпечення GenAlEx v.6.502 [78,85].

У всіх нижченаведених формулах n відповідають кількості досліджених зразків, тоді як p_i відповідає частоті певного алеля.

Спостережувану гетерозиготність розраховували шляхом прямого ділення кількості гетерозиготних генотипів на загальну кількість генотипів. Очікувану гетерозиготність розраховували за формулою:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Для iPBS-маркерів також розраховували незважену очікувану гетерозиготність (uH_e) за наступною формулою:

$$uH_e = \frac{2n}{2n - 1} \cdot H_e$$

Для SSR-маркерів розраховували відмінність у значеннях спостережуваної та очікуваної гетерозиготності для визначення наявності відхилення від

рівноваги Харді-Вайнберга. Оцінку відмінностей між середніми значеннями H_o і H_e проводили за критерієм χ^2 при рівні значущості 95% ($p < 0,05$) з використанням онлайн-ресурсу Open Source Statistics for Public Health [80].

2.5.2 Показники інформативності ПЛР-маркерів. Інформативність досліджених маркерів оцінювали за такими показниками: вміст інформації про поліморфізм (PIC – Polymorphism Information Content) [86], роздільна здатність (R_p) [87], дискримінаційна здатність (D_L) та кількість недиференційованих пар (ND) [88]. Показники R_p , D_L , ND та PIC розраховували у середовищі MS Excel.

PIC відображає здатність маркера виявляти поліморфізм у досліджуваній популяції. Для кодомінантних маркерів значення PIC варіює від 0 до 1 та оцінюється наступним чином: $PIC > 0,5$ свідчить про високу інформативність, від 0,25 до 0,5 – про помірну, нижче 0,25 – про низьку інформативність маркера. Для домінантних маркерів значення PIC варіює від 0 до 0,5 [86,89].

Значення PIC для кодомінантних SSR-маркерів розраховували за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^n p_i^4$$

Для домінантних iPBS-маркерів значення PIC розраховували за формулою:

$$PIC = 2f(1 - f)$$

Де f це частота присутніх смуг в електрофоретичному спектрі для досліджуваного iPBS-праймера [90].

Дискримінаційна здатність (D_L) відображає ймовірність того, що два довільно обрані генотипи із досліджуваної вибірки будуть розрізнені за допомогою конкретного маркера. Значення D_L варіює від 0 до 1, чим ближче значення до 1, тим вища здатність маркера розрізняти генотипи. Показник розраховували за формулою:

$$D_L = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2$$

Однак, на відміну від інших формул показників інформативності, тут за p_i брали не частоту певного алеля, а частоту певного патерна або набору смуг для кожного зразку. На противагу PIC, який оцінює розрахунковий рівень поліморфізму локусу, D_L безпосередньо відображає ефективність маркера саме для аналізу досліджуваної вибірки генотипів [88].

Роздільна здатність (R_p) характеризує рівень варіації між досліджуваними зразками, що здатен виявити конкретний маркер. Роздільну здатність розраховували за формулою:

$$R_p = \Sigma I_b$$

де

$$I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

На відміну від D_L , показник R_p не має фіксованої верхньої межі й залежить від кількості аналізованих фрагментів, тому використовується переважно для порівняння маркерів між собою в межах одного дослідження, а не як абсолютна характеристика [87].

Кількість недиференційованих пар (ND) відображає кількість пар генотипів у досліджуваній вибірці, які неможливо розрізнити за допомогою конкретного маркера або набору маркерів. Кількість пар зразків, що мають ідентичні електрофоретичні профілі за одним аналізованим маркером розраховували за формулою:

$$ND = \frac{n(n-1)}{2} \cdot \sum_{i=1}^n p_i \frac{n \cdot p_i - 1}{n - 1}$$

На відміну від D_L та R_p , які є імовірнісними та відносними показниками, ND є абсолютним числовим значенням і безпосередньо вказує на практичні обмеження маркера при роботі з конкретною вибіркою. Чим менше значення ND,

тим вища практична ефективність маркера. Значення $ND = 0$ означає, що маркер здатен повністю розрізнити всі досліджені генотипи між собою. Показник є особливо інформативним при порівнянні маркерних систем та виборі оптимального набору маркерів для ідентифікації зразків, оскільки дозволяє оцінити, скільки генотипів залишаться нерозрізненими при використанні того чи іншого маркера або їхньої комбінації.

Для розрахунку значення ND для певного набору маркерів використовували наступну формулу:

$$ND_k = \frac{n(n-1)}{2} \cdot \prod_{j=1}^k \sum_{i=1}^n p_i \frac{n \cdot p_i - 1}{n - 1}$$

Очікувану ефективність для наборів маркерів для вибірок з 200, 500 та 1000 зразків розраховували за формулою:

$$E = x(n-x) \cdot \prod_{j=1}^k \sum_{i=1}^n p_i \frac{n \cdot p_i - 1}{n - 1},$$

де x це розмір дослідженої вибірки, а n – розмір теоретичної вибірки.

2.5.3 Побудова дендрограм генетичної подібності. Дендрограми генетичної подібності методом UPGMA будували у програмному забезпеченні MEGA6 [79] на основі матриць попарних генетичних відстаней, обчислених за допомогою програмного забезпечення GenAlEx [85].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Оптимізація методики виділення ДНК з гербарних зразків *Corylus* spp

Отримання високоякісних препаратів геномної ДНК є ключовою умовою успішного молекулярно-генетичного аналізу генетичного різноманіття видів роду *Corylus*. Водночас присутність у листовій тканині цих рослин значної кількості вторинних метаболітів суттєво ускладнює виділення ДНК із використанням стандартних процедур. З огляду на це, було проведено порівняльне тестування кількох методик: класичної методики із використанням цетавлонового буферу і наступним осадженням спиртом [82]; методики виділення ДНК із цетавлоновим буфером і очисткою за допомогою мікрогранул кремнезему (SiO_2) (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit) [77]; а також методики виділення ДНК із цетавлоновим буфером і попередньою відмивкою розчинних сполук охолодженим високосолевим буфером та проміжним осадженням ДНК ізопропанолом в присутності 1М NaCl [83].

При виділенні ДНК за стандартною методикою Doyle & Doyle, 1987 [82] було встановлено, що листові тканини ліщини містять значну кількість вторинних метаболітів, імовірно полісахаридів, які за своїми фізико-хімічними властивостями є подібними до ДНК. Ці сполуки є водорозчинними, екстрагуються цетавлоном, не видаляються у процесі екстракції хлороформом та випадають в осад при осадженні ізопропанолом або етанолом. Внаслідок цього, зразки ДНК, виділені за зазначеною методикою, містили їх у значній кількості, що унеможлиблювало подальший ПЛР-аналіз.

Спроби очищення ДНК за допомогою мікрогранул SiO_2 після попередньої екстракції цетавлоновим буфером та хлороформом [77] також не забезпечили рівня очистки ДНК, достатнього для проведення ПЛР-аналізу.

В подальшому було використано методику виділення ДНК, розроблену для видів роду *Betula* [83], яку раніше було успішно застосовано для роботи із замороженою листковою та камбіальною тканиною. Вибір саме цієї методики для адаптації є цілком обґрунтованим, оскільки рід *Corylus* належить до тієї ж родини *Betulaceae*, що й рід *Betula* L., хоча й до різних підродин – *Betuloideae* та *Coryloideae* [38,91].

Після кількох успішних спроб виділення ДНК з ліщини із застосуванням методу Wang et al. 2013 [83] ми внесли в нього кілька змін з метою пристосування до власних умов. В оригінальному протоколі зразки подрібнювали у рідкому азоті, однак враховуючи те, що в нашій роботі вихідним матеріалом було сухе листя, ми застосували розтирання у ступці із скляним порошком або в пластикових пробірках з металевими кульками на кульовому млині. Такий спосіб подрібнення зразків виявився достатньо ефективним та позбавив залежності від наявності рідкого азоту. Крім того, в оригінальному протоколі разом з ЦТАБ буфером до зразку з метою депротейнізації додавали 100 мкл 10 % розчину N-лауроілсаркозинату натрію і 20 мкл протеїнази К. Цю обробку було виключено з модифікованого протоколу, оскільки вона не впливала істотно на якість виділеної ДНК. Це дозволило скоротити час інкубації при 65°C з 3 год до 45–60 хв і тривалість виділення ДНК у цілому. Крім того, ми встановили, що зниження концентрації РНКаз в 5–10 разів (до кінцевої концентрації 1,5–5 мкг/мл), порівняно з вихідною методикою, також не впливає на ефективність очищення зразків від РНК.

Як показали наші дослідження, оптимізована методика може бути успішно застосована для виділення ДНК з висушених зразків молодого листя видів *Corylus*. З 100 мг сухої листкової тканини може бути виділено 1,5–2,5 мкг ДНК. Електрофоретичне розділення показало, що отримані препарати мають показники (розмір фрагментів ДНК) порівнювані з комерційними препаратами ДНК фага λ (рис. 3.1, а). Спектрофотометричний аналіз чистоти виділених препаратів показав, що вони мають значення співвідношення поглинання A260 /

A280 у межах 1,8–1,9, а A260 / A230 – близько 2,2, які свідчать про достатньо високий рівень очищення від білків та полісахаридів.

Для виділення високомолекулярної ДНК найкраще придатна тканина молодих листків, зібраних не пізніше червня, оскільки вихід ДНК із зібраного пізніше матеріалу знижується. Для виділення ДНК в іншу пору року потенційно може бути використана камбіальна тканина або суцвіття після відповідного адаптування перших кроків методики.

Використання препаратів виділеної ДНК у мультиплексній ПЛР з SSR-праймерами [92] та в ПЛР з iPBS-праймерами [7] (рис. 3.1, б та в) показало, що застосована методика забезпечує отримання препаратів ДНК ліщини, цілком придатних для ПЛР-аналізу.

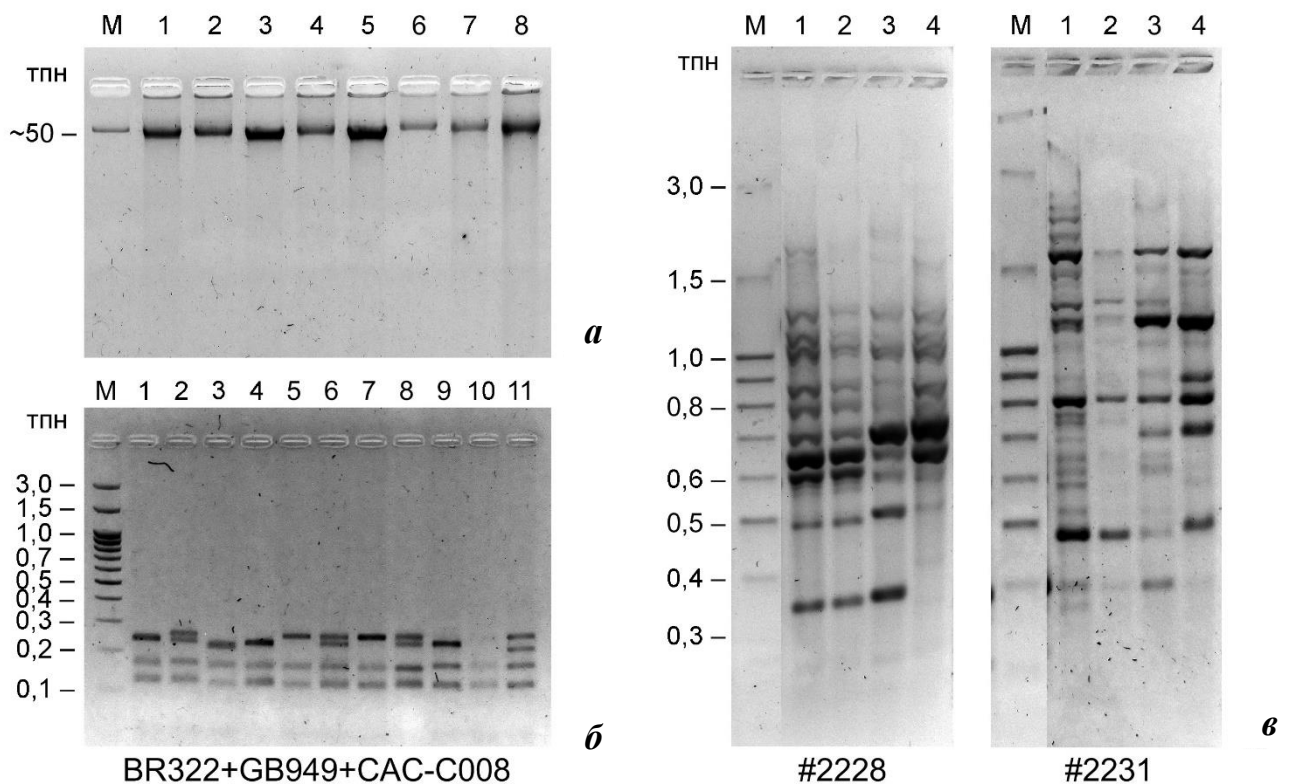


Рис 3.1. Електрофоретичні спектри препаратів ДНК, виділеної із висушених листків *Corylus* spp. (а), та ПЛР-продуктів, отриманих з ДНК *Corylus* spp. у мультиплексній ПЛР трьома SSR праймерами [92] (б) та звичайній ПЛР з iPBS праймерами [7] (в). Назви праймерів вказано під електрофореграмами. М – стандарти ДНК: ДНК фага λ , 20 нг (А) та маркер 100 bp-ladder (б,в)

Таким чином, порівняльна оцінка придатності кількох методик виділення ДНК, розроблених для різних рослинних об'єктів, показала переваги методики модифікованої методики ЦТАБ-екстракції з використанням високосольового буфера для попередньої відмивки розчинних сполук для виділення ДНК із сухого листа ліщини. Модифікований протокол є придатним для виділення препаратів ДНК з метою подальшого їх використання для генетичного різноманіття сортів фундука та видів ліщини методом ПЛР-аналізу.

3.2 Аналіз поліморфізму та структурної організації мікросателітних локусів

Для молекулярно-генетичної ідентифікації та характеристики сортів фундука у даному дослідженні було використано дев'ять SSR-локусів, відібраних із 14 маркерів, розроблених для генотипування зразків ліщини з колекції USDA в Університеті штату Орегон [92]. Усі використані локуси містять мотиви повторів із трьох або більше нуклеотидів. Перевага використання для аналізу локусів із повторами довжиною три та більше нуклеотидів полягає в тому, що вони значно рідше утворюють артефакти та розщеплені піки порівняно з динуклеотидними повторами, що спрощує однозначне визначення алелів та підвищує відтворюваність результатів між лабораторіями.

Дев'ять відібраних локусів входять до семи з одинадцяти груп зчеплення геному *C. avellana* (табл. 2.2). Таке розміщення забезпечує достатньо рівномірне охоплення основних хромосомних регіонів і мінімізує ймовірність зчеплення між локусами, що є важливою умовою для обґрунтованого розрахунку показників інформативності маркерів. Варто зазначити, що локус BR259 розташований у групі зчеплення LG5, де знаходиться S-локус, що контролює несумісність пилку і приймочки – ключовий елемент репродуктивної системи ліщини, що запобігає самозапиленню. Зчеплення з функціонально значущим

локусом може мати вплив на розподіл алелів BR259, а також потенційно дозволяє проводити добір за даною ознакою [92].

3.2.1 Підбір умов для мультиплексної ПЛР мікросателітних локусів.

Мультиплексна ПЛР є значно ефективнішою від ампліфікації локусів у окремих реакціях при виконанні великої кількості паралельних генотипувань. Проведення трьох мультиплексних реакцій замість дев'яти індивідуальних скорочує загальну кількість ПЛР-реакцій утричі та пропорційно зменшує витрати реагентів і робочого часу на стадії ампліфікації. Додатковою перевагою є можливість детектування всіх трьох локусів кожної групи за результатами одного електрофоретичного фракціонування. Використання єдиного флуоресцентного барвника для всіх праймерів принципово спрощує та здешевлює процедуру, оскільки вартість синтезу флуоресцентно мічених олігонуклеотидів є суттєвою статтею витрат при масштабному генотипуванні. При детектуванні на лазерному флуориметрі це не обмежує інформативність аналізу за умови, що діапазони алелів різних локусів не перекриваються, що й було досягнуто при формуванні груп для мультиплексної ПЛР.

На підставі аналізу очікуваних діапазонів розмірів алелів, наведених у роботі [92], дев'ять досліджених локусів були розподілені на три групи по три локуси таким чином, щоб діапазони алелів у межах кожної групи не перекривалися.

До першої групи увійшли локуси BR270, BR414 та BR438 з очікуваними діапазонами розмірів алелів 90–102, 116–164 та 187–211 п.н., відповідно. Мінімальна різниця між суміжними діапазонами в цій групі становила 14 п.н. (між BR270 та BR414). До другої групи було включено локуси BR322, GB949 та CAC-C008 з діапазонами 102–114, 154–166 та 200–253 п.н., з мінімальною різницею між суміжними діапазонами 34 п.н. (між GB949 та CAC-C008). Третю групу сформували з локусів GB950, BR259 та BR464 з діапазонами 162–178, 226–250 та 274–292 п.н., де мінімальна різниця між суміжними діапазонами становила 24 п.н. (між GB950 та BR259). Таким чином, мінімальна різниця між

очікуваними діапазонами суміжних локусів у жодній з груп не була меншою за 14 п.н., що є достатнім для надійного розрізнення алелів при фрагментному аналізі на лазерному флуориметрі. Типовий набір продуктів ПЛР для кожної з трьох груп після електрофоретичного фракціонування показано на рисунку 3.2.

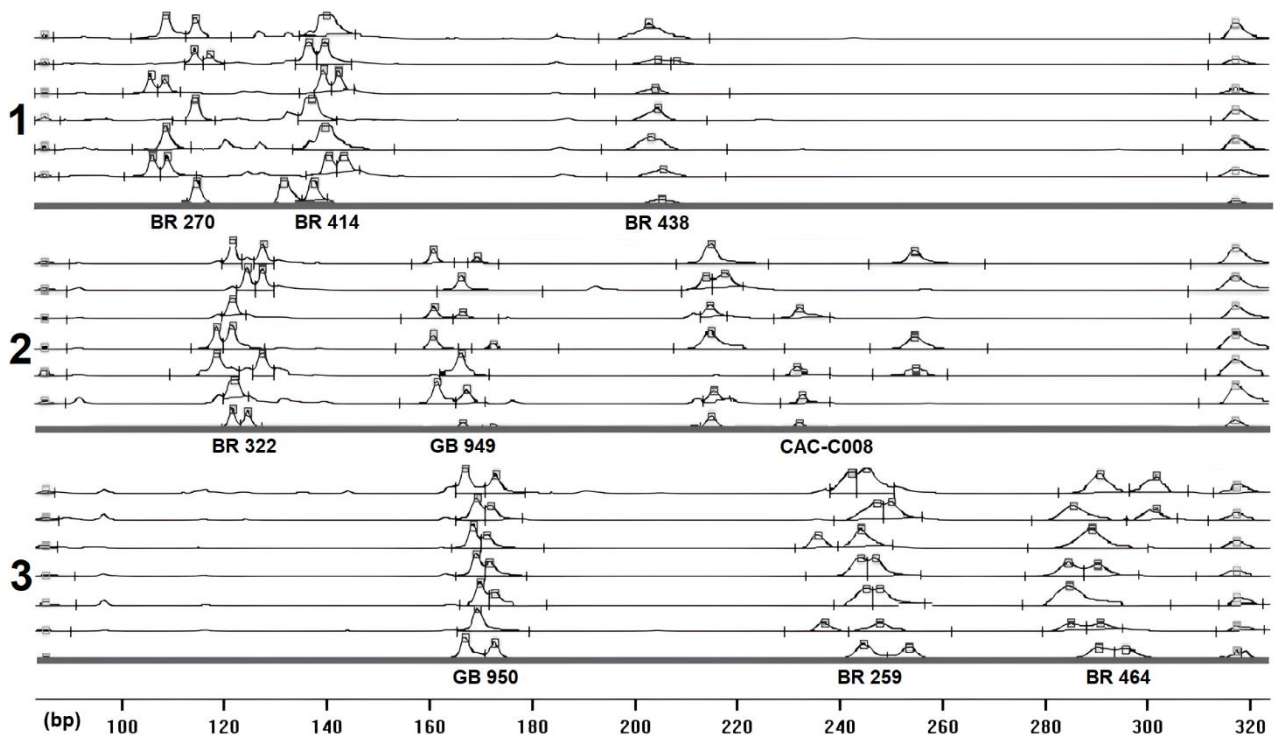


Рис. 3.2. Приклад флуорограми алелів дев'яти мікросателітних локусів зразків *Corylus*. 1, 2, 3 – групи локусів, аналізованих одночасно в мультиплексній ПЛР. Першими та останніми піками в кожній доріжці позначено стандарти довжини – 84 п.н. та 317 п.н.

Таким чином, на підставі аналізу літературних даних щодо діапазонів розмірів алелів було сформовано три групи локусів для мультиплексної ПЛР, в яких алельні діапазони локусів не перекриваються. Крім того, експериментальним шляхом було підібрано співвідношення концентрацій праймерів до окремих локусів, яке забезпечувало приблизно однакову інтенсивність сигналу ПЛР-продуктів для кожного з них. Це дозволило ампліфікувати всі дев'ять локусів у трьох мультиплексних реакціях з

використанням праймерів, мічених одним флуоресцентним барвником та ідентифікувати алелі кожного локуса за результатами електрофоретичного фракціонування.

3.2.2 Алельний склад та діапазони розмірів алелів досліджених мікросателітних локусів. Для дослідження алельного складу та діапазонів розмірів алелів обраних SSR-локусів використали вибірку з 30 зразків, із помологічної колекції Національного дендрологічного парку «Софіївка». До її складу увійшли 3 сорти селекції НДП «Софіївка», 16 сортів Інституту лісового господарства та агролісомеліорації імені Г. М. Висоцького (м. Харків), а також 4 сорти Науково-дослідного інституту квітництва та субтропічних культур (м. Сочі). Крім того, було включено по одному сорту іноземної селекції італійського (Гарібальді) та турецького походження (Трапезунд). Для порівняння до вибірки також включили 5 зразків видів роду *Corylus*, зокрема 3 зразки *C. avellana* (у тому числі f. *fuscorubra*), а також по одному зразку *C. chinensis* та *C. colurna*. (табл. 2.1).

Загалом при дослідженні 30 зразків для 9 використаних SSR-локусів було виявлено 51 алель. Кількість алелів на локус коливалася від 4 до 7 (табл. 3.1). Найменшу кількість алелів (по 4) виявлено для локусів BR438 та BR322, а найбільшу (по 7) для локусів BR270, CAC-C008 та BR259. Середнє значення кількості алелів на локус склало 5,67, що є нижчим за значення, визначені в роботах інших авторів [67,92–94], де середня кількість алелів на локус коливалася від 7,67 до понад 16. Водночас така відмінність є очікуваною, оскільки в зазначених дослідженнях використовували значно більші вибірки від 50 до 200 зразків і більше, що закономірно розширює спектр виявлених алелів. У роботі Akin et al. [92], наприклад, кількість алелів на локус коливалася від п'яти (BR270, BR322, GB949, GB950, BR464) до дев'яти (BR259, CAC-C008), із середнім значенням 6,36. Менша кількість алелів, виявлених у нашому дослідженні, може також бути зумовлена ефектом засновника для дослідженої популяції або відмінностями в алельному складі між українськими сортами та

зразками, проаналізованими в зарубіжних роботах. Виключення становили локуси GB949 та BR270, для яких виявлено більшу кількість алелів порівняно з даними американських дослідників [92], що може вказувати на більшу гетерогенність вибірки за цими ознаками.

Таблиця 3.1

Кількість та діапазон розмірів алелів, виявлених для проаналізованих мікросателітних локусів

Локуси	Мотив*	Кількість алелів			Діапазон розмірів (п.н.)		
		Експериментальні дані	Літературні дані		Експериментальні дані	Літературні дані	
			*	**		*	**
BR270	(CTG) ₆	7	5	7	89-107	90-102	88-104
BR414	(AAT) ₆	6	7	14	119-137	116-164	109-152
BR438	(TCA) ₈	4	6	11	182-194	187-211	161-206
BR322	(ACT) ₇	4	5	5	103-112	102-114	103-115
GB949	(TGG) ₇	6	5	7	146-161	154-166	150-169
CAC-C008	(AAG) ₁₁ (AAG) ₃	7	9	16	202-241	200-253	194-243
GB950	(TGG) ₇	5	5	11	151-163	162-178	152-173
BR259	(TCA) ₁₀	7	9	9	228-246	226-250	226-250
BR464	(ATC) ₇	5	5	9	278-287	274-292	273-300
Разом		51	56	89	89-287	90-292	88-300

Примітка: 1- * – за Akin et al., 2016 [92]; 2 - ** – за Freixas-Coutin et al., 2019 [94].

Аналіз діапазонів розмірів алелів показав певні відмінності між локусами. Найменший діапазон розмірів спостерігався для локусу BR270 (89-107 п.н.), а найбільший – для локусу CAC-C008 (202-241 п.н.).

Для створення більшості сортів фундука впродовж минулого століття проводили активний добір із природних популяцій з метою збільшення генетичного різноманіття селекційного матеріалу. Відмінності в кількості та діапазонах розмірів алелів між нашим дослідженням та літературними даними, таким чином, можуть свідчити про певну генетичну відокремленість сортів фундука українських селекціонерів від матеріалу, описаного в зарубіжних роботах.

Варто зазначити, що Freixas-Coutin et al. [94] виявили незначні відмінності в розмірах фрагментів SSR в 1-3 нуклеотиди між своїм даними та даними Akin et al. [92], пояснивши це відмінностями в обладнанні та підходах до PIG-tailing. Akin et al. [92] використовували аналізатор Beckman Coulter CEQ 8000 та лише шість зворотних праймерів з PIG-tailing, тоді як Freixas-Coutin et al. [94] – генетичний аналізатор ABI 3500 та всі зворотні праймери з PIG-tailing. Подібний методологічний чинник не можна виключати і при зіставленні наших даних з літературними.

3.2.3 Частотний розподіл алелів та мікросателітні профілі досліджених сортів фундука. Аналіз частот алелів досліджених SSR-локусів показав що у частини локусів, зокрема BR464, GB950, GB949 та BR259, частотний розподіл алелів був наближеним до нормального. Водночас у розподілі деяких з них було виявлено виражену асиметрію та дисбаланс (рис. 3.3).

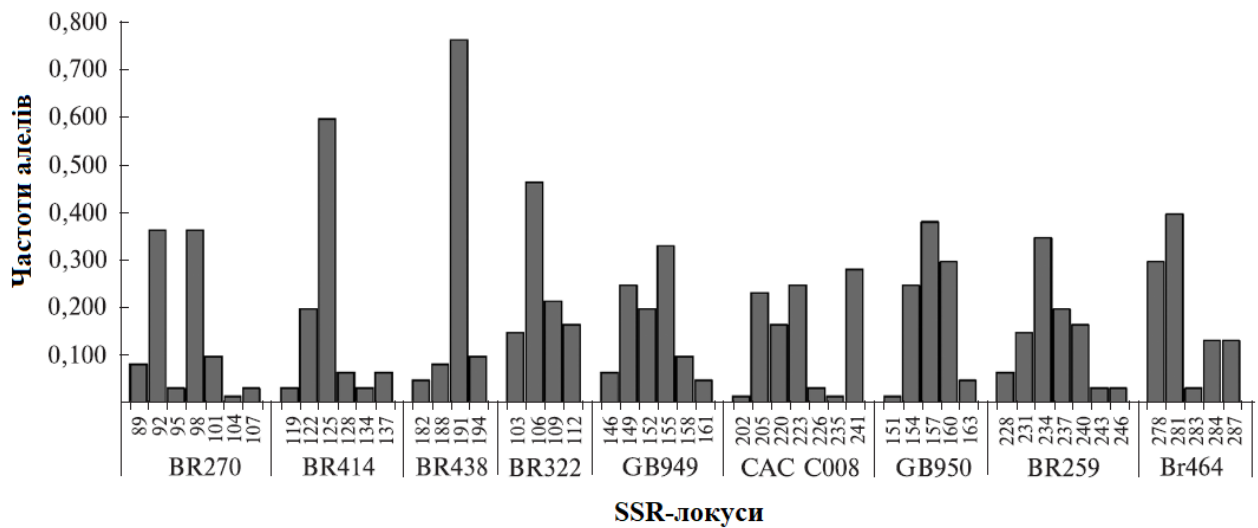


Рис. 3.3. Гістограма частот алелів дев'яти мікросателітних локусів у досліджених сортів фундука і видів *Corylus*

У більшості локусів переважають один або два алелі, тоді як інші мають значно нижчу частоту. Зокрема, для локусу BR438 зафіксовано максимальне значення частоти одного з алелів (191) – 0,767, що свідчить про найбільшу представленість цього алеля у геномах досліджених зразків та низький рівень різноманіття за даною ознакою імовірно через селекційний добір. Для локусів BR414 і BR322 виявлено по одному алелю з частотами 0,600 та 0,467, відповідно. Для локусів BR270 та CAC-C008 не виявлено такого явного переважання одного варіанта над іншими, однак їхній алельний розподіл характеризувався асиметрією.

На основі даних проведеного ПЛР-аналізу 9 SSR-локусів були складені мікросателітні профілі 25 сортів фундука української селекції (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Мікросателітні профілі сортів фундука української селекції

Сорт	Мікросателітний локус								
	BR 270	BR 414	BR 438	BR 322	GB 949	CAC C008	GB 950	BR 259	BR 464
Софіївський 15	92 98	122 125	188	106 109	149	223 241	160 163	228 240	281
Гарібальді	98	125	191	103 106	149	241	157	228 240	281
Софіївський 1	92	125	191	103 109	149 155	223 241	154 157	234 240	281 284
Софіївський 2	89 92	125	191	106 109	149	223	160 163	234 240	281
Дар Павленка	92	125	188	103 106	149 155	205 220	154 157	234	284 287
Україна 50	92 104	125	191	106 112	152	220 241	160	234 240	278 278
Черкеський 2	98 101	122 125	188 194	106 112	152 158	205 223	157 160	234 237	281 287
Лозівський шаровидний	98 101	122 125	191 194	109 112	152	202 205	154 160	231 234	281 287
Корончастий	98 101	122 125	191 194	109 112	152	205	154 160	231 234	281 287
Морозівський	92 101	122 137	191	106 112	152 158	205 241	157 160	234 237	278 287
Гордієнко	92 98	125 137	191 194	109 112	152 158	220	157 160	228 231	281
Караманівський	98	122 125	191 194	106 109	152 158	220 241	157 160	231 234	278 281
Шедевр	89 98	122 125	191	103 109	146 155	220 241	157 160	231 234	278
Трапезунд	92 98	122 137	191	109 112	152 158	220 241	157	228 234	278 281
Грандіозний	89 98	122 125	191 194	106	146 155	220 241	154 160	231 240	281 284
Бадіус	98	122	191	106	149 161	220 223	154 160	234 237	278 281

Продовження табл. 3.2

Сорт	BR 270	BR 414	BR 438	BR 322	GB 949	CAC C008	GB 950	BR 259	BR 464
Дохідний	92 101	122 125	191	103 106	149 155	223 241	154 160	231 234	281 284
Фундук 85	92	125 137	191	103 106	146	220 235	154 157	237 240	278
Перемога 74	92 98	125	191	106 112	149 158	205 241	154 157	234 240	278 281
Лозівський булавоподібний	98 101	125 128	191	109 112	155	205	154 160	234 237	281 287
Пиріжок	89 92	125 128	191	106	149 155	205 223	157	231 234	278 281
Жовтневий	98	125	191	103 106	149 161	205 241	154 157	234 237	278
Фундук 45	92	125	191	103 112	155	223 241	160	240 243	278
Дарунок юнатам	89 92	125 128	191	106	149 155	205 223	157	234 237	278 281
Свічковий	98	119 125	191	106 109	155 161	205 223	157 160	237	281

Отримані мікросателітні профілі можуть стати основою для створення бази даних генетичних паспортів сортів фундука української селекції. Така база даних може слугувати інструментом при вирішенні практичних завдань насінництва та розсадництва, зокрема, для встановлення тотожності або відмінності між зразками невідомого походження та задокументованими сортами, виявлення випадків пересортиці чи фальсифікації садивного матеріалу. Крім того, порівняння мікросателітних профілів нових перспективних гібридів із генетичними профілями вже відомих сортів дозволить визначати ступінь їхньої генетичної новизни ще до завершення процедури офіційного сортовипробування, що може суттєво скоротити терміни введення нових сортів у виробництво.

3.2.4 Оцінка інформативності SSR-маркерів. Для оцінки інформативності досліджених SSR-маркерів використовували такі показники: вміст інформації про поліморфізм (PIC), кількість недиференційованих пар (ND), роздільну здатність (R_p), дискримінаційну здатність (D_L) та індекс Шеннона (I), а також значення спостережувану (H_o) та очікувану (H_e) гетерозиготність. PIC відображає здатність маркера виявляти поліморфізм у популяції незалежно від конкретного складу вибірки. На відміну від PIC, показник D_L безпосередньо відображає ефективність маркера для аналізу конкретної вибірки. Він оцінює ймовірність розрізнення (диференціації) двох довільно обраних зразків і тому є особливо важливим при практичному доборі маркерів для ідентифікації сортів. R_p кількісно характеризує ту саму здатність до розрізнення генотипів, проте без фіксованої верхньої межі, що робить його зручним для порівняння маркерів між собою у межах одного дослідження. Показник ND доповнює ймовірнісні оцінки абсолютним числом. Він вказує, скільки пар генотипів у вибірці залишаться нерозрізненими при застосуванні конкретного маркера або їх комбінації. Чим менше значення ND, тим вища практична ефективність маркера. Значення $ND = 0$ означає повну диференціацію всіх досліджених зразків. Індекс Шеннона (I) кількісно відображає алельне різноманіття в локусі з урахуванням як кількості алелів, так і рівномірності їх розподілу.

Значення показника інформативності PIC коливалося від 0,34 (BR438) до 0,76 (BR259) із середнім значенням 0,62 (табл. 3.3). Серед усіх досліджених локусів лише у BR438 значення PIC було нижчим за поріг у 0,5, який використовують для добору високополіморфних маркерів. Отримане середнє значення PIC перевершує визначене для інших SSR-локусів у вибірці з 75 зразків фундука з Сицилії (0,52) [93] і наближається до значення, встановленого на вибірці з 300 зразків фундука, зібраних із 20 різних районів Фінляндії (0,66) [58]. Вищі значення PIC, зафіксовані в роботах дослідників з Ірану та Китаю [59,95], можуть бути зумовлені більшим розміром вибірок або цілеспрямованим добром

найбільш варіабельних маркерів, тому пряме порівняння цих даних слід здійснювати з обережністю.

Таблиця 3.3

Показники інформативності мікросателітних маркерів, розраховані на основі даних аналізу 25 сортів фундука

Локуси	PIC	PIC*	PIC**	ND	Rp	D_L	I	Ho	He
BR270	0,63	0,48	0,54	47,8	2,485	0,854	1,297	0,640	0,686
BR414	0,52	0,53	0,60	127,6	1,818	0,675	1,098	0,640	0,572
BR438	0,34	0,41	0,54	213,2	1,212	0,490	0,678	0,240	0,367
BR322	0,66	0,56	0,56	56,5	2,727	0,835	1,313	0,840	0,710
GB949	0,76	0,51	0,58	32,6	2,485	0,892	1,657	0,640	0,791
CAC-C008	0,72	0,77	0,78	32,0	2,727	0,899	1,518	0,800	0,765
GB950	0,61	0,64	0,72	62,0	2,667	0,831	1,197	0,760	0,676
BR259	0,72	0,82	0,79	47,6	2,727	0,864	1,559	0,920	0,758
BR464	0,59	0,46	0,58	43,2	2,182	0,901	1,180	0,600	0,652
BR464	0,59	0,46	0,58	43,2	2,182	0,901	1,180	0,600	0,652

Примітки: 1 - * – за Akin et al., 2016 [92]; 2 - ** – за Freixas-Coutin et al., 2019 [94]. 3 - PIC – вміст інформації про поліморфізм; 4 - ND – кількість недиференційованих пар; 5 - Rp – роздільна здатність; 6 - D_L – дискримінаційна здатність; 7 - I – індекс Шеннона; 8 - Ho – спостережувана гетерозиготність; 9 - He – очікувана гетерозиготність.

Оскільки більшість досліджень з оцінки інформативності SSR-маркерів фундука проводилася на різних наборах локусів і різних вибірках зразків, для найкращого порівняння показників інформативності найкраще підходять роботи, в яких аналізували ті самі мікросателітні локуси. Такими роботами є дослідження Akin et al. [92], в якому аналізували вибірку з 83 зразків переважно

американського та європейського походження, та Freixas-Coutin et al. [94], де було проведено генотипування 195 зразків із різних регіонів. Дані цих робіт наведені в таблиці 3.3 для порівняння [92,94].

За даними Akin et al. [92], значення PIC коливалися від 0,41 до 0,82 із середнім 0,59, а найбільш поліморфними були локуси BR259 та CAC-C008 зі значеннями 0,82 та 0,77 відповідно, найменш поліморфним – BR438 (0,41). Порівняння значень PIC, отриманих нами і в роботі цих дослідників, виявило як певну узгодженість у відносному ранжуванні маркерів, так і кількісні відмінності між ними (табл. 3.3). Слід зазначити, що для локусу GB949 нами отримано значно вище значення PIC (0,76) порівняно з Akin et al. [92] (0,51) та Freixas-Coutin et al. [94] (0,58). Така відмінність може свідчити про підвищений рівень алельного різноманіття цього локусу саме серед українських сортів фундука, що, ймовірно, є наслідком особливостей їхньої селекційної історії – зокрема, залучення генетично віддалених вихідних форм при створенні вітчизняних сортів. Спільною закономірністю для всіх трьох досліджень є те, що одні з найвищих значень PIC мали локуси BR259 та CAC-C008, а найнижче – BR438. Це свідчить про відносно високу мінливість цих локусів незалежно від складу вибірки. Для більшості інших локусів, зокрема BR270, BR322, GB949 та BR464, нами отримано порівняно вищі значення PIC хоча використана вибірка в роботі Akin et al. [92] сягала 83 зразків, а в роботі Freixas-Coutin et al. [94] – 195 зразків, що значно перевищує нашу вибірку з 25 зразків. Водночас для локусів BR259 та CAC-C008 нами встановлено нижчі значення PIC (0,72 для обох) порівняно з обома роботами – 0,82 та 0,77 у Akin et al. [92], 0,79 та 0,78 у Freixas-Coutin et al. [94], – що пояснюється меншим розміром нашої вибірки, яка не охоплює повного спектру алельного різноманіття цих найбільш варіабельних локусів.

Значення індексу Шеннона у досліджених локусів коливалося від 0,678 (BR438) до 1,657 (GB949), що є нижчим порівняно з даними, отриманими для природної популяції *C. avellana* в Казахстані, де цей показник варіював від 1,29 до 1,84 [96]. Така різниця є цілком очікуваною, оскільки природні популяції, що

формуються в умовах вільного перехресного запилення між генетично віддаленими особинами, характеризуються значно ширшим спектром алельного різноманіття, ніж вибірки культурних сортів, створених у межах відносно замкнених селекційних програм із обмеженим колом вихідних форм. Нижчі значення I у нашому дослідженні відображають не низьку інформативність використаних маркерів, а реальну генетичну близькість між проаналізованими сортами, яка є закономірним наслідком їхньої спільної селекційної історії.

Разом з тим, варто зазначити, що абсолютні значення індексу Шеннона залежать від розміру вибірки та кількості алелів на локус, що ускладнює пряме зіставлення даних між дослідженнями, які суттєво відрізняються за цими параметрами. Зокрема, аналіз, проведений Копорі́нські [97] на симульованих мікросателітних даних, показав, що оригінальна формула Шеннона систематично занижує справжні значення при малих розмірах вибірок, і що ця похибка сильніше виражена для локусів з більшою кількістю алелів. З огляду на це, значення I у даному дослідженні слід розглядати насамперед як порівняльну характеристику між локусами у межах одного аналізу, а не як абсолютну міру різноманіття для зіставлення з іншими роботами. У цьому контексті ранжування локусів за індексом Шеннона узгоджується з їхнім ранжуванням за PI та кількістю алелів, що свідчить про внутрішню узгодженість отриманих даних.

Величина спостережуваної гетерозиготності (H_o) становила від 0,240 для BR438 до 0,920 для BR259, а очікуваної гетерозиготності (H_e) – від 0,367 для BR438 до 0,758 для BR259, із середніми значеннями 0,676 та 0,664 відповідно. Для порівняння, в дослідженні Akin et al. [92] спостережувана гетерозиготність для окремих локусів коливалася від 0,44 до 0,75 із середнім 0,61, а очікувана – від 0,45 до 0,84 із середнім 0,64. Ці значення дещо нижчі за результати аналізу гібридних сортів, отриманих шляхом схрещування *C. heterophylla* Fisch $\times$ *C. avellana* L. [95] ($H_o = 0,84$), що може пояснюватися меншою вибіркою та географічною специфікою сортів.

Роздільна здатність (R_p), яка кількісно характеризує здатність маркера розрізняти генотипи у вибірці, у нашому дослідженні мала значення від 1,212 для BR438 до 2,727 для CAC-C008, BR322 та BR259, що свідчить про істотні відмінності між маркерами за цим показником.

Значення дискримінаційної здатності (D_L), що характеризує ймовірність відмінностей між двома випадково обраними індивідами за генотипами певного локуса, було найвищим для локуса BR464 (0,901) і найнижчим для BR438 (0,490) із середнім значенням 0,805. Високі значення D_L мали також GB949 (0,892), CAC-C008 (0,899) та BR259 (0,864), що вказує на їхню високу здатність до диференціації генотипів у межах дослідженої вибірки.

Аналіз кількості недиференційованих пар (ND) показав, що жоден з маркерів самостійно не дозволяє розрізнити всі генотипи у проаналізованій вибірці з 25 сортів. Найменше значення ND спостерігалось для CAC-C008 (31,9 пар), GB949 (32,6 пар) і BR464 (43,2 пар), тоді як BR438 мав найвище значення (213,1 пар) серед усіх досліджених локусів, що вказує на його низьку здатність до розрізнення досліджених сортів. Значення ND для комбінації з усіх 9 маркерів на вибірці з 25 зразків дорівнювало 0.

Зіставлення всіх розрахованих показників дає змогу виділити групу найбільш інформативних локусів. CAC-C008, GB949 та BR259 мають найвищі значення PIC, D_L , R_p та індексу Шеннона при одночасно найменших значеннях ND серед усіх досліджених маркерів. Локуси BR322 та BR464 також характеризуються задовільними значеннями більшості показників і можуть розглядатися як доповнення до вищезазначених маркерів. Водночас, BR438 суттєво поступається решті локусів як за PIC (0,34), так і за ND (213,1), а отже є найменш ефективним для диференціації досліджених сортів. Таким чином, вибір оптимальної комбінації маркерів для ідентифікації сортів слід проводити саме серед найбільш інформативних локусів з оцінкою їхньої спільної здатності до диференціації зразків у вибірці необхідного розміру.

3.2.5 Відхилення частот алелів досліджених SSR-локусів від рівноваги Харді–Вайнберга. Рівновага Харді–Вайнберга описує теоретичний розподіл генотипів у ідеальній панміктичній популяції з необмеженою чисельністю, відсутністю мутацій, міграцій та природного добору. Відхилення від рівноваги у вибірці сортів може вказувати на нетипову структуру популяції в результаті селекційного тиску або ефекту засновника, що може впливати на інтерпретацію результатів показників інформативності. Тому перевірка відповідності спостережуваного розподілу теоретичному (очікуваному) є стандартним етапом при характеристиці набору SSR-маркерів у культурних рослин. Для визначення статистичної достовірності відмінностей між очікуваним (H_o) і спостережуваним (H_e) значеннями гетерозиготності використовували критерій χ^2 при рівні значущості 95% ($p < 0,05$).

Для двох із дев'яти досліджених SSR-локусів виявлено достовірні відмінності (рівень значущості 95%) між очікуваною (H_e) та спостережуваною (H_o) гетерозиготністю, що свідчить про відхилення від рівноваги Харді–Вайнберга. Зокрема, для локусу GB949 ($H_o = 0,640$; $H_e = 0,807$; $\chi^2 = 3,904$; $p = 0,024$) зафіксовано надлишок гомозиготних генотипів. Надлишок гомозиготних генотипів у досліджуваній вибірці може бути зумовлений кількома біологічними механізмами.

По-перше, відхилення від рівноваги у бік надлишку гомозигот спостерігається при наддомінуванні – зниженні адаптивної цінності гетерозигот порівняно з гомозиготами [98], що може виявлятися у певних локусах, пов'язаних із господарсько цінними ознаками.

По-друге, суттєву роль може відігравати спрямований добір. За умов спрямованого добору частота алеля, за яким проводиться добір, зростає у кожному наступному поколінні й зрештою прямує до повсюдного переважання в популяції [99], що закономірно призводить до зменшення кількості гетерозиготних генотипів. З огляду на те, що досліджувані сорти є продуктом

цілеспрямованої селекційної роботи, вплив спрямованого добору за комплексом господарських ознак на структуру генотипів виглядає цілком правдоподібним.

По-третє, технічні артефакти, зокрема наявність нульових алелів. Мутація у сайті зв'язування праймера, яка унеможлиблює ампліфікацію одного з алелів, також може штучно завищувати частку гомозигот [100]. Виключити цю причину повністю без додаткового секвенування ділянок зв'язування праймерів неможливо, тому її слід враховувати при інтерпретації результатів.

На противагу цьому, за локусом BR259 ($H_o = 0,920$; $H_e = 0,774$; $\chi^2 = 2,954$; $p = 0,043$) досліджена вибірка має достовірний надлишок гетерозигот. Одним із можливих пояснень може бути селективна перевага гетерозиготних форм, пов'язана з наявністю зчепленого функціонально значущого гена. Зокрема, локус BR259 розташований у п'ятій групі зчеплення (LG5) та зчеплений з S-локусом, який контролює несумісність пилку і приймочки у ліщини (pollen-stigma incompatibility). У селекційних популяціях, де відсутнє випадкове схрещування, такий зв'язок може призводити до накопичення гетерозигот, особливо якщо це забезпечує переваги у репродуктивній здатності. Крім того, надлишок гетерозигот міг виникнути внаслідок ефекту засновника: за умов селекції відносно віддалені батьківські форми могли утворити переважно гетерозиготне F1-покоління, яке згодом було використане як основа для виведення сорту.

3.2.6 Ефективні комбінації SSR-маркерів для диференціації сортів. Для визначення ефективної комбінації маркерів оцінювали здатність досліджених SSR-локусів розрізняти зразки фундука шляхом розрахунку кількості недиференційованих пар зразків для вибірок з 200, 500 та 1000 зразків, виходячи з гіпотези про незалежність наборів утворюваних ними продуктів (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Очікувана ефективність різних комбінацій маркерів для диференціації
генотипів у вибірках різної величини

Комбінації маркерів	ND (200)	ND (500)	ND (1000)
CAC C008 + GB949	24,0	65,2	133,9
CAC C008 + GB949 + BR464	2,4	6,5	13,3
CAC C008 + GB949 + BR464 + BR270	0,3	0,7	1,5
CAC C008 + GB949 + BR464 + BR259	0,3	0,7	1,4
CAC C008 + GB949 + BR464 + BR259 + BR322	0,0	0,1	0,2

Примітка. ND – кількість недиференційованих пар генотипів, розрахована на основі гіпотези про незалежність наборів утворюваних ними продуктів для вибірок з 200, 500 або 1000 зразків.

При застосуванні комбінацій з двох маркерів з найменшими експериментальними значеннями ND, а саме CAC-C008 + GB949, розрахункові показники ND були високими і становили 24,0 недиференційованих пари для вибірки з 200 зразків та понад 100 пар для вибірки з 1000 зразків. У випадку комбінації з трьох маркерів (CAC-C008 + GB949 + BR464) розрахункове значення ND зменшилося до 2,4, 6,5 та 13,3 відповідно для вибірок з 200, 500 і 1000 зразків. При використанні комбінацій з чотирьох маркерів, отриманих шляхом додавання BR270 або BR259, значення ND знижувалося до менше однієї пари для вибірок з 200 і 500 зразків та менше двох пар для вибірки з 1000 зразків. При використанні комбінації з п'яти маркерів CAC-C008 + GB949 + BR464 + BR259 + BR322 значення ND становило 0,0 для 200 зразків, 0,1 для 500 зразків та 0,2 для 1000 зразків.

Загалом, серед досліджених локусів BR414 та BR438 виявилися недостатньо інформативними для використання в якості маркерів для

ідентифікації сортів фундука української селекції. Зазначені локуси мають низькі значення показників інформативності, а також вкрай високі значення кількості недиференційованих пар – 127,6 та 213,1, відповідно.

3.2.7 Структурна організація SSR-локусів. Для вивчення структурної організації мікросателітних локусів було використано власні дані сиквенування, а також геномні послідовності різних видів *Corylus*, знайдені в базах даних NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) та Genomes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/genomes/>).

Для сиквенування були відібрані окремі алелі чотирьох локусів (у дужках вказана назва сорту): BR414 (Софіївський 1), GB950 (Пиріжок), BR259 (Свічковий) та САС-С008 (Корончастий), які у зазначених сортів знаходилися в гомозиготному стані і при ампліфікації з специфічними праймерами формували чіткі одиночні смуги. Завдяки вибору генотипів із локусами у гомозиготному стані вдалося одержати гомогенні продукти ПЛР, які після електрофоретичного розділення вирізували і використали для подальшого клонування та сиквенування. Для підтвердження специфічності досліджених ділянок визначені нуклеотидні послідовності аналізували з використанням бази даних NCBI GenBank. Після цього їх депонували у базі даних NCBI GenBank під номерами PV926123 – PV926126.

В базах даних NCBI було знайдено варіанти всіх дев'яти локусів для різних зразків *C. avellana*, а також інших видів роду: *C. americana*, *C. chinensis*, *C. colurna*, *C. heterophylla* (див. табл. 2.4). В ході вивчення структурної організації мікросателітних локусів аналізували склад наявних простих повторів, їхню мінливість, а також присутність інших мутацій (делецій або інсерцій), які впливають на довжину очікуваних ПЛР-продуктів. Повний перелік проаналізованих послідовностей разом із характеристиками простих повторів та розміром виявлених алелів наведено у додатку Б.

Аналіз нуклеотидних послідовностей досліджених мікросателітних локусів з геномів різних видів *Corylus* показав, що за структурною організацією

ділянки простих повторів їх можна розподілити на дві групи (табл. 3.5). До першої належать локуси з простою однорідною ділянкою, сформованою тринуклеотидними повторами (BR259, BR270, BR322, BR414 та BR464). У цих локусів мінливість довжини алелів зумовлена виключно варіаціями у кількості копій відповідного триплету, що забезпечує формування алельного ряду з регулярним кроком, кратним трьом нуклеотидам, без додаткових делецій чи інсерцій у прилеглих ділянках.

До другої групи належать локуси зі складною або комбінованою організацією повторюваної ділянки (BR438, GB949, GB950 та CAC-C008) (табл. 3.5). Наприклад, для BR438 та GB950 характерне поєднання динуклеотидного та тринуклеотидного повторів у межах одного локусу, тоді як в локусах CAC-C008 та GB949 виявлено два різних тринуклеотидних повтори, розділені інсерцією.

У локусах цієї групи мінливість розміру алелів може бути зумовлена як зміною кількості копій кожного з окремих повторів, так і наявністю інсерцій та делецій, що призводить до відмінностей між варіантами локусу, не завжди кратних розміру базового мотиву. Такі особливості структурної організації значно ускладнюють інтерпретацію результатів ПЛР-аналізу, оскільки здатні призводити до формування ПЛР-продуктів однакового розміру, але з різною нуклеотидною послідовністю. Водночас внаслідок комбінованої структури ці локуси мають більший набір варіантів послідовності, а отже й потенційно більшу інформативність для молекулярно-генетичного аналізу зразків фундука.

Таблиця 3.5

Варіанти досліджених мікросателітних локусів,
знайдені в базах даних NCBI

Локуси	Варіанти мотивів
BR270	(CTG) ₆₋₈
BR414	(AAT) ₄₋₁₂

BR464	(ATC) ₇₋₁₂
BR322	(ACT) ₇₋₉
BR259	(TCA) ₅₋₁₂
CAC-C008	(AAT) ₄₋₉ (AAG) ₃₋₁₆ (AAT) ₄₋₉ (AAG) ₃₋₁₆ (AAG) ₃₋₁₃
GB950	(TGG) ₄₋₇ (GA) ₄₋₅ (TGG) ₄ TCGTGG(GA) ₄ TAG(TGGTGC) ₂ TGG(GA) ₄ (TGG) ₂ TGCTG(TGC) ₃ TGG(GA) ₄
GB949	(TGG) ₁₀ (TGG) ₃₋₇ (TGA) ₁₋₂ (TGG) ₃₋₄ (TGG) ₂ TGAGGG(TGG) ₃ (TGA) ₂ (TGG) ₃
BR438	(CT) ₁₆ (TCA) ₈ (CT) ₈₋₁₃ (GTCT) ₁₋₂ (TCA) ₈₋₁₀ (CT) ₈₋₁₁ (GT) ₁₋₂ (GTCT) ₂ (TCA) ₆₋₈

Нижче коротко представлена характеристика різноманіття алелів окремих мікросателітних локусів з числа досліджених. Повну інформацію про варіанти локусів, знайдених в базах даних NCBI, наведено в таблиці у Додатку Б. Локус BR259 у представників роду *Corylus* містить тринуклеотидний повтор (TCA)_n, для якого спостерігається варіація кількості базових одиниць від п'яти до дванадцяти, що відповідає варіантам розміром від 229 до 249 п.н. Така мінливість пояснює кратні трьом відмінності у розмірі алелів, виявлених шляхом ПЛР аналізу. У сорту «Свічковий» (PV926123) до складу локусу входить повтор (TCA)₈, що відповідає варіанту довжиною 237 п.н., який вписується у загальний ряд варіантів цього локусу, знайдених у інших видів. Частотний розподіл алелів локусу BR259 наближений до нормального (рис. 3.8), що узгоджується з простою структурною організацією локусу. Така структура зумовлює формування алелів із різною кількістю повторів без різкого домінування одного варіанта.

Локус BR414 містить тринуклеотидний повтор $(AAT)_n$, для якого спостерігається варіація кількості одиниць у межах від чотирьох до дванадцяти, що відповідає алелям з розміром 112-137 п.н. У сорту «Софіївський 1» (PV926124) ділянка повторів представлена $(AAT)_7$, що відповідає алелю довжиною 125 п.н., розташованому в центрі розподілу алелів цього локусу. Порівняння з послідовностями з GenBank свідчить про наявність як коротших $(AAT)_{4-6}$, так і довших $(AAT)_{8-12}$ варіантів у різних видів і сортів, що вказує на зміни числа повторів упродовж еволюції локусу. Частотний розподіл алелів BR414 характеризується домінуванням одного варіанта 125 п.н., що пояснюється простою, однорідною структурою повтору та відсутністю перерваних або комбінованих мотивів, які могли б сприяти формуванню більш розсіяного спектра алелів.

Локус SAC-C008 має складну, комбіновану будову ділянки повторів, що сформована двома різними тринуклеотидними мотивами – $(AAT)_n$ та $(AAG)_m$, кількість яких відрізняється у видів *Corylus*. В базі даних GenBank знайдено алельні варіанти з розмірами в широкому діапазоні від 202 до 244 п.н., різниця між якими не завжди кратна розміру простого повтору, що характерно для SSR-локусів з однорідними повторами. Комбіновані повтори можуть виникати внаслідок кількох механізмів: формування вторинних структур ДНК, локальних рекомбінацій між гомологічними повторюваними ділянками або послідовних одонуклеотидних замін, які перетворюють один тип тринуклеотиду на інший. Подібне чергування добре узгоджується з моделями еволюції мікросателітів, які припускають, що зміна одного тринуклеотиду може передувати подальшій експансії нового повтору з формуванням комбінованих повторів у межах одного локусу [101].

Для локусу SAC-C008 виявлено також перебудови внутрішньої організації у вигляді інсерції довжиною 12 п.н., яка присутня у кількох геномах різних видів, а також делеції розміром 20 п.н. у геномі одного із зразків *C. colurna*. У сорту «Корончастий» (PV926125) локус представлений алелем розміром 205 п.н., що

містить комбінацію повторів $(AAT)_5(AAG)_8$. Цей варіант подібний за організацією до виявлених у деяких інших представників *C. avellana* (DQ151612, NC_081543), *C. chinensis* (CM106773) та *C. colurna* (OZ247465), проте є простішим порівняно з більш довгими та перерваними варіантами повторів, характерними для *C. colurna* (CBDDSP010000003), *C. americana* та *C. heterophylla* (рис. 3.4).

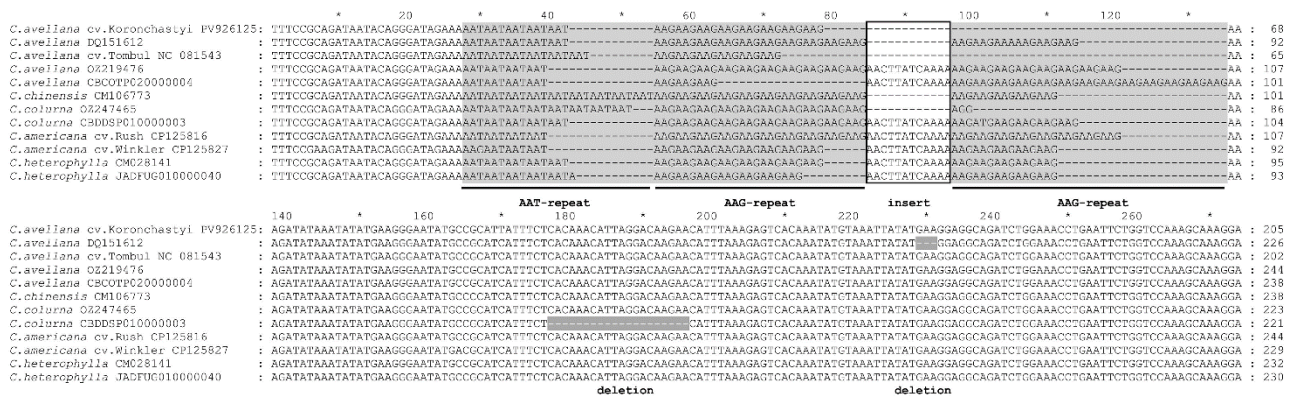


Рис. 3.4. Структурна організація мікросателітного локусу SAC-C008 в геномах видів *Corylus*. Сірим кольором виділено ділянки простих повторів, рамкою показано ділянку інсерції

Вказана в роботі Akin et al., 2016 [92] структурна організація цього локусу, яка містить перерваний однорідний повтор $(AAG)_{11}(AAG)_3$, відрізняється від визначеної нами. У виявлених нами варіантах локусу повтор $(AAG)_n$ закономірно зберігається та представлений більшою кількістю копій, але водночас варіабельністю за числом копій характеризується і блок повторів $(AAT)_m$, про який не згадують зазначені автори. Така складна організація разом із наявністю в окремих геномах інсерції довжиною 12 п.н., яка ділить повтор $(AAG)_n$ на дві частини, впливає на характер мінливості довжини різних варіантів локусу SAC-C008, оскільки внесок у неї вносять зміни в кількості обох типів повторів. Крім того, у двох випадках було виявлено делеції, що також впливають на розмір алелів.

Визначена структурна організація локусу САС-С008 дозволяє пояснити асиметричний розподіл алелів із широким розмахом розмірів, знайдених шляхом ПЛР аналізу (рис. 3.8). Такий розподіл зазвичай свідчить про підвищену внутрішню мінливість локусу, яка характерна саме для мікросателітів із комбінованими повторами. Доведено, що наявність двох ділянок з різними повторами у межах одного мікросателіту значно підвищує його мінливість, що призводить до формування більшої кількості варіантів [102]. Це підтверджують також результати Akin et al. [92] та Freixas-Coutin et al. [94], які показали, що локус САС-С008 має одну з найбільших кількостей алелів серед досліджених.

Для локусу GB950 властива складна та варіабельна структура повторюваної ділянки, в основі якої лежить тринуклеотидний мотив $(TGG)_n$, (рис 3.5) який може перериватися додатковими вставками тринуклеотиду TCG та інших похідних TGG, що виникли імовірно в результаті точкових замін [103]. В геномах представників роду *Corylus* для цього локусу виявлено варіанти розміром 153–162 п.н., відмінності яких за розміром загалом пояснюються мінливістю кількості тринуклеотидних повторів, однак в окремих випадках спостерігається відхилення від цієї закономірності, як от у випадку *C. chinensis* (CM106773), де в одному з повторів відбулася одонуклеотидна делеція. На противагу цьому, в геномах *C. colurna* (OZ247469, CBDDSP01000000), *C. heterophylla* (CM028145) та у *C. avellana* (KT943908) цей повтор є гомогенним. Крім того, ближче до 5'-кінця локусу розташований динуклеотидний повтор $(GA)_4$, (рис 3.5), який в геномі одного із зразків *C. colurna* (CBDDSP010000007) подовжений до $(GA)_5$, і такі відмінності можуть накладатися на мінливість довжини локусу, зумовлену варіаціями у кількості одиниць основного повтору $(TGG)_n$.

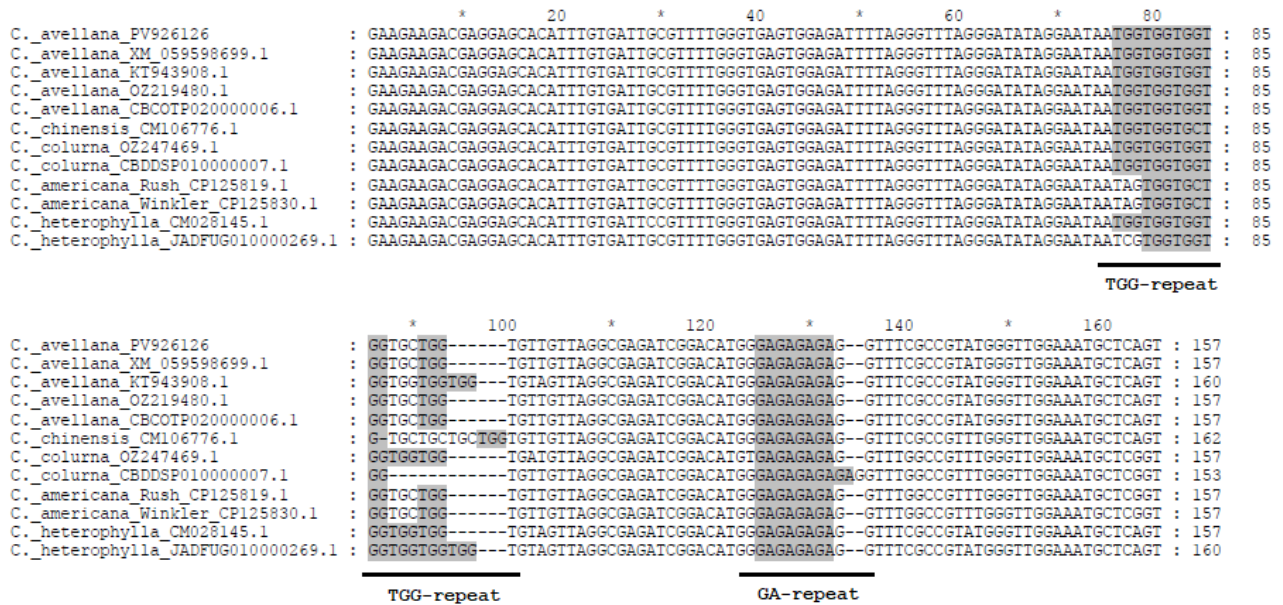


Рис. 3.5. Структурна організація мікросателітного локусу GB950 в геномах видів *Corylus*. Сірим кольором виділено ділянки простих повторів

У *C. chinensis* (CM106776) виявлено незвичайний варіант ділянки повторів локусу GB950, а саме $(TGG)_2TGCTG(TGC)_3$. Цей варіант суттєво відрізняється від типових для цього локусу, які містять однорідний або перерваний повтор $(TGG)_n$, і утворився імовірно в результаті точкової заміни $G \rightarrow C$ з подальшою експансією похідного мотиву TGC та одонуклеотидної делеції в одному з тринуклеотидів, що вказує на давність цієї еволюційної події. Такі одонуклеотидні заміни відбуваються з меншою частотою, ніж зміна кількості повторів, та можуть бути інформативними для досліджень мікроеволюційних процесів. Зокрема, переривання мікросателіту підвищує його стабільність та зменшує частоту подальших мутацій, завдяки чому змінена послідовність є кращим популяційним маркером порівняно зі звичайними повторами [103]. У *C. americana* (CP125819, CP125830) спостерігається істотна зміна організації повторюваної ділянки, а саме присутня точкова заміна $G \rightarrow C$ і формування шестинуклеотидного повтору $(TGGTGC)_2$, якому передують змінений тринуклеотид TAG. У сорту «Пиріжок» (PV926126) локус представлений алелем

розміром 157 п.н. з ділянкою повторів $(TGG)_2TCG(TGG)_3$, яка відрізняє його від решти зразків *C. avellana*, для більшості яких властивий варіант тієї ж довжини, але зі структурою повтору $(TGG)_4TCGTGG$.

Локус BR270 характеризується простою організацією ділянки повтору, сформованої тринуклеотидним мотивом $(CTG)_n$. У послідовностях з бази даних GenBank кількість повторів варіює від шести до восьми, що відповідає алелям розміром 92–98 п.н. Відмінності в розмірі варіантів локусу зумовлені лише варіаціями у кількості одиниць повтору. У *C. avellana*, *C. chinensis* та *C. americana* переважають алелі з шістьма або вісьмома повторами, тоді як у *C. colurna* та *C. heterophylla* частіше виявляються проміжні варіанти з сімома повторами.

Локус BR322 містить простий повтор $(ACT)_n$, для якого в геномах представників роду *Corylus* спостерігається відносно обмежена варіабельність кількості повторів. За даними GenBank, кількість мотивів варіює переважно від семи до восьми, рідше до дев'яти, що відповідає алелям розміром 105–111 п.н. Повтори $(ACT)_7$ та $(ACT)_8$ зустрічаються переважно у зразках *C. avellana*, *C. chinensis* та *C. colurna*, тоді як у *C. americana* (CP125824) виявлено варіант $(ACT)_9$ з довжиною 111 п.н. Відмінності за довжиною між усіма знайденими варіантами цього локусу зумовлені лише варіаціями в числі повторюваних одиниць без додаткових делецій чи інсерцій.

Локус GB949 містить перерваний повтор, сформований тринуклеотидним мотивом $(TGG)_n$ з вставкою тринуклеотиду TGA (рис 3.6) або більш складних фрагментів. Кількість повторів TGG у першому блоці варіює від чотирьох до семи, після чого спостерігається вставка TGA, а далі розташований другий блок з чотирьох тринуклеотидів TGG. Ця ділянка представлена у одного зі зразків *C. colurna* (CBDDSP010000008) $(TGG)_{10}$, а у *C. americana* cv. Winkler (CP125835) зазнала значних змін у вигляді точкових мутацій в окремих одиницях першої частини повтору, що призвели до його переривання в кількох місцях. Розмір знайдених варіантів варіює у діапазоні 147–162 п.н.

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
C._avellana_CBCOTP020000007.1 : TTTGGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGG : 79
C._avellana_KT943907 : TTTGGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGG : 79
C._avellana_OZ219483.1 : TTTGGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGG : 70
C._avellana_Tombul_NC_081549.1 : TTTGGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGG : 76
C._chinensis_CM106779.1 : TTTAGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGG : 79
C._colurna_OZ247470.1 : TTTGGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGG : 73
C._colurna_CBDDSP010000008.1 : TTTGGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGGT : 80
C._americana_Rush_CP125822.1 : TTTGGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGGT : 80
C._americana_Winkler_CP125833.1 : TTTGGAGGGAGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGGT : 79
C._heterophylla_CM028147.1 : TTTGGAGGGTGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGGT : 76
C._heterophylla_JADFUG010000054.1 : TTTGGAGGGTGACAGTTTGGCGGGATTGGGAAGTGAGGATCTGTAGGGCTTGCTGGAATGGTGGTGGTGGTGGTGGT : 76

      *           100          *           120          *           140          *
C._avellana_CBCOTP020000007.1 : --TGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGAGGAGGAGGAGCCAAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 156
C._avellana_KT943907 : --TGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGACGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 156
C._avellana_OZ219483.1 : --TGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGACGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 147
C._avellana_Tombul_NC_081549.1 : --TGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGAGGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 153
C._chinensis_CM106779.1 : --TGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATAGAGGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 156
C._colurna_OZ247470.1 : --TGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGAGGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 150
C._colurna_CBDDSP010000008.1 : GGTGGTGG-----GAAGGAGTGGCAATGGAGGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 150
C._americana_Rush_CP125822.1 : GGTGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGAGGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 159
C._americana_Winkler_CP125833.1 : --TGATGATGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGAGGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 156
C._heterophylla_CM028147.1 : --TGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGACGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 153
C._heterophylla_JADFUG010000054.1 : --TGATGGTGGTGGTGGGAAGGAGTGGCAATGGACGAGGAGGAGGCCAAGGATGACGAACTCTCTCATTCTTGGCCCAACC : 153

```

Рис. 3.6. Структурна організація мікросателітного локусу GB949 в геномах видів *Corylus*. Сірим кольором виділено ділянки простих повторів

Локус BR438 містить дві ділянки повторів: одна сформована динуклеотидним повтором (СТ)_n, а друга містить простий повтор (ТСА)_m (рис 3.7). В геномах видів *Corylus*, представлених у GenBank, кількість повторів СТ становить 8-16, а кількість повторів ТСА – 6-10, що відповідає діапазону розмірів варіантів 181-205 п.н. Внаслідок такої організації відмінності між варіантами локусу за довжиною не завжди кратні трьом. Основними мутаційними подіями для BR438 є зміна кількості повторів тринуклеотиду ТСА і динуклеотиду СТ, що призводить до зміни співвідношення цих двох мотивів. Водночас на 5'-кінці повтору (СТ)_n розташована мінлива ділянка, довжина якої варіює від 4 у *C. chinensis* (GTCT) до 14 нуклеотидів у *C. americana* cv. Rush (GT)₃CA(GTCT). У більшості зразків вона представлена повтором (GTCT)₂. Другий простий повтор найчастіше представлений (ТСА)₈. Виключення становлять один зразок *C. avellana* (OZ219479) та *C. chinensis* (CM106775), у яких повтор подовжений до (ТСА)₁₀ та (ТСА)₉, і зразки *C. colurna*, в яких цей локус навпаки містить скорочений варіант (ТСА)₆ або (ТСА)₇.

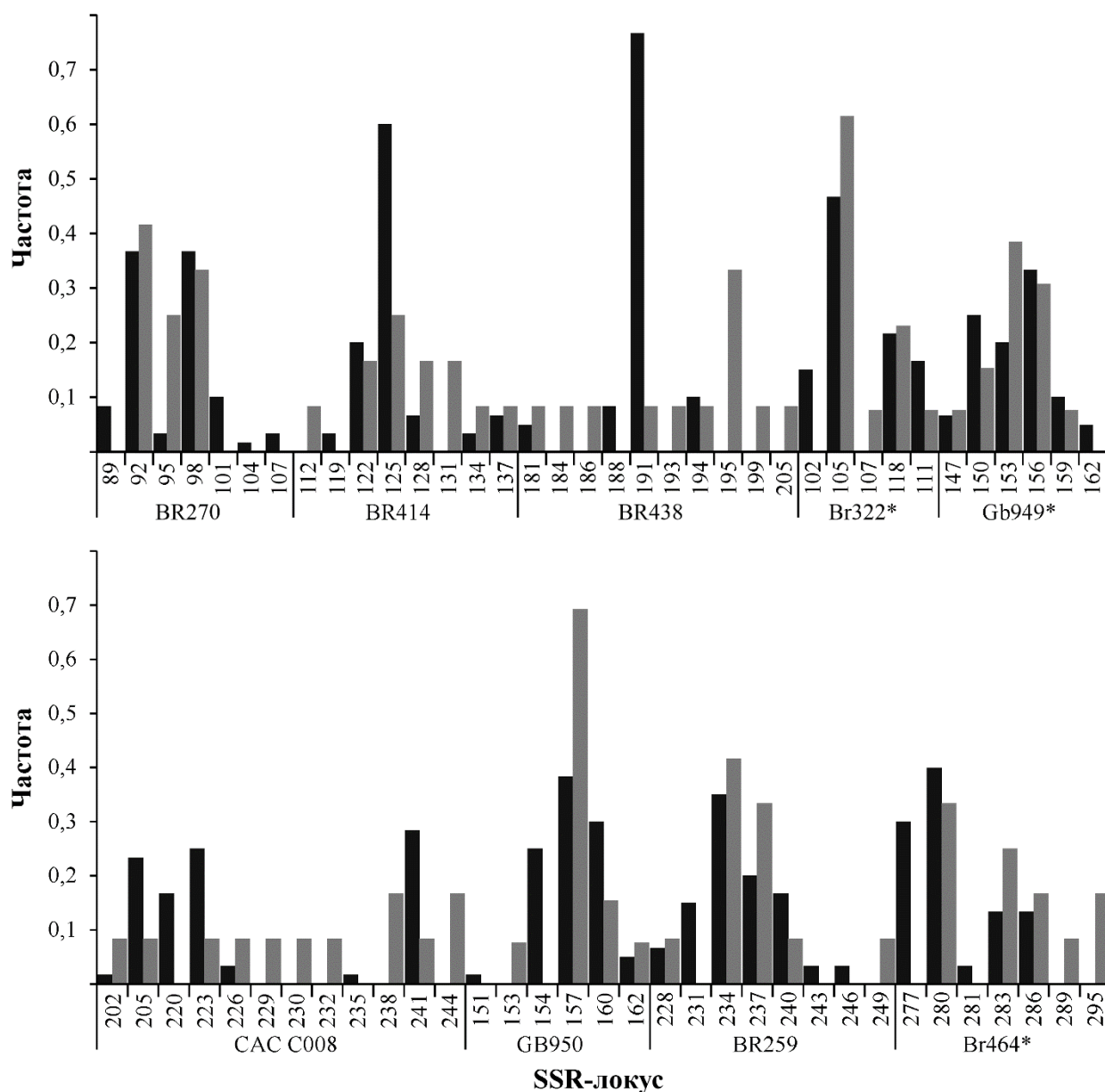


Рис. 3.8. Розподіл частот алельних варіантів досліджених мікросателітних локусів: ■ – за даними ПЛР аналізу сортів фундука української селекції; ■ – за результатами аналізу нуклеотидних послідовностей з баз даних NCBI. Під стовпчиками вказано розміри відповідних алелів в п.н. Розміри алелів для локусів, помічених зірочкою, скориговано за результатами їх оцінки по нуклеотидним послідовностям

Для більшості локусів розподіл виявився подібним. Зокрема, це стосується локусів із одним простим повтором. Для частини локусів кількість алелів була

подібною або більшою у вибірці українських сортів, хоча до вибірки зразків з баз даних NCBI додатково увійшли ще два види. В інших випадках – для локусів із комбінованими повторами, таких як CAC-C008 та BR438, – кількість виявлених у вибірці українських сортів алельних варіантів була меншою, що узгоджується зі складнішою структурною організацією цих локусів та їхньою підвищеною схильністю до мутаційних перебудов.

3.3 Аналіз поліморфізму iPBS-маркерів

3.3.1 Скринінг та відбір інформативних iPBS-праймерів. Наступним етапом нашого дослідження стала перевірка можливості застосування для молекулярно-генетичного аналізу українських сортів фундука методу iPBS, в якому використовують праймери, розроблені на основі консервативних послідовностей сайтів зв'язування тРНК LTR-ретротранспозонів [7]. На першому етапі роботи провели скринінг 24-х iPBS-праймерів, описаних у дослідженні Kalendar et al. [7], з метою відбору тих, які в ПЛР з ДНК сортів і видів *Corylus* продукують найбільш поліморфні набори продуктів ампліфікації. Для цього використали ДНК п'яти зразків ліщини, що включали культурні сорти фундука і види *Corylus*. Результати оцінки поліморфізму отриманих спектрів ПЛР-продуктів наведено в *табл. 3.6*.

Таблиця 3.6

Перелік досліджених iPBS-праймерів

Назва	Кільк. ПЛР-фрагментів	Кільк. поліморфних ПЛР-фрагментів	Частка поліморфних ПЛР-фрагментів (%)
2231	10	6	60
2249	12	9	75
2085	9	7	77,8
2378	10	8	80
2076	8	6	75

Продовж. таблиці 3.6

Назва	Кільк. ПЛР-фрагментів	Кільк. поліморфних ПЛР-фрагментів	Частка поліморфних ПЛР-фрагментів (%)
2380	12	12	100
2382	11	10	90,9
2232	13	12	92,3
2277	15	14	93,3
2272	11	9	81,8
2252	12	12	100
2251	25	16	64
2253	20	16	80
2376	8	5	62,5
2402	22	21	95,4
2415	14	11	78,6
2273	8	7	87,5
2378	6	4	66,7
2229	17	16	94,1
2219	9	9	100
2377	11	9	81,8
2395	12	12	100
2373	11	7	63,6
2374	13	9	69,2

Примітка. Жирним виділено праймери, які були відібрані для подальшого аналізу інформативності з повною вибіркою зразків.

Приклади спектрів ПЛР-продуктів деяких з відібраних iPBS-праймерів наведено на рис. 3.9.

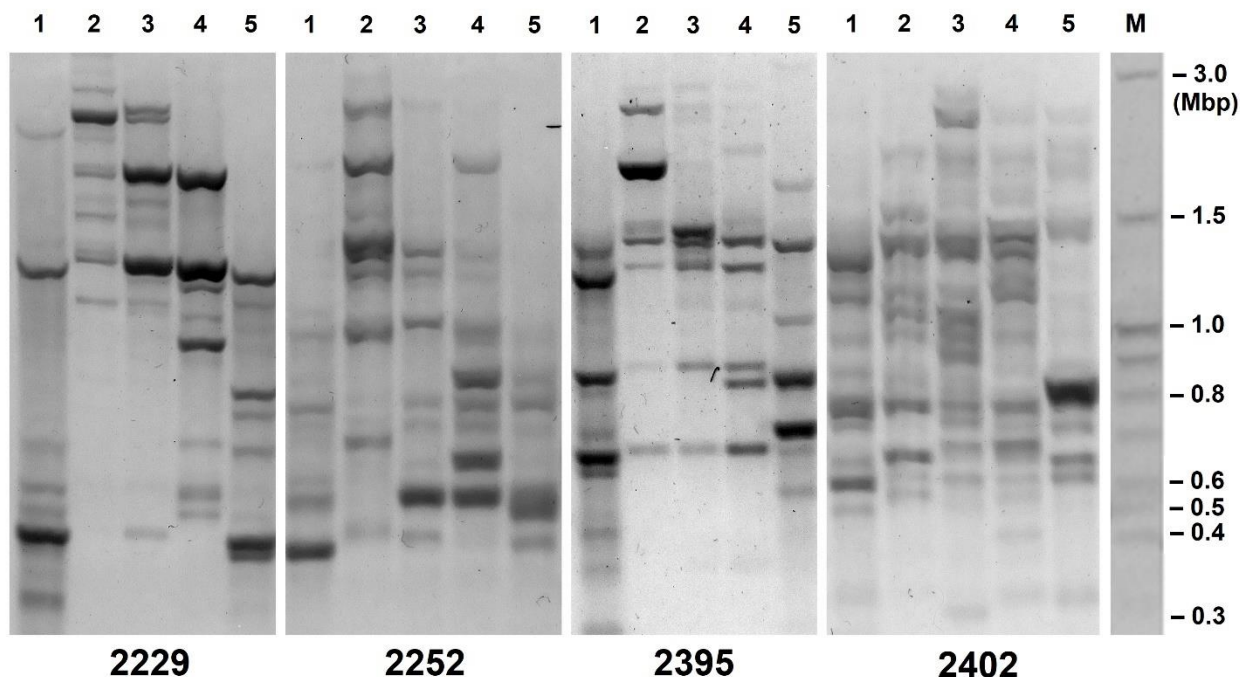


Рис 3.9. Електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів, отримані з деякими з відібраних іPBS праймерів для ДНК тестової вибірки з п'яти зразків: 1 – *C. avellana* f. *fuscorubra*; 2 – *C. chinensis*; 3 – Гарібальді; 4 – Дар Павленка; 5 – Україна 50. М – молекулярний маркер, 100bp DNA ladder

Електрофоретичні спектри оцінювали за чіткістю та поліморфністю продуктів ампліфікації, отриманих із зразками ДНК тестової вибірки. Праймери, для яких була характерна велика кількість мономорфних або нечітких смуг, з подальшого аналізу виключали. За результатами скринінгу відібрали 6 праймерів з найбільш чіткими та поліморфними продуктами ПЛР: 2229, 2232, 2252, 2277, 2395 та 2402. В подальшому провели оцінку їхньої інформативності на основі результатів ПЛР-аналізу 30 зразків сортів фундука та видів ліщини.

3.3.2 Показники інформативності відібраних іPBS-праймерів. Загальна кількість продуктів ампліфікації 25 сортів фундука з використанням шести відібраних праймерів становила 95 і коливалася від 11 для праймера 2229 до 25 для праймера 2402 із середнім значенням 15,8 фрагментів на праймер (табл. 3.7). Всі продукти досліджених праймерів були поліморфними, за винятком праймера 2395, у якого виявили один мономорфний фрагмент. Кількість продуктів

ампліфікації, отриманих в ПЛР з відібраними праймерами, у нашому дослідженні в цілому є порівнюваною з аналогічними даними інших авторів для різних об'єктів дослідження. Зокрема, при аналізі 18 генотипів петрушки (*Petroselinum crispum*) середня кількість ампліфікованих фрагментів на праймер становила 11,3 [104]. У iPBS-аналізі 35 та 13 сортів винограду з Китаю та Словаччини кількість ампліфікованих фрагментів на праймер становила 6,6 та 11,6 відповідно [105,106]. Для вибірки з 80 зразків трьох видів роду *Zanthoxylum* середня кількість смуг становила 12,7 [107], а для капусти – 14 [108].

Таблиця 3.7

Показники інформативності відібраних iPBS-праймерів

	2229	2232	2252	2277	2395	2402	Середнє
B	11	14	12	19	14	25	15,8
Rp	5,690	6,960	3,540	8,800	5,040	10,560	6,760
D_L	0,942	0,946	0,931	0,955	0,957	0,960	0,948
ND	4,0	4,0	9,0	1,0	1,0	0,0	3,2
He	0,285	0,224	0,199	0,253	0,216	0,270	0,240
uHe	0,289	0,226	0,201	0,256	0,218	0,273	0,240
PIC	0,32	0,32	0,26	0,32	0,28	0,29	0,30

Примітки: 1 - B – загальна кількість ампліфікованих смуг; 2 - Rp – роздільна здатність; 3 - D_L – дискримінаційна здатність; 4 - ND – кількість недиференційованих пар; 5 - He – очікувана гетерозиготність; 6 - uHe – незважена очікувана гетерозиготність; 7 - PIC – вміст інформації про поліморфізм.

Значення показника PIC для відібраних iPBS-праймерів коливалося від 0,26 для праймера 2252 до 0,32 для праймерів 2229 та 2232 із середнім значенням 0,30 (табл. 3.7). Отримані значення свідчать про здатність використаних маркерів виявляти міжсортів відмінності та є задовільними для домінантних

маркерів типу iPBS, для яких теоретично максимальне значення PIC становить 0,5. Подібні значення цього показника зафіксовано і в інших дослідженнях з використанням iPBS-маркерів: при аналізі бобів середнє значення PIC становило 0,330 [109], у дослідженні генетичного різноманіття собачої кропиви (*Leonurus cardiaca* L.) – 0,29 [110], а при аналізі картоплі – 0,23 [34]. Таким чином, отримані нами значення PIC знаходяться в межах діапазону, характерного для iPBS-маркерів при дослідженні генетичного різноманіття різних культурних рослин.

Середнє значення роздільної здатності (R_p) для шести використаних iPBS-праймерів становило 6,76, варіюючи від 3,54 для праймера 2252 до 10,56 для праймера 2402. Дискримінаційна здатність (D_L) iPBS-маркерів виявилася стабільно високою: середнє значення склало 0,948 при коливаннях у межах 0,931-0,960 (табл. 3.7). Це означає, що ймовірність правильного розрізнення двох довільно обраних генотипів у вибірці перевищує 93%. Вузкий діапазон значень D_L свідчить про відсутність праймерів з низькою ефективністю за цим показником серед числа відібраних.

Кількість недиференційованих пар (ND) для iPBS-маркерів варіювала від 0 до 9, в середньому становила 3,2. Зокрема, праймер 2402 дозволив розрізнити всі генотипи 25 досліджених сортів, а праймери 2277 та 2395 не змогли розрізнити лише одну пару генотипів.

3.3.3 Ефективні комбінації iPBS-праймерів для диференціації зразків фундука. Для визначення оптимальної комбінації маркерів для диференціації зразків фундука провели оцінку ефективності iPBS-праймерів шляхом розрахунку кількості недиференційованих пар для вибірок із 200, 500 та 1000 зразків, виходячи з припущення про незалежність наборів утворюваних ними продуктів. Результати цих розрахунків представлені у табл. 3.8. Теоретично, одного праймера 2402 достатньо для аналізу невеликих вибірок до тридцяти зразків фундука, проте для більшої надійності ідентифікації доцільним є застосування щонайменше двох праймерів. Зокрема, для дослідження вибірок

понад 200 зразків можна рекомендувати проведення аналізу з використанням праймера 2402 у поєднанні з праймерами 2277 чи 2395.

Таблиця 3.8

Очікувана ефективність різних комбінацій праймерів для диференціації генотипів фундука у вибірках різної величини

iPBS-праймери	ND(200)	ND(500)	ND(1000)
2402	0	0	0
2277 або 2395	14,6	39,6	81,2
2277 та 2395	0,0	0,1	0,3

Примітка. ND – кількість недиференційованих пар генотипів, розрахована на основі гіпотези про незалежність наборів утворюваних ними продуктів для вибірок з 200, 500 або 1000 зразків.

3.3.4 Порівняння інформативності iPBS та SSR-маркерів. Ефективність відібраних iPBS-маркерів оцінювали шляхом порівняння з SSR-маркерами, результати визначення інформативності яких наведені у розділі 3.2. Порівняння здійснювали за показниками роздільної здатності (R_p), дискримінаційної здатності (D_L) та кількості недиференційованих пар (ND) на однаковій вибірці з 25 сортів, що забезпечило коректність співставлення результатів, незважаючи на відмінності у природі порівнюваних маркерів.

За показником роздільна здатність iPBS-маркери істотно переважають SSR-маркери. Для останніх значення R_p варіювало від 1,210 до 2,730, що приблизно втричі нижче за аналогічні показники для iPBS-маркерів (6,760). Причиною вищого рівня роздільної здатності iPBS-маркерів є, в першу чергу, значно більша кількість поліморфних фрагментів на праймер. При використанні SSR-аналізу з однією парою праймерів можливо ампліфікувати лише один конкретний локус, який у диплоїдних організмів представлений максимум двома

алелями. Натомість в ПЛР з iPBS-праймером відбувається ампліфікація великої кількості локусів одночасно, що і забезпечує значно вищі значення R_p .

За показником дискримінаційної здатності iPBS-маркери також перевершили SSR-маркери. Для останніх величина D_L варіювала від 0,490 до 0,901 із середнім значенням 0,805, тоді як для iPBS-маркерів середнє значення становило 0,948. Це свідчить про вищу ймовірність правильного розрізнення двох довільно обраних генотипів у вибірці при використанні iPBS-маркерів порівняно із SSR-маркерами.

Найбільшою є різниця між двома типами маркерів за показником ND. Для SSR-маркерів його значення коливалося від 31,92 до 213,2 нерозрізнених пар, що на кілька порядків перевищує показники iPBS-маркерів, жоден з яких не перевищував 9, а кількість недиференційованих пар дорівнювала в середньому 3,2. Показово, що серед досліджених SSR-маркерів не виявлено жодного, за допомогою якого можна диференціювати всі досліджені зразки, тоді як за використання iPBS-праймера 2402 вдалося диференціювати всі 25 генотипів. Таким чином, iPBS-маркери характеризуються вищою чутливістю та дозволяють ефективно розрізняти зразки вже при використанні одного-двох праймерів, що робить їх перспективним «польовим» інструментом для диференціації сортів фундука.

3.4 Кластерний аналіз сортів фундука з використанням iPBS та SSR-маркерів

Для оцінки генетичної подібності досліджених сортів порівняли структуру дендрограм, отриманих з використанням SSR та iPBS-маркерів. Дендрограми генетичної подібності будували методом UPGMA у програмі MEGA6 на основі матриць попарних генетичних відстаней, розрахованих для обох наборів маркерів за допомогою програмного забезпечення GenAlEx.

3.4.1 Дендрограма на основі SSR-маркерів. Дендрограма, побудована на основі даних аналізу SSR-маркерів, дозволила простежити генетичні зв'язки між сортами з відомим родоводом та оцінити ступінь відповідності між кластерною структурою та селекційним походженням досліджених зразків. Для вкорінення дендрограми використали вид *C. colurna*, оскільки його не використовували для схрещувань при створенні жодного з досліджених сортів.

Більшість сортів селекції Науково-дослідного інституту квітництва та субтропічних культур (м. Сочі) розташувалися на дендрограмі в одному кластері разом із сортом Трапезунд. Зокрема, це сорти Караманівський та Гордієнко, походження яких пов'язане із сортом Черкеський 2, однак при цьому сорт Караманівський знаходиться в іншій групі (рис. 3.10, позначені трикутником).

Сорти, створені в Інституті лісового господарства та агролісомеліорації імені Г. М. Висоцького, не формують окремої групи та рівномірно розподілені по всіх утворених кластерах (рис. 3.10, позначені колом), що може вказувати на те, що для їхнього виведення залучали більш генетично різноманітний вихідний матеріал.

Сорти селекції Національного дендрологічного парку «Софіївка» на дендрограмі увійшли до двох різних підгруп в межах одного великого кластеру (рис. 3.10, позначені ромбом), що певною мірою відображає складність їхнього генетичного походження. Сорти Софіївський 1, Софіївський 2 і Софіївський 15 розташовані в одному кластері разом зі зразком *C. chinensis*, сортом Гарібальді та *C. avellana* f. *fuscorubra*.

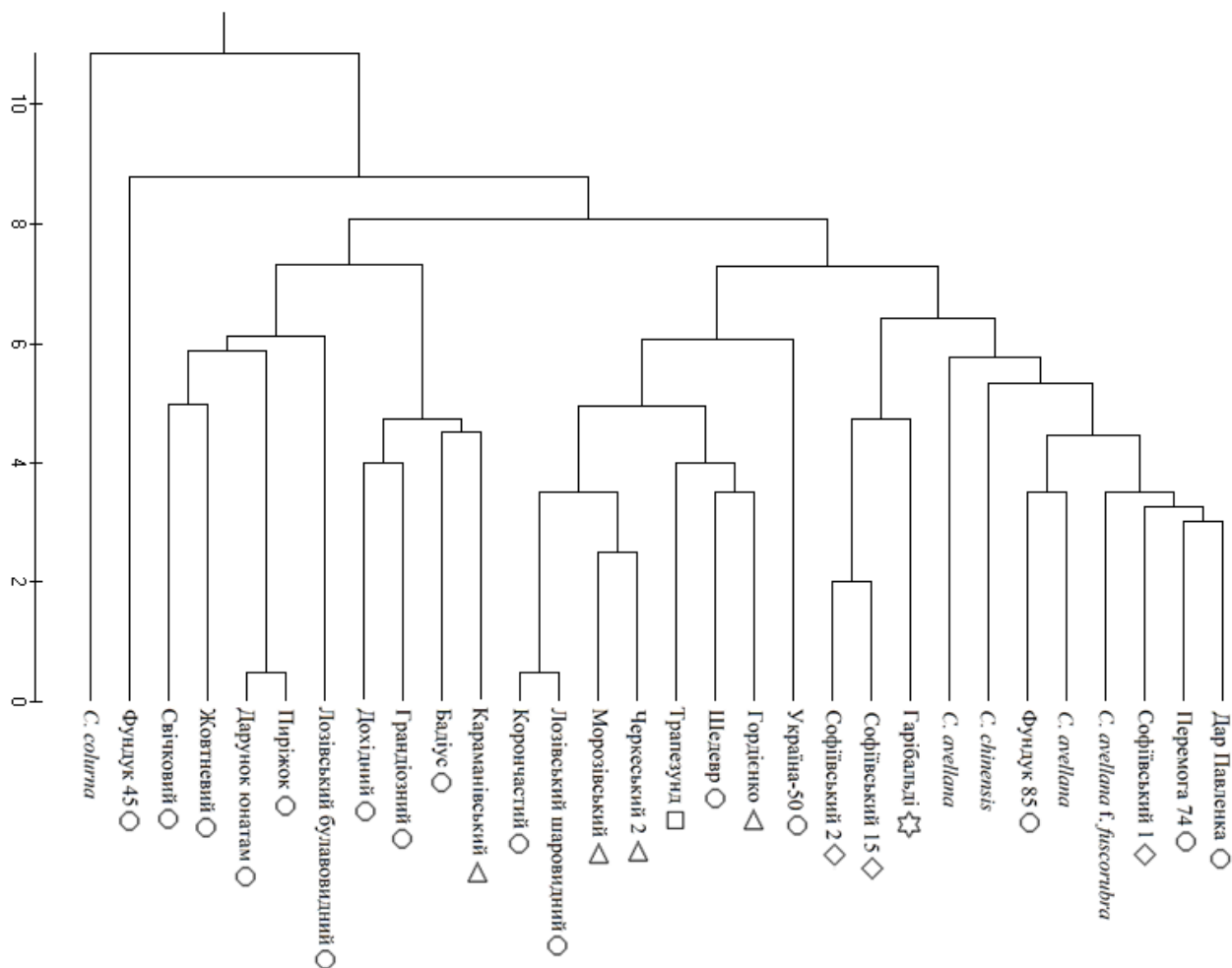


Рис. 3.10. Дендрограма генетичної подібності досліджених зразків фундука і ліщини, побудована на основі даних аналізу SSR-маркерів. Селекційні центри, на базі яких проводили селекцію відповідних сортів позначено наступним чином: $\diamond$ – Національний дендрологічний парк «Софіївка» (м. Умань); $\circ$ – Інститут лісового господарства та агролісомеліорації імені Г. М. Висоцького (м. Харків); Δ – Науково-дослідний інститут квітництва та субтропічних культур (м. Сочі); $*$ – Італія; $\square$ – Туреччина. Для вкорінення дендрограми використано зразок *C. colurna*

Слід зазначити, що *C. avellana* f. *fuscorubra* використовували як запилювач для отримання сорту Софіївський 1, а *C. chinensis* – як запилювач при виведенні сортів Софіївський 2 та Софіївський 15, тоді як Гарібальді є материнським сортом для Софіївського 15 [17,19,111]. Сорт Гарібальді, який є материнським

сортом Софіївського 15, розташований в одній групі разом із Софіївським 15 та Софіївським 2. Натомість сорти селекції Сочинського НДІ квітництва і субтропічних культур розташовані в різних групах. Сорт Україна 50 – материнський для сорту Софіївський 1 – розташувався в іншому кластері, значно віддаленому від решти сортів, створених в НДП «Софіївка». Такі розбіжності можуть бути зумовлені перекомбінацією генетичного матеріалу в ході селекції, а також обмеженою кількістю аналізованих SSR-локусів. Таким чином, на дендрограмі спостерігається певна невідповідність між очікуваними генетичними зв'язками і реальним розташуванням сортів у кластерах.

3.4.2 Дендрограма на основі iPBS-маркерів. Загальна структура дендрограми, побудованої на основі попарних генетичних відстаней між зразками, розрахованих за результатами даних iPBS- аналізу, в цілому відтворює основні закономірності, виявлені при використанні SSR-маркерів, хоча між двома деревами спостерігаються й певні відмінності, зумовлені різною природою та охопленням геному цими двома типами маркерів. Для вкорінення побудованої дендрограми як і у випадку дендрограми на основі SSR-маркерів використали зразок *C. colurna*.

Усі три сорти селекції Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України: Софіївський 1, Софіївський 2 та Софіївський 15 (рис. 3.11, позначено ромбом) – розташовані в одній групі разом із запилювачами *C. chinensis* та *C. avellana* f. *fuscorubra*, використаними для їх виведення. Їхні материнські сорти Гарібальді та Дар Павленка розміщені в сусідньому кластері, що добре узгоджується з відомим родоводом цих сортів.

«Софіївка», що є узгодженим результатом для обох типів маркерів і може вказувати на суттєвий вплив батьківських запилювачів на генетичний профіль цих сортів або на внутрішньосортову гетерогенність рослин сорту Україна 50, використаних для схрещування.

Сорти селекції Науково-дослідного інституту квітництва та субтропічних культур знову формують чітку компакту групу разом із турецьким сортом Трапезунд (рис. 3.11, позначено трикутником). Однак на відміну від дендрограми на основі SSR-маркерів, їхній сорт-попередник Черкеський 2 розташований в окремому кластері, а не поруч із похідними від нього сортами.

Сорти, створені в Інституті лісового господарства та агролісомеліорації імені Г. М. Висоцького, як і на дендрограмі, побудованій за даними SSR-аналізу, не формують чіткого окремого кластеру та рівномірно розподілені по дендрограмі, що підтверджує висновок про широку генетичну базу їхнього вихідного матеріалу (рис. 3.11, позначено колом).

3.4.3 Генетичний статус зразка *C. chinensis* з помологічної колекції НДП «Софіївка» НАН України. Особливої уваги заслуговує положення на обох дендрограмах дослідженого зразка, який фігурує в колекції як *C. chinensis*. Ця рослина характеризується генетичною подібністю до зразків *C. avellana* і не утворює окремої, чітко ізольованої гілки, як це спостерігається у випадку *C. colurna*. Подібне явище було відмічено у дослідженні Freixas-Coutin et al. [94], де зразок *C. chinensis* «OSU 567.004» з колекції Національного центру генетичних ресурсів (NCGR), також попав до однієї кладі з *C. avellana* з Чорноморського регіону та Росії, а не відокремився в самостійну гілку, як цього слід було б очікувати, виходячи з його систематичного положення.

Такий результат суперечить даним молекулярної філогенетики, отриманим з використанням інших типів маркерів. Зокрема, за результатами дослідження ВТС рДНК та хлоропластних маркерів, *C. chinensis* належить до кладі *Colurneae*, яка включає також *C. colurna* та *C. jacquemontii*, але не *C. avellana* [39]. Аналогічно, Bassil et al. показали, що *C. chinensis* і *C. avellana* формують два

різних кластери при UPGMA-аналізі матриці відстаней, розрахованої за результатами аналізу SSR-маркерів [68]. Freixas-Coutin et al. [94] на підставі цих суперечностей припустили, що зразок з колекції, ідентифікований раніше як *C. chinensis*, насправді може бути гібридом між *C. avellana* та одним з азійських видів роду *Corylus*, оскільки на UPGMA-дендрограмі він входив до складу однієї групи разом із сортами *C. avellana* чорноморського та російського походження. При цьому автори зазначають, що за своїми морфологічними ознаками цей зразок – дерево заввишки 7 м з широким яйцеподібним листям та скупченнями товстошкаралупних горіхів діаметром 2,2 см – подібне до *C. chinensis* [112], що не дозволяє виключити можливість його неправильної ідентифікації в колекції на основі фенотипу.

Результати, отримані нами, вказують на те, що зразок з помологічної колекції НДП «Софіївка» НАН України, раніше ідентифікований як *C. chinensis*, подібно до описаного в дослідженні Freixas-Coutin et al. [94], найімовірніше є природним гібридом або фенотиповим варіантом *C. avellana*, морфологічно подібним до *C. chinensis*. На обох дендрограмах, побудованих як на основі SSR, так і iPBS-маркерів, цей зразок розташований поруч із зразками *C. avellana*, а не окремо як *C. colurna*.

Наразі точно ідентифікувати цей зразок на основі наявних даних не видається можливим, і це питання потребує додаткового вивчення із залученням інших молекулярно-філогенетичних маркерів та верифікованого еталонного матеріалу цього та інших видів *Corylus*.

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Верифікація сортового складу насаджень є однією з ключових потреб сучасного промислового горіхівництва. Для ліщини, як і для більшості деревних перехреснозапильних культур, морфологічний підхід до сортової ідентифікації має принципові обмеження: ознаки, описані в UPOV-дескрипторах, виявляють значну пластичність залежно від регіону вирощування, агрофону, вікового стану рослин та умов конкретного вегетаційного сезону. У вітчизняному сортовому фонді ця проблема стоїть особливо гостро, оскільки більшість українських сортів фундука є маловивченими за молекулярно-генетичними критеріями, а питання їхньої генетичної ідентифікації залишалося практично не дослідженим до початку цієї роботи.

ДНК-маркери, на відміну від морфологічних, є стабільними незалежно від умов довкілля, стадії розвитку особини та сезону аналізу. Серед різних типів молекулярних маркерів для ідентифікації сортів деревних культур мікросателітні маркери є доволі розповсюдженим методом ідентифікації завдяки кодомінантній природі, високому рівню поліморфізму та відтворюваності результатів. Для роду *Corylus* розроблено значну базу SSR-маркерів, що успішно застосовуються для характеристики колекцій у Туреччині, Італії, США та інших країнах. Водночас ДНК-маркери на основі LTR-ретротранспозонів, зокрема метод iPBS-маркери, лишались невипробуваними стосовно сортів і видів роду *Corylus*, попри встановлену ефективність при генотипуванні широкого кола рослинних об'єктів.

Відправною точкою дослідження стала розробка ефективного протоколу виділення ДНК з рослинного матеріалу ліщини. Характерний для листкової тканини рослин роду *Corylus* значний вміст вторинних метаболітів, близьких за своїми властивостями до нуклеїнових кислот, суттєво ускладнює стандартні методики екстракції ДНК. Порівняльне тестування трьох методик виділення

ДНК показало, що ні класичний метод ЦТАБ-екстракції, ні його модифікація з додатковим очищенням ДНК зв'язуванням на мікрогранулах кремнезему (SiO_2) не дозволяють отримати із сухого листового матеріалу препарати ДНК, придатні для ПЛР-аналізу. Єдиною методикою, що забезпечувала задовільний результат, стала методика Wang et al. [83], розроблена для виділення і очищення ДНК з рослин роду *Betula* – близького родича роду *Corylus* у межах родини *Betulaceae*.

Адаптований нами протокол відрізняється від оригінального вилученням деяких операцій, що суттєво спрощує і здешевлює методику без втрати ефективності. Так, щоби рознести в часі процедуру збору і виділення ДНК, ми зупинилися на використанні в якості вихідного матеріалу сухого молодого листа рослин, яке розтирали у ступці зі скляним порошком або на кульовому млині в пробірках об'ємом 2 мл на противагу використанню рідкого азоту для зберігання та подрібнення свіжозібраного матеріалу у вихідній методиці. Також відмовилися від використання під час екстракції саркозинату натрію та протеїнази К та знизили концентрацію РНКаз А на етапі гідролізу РНК. Виявлено, що для збільшення виходу ДНК найкраще використовувати як матеріал молоде листя в період травень – початок червня. З 100 мг сухої листової тканини вдається виділити 1,5-2,5 мкг ДНК, що цілком достатньо для подальшого ПЛР-аналізу. Придатність одержаних препаратів для проведення ПЛР-аналізу підтвердили результатами ампліфікації специфічних продуктів з SSR- та iPBS-праймерами.

На сьогодні, основу для молекулярної паспортизації та ідентифікації сортів культурних рослин складають системи SSR-маркерів. Для ідентифікації сортів фундука української селекції використали 9 мікросателітних локусів. ПЛР-аналіз цих локусів у вибірці з 25 зразків сортів фундука виявив 51 алель із середньою кількістю 5,67 алеля на локус. Отримане значення є нижчим, ніж у більшості зарубіжних робіт, що є закономірним, оскільки вони зазвичай охоплюють значно більші вибірки, до яких входить більш географічно різноманітний матеріал.

Водночас виявлено, що для дослідженої в цій роботі вибірки зразків кількість алелів окремих локусів (GB949, BR270) перевищує показники, описані американськими дослідниками [92,94], що може свідчити про більшу гетерогенність українських сортів за цими ознаками. Аналіз частотного розподілу алелів для більшості локусів показав виражену асиметрію з домінуванням одного-двох варіантів, що характерно для відносно невеликих вибірок і є очікуваним наслідком обмеженого кола батьківських форм, задіяних у вітчизняній селекції фундука.

З практичної точки зору найважливішим результатом є складання індивідуальних мікросателітних профілів для 25 сортів фундука української селекції.

Вісім із дев'яти досліджених локусів характеризувалися високою інформативністю. Розрахунок теоретичної ефективності різних комбінацій SSR-локусів з найбільшими показниками інформативності показав, що п'яти з них достатньо для повного розрізнення генотипів у вибірках до 1000 зразків.

Паралельно з типуванням сортів дослідили структурну організацію використаних мікросателітних локусів, оскільки без цієї інформації неможливо надійно інтерпретувати розміри алелів. Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей досліджених SSR-локусів, отриманих з досліджених сортів шляхом клонування та сиквенування окремих алелів чотирьох з локусів, а також знайдених у базах даних NCBI, показав, що для більшості локусів мінливість довжини варіантів зумовлена виключно варіаціями у кількості одиниць простого тринуклеотидного повтору, що забезпечує прогнозованість алельного різноманіття та спрощує інтерпретацію результатів. Водночас виявлено локуси зі складною організацією ділянки повторів. Локус BR438 містить поєднання динуклеотидного повтору (CT)_n та тринуклеотидного (TCA)_m, що призводить до відмінностей розмірів алелів, некратних трьом. Локус GB949 сформований перерваним повтором із вставкою TGA між блоками TGG. Подібні переривання мікросателіту підвищують його стабільність, тому цей варіант може слугувати

інформативним маркером для мікроеволюційних досліджень. Сиквеновані в цій роботі послідовності мікросателітних локусів депоновані в NCBI GenBank (PV926123–PV926126), що забезпечує їхню доступність для майбутніх порівняльних досліджень.

iPBS-маркери були використані для молекулярно-генетичного аналізу рослин роду *Corylus* вперше. Принцип методу полягає в ампліфікації геномних ділянок, розташованих між зверненими назустріч одна одній PBS-послідовностями сусідніх LTR-ретротранспозонів. Оскільки PBS-сайти є еволюційно консервативними через їхню комплементарність до клітинних тРНК, один і той самий праймер дозволяє ампліфікувати специфічні міжретротранспозонні фрагменти в геномах широкого кола організмів. Розмір і наявність кожного такого фрагмента є унікальними для конкретного генотипу, що і забезпечує надзвичайно високу поліморфність цього типу маркерів.

Після скринінгу 24 праймерів було відібрано шість з них (2229, 2232, 2252, 2277, 2395, 2402) з найбільш поліморфними та чіткими електрофоретичними спектрами. Для цих праймерів кількість ампліфікованих фрагментів на праймер в середньому становила 15,8. Середнє значення PIC (0,30) знаходиться в діапазоні, типовому для домінантних маркерів при використанні для аналізу культурних рослин (0,23-0,33 у різних авторів для iPBS). Показовою виявилася дискримінаційна здатність маркерів з середнім значенням 0,948, яке свідчить, що ймовірність правильного розрізнення двох довільно обраних генотипів при використанні цих праймерів перевищує 93%. За використання праймера 2402 можливе повне розрізнення всіх 25 досліджених сортів, а комбінації праймерів 2402 + 2277 або 2402 + 2395 за результатами розрахунків теоретично здатні розрізнити генотипи у вибірках до 1000 зразків.

Порівняльний аналіз двох типів маркерів на однаковій вибірці генотипів виявив суттєву перевагу iPBS-маркерів за всіма оціненими показниками. Роздільна здатність Rp iPBS-маркерів майже втричі перевищує відповідний показник SSR-маркерів, що пояснюється принципово різною природою двох

систем: з парою SSR-праймерів у диплоїдних організмів можливо дослідити не більше двох алелей одного локусу, тоді як з одним iPBS-праймером одночасно можливо охопити в аналізі десятки геномних локусів. Різниця за показником ND є особливо разючою, ПЛР-аналіз окремих SSR-локусів з числа досліджених SSR-локусів не дає змоги диференціювати 25 проаналізованих сортів, тоді як це завдання цілком можливо вирішити за використання лише одного iPBS-праймера 2402.

Водночас обидва типи маркерів мають притаманні їм переваги та обмеження, які визначають доцільність їх використання у різних практичних ситуаціях.

iPBS-маркери вирізняються значно вищою інформативністю, простотою виконання аналізу та нижчою вартістю, оскільки не потребують флуоресцентно мічених праймерів і спеціального обладнання для аналізу. Разом із тим, домінантний тип успадкування цих маркерів унеможливорює розрізнення гетерота гомозиготних генотипів, а низька відтворюваність позбавляє можливості прямого зіставлення результатів, отриманих в різних лабораторіях.

SSR-маркери, натомість, завдяки кодомінантному типу успадкування та стандартизованій формі запису алельних профілів, дозволяють не лише ідентифікувати генотипи, а й порівнювати вітчизняні сорти із зразками з зарубіжних колекцій у рамках міжнародних програм, що є обов'язковою умовою для офіційної генетичної паспортизації, захисту прав селекціонерів і сертифікації садивного матеріалу.

Таким чином, iPBS-маркери є оптимальними для поточного аналізу та контролю сортового складу насаджень та первинної диференціації генотипів у рутинних задачах розсадництва, тоді як SSR-маркери залишаються незамінними у випадках, коли результати аналізу мають юридичне чи міжнародне значення – зокрема для верифікації садивного матеріалу та офіційної паспортизації сортів.

Кластерний аналіз методом UPGMA на основі обох типів маркерів показав високу гетерогенність досліджених сортів фундука української селекції і

водночас дозволив виявити групи споріднених генотипів. Дендрограми, побудовані на основі даних іPBS- та SSR-аналізу, відрізнялися за характером кластеризації досліджених сортів. Виявлені відмінності можуть бути пов'язані з особливостями мінливості та геномного покриття різних типів маркерів, однак з огляду на обмежений обсяг вибірки та неповноту інформації про родовід, однозначна оцінка відповідності отриманих кластерів реальним генетичним зв'язкам потребує додаткових досліджень.

Таким чином, проведене дослідження закладає основу для молекулярно-генетичних досліджень вітчизняного генофонду фундука, зокрема ідентифікації та паспортизації сортів, швидкої характеристики селекційного матеріалу, сортової верифікації садивного матеріалу, тощо.

ВИСНОВКИ

1. Аналіз алельного складу та частотного розподілу алелів 9 мікросателітних локусів у досліджених сортів фундука виявив суттєві відмінності між локусами за рівнем алельного різноманіття та характером розподілу алелів. Загальна кількість виявлених алелів становила 51, найнижчу кількість алелів (по 4) мають локуси BR438 та BR322, найвищу (по 7) – BR270, CAC-C008 та BR259. Найбільш рівномірний розподіл алелів характерний для локусів BR464, GB950, GB949 та BR259, тоді як локуси BR438, BR414 та BR322 характеризуються вираженою асиметрією, зокрема у локусі BR438 частота одного алеля (191) сягає 0,767.

2. Дослідження 9 мікросателітних локусів показало, що 8 з них мають високі показники поліморфізму та інформативності для ідентифікації українських сортів фундука: значення PIC варіювало від 0,34 до 0,76 (середнє 0,62), дискримінаційна здатність (D_L) – від 0,490 до 0,901 (середнє 0,805), роздільна здатність (R_p) – від 1,212 до 2,727. Теоретичні розрахунки показали, що комбінація з 5 SSR-локусів з числа досліджених (CAC-C008, GB949, BR464, BR259, BR322) може бути достатньою для диференціації генотипів у вибірках до 1000 зразків.

3. Для двох із дев'яти досліджених SSR-локусів встановлено достовірні відхилення від рівноваги Харді–Вайнберга ($p < 0,05$). Для локусу GB949 зафіксовано надлишок гомозиготних генотипів ($H_o = 0,640$; $H_e = 0,807$; $\chi^2 = 3,904$; $p = 0,024$), що може бути зумовлено спрямованим добором або ефектом засновника в умовах цілеспрямованої селекційної роботи. Для локусу BR259 виявлено надлишок гетерозиготних генотипів ($H_o = 0,920$; $H_e = 0,774$; $\chi^2 = 2,954$; $p = 0,043$), що може бути пов'язано із зчепленням даного локусу з S-локусом, який контролює несумісність пилку і приймочки у ліщини.

4. Визначено, що більшість досліджених SSR-локусів мають просту структуру і складаються з одного типу простих тринуклеотидних повторів, а

різниця довжин їхніх алельних варіантів як правило кратна трьом. Водночас чотири з дев'яти локусів мають складну структуру і містять різні типи повторів або перервану ділянку повторів. У цих локусів розмір алелів залежить від кількості одиниць різних типів повторів, а також мікромутаційних подій – інсерцій та делецій.

5. На основі аналізу 9 SSR-локусів складено мікросателітні профілі 25 сортів фундука, в тому числі 23 створених українськими селекціонерами, які в подальшому можуть бути використані для їхньої ідентифікації та паспортизації.

6. Проведено первинний скринінг 24 iPBS-праймерів і відібрано 6 найбільш ефективних з них (2229, 2232, 2252, 2277, 2395, 2402). Встановлено високі показники інформативності цих праймерів для молекулярно-генетичного аналізу українських сортів фундука: значення PIC варіювало від 0,26 до 0,32 (середнє 0,30), дискримінаційна здатність (D_L) - від 0,931 до 0,960 (середнє 0,948), роздільна здатність (R_p) - від 3,540 до 10,560 (середнє 6,760). Показано, що використання одного iPBS-праймера 2402 достатньо для повної диференціації всіх досліджених сортів. Для практичної роботи рекомендується використовувати комбінації найбільш інформативних праймерів (2402, 2277, 2395), а також за необхідності залучати додаткові.

7. Кластерний аналіз матриць попарних генетичних відстаней, розрахованих за результатами SSR- та iPBS-аналізу, показав високу гетерогенність досліджених сортів фундука, а також виявив групи споріднених генотипів.

8. Встановлено, що iPBS-маркери мають вищу інформативність порівняно з SSR-маркерами. При цьому використання iPBS-підходу вимагає значно менших витрат часу та коштів на проведення генетичного аналізу зразків. Водночас, можливості застосування цього типу маркерів обмежуються завданнями диференціації генотипів у межах однієї лабораторії внаслідок домінантного типу успадкування та низької міжлабораторної відтворюваності результатів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Botta R., Molnar T.J., Erdogan V., Valentini N., Marinoni D.T., Mehlenbacher S.A. Hazelnut (*Corylus* spp.) breeding., *Advances in Plant Breeding*. 2019. Vol. 4 P.157–219. doi: 10.1007/978-3-030-23112-5_6
2. Marwal A., Gaur R.K. Molecular markers: tool for genetic analysis. *Animal Biotechnology*. 2020. P.353–372. doi: 10.1016/b978-0-12-811710-1.00016-1
3. Jiang G.L. Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. 2013. doi: 10.5772/52583
4. Nadeem M.A., Nawaz M.A., Shahid M.Q., Doğan Y., Comertpay G., Yıldız M., et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing., *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2018. Vol.32 P.261–85. doi: 10.1080/13102818.2017.1400401
5. Mehlenbacher S.A. Advances in genetic improvement of hazelnut. *Acta Horticulturae*. 2018. Vol.1226 P.1–12. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1226.1
6. Pearce S.R., Stuart-Rogers C., Knox M.R., Kumar A., Ellis T.H.N., Flavell A.J. Rapid isolation of plant Ty1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. *Plant J*. 1999. Vol.19(6). P.711–717. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00556.x
7. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A.H. iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet*. 2010. Vol.121(8). P.1419–1430. doi: 10.1007/s00122-010-1398-2
8. Holstein N., el Tamer S.E., Weigend M. The nutty world of hazel names -A critical taxonomic checklist of the genus *corylus* (Betulaceae). Vol. 2018, European Journal of Taxonomy. 2018. P.1–45. doi: 10.5852/ejt.2018.409
9. Botta R., Valentini N. Il nocciolo : progettazione e coltivazione del corileto. *Edagricole*. 2018.
10. Fairbairn A., Kulakoğlu F., Atici L. Archaeobotanical evidence for trade in

- hazelnut (*Corylus* sp.) at Middle Bronze Age Kültepe (c. 1950-1830 b.c.), Kayseri Province, Turkey. *Veg. Hist. Archaeobot.* 2014. Vol.23(2). P.167–74. doi: 10.1007/s00334-013-0403-5
11. Molnar T., Capik J. Eastern Filbert Blight Susceptibility of American × European Hazelnut Progenies. *HortScience*. 2012. Vol.47. P.1412–8. doi: 10.21273/HORTSCI.47.10.1412
 12. Molnar T.J., Capik J. Advances in hazelnut research in North America. *Acta Hortic.* 2012. Vol.940. P.57–65. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.940.6
 13. Mehlenbacher S.A. Advances in genetic improvement of hazelnut. *Acta Hortic.* 2018. Vol.1226. P.1–12. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1226.1
 14. Foreste L., Natura L., Energia E. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) genetic resources and nursery industry improvement by biotechnological approaches. 2015. P.1–87.
 15. Tombesi S., Botta R., Valentini N., Cristofori V., DeSalvador F., Farinelli D. Piattaforma varietale e orientamenti produttivi per i nuovi impianti. *Riv. di Fruttic. e di Ortofloric.* 2017. Vol.81. P.23–9.
 16. Косенко І.С., Опалко А.І., Опалко О.А. Фундук: Прикладна генетика, селекція, технологія розмноження і виробництва. 2008. 256 р.
 17. Косенко І.С., Опалко А.І., Балабак О. А., Опалко О.А. Використання ліщини китайської (*Corylus chinensis* Franch.) в селекції фундука (*Corylus domestica* Kos. et Opal.). *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2020. Vol.27. P.113–118. doi: 10.7124/FEEO.v27.1312
 18. Kosenko I.S., Balabak A.F., Sonko S.P., Balabak O.A., Balabak A.V., Opalko A.I., et al. Tolerance of hazelnuts towards unfavorable environmental factors. *Ukr. J. Ecol.* 2019. (9). P.117–125. doi: 10.15421/40290501
 19. Kosenko I.S., Opalko A.I., Balabak O.A., Opalko O.A., Balabak A.V. Hazelnut (*Corylus domestica* Kos. et Opal.) research and breeding at NDP “Sofiyivka” of NAS of Ukraine. *Temp. Hortic. Sustain. Dev. Environ. Ecol. Asp.* 2019. P.237–267.

20. Kosenko I.S., Opalko A.I., Balabak O.A., Opalko O.A., Balabak A.V. Breeding value of the hazelnut (*Corylus* spp.) genetic collection of the National dendrological park “Sofiyivka” of NAS of Ukraine. *Plant Divers. status, trends, Conserv. concept*. 2020. P.203.
21. Kosenko I.S., Opalko A.I., Balabak O.A., Opalko O.A., Balabak A.V. Hazelnut breeding in the National Dendrological Park “Sofiyivka” of the NAS of Ukraine. *Plant Var. Stud. Prot.* 2017. (13). P.245–251. doi: 10.21498/2518-1017.13.3.2017.110706
22. Vizek T. Application of molecular markers in plant breeding. 2007. Vol.1(4). P.192–200.
23. Kundan M.K., Vinita T., Yachana J., Madhumati B. Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis International Journal of Pure & Applied Bioscience. Vol. 2, International Journal of Pure & Applied Bioscience. 2014.
24. Ebert D., Peakall R. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. *Mol. Ecol. Resour.* 2009. Vol.9. P.673–690. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02319.x
25. Mason A.S. SSR genotyping. *Methods Mol Biol.* 2014. Vol.1245. P.77–89. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6_6
26. Hirsch C.D., Springer N.M. Transposable element influences on gene expression in plants. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 2017. Vol.1860(1). P.157–65. doi: 10.1016/j.bbagrm.2016.05.010
27. Кунах В.А. Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин. Київ: Логос; 2013. 1–288 р.
28. Shapter F.M., Waters D.L.E. Genome Walking. *Methods in Molecular Biology.* 2014. Vol. 1099 P. 133–146. doi: 10.1007/978-1-62703-715-0
29. Kalendar R., Flavell A.J., Ellis T.H.N., Sjakste T., Moisy C., Schulman A.H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers.,

- Heredity*. 2011. Vol. 106 P. 520–530. doi: 10.1038/hdy.2010.93
30. Kalendar R., The Use of Retrotransposon-Based Molecular Markers to Analyze Genetic Diversity, *Ratar. Povrt. / Field Veg. Crop Res.* 2011. Vol. 48. P. 261–274
 31. Milovanov A., Zvyagin A., Daniyarov A., Kalendar R., Troshin L. Genetic analysis of the grapevine genotypes of the Russian Vitis ampelographic collection using iPBS markers. *Genetica*. 2019. Vol.147(1). P.91–101. doi: 10.1007/s10709-019-00055-5
 32. Li S., Ramakrishnan M., Vinod K.K., Kalendar R., Yrjälä K., Zhou M. Development and deployment of high-throughput retrotransposon-based markers reveal genetic diversity and population structure of asian bamboo. *Forests*. 2020. Vol.11(1). P.1–25. doi: 10.3390/f11010031
 33. V. Melnikova N., V. Kudryavtseva A., S. Speranskaya A., A. Krinitsina A., A. Dmitriev A., S. Belenikin M., et al. The FaRE1 LTR-retrotransposon Based SSAP Markers Reveal Genetic Polymorphism of Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Cultivars. *J. Agric. Sci.* 2012. Vol.4(11). P.111–118. doi: 10.5539/jas.v4n11p111
 34. Demirel U., Tindaş I., Yavuz C., Baloch F.S., Çalişkan M.E. Assessing genetic diversity of potato genotypes using inter-PBS retrotransposon marker system. *Plant Genet. Resour. Characterisation Util.* 2018. Vol.16(2). P.137–145. doi: 10.1017/S1479262117000041
 35. Mehmood A., Jaskani M.J., Ahmad S., Ahmad R. Evaluation of genetic diversity in open pollinated guava by iPBS primers. *Pakistan J. Agric. Sci.* 2013. Vol.50(4). P.591–597.
 36. Mehmood A., Luo S., Ahmad N.M., Dong C., Mahmood T., Sajjad Y., et al. Molecular variability and phylogenetic relationships of guava (*Psidium guajava* L.) cultivars using inter-primer binding site (iPBS) and microsatellite (SSR) markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2016. Vol.63(8). P.1345–1361. doi: 10.1007/s10722-015-0322-7

37. Öztürk S.C., Göktay M., Allmer J., Doğanlar S., Frary A. Development of Simple Sequence Repeat Markers in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) by Next-Generation Sequencing and Discrimination of Turkish Hazelnut Cultivars. *Plant Mol. Biol. Report.* 2018. Vol.36(5–6). P.800–811. doi: 10.1007/s11105-018-1120-0
38. Mohammadzede M., Fattahi R., Zamani Z., Khadivi-Khub A. Genetic identity and relationships of hazelnut (*Corylus avellana* L.) landraces as revealed by morphological characteristics and molecular markers. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2014. Vol.167. P.17–26. doi: 10.1016/j.scienta.2013.12.025
39. Erdogan V., Mehlenbacher S.A. Phylogenetic Relationships of *Corylus* Species (Betulaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA ITS Region and Chloroplast matK Gene Sequences. *Syst. Bot.* 2000. Vol.25(4). P.727–737. doi: 10.2307/2666730
40. Palme A.E., Vendramin G.G. Chloroplast DNA variation , postglacial recolonization and hybridization in hazel , *Corylus avellana*. *Mol. Ecol.* 2002. Vol.11. P.1769–1779.
41. Mehlenbacher S.A., Brown R.N., Nouhra E.R., Gökirmak T., Bassil N.V., Kubisiak T.L. A genetic linkage map for hazelnut (*Corylus avellana* L.) based on RAPD and SSR markers. *Genome.* 2006. Vol.49(2). P.122–133. doi: 10.1139/G05-091
42. Rowley E., Vanburen R., Bryant D., Priest H., Mehlenbacher S., Mockler T. A Draft Genome and High-Density Genetic Map of European Hazelnut (*Corylus avellana* L.): 2018. 1–25 p. doi: 10.1101/469015
43. Sathuvalli V., Mehlenbacher S.A., Smith D.C. High-Resolution Genetic and Physical Mapping of the Eastern Filbert Blight Resistance Region in ‘Jefferson’ Hazelnut (*Corylus avellana* L.) . *Plant Genome.* 2017. Vol.10(2). P.1–12. doi: 10.3835/plantgenome2016.12.0123
44. Koma G.K., Sekerli M., Snelling J.W., Mehlenbacher S.A., Lucas S.J. New Sources of Eastern Filbert Blight Resistance and Simple Sequence Repeat

- Markers on Linkage Group 6 in Hazelnut (*Corylus avellana* L .). 2021. Vol.12(June). P.1–18. doi: 10.3389/fpls.2021.684122
45. Kafkas S., Turan A., Seker H. Genetic Characterization of Hazelnut (*Corylus avellana* L .) Cultivars from Turkey Using Molecular Markers. *Hort Sci.* 2009. Vol.44(6). P.1557–1561. doi: 10.21273/HORTSCI.44.6.1557
 46. Marinoni D.T., Valentini N., Portis E., Acquadro A., Beltramo C., Mehlenbacher S.A., et al. High density SNP mapping and QTL analysis for time of leaf budburst in *Corylus avellana* L. *PLoS One*. 2018. Vol.13(4). P.1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0195408
 47. Ozturk S.C., Ozturk S.E., Celik I., Stampar F., Veberic R., Doganlar S., et al. Molecular genetic diversity and association mapping of nut and kernel traits in Slovenian hazelnut (*Corylus avellana*) germplasm. *Tree Genet. Genomes*. 2017. Vol.13(1). P.1–14. doi: 10.1007/s11295-016-1098-4
 48. Frary A., Öztürk S.C., Balık H.I., Balık S.K., Kızılcı G., Doğanlar S., et al. Association mapping of agro-morphological traits in European hazelnut (*Corylus avellana*). *Euphytica*. 2019. Vol.215(2). P.1–14. doi: 10.1007/s10681-019-2352-2
 49. Frary A., Öztürk S.C., Balık H.I., Balık S.K., Kızılcı G., Doğanlar S., et al. Analysis of European hazelnut (*Corylus avellana*) reveals loci for cultivar improvement and the effects of domestication and selection on nut and kernel traits. *Mol. Genet. Genomics*. 2019. Vol.294(2). P.519–527. doi: 10.1007/s00438-018-1527-1
 50. Jef H., Rowley E.R., Fox S.E., Bryant D.W., Sullivan C.M., Priest H.D., et al. Assembly and Characterization of the European. *Crop Sci. Soc. Am.* 2012. Vol.52. P.2679–2686. doi: 10.2135/cropsci2012.02.0065
 51. Lucas S.J., Kahraman K., Avsar B., Buggs R., Bilge I. A chromosome-scale genome assembly of European hazel (*Corylus avellana* L .) reveals targets for crop improvement. 2021. P.1413–1430. doi: 10.1111/tpj.15099
 52. Gökirmak T., Mehlenbacher S.A., Bassil N. V. Characterization of European

- hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars using SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2009. Vol.56(2). P.147–172. doi: 10.1007/s10722-008-9352-8
53. Botta R., Molnar T.J., Erdogan V., Valentini N., Marinoni D.T., S.A. M. Hazelnut (*Corylus* spp.) breeding. *Adv. Plant Breed. Strateg. Nut Beverage Crop.* 2019. Vol.4. P.157–219. doi: 10.1007/978-3-030-23112-5_6
 54. Boccacci P., Beltramo C., Prando M.A.S., Lembo A., Sartor C., Mehlenbacher S.A., et al. In silico mining , characterization and cross-species transferability of EST-SSR markers for European hazelnut (*Corylus avellana* L .). *Mol Breed.* 2015. Vol.35(21). P.1–14. doi: 10.1007/s11032-015-0195-7
 55. Boccacci P., Akkak A., Bassil N.V., Mehlenbacher S.A., Botta R. Characterization and evaluation of microsatellite loci in European hazelnut (*Corylus avellana* L.) and their transferability to other *Corylus* species. *Mol. Ecol. Notes.* 2005. Vol.5. P.934–937. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01121.x
 56. Gürcan K., Mehlenbacher S.A., Erdoğan V. Genetic diversity in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars from Black Sea countries assessed using SSR markers. *Plant Breed.* 2010. Vol.129(4). P.422–434. doi: 10.1111/j.1439-0523.2009.01753.x
 57. Bassil N. V., Botta R., Mehlenbacher S.A. Microsatellite markers in hazelnut: Isolation, characterization, and cross-species amplification. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2005. Vol.130(4). P.543–549. doi: 10.21273/jashs.130.4.543
 58. Tanhuanpää P., Heinonen M., Bitz L., Rokka V.M. Genetic diversity and structure in the northern populations of European hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Genome.* 2019. Vol.62(8). P.537–548. doi: 10.1139/gen-2018-0193
 59. Ershadi A., Toolir J.F. Evaluation of Genetic Diversity of Iranians Populations of Hazlnut (*Corylus avellana* L.) Using SSR Markers. *J. Nuts.* 2022. Vol.13(4). P.273–288. doi: 10.22034/jon.2022.1955752.1162
 60. Demchik M., Kern A., Braun L., Fischbach J., Turnquist K. Genetic diversity of American hazelnut in the Upper. *Agrofor. Syst.* 2017. doi: 10.1007/s10457-017-0097-2

61. Bacchetta L., Rovira M., Tronci C., Aramini M., Drogoudi P., Silva A.P., et al. Multidisciplinary approach to enhance the conservation and use of hazelnut *Corylus avellana* L. genetic resources. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2015. Vol.62. P.649–663. doi: 10.1007/s10722-014-0173-7
62. Boccacci P., Aramini M., Valentini N., Bacchetta L., Rovira M., Drogoudi P., et al. Molecular and morphological diversity of on-farm hazelnut (*Corylus avellana* L.) landraces from southern Europe and their role in the origin and diffusion of cultivated germplasm. *Tree Genet. Genomes.* 2013. Vol.9. P.1465–1480. doi: 10.1007/s11295-013-0651-7
63. Köse M.A., Gürcan K. Genetic diversity and genetic comparison of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) of Kayseri province of Turkey to major accessions of Azerbaijan, Georgia, Italy, Spain, and Turkey. *Acta Hort.* 2018. Vol.1226. P.93–99. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1226.13
64. Mehlenbacher S.A., Brown R.N., Nouhra E.N., Gökirmak T., Bassil N.V., Kubisiak T.L. A genetic linkage map for hazelnut (*Corylus avellana* L.) based on RAPD and SSR markers. *Genome.* 2006. Vol.49. P.122–133.
65. Kavas M., Yıldırım K., Seçgin Z., Gökdemir G. Discovery of simple sequence repeat (SSR) markers in hazelnut (*Corylus avellana* L.) by transcriptome sequencing and SSR-based characterization of hazelnut cultivars. *Scand. J. For. Res.* 2020. Vol.35(5–6). P.227–237. doi: 10.1080/02827581.2020.1797155
66. Boccacci P., Boccacci P., Akkac A., Botta R. DNA typing and genetic relations among European hazelnut (*Corylus avellana* L .) cultivars using microsatellite markers DNA typing and genetic relations among European hazelnut (*Corylus avellana* L .) cultivars using microsatellite markers. *Genome* 2006. (July). Vol.49. P. 598–611. doi: 10.1139/g06-017
67. Gürcan K., Mehlenbacher S.A., Köse M.A., Balık H.I. Population structure analysis of European hazelnut (*Corylus avellana*). *Acta Hort.* 2018. Vol.1226. P.87–92. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1226.12
68. Bassil N., Boccacci P., Botta R., Postman J., Mehlenbacher S. Nuclear and

- chloroplast microsatellite markers to assess genetic diversity and evolution in hazelnut species, hybrids and cultivars. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2013. Vol.60(2). P.543–568. doi: 10.1007/s10722-012-9857-z
69. Boccacci P., Botta R. Microsatellite variability and genetic structure in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars from different growing regions. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2010. Vol.124(1). P.128–133. doi: 10.1016/j.scienta.2009.12.015
 70. Mehlenbacher S.A. Characterization of American hazelnut (*Corylus americana*) accessions and *Corylus americana* × *Corylus avellana* hybrids using microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol.* 2012. Vol.59. P.1055–1075. doi: 10.1007/s10722-011-9743-0
 71. Öztürk S.C., Balık H.İ., Balık S.K., Kızılcı G., Duyar Ö., Doğanlar S., et al. Molecular genetic diversity of the Turkish national hazelnut collection and selection of a core set. *Tree Genet. Genomes.* 2017. Vol.13(5). doi: 10.1007/s11295-017-1195-z
 72. Martins S., Simões F., Mendonça D., Matos J., Silva A.P., Carnide V. Western European Wild and Landraces Hazelnuts Evaluated by SSR Markers. *Plant Mol Biol Rep.* 2015. Vol.33. P.1712–1720. doi: 10.1007/s11105-015-0867-9
 73. Honig J.A., Hall F., Road D., Brunswick N., Muehlbauer M.F., Capik J.M., et al. Identification and Mapping of Eastern Filbert Blight Resistance Quantitative Trait Loci in European Hazelnut Using Double Digestion Restriction Site Associated DNA Sequencing. 2019. Vol.144(5). P.295–304. doi: 10.21273/JASHS04694-19
 74. Bassil N. V., Postman J., Hummer K., Sezer A., Botu M. SSR fingerprinting panel verifies identities of clones in backup hazelnut collection of USDA genebank. *Acta Hortic.* 2009. Vol.845. P.95–102. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.845.9
 75. Mehlenbacher S.A. Development of microsatellite marker loci for European hazelnut (*Corylus avellana* L.) from ISSR fragments. 2010. Vol.26. P.551–559. doi: 10.1007/s11032-010-9464-7

76. Beltramo C., Valentini N., Portis E., Torello Marinoni D., Boccacci P., Sandoval Prando M.A., et al. Genetic mapping and QTL analysis in European hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Mol. Breed.* 2016. Vol.36(3). P.1–17. doi: 10.1007/s11032-016-0450-6
77. Rohland N., Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques*. 2007. Vol.42(3). P.343–352. doi: 10.2144/000112383
78. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. 2006. Vol.6(1). P.288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
79. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol.30(12). P.2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
80. Sullivan K.M., Dean A., Minn Soe M. OpenEpi: A Web-Based Epidemiologic and Statistical Calculator for Public Health. *Public Health Rep.* 2009. Vol.124(3). P.471–474. doi: 10.1177/003335490912400320
81. Altschup S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 1990. Vol.215(3). P.403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
82. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987. Vol.19(1). P.11–15.
83. Wang N., Thomson M., Bodles W.J.A., Crawford R.M.M., Hunt H. V., Featherstone A.W., et al. Genome sequence of dwarf birch (*Betula nana*) and cross-species RAD markers. *Mol. Ecol.* 2013. Vol.22(11). P.3098–3111. doi: 10.1111/mec.12131
84. Sambrook J., Fritsch E.R., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
85. Peakall R., Smouse P.E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population

- genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012. Vol.28(19). P.2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
86. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Gen* [Internet]. 1980. Vol.32. P.314–331.
 87. Prevost A., Wilkinson M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 1999. Vol.98(1). P.107–112. doi: 10.1007/s001220051046
 88. Tessier C., David J., This P., Boursiquot J.M., Charrier A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 1999. Vol.98(1). P.171–177. doi: 10.1007/s001220051054
 89. Serrote C.M.L., Reiniger L.R.S., Silva K.B., Rabaiolli S.M. dos S., Stefanel C.M. Determining the polymorphism information content of a molecular marker. *Gene*. 2020. Vol.726. P.144–175. doi: 10.1016/j.gene.2019.144175
 90. Rold'an-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loose M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp .). *Mol. Breed.* 2000. Vol.6. P.125–134. doi: 10.1023/A:1009680614564
 91. Whitcher I.N., Wen J. Phylogeny and biogeography of corylus (betulaceae): Inferences from its sequences. *Syst. Bot.* 2001. Vol.26(2). P.283–298.
 92. Akin M., Nyberg A., Postman J., Mehlenbacher S., Bassil N. V. A multiplexed microsatellite fingerprinting set for hazelnut cultivar identification. *Eur. J. Hortic. Sci.* 2016. Vol.81(6). P.327–338. doi: 10.17660/eJHS.2016/81.6.6
 93. Fiore M.C., Marchese A., Mauceri A., Digangi I., Scialabba A. Diversity Assessment and DNA-Based Fingerprinting of Sicilian Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Germplasm. *Plants*. 2022. Vol.11(5). P.1–18. doi: 10.3390/plants11050631
 94. Freixas-Coutin J.A., An S., Postman J., Bassil N. V., Yates B., Shukla M., et al. Development of a reliable *Corylus* sp. reference database through the implementation of a DNA fingerprinting test. *Planta* [Internet]. 2019.

- Vol.249(6). P.1863–74. doi: 10.1007/s00425-019-03131-4
95. Yang Z., Zhao T., Liang L., Jiang L., Wang L., Hou S., et al. Genetic Analysis of the Cultivars of Ping'ou Hybrid Hazelnut (*C. heterophylla* Fisch. × *C. avellana* L.) in China Based on SSR Markers. *Forests*. 2023. Vol.14(7). P.1–15. doi: 10.3390/f14071405
 96. Kushnarenko S. V, Omasheva M., Romadanova N., Aralbayeva M., Rymkhanova N., Manapkanova U., et al. Genetic Diversity of the Only Natural Population of *Corylus avellana* L. in Kazakhstan and Prospects for Its In Vitro Conservation. 2025. P.1–15.
 97. Konopiński M.K. Shannon diversity index : a call to replace the original Shannon ' s formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*. 2020. Vol.8. P.1–16. doi: 10.7717/peerj.9391
 98. Lachance J. Hardy – Weinberg Equilibrium and Random Mating. *Encycl. Evol. Biol.* 2016. Vol.2. P.208–211. doi: 10.1016/B978-0-12-800049-6.00022-6
 99. Andrews C.A. Natural Selection, Genetic Drift, and Gene Flow Do Not Act in Isolation in Natural Populations. *Nat. Educ. Knowl.* 2010. Vol.3(10). P.5.
 100. Guha D., William S.B., Olin E.R. Heterozygote Deficiencies Caused by a Wahlund Effect : Dispelling Unfounded Expectations. *J. Wildl. Manage.* 2013. Vol.77(2). P.226–234. doi: 10.1002/jwmg.458
 101. Buschiazzi E., Gemmell N.J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays*. 2006. Vol.28. P.1040–1050. doi: 10.1002/bies.20470
 102. Bull L.N., Pabon-Pena C.R., Freimer N.B. Compound Microsatellite Repeats : Practical and Theoretical Features. *Cold Spring Harb. Lab. Press*. 1999. Vol.9. P.830–838.
 103. Ananda G., Hile S.E., Breski A., Wang Y., Kelkar Y., Makova K.D., et al. Microsatellite Interruptions Stabilize Primate Genomes and Exist as Population-Specific Single Nucleotide Polymorphisms within Individual Human Genomes. *PLOS Genet.* 2014. Vol.10(7). P.1–20. doi: 10.1371/journal.pgen.1004498

104. Coşkun Ö.F. Molecular characterization, population structure analysis, and association mapping of turkish parsley genotypes using iPBS markers. *Horticulturae*. 2023. Vol.9(3). P.1–12. doi: 10.3390/horticulturae9030336
105. Žiarovská J., Kováčik A., Farkasová S., Fixelová M., Sabo J., Kacániová M. Analyse of iPBS lenght polymorphism in selected group of *Vitis vinifera*, L. varieties. *Acta Fytotech. Zootech*. 2022. Vol.25(2). P.122–129. doi: 10.15414/afz.2022.25.02.122-129
106. Guo D.L., Guo M.X., Hou X.G., Zhang G.H. Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers. *Biochem. Syst. Ecol.* [Internet]. 2014. Vol.52. P.27–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.10.008> doi: 10.1016/j.bse.2013.10.008
107. Zhang X., Chen W., Yang Z., Luo C., Zhang W., Xu F., et al. Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction of *Zanthoxylum* species based on SSR and iPBS markers. *BMC Plant Biol*. 2024. Vol.24(1). P.1–18. doi: 10.1186/s12870-024-05373-1
108. Sameeullah M., Kayaçetin F., Khavar K.M., Perkasa A.Y., Maesaroh S., Waheed M.T., et al. Decoding genetic diversity and population structure of Brassica species by inter primer binding site (iPBS) retrotransposon markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2024. (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s10722-024-01986-5> doi: 10.1007/s10722-024-01986-5
109. Haliloğlu K., Türkoğlu A., Öztürk H.I., Özkan G., Elkoca E., Poczai P. iPBS-retrotransposon markers in the analysis of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Turkey. *Genes (Basel)*. 2022. Vol.13(7). P.1–15. doi: 10.3390/genes13071147
110. Borna F., Luo S., Ahmad N.M., Nazeri V., Shokrpour M., Trethowan R. Genetic diversity in populations of the medicinal plant *Leonurus cardiaca* L. revealed by inter-primer binding site (iPBS) markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2017. Vol.64(3). P.479–492. doi: 10.1007/s10722-016-0373-4
111. Косенко І.С., Опалко А.І., Балабак О.А., Опалко О.А. Селекція фундука

(*Corylus domestica* Kos. et Opal.) у НДП «Софіївка» НАН України.

Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017. Vol.21. Р.154–159.

doi: 10.37555/.14.2018.173278

112. Molnar T.J. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. 2011. doi: 10.1007/978-3-642-21250-5

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Міщенко А. М.**, Андрєєв І. О. Підбір та оптимізація методу виділення та очищення ДНК з видів роду *Corylus* для ПЛР аналізу. Фактори експериментальної еволюції організмів, 2023; 32:53-58. DOI: 10.7124/FEEO.v32.1535 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).
2. **Міщенко А. М.**, Андрєєв І. О., Косенко І. С. Характеристика нових сортів фундука Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України із використанням мікросателітних маркерів. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2025; 36:98-104. DOI:10.7124/FEEO.v36.1754 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).
3. **Міщенко, А. М.**, Андрєєв, І. О., Грищенко, Н. В., Кравченко, С. А., Кунах, В. А.. Оцінка інформативності SSR-маркерів для ідентифікації та диференціації сортів фундука української селекції. Цитологія і генетика, 2026; 60(2):21-30 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).
4. **Міщенко А. М.**, Андрєєв І. О., Кунах В. А. Оцінка інформативності iPBS-маркерів для ідентифікації та диференціації українських сортів фундука. Біополімери і клітина. 2025; 41(4):266-274. DOI: 10.7124/bc.000B2A (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).

5. **Міщенко А. М.**, Андрєєв І. О., Мельник В. М., Кунах В. А. Структурна організація деяких мікросателітних локусів у представників роду *Corylus*. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2025; 23:12-23. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.22.1-2.1684 (Особистий внесок здобувача – опрацювання літератури, отримання експериментальних даних, написання тексту та обговорення зі співавторами).

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Prospective DNA markers for the identification of hazelnut varieties of Ukrainian selection / Mishchenko A. M. // Biopolymers and Cell. 2023. Vol. 39. N 4. P. 311–322. doi: 10.7124/bc.000AA8
2. Application of SSR markers for identification of hazelnut varieties of Ukrainian breeding / Mishchenko A. M., Andreev I. O. // Book of abstracts XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Institute of molecular biology and genetics National Academy of Sciences of Ukraine 21–22.05.2024. – Kyiv, 2024. – P. 37.
3. Мікросателітний аналіз сортів фундука (*Corylus* spp.) селекції національного дендрологічного парку «Софіївка» / Міщенко А. М., Андрєєв І. О. // Матеріали IV конференції молодих вчених «Біологія рослин і біотехнологія», Київ, Україна, 18.05.2024. – Київ, 2024. – С. 17.
4. Potential of retrotransposon-based iPBS-markers in the identification of ukrainian hazelnut varieties / Mishchenko A. M., Andreev I. O. // Book of abstracts XIX All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Institute of molecular biology and genetics National Academy of Sciences of Ukraine, 20–21.05.2025. – Kyiv, 2025. – P. 38.

ДОДАТОК Б

ВИЯВЛЕНІ У РІЗНИХ ВИДІВ *CORYLUS* АЛЕЛЬНІ ВАРІАНТИ

МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ З ВИЗНАЧЕНИМ МОТИВОМ

ПРОСТОГО ПОВТОРУ ТА НОМЕРОМ ВІДПОВІДНОЇ

ПОСЛІДОВНОСТІ В БАЗАХ ДАНИХ NCBI

Табл.Б.1

Локус	Розмір р алеля, п.н.	Мотив	Вид/сорт	Номер в базі даних NCBI GenBank
BR259	237	(TCA) ₈	<i>C. avellana</i> cv. Свічковий	PV926123
	234	(TCA) ₇	<i>C. avellana</i>	KJ193889
	249	(TCA) ₁₂	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	XM_059593920
	234	(TCA) ₇	<i>C. avellana</i>	OZ219478
	228	(TCA) ₅	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 001
	237	(TCA) ₈	<i>C. chinensis</i>	CM106774
	237	(TCA) ₈	<i>C. colurna</i>	OZ247467
	237	(TCA) ₈	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 005
	234	(TCA) ₇	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125818
	234	(TCA) ₇	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125829
	234	(TCA) ₇	<i>C. heterophylla</i>	CM028143
	240	(TCA) ₉	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 175

Продовження табл.Б.1

Локус	Розмір палеля, п.н.	Мотив	Вид/сорт	Номер в базі даних NCBI GenBank
BR414	125	(AAT) ₇	<i>C. avellana</i> cv. Софіївський 1	PV926124
	122	(AAT) ₆	<i>C. avellana</i>	KJ193944
	122	(AAT) ₆	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	XM_059591969
	125	(AAT) ₇	<i>C. avellana</i>	OZ219477
	125	(AAT) ₇	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 001
	128	(AAT) ₈	<i>C. chinensis</i>	CM106772
	128	(AAT) ₈	<i>C. colurna</i>	OZ247466
	137	(AAT) ₁₁	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 004
	112 ^a	(AAT) ₄	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125817
	135	(AAT) ₁₂	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125828
	131	(AAT) ₉	<i>C. heterophylla</i>	CM028142
	131	(AAT) ₉	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 330
CAC- C008	205	(AAT) ₅ (AAG) ₈	<i>C. avellana</i> cv. Корончастий	PV926125
	226 ^δ	(AAT) ₅ (AAG) ₁₆	<i>C. avellana</i>	DQ151612
	202	(AAT) ₆ (AAG) ₆	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	NC_081543
	244 ^ε	(AAT) ₄ (AAG) ₁₀ (AAG) ₈	<i>C. avellana</i>	OZ219476

Продовження табл.Б.1

Локус	Розмір палеля, п.н.	Мотив	Вид/сорт	Номер в базі даних NCBI GenBank
	238 ⁶	(AAT) ₅ (AAG) ₃ (AAG) ₁₃	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 004
	238	(AAT) ₉ (AAG) ₁₅	<i>C. chinensis</i>	CM106773
	223	(AAT) ₈ (AAG) ₁₁	<i>C. colurna</i>	OZ247465
	221 ^{6;2}	(AAT) ₅ (AAG) ₁₀ (AAG) ₆	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 003
	244 ⁶	(AAT) ₄ (AAG) ₁₀ (AAG) ₈	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125816
	229 ⁶	(AAT) ₄ (AAG) ₈ (AAG) ₅	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125827
	232 ⁶	(AAT) ₅ (AAG) ₈ (AAG) ₅	<i>C. heterophylla</i>	CM028141
	230 ⁶	(AAT) ₅ (AAG) ₇ (AAG) ₅	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 040
GB950	157	(TGG) ₂ TCG(TGG) ₃ (GA) ₄	<i>C. avellana</i> cv. Пиріжок	PV926126
	160	(TGG) ₇ (GA) ₄	<i>C. avellana</i>	KT943908
	157	(TGG) ₄ TCGTGG(GA) ₄	<i>C. avellana</i>	XM_059598699
	157	(TGG) ₄ TCGTGG(GA) ₄	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	NC_081546
	157	(TGG) ₄ TCGTGG(GA) ₄	<i>C. avellana</i>	OZ219480
	157	(TGG) ₄ TCGTGG(GA) ₄	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 006
	162	(TGG) ₂ TGCTG(TGC) ₃ TGG (GA) ₄	<i>C. chinensis</i>	CM106776
	157	(TGG) ₆ (GA) ₄	<i>C. colurna</i>	OZ247469

Продовження табл.Б.1

Локус	Розмір палеля, п.н.	Мотив	Вид/сорт	Номер в базі даних NCBI GenBank
	153	(TGG) ₄ (GA) ₅	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 007
	157	TAG(TGGTGC) ₂ TGG(GA)) ₄	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125819
	157	TAG(TGGTGC) ₂ TGG(GA)) ₄	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125830
	157	(TGG) ₆ (GA) ₄	<i>C. heterophylla</i>	CM028145
	160	TCG(TGG) ₆ (GA) ₄	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 269
BR270	92	(CTG) ₆	<i>C. avellana</i>	KJ193894
	98	(CTG) ₈	<i>C. avellana</i>	XM_059578301
	98	(CTG) ₈	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	NC_081541
	98	(CTG) ₈	<i>C. avellana</i>	OZ219475
	92	(CTG) ₆	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 003
	98	(CTG) ₈	<i>C. chinensis</i>	CM106770
	95	(CTG) ₇	<i>C. colurna</i>	OZ247463
	95	(CTG) ₇	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 001
	92	(CTG) ₆	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125814
	92	(CTG) ₆	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125825
	92	(CTG) ₆	<i>C. heterophylla</i>	CM028139

Продовження табл.Б.1

Локус	Розмір р алеля, п.н.	Мотив	Вид/сорт	Номер в базі даних NCBI GenBank
	95	(CTG) ₇	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 126
BR322	105	(ACT) ₇	<i>C. avellana</i>	KJ193907
	108	(ACT) ₈	<i>C. avellana</i>	XM_059576315
	108	(ACT) ₈	<i>C. avellana</i>	XM_059576314
	108	(ACT) ₈	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	NC_081551
	105	(ACT) ₇	<i>C. avellana</i>	OZ219484
	105	(ACT) ₇	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 009
	105	(ACT) ₇	<i>C. chinensis</i>	CM106780
	105	(ACT) ₇	<i>C. colurna</i>	OZ247472
	105	(ACT) ₇	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 010
	111	(ACT) ₉	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125824
	105	(ACT) ₇	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125835
	105	(ACT) ₇	<i>C. heterophylla</i>	CM028149
	107 ^o	(ACT) ₇	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 317
GB949	156	(TGG) ₇ TGA(TGG) ₄	<i>C. avellana</i>	KT943907
	153	(TGG) ₆ TGA(TGG) ₄	<i>C. avellana</i>	XM_059606598
	153	(TGG) ₆ TGA(TGG) ₄	<i>C. avellana</i>	XM_059606599
	153	(TGG) ₆ TGA(TGG) ₄	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	NC_081549

Продовження табл.Б.1

Локус	Розмір п.н.	Мотив	Вид/сорт	Номер в базі даних NCBI GenBank
	147	(TGG) ₄ TGA(TGG) ₄	<i>C. avellana</i>	OZ219483
	156	(TGG) ₇ TGA(TGG) ₄	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 007
	156	(TGG) ₇ TGA(TGG) ₄	<i>C. chinensis</i>	CM106779
	150	(TGG) ₅ TGA(TGG) ₄	<i>C. colurna</i>	OZ247470
	150	(TGG) ₁₀	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 008
	159	(TGG) ₈ TGA(TGG) ₄	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125822
	156	(TGG) ₂ TGAGGG (TGG) ₃ (TGA) ₂ (TGG) ₃	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125833
	153	(TGG) ₆ TGA(TGG) ₄	<i>C. heterophylla</i>	CM028147
	153	(TGG) ₆ TGA(TGG) ₄	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 054
BR438	193	(CT) ₁₁ (GTCT) ₂ (TCA) ₈	<i>C. avellana</i>	KJ193954
	195	(CT) ₁₂ (GTCT) ₂ (TCA) ₈	<i>C. avellana</i>	XM_059601891
	195	(CT) ₁₂ (GTCT) ₂ (TCA) ₈	<i>C. avellana</i>	XM_059601892
	195	(CT) ₁₂ (GTCT) ₂ (TCA) ₈	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	NC_081547
	199	(CT) ₁₁ (GTCT) ₂ (TCA) ₁₀	<i>C. avellana</i>	OZ219479
	191	(CT) ₁₀ (GTCT) ₂ (TCA) ₈	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 005
	186	(CT) ₈ (GTCT)(TCA) ₉	<i>C. chinensis</i>	CM106775
	181	(CT) ₈ (GT)(GTCT) ₂ (TCA) ₆	<i>C. colurna</i>	OZ247468

Продовження табл.Б.1

Локус	Розмір п.н.	Мотив	Вид/сорт	Номер в базі даних NCBI GenBank
	184	(CT) ₈ (GT)(GTCT) ₂ (TCA) ₇	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 006
	205	(CT) ₁₁ (GT) ₃ CA(GTCT)(TC A) ₈	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125820
	195	(CT) ₁₆ (TCA) ₈	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125831
	194	(CT) ₁₃ (GTCT)(TCA) ₈	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 309
BR464	280	(ATC) ₇	<i>C. avellana</i>	KJ193960
	280	(ATC) ₇	<i>C. avellana</i>	XM_059604722
	280	(ATC) ₇	<i>C. avellana</i> cv. Tombul	NC_081548
	286	(ATC) ₉	<i>C. avellana</i>	OZ219482
	280	(ATC) ₇	<i>C. avellana</i>	CBCOTP020000 002
	295	(ATC) ₁₂	<i>C. chinensis</i>	CM106777.1
	283	(ATC) ₈	<i>C. colurna</i>	OZ247473
	283	(ATC) ₈	<i>C. colurna</i>	CBDDSP010000 011
	289	(ATC) ₁₀	<i>C. americana</i> cv. Rush	CP125821
	286	(ATC) ₉	<i>C. americana</i> cv. Winkler	CP125832
	283	(ATC) ₈	<i>C. heterophylla</i>	CM028146

Продовження табл.Б.1

Локус	Розмір р алеля, п.н.	Мотив	Вид/сорт	Номер в базі даних NCBI GenBank
	295	(ATC) ₁₂	<i>C. heterophylla</i>	JADFUG010000 222

Примітка. Жирним виділено номери послідовностей визначених в цьому дослідженні. ^a – локус містить делецію 4 п.н.; ^b – локус містить делецію 3 п.н.; ^c – локус містить інсерцію 12 п.н.; ^e – локус містить делецію 20 п.н.; ^d – локус містить інсерцію 2 п.н.

ДОДАТОК В

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ



„Затверджую”
В.о. директора
Національного дендрологічного парку "Софіївка"
НАН України
канд. біол. наук, с.н.с.
Володимир Грабовий
« 9 » вересня 2024 р.
м. Умань, Черкаська обл.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ Андрія Миколайовича МІЩЕНКА «Розробка і використання ДНК-маркерів для ідентифікації сортів ліщини української селекції»

Даним актом засвідчується, що в експериментальній роботі відділу декоративних і плодових рослин Національного дендрологічного парку "Софіївка" НАН України впроваджені і використовуються наступні розробки А. М. Міщенка, які виконані за його дисертаційними дослідженнями:

1. За допомогою системи мікросателітних ДНК-маркерів, запропонованої А. М. Міщенком, вивчено та охарактеризовано алельний склад сортів фундука та видів ліщини з колекції НДП «Софіївка», що продемонструвало придатність даної системи для ідентифікації досліджених генотипів та використання її в селекційній роботі при створенні нових сортів фундука. Розроблені А. М. Міщенком лабораторні процедури ідентифікації зразків фундука на основі мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції з використанням мікросателітних маркерів дають змогу значно підвищувати ефективність селекційного процесу завдяки скороченню часу, необхідного для молекулярно-генетичного маркування зразків.

2. Розроблена А. М. Міщенком система молекулярно-генетичного маркування зразків фундука із використанням ПЛР-маркерів на основі послідовностей мобільних генетичних елементів (iPBS) є спрощеною альтернативою системі мікросателітних маркерів, що не потребує складного обладнання і дає змогу ефективно ідентифікувати сорти фундука й види ліщини. Створена система маркерів може сприяти проведенню молекулярно-генетичної ідентифікації зразків фундука з мінімальним технічним забезпеченням і підвищувати ефективність селекційного процесу.

Провідний науковий співробітник відділу
декоративних і плодових рослин
Національного дендрологічного парку "Софіївка" НАН України
канд. с.-г. наук, професор

Анатолій ОПАЛКО