

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПІРКО ЯРОСЛАВ ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 575.2:577.2

**ДИСЕРТАЦІЯ
ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ БІЛКІВ
ЦИТОСКЕЛЕТУ ЯК ЕФЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ
ГЕНОТИПУВАННЯ РОСЛИН**

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 Пірко Я. В.

Науковий консультант Блюм Ярослав Борисович, доктор біологічних наук, професор, академік НАН України

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Пірко Я. В. Поліморфізм довжини інтронів генів білків цитоскелету як ефективний інструмент генотипування рослин – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2021.

Дисертаційне дослідження присвячено розробленню та впровадженню молекулярно-генетичних маркерів, що ґрунтуються на використанні поліморфізму інтронів генів, які кодують білки цитоскелету (α -, β -, γ -тубулін та актин – Intron Length Polymorphism of Cytoskeleton Genes, ILP-CG) для генетичного профілювання, диференціації та генотипування рослин. Зокрема проведено аналіз існуючих геномних баз даних рослин на наявність послідовностей генів, що кодують α -, β -, γ -тубулін та актин. Досліджено їх екзон-інтронну структуру, здійснено вирівнювання послідовностей з метою отримання консенсусних послідовностей та підбір праймерів до консервативних ділянок геномів, що оточують інтрони генів. Підібрано як видоспецифічні, так і універсальні (що можуть бути використані у дослідженні багатьох видів рослин) вироджені праймери.

Наведено приклади застосування ТВР-аналізу (Tubulin Base Polymorphism), що ґрунтується на дослідженні поліморфізму I-го інтрону генів β -тубулінів, combinatorial ТВР (сТВР) та horse ТВР (hТВР), які базуються на аналізі поліморфізму II-го та I-го разом з II-м інтронів β -тубулінів, інтронів генів α - та γ - тубулінів, а також генів актину у генетичних дослідженнях. В роботі продемонстровано можливість використання ILP-маркерів, що базуються на вивченні поліморфізму інтронів цитоскелетних генів, для генотипування та диференціації рослин різних таксономічних груп,

а саме, на внутрішньовидовому (популяції, сорти та генотипи) та міжвидовому (окремі види) рівнях. Показано, що цей підхід може бути застосований під час аналізу однодольних та дводольних рослин. Для отримання характерного ДНК-профілю рослин проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з вже відомими та власноруч розробленими послідовностями праймерів, а отримані продукти реакції розділяли в неденатуруючому поліакриламідному гелі з подальшою візуалізацією продуктів за допомогою або етидію броміду, або нітрату срібла. Для всіх досліджених видів рослин був встановлений діапазон варіювання розмірів ампліконів (інтронів цитоскелетних генів), на основі значень коефіцієнтів генетичної подібності Нея та Лі побудовано UPGMA-дендрограми взаємозв'язку між окремими генотипами, сортами, популяціями; для кожного ПЛР-маркера розраховано значення PIC (Polymorphism Information Content). Диференціюючі властивості цитоскелетних ПЛР-маркерів оцінювали на трав'янистих і деревних рослинах. Зокрема представниках родини Злакові. Було продемонстровано диференціюючу здатність ТВР-методу на сортах української селекції роду *Eleusine*. Встановлено, що частина ампліконів з інтронами β -тубуліну є однаковою для всіх зразків, імовірно через те, що вони виявилися специфічними для роду *Eleusine*. Відмінності були легко помітні як між різними видами, так і між сортами в межах одного виду. Встановлено, що для диференціації видів роду *Eleusine* достатньо використовувати лише I-й інтрон гена β -тубуліну.

Рід *Aegilops* L. є найближчим родичем пшениці та являє собою природний резервуар генів для поліпшення її агротехнічних характеристик. Під час формування колекцій, а також за для оцінки генетичного різноманіття популяцій необхідні більш прості та дешеві, засновані на вивченні структурно-функціональної організації генів, підходи. У зв'язку з цим було перевірено можливість використання цитоскелетних ПЛР-маркерів, зокрема ТВР/h-ТВР/c-ТВР та оцінки поліморфізму інтронів генів актину у дослідженні природних популяцій егілопсів. Зокрема було перевірено їх

диференційну здатність на 15 зразках *Ae. biuncialis*, що представляють різні популяції цієї рослини в Криму. Встановлено, що ТВР-аналіз у всіх його варіантах дає можливість диференціювати зразки з різних кримських популяцій *Ae. biuncialis*. Виявлено, що за умов використання різних типів ТВР-аналізу характер кластеризації може відрізняється, в той же час групи, що утворюються за умов проведення бутстреп-аналізу, в цілому зберігаються. Також застосування ДНК-маркерної системи, що базується на використанні поліморфізму інтронів генів актину, дозволило генотипувати та диференціювати досліджені популяції *Ae. biuncialis*, виявивши їх значну гетерогенність та генетичну неоднорідність. В той же час, якщо порівнювати його з ТВР-аналізом, то АВР виявився гіршим інструментом щодо диференціації природних популяцій егілопсів, тому може бути рекомендований як додатковий метод аналізу.

Досліджуючи *Deschampsia antarctica* E. Desv. – злак, що зростає в екстремальних умовах Антарктики, встановлено, що жоден із варіантів методу аналізу поліморфізму інтронів генів тубуліну (ТВР, с-ТВР та с-ТВР із специфічними праймерами, h-ТВР) в цілому не виявив генетичного поліморфізму в досліджених збірках рослин. В той же час, збільшивши кількість аналізованих рослин у кожній популяції та застосувавши лише ТВР-аналіз, було виявлено внутрішньопопуляційний поліморфізм за I-им інтроном генів β -тубуліну. Це свідчить про доволі низький рівень генетичного різноманіття *D. antarctica* в досліджуваному регіоні, що узгоджується з даними, отриманими раніше іншими дослідниками.

Triticum aestivum та *Hordeum vulgare* є одними з головних продовольчих культур світу. Селекціонери створюють та реєструють нові сорти цих рослин, що потребує надійних та швидких методів виявлення їх гетерогенності, ідентифікації та диференціації. Під час проведених досліджень було оцінено можливість використання поліморфізму інтронів цитоскелетних генів для генотипування вітчизняних сортів пшениці та ячменю. Виявлено міжсортний поліморфізм в межах досліджених видів.

Результати продемонстрували непогану диференціюючу спроможність інтронів цитоскелетних генів для оцінки генетичного поліморфізму рослин та можливість використання його для фінгерпринт-аналізу злакових культур.

Також доведено можливість використання поліморфізму інтронів генів білків цитоскелету для диференціації та генотипування дводольних рослин. Зокрема досліджено за допомогою ТВР- та АВР-методів українські сорти та сортозразки *Camelina sativa* (L.) Crantz, яка є перспективною рослиною для створення біодизеля. За умов використання АВР, ТВР та сТВР вдалося диференціювати всі досліджувані зразки.

Вдалим ТВР-аналіз виявився у дослідженні генетичного різноманіття та філогенетичних взаємовідносин у перехреснозапильних покритонасінних рослин, зокрема це стосується представників роду *Achillea* L.: *Achillea glaberrima* Klok. та *Achillea leptophylla* Vieb. У обох видів вдалося виявити внутрішньовидовий поліморфізм. В цілому можна заключити, що ТВР-метод може бути успішно застосований для генетичного профілювання генотипів і розроблення довгострокових програм із збереження та відновлення популяцій ендемічних рослин.

ТВР та сТВР-методи, а згодом поліморфізм довжини інтронів генів актину були використані для диференціації та генотипування видів, сортів та сортозразків льону. За допомогою ILP-CG методів вдалося диференціювати різні види льону, а саме, *L. usitatissimum*, *L. perenne*, *L. humile*, *L. angustifolium* та *L. bienne*. При цьому, результати ТВР та сТВР-аналізу вказують на те, що *L. angustifolium* та *L. bienne* є різними видами, а *L. bienne* дійсно є підвидом *L. usitatissimum*. Також вдалося ідентифікувати та диференціювати сорти *L. usitatissimum*, що походять з різних країн. Варто зазначити, що під час кладистичного аналізу всі досліджені зразки розподілилися таким чином, що сорти однієї селекції виявилися поряд один з одним.

Проведені дослідження внутрішньо- та міжсортового поліморфізму 16 сортів льону української селекції за допомогою ТВР, оцінки поліморфізму інтронів генів актину та SSR-маркерів показало, що більшість сортів є

генетично неоднорідними за всіма дослідженими маркерами. При цьому ТВР-аналіз та аналіз поліморфізму інтронів генів актину не поступаються SSR-аналізу в диференційній здатності та навіть мають деякі практичні переваги у використанні. ТВР- та АВР-аналіз також було використано і під час дослідження ландрас льону, оскільки вивчення ландрас дає можливість виявити генотипи, цікаві як донори рідкісних алелей генів господарськоцінних ознак. В цілому було проаналізовано 30 білоруських ландрас льону. Використання ТВР- та АВР-методів дозволило диференціювати вивчені ландраси *L. usitatissimum* та дослідити їх внутрішньосортний поліморфізм.

Використовуючи аналіз поліморфізму інтронів генів актину та α -тубуліну генотиповано сорти томату (*S. lycopersicum*) та картоплі (*S. tuberosum*), отримано специфічні ДНК-профілі досліджених сортів. Більш поліморфною виявилася вибірка сортів картоплі, в той час як сорти томату мали значну генетичну спорідненість. Отримані дані свідчать про доцільність використання ІLP-CG для дослідження генетичних особливостей представників родини *Solanaceae*.

ТВР-метод виявився зручним та досить надійним як для молекулярно-генетичного маркування, так і для вивчення окремих аспектів внутрішньовидового поліморфізму господарчо цінних, садовопаркових та лісоутворюючих деревних рослин. В цілому, за допомогою ТВР-методу вдалося ідентифікувати унікальні патерни для 20 деревних видів рослин та створити молекулярні профілі кожного з цих видів, знайти деякі спільні фрагменти, які притаманні окремим родам в межах родин. Досліджено різні фенологічні форми *Quercus robur* (*Fagaceae*) (*Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora*) за допомогою ТВР-та мікросателітних маркерів. З'ясовано генетичні відмінності між ранньою та пізньою формами *Q. robur*. за цими двома видами маркерів. В цілому дерева досліджених фенологічних форм *Q. robur* мають відмінності як за ТВР-, так і за мікросателітними профілями.

Фрагменти, які представлено тільки в одній із форм можна використовувати для генетичного маркування.

Досліджено генетичну структуру інвазійних популяцій *Ulmus pumila* L. та *Ulmus suberosa* Moench. у Степовому Придніпров'ї з використанням ДНК-маркерів різних класів: мікросателітів та ТВР-маркерів. У дерев *U. suberosa* всі досліджені мікросателітні та ТВР-локуси виявилися мономорфними. В досліджуваних збірках *Ulmus pumila* за мікросателітними локусами виявлена нестача гетерозиготних генотипів. В цілому встановлено, що за переважною більшістю досліджених локусів *U. pumila* та *U. suberosa* у Степовому Придніпров'ї характеризується відносно низьким рівнем генетичної мінливості.

ТВР та сТВР дозволяють якісно генотипувати різні зразки мікроводоростей. Кожна з використаних ДНК-маркерних систем дозволила отримати ряд чітких та відтворюваних фрагментів, що містили перший (для ТВР) та другий (для сТВР) інтрони генів β -тубуліну. Специфічні ТВР- та сТВР-профілі значно відрізнялися між собою за кількістю та розташуванням цільових ампліконів, що дозволило чітко диференціювати генотипи мікроводоростей на різних таксономічних рівнях. Окрім того, обидві маркерні системи однозначно підтвердили однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму. Отримані результати в цілому свідчать про доцільність подальшого використання даних ДНК-маркерів для генотипування та аналізу різних таксонів водоростей.

Розроблено нові варіанти ILP-CG-методів, що базуються на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів α - та γ -тубуліну. За допомогою біоінформатичних підходів проведено пошук консервативних ділянок екзонів генів α - та γ -тубуліну у різних видів рослин, що оточують інтрони, і до яких було підібрано вироджені універсальні праймери. Розміри отриманих ампліконів цілком узгоджуються з даними біоінформатичного аналізу. Важливо, що у випадку *Linum usitatissimum* найбільше за профілем інтронів γ -тубуліну виокремлюється серед інших сорт Глобус, який слабо

диференціюється від інших зразків під час TBP-, ABP та SSR-аналізу. Також було доведено, що аналіз поліморфізму інтронів генів α - та γ -тубуліну є надійним молекулярно-генетичним інструментом, який може бути ефективно застосований для фінгерпринтингу та молекулярно-генетичного аналізу різних видів та сортів рослин як у поєднанні з іншими маркерними системами, так і самостійно.

Загалом показано високу ефективність та простоту використання ILP-CG-підходу для диференціації різних генотипів рослин, що може бути дуже корисним в галузі молекулярної генетики та селекції.

Ключові слова: молекулярно-генетичні маркери, інтрон, ILP (intron length polymorphism), α -, β -, γ -тубулін, генетичне профілювання, генотипування.

Список публікацій за темою дисертації:

1. Kravets OA, **Pirko YaV**, Kalafat LO, Rabokon AM, Postovoitova AS, Bilonozhko YuO, Privalikhin SN, Lykholat YuV, Blume YaB. Genetic and reproductive state assessment of *Ulmus pumila* and *U. suberosa* invasive populations in the dnierper steppe under climate change. Cytol. Genetics. 2020; 54 (1): 15. doi.org/10.3103/S0095452720010090 (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).

2. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний засіб генетичного профілювання злакових (Poaceae L.). Доповіді Національної академії наук України. 2019; 2: 78-83. doi.org/10.15407/dopovidi2019.02.078 (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).

3. Rabokon AM, **Pirko YV**, Demkovych AYe, Andreev IO, Parnikoza IYu, Kozeretska IA, Yu Z, Kunakh VA, Blume YB. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in *Deschampsia antarctica* E. Desv. across the western coast of the

Antarctic Peninsula. Polar Science. 2019;19:151-154. doi.org/10.1016/j.polar.2018.11.001 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

4. Rabokon A, Demkovich A, Sozinov A, Kozub N, **Pirko Ya**, Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. Cell Biol Int. 2019; 43: 1031-1039. DOI: 10.1002/cbin.10886 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

5. Pydiura N, **Pirko Ya**, Galinousky D, Postovoitova A, Yemets A, Kilchevsky A, Blume Ya. Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterisation of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). Cell Biol. Intl. 2019; 43: 1010-1018. DOI: 10.1002/cbin.11001 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

6. **Пірко ЯВ**, Постовойтова АС, Рабоконь АМ, Калафат ЛО, Приваліхін СМ, Білоножко ЮО, Пірко НМ, Блюм ЯБ. Вивчення поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну як метод аналізу генетичної диференціації рослин. Український ботанічний журнал. 2018; 75 (6): 576-584. doi.org/10.15407/ukrbotj75.06.576 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

7. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як інструмент генотипування представників родини *Solanaceae*. Науковий Вісник НУБІП України. 2018; 287: 70-78. doi.org/10.31548/biologiya2018.287.071 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

8. Postovoitova AS, Yotka OYu, **Pirko YaV**, Blume Ya B. Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci. *Cytol. Genetics*. 2018; 52 (6): 448-460. doi.org/10.3103/S0095452718060099 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

9. **Пірко ЯВ**, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабоконь АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Кравець ОА, Алексєєва АА, Хромих НО, Лихолат ЮВ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у рослин *Ulmus pumila* L. в Степовому Придніпров'ї. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2018; 16 (1): 28-34. (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

10. Rabokon AN, **Pirko YaV**, Demkovych AYe, Blume YaB. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genetics*. 2018; 52 (1): 1–10. doi.org/10.3103/S0095452718010115 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

11. Рабоконь АМ, **Пірко ЯВ**, Калафат ЛО, Гузенко ЄВ, Богданова МВ, Сакович ВІ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів β -тубуліну у білоруських ландрас *Linum usitatissimum* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018; 22: 180-185. doi.org/10.7124/FEEO.v22.945 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

12. **Пірко ЯВ**, Нецветов МВ, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабоконь АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Блюм ЯБ. Генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur* (Fagaceae) за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів.

Український ботанічний журнал. 2018; 75 (5): 489-500. doi.org/10.15407/ukrbotj75.05.489 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

13. **Pirko YaV**, Demkovich A E, Kalafat LO, Blume YaB, Lykholat OA. Studying the genetic structure of *Quercus robur* forest stands on anthropogenically transformed territories using introns of the β -tubulin gene. Biosystems Diversity. 2018; 26 (4): 269-275. doi.org/10.15421/011841 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

14. **Пірко ЯВ**, Буй ДД, Постовойтова АС, Рабоконь АМ, Калафат ЛО, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів γ -тубуліну як новий підхід до генотипування рослин. Доповіді Національної академії наук України. 2018; 12: 87-92. doi.org/10.15407/dopovidi2018.12.087 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

15. Калафат ЛО, Пірко НМ, Демкович АЄ, Приваліхін СМ, Рабоконь АМ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Оцінка генетичної різноманітності різних видів деревних рослин за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2017; 15 (2): 159-166. doi.org/10.7124/visnyk.utgis.15.2.874 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

16. Рабоконь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Андреев ІО, Парнікоза ІЮ, Козерецька ІА, Кунах ВА, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у *Deschampsia antarctica* Desv. з морської Антарктики. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 104-108. doi.org/10.7124/FEEO.v20.743 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

17. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016; 19: 43-46. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

18. Pirko NN, Demkovych AYe, Kalafat LO, Privalikhin SN, Rabokon AN, **Pirko YaV**, Blume YaB. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in different representatives of Pinaceae Lindl. family. Journal of Botany. 2016; 8 (2): 5-9. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

19. Рабокoнь АН, **Пірко ЯВ**, Демкович АЕ, Блюм ЯБ. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. Молекулярная и прикладная генетика (Минск). 2015; 19: 35-44. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

20. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015; 17: 82–86. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

21. Постовойтова АС, Баєр ГЯ, Пидюра МО, Пастухова НЛ, **Пірко ЯВ**, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Пошук та аналіз послідовностей генів актину в геномі льону. Наукові доповіді НУБіП. 2015; 8 (57) http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/14.pdf (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавтором – аналіз результатів, написання статті*).

22. Рабокoнь АН, Пoстoвoйтoвa АС, **Пиркo ЯВ**, Блюм ЯБ. Анализ гoмoлoгoв гeнoв oснoвнoх бeлкoв цитoскeлeтa у рaзличнoх видoв вoсшix рaстeний. Фaктoри експeримeнтaльнoї eвoлюцiї oргaнiзмiв. 2014; 14: 76–78. (Осoбистий внeсoк здoбувaчa: плaнувaння тa прoвeдeння експeримeнту, oпрaцювaння oтримaних дaних; рaзoм зi спiвaвтoрaми – aнaлiз рeзультaтiв, нaписaння стaттi).

23. **Пиркo ЯВ**. Дoслiджeння гeнeтичнoї мiнливoстi рiзних видiв рoслин зa дoпoмoгoю aнaлiзу пoлiмoрфiзмy iнтрoнiв гeнiв β -тубуліна. Прoмшлeннa бoтaнiкa. 2011; 11: 152-156.

24. Рабокoнь АМ, Бiлoнoжкo ЮО, Пoстoвoйтoвa АС, **Пиркo ЯВ**, Блюм ЯБ. Гeнeтичнe прoфiлювaння видiв дeрeвних рoслин зa дoпoмoгoю aнaлiзу пoлiмoрфiзмy довжини iнтрoнiв гeнiв γ -тубуліну. Мaтeрiали мiжнaрoднoї нaукoвoї кoнфeрeнцiї, присв'ячeнoї 100-рiччю вiд днa нaрoджeння прoфeсoрa Кoст'янтинa Мaлинoвськoгo «Прoблeми уникнeння втрaт бioрiзнoмaнiтт'я укрaїнських Кaрпaт». 2020 14-15 трaвн'я, Львiв, Укрaїнa, 2020. с.30-33.

25. **Pirko Ya**, Buy D, Rabokon A, Postovoitova A, Kalafat L, Blume Ya. Genomic fingerprinting of *Linum usitatissimum* L. cultivars using intron length polymorphism of γ -tubulin. 4th International Scientific Conference «Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health And Quality of Human and Bees Life». 2019, 11-13 September, Nitra, Slovakia, 2019. p.124.

26. **Pirko Ya**, Rabokon A, Postovoitova A, Kalafat L, Bilonozhko Yu, Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin and actin genes as efficient tool for *Camelina sativa* genotyping. 4th International Scientific Conference «Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health And Quality of Human and Bees Life». 2019, 11-13 September, Nitra, Slovakia, 2019. p. 125.

27. Пoстoвoйтoвa АС, **Пиркo ЯВ**, Блюм ЯБ. Гeнoтипувaння сортiв рису пoсiвнoгo зa дoпoмoгoю oцiнки пoлiмoрфiзмy довжини другoгo iнтрoну гeнiв aктинy. Мiжнaрoднa нaукoвo-прaктичнa кoнфeрeнцiя «Сучaснi тeхнoлoгiї пiдвищeння гeнeтичнoгo пoтeнцiялу рoслин», 2018, 4-5 липн'я, Хaркiв, Укрaїнa, 2018. с. 231-232.

28. Rabokon A, **Pirko Ya**, Kalafat L, Kozub N, Sozinov I, Demkovych A, BlumeYa. The second intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis*. Abstract of the 7th Baltic Genetics Congress, 2018, October 24-27, Riga, Latvia, 2018. с. 243.

29. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, Йотка ОЮ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Дослідження поліморфізму довжин інтронів генів β -тубуліну у сортів льону української селекції. Третя конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». 2017, 16-18 травня, Київ, Україна, 2017. с. 43.

30. Pirko NN, Kalafat LO, Demkovych AYe, Privalikhin SN, Rabokon AN, Koval OP, **Pirko YaV**, Blume YaB. Investigation of genetic variability of Fagales order by analysis of introns polymorphism of β -tubulin genes. Материали 5-ой Международной конференции-совещания «Сохранение лесных генетических ресурсов». 2017, 02-07 октября, Гомель, Беларусь, 2017. с. 172-175.

31. Постовойтова АС, Йотка ОЮ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Аналіз поліморфізму довжин інтронів генів актину у представників роду *LINUM* L. Третя конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». 2017, 16-18 травня, Київ, Україна, 2017. с. 41.

32. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Козуб НО, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів актину як новий метод оцінки генетичної диференціації природних популяцій *Aegilops biuncialis*. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин». 2017, 12 вересня, Одеса, Україна, 2017. с. 61-62.

33. Рабокoнь АН, Демкович АЕ, **Пірко ЯВ**, Богданова МВ, Сакович ВИ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у ландрас *Linum usitatissimum* L. Материали III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». 2016, 23-25 ноября, Минск, Беларусь, 2016. с. 33.

34. Blume RYa, Rabokon AN, Demkovich AYe, **Pirko YaV**, Yemets AI. Analysis of the exon-intron structure of β -tubulin genes in different plant species. Annual Meeting, 2016, Dec 3-7, San Francisco, California, USA: ASCB, 2016. p. 1177.

35. **Пирко ЯВ**, Рабокoнь АН, Постовойтова АС, Самофалова ДА, Блюм ЯБ. Анализ гомологов генов, кодирующих актин, у различных видов высших растений. Матеріали ІІІ міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології». 2014, 24-27 лютого, Донецьк, Україна, 2014. с. 284–285.

36. **Пирко ЯВ**, Постовойтова АС, Рабокoнь АМ, Блюм ЯБ. Анализ экзон-интронной структуры генов “домашнего хозяйства” у различных видов растений. Матеріали ІІ конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». 2013, 24-25 грудня, Київ, Україна, 2013. с. 34.

37. Демкович АЄ, Рабокoнь АМ, **Пирко ЯВ**, Блюм ЯБ, винахідники; заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Прилад для вертикального гель-електрофорезу; Патент України на корисну модель № 102060. 2015 Жовт. 12. Бюл. 19.

SUMMARY

Pirko Ya.V. Intron length polymorphism of cytoskeleton protein genes as an effective tool for plant genotyping – Manuscript.

A thesis submitted to acquire the degree of Doctor of Science in Biology by speciality 03.00.22 – molecular genetics – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation study is devoted to the development and implementation of molecular genetic markers based on the intron length polymorphism using of genes encoding cytoskeleton proteins (α -, β -, γ -tubulin and actin - Intron Length Polymorphism of Cytoskeleton Genes, ILP-CG) for genetic profiling, differentiation and genotyping of plants. In particular, the analysis of existing plant genomic databases for the presence of gene sequences encoding α -, β -, γ -tubulin and actin was carried out. Their exon-intron structure was investigated, the sequence alignment was carried out in order to obtain consensus sequences and the primer selection for the conserved gene regions surrounding the gene introns. Both species-specific and universal (which can be used in the study of many plant species) degenerate primers were selected.

Examples of application of TBP (Tubulin Base Polymorphism) analysis (based on the study of the Ist intron length polymorphism of the β -tubulin genes), combinatorial TBP (cTBP) and horse TBP (hTBP) analysis (based on the analysis of the IInd intron length polymorphism and Ist together with IInd intron length polymorphism of β -tubulins), α - and γ -tubulin gene intron analysis, as well as actin intron genes analysis are shown in genetic studies. The investigation demonstrates the possibility of using ILP markers based on the study of intron polymorphism of the cytoskeleton genes for genotyping and differentiation of different taxonomic plant groups, specifically, at the intraspecific (populations, varieties and genotypes) and interspecific (individual species) levels. It is shown that this approach can be applied to the analysis of monocotyledonous and dicotyledonous

plants. To obtain a specific plant DNA profile, a polymerase chain reaction (PCR) with known and personally developed primer sequences was carried out, and the resulting reaction products were separated in a non-denaturing polyacrylamide gel with further product visualization of either ethidium bromide or silver nitrate. For all studied plant species, a variation range of the amplicon sizes (cytoskeleton genes intron sizes) was established. UPGMA-denrograms of the relationship between individual genotypes, varieties, populations were constructed based on the values of the Ney and Lee genetic similarity coefficients; PIC (Polymorphism Information Content) value was calculated for each ILP marker.

The differentiating properties of cytoskeleton ILP markers were evaluated in herbaceous and woody plants. In particular, representatives of the Poacea family. The differentiating ability of the TBP method was demonstrated on the Ukrainian selection varieties of the genus *Eleusine*. It was found that some amplicons with β -tubulin introns are the same for all samples, probably due to the fact that they turned out to be specific for the genus *Eleusine*. The differences were easily distinguishable both between different species and between varieties within the same species. It has been established that for the species differentiation of the genus *Eleusine*, it is sufficient to use only the Ist intron of the β -tubulin gene.

The genus *Aegilops* L. is the closest relative of wheat and is a natural reservoir of genes for improving its agricultural characteristics. When forming collections, as well as for assessing the genetic diversity of populations, simpler and cheaper approaches based on the study of the structural and functional organization of genes are needed. In this regard, the possibility of using cytoskeleton ILP markers, in particular TBP/h-TBP/c-TBP and assessment of the actin gene intron polymorphism the in the study of natural populations of *Aegilops*, was tested. In particular, their differentiating ability was tested on 15 samples of *Ae. biuncialis*, representing different populations of this plant in Crimea. It was found that TBP analysis in all its variants makes it possible to differentiate samples from different Crimean populations of *Ae. biuncialis*. It was discover that at using different types of TBP analysis, the clustering may differ,

however, the groups formed under the bootstrap analysis conditions are generally preserved. Also, the use of a DNA marker system based on the use of of actin gene intron polymorphism made it possible to genotype and differentiate the studied populations of *Ae. biuncialis*, revealing their significant heterogeneity and genetic heterogeneity. At the same time, when compared with TBP-analysis shown that the ABP is not a suitable tool to differentiate natural populations *Aegilops*, therefore, it can be recommended only as an additional analysis method.

Investigating *Deschampsia antarctica* E. Desv, a cereal growing in extreme Antarctic conditions, it was found that none of the method variants for analyzing of tubulin gene intron polymorphism (TBP, c-TBP, and c-TBP with specific primers, h-TBP) as a whole did not reveal genetic polymorphism in the studied plant samples. At the same time, increasing the amount of analyzed plants in each population and using only TBP analysis, intrapopulation polymorphism was found for the Ist intron of β -tubulin genes. This indicates a rather low level of genetic diversity of *D. antarctica* in the studied region, which is consistent with the data obtained earlier by other researchers.

Wheat (*Triticum aestivum*) and barley (*Hordeum vulgare*) are some of the main food crops in the world. Breeders create and register new varieties of these plants, which requires reliable and fast methods for revealing their heterogeneity, identification and differentiation. In the course of the studies, the possibility of using the of the cytoskeleton gene intron polymorphism for the genotyping of domestic wheat and barley varieties was assessed. Intervarietal polymorphism was revealed within the studied species. The results demonstrated a good differentiating ability of cytoskeleton gene introns for assessing genetic polymorphism in plants and the possibility of using it for fingerprint analysis of cereals.

The possibility of using intron length polymorphism of cytoskeleton protein genes for differentiation and genotyping of dicotyledonous plants was also proved. In particular, Ukrainian varieties and genotypes of camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz), which is a promising plant for creating biodiesel, have been studied using

TBP and ABP methods. With the use of ABP, TBP and cTBP, it was possible to differentiate all the investigated samples.

TBP analysis was successful in the study of genetic diversity and phylogenetic relationships in cross-pollinated angiosperms, in particular in the genus *Achillea* L.: *Achillea glaberrima* Klok. and *Achillea leptophilla* Bieb. Intraspecific polymorphism was detected in both species. In general, it can be concluded that the TBP method can be successfully used for genetic profiling of genotypes and the development of long-term programs for the conservation and restoration of endemic plant populations.

TBP and cTBP methods and intron length polymorphism of actin genes were used for differentiation and genotyping of flax species, varieties and cultivars. Different types of flax, namely *L. usitatissimum*, *L. perenne*, *L. humile*, *L. angustifolium* and *L. bienne*, were differentiated by ILP-CG methods. However, the results of TBP and cTBP analysis indicate that *L. angustifolium* and *L. bienne* are different species, and *L. bienne* is indeed a subspecies of *L. usitatissimum*. Varieties of *L. usitatissimum* originating from different countries were also identified and differentiated. It should be noted that during the cladistic analysis, all the studied samples were distributed in such a way that the varieties of one selection were next to each other.

Studies of intra- and intervarietal polymorphism of 16 varieties of flax of Ukrainian selection using TBP, intron length polymorphism of actin genes and SSR-markers showed that most varieties were genetically heterogeneous in all studied markers. In this case, TBP analysis and analysis of intron length polymorphism of actin genes are not inferior to SSR analysis in the ability to differentiate and even have some practical advantages in use. TBP and ABP analysis were also used in the study of flax landrace, as the study of landrace makes it possible to identify genotypes which are interesting as donors of rare alleles of genes of economic traits. In total, 30 Belarusian flax landraces were analyzed. The use of TBP and ABP methods allowed to differentiate the studied landraces of *L. usitatissimum* and to study their intra-varietal polymorphism.

Using analysis of intron length polymorphism of actin and α -tubulin genes, tomato (*S. lycopersicum*) and potato (*S. tuberosum*) varieties were genotyped, and specific DNA profiles of the studied varieties were obtained. The selection of potato varieties turned out to be more polymorphic, while tomato varieties had significant genetic relatedness. The data obtained indicate the feasibility of using ILP-CG to study the genetic characteristics of members of the family *Solanaceae*.

The TBP method proved to be convenient and quite reliable both for molecular genetic labeling and for studying certain aspects of intraspecific polymorphism of economically valuable, horticultural and forest-forming woody plants. In general, using TBP method unique patterns for 20 tree species were identified and molecular profiles of these species were created, some common fragments that were inherent in individual genera within families were found. Various phenological forms of *Quercus robur* (*Fagaceae*) (*Q. robur* var. *praecox* and *Q. robur* var. *tardiflora*) were studied using TBP and microsatellite markers. Genetic differences between early and late forms of *Q. robur* have been elucidated for these two types of markers. In general, the trees of the studied phenological forms of *Q. robur* have differences in both TBP and microsatellite profiles. Fragments that are presented in only one form can be used for genetic labeling.

The genetic structure of invasive populations of *Ulmus pumila* L. and *Ulmus suberosa* Moench was studied. in the Steppe Dnieper using DNA markers of different classes: microsatellites and TBP markers. In *U. suberosa* trees, all studied microsatellite and TBP loci were found to be monomorphic. A lack of heterozygous genotypes was detected in the studied samples of *U. pumila* at microsatellite loci. In general, it was found that the vast majority of the studied loci *U. pumila* and *U. suberosa* in the Steppe Dnieper is characterized by a relatively low level of genetic variability.

TBP and cTBP allow to qualitatively genotype different samples of microalgae. Each of the DNA marker systems used allowed to obtain a number of clear and reproducible fragments containing the first (for TBP) and second (for cTBP) introns of β -tubulin genes. Specific TBP and cTBP profiles differed

significantly in the number and location of target amplicons, which allowed to clearly differentiate the genotypes of microalgae at different taxonomic levels. In addition, both marker systems clearly confirmed the homogeneity of individual samples belonging to the same strain. The results obtained in general indicate the feasibility of further use of these DNA markers for genotyping and analysis of various algal taxa.

New variants of ILP-CG methods based on the estimation of the intron length polymorphism of α - and γ -tubulin genes have been developed. Bioinformatics approaches were used to search for conserved exon regions of α - and γ -tubulin genes in various plant species surrounding introns, and to which degenerate universal primers were selected. The dimensions of the obtained amplicons are fully consistent with the data of bioinformatics analysis. Importantly, in the case of *Linum usitatissimum*, the Globin cultivar, which is weakly differentiated from other samples during TBP, ABP and SSR analysis, stands out the most in terms of intron profile of γ -tubulin. It was also proved that the intron polymorphism analysis of α - and γ -tubulin genes is a reliable molecular genetic tool that can be effectively used for fingerprinting and molecular genetic analysis of various plant species and varieties both in combination with other marker systems and independently.

In general, the high efficiency and ease of use of the ILP-CG approach for the differentiation of plant genotypes has been shown, which can be very useful in the field of molecular genetics and selection.

Key words: molecular genetic markers, intron, ILP (intron length polymorphism), α -, β -, γ -tubulin, genetic profiling, genotyping.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	26
ВСТУП.....	29
РОЗДІЛ 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ У ДОСЛІДЖЕННІ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ РОСЛИН (огляд літератури).....	39
1.1. Основні типи ДНК-маркерів.....	44
1.1.1. Довільні ДНК-маркери.....	45
1.1.2. Ген-специфічні ДНК-маркери.....	54
1.2. Поліморфізм довжини інтронів генів як основа розроблення молекулярно-генетичних маркерів.....	60
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	77
2.1. Рослинний матеріал.....	77
2.2. Біоінформатичний пошук та аналіз генів, що кодують цитоскелет клітини, в геномах досліджуваних рослин	89
2.3. Виділення рослинної ДНК та визначення її концентрації	92
2.4. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).....	93
2.5. Електрофорез та візуалізація продуктів ампліфікації.....	98
2.6. Статистичний аналіз даних.....	99
РОЗДІЛ 3. БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ЕКЗОН-ІНТРОННОЇ СТРУКТУРИ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ БІЛКИ ЦИТОСКЕЛЕТУ КЛІТИНИ, ТА РОЗРОБЛЕННЯ ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЇХ ІНТРОНІВ.....	101
3.1. Аналіз екзон-інтронної структури генів, що кодують білки цитоскелету (α -, β -, γ -тубулін, актин) у різних видів вищих рослин.....	101
3.2. Пошук консенсусних послідовностей генів, що кодують білки цитоскелету клітини, та розроблення олігонуклеотидних праймерів для дослідження поліморфізму інтронів генів, що кодують білки цитоскелету клітини.....	121

РОЗДІЛ 4. ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ ТА АКТИНУ	161
4.1. Генотипування однодольних рослин за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну.....	161
4.1.1. Генетична диференціація видів роду <i>Eleusine</i> L. з використанням поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну.....	161
4.1.2. Генотипування <i>Aegilops biuncialis</i> Vis. за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну	164
4.1.3. Оцінка генетичної різноманітності природних популяцій <i>Aegilops biuncialis</i> за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів актину	172
4.1.4. Генетичне профілювання острівних популяцій <i>Deschampsia antarctica</i> E. Desv. за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну.....	175
4.1.5. Генотипування сортів пшениці та ячменю за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну.....	180
4.1.6. Генотипування сортів пшениці, ячменю та рису за допомогою поліморфізму інтронів генів актину.....	183
4.2. Генетичне профілювання дводольних рослин за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину	188
4.2.1. Генотипування <i>Camelina sativa</i> L. Cranz. за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину.....	188
4.2.2. Генетичне профілювання <i>Achillea glaberrima</i> Klok. та <i>Achillea leptophylla</i> Vieb. за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну.....	195
4.2.3. Генотипування різних видів льону за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину.....	197

4.2.3.1. Генетичне профілювання різних видів роду <i>Linum</i> L. за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну	197
4.2.3.2. Порівняльний аналіз використання поліморфізму інтронів генів β -тубуліну, актину та мікросателітних локусів для генетичного профілювання сортів льону української селекції.....	202
4.2.3.3. Генотипування білоруських ландрас льону за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну.....	225
4.2.4 Генотипування представників родини <i>Solanaceae</i> (<i>Solanum tuberosum</i> L. та <i>S. lycopersicum</i> L.) за допомогою поліморфізму інтронів генів актину.....	232
4.3. Застосування поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для дослідження генетичної мінливості деревних рослин.....	236
4.3.1. Дослідження генетичної структури деревостанів <i>Quercus robur</i> L. на антропогенно змінених територіях за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну.....	245
4.3.2. Генетичні особливості фенологічних форм <i>Quercus robur</i> L. за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів.....	252
4.3.3. Дослідження генетичної структури <i>Ulmus pumila</i> та <i>U. suberosa</i> в Степовому Придніпров'ї за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів	262
4.3.3.1 Поліморфізм мікросателітних локусів у <i>Ulmus pumila</i> та <i>U. suberosa</i>	267
4.3.3.2. Поліморфізм інтронів β -тубуліна у рослин <i>Ulmus pumila</i> та <i>U suberosa</i>	273
4.4. Генетичне профілювання мікроводоростей за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну.....	277

РОЗДІЛ 5. ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ α -ТУБУЛІНУ	283
РОЗДІЛ 6. ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ АНАЛІЗУ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ γ -ТУБУЛІНУ	293
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	297
ВИСНОВКИ.....	324
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	329
ДОДАТОК	380

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

MAS	-	(Marker Assisted Selection) маркер-опосередкований добір
QTL	-	(Quantitative Trait Loci) локус кількісної ознаки
SSR	-	(Simple Sequence Repeats) повтори простих послідовностей, мікросателіти
TBP	-	(Tubulin Base Polymorphism) поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну
PIC	-	(Polymorphism Information Content) індекс поліморфності
ЦТАБ	-	(СТАВ) цетилтриметиламоній бромід
ПЛР	-	(PCR) полімеразна ланцюгова реакція
дНТФ	-	(dNTP) суміш дезоксирибонуклеотидтрифосфатів
п.н.	-	(bp) пара нуклеотидів
ПААГ	-	(PAGE) поліакриламідний гель
GTMs	-	(Gene-targeted markers) ген-специфічні маркери
ILP	-	(Intron Length Polymorphism) поліморфізм довжини інтронів
ДНК	-	(DNA) дезоксирибонуклеїнова кислота
кДНК	-	(cDNA) комплементарна ДНК
рДНК	-	рибосомальна ДНК
RFLP	-	(Restriction Fragment Length Polymorphism) поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів
RDMs	-	(Random DNA Markers) довільні ДНК-маркери
AADs	-	(Arbitrarily amplified DNA markers) ДНК-маркери, що ампліфікуються довільно
RAPD	-	(Random Amplified Polymorphic DNA) випадково ампліфікована поліморфна ДНК

AFLP	-	(Amplified Fragment Length Polymorphism) поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів
ISSR	-	(Inter Simple Sequence Repeats) міжмікросателітні послідовності
REMAP	-	(Retrotransposon-microsatellite Amplified Polymorphism) поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами та мікросателітами
IRAP	-	(retrotransposon amplified polymorphism) поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами
РНК	-	(RNA) рибонуклеїнова кислота
mRNA	-	матрична РНК
LTR	-	(Long Terminal Repeat) довгий кінцевий повтор
PBA	-	(Cytochrome P450 Based Analogues) поліморфізм аналогів генів цитохрому P450
TBP	-	(Tubulin Based Polymorphism) поліморфізм інтронів генів β -тубуліну
hTBP	-	(Horse Tubulin Base Polymorphism) поліморфізм довжини I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну
cTBP	-	(combinatorial Tubulin Base Polymorphism) комбінований поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (II-го інтрона)
UTR	-	нетрансльовані ділянки генів (untranslated regions)
ABP	-	(Actin Base Polimorphism) поліморфізм інтронів генів актину
UPGMA	-	(Unweighted Pair-Group Method) незважений парногруповий метод з арифметичним усередненням

SCAR	-	(Sequence Characterized Amplified Regions) ампліфіковані ділянки, охарактеризовані сиквенуванням
CAPS	-	(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) аналіз рестрикційного поліморфізму ампліфікованих послідовностей
EST	-	(Expressed Sequence Tag) послідовності, що експресуються
SNP	-	(Single Nucleotide Polymorphism) поліморфізм, викликаний заміною одного нуклеотида
CDDP	-	(Conserved DNA-derived Polymorphism) поліморфізм, що виникає під час аналізу ділянок між консервативними фрагментами ДНК
МГС	-	міжгенний спейсер
IME	-	(Intron Mediated Enhancement) властивість інтронів підсилювати експресію генів, що містять цей інтрон
IDSE	-	(Intron Dependent Spatial Expression)
ISJ	-	(Intron Splice Junction)
EPIC PCR	-	(Exon-Primed Intron-Crossing PCR) ПЛР з використанням праймерів до ділянок екзонів, що фланкують інтрон
CISP	-	(Conserved-Intron Scanning Primers)
PIP	-	(Potential Intron Polymorphism) потенційний поліморфізм інтронів
PLUG	-	(PCR-based Landmark Unique Gene)
IT	-	(Intron-Targeting)
γ-TuRC	-	γ-тубулінові кільцеві комплекси
5'UTR	-	5'-нетрансльована ділянка генів
3'UTR	-	3'-нетрансльована ділянка генів

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Дослідження генетичної різноманітності видів є основою під час проведення генетико-селекційних досліджень, оцінки біорізноманітності, вивчення проблем філогенії, а також дослідження структури та динаміки популяцій [22, 403]. Для цього широко застосовують молекулярно-генетичні маркери (МГМ), наприклад, ДНК-маркери, яких на сьогодні існує дуже велика кількість. Кожен з маркерів має свої переваги та недоліки, деякі застосовуються тільки з певною метою. Зважаючи на те, що інформація щодо структури геномів рослин постійно оновлюється, то продовжуються пошуки нових маркерних систем, які були б більш зручними, дешевими та ефективними під час проведення генетичного аналізу.

Серед ДНК-маркерів, що застосовуються у популяційно-генетичних дослідженнях, досить популярними є SSR (Simple Sequence Repeats) маркери або мікросателіти, методика застосування яких є відносно недорогою та відтворюваною [202]. До того ж, вони кодомінантні за характером успадкування, що робить їх доволі зручним інструментом у генетичних дослідженнях. Іншою, досить корисною групою маркерів є так звані STS-маркери (Sequence Tagged Sites), що дають змогу аналізувати поліморфізм певних послідовностей в генах, спираючись на знання сиквенсів ділянок генів, які нерідко асоціюються з тими, чи іншими ознаками, які ми можемо безпосередньо спостерігати [324].

Новим типом маркерів, які суміщають в собі інформаційність STS-маркерів та простоту аналізу мікросателітів – є маркери, що базуються на знанні структури генів, а саме, їх екзон-інтронної структури. Іншими словами мова йде про ILP (Intron Length Polymorphism), або поліморфізм довжини інтронів [34]. Система, що ґрунтується на такого роду поліморфізмі буде ефективною, коли ділянки екзонів генів будуть мати високий рівень гомології. До таких генів можна віднести гени, що кодують білки

цитоскелету клітини, наприклад, тубуліни, актин тощо. Варто зазначити, що тубуліни відіграють важливу роль у життєдіяльності клітини. Вони входять до складу мікротрубочок, які беруть участь у поділі клітин, транспорті везикул, формуванні клітинної стінки та інших процесах [31, 209, 223, 250]. Відомі декілька форм тубулінів, зокрема α -, β -, γ -тубуліни, і є інформація про те, що цих форм може бути набагато більше. Однак тільки α - та β -тубуліни відносяться до добре досліджених [223]. Завдяки тому, що α -, β -, γ -тубуліни є дуже важливими для клітини, то у рослин різних систематичних груп можна передбачити існування певної консервативності цих білків за амінокислотними послідовностями та, відповідним чином, за нуклеотидними послідовностями генів, що їх кодують. У переважній більшості випадків це відноситься до кодуючих ділянок генів – екзонів, в той же час до гіперваріабельних ділянок генів, що можуть мати різну довжину, належать інтрони генів тубулінів. Зважаючи на те, що розміри інтронів у різних таксономічних одиниць (або навіть рослин в межах однієї одиниці) можуть бути різними, то спостерігається інтронний поліморфізм. Таким чином, дослідження поліморфізму інтронів (ILP) – новий підхід, який може використовуватися у генетичному аналізі рослин, а ILP-CG – метод, який ґрунтується на визначенні поліморфізму довжини інтронів генів, що кодують білки цитоскелету клітини. Встановлено, що поліморфізм довжини інтронів цитоскелетних генів можна легко виявити за допомогою гель-електрофорезу, і немає необхідності в додаткових аналізах ампліконів. Зокрема, використовуючи аналіз поліморфізму одного з інтронів генів, що кодують β -тубулін, здійснено аналіз деяких видів родів *Eleusine Gaertn.*, *Lotus L.*, *Coffea L.*, *Brassica L.*, *Rosa L.* [22, 34, 36]. Варто зазначити, що в подальшому був залучений до аналізу і другий інтрон β -тубуліна, в результаті чого було збільшено диференціальну здатність методу [34, 36]. В той же час цей інтрон виявляється не у всіх видів рослин. Зокрема він відсутній у *Zea mays L.* [22], що може вплинути на результати аналізу.

Варто зазначити, що поліморфізм довжини інтронів цитоскелетних

генів взагалі не досліджений для багатьох голо- та покритонасінних видів рослин. Також не виключено, що поліморфізм довжини інтронів генів цитоскелету може виявитися пов'язаним із ступенем вираженості деяких морфологічних ознак, в тому числі, господарсько значущих, або бути пов'язаною з адаптацією як окремих особин, так і видів в цілому.

Загалом можна зробити висновок, що ІЛР підхід (оцінка поліморфізму інтронів), зокрема генів, що кодують α -, β -, γ -тубуліни та актин – швидкий, недорогий, простий, надійний метод, який не вимагає наявності великої попередньої інформації про геном рослини, і дає можливість диференціювати різні види рослин. Розширення лінійки маркерів за рахунок залучення у дослідження інтронів генів білків цитоскелету може виявитися корисним у подальших молекулярно-генетичних та генетико-селекційних дослідженнях різноманітних видів рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології та у відділі популяційної генетики Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» в рамках бюджетних науково-дослідних робіт «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (номер держреєстрації 0112U001597, 2012–2016 рр.), «Популяційна біологія і генетика видів деревних рослин на антропогенно трансформованих ландшафтах» (номер держреєстрації 0112U007760, 2014–2017 рр.), «Створення молекулярно-генетичних маркерів для диференціації різних генотипів рослин на основі вивчення поліморфізму інтронів генів їх цитоскелетних білків» (номер держреєстрації 0115U005025, 2015–2019 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було на основі аналізу екзон-інтронної структури генів, що кодують цитоскелетні білки (α -, β -, γ -тубулін, а також актин) у рослин, розробити та впровадити молекулярно-

генетичні маркери для вивчення поліморфізму інтронів та їх подальшого застосування у молекулярно-генетичних дослідженнях. За допомогою розроблених маркерів здійснити генетичне профілювання (генотипування) окремих генотипів, сортів, популяцій та видів рослин різних таксономічних груп.

Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити наступні завдання:

1. За допомогою біоінформатичних підходів здійснити пошук гомологічних послідовностей генів, що кодують α -, β -, γ -тубуліни та актин у різних видів рослин, встановити їх екзон-інтронну структуру.

2. Провести окремо пошук консенсусних послідовностей для кожної групи генів цитоскелетних білків (α -, β -, γ -тубулінів та актину), що об'єднують консервативні ділянки генів – екзони, та здійснити дизайн олігонуклеотидних праймерів для ампліфікації інтронних ділянок.

3. Проаналізувати специфічність і чутливість методів, що базуються на вивченні поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину у різних видів рослин, провівши за допомогою розроблених маркерів генотипування окремих генотипів, сортів, популяцій, видів вищих рослин та мікроводоростей.

4. Здійснити генотипування однодольних рослин шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину, зокрема кримських популяцій егілопсу двохдюймового (*Aegilops biuncialis* Vis.), вибірки сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) та ячменю (*Hordeum vulgare* L.).

5. Здійснити генотипування щучнику антарктичного (*Deschampsia antarctica* E. Desv.) за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та сортів рису (*Oryza sativa* L.) за допомогою поліморфізму інтронів генів актину.

6. Здійснити генетичне профілювання дводольних рослин за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та

актину, зокрема, рижію посівного (*Camelina sativa* L. Cranz.) та за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну – видів роду Деревій (*Achillea glaberrima* Klok. та *Achillea leptophilla* Bieb.).

7. Співставити ефективність генотипування різних видів льону (*Linum* L.), а також сортів льону української селекції за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну, актину та мікросателітних маркерів.

8. Генотипувати представників родини *Solanaceae* – картоплі (*Solanum tuberosum* L.) та томату (*Solanum lycopersicum* L.) шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.

9. Дослідити можливість застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для вивчення генетичної мінливості деревних рослин.

10. Встановити генетичну структуру деревостанів *Quercus robur* L. на антропогенно змінених територіях, а також за результатами аналізу мікросателітних локусів та поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну встановити генетичні особливості фенологічних форм дубу звичайного *Quercus robur* L.

11. З'ясувати ефективність використання поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну для генотипування та генетичної диференціації різних видів рослин рослин.

12. Перевірити ефективність генотипування рослин за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну.

13. Визначити ефективність застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР-метод) та комбінаторного (сТВР-метод) для генотипування зразків мікроводоростей.

14. Порівняти ефективність застосування ДНК-маркерних систем, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів цитоскелетних білків, з іншими генетичними маркерами, зокрема мікросателітними, на прикладі різних видів рослин.

Об'єкт дослідження: поліморфізм довжини інтронів генів основних цитоскелетних білків (α -, β -, γ -тубуліни та актин) у рослин.

Предмет дослідження: нуклеотидні послідовності генів цитоскелетних білків (α -, β -, γ -тубуліну, а також актину), закодовані в геномах різних видів рослин; використання поліморфізму інтронів цих генів в молекулярно-генетичних дослідженнях рослин.

Методи дослідження. Аналіз екзон-інтронної структури генів білків рослин, що кодують α -, β -, γ -тубулін, а також актин та їх гомологів за допомогою геномних баз даних, зокрема Phytozome. Аналіз генів, встановлення розміру інтронів, пошук консенсусних послідовностей та дизайн праймерів за допомогою біоінформатичних підходів. Молекулярно-генетичні методи (виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному та поліакриламідному (ПААГ) гелях). Статистичні методи (визначення індексу поліморфності PIS, побудова дендрограм, розрахунок коефіцієнтів подібності Нея та Лі, стандартної генетичної дистанції Нея) застосовували для встановлення статистичної значимості отриманих результатів та для визначення ступеня подібності різних генотипів рослин.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено нові ПЛР-маркерні системи, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів цитоскелетних білків у різних видів рослин. Вперше оцінено поліморфізм інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину на видовому, популяційному, сортовому та внутрішньосортівому рівнях різних таксономічних груп рослин. Вперше на підставі результатів аналізу поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину проведено генетичне профілювання таких господарсько цінних видів рослин, як льон-довгунець, рис посівний, пшениця, ячмінь, томат та картопля. Також завдяки оцінці поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину вперше досліджено генетичну мінливість та диференційовано природні популяції егілопсів *Aegilops biuncialis* з Кримського півострову. Використовуючи аналіз поліморфізму

інтронів генів актину та α -тубуліну генотиповано сорти томату (*S. lycopersicum*) та картоплі (*S. tuberosum*), отримано специфічні ДНК-профілі досліджених сортів. Вперше оцінений внутрішньосортний та міжсортний поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну та актину у різних сортів льону-довгунця. Вперше показана висока ефективність використання ІЛР-маркерів, що базуються на оцінці поліморфізму інтронів генів цитоскелетних білків у порівнянні з SSR-маркерами на прикладі аналізу родів *Linum* L., *Quercus* L., *Ulmus* L. Продемонстровано зручність та надійність застосування методу ТВР-аналізу для молекулярно-генетичного маркування трав'янистих та деревних рослин, а також для вивчення окремих аспектів внутрішньовидового поліморфізму господарчо цінних, садово-паркових та лісоутворюючих порід. Вперше за допомогою ТВР-методу ідентифіковано унікальні патерни для 20 деревних видів рослин та створено молекулярні профілі кожного з цих видів. Також вперше отримано специфічні ТВР-профілі мікродоростей, які дозволили чітко диференціювати генотипи на різних таксономічних рівнях та підтвердити однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблені ІЛР-маркерні системи, що базуються на аналізі поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубуліну, а також актину, можуть бути застосовані для генотипування (ДНК-профілювання) різних генотипів, сортів, популяцій, видів рослин під час філогенетичних, популяційно-генетичних та селекційно-генетичних досліджень. Зокрема, продемонстровано високу диференціюючу здатність методу ТВР-аналізу на генотипах та видах роду елевсина (*Eleusine*). Також ТВР-метод та аналіз поліморфізму інтронів генів актину (АВР-аналіз, Actin Base Polymorphism) дозволили генотипувати кримські популяції егілопсу (*Aegilops biuncialis*) та виявити їх гетерогенність, що може бути використано у селекційно-генетичних програмах з покращення пшениці. ТВР-метод виявився ефективним для оцінки генетичної різноманітності ряду ендемічних рослин, зокрема, *Deschampsia antarctica*, *Achillea glaberrima* Klok. та *Achillea*

leptophilla Vieb., що може бути використано для розроблення програм генетичного моніторингу та комплексної охорони видів. Завдяки ТВР/сТВР-аналізу та АВР-аналізу перспективних олійних сортів та сортозразків рижію (*C. sativa*) української селекції, встановлено їх міжсортівий поліморфізм. Практично цінним виявилось застосування ТВР, АВР-аналізу в комбінації з аналізом мікросателітних маркерів для генотипування та генетичної диференціації сортів льону української селекції. Було показано, що більшість досліджених сортів льону української селекції є генетично гетерогенними. Продемонстрована досить висока ефективність використання ІЛР-аналізу для диференціації генотипів льону в порівнянні з SSR-маркерами. Також продемонстровано застосованість ІЛР-маркерних систем для генотипування деревних рослин. Отримано ІЛР-профілі вікових дерев дубу звичайного *Quercus robur*. Також за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину здійснено генетичне профілювання ранньої та пізньої фенологічних форм *Q. robur*, що може бути використано у практиці зеленого будівництва. Ефективність диференціювання генотипів мікроводоростей на різних таксономічних рівнях за допомогою ТВР та сТВР-аналізу свідчить про доцільність використання цих методів у молекулярно-філогенетичних дослідженнях нижчих рослин.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є завершеною самостійною науковою працею, виконаною на підставі власних теоретичних і практичних напрацювань. Автором дисертаційної роботи особисто розроблено її концепцію та структуру, здійснено аналіз літературних джерел, визначено експериментальні завдання, проведено аналіз отриманих результатів, зроблено рисунки і таблиці, сформульовано висновки та положення, викладені у дисертації. Основна частина результатів експериментальних досліджень, представлених у дисертації, отримана автором особисто. До дисертації включено дані експериментів, проведених разом з науковими співробітниками відділу популяційної генетики. В обговоренні результатів та написанні статей брали участь співавтори відповідних публікацій. Права

співавторів не порушено. Під час обговорення мети та завдань дослідження, отриманих даних і всієї роботи здобувач користувався консультаціями академіка НАН України Я.Б. Блюма. В цілому, у проведенні досліджень, їх аналізі та узагальненні частка автора складає близько 85%.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи викладено та обговорено на наукових конференціях: міжнародних конференціях «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 22–26 вересня 2014 р., 2–6 жовтня 2017 р.; Чернівці, 14–18 вересня 2015 р.; Одеса, 12–16 вересня 2016 р.; Яремче, 17–21 вересня 2018 р., Київ, 15–20 вересня 2019 р.), II-й конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 24–25 грудня 2013 р.), III-й міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 24–27 лютого 2014 р.), Annual Meeting ASCB (San Francisco, California, USA, 3–7 грудня 2016 р.), III-й Міжнар. науковій конф-ції «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, Беларусь, 23–25 листопада 2016 р.), Міжн. наук. конф-ції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (Одеса, 12 вересня 2017 р.), Третій конф-ції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 16–18 травня 2017 р.), 5-й Міжн. конф-ції-наradі «Сохранение лесных генетических ресурсов» (Гомель, 02–07 жовтня 2017 р.), Міжн. науковій конф-ції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (Одеса, 12 вересня 2017 р.), Третій конф-ції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 16–18 травня 2017 р.), The 7th Baltic Genetics Congress (Riga, Latvia, 24–27 жовтня 2018 р.), Міжнародній науково-практичній конф-ції «Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин» (Харків, 4–5 липня 2018 р.), 4th Int. Sci. Conference «Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health And Quality of Human and Bees Life» (Nitra, Slovakia, 11–13 вересня 2019 р.), Міжн. наук. конф-ції «Проблеми уникнення втрат біорізноманіття українських Карпат» (Львів, 14–15 травня 2020 р.).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 37 наукових праць, з них 23 статті в українських та зарубіжних наукових виданнях та 13 тез у збірниках матеріалів міжнародних та всеукраїнських конференцій, 1 патент.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальненню результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури. Дисертація викладена на 385 сторінках машинописного тексту, містить 124 рисунки та 42 таблиці. Список використаних джерел містить 475 найменувань.

РОЗДІЛ 1

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ У ДОСЛІДЖЕННІ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ РОСЛИН (огляд літератури)

Нагальні проблеми розвитку різних галузей біологічної науки зумовлюють стрімкий розвиток молекулярно-генетичних методів досліджень. Вони мають суттєві переваги перед традиційними методами та дають значно більші можливості для проведення досліджень і підвищення надійності отриманих даних.

Результати використання ДНК-маркерів не залежать від факторів впливу на організм навколишнього середовища. Вони потенційно не обмежені у кількості (повністю охоплюють геном організма), об'єктивно вимірюють мінливість, крім того вони можуть бути застосовані на різних стадіях розвитку рослин.

Молекулярно-генетичні маркери (ДНК-маркери) – нуклеотидні послідовності, що кодують певні гени, або некодуючі ділянки геному, які досліджуються переважно задля встановлення поліморфізму у різних видів організмів. Вважається, що мутації є основним джерелом кількісних та якісних змін у нуклеотидних послідовностях [467]. ДНК-маркери є третім поколінням генетичних маркерів (після класичних генетичних маркерів та білкових).

На сьогодні у зв'язку із стрімким розвитком молекулярно-генетичних технологій, вивчення поліморфізму на рівні ДНК дає можливість оцінювати генетичну мінливість на рівні геномів. Інформація щодо генетичних варіацій в геномах рослин є актуальною при вирішенні багатьох питань раціонального використання рослинних ресурсів для потреб людини [59]. Так дослідження генетичного різноманіття можуть надати можливості (а саме нові генні ресурси) для покращення вже існуючого селекційного матеріалу [124].

Поглиблення знань в області генетичного різноманіття, а також розробка адекватних та ефективних стратегій збереження генетичних ресурсів дозволять підвищити продуктивність вирощування сільськогосподарських та лісових культур. В глобальному розумінні це сприятиме вирішенню проблем голоду, бідності та деяких екологічних питань.

Оцінка генетичного поліморфізму та патернів мінливості на видовому рівні є важливим етапом під час проведення генетичних досліджень із використанням нових видів генетичних маркерів. Наявність попередньої інформації про генетичні маркери є запорукою успішного використання їх у прикладному застосуванні, наприклад, оцінки біорізноманіття, ступеня клональності, тощо.

Поліморфізм ДНК являє собою різницю в структурі відповідних ділянок ДНК у різних генотипів. При цьому він виражається в локальних змінах нуклеотидних послідовностей, що можуть бути викликані будь-якими перебудовами в хромосомі (делеції, інсерції, інверсії, тощо). На сьогодні відомий поліморфізм в кодуючих та не кодуючих ділянках, в унікальних та повторюваних послідовностях. Крім того виділяють поліморфізм послідовності та довжини [415].

Збільшення об'єму знань про структуру та розміри геному рослин, про його роль у фізіологічних процесах та зв'язок між різними генами в межах окремих організмів призвів до стрімкого розвитку молекулярної та популяційної генетики, геноміки та селекції, крім того це сприяло створенню та впровадженню різноманітних ДНК-маркерних систем, використання яких дає дещо глибші уявлення про генетичну різноманітність рослинних організмів [240].

За допомогою молекулярних маркерів було складено детальні карти геномів різних видів рослин, тварин і людини, на яких зазначено найважливіші гени, що визначають ріст та розвиток організмів, їх морфологічні ознаки, стійкість до хвороб та інші властивості [156, 432].

Одним з основних напрямків застосування ДНК-маркерів є картування різних видів рослин. Для створення генетичних карт необхідною є ідентифікація локусу, в якому закодований ген та визначення відстані між генами, розташованими на хромосомах [240]. На таких картах в першу чергу відображені важливі гени, що відповідають за розвиток, формування морфологічних ознак, стійкість до захворювань тощо [467]. ДНК-маркери є ключовими інструментами в картуванні QTL (Quantitative Trait Loci, локусів кількісних ознак), що полягає в аналізі ділянок геному, які містять гени, пов'язані з проявом корисних ознак [13, 342]. Відомо, що більшість господарсько-цінних ознак рослин спадкується полігенно та знаходиться під контролем значної кількості генів, що розташовані в QTL-локусах. В подальшому QTL-карти застосовуються для проведення маркер-допоміжної селекції (Marker-Assisted Selection, MAS) [13].

MAS-селекція є перспективним напрямком використання ДНК-маркерів. Оскільки селекція в цілому відіграє ключову роль в прагненнях збільшити продуктивність харчових рослин, актуальність створення нових, більш продуктивних сортів господарськоцінних видів не викликає сумнівів. До таких ознак відносять продуктивність, стійкість до захворювань, адаптацію до таких факторів навколишнього середовища як посуха, засоленість ґрунтів тощо [322, 342]. MAS-селекція – особливий підхід, який дає можливість здійснювати відбір рослин за генотипом з використанням ДНК-маркерів [61]. MAS-стратегія полягає в ідентифікації алеля гену, який відповідає за прояв певної корисної ознаки, подальшому підборі відповідних ДНК-маркерів, алелі яких тісно зчеплені з селекційним геном та подальшому відбору цільових генотипів. За рахунок застосування декількох маркерів, розташованих поруч з цільовим геном, досягається точність відбору. ДНК-маркери, які тісно пов'язані з цільовим геном, дозволяють достовірно спрогнозувати фенотип відібраних рослин. За умов існування повної послідовності гена, існує можливість розробити внутрішньогенні ДНК-маркери для більш точного відбору генотипів. У випадку відсутності

зчепленого з геном ДНК-маркеру доцільно використовувати більш віддалені маркери та поєднати MAS з подальшим фенотипуванням рослин. Отже такий комбінований підхід називається маркер-спрямованим фенотипуванням (Marker-directed phenotyping) [232, 415, 467]. Також QTL-карти виявилися корисним інструментом в процесі MAS-селекції для розробки нових сортів з конкретними комбінаціями генів [329]. В цілому застосування маркерних систем значно підвищує ефективність та точність селекції, покращує якість відібраного матеріалу та дозволяє виокремлювати організми, які несуть цільові гени [402, 408].

Крім широкого застосування в селекційних роботах різноманітні молекулярно-генетичні маркери широко застосовуються в популяційній та порівняльній генетиці, при вивченні біорізноманіття та філогенії видів, дослідження динаміки популяцій і екологічних відносин в природних і штучних угрупованнях, медичній діагностиці та філогенетичних дослідженнях [467]. Лише застосування молекулярних маркерів дозволяє простежити геніалогію окремих родин, популяцій, тощо.

Все частіше молекулярні маркери застосовуються при вивченні генетичної мінливості організмів, генотипуванні та диференціації різних видів, при створенні колекцій господарсько цінних видів. Як вже було зазначено методи, що базуються на застосуванні ДНК-маркерів дозволяють отримати достовірну інформацію під час створення нових селекційних сортів (порід, штамів) для ефективного підбору батьківських генотипів, що в свою чергу сприяє уникненню плагіату та дублювання [240, 278, 377].

Ефективність молекулярних маркерів виявилася безцінною при оціненні та збереженні біорізноманіття рослин. Вони дали змогу схарактеризувати генетичні зв'язки в середині популяції та між ними, сприяли вивченню історії окультурення та еволюції рослин, моніторингу потоків генів між окультуреними та дикорослими популяціями [415].

При дослідженні особливостей спадкування та реалізації ряду хвороб людини молекулярно-генетичні маркери допомагають виявити нові

молекулярні мішені для розробки та впровадження нових ефективних терапевтичних засобів [373].

Зважаючи на широкий асортимент існуючих маркерів, різні аспекти застосування та характер отриманих даних, важливим завданням в дослідженнях, спрямованих на вивчення генетичного поліморфізму є оптимальний підбір типу молекулярно-генетичних маркерів. Перш за все вони мають вирішувати конкретну задачу дослідження. Неодмінною рисою є наявність і доступність фенотипових проявів алелей для їх ідентифікації, рівномірність розподілу в геномі, легке виявлення і відтворюваність результатів, можливість автоматизації тощо [231, 428, 435]. За рівнем мінливості маркер повинен мати високо поліморфну природу для оцінки генетичного різноманіття. Важливою умовою вибору ефективного маркеру є його нейтральність у відношенні до умов оточуючого середовища.

Щоб задовольнити критерії ефективності дискримінаційної сили маркери повинні бути сконцентровані на кількісних характеристиках. Вони повинні адекватно відображати подібність і відмінність генотипів [415].

Одним з найбільш швидких і відносно дешевих способів виявити генетичну варіабельність вважається застосування молекулярно-генетичних методів, які базуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) і оцінці відповідного поліморфізму ДНК [307]. На сьогодні ПЛР використовується у переважній більшості сучасних молекулярно-генетичних досліджень, оскільки дає можливість отримати певні фрагменти ДНК досліджуваного зразка в процесі ампліфікації *in vitro* [165]. ПЛР та технології секвенування зробили можливим широке застосування генетичних маркерів у немодельних організмах.

За останні роки було розроблено та впроваджено декілька десятків типів молекулярних маркерів, кожний з яких має свої переваги і недоліки, а от же кожен з них може бути використаний в залежності від поставленої мети дослідження [347, 369]. В зв'язку з постійним накопиченням інформації про структуру геному різних живих організмів, невпинно тривають пошуки

нових, більш зручних та ефективних дешевих маркерних систем для проведення генетичного аналізу.

1.1. Основні типи ДНК-маркерів

Серед сучасних класифікацій ДНК-маркерів найбільш поширеними є наступні:

- 1) За формою взаємодії генів:
 - кодомінантні;
 - домінантні ДНК-маркери;
- 2) За методом аналізу:
 - блот-гібридизація;
 - ПЛР-аналіз;
- 3) За способом передачі генетичної інформації:
 - успадкування ядерного геному за обома батьками;
 - успадкування ядерного геному за материнським типом;
 - успадкування органельного геному за материнським типом;
 - успадкування органельного геному за батьківським типом.
- 4) За кількістю аналізованих локусів:
 - монолокусні,
 - мультилокусні ДНК-маркери [278, 307, 467].

Серед них розрізняють маркери з визначеною локацією (конкретний ген або ділянка хромосоми) та довільні мультилокусні маркери. Обидва типи знаходять своє застосування як у генетичних дослідженнях, так і в селекції.

1.1.1. Довільні ДНК-маркери

Більшість молекулярних маркерів спрямована на визначення анонімних послідовностей ДНК. Такі системи ефективні для оцінки генетичного поліморфізму широкого спектру різних видів організмів, але майже повністю знаходяться всередині геномів з невідомою функцією. Їх неможливо використовувати для маркування певного гена, проте їх успішно застосовують у філогенетичних дослідженнях, а також при паспортизації сортів та порід [108, 463].

Використання довільних ДНК-маркерів дозволяє аналізувати різні нуклеотидні фрагменти. Це можуть бути як кодуючі так і некодуючі ділянки геному. Довільні ДНК-маркери проектуються випадковим чином. Більшість з них є мультилокусними, досить технічно простими у використанні та дешевими, що надає їм переваги у порівнянні з іншими маркерами [130].

Досить широко в молекулярно-генетичних дослідженнях використовуються такі маркерні системи:

1) **Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)** – метод ампліфікації ДНК-сегментів з використанням випадкових коротких праймерів (біля 10 нуклеотидів). Під час проведення ПЛР праймери забезпечують ампліфікацію ділянки геному, що розташована між ними [289, 372]. Однією з переваг цього методу є можливість швидко виявити варіабельність одразу великої кількості локусів по всьому геному. Поліморфізм, наявний для специфічних сайтів зв'язування RAPD-маркерів, виявляється шляхом розділення ДНК за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, та підтверджується присутністю або відсутністю певних специфічних фрагментів. Якщо в ділянці геному, комплементарній до RAPD-маркеру, відбулася мутація, то ПЛР продукт не утворюватиметься, в наслідок чого зміниться кількість та розподіл ампліконів на гелі. RAPD метод вважається надзвичайно чутливим до умов проведення ПЛР. Кінцевий

результат може залежати від багатьох факторів (концентрації геномної ДНК, типу ДНК-полімерази, концентрації ПЛР-буферу та хлориду магнію, довжини та температури відпалу RAPD праймерів, тощо) [363, 379].

Із допомогою RAPD-аналізу можна вивчати поліморфізм ДНК у вищих рослин [40, 165, 238, 423], конструювати генетичні карти [292]. Його також використовують для генотипування та встановлення філогенетичних зв'язків [154, 457].

RAPD-метод широко застосовується при дослідженні генетичної різноманітності на між- та внутрішньовидовому рівнях у різних видів рослин [27, 172, 193, 335, 238]. Низка робіт присвячена розробленню та застосуванню RAPD-маркерів для сільськогосподарських культур (*Pisum sativum* L., *Triticum* L., *Zea mays* L., *Hordeum vulgare* L., *Solanum tuberosum* L., *Fagopyrum esculentum* Moench, *Linum* L. та інш.) [2, 70, 88, 117, 123, 230, 255, 262, 286, 331, 426].

2) Amplified restriction Fragment Length Polymorphism, (AFLP) – метод, що передбачає попередню рестрикцію геномної ДНК ендонуклеазами, лігування утворених фрагментів з спеціальними ДНК-адапторами, та селективну ампліфікацію поліморфних по довжині фрагментів за допомогою ПЛР [91, 215].

AFLP-маркери є більш поліморфними, ніж RAPD-маркери та дають можливість виявляти точкові мутації в сайтах, де відбулася рестрикція або в ділянках відпалу праймерів. Це можливо через детекцію присутності або відсутності специфічних ампліконів. Таким чином можна оцінити наявність делецій або вставок в межах утвореного рестрикційного фрагменту, здійснюючи аналіз його довжини під час електрофоретичного розділення [226].

За допомогою AFLP-аналізу можна отримати загальну картину мінливості геному. Він досить успішно застосовується для генотипування та таксономічного аналізу (метод дає можливість визначати генетичні дистанції

між ізогенними лініями одного сорту). Крім того результати AFLP-аналізу використовуються для побудови карт хромосом [188, 463].

AFLP-маркери розроблені та протестовані для багатьох видів рослин, серед них *Z. mays*, *H. vulgare*, *S. tuberosum*, *Solanum lycopersicum* L., *Oryza sativa* L., *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [47, 87, 222, 230, 300, 314, 398 Molin et al., 2013].

3) **Simple Sequence Repeat (SSR)** – є монолокусними, кодомінантними, відтворюваними ДНК-маркерами, які дозволяють за допомогою ПЛР-аналізу оцінити рівень мінливості, що обумовлена різною кількістю повторів в мікросателітному локусі [171]. Маркери мають кодомінантне успадкування і дозволяють виявляти гетерозиготи по даному локусу. Можливість відрізнити гомо- та гетерозиготні генотипи має велике практичне значення для раннього виявлення гібридів при створенні нових селекційно-важливих вихідних форм. Однак маркер є локус-специфічним, оскільки одна пара праймерів в ПЛР дає можливість розглядати поліморфізм тільки одного локусу. Для багатьох мікросателітних локусів не можливо виявити поліморфізм. Як правило фланкуючі послідовності для одного мікросателітного локусу є видоспецифічними. Характеризуються відтворюваністю, високою варіабельністю, простотою аналізу та можливістю часткової автоматизації процесу [75, 81]. SSR-метод є досить зручним саме для індивідуального генотипування, а також при дослідженні потоків генетичної інформації [171, 462].

Наявність мікросателітів в геномах пов'язують з рекомбінацією ДНК, переміщенням мобільних генетичних елементів, появою спарених нуклеотидів, тощо. Мікросателіти широко розповсюджені у ядерному геномі. Можуть бути розташовані як в некодуючих ділянках геному, так і в генах, які кодують білки [235]. Частота виникнення мутацій в мікросателітних локусах істотно перевищує очікувану частоту спонтанного мутагенезу [340]. Варіабельність SSR-локусів пов'язана зі зміною кількості простих повторів,

що виникають під час реплікації ДНК через помилки ДНК-полімерази або в результаті нерівномірного кросинговеру [422].

Для пошуку SSR в геномах різних організмів розроблено ряд алгоритмів (TROLL, MISA, SSRFinder, SciRoKo, тощо) [45, 109, 184, 338]. Крім того короткі тандемні повтори були виявлені в хлоропластному та мітохондріальному геномах, що стало основою для створення *cp-* та *mtSSR-* маркерів [82, 213].

SSR-маркери досить широко використовуються в генетиці рослин [171, 350]. SSR-маркери часто застосовують для аналізу агрономічних ознак, прогнозування рівня гетерозису та комбінаційної здатності у ході створення гібридів, стійкості до абіотичних факторів тощо. Вони є ефективним інструментом для генотипування і дослідження потоків генетичної інформації, диференціації геномів різних видів рослин [171, 178, 420]. За допомогою цих маркерів було досліджено багато господарсько-цінних культур (*Z. mays*, *H. vulgare*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, *O. sativa*, *A. thaliana*, *Triticum*, *H. vulgare*, *Linum*, *Glycine max* (L.) Merr., *Cucumis sativus* L., *Piper nigrum* L. та інші) [14, 84, 132, 207, 222, 263, 264, 309, 337, 346, 396, 416, 424, 469].

За допомогою метода SSR-аналізу розроблена система молекулярних маркерів для встановлення родинних зв'язків, виділення унікальних генотипів та ідентифікації сортів деревних плодових культур (наприклад, для рослин родів *Malus* та *Pyrus*). Крім того складаються генетичні карти зчеплення SSR-маркерів з генами, що кодують цінні ознаки [463].

SSR-маркери є одними з найбільш популярних та вживаних ДНК-маркерів, які використовуються в сучасній MAS-селекції. Зокрема SSR-маркери застосовуються для добору сортів пшениці зі стійкістю до фузаріозу [384], бурої та стеблової іржі [249, 320], сортів нуту зі стійкістю до фузаріозу [469], ячменю зі стійкістю до смугастої іржі [46], сортів сої за геном фотоперіодичної чутливості [416], генотипів кукурудзи з підвищеним вмістом лізину та амілопектину в ендоспермі [385], сортів рису з

толерантністю до засолення ґрунтів та зі стійкістю до пірікуляріозу [228], тощо.

4) **Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)** – цей метод ґрунтується на вивченні поліморфізму послідовностей ДНК, що знаходяться між двома сусідніми мікросателітами. Як правило, це ділянки ДНК, довжиною 200 – 2000 п. н., що локалізовані між протилежно орієнтованими ідентичними мікросателітними повторами [397]. В результаті електрофоретичного розділення візуалізується багато видоспецифічних фрагментів. ISSR-маркери є домінантними, мільтилокусними системами, які не потребують попередньої інформації про цільову послідовність ДНК. Під час проведення ампліфікації з використанням однієї пари праймерів, як правило, генерується велика кількість локусів [153, 215, 440, 441].

ISSR-маркери досить широко застосовуються в генетиці для генотипування та диференціації генотипів, при вивченні генетичної різноманітності, картування геномів тощо. Вони використовуються у дослідженнях багатьох видів рослин, в тому числі і господарсько-цінних видів [1, 32, 49, 27, 97, 172, 185, 193, 222, 238, 244, 290, 330, 335]. Крім того ISSR-маркери використовують для виявлення генетичної ідентичності, диференціації клонів [444].

ISSR-маркери знайшли своє застосування і в популяційно-генетичних дослідженнях. В тому числі при вивченні генетичного різноманіття та внутришньовидової диференціації лісоутворюючих видів хвойних та листяних порід (*Larix*, *Acer*, тощо)[443, 475].

5) **Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP)** – генерує ПЛР продукти між двома прилеглими ретратранспазонами [169]. Продукт ПЛР ампліфікації геномної ДНК є стабільним генетичним IRAP- маркером. Поліморфізм у даному випадку обумовлений мутацією в ділянці зв'язування праймера, або унікальним біологічним процесом – ретротранспозицією

внаслідок встроювання ретротранспозона в нову ділянку геномної ДНК без втрати первинної ділянки [413].

Ретротранспозони вважаються потужним джерелом генетичної інформації для створення довільних ДНК-маркерів. Мобільні генетичні елементи можуть бути доволі широко представлені у геномах рослин, займаючи порою значну їх частину. Наприклад, до 90% генома пшениці може містити повторювані послідовності, з яких 68% належить мобільним генетичним елементам [205]. За рахунок транскрипції послідовностей ретротранспозонів, подальшої зворотної транскрипції утвореної РНК та реінтеграції продукту в новий, випадковий сайт геному, ретротранспозони можуть змінювати своє місцеположення. Враховуючи гетерогенність та поширеність цих мобільних генетичних елементів, на їх основі створено ряд ефективних ДНК-маркерних систем. Для них характерний значний вибір підходів детектування продуктів: проведення електрофорезу в агарозному та поліакриламідном гелі, використання капілярного електрофорезу та мікрочипів.

IRAP-маркери використовуються при вивченні філогенії та генетичного різноманіття.

б) **Retrotransposon-Microsatellite Amplification Polymorphism (REMAP)** – метод аналогічний IRAP. Його головна відмінність полягає у тому, що одночасно з праймерами до ретротранспозонів використовуються мікросателітні праймери. З огляду на те, що мікросателіти можуть мати високий рівень мутацій, то показники, що характеризують генетичну різноманітність, можуть значно відрізнятись від таких, що отримані під час проведення IRAP-аналізу [169].

В цілому IRAP- та REMAP-методики мають багато чого спільного, однак принциповою різницею між ними є те, що в IRAP використовуються тільки праймери до LTR (Long terminal repeat) кінців ретротранспозону, а в REMAP – один праймер відпалюється на LTR, а другий на ділянці

мікросателітного повтору [169]. Після проведення ПЛР відбувається розділення та візуалізація утворених видоспецифічних ампліконів в агарозному гелі.

REMAP-маркери – полілокусні та гетерогенні і не потребують попередньої інформації про геномні послідовності, а отже вони є ефективними маркерними системами при генотипуванні та дослідженні генетичної різноманітності [168, 170].

Як IRAP так і REMAP-маркери розроблені та протестовані на багатьох рослинних об'єктах [35, 191, 242, 312, 414].

7) **Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR)** – метод розроблено на основі отриманих з використанням випадкових праймерів RAPD фрагментів, їх розділення, екстрагування, клонування та секвенування і дизайну специфічних праймерів [179].

SCAR-маркери дозволяють дискримінувати певні молекулярні фенотипи різних видів одного роду, виявляти унікальні соматональні варіанти та події, пов'язані із варіабельністю соматоклонів. Вони застосовуються у селекції та дають можливість відрізнити певні патогенні штами мікроорганізмів, тощо.

8) **Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)** – метод аналогічний SCAR, однак має додатковий етап обробки рестриктазами, що підвищує кількість виявлених поліморфних фрагментів [139]. Суттєвим недоліком цих маркерів є те, що вони дозволяють виявляти поліморфізм лише в незначній частині геному і площа між праймерами становить менше 5 kb. CAPS-маркери розробляються на основі відомої нуклеотидної послідовності, є кодомінантними та дозволяють виявляти поліморфізм у багатьох видів [444].

Цей метод використовують для вивчення будови, функції, експресії та регуляції генів. Крім того його вважають зручним інструментом для MAS-селекції. Метод широко застосовується при відборі особин, стійких до

фітопатогенів у багатьох культурних рослин (*H. vulgare*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, *Triticum*, *H. vulgare*, *G. max*, тощо) [463, 472].

9) **Expressed Sequence Tag (EST-SSR)** – короткі фрагменти послідовностей клонованих ділянок ДНК (mRNA→cDNA). Використовуються для ідентифікації транскриптів генів, які можуть бути джерелом для виявлення SSRs в ділянках генома, що експресуються [85].

EST послідовності консервативні. Межвидова EST-SSRs ПЛР дещо краща, ніж SSRs геномної ДНК. Розроблення цих маркерів досить доступний процес. Вони характеризують гени, що транскрибуються та чий передбачуваний функції можна визначити за допомогою виявлення гомології. Продуктами EST-SSR-маркерів є чіткі фрагменти. На якість SSR-EST послідовностей може впливати розповсюдження одного чи обох праймерів на ділянці сплайсингу; наявність великих інтронів в послідовності геномної ДНК, використання «неповноцінної» інформації для створення праймерів, тощо. На початку 2013 року в базах даних (GenBank) були доступні більш ніж 74 млн. ESTs.

EST-маркери використовуються для асоціативного картування, вивчення генетичного різноманіття та аналізу кількісних ознак. Досить ефективні такі маркери для порівняння генів в геномі різних організмів, дослідження еволюції певних генів та підходять для вивчення експресованих генів. EST-SSR маркери допомагають при дослідженні багатьох таксонів, а також для аналізу видів з обмеженими ресурсами. Оскільки вони є похідними від транскриптів, то можуть бути використані для оцінювання функціонального різноманіття природних популяцій. EST-маркери корисні в селекції та для маркування генів, відповідальних за фенотипові ознаки. На основі EST-послідовностей розробляються CAPS маркери.

10) **Single Nucleotide Polymorphism (SNP)**. Визначаються як поодинокі нуклеотидні послідовності в геномній ДНК, в яких в популяції є різні варіанти послідовностей з частотою рідкісного алеля не менше 1% [415].

Це відносно новий метод, який заснований на детекції в організмі однонуклеотидних замін, що призводять до точкових мутацій. Таким чином спостерігається поліморфізм за одним нуклеотидом [303, 467]. Розробка цього методу стала можливою завдяки секвенуванню геномів. SNPs майже рівномірно розподілені по геному [227]. Відомо, що однонуклеотидний поліморфізм лежить в основі виникнення нових алелів. Висока щільність та еволюційна стабільність однонуклеотидних змін роблять його одним з найбільш зручних генетичних маркерів [400].

SNP-маркери широко застосовуються під час дослідження геному. Для створення специфічних праймерів необхідно знати послідовності фланкуючих ділянок. Технологія дозволяє використовувати незначну кількість вихідного матеріалу [409]. На сьогодні метод добре автоматизований та дозволяє виконувати високоякісне генотипування з одночасним використанням великої кількості SNP-маркерів. Однак різноманіття алелів лише за одним нуклеотидом робить неможливим створення оптимальних умов гібридизації для великого об'єму проб. [463].

SNP-аналіз вважають досить ефективним для виявлення внутривидового поліморфізму та застосовують під час генетичної паспортизації сортів культурних рослин [429].

11) Diversity Array Technology (DArT) – метод базується на технології мікрочипів (ДНК-чипів) [214]. Від SNP відрізняється тим, що не потребує інформації про послідовності геному для розробки чипів [467].

DArT підходять для вивчення генетичного різноманіття. За допомогою цього методу можна одночасно виявляти поліморфізм одразу в декількох сотнях або тисячах локусів (як у диплоїдних, так і у гексаплоїдних рослин) [3, 164, 371]. Застосування DArT-методу дозволяє давати експресхарактеристику гермоплазми.

Даний метод підходить та успішно використовується для філогенетичного аналізу та складання генетичних карт багатьох культурних

рослин (*H. vulgare*, *O. sativa*, *Nicotiana* L.) [214, 371]. DArT-маркери застосовуються в геномній селекції. DArT-маркери дали також можливість виявити хромосомне розташування гена стійкості до листової іржі у *Aegilops sharonensis* [256].

Було встановлено більшу ефективність DArT в порівнянні з AFLP- й SSR-маркерами [463].

Таким чином, на цей час існує велика кількість різних типів ДНК-маркерів зі своїми перевагами та недоліками. Деякі з цих маркерів можуть бути застосовані тільки для вирішення специфічних задач. Зокрема, довільні ДНК-маркери були одними з перших ДНК-маркерних систем, які були використані з метою ДНК-профілювання та диференціювання організмів. Ці ДНК-маркери і по цей час залишаються надзвичайно популярними в сучасних генетико-селекційних дослідженнях рослин завдяки своїй універсальності, інформативності та точності отриманих даних.

1.1.2. Ген-специфічні ДНК-маркери

У зв'язку зі збільшенням кількості інформації про структуру геному весь час відбувається пошук нових, більш ефективних і інформативних, зручних та дешевих маркерних систем для проведення генетичних досліджень. Постійний розвиток та покращення молекулярно-генетичних методик (ПЛР, секвенування, розділення та візуалізація продуктів ампліфікації), а також глобалізація та доступність інформації, покращення та поповнення баз даних, сприяє розробці та впровадженню нових ДНК-маркерів.

Розвиток маркерних систем відбувається від оцінки анонімних послідовностей до визначення поліморфізму цільових послідовностей генів (gene-targeted and functional markers (GTMs and FMs) таких як CDDP, PBA, ПР, що ґрунтуються на знанні структури генів [60, 278, 364, 383]. Значно прискорила цей перехід поява загальнодоступних баз даних, що містять

інформацію щодо генних послідовностей організмів. Використання методів, які пов'язані із функціонально значущими ділянками ДНК, дозволяє оцінити генетичні зміни всередині певних генів (або родин генів). Крім того було встановлено, що для вирішення питань філогенії та систематики доцільніше використовувати ДНК-послідовності, що пов'язані з морфологічними або фізіологічними відмінностями організмів [11, 182, 288].

1) **Conserved DNA-derived Polymorphism (CDDP)** – Метод генерування рослинних ДНК-маркерів, розроблений на основі вивчення даних про короткі послідовності амінокислот та проектування праймерів для ПЛР на основі відповідної послідовності ДНК. За допомогою цих маркерів, маючи нуклеотидні послідовності генів, можна оцінити наявність функціональних доменів високо консервативних ділянок, які притаманні всім представникам генної родини.

CDDP була однією з перших ген-специфічних ДНК-маркерних систем, яка дозволила диференціювати різні організми за поліморфізмом в консервативних генах та генних родинках [60]. В CDDP методиці такі функціональні домени використовуються для дизайну праймерів та для подальшого використання їх під час ампліфікації. В результаті ПЛР утворюються ряд фрагментів, які дозволяють диференціювати різні генотипи між собою. Наприклад, CDDP-маркери розроблені для таких функціональних генів, що кодують транскрипційні фактори рослин, ауксин-зв'язуючі білки тощо [210, 241, 382].

CDDP-метод може бути використаний для багатьох видів рослин. Такі маркери вже успішно протестовані на таких рослинах як *O. sativa*, *Triticum*, *Cicer arietinum* L., *Chrysanthemum* L. та інших господарсько цінних рослинах [60, 133, 162, 163, 208, 238, 277].

2) **P450 based analogue markers (PBA)** – ДНК-маркерна система, яка оцінює поліморфізм аналогів генів цитохрому P450. Родина генів цитохром

P450-монооксидаз є доволі розповсюдженою та чисельною родиною генів у мікроорганізмів, грибів, тварин та рослин [304]. Значна поширеність цих генів є однією з головних переваг PVA-маркерної системи. При аналізі геному *Arabidopsis* було виявлено, що близько 272 генів та 26 псевдогенів є генами цитохрому P450, що приблизно складає 0,9 % від всіх генів [279].

Універсальні праймери, що при PVA аналізі використовуються у різних комбінаціях, підібрані до ділянки гену, що кодує сайт зв'язування, та до високо консервативних ділянок генів P450.

В результаті ПЛР з PVA-праймерами утворюються видоспецифічні фрагменти генів P450. Подальше їх розділення дає можливість охарактеризувати у різних видів рослин міжвидову та внутрішньовидову генетичну різноманітність. Ця маркерна система ефективно використовується для вивчення генетичного різноманіття вищих рослин [383].

PVA-маркерна система вже була опробована на 51 виді рослин з 28 родин, серед яких Solanaceae, Rosaceae, Ericaceae, Magnoliaceae тощо [278].

3) Молекулярні маркери, що базуються на аналізі кількості повторів 5S рДНК. В основі розроблення даного типу маркерів лежить ідея, що для вивчення внутрішньовидової мінливості рослин необхідно використовувати ділянки геному, які еволюціонують із найбільшою швидкістю. 5S рДНК належать саме до таких. Це тандемно організовані послідовності, які утворюють кластери. Вони локалізуються на одній чи декількох хромосомах [150, 445]. Кожна повторювана одиниця 5S рДНК складається з кодувальної ділянки (саме вона є еволюційно консервативною) та міжгенного спейсера (МГС) (послідовність якого швидко накопичує мутації). У МГС існують відносно консервативні ділянки, що є частинами промотора або термінатора РНК-полімерази III [316, 356]. Помітна різниця в послідовності кодувальної ділянки спостерігається лише при порівнянні

віддалених таксонів, тоді як послідовність МГС може значно відрізнятися вже на міжвидовому або міжпопуляційному рівні [354].

Ділянка, що кодує 5S рРНК (5S рДНК) присутня в геномі у всіх еукаріотичних організмів, тому представляє універсальну модель для вивчення молекулярної еволюції тандемних повторів. Кількість цих послідовностей може коливатися від близько 1000 до більше 75000 копій [56, 95, 316]. На разі функціонує база даних, яка містить нуклеотидні послідовності 5S рРНК для основних таксономічних груп (серед них як рослини так і тварини, гриби та бактерії).

Метод може бути використаний для багатьох видів рослин. Такі маркери вже успішно протестовані на трав'янистих та деревних рослин, серед них *Mandragora autumnalis* Bertol., *Solanum betaceum* Cav., *Acer pseudoplatanus* L., *Acer campestre* L., *Lathyrus venetus* (Mill.) Wohlf., *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don., *Dactylis glomerata* L. (Poaceae), *Deschampsia antarctica* E. Desv., *Quercus acutissima* Carruth., *Q. glauca* Thunb., *Q. texana*, *Atropa belladonna* L., *Hippophae rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Calligonum mongolicum* Turcz. та видів триби Anemoneae (Ranunculaceae) [229, 334, 353, 355, 401, 417, 454, 466, 473, 474].

4) Intron Length Polymorphism (ILP) – метод оцінки генетичного різноманіття живих організмів, що базується на вивченні поліморфізму довжини інтронів генів.

Відомо, що у всіх еукаріотичних організмів екзони більш консервативні за інтрони, а відповідно і менш варіабельні за своїми послідовностями. Таке явище можна пояснити різним селективним тиском, швидкістю накопичення мутацій, а отже і різною швидкістю еволюції цих двох елементів [12]. Крім того інтрони є гіперваріабельними ділянками генів. Саме в них відбуваються інсерції та делеції. Особливо це характерно для послідовностей геномних ділянок, де містяться гени, що кодують велику кількість генів «домашнього господарства» (housekeeping genes), ферментів

транспортного ланцюга електронів та різні структурні білки (наприклад, білки цитоскелету клітини) [34, 52, 55, 57, 72, 234].

Враховуючи це можна зрозуміти, що джерелом генетичного поліморфізму можуть бути саме некодуючі ділянки геному. Тож застосування методу оцінки генетичного різноманіття, який базується на вивченні поліморфізму довжини інтронів генів, дозволяє виявляти різницю між гомологічними генами як одного виду, так і між різними видами [18]. Однак для створення молекулярно-генетичної маркерної системи, що базується на оцінці поліморфізму довжин інтронів генів, необхідно отримати попередню інформацію про кількість екзонів та інтронів, їх нуклеотидний склад, гомологію екзонних ділянок, тощо. На сьогодні такі дані є загальнодоступними у чисельних базах даних [364].

ІІР-маркери є ефективною мультиплексною системою, яка застосовується при дослідженні інтронів різних представників конкретної родини генів. Вони дозволяють отримати специфічний ДНК-профіль досліджуваного генотипу. Генам, об'єднаним у родини генів, притаманна консервативність екзонних ділянок та гіперваріабельність інтронів. Правильно підібрані ІІР-праймери для проведення ПІР дозволяють аналізувати поліморфізм довжини інтронних ділянок генів між сусідніми екзонами. Аналіз, заснований на простій ПІР з використанням праймерів до ділянок екзонів, що фланкують інтрон (exon-primed intron crossing (EPIC-PCR)), дає змогу використовувати всього одну комбінацію вироджених праймерів для будь-якої рослинної ДНК. Як результат можна швидко та зручно отримувати надійні, відтворювані та легко інтерпретовані результати [8, 18].

До переваг генетичних маркерів, що засновані на оцінці поліморфізму довжини інтронів, можна віднести нейтральність, кодомінантність, специфічність та стабільність [364].

Поліморфізм довжини інтронів виявився універсальним для широкого спектру організмів, а також зручним інструментом для генетичного

картування, оскільки інтрони прив'язані безпосередньо до конкретних генів [38, 234].

ILP-маркери вже розроблено для різних видів господарсько цінних рослин (*O. sativa*, *A. thaliana*, *Triticum*, *Panicum* L., *Dasypyrum villosum*, *Daucus carota*, *Medicago sativa*) та деяких деревних порід (*Populus trichocarpa*, *Jatropha curcas* L., *E. guineensis*, *A. trichopo*, *H. brasiliensis*, *J. curcas* L., *M. notabilis*, *Phoenix dactylifera*, *Pinus taeda* L., *Populus euphratica* Oliv, *Populus trichocarpa*, *Prunus persica*, *T. cacao* L., *S. babylonica*, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Müll.Arg.) [15, 136, 208, 239, 243, 311, 315, 333, 380, 392, 393]. Із застосуванням ILP-маркерів проведено філогенетичні дослідження хвойних порід (серед досліджуваних видів: *Pinus lambertiana*, *Picea abies*, *G. biloba* L., *Fraxinus excelsior*, *Pinus taeda* L., *P. massoniana* Lamb., *P. elliotii* Engelm., *P. parviflora* Siebold & Zucc., *Abies firma* Siebold & Zucc., *Keteleeria davidiana* (Bertrand) Beissn., *Cedrus deodara* (Roxb. ex D. Don) G. Don, *Juniperus chinensis* L., *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng) [50].

Дослідження останніх років показали, що ILP-маркери були успішно використані для побудови генетичних карт, а сам поліморфізм інтронів виявився надійним джерелом інформації щодо оцінки міжвидової та внутрішньовидової мінливості організмів [394]. Крім того інтрони тубулінових генів рослин є корисними молекулярними інструментами для вивчення експресії генів (IME, Intron Mediated Enhancement), а також для визначення генетичних та еволюційних зв'язків рослин [36, 234].

Достовірно знаючи розташування послідовностей в геномі організму, пошук ДНК-маркерів, що локалізуються в генах (або в безпосередній близькості з ними) став достатньо зручним та простим [9]. Вони є досить ефективними в різноманітних молекулярно-генетичних дослідженнях. Так на сьогодні існує і досить вдало застосовується метод animalТВР (базується на поліморфізмі довжини інтронів генів бета-тубліну тварин). З його допомогою виявилось можливим ідентифікувати різні генотипи риб [119].

Отримати ген-специфічні маркери можна з будь-якої послідовності ДНК, яка містить поліморфну ділянку, використовуючи специфічні праймери для проведення ПЛР. Ключовою умовою їх отримання є розшифрування цільової послідовності.

І все ж використання ІЛР-маркерів для рослин залишається ще дещо обмеженим. Це передусім пов'язано з тим, що для більшості видів рослин в геномних базах даних наявні тільки EST послідовності або кДНК і не завжди представлені повні сіквенси генів. В той же час дослідження показали, що у різних гомологічних генів екзон-інтронна структура може бути подібною [24]. Тому, володіючи інформацією про структуру гомологічних генів зі спорідненого організму, можна передбачити сайти сплайсингу інтронів в кДНК/EST послідовностях організму, що досліджується. У підсумку це дає можливість розробляти ІЛР-маркери для будь-якого організму.

Таким чином, розробка маркерів, що базуються на оцінці поліморфізму довжини ітронів різноманітних генів для використання при диференціації та генетичному профілюванні різних видів рослин, є досить перспективним напрямком досліджень.

1.2. Поліморфізм довжини інтронів генів як основа розроблення молекулярно-генетичних маркерів.

Вже розроблено та успішно застосовується на практиці цілий ряд специфічних варіантів ІЛР, які відрізняються один від одного родиною генів, що виступає в якості джерела інформації [425]. Вивчення поліморфізму інтронних ділянок стає важливим етапом генетичних та селекційних досліджень основних видів сільськогосподарських культур [461]. Вони широко використовуються при створенні маркерних систем для оцінки генетичної різноманітності. Оскільки інтрони безпосередньо пов'язані з конкретними генами цей метод виявився зручним для молекулярно-

генетичної диференціації та оцінки генетичного різноманіття широкого спектра живих організмів [11, 17].

Було встановлено, що інтрони можна використовувати для побудови генетичних карт, оскільки вони безпосередньо відображають зміни, що виникають всередині генів [135].

Інтрони – ділянки ДНК, які є частиною гену, однак не містять інформації про послідовність амінокислот білка. Вони вважаються найбільш варіабельними ділянками генів, що містять багато функціональних елементів. Як відомо ітрони впливають на посилення та послаблення транскрипції, регуляцію альтернативного сплайсингу, експресію, тривалість життя мРНК та еволюцію організму в цілому, тощо [461].

Встановлено, що інтрони мають посилюючий ефект на експресію генів. Це явище – інтрон-опосередковане посилення – спостерігається в різних організмах, включаючи рослини. Його механізм в значній мірі невідомий, однак було визначено, що посилення ефекту інтронів корелює з положенням інтрону. Найбільш значущими – є перші інтрони [236, 297].

Нещодавно було виявлено, що інтрони беруть активну участь у контролі експресії генів не тільки через механізм альтернативного сплайсингу, що є ключовим та дозволяє отримувати різні молекули РНК одного і того ж гена, а й через інші механізми (Intron Mediated Enhancement (IME) та інтрон-залежне просторове вираження (intron dependent spatial expression (IDSE)) [34, 83].

Кількість інтронів на ген збільшується з рівнем ускладнення еукаріотичного виду. Геноми вищих рослин зазвичай містять 5–6 інтронів на ген, з середньою довжиною близько 250 вр. Що стосується еволюційної геноміки, то це спостереження підтримує модель інтронного посилення, яка свідчить про те, що інтрони накопичувалися стохастично в межах еукаріотичних ліній [34].

Зазвичай інтрони є послідовностями, які помірно еволюціонують і розглядаються як «сміттєва» ДНК [180]. Вони досить успішно

використовуються для розроблення маркерних систем з метою оцінки генетичної різноманітності. Оскільки інтрони безпосередньо пов'язані з конкретними генами, то поліморфізм довжини інтронів генів виявився зручним інструментом для генетичного картування та універсальним для широкого спектра організмів [39, 234].

Вперше такі дослідження були проведені для вивчення поліморфізму довжини інтронів в родині гена α -амілази у пшениці та ячменю 1991 році [369]. При цьому були використані праймери до сайтів сплайсингу інтронів (intron splice junction (ISJ)). Схему, що лежить в основі цього підходу наведено на рис. 1.1.

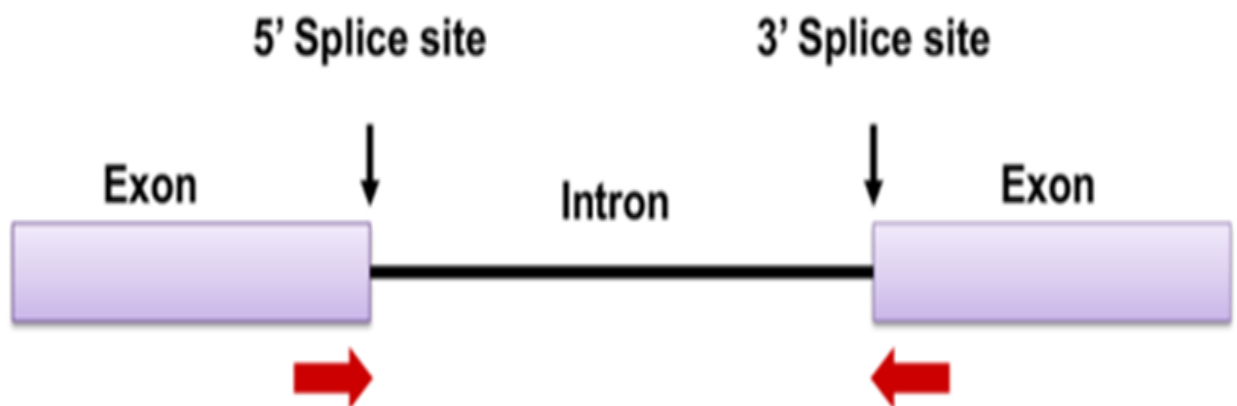


Рис. 1.1. «Intron-targeting» маркер з праймерами, що фланкують екзонні ділянки [278].

В подальшому метод було неодноразово випробувано на інших рослинних об'єктах [52, 143, 199, 200, 265, 276, 321]. Для бобових також було проведено диференціацію родів, родин, порядків та класів з використанням поліморфізму довжини інтронів в родині генів β -амілази [461].

На сьогодні вже розроблено специфічні варіанти ІЛР, які ґрунтуються на оцінці поліморфізму розмірів інтронів і відрізняються один від одного родинною генів, що виступає в якості джерела поліморфізму, і консервативною ділянкою ДНК на межі з інтроном.

Під час розробки методики вона мала різні назви: exon-primed intron-crossing PCR (EPIC PCR), conserved-intron scanning primers (CISP), intron-flanking primers, potential intron polymorphism (PIP) та PCR-based landmark unique gene (PLUG) [94, 151, 265, 368]. Відмінності між цими методами полягають в джерелі отримання праймерів, методиці проведення ПЛР, методі розділення фрагментів після ампліфікації та області ампліфікації інтрона. Однак в їх основі один фундаментальний метод – «intron-targeting» (IT). Отже IT – це основний підхід, який використовує поліморфізм довжини інтрона у якості джерела інформації [369].

Через дизайн праймерів до ділянок EST, що представляють собою короткі послідовності кДНК, створено прості специфічні ILP-маркери або PIP-маркери (potential intron polymorphism). Для їх систематизації створена онлайн база даних [384]. Однак для більшості рослин в цих базах даних є лише кДНК або EST послідовності. Як відомо екзон-інтронні структури в значній мірі подібні серед гомологічних генів, а отже сайти сплайсингу інтронів в кДНК/EST послідовностях можна вирахувати, знаючи екзон-інтронну структуру гомологічних генів зі спорідненого організму. Це дає можливість розробити ILP-маркери для будь-якого організму.

На схемі (рис. 1.2) наведено основні етапи визначення потенційних інтронів для створення на їх основі молекулярних маркерів [384].

Як можна бачити в ньому присутні три основні етапи:

1) визначення положення інтронів і їх довжини шляхом вирівнювання кДНК досліджуваних рослин з геномною послідовністю рослин з вже відомою послідовністю генів (для дводольних рослин як споріднений вид використовують *Arabidopsis thaliana*, для однодольних – *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare);

2) ідентифікація можливих позицій інтронів в кожному дослідженому виді шляхом вирівнювання EST послідовностей рослин з відомою кДНК послідовністю спорідненого виду;

3) створення праймерів для досліджених послідовностей EST, що містять можливі позиції інтронів.

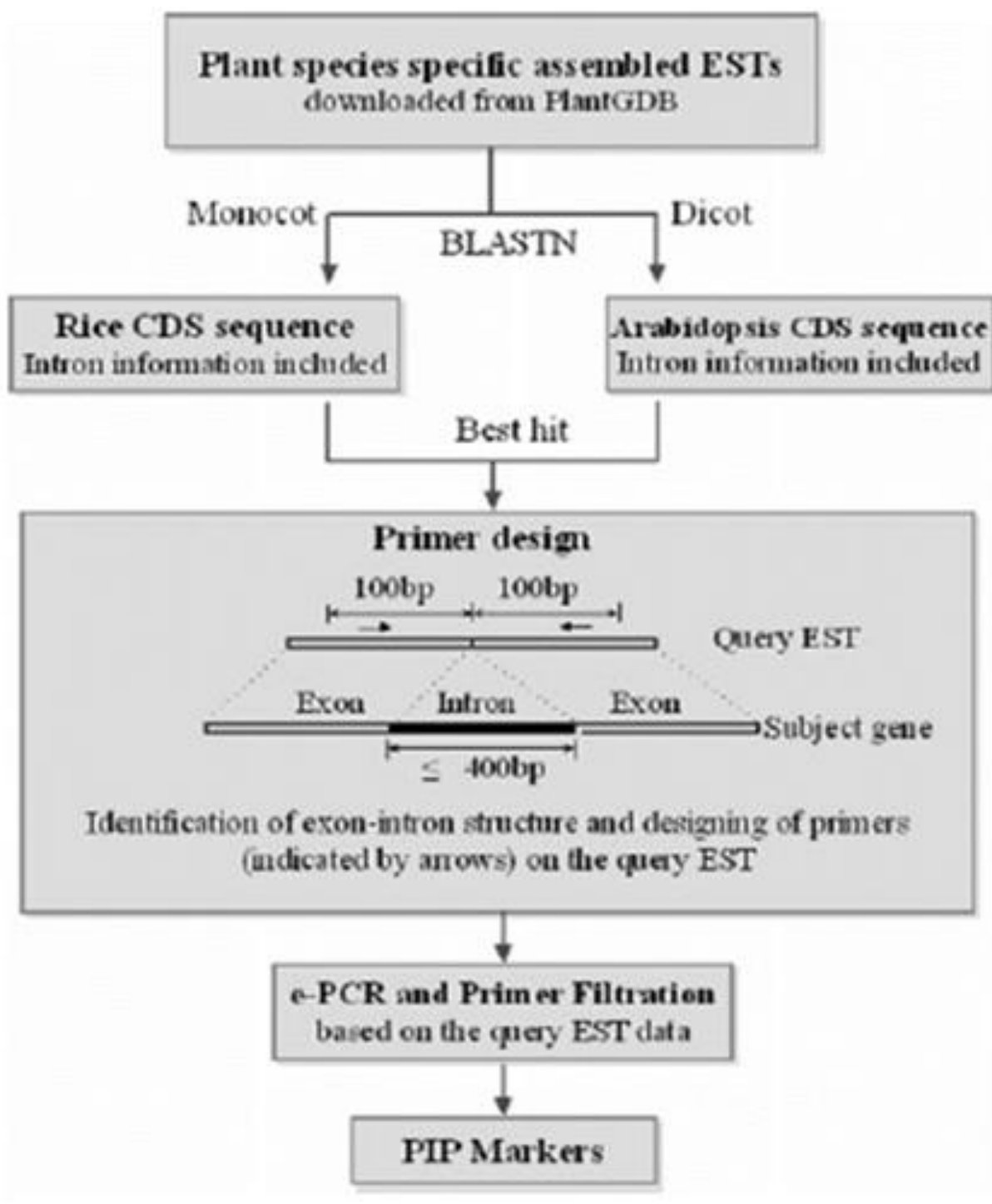


Рис. 1.2. Блок-схема розробки PIP-маркерів [34].

За такою схемою було виявлено 57 658 PIP маркерів для 59 видів рослин (22 273 для однодольних і 35 385 для дводольних рослин) [34].

Застосовуючи молекулярно-генетичні маркери на основі поліморфізму інтронів досліджують різноманітні групи живих організмів (мідії – *Mytilus edulis* L. та *M. galloprovincialis* Lmk.; дрозозфіли – *Drosophila melanogaster* Meigen, лакові червці – *Kerria lacca* Kerr) [62, 63, 253, 310]. Серед хребетних тварин маркери даного типу застосовуються у вивченні філогенетичних зв'язків у змії (*Python molurus bivittatus*, *Ophiophagus hannah*, та інш.) [204]. Також нещодавно було розроблено протокол для дослідження найзручніших інтронів з геному ссавців. В дослідженні використовували гени п'яти видів: людини, шимпанзе, макака, собаки та корови, та свідомо не залучали наявні геноми гризунів (миші та щура), оскільки вони мають геномні особливості (швидкі еволюційні показники), які роблять порівняння всіх ссавців проблематичним [148].

Використання ILP-маркерів для рослин на сьогодні є дещо обмеженим, що пов'язано із необхідністю попереднього виявлення відповідних інтронів. Однак питання їх розробки та верифікації є надзвичайно актуальним, оскільки вдалі варіанти маркерних систем можуть бути використані за для генотипування та диференціації організмів на різних таксономічних рівнях (види, сорти, клони).

Однією з найбільш успішних ILP маркерних систем можна вважати метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів основного білку мікротрубочок клітини β -тубуліну (**Tubulin Based Polymorphism, TBP**) [22, 113].

Відомо, що β -тубулін є основною складовою мікротрубочок, що утворюють цитоскелет рослинної клітини, та бере участь у фундаментальних процесах, таких як поділ, везикулярний транспорт, передача сигналів, утворення клітинної стінки тощо [30, 250]. Важливість та багатофункціональність β -тубуліну в забезпеченні нормального функціонування клітин передбачає певну консервативність первинної амінокислотної послідовності білку.

У хребетних тварин спостерігається до 9 різних ізоформ β -тубуліну, які кодуються різними генами і розташовуються в різних хромосомах, а також мають тканинспецифічні патерни експресії [105]. У рослин гени β -тубуліну об'єднані в одну родину та кодують різні ізоформи білку. Найбільш охарактеризованими є родини генів β -тубуліну *A. thaliana* та *O. sativa*, які містять дев'ять та вісім представників відповідно [118, 325].

Для генів β -тубуліну, як в межах одного, так і між різними організмами встановлена висока консервативність. Вони складаються з трьох екзонів та двох інтронів, які розташовані у фіксованих позиціях. Гени β -тубуліну кукурудзи (*ZeamTUB1*) та рису (*OryzaTUB2*) – є виключенням, оскільки містять лише один перший інтрон [38]. Перший інтрон β -тубуліну починається з 397 нуклеотиду після стартового кодону (його довжина може значно варіювати між різними ізо типами генів β -тубуліну). До того ж для інтронів генів β -тубулінів виявлено, що їх еволюція йде дещо повільніше, ніж у багатьох інших інтронних послідовностях [37, 101, 159, 233].

ТВР-метод був вперше запропонований у 2004 році [22]. Автори провели оцінку поліморфізму першого інтрону одночасно всіх генів β -тубуліну, закодованих в геномах *Brassica napus*, *Coffea* та *Lotus*. Було запропановано пару вироджених ТВР-праймерів, які відпалюються під час ПЛР на частинах екзонів, і забезпечують ампліфікацію перших інтронів всіх генів β -тубуліну, закодованих в геномах досліджуваних рослин. В подальшому, утворені фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелі [22]. Також було показано можливість їх розділення за допомогою капілярного електрофорезу [113]. На рис. 1.3 наведено схему ТВР-методу.

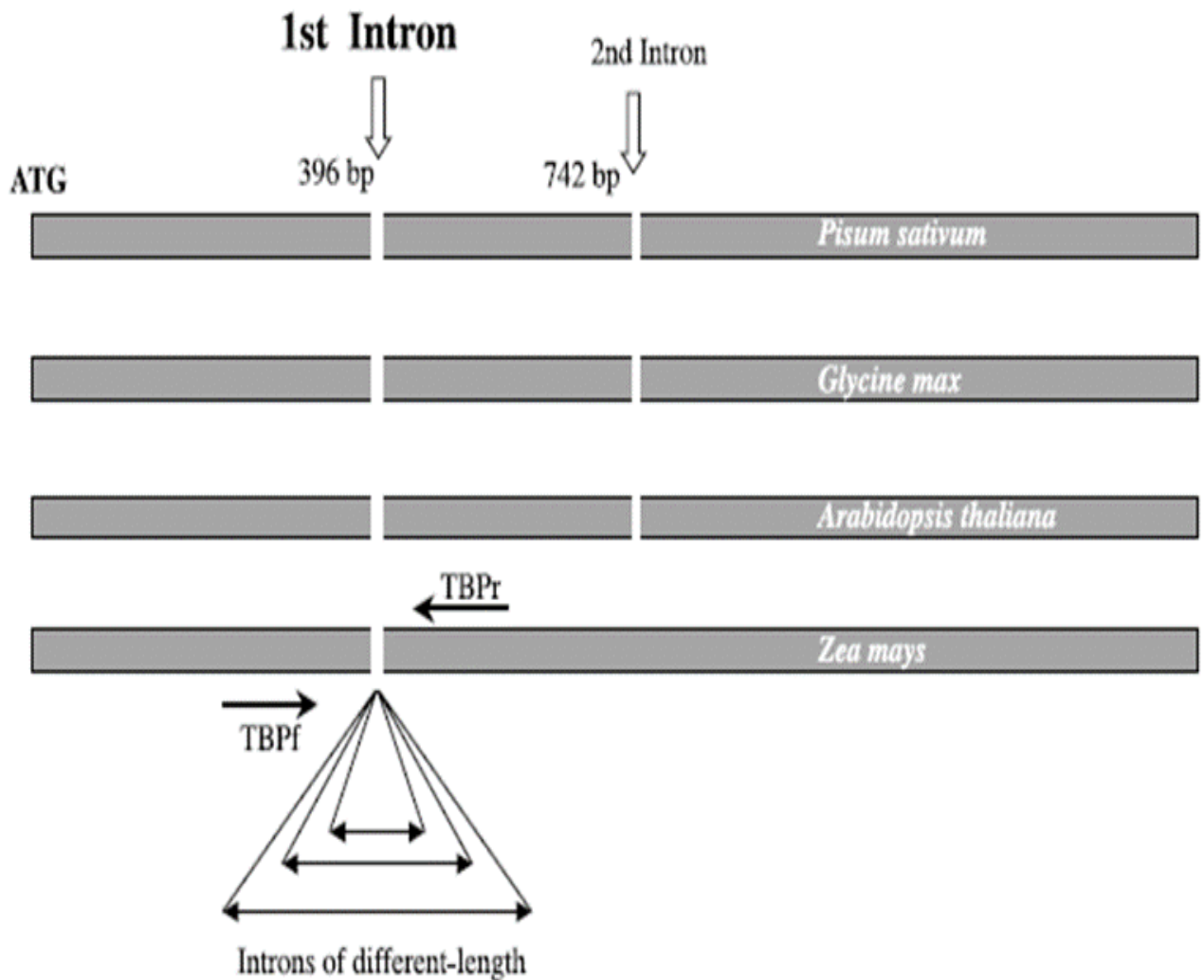


Рис. 1.3. Схема методу, що базується на визначенні поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну [22].

Із застосуванням аналізу поліморфізму I інтрону генів β -тубуліну було досліджено ряд рослинних організмів (*Vitis* L., *Passiflora* L., *Heliānthus* L., *Glycine* L., *Medicāgo* L.) [33, 112, 113].

Однак для ТВР було виявлено певне обмеження. Воно полягає в невеликій кількості молекулярних маркерів, що були отримані для деяких видів рослин, оскільки сам метод спирається лише на оцінку поліморфізма довжини першого інтрона генів β -тубуліну. Таке обмеження перешкоджає точній оцінці таксономічної спорідненості та вимірюванню генетичних відстаней. Для виправлення цього недоліку, було впроваджено модифікацію

методу ТВР. Вона базується на використанні у дослідженнях II інтрона β -тубуліну. Крім того це дозволяє збільшити диференційну здатність методу [34]. Другий інтрон присутній у більшості видів рослин. Така модифікація ТВР-методу називається сТВР (combinatorial ТВР, або комбінований поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну), яка спирається на залучення у аналіз поліморфізму довжини II-го інтрона гена β -тубуліну.

Таким чином, ті сорти і види, які не можна було б диференціювати за одним інтроном, можуть бути розділені за другим. Дана модифікація була залучена до ряду досліджень та дозволила оцінити генетичний поліморфізм у наступних рослинних об'єктів: *Rumex acetosa* L., *Bromus hordaceus* L., *Trifolium* L., *Crepis* spp., *Phaseolus vulgaris* L., *Festuca violacea* Gaudin., *Brassica napus* L., *Rosa* spp., *Arachis* L., *Veronica persica* Poiret., *Dactylis glomerata* L., *Plantago lanceolata* L., *Holcus lanatus* L., *Phalaris arundinacea* L., *Nardus stricta* L., *Phleum pratense* L. [34, 38].

Ще однією з варіацій ТВР методу яку було запропоновано для збільшення диференціюючої здатності методу є h-ТВР (horse-ТВР), який використовує в аналізі як I так і II інтрон генів β -тубуліну [106]. Така комбінація дозволяє аналізувати всю геномну ділянку, яка асоційована з генами β -тубуліну. За рахунок того, що при цьому ампліфіковані фрагменти мають більший розмір (до 2 кб) – забезпечується краща роздільна здатність методу. Ефективність застосування цього варіанту аналізу було показано під час дослідження *Camelina Crantz* [106, 107].

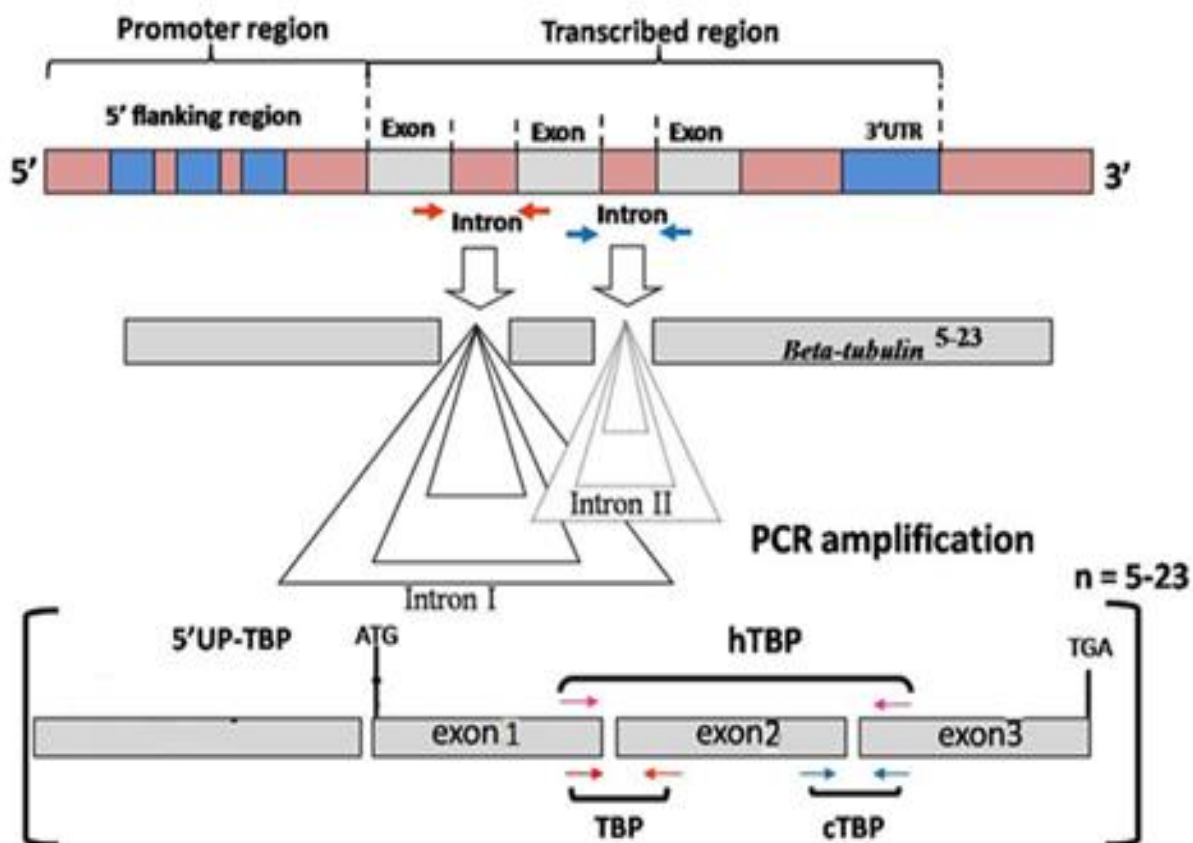


Рис. 1.4. Схема можливих варіантів аналізу поліморфізму довжин інтронів у генах β -тубуліну рослин. Стрілки вказують різні комбінації праймерів у відповідній позиції і орієнтації. Цифри 5-23 вказують на кількість можливих генів β -тубуліну рослин в межах одного виду [34].

Комбінації праймерів, спочатку розроблені для селективної ампліфікації або I інтрона (TBP), або II інтрона (cTBP), можуть бути використані разом при тих же експериментальних умовах проведення ПЛР. Це дозволяє здійснити супутню ампліфікацію двох інтронів з генерацією більшої кількості маркерів одного і того ж генного локусу. Крім того це дозволяє використовувати альтернативні комбінації між прямим і зворотнім виродженими праймерами. Дискримінаційна ефективність методу TBP/cTBP також спирається на те, що відбувається одночасна ампліфікація інтронів всіх членів сімейства генів β -тубуліну. Кількість членів може варіювати залежно від виду рослин. Крім того вироджені праймери, які зазвичай

використовуються, становлять тисячі різних комбінацій нуклеотидів, що забезпечує основу для широкого діапазону застосованості методу.

Тобто на сьогодні вже існує та успішно застосовується декілька варіацій TBP-методу. Незважаючи на це відбуваються додаткові розробки на основі деяких особливостей будови 5'-ділянки генів β -тубуліну, які можуть забезпечити ампліфікацію некодууючої послідовності вище стартового кодону ATG (як у тополі, рису та *Arabidopsis*) [34].

Було показано, що TBP-метод володіє певним набором переваг у порівнянні з іншими методами, що базуються на основі вивчення поліморфізму довжини інтронів. Передусім, – це універсальність, яка пов'язана з високим консерватизмом фланкуючих інтрон ділянок екзонів генів β -тубуліна, до яких підібрані праймери. Це робить TBP-метод більш ефективним для прискореної оцінки генетичної мінливості, ніж популярні SSR маркери, для яких необхідна попередня інформація про структуру геному.

Загалом на сьогодні, TBP-маркери, є одними з найпоширеніших серед вже відомих ILP маркерних систем. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну є універсальним, інформативним та надійним інструментом при різноманітних генетичних дослідженнях рослин. Доцільність використання різних варіантів TBP-методу було вдало апробовано для деяких видів родів *Brassica* L., *Lotus* L., *Coffea* L., *Eleusine* Gaertn., *Triticum* L., *Hordeum* L., *Camelina* Crantz., *Passiflora* L., *Rosa* L., *Pinus* L., *Abies* Mill., *Picea* A. Dietr., *Populus* L., *Quercus* L. тощо [33, 34, 36, 103, 106, 107, 247, 270, 271].

У той же час інформація щодо застосування TBP-методу, особливо для диференціації деревних рослин та оцінки їх поліморфізму, є вкрай неповною.

Отже, TBP-маркери показали себе як універсальна маркерна система, що дозволяє отримати видоспецифічні ДНК-профілі різноманітних видів рослин. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну може бути використана як джерело інформації для генотипування та генетичної диференціації різних видів, сортів та генотипів рослин. TBP-маркерам

притаманна низка вагомих переваг, які роблять їх привабливими в порівнянні з іншими популярними маркерними системами. Слід зазначити, що вони є кодомінантними, мультилокусними, варіабельними та відтворюваними, а також відносно дешевими.

Мікротрубочки є обов'язковим та універсальним структурним елементом еукаріотичних клітин. Головним їх компонентом є тубулін – гетеродимерний білок. Відомо, що множинність ізотипів рослинного тубуліну є результатом експресії сімейства генів, які кодують різні субодиниці тубуліну [100, 145].

У водоростей, грибів та тварин дослідження генів, що кодують α -тубулін, продемонстрували наявність від 2 до 20 ізотипів. У ссавців більшість генів тубуліну є псевдогенами. Відомо, що у миші (*Mus musculus* L.) функціонують лише п'ять генів α -тубуліну [187]. У кукурудзи було виявлено чотири ізоформи α -тубуліну [166]. Пізніше для цієї рослини було показано 7 генів, однак деякі з них – це псевдогени [351].

Найбільш дослідженими є 6 генів α -тубуліну *Arabidopsis thaliana*, які кодують 4 ізотипи білку [93, 187]. Існує припущення, що одним із механізмів формування холодо- та морозостійкості у рослин є зміна співвідношення окремих ізотипів тубуліну в їх складі [161, 174], що призводить до формування мікротрубочок, здатних зберігати полімеризований стан за низьких температур. Так, було встановлено, що під час холодової акліматизації у пшениці змінюється рівень експресії різних ізотипів генів α -тубуліну [294].

α -тубулін має високу консервативність амінокислотної послідовності і послідовностей кодуючих ділянок генів. Зважаючи на цей факт, а також на сталу екзон-інтронну структуру, можна припустити, що гени α -тубуліну також можуть бути використані для створення універсальної ILP- маркерної системи (по аналогії з β -тубуліном), придатної для проведення молекулярно-генетичного аналізу різних генотипів рослинних організмів.

Як відомо до складу мікротрубочок на ряду з α - та β -тубуліном входить γ -тубулін. Всі три різновиди тубулінів є критично необхідними для нуклеації та процесів перетворення структур цитоскелету.

Вважається, що γ -тубулін допомагає підтримувати бічні зв'язки між димерами α - і β -тубуліну під час їх складання в протофіламенти. Таким чином стає можливим, хоча це є кінетично несприятливим, утворення короткої трубчастої структури, яка, виходячи за певний поріг розміру, може швидко полімеризуватися в мікротрубочкову нитку [360].

Мікротрубочки є основними складовими цитоскелету у всіх еукаріотичних клітин. Вони необхідні для сегрегації хромосом під час поділу, для спрямованого внутрішньоклітинного транспорту і для створення спеціалізованих клітинних структур, таких як вії або джгутики. Їх збірка повинна контролюватися в просторі і часі. Для цього в клітині використовуються мультипротеїнові комплекси, що містять γ -тубулін [92, 181]. Багатопротеїнові γ -тубулінові кільцеві комплекси (γ -TuRC) регулюють полярність мікротрубочок, оскільки вони завжди розташовані на «мінусовому кінці», що містить α -тубулін [42, 360].

Було виявлено, що у клітинах тварин γ -тубулін має обмежене росташування в районі центросоми тоді як у рослинних клітинах він розподілений по всьому масиву мікротрубочок [395].

γ -тубулін відіграє важливу роль у підтриманні функціонування мітохондріальної сітки клітини. Підвищення рівня білка в ДНК-зв'язуючому домені γ -тубуліну посилює його асоціацію з мітохондріями. Крім того встановлено вплив γ -тубуліна на експресію генів [212]. Амінокислотна послідовність γ -тубуліну є високонсервативною серед філогенетично різних організмів [260, 285].

Структура генів γ -тубуліну вказує на те, що потенційно ці гени можуть бути використані для розробки ДНК маркерів. Випадки розробки та застосування ІЛР-маркерної системи на основі α - та γ -тубуліну поки-що не відомі.

Крім тубулінів до складу основних компонентів цитоскелету клітини входить глобулярний білок – актин. Це ключовий білок мікрофіламентів, а отже він відіграє важливу роль у більшості фундаментальних клітинних процесів (ріст та поділ клітин, підтримка сталої форми та полярності, забезпечення внутрішньоклітинного та везикулярного транспорту при ендоцитозі, тощо) [77]. Він наявний у всіх еукаріотичних клітинах. Як і β -тубулін утворює родину генів, що характеризується значною гомологією у різних видів організмів. Всі гени, що кодують білок актин в геномі рослин, відносять до великої мультигенної родини.

Актин представлений у багатьох різних ізоформах. Вони відрізняються за структурою, функціями, тканино-специфічністю та механізмами регуляції експресії генів.

В геномі тварин спостерігається до 10 генів актину. Зокрема у птахів та ссавців – 6 різних генів актину, що кодують 6 різних ізоформ білку [269]. В порівнянні з тваринами, рослинні актинові гени є більш диверсифікованою та складною родиною генів. Цьому також сприяє досить поширене явище поліплоїдії та гібридне видоутворення, більш притаманне рослинному організму ніж тваринному [26].

Кількість генів актину у різних видів рослин варіює. Так для нижчих рослин (червоні та зелені водорості) визначено два ізотипи актину [197, 378]. Для голонасінних та мохів від 7 до 11 різних актинів [225, 306]. Покритонасінні рослини в середньому мають близько 10 різних ізотипів генів актину. Імовірно деякі перебудови у геномі (такі як дуплікація окремих частин хромосом, що містять гени актину) призводять до наявності більше 100 генів актину у *Petunia juss* [19].

На прикладі генів актину у *A. thaliana* було показано, що їх структура є високо консервативною, однак є певні відмінності в нуклеотидному складі окремих ізотипів. Кодуючі ділянки цих генів переважно містять по 4 екзони, що розділені 3 інтронами. Родина генів актину *A. thaliana* складається з 10 генів актину (*act*), вісім з них кодують функціонально-активні білки актину,

що містять 376 амінокислот, а два інші (*act5* та *act9*) – псевдогени. Базуючись на філогенетичному аналізі всі гени актину *A. thaliana* поділяють на два класи: вегетативні та репродуктивні. Крім того, вісім ізотипів генів актину поділяються на п'ять підкласів. До вегетативного класу актинів відносяться *act7*, *act11* та *act2/8* підкласи, а до репродуктивного *act1/3* та *act4/12* [320]. Як вже згадувалося гени актину *act5* та *act9* вважаються псевдогенами. Було показано, що ці гени експресуються виключно в ендоспермі. Отже їх функціональні особливості потребують подальших досліджень [323].

Інтрони в генах актину знаходяться у чітко фіксованих позиціях. Зокрема, 1-ий інтрон гена актину слідує за 20 кодоном (без врахування 5'UTR), інтрон 2 починається після 197 кодону, а 3 інтрон – з 435 кодону. Ген актину *act2* у *A. thaliana* є виключенням, в ньому відсутній I інтрон. Також на кінцях генів актину розташовані 5'UTR (близько 120 п. н.) та 3'UTR (приблизно від 180 до 220 п. н.). Вони є нетрансльованими ділянками, які у складі мРНК не є матрицею для синтезу білку. В той же час вони містять регуляторні послідовності, що впливають на регуляцію трансляції, локалізації та деградації мРНК [120, 352].

Варто зазначити, що 5'UTR (нетрансльовані ділянки) генів актину мають сайти ініціації транскрипції. Деякі гени актину можуть мати декілька таких сайтів, наприклад, у *act1* їх три, а у *act7* – два [321]. Також 5'UTR-ділянка гена *act7* містить ряд гормон-чутливих консервативних елементів, зокрема, гіберелін- та ауксин-чутливі елементи та елемент, чутливий до абсцизової кислоти. Ці елементи регулюють експресію *act7* залежно від гормональних стимулів. Більшість генів актину *A. thaliana*, окрім *act2* та *act8*, мають консенсусний елемент поліаденілювання ААТААА у 3'UTR нетрансльованій ділянці [321].

У *A. thaliana* гени актину *act1* та *act3* мають велику подібність за нуклеотидними послідовностями, різниця складає лише 9 – 12 %. В цілому, відмінність у нуклеотидному складі генів актину у *A. thaliana* не перевищує

22 %. Найбільші відмінності спостерігаються між продуктами (білками) генів актину *act2* та *act4*, що складає 33 амінокислоти [323].

Гени актину *A. thaliana*: *act1/3*, *act4/12*, *act11*, експресуються в репродуктивних тканинах рослин, а вегетативні (*act2/8*, *act7*) – у вегетативних. *Act1* та *act3* експресуються під час розвитку квіткової меристеми, формування плодолистиків та яйцеклітин, а також у зрілому пилку [321]. Гени *act4* та *act12* одночасно експресуються у молодих судинних тканинах, тапетумі, у пилку. *Act12* виявляється в перициклі під час ініціації росту бічного кореня. *Act11* значно експресується в зрілому пилку, яйцеклітинах, ембріоні, ендоспермі, тощо [143]. Гени актину *act2* та *act8* експресуються у всіх вегетативних тканинах рослини. Ген *act7* виявляється у всіх молодих вегетативних тканинах, гіпокотелях тощо.

Було встановлено, що гени актину характеризуються консервативністю екзонних ділянок та гіперваріабельністю інтронних послідовностей, а отже, інтрони генів актину, як і генів тубуліну, можуть слугувати джерелом поліморфізму.

На рис. 1.5. представлено загальну схему розробки маркерів на основі оцінки поліморфізму довжини інтронів структурних генів для проведення молекулярно-генетичного аналізу рослин на основі вивчення поліморфізму довжини інтронів цитоскелетних генів.

В цілому, проаналізувавши сучасний стан розробки, верифікації, впровадження та застосування нових молекулярно-генетичних маркерів, можна зробити висновок, що ILP-маркерні системи мають ряд значних переваг, що робить їх бажаними для застосування у генетико-селекційних дослідженнях. Перспективними для розробки таких маркерних систем, що базуються на вивченні поліморфізму інтронів генів, є гени головних білків цитоскелету клітини (α -, β - та γ -тубуліну, а також актину). Практичне застосування таких ДНК-маркерних систем дасть можливість здійснювати генетичне профілювання (генотипування) й проводити оцінювання

генетичної диференціації окремих популяцій, сортів та видів (голо- та покритонасінних рослин).

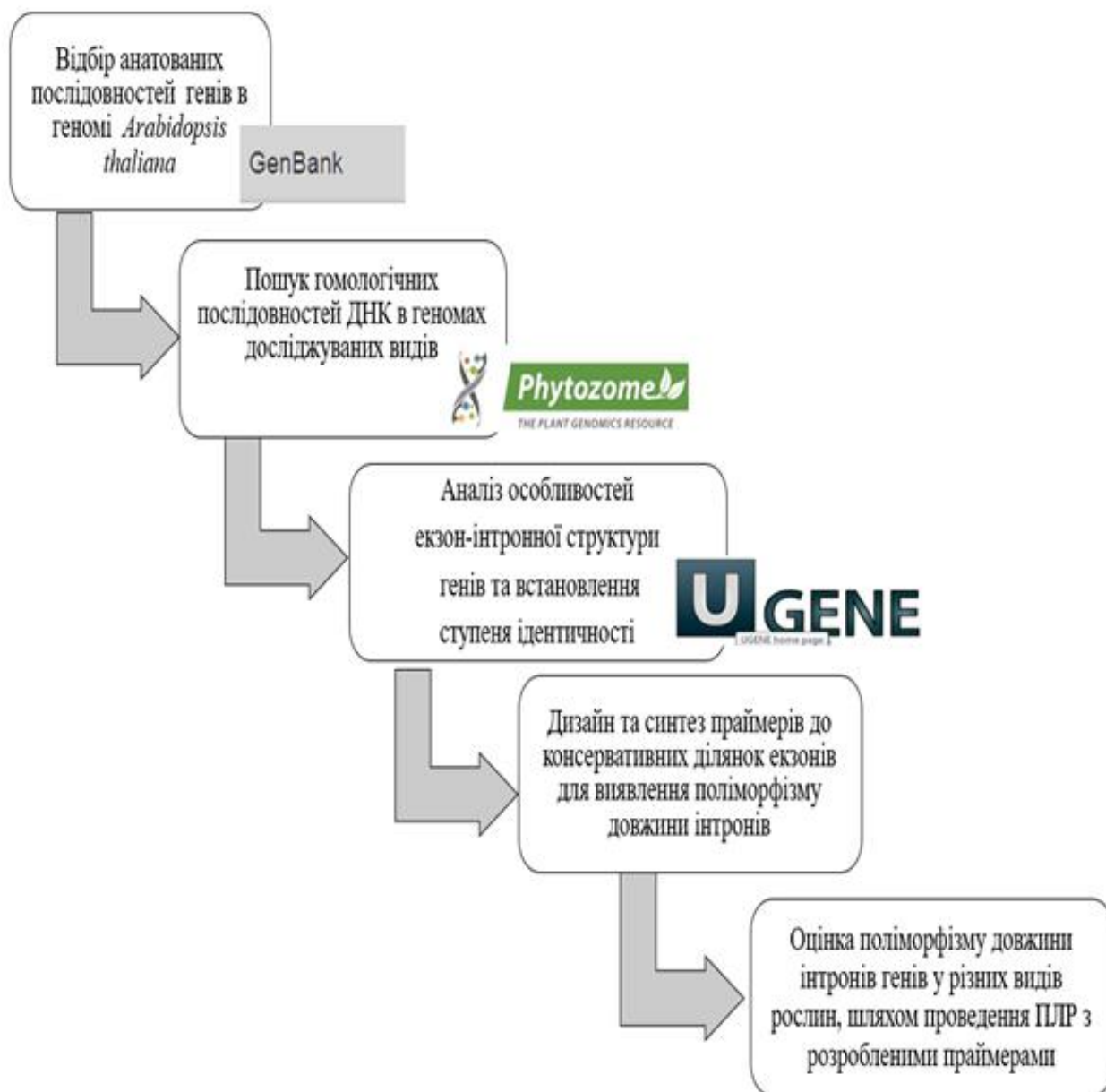


Рис. 1.5. Загальна схема розробки маркерів на основі оцінки поліморфізму довжини інтронів структурних генів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Рослинний матеріал

Для вивчення поліморфізму інтронів генів, що кодують основні білки цитоскелету клітини (α -, β - та γ -тубуліну, а також актину) в дослідженні було використано різні види (сорти та сортозразки) як однодольних так і дводольних рослин. Серед зразків трав'янисті форми та дерева, а також нижчі рослини – зелені мікроводорості.

Однодольні рослини:

- *Hordeum vulgare* L. В дослідженні використовували етильовані проростки насіння або зелену масу 30 сортів ячменю. Кожному сорту присвоювали порядковий номер, який наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Список сортів *Hordeum vulgare*, задіяних в дослідженні

№	Сорт	№	Сорт	№	Сорт
1	'Дружба'	11	'Паллідум 107'	21	'Адапт'
2	'Одеський 100'	12	'Одеський 131'	22	'Галатея'
3	'Вестнік'	13	'Одеський 151'	23	'Галактик'
4	'Одеський 111'	14	'Престиж'	24	'Зоряний'
5	'Романтик'	15	'Дерибас'	25	'Південний'
6	'Тайфун'	16	'Переможний'	26	'Південний'
7	'Одеський 115'	17	'Гамбринус'	27	'Гетьман'
8	'Тиль'	18	'Едем'	28	'Оболонь'
9	'Прерія'	19	'Сталкер'	29	'Чудовий'
10	'Рось'	20	'Незалежний'	30	'Селеніт'

- *Triticum aestivum* L. Досліджено 12 сортів м'якої ярої пшениці вітчизняної селекції ('Харківська 30', 'Безоста 1', 'Етюд', 'Елегія', 'Харківська 26', 'Миронівська 808', 'Колективна', 'Черемшина', 'Х 12', 'Retown', 'Недра' та 'Selkirk').

- *Oryza sativa* L. Використано 6 сортів рису посівного: 'YIP-4970', 'YIP-4558', 'Лазурит', 'Віконт', 'Преміум', 'Консул', які були надані Інститутом рису НААН України.

- *Aegilops biuncialis* Vis. (синоніми *Ae. lorentii* Hochst., *Ae. macrochaeta* Schuttl. et Huet, *Triticum lorentii* (Hochst), *T. macrochaetum* (Schuttl. et Huet) K. Richt, *T. biunciale* K. Richt). При аналізі було взято насіння з 15 різних популяцій Криму. Кожному зразку надали свій порядковий номер, наведений в табл. 2.2 з даними про походження популяції, колір та опушення колоскових лусок.

Таблиця 2.2

Характеристика вибірок з кримських популяцій *Aegilops biuncialis*

Н/п	Зразок <i>Ae. biuncialis</i>	Походження	Опушення колоскових лусок	Колір колоскових лусок
1	NK_02	Не відомо	Опушені	Темний
2	NK_010	Кара-Даг	Неопушені	Світлий
3	NK_B1-1	Піщане	Неопушені	Світлий
4	NK_11-2	Кара-Даг	Неопушені	Світлий
5	NK_MM7-3	Мис Мартьян	Неопушені	Світлий
6	NK_MMB-1	Мис Мартьян	Неопушені	Світлий
7	NK_13-1	Кара-Даг	Неопушені	Світлий
8	NK_50	Кара-Даг	Середньоопушені	Темний
9	NK_6-2	Берегове	Неопушені	Світлий
10	NK_4N2	Берегове	Неопушені	Світлий
11	NK_1-I	Мис Мартьян	Опушені	Темний

Продовження табл. 2.2

12	NK_OZ-2	Аю-Даг	Опушені	Темний
13	NK_10-3	Кара-Даг	Опушені	Темний
14	NK_MM2-1	Мис Мартьян	Неопушені	Світлий
15	NK_14-12	Кара-Даг	Неопушені	Світлий

• *Deschampsia antarctica* E. Desv. В роботі були використані рослини, які походять із двох географічно віддалених регіонів морської Антарктики (табл. 2.3). Матеріал був зібраний учасниками IX (2004/05), XI (2006/07), XII (2007/08) та XV (2010/11) Українських антарктичних експедицій та І.А. Козерецькою під час сезонної роботи на станції «Генрик Арцтовський» (2005/06).

Таблиця 2.3

Походження та кількість досліджених зразків

Deschampsia antarctica E. Desv.

Місце збору матеріалу	Локалізація	Кількість зразків
Point Thomas oasis, King George Island, South Shetland Islands	S 62.163517°, W 58.469100°	5
Fildes Peninsula, King George Island, South Shetland Islands	S 62.188133°, W 58.917917°	5
Robert Island, South Shetland Islands	S 62.441680°, W 59.380710°	5
Gamage Point, Anvers Island, Palmer Archipelago	S 64.774207°, W 64.055420°	5
Pléneau Island, Wilhelm Archipelago	S 65.100050°, W 64.050110°	4
Oasis Rasmussen, Kyiv Peninsula, Graham Land	S 65.247210°, W 64.085420°	5
Cape Pérez, Kyiv Peninsula, Graham Land	S 65.407850°, W 64.097950°	5
Léonie Island, Adelaide Island region	S 67.598861°, W 68.356250°	3

- *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. та *Eleusine indica* (L.) Gaertn. У роботі використано два сорти *E. coracana* – 'Тропіканка' та 'Євгенія', отримані методами класичної селекції [405], а також два соматоклональних варіанти *E. coracana* (SE-1, SE-4) [406], які було отримано від сорту Тропіканка. Для *E. indica* – три генотипи, один з яких є природною популяцією цього виду, а два інші (*E. indica* 4A-21, *E. indica* 4A-1) є стійкими до дії динітроанілінових гербіцидів і були люб'язно надані проф. У.В. Баярдом (Мічіганський Університет, США).

Серед дводольних рослин були досліджені наступні:

- *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – досліджено 10 рослин дикого типу.

- *Camelina sativa* (L.) Crantz. Для аналізу використали високопродуктивні олійні сорти та сортозразки рижію посівного, отримані у відділі нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка, серед яких: сортозразки ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-Ч, ФЕОРЖЯФ-ЧП, ФЕОРЖЯФ-Д та сорти Перемога, Євро-12, а також сорти Міраж та Клондайк селекції Інституту олійних культур НААН України.

- *Achillea glaberrima* Klokov та *Achillea leptophilla* Vieb. Для молекулярно-генетичного аналізу використовували проростки деревію голого та тонколистого. *Achillea glaberrima* (деревій голий) та *Achillea leptophilla* (деревій тонколистий (м'яколистий)) належать до жовтоквіткових таксонів секції *Filipendulinae* (DC.) Afan. Ці два види поширені в Україні на порівняно невеликій території. Зокрема, *A. leptophilla* є причорноморським ендеміком кам'янистих оголень, а *A. glaberrima* відноситься до стенотопних ендеміків Приазов'я, який зустрічається тільки на гранітних оголеннях заповіднику «Кам'яні могили» (занесений до Червоної книги України). Слід зауважити, що деякі дослідники вважають *A. glaberrima* похідною від

A. leptophylla расою, яка повністю втратила опушення. Обидва ці види заслуговують на всебічне вивчення та охорону [470].

- ***Solanum tuberosum* L.** та ***Solanum lycopersicum* L.** Матеріалом для дослідження обрано різні сорти рослин, які представляють практичний інтерес для генетичних та селекційних досліджень, а також є широко розповсюдженими господарсько цінними культурами. Було використано 12 сортів томату *S. lycopersicum*: 'Money Maker', 'Перлина', 'Волгоградський', 'Балконне Чудо золоте', 'Де Барао чорний', 'Тарасенко рожевий', 'Ефемер', 'Шапка Мономаха', 'Валютній', 'Американський Синій', 'Золотий Горіх', 'Де Барао рожевий' та 4 сорти картоплі *S. tuberosum* ('Зарево', 'Левада', 'Світанок', 'Вернісаж'). З кожного сорту аналізували не менше 5 рослин.

- ***Linum usitatissimum* L., *L. angustifolium* Huds., *L. bienne* Mill., *L. perenne* L., *L. humile* Mill. (*L. humile* cv. 'Орфей' і *L. humile* cv. 'Еврика'), та *L. angustifolium* Huds.** В дослідженні використані як різні види льону так і їх сорти. Зокрема, 10 сортів *L. usitatissimum* зарубіжної та вітчизняної селекції ('Зенга' (Нідерланди), 'Ескаліна' (Бельгія), 'Електра' (Бельгія), 'Глазур' (Україна), 'Світанок' (Україна), 'Антей' (Росія), 'Светоч' (Росія), 'Л-1120' (Росія), 'Хейя 13' (Китай), 'Хейя 15' (Китай).

12 сортів льону-довгунця білоруської селекції, люб'язно надані Інститутом генетики і цитології НАН Білорусі, серед них 'К-790', 'К-5330', 'К-5455', 'К-5451', 'К-5460', 'К-5992', 'К-603', 'К-604', 'К-5990', 'К-6601', 'К-37', 'К-7236'.

16 сортів льону-довгунця української селекції, які люб'язно надані Інститутом луб'яних культур (м. Глухів, Україна), а саме сорти: 'Есмань', 'Чарівний', 'Зоря 87', 'Сіверський', 'Каменярь', 'Журавка', 'Глухівський ювілейний', 'Іванівський', 'Вручий', 'Глазур', 'Рушничок', 'Гладіатор', 'Надія', 'Глобус', 'Глінум'. Детальна інформація про походження сортів льону-довгунця наведена в табл. 2.5.

Таблиця 2.5

Сорти льону-довгунця (*Linum usitatissimum*) української селекції

№ Зразка	Назва сорту	Оригінатор
1	'Есмань'	ДСЛК*
2	'Сіверський'	ДСЛК*
3	'Глухівський ювілейний'	ДСЛК*
4	'Глобус'	ДСЛК*
5	'Глазур'	ДСЛК*
6	'Гладіатор'	ДСЛК*
7	'Чарівний'	ДСЛК*
8	'Глінум'	ДСЛК*
9	'Зоря 87'	Інститут Карпатського регіону
10	'Каменярь'	Інститут Карпатського регіону
11	'Міандр'	Інститут Карпатського регіону
12	'Журавка'	Інститут сільського господарства Полісся
13	'Надія'	Інститут сільського господарства Полісся
14	'Рушничок'	ННЦ «Інститут землеробства»
15	'Іванівський'	ННЦ «Інститут землеробства»
16	'Вручий'	ННЦ «Інститут землеробства»

*ДСЛК – Дослідна станція луб'яних культур Інституту сільського господарства Північного Сходу НААН України (Інститут луб'яних культур НААН України)

В дослідженні також було використано 30 білоруських ландрас *L. usitatissimum* (табл. 2.6). З них 24 – довгунцевого, 3 – олійного, 2 – довгунцево-олійного типів, 2 зразки стародавнього сорту та 1 зразок поліпшеного сорту. Геномну ДНК виділяли з проростків (не менше ніж з 10 рослин кожного сорту).

Таблиця 2.6

Список білоруських ландрас льону, використаних в дослідженні

№	Назва сорту	Тип сорту	№	Назва сорту	Тип сорту
1	<i>K-5475</i>	довгунцевий	16	<i>K-5453</i>	довгунцевий
2	<i>K-594</i>	довгунцевий	17	<i>K-5452</i>	довгунцевий
3	<i>K-1431</i>	довгунцевий	18	<i>K-5451</i>	довгунцевий
4	<i>K-1430</i>	довгунцевий	19	<i>K-603</i>	олійний
5	<i>K-5483</i>	довгунцевий	20	<i>K-5991</i>	довгунцево-олійний
6	<i>K-4219</i>	довгунцевий	21	<i>K-790</i>	довгунцевий
7	<i>K-5330</i>	довгунцевий	22	<i>K-37</i>	стародавній довгунцевий
8	<i>K-5992</i>	олійний	23	<i>K-5476</i>	довгунцевий
9	<i>K-5990</i>	довгунцево-олійний	24	<i>K-6221</i>	довгунцевий
10	<i>K-6601</i>	стародавній олійний	25	<i>K-5455</i>	довгунцевий
11	<i>K-780</i>	довгунцевий	26	<i>K-1042</i>	довгунцевий
12	<i>K-604</i>	олійний	27	<i>K-186</i>	довгунцевий
13	<i>K-7236</i>	покращений довгунцевий	28	<i>K-5465</i>	довгунцевий
14	<i>K-6212</i>	довгунцевий	29	<i>K-783</i>	довгунцевий
15	<i>K-777</i>	довгунцевий	30	<i>K-1453</i>	довгунцевий

Для виділення ДНК та подальшої оцінки поліморфізму інтронів генів тубуліну у деревних рослин використовували вегетативний матеріал, а саме термінальні бруньки із фрагментами пагонів та листові пластинки. В цілому проаналізовано 27 видів деревних рослин (табл. 2.7).

Перелік видів досліджених деревних рослин

№	Вид	Місце збору матеріалу	№	Вид	Місце збору матеріалу
1	<i>Quercus robur</i> L.	м. Київ, «Голосіївська пустинь»	15	<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	м. Київ, «Гірка Крістера»
2	<i>Quercus robur</i> L.	м. Київ, «Феофанія»	16	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»
3	<i>Populus tremula</i> L.	м. Київ, «Лиса Гора»	17	<i>Populus nigra</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»
4	<i>Fagus sylvatica</i> f. <i>salicifolia</i>	м. Київ, «Гірка Крістера»	18	<i>Juglans regia</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»
5	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»	19	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»
6	<i>Morus alba</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»	20	<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.	м. Київ, «Гірка Крістера»
7	<i>Ulmus glabra</i> Huds.	м. Київ, «Гірка Крістера»	21	<i>Ginkgo biloba</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»
8	<i>Betula pendula</i> Roth	м. Київ, «Гірка Крістера»	22	<i>Picea abies</i> L. Karst.	Українські Карпати
9	<i>Acer platanoides</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»	23	<i>Pinus mugo</i> Turra	Українські Карпати
10	<i>Acer negundo</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»	24	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Українські Карпати
11	<i>Acer saccharinum</i> Marshall	м. Київ, «Гірка Крістера»	25	<i>Abies alba</i> Mill.	Українські Карпати
12	<i>Fagus sylvatica</i> L.	м. Київ, «Гірка Крістера»	26	<i>Picea pungens</i> Engelm	Українські Карпати
13	<i>Catalpa bignonioides</i> Walter	м. Київ, «Гірка Крістера»	27	<i>Ulmus pumila</i> L.	м. Дніпро
14	<i>Tilia cordata</i> Mill.	м. Київ, «Гірка Крістера»	28	<i>Ulmus suberosa</i> Moench	м. Дніпро

- *Quercus robur* L.

Для отримання даних щодо поліморфізму вибірок вікових дерев *Q. robur* НПП «Голосіївський», аналізу просторової компоненти генетичної мінливості, оцінки антропогенного впливу на генетичну структуру деревостанів були задіяні дуби віком понад 100 років (відбирали дерева з найбільшим діаметром стовбура), деякі дерева мали охоронний статус (рис. 2.1). Всього було відібрано матеріал з 55 дерев.



Рис. 2.1. Деревя дуба звичайного Голосіївського лісу.

Обрані для аналізу дерева умовно поділили на п'ять вибірок-популяцій (рис. 2.2): № 1 – дерева зростають зі сторони купелі «Голосіївська пустинь» (8 рослин), № 2 – дерева з верхнього схилу балки (19 рослин), № 3 – дерева з нижнього схилу балки (7 рослин), № 4 – дерева розташовані між Головною астрономічною обсерваторією НАН України та музеєм «Пірогово» (6 рослин), № 5 – дерева на території цієї обсерваторії та в її околицях (15 рослин).

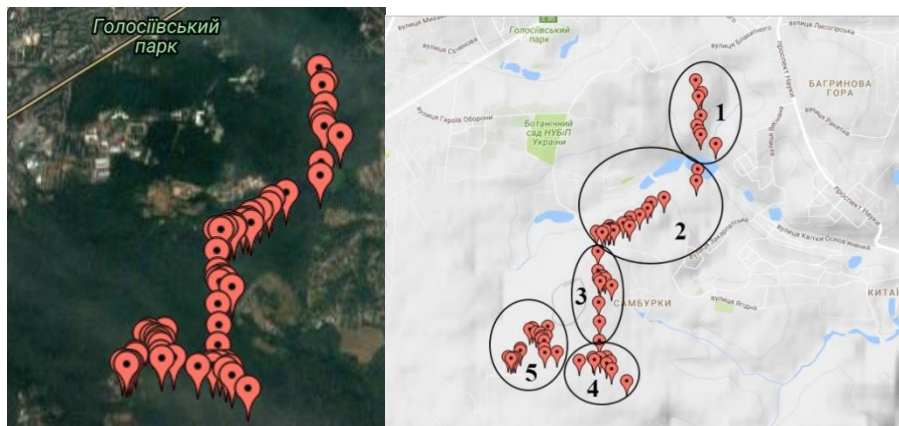


Рис. 2.2. Розташування дубів, з яких було відібрано матеріал в парку «Голосіївський».

Геодані, стосовно розташування джерела матеріалу, колектувалися одночасно із збором матеріалу. Для цього робили фотознімки об'єктів із увімкненим геотегуванням. Надалі геотеги, виокремленні із знімків рослин, з яких збирався матеріал, оброблялися за допомогою скриптів в середовищі статистичного програмування «R» (R Core Team), пакети «googleVis» та «geosphere». Отримані геодані дані експортувалися до пакету GenALEX.

Слід зазначити, що при аналізі вікових дерев *Q. robur* з парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва загальнодержавного значення «Феофанія» для ТВР-аналізу було відібрано зразки з двох фенологічних форм, які ділять на ранню та пізню за рядом ознак [410, 438, 453, 458, 471]. *Q. robur* var. *praecox* – рання фенологічна форма і *Q. robur* var. *tardiflora* Czern. – пізня фенологічна форма, відмінні як за часом виникнення фенологічних фаз, так і за фенотипом взагалі. Основні діагностичні ознаки за якими диференціюються *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* наступні: 1) розкриття бруньок, цвітіння, початок росту пагонів та більшість інших фенологічних фаз виникають у *Q. robur* var. *tardiflora* на 2 – 3 тижні пізніше, ніж у *Q. robur* var. *praecox*, 2) на відміну від *Q. robur* var. *praecox*, листя *Q. robur* var. *tardiflora* не падає, залишаючись на гілках до кінця зими, 3) *Q. robur* var. *tardiflora* менше уражується шкідниками та хворобами, 4) порівняно з *Q. robur* var. *praecox*, *Q. robur* var. *tardiflora* має вищу і більш регулярну форму крони, ширший стовбур і вищу якість деревини, віддає перевагу більш зволоженим місцезростанням [471]. Визначено, що ці різновиди мають значні відмінності у стійкості до середовища, зростанні та розвитку [345, 410, 437, 438, 439, 453, 458]. У природних популяціях також відмічають перехідні фенологічні форми *Q. robur* [345].

• *Ulmus pumila* L. та *U. suberosa* Moench.

Ulmus pumila L. – в'яз приземкуватий (сін. низький, туркестанський, сибірський, карагач) з родини *Ulmaceae* – один з найбільш проблемних південно-європейських інвазійних видів азійського походження, поширений на південному сході та центральній частині України. *U. suberosa* Moench, або *U. campestris* var. *suberosa* Wahl – в'яз корковий, теж адвентивний інвазивний вид азійського походження, розповсюджений майже по всій території України (крім Карпат і крайнього півдня). Обидва види диплоїди; каріотип *U. pumila* та *U. suberosa* складає $2x=2n=28$ хромосом.

Насіння *U. pumila* було зібрано в травні-червні 2018 р. в трьох популяціях передмістя Дніпра. Перша природна популяція (ПП1) була моновидовим угрупованням різновікових особин з високою щільністю деревостану (11,9 шт./м²), займала площу 70×80 м. Друга популяція (ПП2), що характеризувалась присутністю деревних рослин інших видів, займала площу 90×80 м із щільністю деревостану 0,02 шт./м². Третя популяція (ПП3) також відзначалась присутністю інших видів дерев, займала площу 250×30 м. Щільність рослин *U. pumila* у ПП3 складала 0,1 шт./м². З 7 дерев у кожній популяції було проаналізовано по 200 насінин. Моновидова популяція насінневого походження *U. suberosa*, розташована у Міжнародному біосферному стаціонарі ім. О.Л. Бельгарда. Вона займає площу 300м² щільність різновікових особин в'яза коркового становила 0,3 шт./м².

Ulmus pumila – в'яз приземкуватий (син.: низький, дрібнолистий, туркестанський, горний, карагач) та *U. suberosa* Moench. – в'яз корковий. Для популяційно-генетичних досліджень матеріал *U. pumila* відібрано на трьох ділянках Дніпропетровської області та однієї ділянки *U. suberosa*. Всього було відібрано матеріал з 60 дерев (деревостани П1-П3) *U. pumila* по 20 дерев на кожній ділянці та 20 дерев (деревостан П4) *U. suberosa*.

• *Зелені мікроводорості.*

Для оцінки ефективності застосування молекулярно-генетичних маркерів, що базуються на дослідженні поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у нижчих рослин, було використано вісім видів (10 штамів) мікроводоростей з колекції IBASU-A Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного, що представляли три філи – зеленої (Chlorophyta), жовтої або жовто-зеленої (Ochrophyta) та еугленофітової (Euglenophyta) лінії еволюції. Відібрані види та штами у філогенетичному відношенні формують добре відокремлені клади і мають різну таксономічну належність на рівні найвищих таксономічних одиниць (відділів). Вони належать до п'яти родів трьох таксономічних відділів: *Acutodesmus acuminatus* (Lagerh.) P. Tsarenko, штам IBASU-A 245, *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P. Tsarenko, штам IBASU-A 251, *Acutodesmus dimorphus*, штам IBASU-A 344, *Desmodesmus armatus* (Chodat) E. Hegew., штам IBASU-A 338, *Desmodesmus armatus*, штам IBASU-A 263, *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E. Hegew. et A. Schmidt, штам IBASU-A 408, *Dunaliella salina* (Dunal) Teodor., штам IBASU-A 4, *Dunaliella minuta* W. Lierche, штам IBASU-A 40 (Chlorophyta), *Tribonema ulotrichoides* Pascher, штам IBASU-A 520 (Ochrophyta) та *Euglena* sp., штам IBASU-A 498 (Euglenophyta). Усі перелічені види водоростей були люб'язно надані член-кореспондентом НАН України, професором, доктором біологічних наук, завідувачем відділу фікології Інституту ботаніки НАН України Царенко П.М.

2.2. Біоінформатичний пошук та аналіз генів, що кодують цитоскелет клітини, в геномах досліджуваних рослин

Серед обраних для дослідження рослин, лише для пшениці та ячменю є дані повного секвенування геному. На даний момент у базі даних Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) не міститься жодної достовірно анотованої послідовності β -тубулінів, закодованих у геномі льону. Що стосується злаків, то в цій базі даних наразі знаходиться 5 анотованих послідовностей β -тубіліну пшениці і лише 1 анотована послідовність β -тубіліну ячменю. Як правило, у геномах вищих рослин міститься від 3 до 11 ізотипів β -субодиниць тубулінів, довжиною 445 – 447 амінокислотних залишків [31].

На підставі аналізу п'яти, віднесених до послідовностей β -тубуліну пшениці, однієї анотованої послідовності ячменю та однієї послідовності β -тубуліну *A. thaliana*, а саме – ізотипу beta-1 (TBB1_ARATH) за допомогою інструменту BLASTN було проведено пошук передбачених генів білків β -тубуліну, доступних у базі даних Phytozome v12.1. (www.phytozome.net) у геномах пшениці, ячменю та льону, відповідно [122, 365]. Для пошуку було використано налаштування програми BLASTN за замовчуванням. Відбір гомологів був заснований на відсоткових показниках ідентичності і подібності генів, а також на повноті нуклеотидних послідовностей і трансльованих продуктів. Для множинного вирівнювання досліджуваних нуклеотидних секвенсів були використані програми Clustal 2.0 і UGENE [196, 254]. Відібрані нами в ході аналізу послідовності використовували для візуалізації екзон-інтронної структури за допомогою програми Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>).

Для ТВР та сТВР-аналізу *D. antarctica* було здійснено дизайн пари видоспецифічних праймерів. На цей час в базі даних Gene Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) наявна інформація про послідовність кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (NM208297), яка є неповною, оскільки має довжину 917 п.н. та кодує лише 304 амінокислотних залишки, в той час як повний

поліпептидний ланцюг β -тубуліну складається з 450 амінокислотних залишків. З метою розроблення специфічних праймерів для оцінки поліморфізму хоча б одного з інтронів генів β -тубуліну *D. antarctica* спочатку за допомогою подвійного вирівнювання у програмі ClustalX 2.0.11 [196] визначили ділянки екзонів, які належить кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (NM208297). При вирівнюванні як референсні використовували послідовності генів β -тубуліну з бази даних Phytozome v9.1 (www.phytozome.net) різних видів вищих рослин, а саме: *Arabidopsis thaliana* – tubulin beta-1 (P12411_TBB1_ARATH та *Oryza sativa* – Os01g18050, для яких відома екзон-інтронна структура цього гену. В результаті попарного вирівнювання встановлено високий ступінь гомології двох ділянок (довжиною 240 та 677 п.н.) кДНК *D. antarctica* з фрагментами другого та третього екзонів генів β -тубуліну *A. thaliana* та *O. sativa*. Надалі було підібрано пару специфічних сТВР праймерів для оцінки поліморфізму II-го інтрону генів β -тубуліну *D. antarctica* за допомогою програми PrimerBlast [430].

Повні анотовані послідовності генів актину різущки Таля (*A. thaliana* L.) були взяті з бази даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), їх анотовані послідовності білка – з бази даних UniProt (www.uniprot.org/). Використовуючи он-лайн інструмент BLASTN версії 2.2.26+, був проведений пошук в базі даних Phytozome v 9.1 (www.phytozome.net) [122] на предмет наявності потенційних генів актину, закодованих в геномах рису посівного (*O. sativa* L.), льону-довгунця (*L. usitatissimum* L.), картоплі (*S. tuberosum* L.), томату звичайного (*S. lycopersicum* L.). Як матрицю для пошуку таких генів актину були використана повна анотована послідовність гену актину АСТ1 *A. thaliana*. Даний тип пошуку передбачає пошук на основі порівняння заданих нуклеотидних послідовностей з трансльованою у амінокислотні послідовності базою даних нуклеотидів. Для цього було використано налаштування програми BLASTN за замовчуванням. Відбір послідовностей

проводився на основі відсоткових показників ідентичності, а також на основі повноти амінокислотних продуктів трансляції.

Для множинного вирівнювання кодуєчих ділянок (екзонів) гомологічних послідовностей, а також їхніх поліпептидних продуктів була використана програма Clustal X 2.0 [196]. Ступінь ідентичності кодуєчих ділянок генів актину та їх трансльованих амінокислотних послідовностей визначили за допомогою програми UGENE [254].

Анотовані послідовності генів α -тубуліну *A. thaliana* були взяті з бази даних GenBank (NCBI). Пошук генів, що кодують α -тубулін у геномах *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, здійснювали за допомогою інструменту BLASTN версії 2.2.26+ у базі даних Phytozome v11 (www.phytozome.net). Множинне вирівнювання знайдених послідовностей виконували за допомогою програми Clustal X [196]. Праймери підбирали до консервативних ділянок I та II екзонів генів α -тубуліну, отриманих під час множинного вирівнювання, та аналізували за допомогою онлайн-інструменту OligoAnalyzer 3.1 ([https:// eu.idtdna.com/calc/analyzer](https://eu.idtdna.com/calc/analyzer)).

Проведено пошук консервативних ділянок екзонів генів γ -тубуліну, що оточують інтрон, для подальшого підбору до них праймерів таким чином, щоб під час ПЛР можна було отримати копії послідовностей інтронів. Праймери підбрано з використанням послідовностей генів γ -тубулінів таких видів рослин, як *Zea mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *Arabidopsis thaliana* (AT3G61650), *Linum usitatissimum* (Lus10010986.g, Lus10007851.g), для яких екзон-інтронна структура гена γ -тубуліну є доступною в базі даних Phytozome.v12 (www.phytozome.net). Після вирівнювання послідовностей генів з використанням алгоритму MUSCLE та програмного забезпечення UniproUGENE [254]. В подальшому найбільш консервативні ділянки екзонів використовували для підбору вироджених праймерів за допомогою програми PrimerBlast [386].

2.3. Виділення рослинної ДНК та визначення її концентрації

Виділення тотальної геномної ДНК з насіння, проростків або зеленої маси досліджуваних рослин проводили згідно ЦТАБ-методу з певними практичними модифікаціями [79, 296]. Рослинну тканину, вагою приблизно 250 – 300 мкг, клали в 1,5 мл пластикову пробірку типу «Eppendorf» та розтирали з рідким азотом до стану пудри за допомогою спеціального пестика. До розтертої тканини додавали 350 мкл лізуючого біферу з 2х ЦТАБ (1,4 М NaCl, 20 мМ Na₃EDTA, 100 мМ Tris-HCl, 2 % СТАВ, рН 8,0) добре перемішували та ставили до термостату на інкубування протягом 1 год при температурі 65 °С. В період термостатування суміш зрідка перемішували. Після інкубації лізат центрифугували 10 хв при 14 500 об./хв в мікроцентрифугі «Centrifuge 5415» (Eppendorf, Німеччина). Утворений супернатант обережно знімали та переносили в нові мікропробірки, додавали 500 мкл суміші хлороформ:ізопропіловий спирт (24:1) та перемішували до утворення суспензії з подальшим центрифугуванням протягом 10 хв при 14 500 об./хв. Знімали водну верхню фазу та переносили до нових пробірок та додавали 0,2 об'єму 5хЦТАБ (5 %-ний СТАВ, 350 мМ EDTA). Обережно перемішували та ставили до термостату при 65 °С на 10 хв. Додавали рівний об'єм хлороформу та ретельно перемішували. Знов центрифугували протягом 10 хв при 10 000 об./хв. Надосадкову рідину (верхню фазу) знімали та переносили у нові пробірки. Додавали 3 об'єми буферу для преципітації (1 %-ний СТАВ, 50 мМ Tris-HCl, рН 8,0, 10 мМ EDTA), перемішували та залишали на ніч за умов нормальної температури. Після цього центрифугували протягом 10 хв при 16000 об./хв. при 4 °С. Супернатант видаляли, а осад розчиняли у 300 мкл 1,2 М NaCl. Додавали 300 мкл хлороформу та ретельно перемішували до утворення суспензії. Центрифугували протягом 10 хв при 16000 об./хв. при 4 °С. Надосадкову рідину переносили у нові пробірки та додавали 0,6 об'єму охолодженого ізопропонолу (утворювався мутний розчин). Центрифугували протягом 10 хв

при 16000 об./хв. при 4 °С. Обережно зливали супернатант, до осаду додавали 250 мкл 70%-ного етилового спирту. Центрифугували протягом 10 хв при 16000 об./хв. при 4 °С. За допомогою піпетки обережно видаляли спирт, а від залишків спирту позбавлялися за допомогою термостату (сушили ДНК при 65 °С). До осаду додавали 50 мкл бідистильованої води.

Якість та кількість ДНК визначали за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі та спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf». Зразки ДНК зберігали при - 20 °С.

2.4. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в мікропробірках на 200 мкл в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl₂, 50 нг рослинної ДНК, 1мкМ кожного з праймерів, 0,2 мм кожного dNTPs, 0,5 од. Taq полімерази («Fermentas», Литва).

ТВР-аналіз та його модифікації виконували згідно методики [22]. Послідовності праймерів наведені нижче у табл. 2.8. Для SSR-аналізу льону були обрані праймери, запропоновані раніше, оскільки вони мають досить великі значення PIC [263].

Таблиця 2.8

Опис використаних праймерів

Метод	Праймери (5'- 3')		Т, °С	Джерело
	F	R		
ТВР	AACTGGGCBAARGGNCA YTAYAC	ACCATRCAAYTCRTCDGCRTT YTC	55	[36]
сТВР	GARAAYGCHGAYGARTG YATG	CRAAVCCBACCATGAARAAR TG	55	[34]
hТВР	AACTGGGCBAARGGNCA YTAYAC	CRAAVCCBACCATGAARAAR TG	55	[106]

SSR Lu_1	TCATTCATCTCCTTCCAC TAAAA	TTGAAAGCCCTAGTAGACAC CA	58	[263]
SSR Lu_7	CATCCAACAAAGGGTGG TG	GGA ACA AAG GGT AGC CAT GA	58	[263]
SSR Lu_21	AAGGGTGGTGGTGGGAA C	GTTGGGGTGAAGAGGAACA A	58	[263]
SSR Lu_25	TCTACAGAGTTCAATTCC CGTAA	GTTGGACCTTACAAGACTCA CTG	58	[263]

Ампліфікацію проводили за наступним протоколом:

- для *TBP*- та *sTBP*-аналізу: початкова денатурація (94°C) – 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація при 94°C – 30 с, відпал праймерів при 55°C – 40 с, елонгація при 72°C – 1,5 хв), кінцева елонгація при 72°C – 8 хв, утримання при 15°C [22];

- для *hTBP*- аналізу: початкова денатурація (94°C) – 4 хв, а потім 14 циклів (30 с при 94 °C, 45 с при 65 °C (зниження на 0,7 °C в кожному циклі від початкового до кінцевого значення), та 2,5 хв при 72 °C), потім 15 циклів (30 с при 94 °C, 30 с при 55 °C та 2,5 хв при 72 °C), кінцева елонгація при 72 °C – 8 хв, 15 °C – утримання [106];

- для *SSR*-аналізу: початкова денатурація (95°C) – 4 хв, 32 цикли ампліфікації (денатурація при 95°C – 1 хв, відпал праймерів при 58°C – 1 хв, елонгація при 72°C - 1 хв), кінцева елонгація при 72°C – 7 хв, утримання при 15 °C [263].

Поліморфізм ядерних мікросателітних локусів у ранніх та пізніх фенологічних форм *Q. robur* досліджували за допомогою праймерів (табл. 2.9)

Таблиця 2.9

Послідовності праймерів та основні характеристики SSR локусів *Q. robur*

Локус	Послідовність праймерів (5'-3')	Характер повторів	Ta (°C)	Джерело
quru -GA-1C08	F: TCCCAATCGATGTTTGATAAGG	(GA) ₂₉	60	[5]
	R: GGGCTCTTGAGAGGATGTAGG			
quru -GA-0C19	F: TTAGCTTTTACGCAGTGTCG	(GA) ₁₈	60	[6]
	R: CGGCTTCGGTTTCGTC			
MSQ13	F: TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG	(GA) _{14, 11}	50	[78]
	R: ACACTCAGACCCACCATTTTCC			
QPZAG9	F: GCAATTACAGGCTAGGCTGG	(AG) ₁₂	50	[332]
	R: GTCTGGACCTAGCCCTCATG			

ПЛР-аналіз SSR локусів у *Ulmus pumila* та *Ulmus suberosa* проведено із застосуванням локусів UR101, UR138, UR153, UR158, UR173b (табл. 2.10). Послідовності праймерів для проведення полімеразної ланцюгової взято з літературних джерел [390].

Таблиця 2.10

Послідовності праймерів та основні характеристики SSR локусів для дослідження генетичного поліморфізму *Ulmus pumila* та *Ulmus suberosa*

Локус	Послідовність праймерів (5'-3')	Характер повторів	Ta (°C)
UR101	F-GGGAAGTCAAATTTCCCATGA	(TA) ₅ (CA) ₉	60
	R-CTCCAATGGCATCTTCACAA		
UR138	F-CTAGAACCCCTTCGAAACC	(GA) ₈	60
	R-ACAAAAAGCCCACACACCTC		
UR153	F-AGATTTTCATGCCTCCAGTCG	(CTT) ₇	55

	R-CCTTTTCGAAATGCAGAGGTAG		
UR158	F-TTCTTCATAGGCGCTGAGGT	(TGTA) ⁵	55
	R-TGCACCCTGTCAAAGCTAAA		
UR173b	F-CCGTGCAACTTTCCTGCTAC	(TATTT) ³	55
	R-TGACTGCCTTAGCGTCCTTTAT		

Спираючись на дані, отримані в результаті біоінформатичного аналізу генів актину в геномах вищих видів рослин, для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину нами були розроблені чотири пари ПЛР праймерів. Зокрема три пари праймерів є специфічними, що оцінюють поліморфізм довжини II-го інтрону в окремих генах актину геному льону-довгунця. Праймери Lus10016259 F/R та Lus10040826 F/R дають можливість оцінити поліморфізм довжини другого інтрону генів актину Lus10016259 та Lus10040826 льону-довгунця відповідно. Зважаючи на надзвичайно високу консервативність екзонних ділянок генів актину, пара праймерів Lus може бути використана для визначення поліморфізму інших інтронів генів актину Lus10021057 та Lus10029286 одночасно [381]. В табл. 2.9 наведені послідовності специфічних праймерів, використаних в дослідженні.

Для оцінки поліморфізму інтронів генів актину у різних видів вищих рослин, спираючись на результати біоінформатичного аналізу генів актину, синтезовані універсальні виродженні праймери ActIn (табл. 2.11), що можуть бути використані для аналізу поліморфізму інтронів генів актину будь-якого виду вищих рослин [381].

Таблиця 2.11

**Праймери, які можуть бути використані для оцінки поліморфізму
довжини інтронів генів актину**

Назва праймеру	Послідовність 5'--> 3'	Кількість нуклеотидів (п. н.)	Температура відпалу (°C)
ActIn (вироджені, універсальні)	F:TGG CAT CAU ACN TTY TAC AAY GA	23	59
	R:CCM CCA CTT DAG VAC RAT GTT	20	59

Для оцінки поліморфізму інтронів генів, що кодують α - та γ -тубуліни у рослин використовували власноруч розроблені вироджені праймери, що наведені у табл. 2.12 [448, 449].

Таблиця 2.12

**Праймери, які можуть бути використані для оцінки поліморфізму
довжини інтронів генів α - та γ -тубуліну**

Метод	Праймери (5' - 3')	T, °C
α ТВР (I-й інтрон α -тубуліну)	F:TGGGARCTNTAYTGYCTY GA R:TCRCTRAARAANGTRTTRAANGMATC	57
γ ТВР (інтрон γ -тубуліну)	F:GAYGTBTTYTTTTACCARGCKGA R:GAGTTGTARGGYTGGACRAC	59

Ампліфікацію інтронів генів актину, α - та γ -тубуліну проводили за допомогою ПЛР на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Кожна реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль $MgCl_2$, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мм кожного дНТФ (дАТФ, дТТФ, дГТФ та дЦТФ), 0,5 од. Таq полімерази («Thermo Scientific», США).

З праймерами (в тому числі виродженими) для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину використовували наступний протокол ампліфікації: початкова денатурація (95 °С) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 95 °С – 45 с, відпал праймерів (для ActIn – 59 °С, Lus та Lus10016259 – 63 °С, Lus1004082 – 64 °С, α TBP – 55 °С, γ TBP – 57 °С) – 45 с, елонгація 72 °С – 1 хв), кінцеве подовження 72 °С – 7 хв, 10 °С – утримання.

Кожну ПЛР проводили як мінімум у двократній повторності з використанням негативного контролю, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації.

2.5. Електрофорез та візуалізація продуктів ампліфікації

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою методу вертикального неденатуруючого електрофорезу в 6 %-ному поліакриламідному гелі (ПААГ) на пластинках розмірами 200 x 200 x 1 мм. Для виготовлення 6 %-ного ПААГ об'ємом 40 мл використовували: 2,32 г акриламиду та 0,08 г бісакриламиду (тобто 8 мл 30% акриламиду), 4 мл 10 x TBE (0,89 М Tris base, 0,89 М H_3BO_3 , 20 мМ EDTA, рН 8,0), 28 мл бідистильованої H_2O , 400 мкл 10 % персульфату амонію та 20 мкл TEMED [301]. Перед нанесенням на гель до реакційної суміші додавали 10x буфер для нанесення (0,1 % ксилен-ціанол, 0,1 % бромфеноловий синій, 0,5 % лаурилсульфат натрію, 0,1 М EDTA рН 8,0, 50 % гліцерин). До 10 мкл реакційної суміші додавали 2 мкл буфера, тобто 0,2 % (w/v). У лунки гелю наносили по 1–3 мкл реакційної суміші. Електрофорез проводили за постійної напруги 350 В протягом 2–3 год в 1xTBE (89 мМ Tris base, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ EDTA, рН 8,0) буфері в залежності від молекулярної маси фрагментів, що аналізувалися.

Візуалізацію фрагментів здійснювали шляхом фарбування нітратом срібла [29]. Гель з приладу переносили в кювету, додавали 250 мл розчину 10%-ного етанолу та 0,5%-ної оцтової кислоти (10–12 °С), накривали склом

та інкубували похитуючи протягом 3 хв. Зливали перший розчин та проводили експозицію в 250 мл розчину азотнокислого срібла (0,15% AgNO_3 , 0,08% формалін), інкубували на денному світлі похитуючи протягом 3–5 хв. Зливали другий розчин, швидко 1–2 рази рясно промивали бідистильованою водою та додавали 250 мл відновлюючого розчину (1,5% NaOH , 0,08% формалін (перед кожним використанням додавали 1 мл/л формаліну (40%)), інкубували на денному світлі похитуючи до розвитку фарбування (приблизно 3–7 хв, проте швидкість забарвлення напряму залежить від температури третього розчину). Зливали третій розчин та обробляли гелеву пластину 5 % льодяною оцтовою кислотою до зупинки фарбування (приблизно 1 хв). На заключному етапі гелеву пластину промивали бідистильованою водою протягом 2 хв. В подальшому гель фотографували у видимому світлі та аналізували отримані зображення в програмі GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і чітких фрагментів ДНК визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; або O'GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use «Thermo Scientific», США).

2.6. Статистичний аналіз даних

Ампліфікацію фрагментів з інтронами генів, що кодують цитоскелетні білки, проводили як мінімум два рази. Оцінювали тільки відтворювані та чіткі смуги. Смуги реєстрували згідно бінарної системи: присутнім фрагментам присвоювали значення одиниці, відсутнім - нуля.

Коефіцієнт подібності Нея та Лі [245] та стандартну генетичну дистанцію Нея [246] між генотипами визначали за допомогою програми FreeTree [268] на основі наявності/відсутності ампліфікованих фрагментів у проаналізованих зразках. Значення подібності були використані для кластерного аналізу, який проводили за допомогою методу UPGMA з використанням тієї ж програми. Для оцінки достовірності побудованих дерев

було проведено бутстреп (bootstrap) аналіз [140] для 1000 повторностей. Тобто цей аналіз вказує ймовірність відповідного галудження в побудованій дендрограмі. Отримані дендрограми візуалізували за допомогою програми FigTree v1.4.2 [291]. Для оцінки поліморфізму локусів використовували індекс поліморфного інформаційного змісту – PIC (Polymorphism Information Content), який розраховували за двома формулами:

$$PIC = \frac{\sum_{i=1}^n (1 - f_{ai}^2 - f_{bi}^2)}{n}, \quad (1)$$

де n - загальна кількість отриманих поліморфних маркерів, f_a - частота фрагментів, в яких відсутній i -й фрагмент, а f_b - частота фрагментів, в яких присутній i -й фрагмент [36, 142].

Для SSR- та TBP-аналізу у випадку, коли необхідно було порівняти ці два методи, використовували наступну формулу 2:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \quad (2)$$

де p_i - частота присутності i -го алельного фенотипу у вибірці, n – загальна кількість різних алельних фенотипів [9]. Зважаючи на складність визначення частот алелей конкретних локусів, що кодують актин, та α - та γ -тубуліни, при розрахунку PIC замість частот алелей використовували показник частоти алельних фенотипів [186].

РОЗДІЛ 3

БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ЕКЗОН-ІНТРОННОЇ СТРУКТУРИ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ БІЛКИ ЦИТОСКЕЛЕТУ КЛІТИНИ, ТА РОЗРОБЛЕННЯ ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЇХ ІНТРОНІВ

3.1. Аналіз екзон-інтронної структури генів, що кодують білки цитоскелету (β -, α -, γ -тубулінів та актину) у різних видів вищих рослин

Для пошуку гомологічних послідовностей було відібрано декілька видів вищих рослин, геноми яких повністю сіквензовані, але до кінця не анотовані. Об'єктами дослідження насамперед були геном арабідопсіса (*A. thaliana*), оскільки на сьогодні він є розшифрованим та найбільш вивченим, а також геноми рису посівного (*O. sativa*), льону-довгунця (*L. usitatissimum*), картоплі (*S. tuberosum*) та томату (*S. lycopersicum*).

На сьогодні в базі даних GeneBank наявні 9 анотованих послідовностей генів β -тубуліну *A. thaliana*: *tub1*, *tub2*, *tub3*, *tub4*, *tub5*, *tub6*, *tub7*, *tub8*, *tub9*, схематичні зображення яких наведено на рис. 3.1.

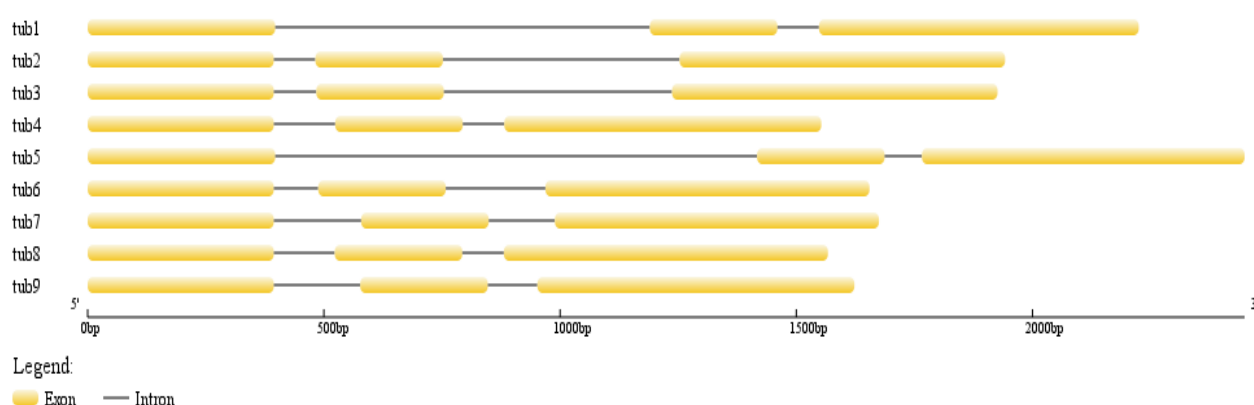


Рис. 3.1. Схематичне зображення генів β -тубуліну *A. thaliana*.

В геномі *O. sativa* знайдено 8 послідовностей гомологів β -тубуліну: LOC_Os03g56810, LOC_Os03g45920, LOC_Os03g01530, LOC_Os01g59150,

LOC_Os01g18050, LOC_Os06g46000, LOC_Os02g07060, LOC_Os05g34170
(рис. 3.2).

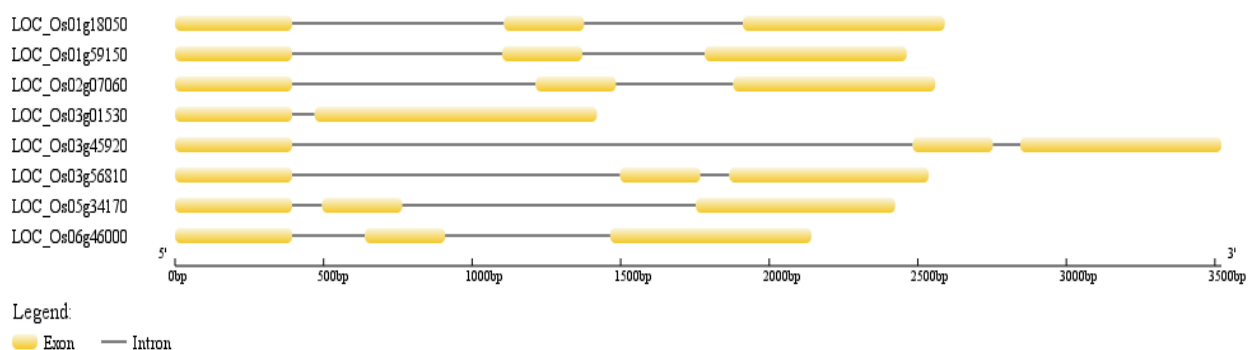


Рис. 3.2. Схематичне зображення генів β -тубуліну *O. sativa*.

В геномі *L. usitatissimum* виявлено 12 гомологічних послідовностей генів β -тубуліну (рис. 3.3.): Lus10017217, Lus10021094, Lus10036069, Lus10016448, Lus10027476, Lus10038458, Lus10039231, Lus10023348, Lus10008528, Lus10035497, Lus10040712, Lus10002000.

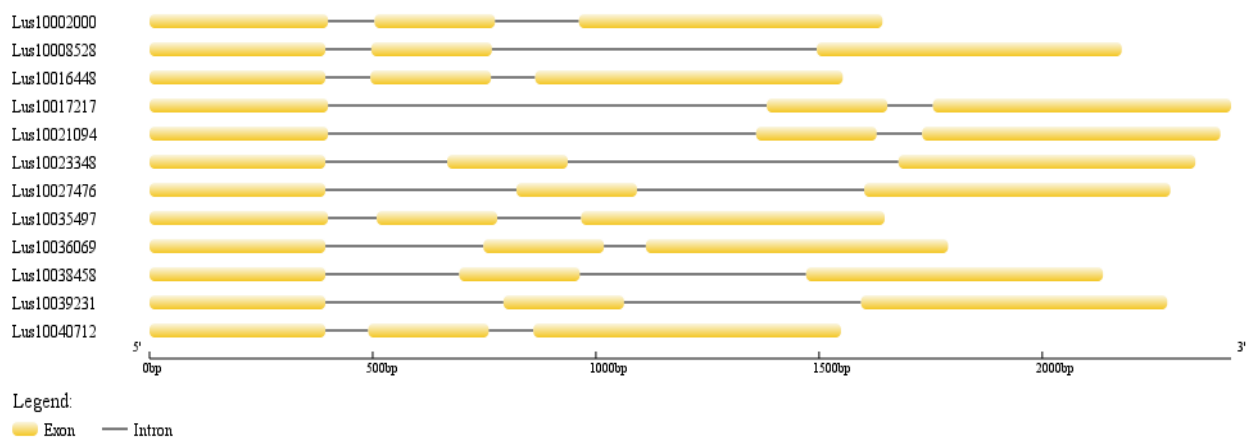


Рис. 3.3. Схематичне зображення генів β -тубуліну *L. usitatissimum*.

В геномі *S. tuberosum* відібрано 8 послідовностей гомологів генів β -тубуліну (рис. 3.4): PGSC0003DMG400011088, PGSC0003DMG400028193, PGSC0003DMG400019131, PGSC0003DMG400029337,

PGSC0003DMG400014296, PGSC0003DMG400029926,
PGSC0003DMG400020850, PGSC0003DMG400030431.

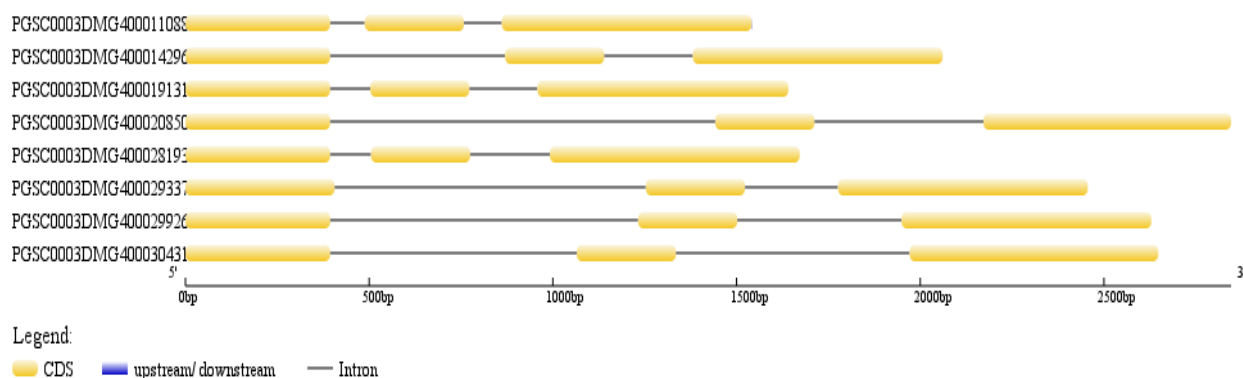


Рис. 3.4. Схематичне зображення генів β -тубуліну *S. tuberosum*.

В геномі *S. lycopersicum* знайдено 10 гомологів генів β -тубуліну (рис. 3.5): Solyc04g081490, Solyc10g085020, Solyc10g080940, Solyc12g089310, Solyc06g035970, Solyc06g005910, Solyc03g025730, Solyc03g118760, Solyc06g076640, Solyc10g086760.

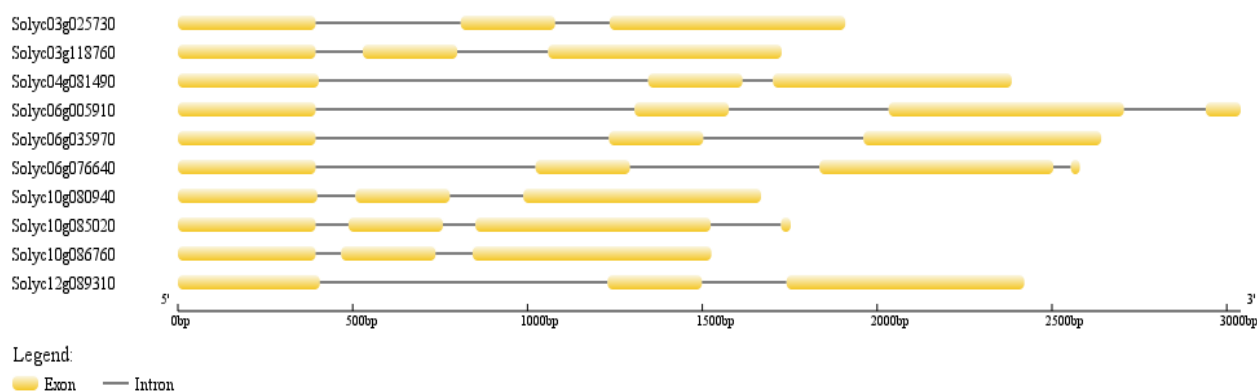


Рис. 3.5. Схематичне зображення генів β -тубуліну *S. lycopersicum*.

Оскільки геном *A. thaliana* в нашому дослідженні вважається модельним, то було проаналізовано анотовані послідовності β -тубуліну цього виду за допомогою бази даних GenBank з метою встановлення довжини та кількості екзонів та інтронів.

Проаналізовані анотовані послідовності генів β -тубуліну *A. thaliana* містять по два інтрони та по три екзони, довжина інтронів варіює в доволі широких межах – від 78 до 1019 п. н., в той же час варіювання розмірів екзонів виявилось доволі обмеженим: перший екзон варіював в межах 393-397 п. н., розмір другого екзону склало – 270 п.н., а розмір третього екзону варіював в межах 671-689 п.н. (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Екзон-інтронна структура генів β -тубуліну *A. thaliana* (п. н.)

Ген	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон
<i>tub 1</i>	397	792	270	87	677
<i>tub 2</i>	394	87	270	500	689
<i>tub 3</i>	394	89	270	482	689
<i>tub 4</i>	393	130	270	88	671
<i>tub 5</i>	397	1019	270	78	683
<i>tub 6</i>	394	93	270	210	686
<i>tub 7</i>	394	184	270	139	686
<i>tub 8</i>	394	128	270	87	686
<i>tub 9</i>	394	82	270	104	671

Для відібраних нами гомологів генів β -тубулінів в геномах *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* також було проведено аналіз екзон-інтронної структури на основі інформації представленої в базі даних Phytozome.

Проаналізовані гомологічні послідовності β -тубуліну *O. sativa* мають по два інтрони та три екзони, окрім гену LOC_Os03g01530, який містить один інтрон та два екзони. Довжини інтронів варіюють в межах від 76 до 2089 п. н. (для екзонів – 270 - 950 п. н.) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Екзон-інтронна структура гомологів генів β -тубуліну *O. sativa* (п. н.)

Локус	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон
LOC_Os03g56810	394	1104	270	98	671
LOC_Os03g45920	394	2089	270	92	677
LOC_Os03g01530	394	76	950	-	-
LOC_Os01g59150	394	707	270	412	680
LOC_Os01g18050	394	713	270	534	680
LOC_Os06g46000	394	245	270	556	677
LOC_Os02g07060	394	820	270	395	680
LOC_Os05g34170	394	101	270	988	671

Всі проаналізовані гомологічні послідовності генів β -тубуліну *L. usitatissimum* мають по два інтрони та три екзони, довжиною від 94 до 983 п. н. (для екзонів – 270 - 689 п. н.) (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Екзон-інтронна структура гомологів генів β -тубуліну *L. usitatissimum* (п. н.)

Локус	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон
Lus10017217	400	983	270	102	668
Lus10021094	400	959	270	102	668
Lus10036069	394	354	270	94	677
Lus10016448	394	101	270	99	689
Lus10027476	394	428	270	509	686
Lus10038458	394	300	270	506	665
Lus10039231	394	599	270	531	686
Lus10023348	394	273	270	741	665

Продовження табл. 3.3

Lus10008528	394	103	270	728	683
Lus10035497	400	109	270	188	680
Lus10040712	394	96	270	100	689
Lus10002000	394	104	270	188	680

Всі гомологи генів β -тубуліну у *S. tuberosum* мають по два інтрони та три екзони, довжиною від 94 до 1048 п. н. (для екзонів – 270 - 683 п. н.) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Екзон-інтронна структура гомологів генів β -тубуліну *S. tuberosum*
(п. н.)

Локус	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон
PGSC0003DMG400011088	394	94	270	103	680
PGSC0003DMG400028193	394	111	270	217	680
PGSC0003DMG400019131	394	109	270	185	683
PGSC0003DMG400029337	406	847	270	253	680
PGSC0003DMG400014296	394	476	270	241	680
PGSC0003DMG400029926	394	838	270	447	680
PGSC0003DMG400020850	394	1048	270	460	674
PGSC0003DMG400030431	394	671	270	636	677

В геномі *S. lycopersicum* проаналізовані гомологи генів β -тубуліну в переважній більшості мають по три інтрони та чотири екзони, окрім генів Solyc10g085020, Solyc06g005910 та Solyc06g076640, які містять по три інтрони та чотири екзони. Довжини інтронів варіюють від 50 до 1630 п. н., а екзонів – 26 - 683 п. н. (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Екзон-інтронна структура гомологів генів β -тубуліну *S. lycopersicum* (п. н.)

Локус	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон	Третій інтрон	Четвертий екзон
Solyc04g081490	403	942	270	87	683	-	-
Solyc10g085020	394	94	270	93	673	201	28
Solyc12g089310	406	823	270	242	680	-	
Solyc10g080940	400	109	270	210	680	-	
Solyc06g035970	394	839	270	458	680	-	
Solyc06g005910	394	912	270	457	673	234	100
Solyc03g025730	394	415	270	156	674	-	
Solyc03g118760	394	135	270	260	668	-	
Solyc06g076640	394	629	270	542	669	50	26
Solyc10g086760	394	73	270	106	683	-	

Загалом проведений екзон-інтронний аналіз відібраних гомологів генів β -тубуліну продемонстрував консервативність кількісного складу екзонів генів, оскільки перший екзон в переважній більшості генів містив 394 п. н., другий – 270 п. н., третій – близько 680 п. н. Одночасно жодної консервативності в складі інтронів генів β -тубуліну виявлено не було.

Надалі проводився відбір та екзон-інтронний аналіз гомологів генів α -тубуліну у різних видів рослин. Оскільки геном *A. thaliana* є модельним в цьому дослідженні, було проаналізовано анотовані послідовності α -тубуліну *A. thaliana* (*tua1*, *tua2*, *tua3*, *tua4*, *tua5*, *tua6*) за допомогою бази даних GenBank (рис. 3.6).

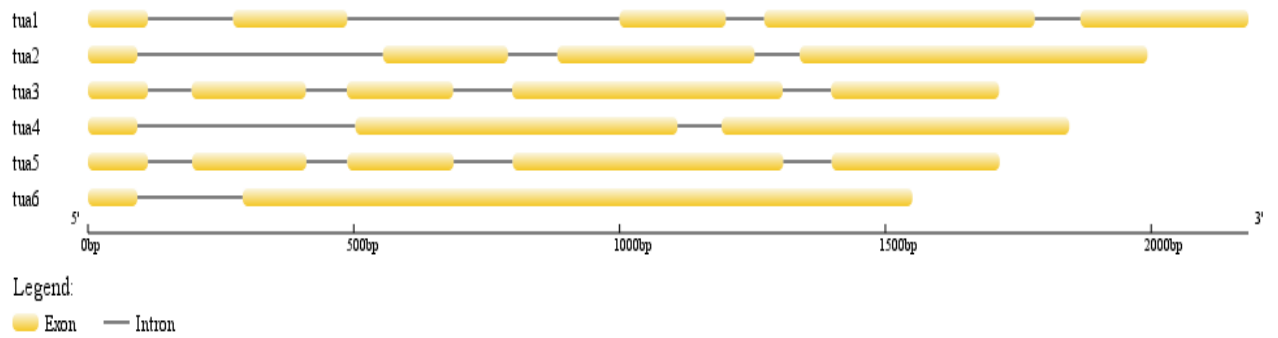


Рис. 3.6. Схематичне зображення генів α -тубуліну *A. thaliana*.

З використанням бази даних Phytozome v 9.1 в геномі *O. sativa* виявлено 4 послідовності гомологів генів α -тубуліну (рис. 3.7), серед яких LOC_Os07g38730, LOC_Os11g14220, LOC_Os03g11970 та LOC_Os03g51600.

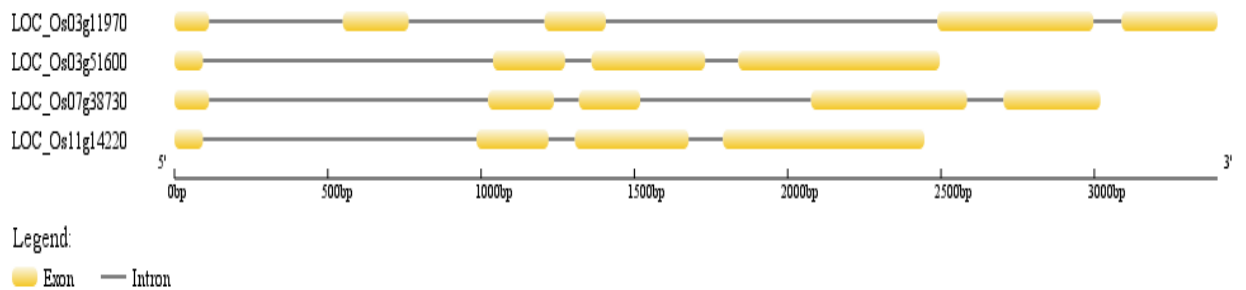


Рис. 3.7. Схематичне зображення генів α -тубуліну *O. sativa*.

В геномі *L. usitatissimum* закодвано 4 гомологи генів α -тубуліну (рис. 3.8): Lus10005705, Lus10020281, Lus10013765, Lus10035422.

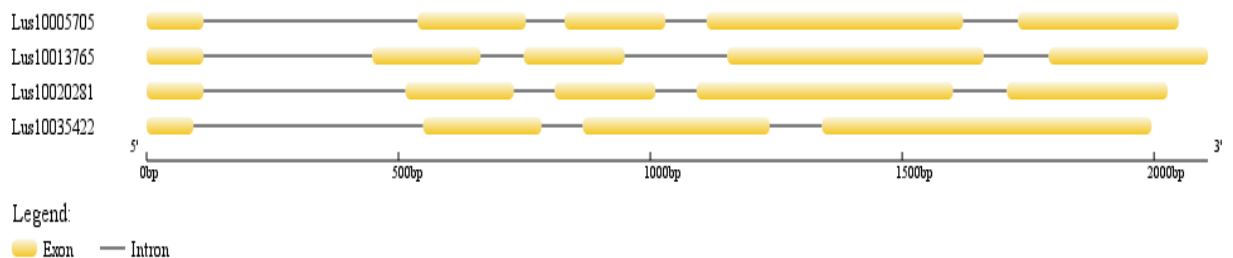


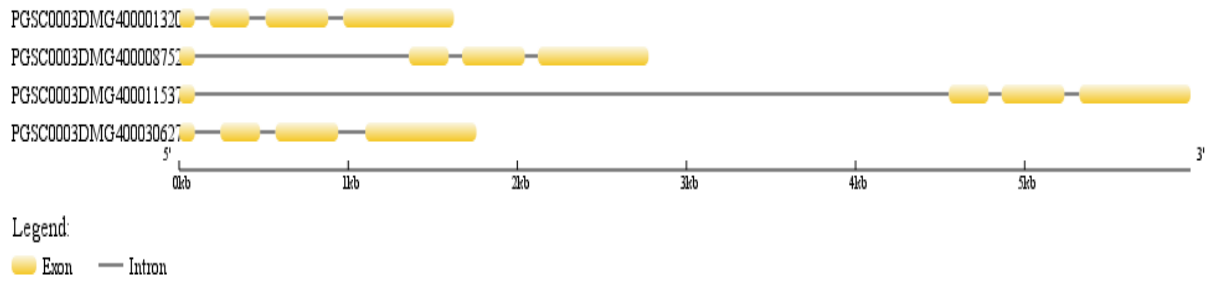
Рис. 3.8. Схематичне зображення генів α -тубуліну *L. usitatissimum*.

В результаті біоінформатичного пошуку виявлено 4 гомологи генів α -тубуліну *S. tuberosum*, серед яких PGSC0003DMG400011537,

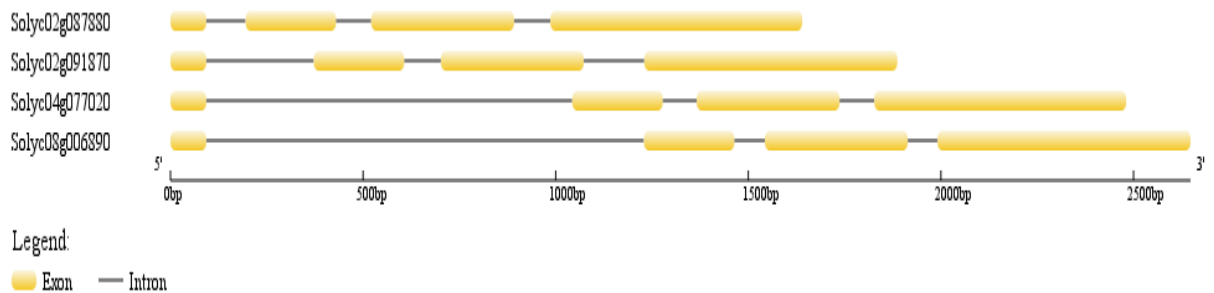
PGSC0003DMG400030627,

PGSC0003DMG400001320,

PGSC0003DMG400008752 (рис. 3.9).

Рис. 3.9. Схематичне зображення генів α -тубуліну *S. tuberosum*.

В геномі *S. lycopersicum* встановлено 4 послідовності гомологів генів α -тубуліну, а саме Solyc08g006890, Solyc04g077020, Solyc02g087880 та Solyc02g091870 (рис. 3.10).

Рис. 3.10. Схематичне зображення генів α -тубуліну *S. lycopersicum*.

В результаті проведеного аналізу екзон-інтронної структури генів α -тубуліну встановлено, що гени *tuba1* та *tuba5* *A. thaliana* містять в своєму складі по п'ять екзонів та чотири інтрони, гени *tuba2* та *tuba3* – по чотири екзони та три інтрони. Однак *tuba4* та *tuba 6* мають в своєму складі лише три екзони та два інтрони, і два екзони та один інтрон відповідно. Довжини екзонів варіюють в межах 86 - 1259 п. н., а інтронів — 77 - 654 п. н. (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Екзон-інтронна структура гомологів генів α -тубуліну *A. thaliana* (п. н.)

Ген	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон	Третій інтрон	Четвертий екзон	Четвертий інтрон	П'ятий екзон
<i>tuba1</i>	113	160	215	512	200	72	509	86	316
<i>tuba2</i>	93	462	235	93	371	85	654	-	-
<i>tuba3</i>	212	82	215	77	200	111	497	-	-
<i>tuba4</i>	93	409	606	83	654	-	-	-	-
<i>tuba5</i>	113	83	215	77	200	111	509	91	316
<i>tuba6</i>	93	198	1259	-	-	-	-	-	-

Проаналізовані гомологи генів α -тубуліну в геномі *O. sativa* містять по п'ять екзонів і чотири інтрони (LOC_Os07g38730, LOC_Os03g11970), та по чотири екзони та три інтрони (LOC_Os11g14220, LOC_Os03g51600) (табл. 3.7). Довжини екзонів становлять від 93 п. н. до 657 п. н., а інтронів — 81 - 1081 п. н.

Таблиця 3.7

Екзон-інтронна структура гомологів генів α -тубуліну *O. sativa* (п. н.)

Локус	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон	Третій інтрон	Четвертий екзон	Четвертий інтрон	П'ятий екзон
LOC_Os07g38730	113	910	215	81	200	557	509	119	316
LOC_Os11g14220	93	892	235	86	371	112	657	-	-
LOC_Os03g11970	113	436	215	443	200	1081	509	92	313
LOC_Os03g51600	93	946	235	86	371	108	657	-	-

Відібрані нами гомологи генів актину в геномі *L. usitatissimum* містили в переважній більшості п'ять екзонів та чотири інтрони, окрім гомологічної послідовності в локусі Lus10035422, що складається з чотирьох екзонів та трьох інтронів. Довжини екзонів коливаються в межах від 93 до 654 п. н., інтронів — від 77 до 456 п. н. (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Екзон-інтронна структура гомологів генів актину *L. usitatissimum* (п. н.)

Локус	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон	Третій інтрон	Четвертий екзон	Четвертий інтрон	П'ятий екзон
Lus10005705	114	452	215	77	200	82	509	109	319
Lus10020281	113	401	215	81	200	82	509	107	319
Lus10013765	113	335	215	86	200	204	509	129	316
Lus10035422	93	456	235	82	371	104	654	-	-

Гомологи генів α -тубуліну в геномі *S. tuberosum* містять по чотири екзони та три інтрони. Кількість нуклеотидів екзонних ділянок генів складає від 93 до 657 п. н. Довжини інтронів складають 77 – 4459 п. н. (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Екзон-інтронна структура гомологів генів α -тубуліну *S. tuberosum* (п. н.)

Локус	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон	Третій інтрон	Четвертий екзон
PGSC0003DM G400011537	93	4459	235	77	371	89	657
PGSC0003DM G400030627	93	151	235	91	371	160	657
PGSC0003DM G400001320	93	87	235	96	371	89	654
PGSC0003DM G400008752	93	1266	235	79	371	78	654

Всі відібрані гомологи генів α -тубуліну в геномі *S. lycopersicum* мають переважно по чотири екзони та три інтрони. Довжини кодуєчих ділянок генів корелюють від 93 до 657 п. н., довжини інтронів – 77 - 1136 п. н. (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

**Екзон-інтронна структура гомологів генів α -тубуліну *S. lycopersicum*
(п. н.)**

Локус	Перший екзон	Перший інтрон	Другий екзон	Другий інтрон	Третій екзон	Третій інтрон	Четвертий екзон
Solyc08g006890	93	1136	235	79	371	77	657
Solyc04g077020	93	950	235	88	371	90	655
Solyc02g087880	93	102	235	91	371	94	654
Solyc02g091870	94	279	235	95	371	157	657

В результаті проведеного екзон-інтронного аналізу анотованих послідовностей генів α -тубуліну *A. thaliana* та відібраних нами гомологів даних генів в геномах чотирьох видів вищих рослин, було встановлено, що послідовності мають відносно схожу екзон-інтронну структуру. Кількість інтронів складає переважно 3 - 4, а екзонів – 4 - 5. Окрім того за даними, представленими в таблицях, очевидно, в кількісному складі екзонів спостерігається певна системність, що вказує на їх певну консервативність. В той же час, інтрони мають різну кількість нуклеотидів, яка варіює в широких межах, та жодної системності не спостерігається.

Відомо, що крім α - та β -тубуліну до складу мікротрубочок входить γ -тубулін, який є критично необхідним для їх нуклеації. До того ж його амінокислотна послідовність є високонсервативною серед філогенетично різних організмів [260, 285].

Зважаючи на обмежену кількість даних щодо складу та кількості генів γ -тубуліну в геномах вищих видів рослин було проаналізовано послідовності генів γ -тубулінів таких видів, як *Zea mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *A. thaliana* (AT3G61650), *L. usitatissimum* (Lus10010986, Lus10007851), для яких екзон-інтронна структура гена γ -тубуліну є доступною в базі даних Phytozome.v12.

Всього було проаналізовано 7 послідовностей (4 для кукурудзи, 2 для льону, 1 для арабідопсису) (рис. 3.11).

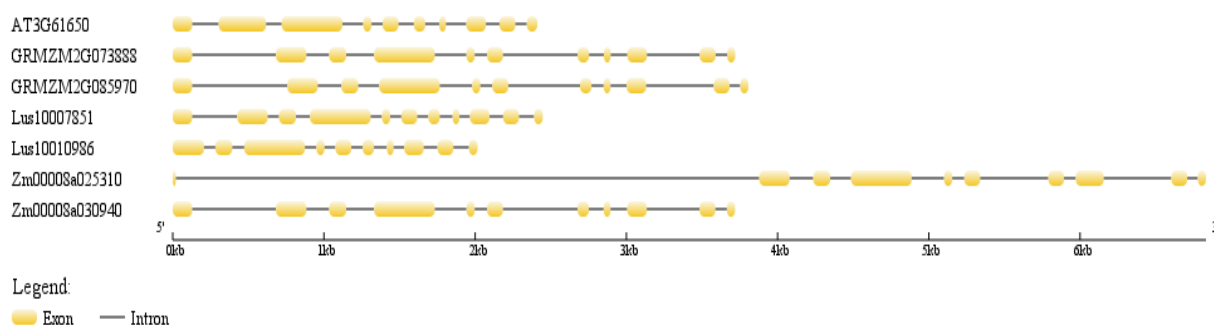


Рис. 3.11. Схематичне зображення генів γ -тубуліну рослин.

В цілому гени γ -тубулінів склалися з 10 - 11 екзонів (по 10 екзонів у арабідопсису та льону і 11 - у кукурудзи) та 9 – 10 інтронів.

В подальшому був проведений біоінформатичний пошук та аналіз екзон інтронної структури генів актину вищих видів рослин.

На сьогодні в базі даних GeneBank наявні 8 анотованих генів актину *A. thaliana* (рис. 3.12), а саме *act1*, *act2*, *act3*, *act4*, *act7*, *act8*, *act11* та *act12*, які були вилучені та проаналізовані на даному етапі роботи.

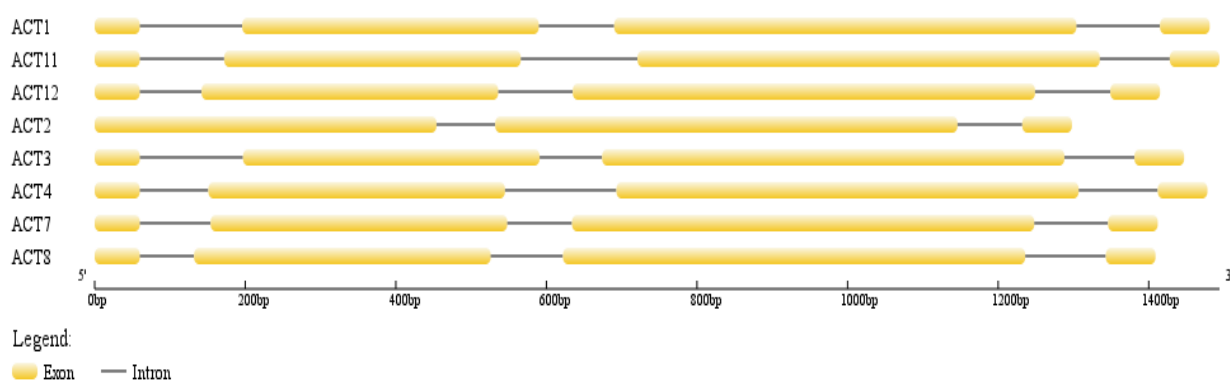


Рис. 3.12. Схематичне зображення генів актину *A. thaliana*.

В результаті пошуку в базі даних Phytozome v 9.1 було виділено та проаналізовано в геномі *O. sativa* 9 нуклеотидних послідовностей, що

гіпотетично є гомологами генів актину: LOC_Os03g61970, LOC_Os03g50885, LOC_Os11g06390, LOC_Os01g73310, LOC_Os05g36290, LOC_Os05g01600, LOC_Os10g36650, LOC_Os12g06660, LOC_Os01g64630 (рис. 3.13).

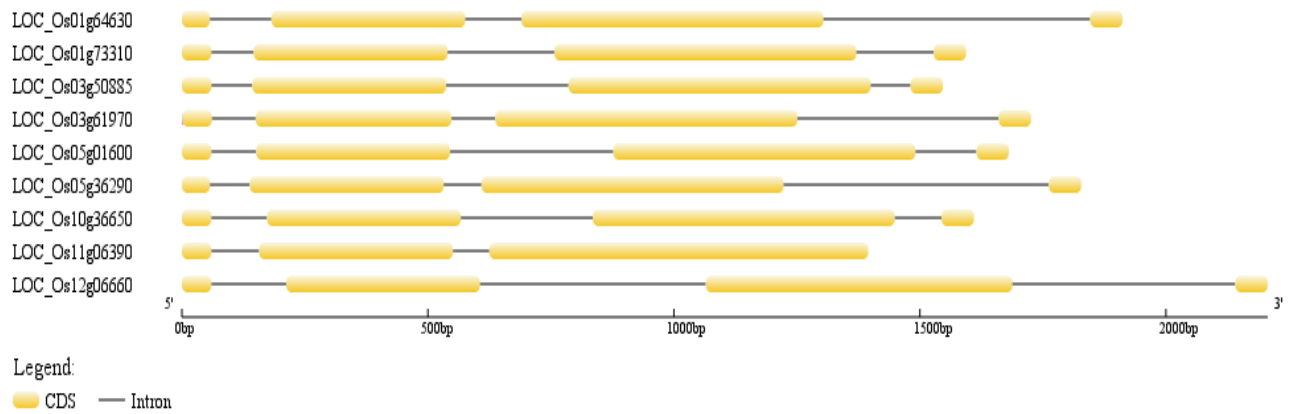


Рис. 3.13. Схематичне зображення генів актину *O. sativa*.

В геномі *L. usitatissimum* виявлено 15 нуклеотидних послідовностей, що є гомологами генів актину (рис. 3.14): Lus10005163, Lus10006783, Lus10006784, Lus10005819, Lus10005820, Lus10029286, Lus10004169, Lus10021057, Lus10016259, Lus10016558, Lus10005457, Lus10001694, Lus10040826 Lus10004956, Lus10001693.

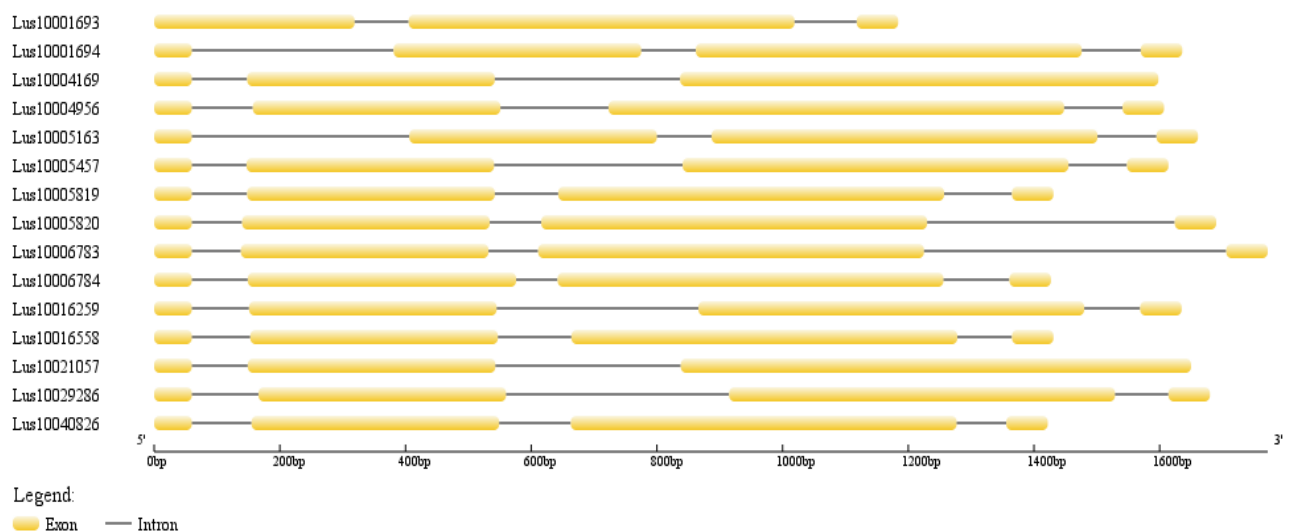


Рис. 3.14. Схематичне зображення генів актину *L. usitatissimum*.

В геномі *S. tuberosum* відібрано 11 послідовностей, що кодують гомологи генів актину (рис. 3.15): PGSC0003DMG400003985, PGSC0003DMG400000439, PGSC0003DMG400018449, PGSC0003DMG400027746, PGSC0003DMG400023708, PGSC0003DMG400019204, PGSC0003DMG400008912, PGSC0003DMG400036865, PGSC0003DMG400029121, PGSC0003DMG400008619, PGSC0003DMG400008618.

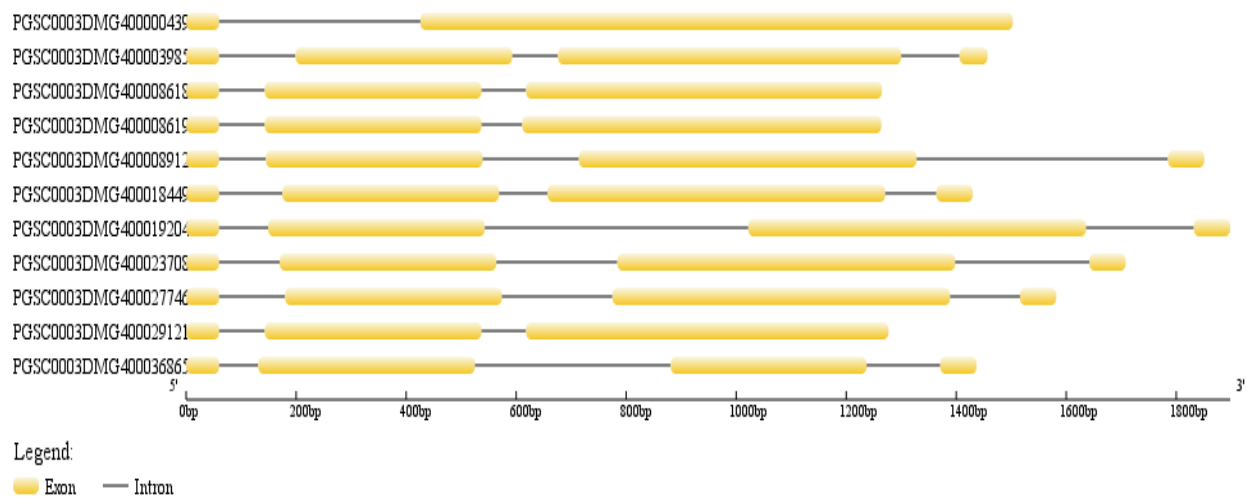


Рис. 3.15. Схематичне зображення генів актину *S. tuberosum*.

В геномі *S. lycopersicum* знайдено 11 гомологів генів, що кодують актин (рис. 3.16): Solyc00g017210, Solyc01g104770, Solyc03g078400, Solyc04g011500, Solyc04g071260, Solyc05g054480, Solyc06g076090, Solyc10g080500, Solyc10g086460, Solyc11g005330, Solyc11g065990.

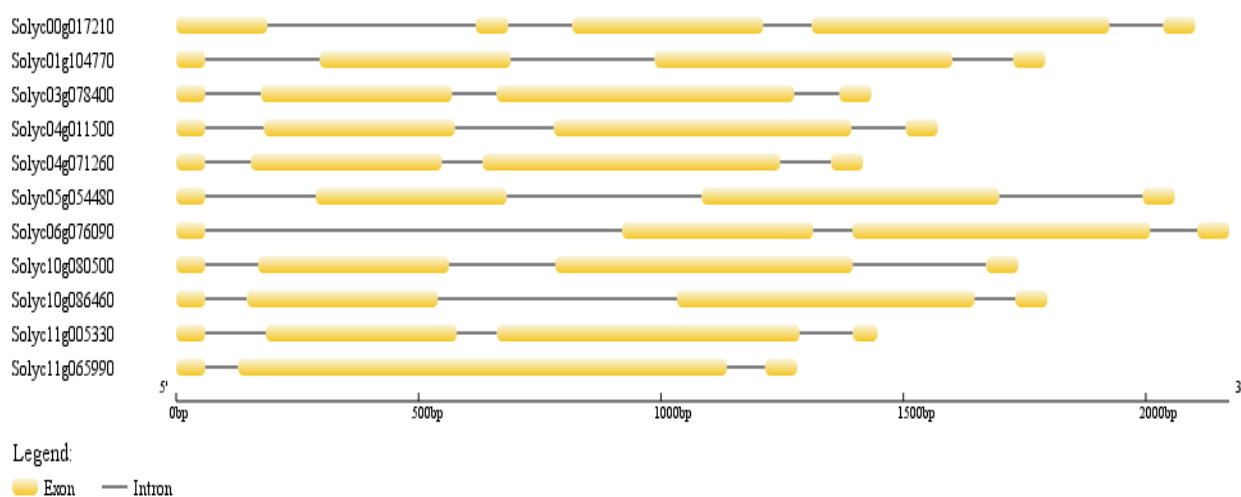


Рис. 3.16. Схематичне зображення генів актину *S. lycopersicum*.

Встановлено, що всі послідовності генів актину *A. thaliana* переважно мають по три інтрони (чотири екзони), окрім *act2* (два інтрони та три екзони). Довжини інтронів коливаються від 72 до 155 п. н. (екзонів – 60 - 614 п. н.) (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Екзон-інтронна структура генів актину *A. thaliana* (п. н.)

Ген	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й Інтрон	IV-й екзон
<i>act 1</i>	60	136	394	100	614	111	66
<i>act 2</i>	454	-	-	78	614	86	66
<i>act 3</i>	60	138	394	83	614	93	66
<i>act 4</i>	60	91	394	148	614	105	66
<i>act 7</i>	60	94	394	86	614	98	66
<i>act 8</i>	60	72	394	96	614	107	66
<i>act 11</i>	60	112	394	155	614	93	66
<i>act 12</i>	60	82	394	99	614	100	66

Для відібраних нами гомологів генів актину в геномах *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* також було проведено аналіз екзон - інтронної структури на основі інформації, представленої в базі даних Phytozome v 9.1.

Проаналізовані гомологи генів актину в геномі *O. sativa* містять переважно по три інтрони, окрім LOC_Os11g06390, що містять по два інтрони, довжини яких від 74 до 539 п. н. (табл. 3.12). Довжини екзонів становлять 57 – 770 п. н.

Таблиця 3.12

Екзон-інтронна структура гомологів генів актину у *O. sativa* (п. н.)

Локус	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й інтрон	IV-й екзон
LOC_Os03g61970	60	89	394	93	614	409	66
LOC_Os03g50885	60	83	394	249	614	81	66
LOC_Os11g06390	60	97	394	74	770	-	-
LOC_Os01g73310	60	86	394	217	614	157	65
LOC_Os05g36290	57	81	394	77	614	539	66
LOC_Os05g01600	60	91	394	332	614	124	66
LOC_Os10g36650	60	113	394	268	614	95	66
LOC_Os12g06660	60	152	394	459	623	453	66
LOC_Os01g64630	57	125	394	114	614	542	66

Відібрані гомологи генів актину в геномі *L. usitatissimum* містили в переважній більшості по три інтрони та чотири екзони, окрім Lus10004169 та Lus10021057 (по три інтрони та чотири екзони) (табл. 3.13). Довжини інтронів складають від 66 до 481 п. н., екзонів - 60 - 812 п. н.

Таблиця 3.13

Екзон-інтронна структура гомологів генів актину *L. usitatissimum* (п. н.)

Локус	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й інтрон	IV-й екзон
Lus10005163	60	346	394	87	614	94	66
Lus10006783	60	78	394	79	614	481	66
Lus10006784	60	89	427	66	614	105	66
Lus10005819	60	88	394	101	614	108	66
Lus10005820	60	80	394	82	614	394	66
Lus10029286	60	106	394	355	614	85	66
Lus10021057	60	89	394	295	812	-	-
Lus10005457	60	87	394	300	614	93	66
Lus10004956	60	106	394	355	614	85	66
Lus10004169	60	88	394	295	761	-	-
Lus10016259	60	91	394	321	614	89	66
Lus10001694	60	321	394	87	614	94	66
Lus10040826	60	95	394	114	614	79	66
Lus10004956	60	97	394	172	725	93	66
Lus10001693	319	-	-	86	614	99	66

Проаналізовані гомологи генів актину в геномі *S. tuberosum* містять переважно по три інтрони та чотири екзони, окрім PGSC0003DMG400029121, PGSC0003DMG400008619, PGSC0003DMG400008618, що мають по два інтрони та три екзони, та PGSC0003DMG400000439 - лише один інтрон та два екзона. Кількість нуклеотидів некодуючих ділянок генів складає від 71 до 479 п. н. Довжини екзонів складають 60 – 1077 п. н. (табл. 3.14).

Таблиця 3.14

Інтронна структура гомологів генів актину *S. tuberosum* (п. н.)

Локус	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й Інтрон	IV-й екзон
PGSC0003DMG 400003985	60	139	394	83	614	101	66
PGSC0003DMG 400000439	60	366	1077	-	-	-	-
PGSC0003DMG 400018449	60	115	394	88	614	93	66
PGSC0003DMG 400027746	60	120	394	201	614	127	66
PGSC0003DMG 400023708	60	110	395	220	614	244	66
PGSC0003DMG 400019204	60	89	394	479	614	196	66
PGSC0003DMG 400008912	60	85	394	175	614	457	66
PGSC0003DMG 400036865	9	71	394	356	356	134	66
PGSC0003DMG 400029121	60	83	394	81	659	-	-
PGSC0003DMG 400008619	60	83	394	74	659	-	-
PGSC0003DMG 400008618	60	83	394	81	647	-	-

Гомологи генів актину в геномі *S. lycopersicum* мають переважно по три інтрони, окрім Solyc00g017210, Solyc01g104770 та Solyc11g065990, що мають по чотири та два інтрони відповідно. Довжини інтронів – від 68 до 860 п. н., а довжини екзонів – 60 - 1008 п. н. (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Екзон-інтронна структура гомологів генів актину *S. lycopersicum* (п. н.)

Локус	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й інтрон	IV-й екзон	IV-й інтрон	V-й екзон
Solyc00g 017210	188	433	64	132	394	100	614	111	64
Solyc01g 104770	60	236	394	297	614	126	66	-	-
Solyc03g 078400	60	115	394	92	614	93	66	-	-
Solyc04g 011500	60	121	394	204	614	112	66	-	-
Solyc04g 071260	60	94	394	84	614	105	66	-	-
Solyc05g 054480	60	228	394	402	614	275	66	-	-
Solyc06g 076090	60	860	394	81	614	97	66	-	-
Solyc10g 080500	60	109	394	219	614	296	66	-	-
Solyc10g 086460	60	86	394	493	614	84	66	-	-
Solyc11g 005330	60	125	394	83	614	105	66	-	-
Solyc11g 065990	60	68	1008	-	-	79	66	-	-

За результатами проведеного аналізу екзон-інтронної структури анотованих послідовностей генів актину, α -, β - та γ -тубуліну *A. thaliana* та відібраних гомологів цих генів в геномах інших видів вищих рослин було встановлено, що послідовності мають схожу екзон-інтронну структуру. Кількість інтронів для генів актину складає переважно 3-4, для генів β -

тубуліну - переважно по 2 інтрони, α -тубуліну – 3-4, а для γ -тубуліну – 9-10. Окрім того за даними, представленими в геномних базах даних, інтрони мають різну кількість нуклеотидів і варіюють в доволі широких межах. Отже, отриманні дані вказують на те, що в геномах рослинних організмів саме за рахунок складу та довжин інтронів підвищується варіабельність нуклеотидних послідовностей генів як в межах одного виду, так і при міжвидовому порівнянні.

3.2. Пошук консенсусних послідовностей генів, що кодують білки цитоскелету клітини, та розроблення олігонуклеотидних праймерів для дослідження поліморфізму інтронів генів, що кодують білки цитоскелету клітини

На наступному етапі роботи був проведений біоінформатичний аналіз, в результаті якого встановлений ступінь ідентичності кодуючих ділянок (екзонів) відібраних гомологів генів β -тубуліну та їх трансльованих амінокислотних послідовностей, які складають в середньому 78% та 93% (табл. 3.16, 3.17).

Таблиця 3.16

Ступінь ідентичності кодуючих ділянок гомологів генів β -тубуліну (%)

Вид рослин	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	78	81	79	79
<i>O. sativa</i>	78	100	78	76	76
<i>L. usitatissimum</i>	81	78	100	72	76
<i>S. tuberosum</i>	79	76	72	100	82
<i>S. lycopersicum</i>	79	6	76	82	100
В середньому	78				

Таблиця 3.17

**Ступінь ідентичності трансльованих амінокислотних послідовностей
гомологів генів β -тубуліну (%)**

Вид рослин	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	91	90	89	90
<i>O. sativa</i>	91	100	94	93	94
<i>L. usitatissimum</i>	90	94	100	91	92
<i>S. tuberosum</i>	89	93	91	100	95
<i>S. lycopersicum</i>	90	94	92	95	100
В середньому	93				

Встановлено, що відсоток ідентичності екзонів та трансльованих амінокислотних послідовностей гомологів даних генів цитоскелету у п'ятьох видів вищих рослин виявився достатньо високим. Це є свідченням того, що саме екзони є найбільш консервативними ділянками досліджених генів.

Для пошуку консенсусних послідовностей гомологів генів β -тубуліну у арабідопсіса (*A. thaliana*) було використано наступні анотовані сіквенси: *tub 1*, *tub 2*, *tub 3*, *tub 4*, *tub 5*, *tub 6*, *tub 7*, *tub 8* та *tub 9*, що взяті з бази даних GeneBank. В подальшому було здійснено вирівнювання і пошук консенсусних послідовностей за допомогою програм CLUSTAL X 2.0 та UGENE. Враховуючи те, що всі гени β -тубуліну у *A. thaliana* містять по 2 інтрони, то мінімальна кількість праймерів для оцінки поліморфізму інтронів може сягати 4: одна пара праймерів для виявлення поліморфізму довжин I-го інтрону (рис. 3.17), друга – II-го інтрону (рис.3.18).

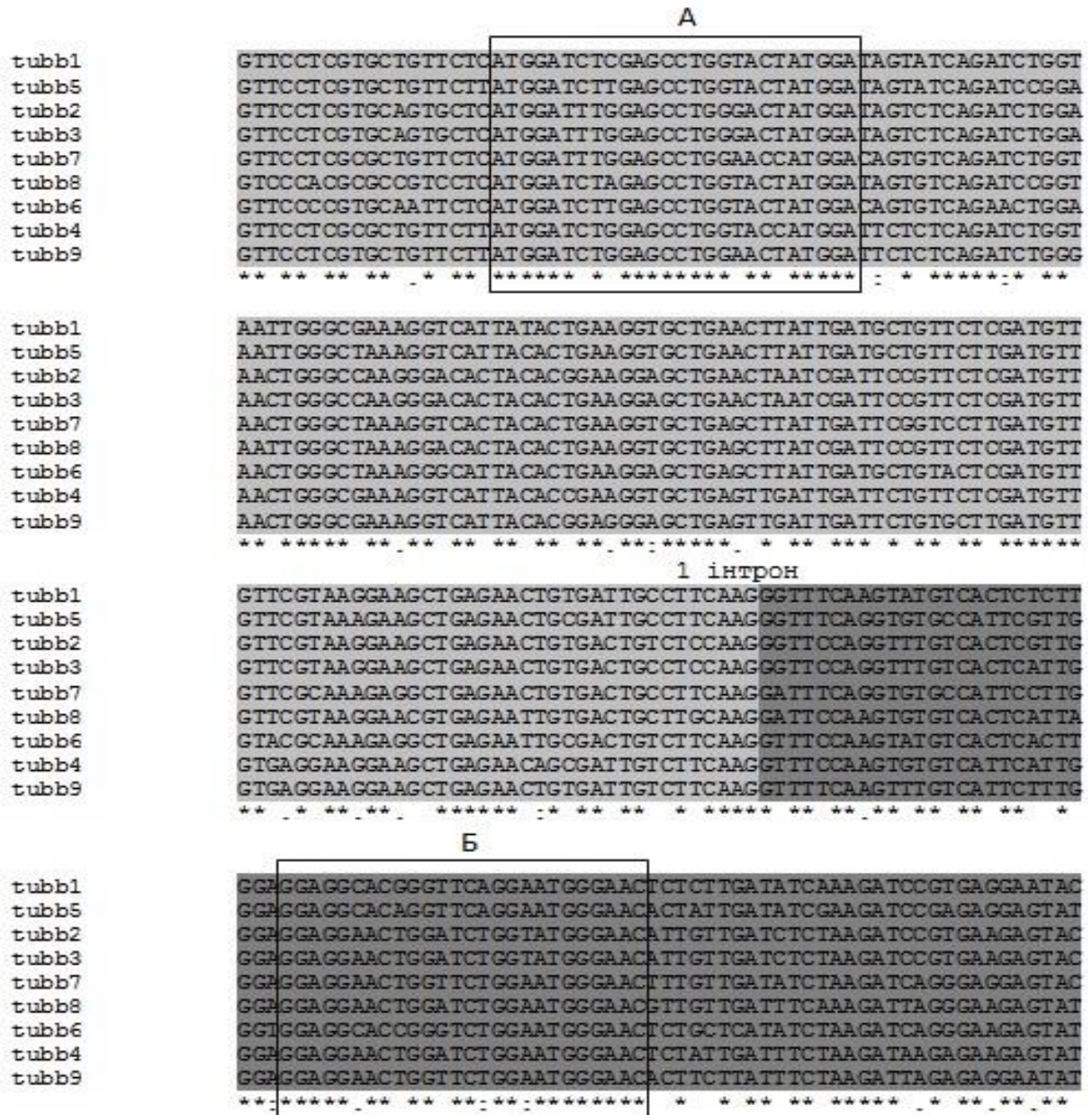


Рис. 3.17. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів β -тубуліну *A. thaliana*, що оточують I-ий інтрон.

A – розташування форвардного праймеру;

Б – розташування реверсного праймеру.

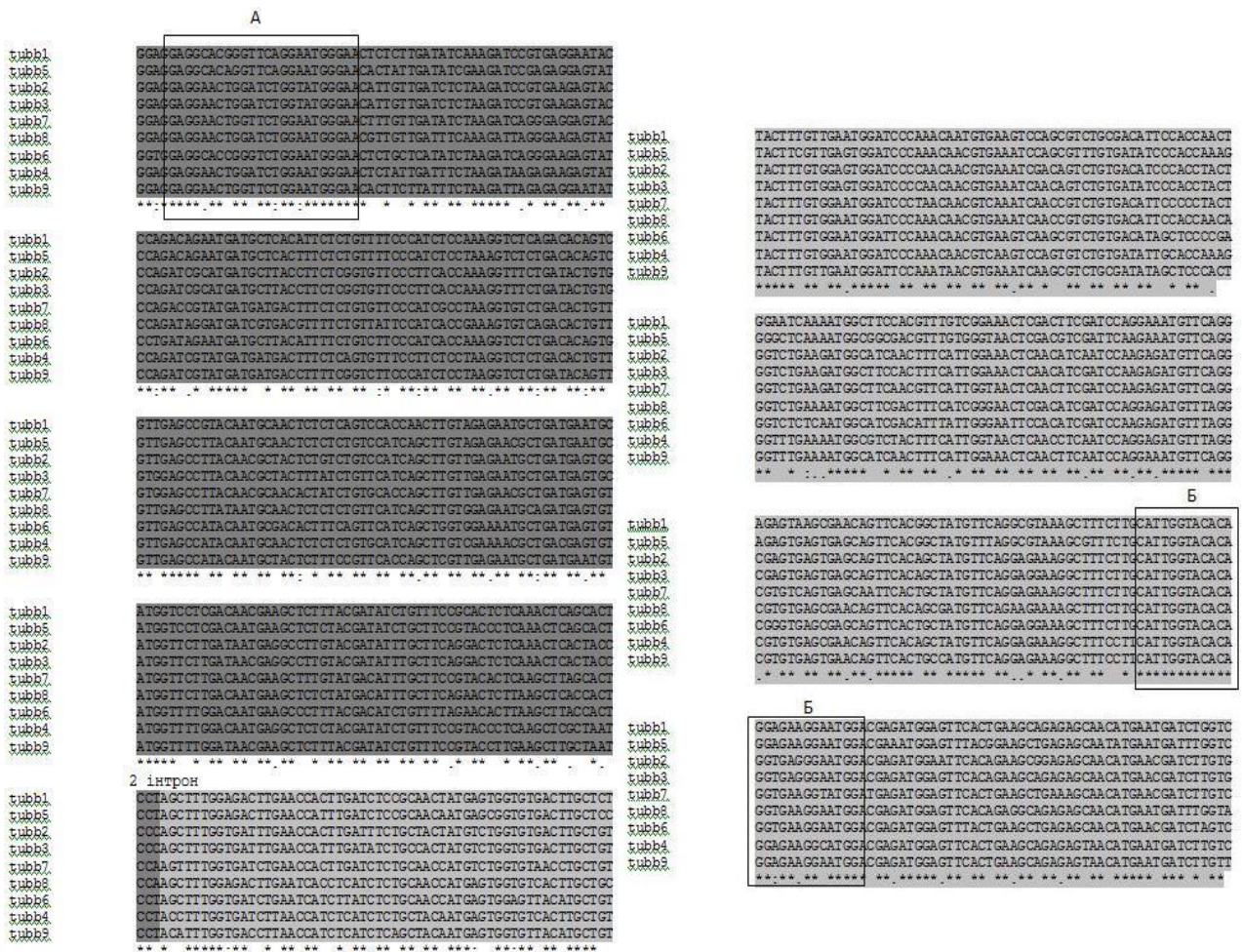


Рис. 3.18. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів β -тубуліну *A. thaliana*, що оточують II-ий інтрон.

- А – розташування форвардного праймеру;
- Б – розташування реверсного праймеру.

Пошук консенсусних послідовностей гомологів генів β -тубуліну у геномі рису посівного (*O. sativa*) було здійснено для наступних послідовностей: LOC_Os03g56810, LOC_Os03g45920, LOC_Os03g01530, LOC_Os01g59150, LOC_Os01g18050, LOC_Os06g46000, LOC_Os02g07060, LOC_Os05g34170, що містяться в базі даних Phytozome v 9.1. Враховуючи те, що гени β -тубуліну *O. sativa* містять переважно 2 інтрони, то можуть бути підбрані консенсусні послідовності для підбору двох пар праймерів для визначення поліморфізму 1-го (рис. 3.19) та 2-го (рис. 3.20) інтронів генів β -тубуліну.

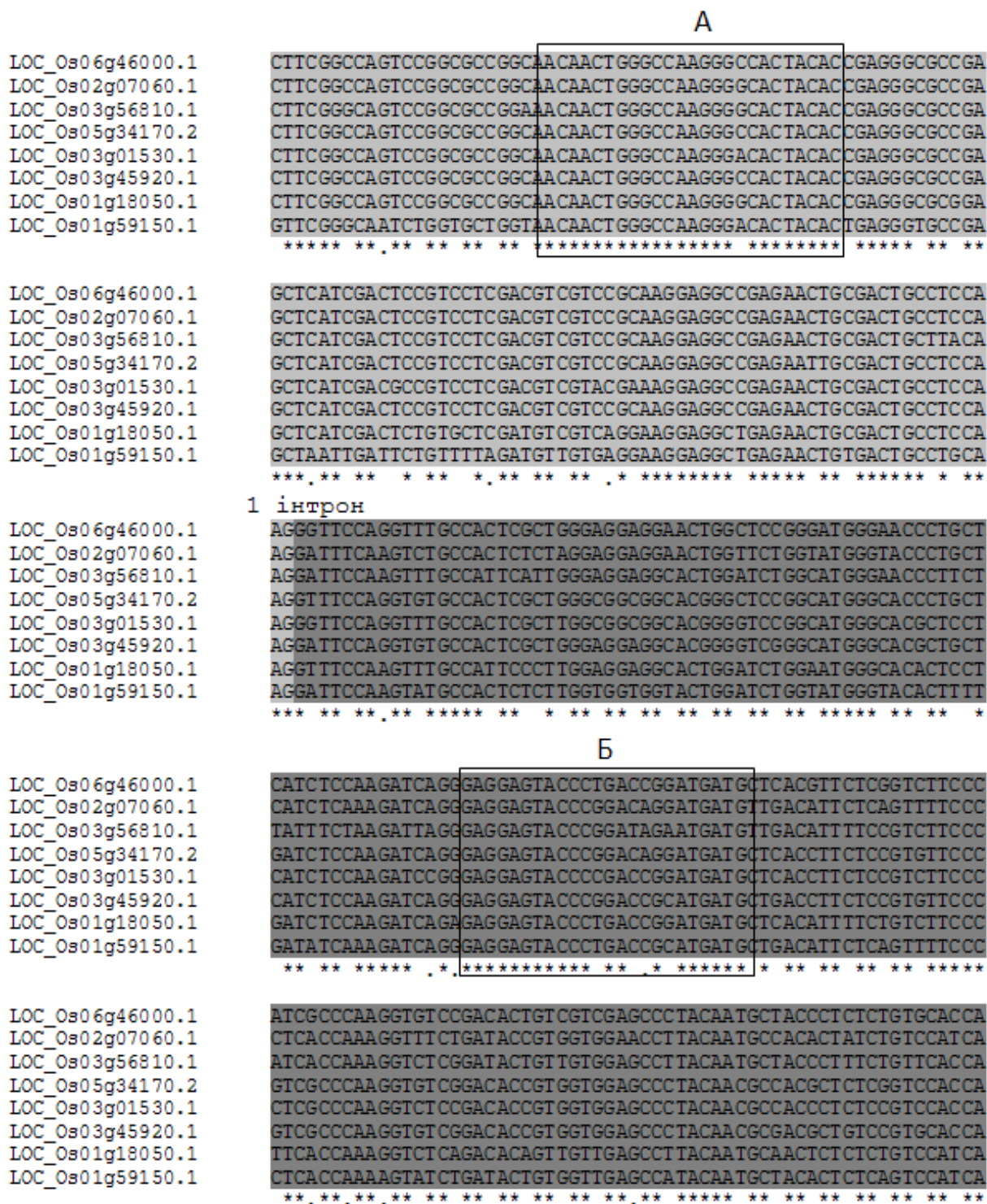


Рис. 3.19. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів β -тубуліну *O. sativa*, що оточують I-ий інтрон.

A – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

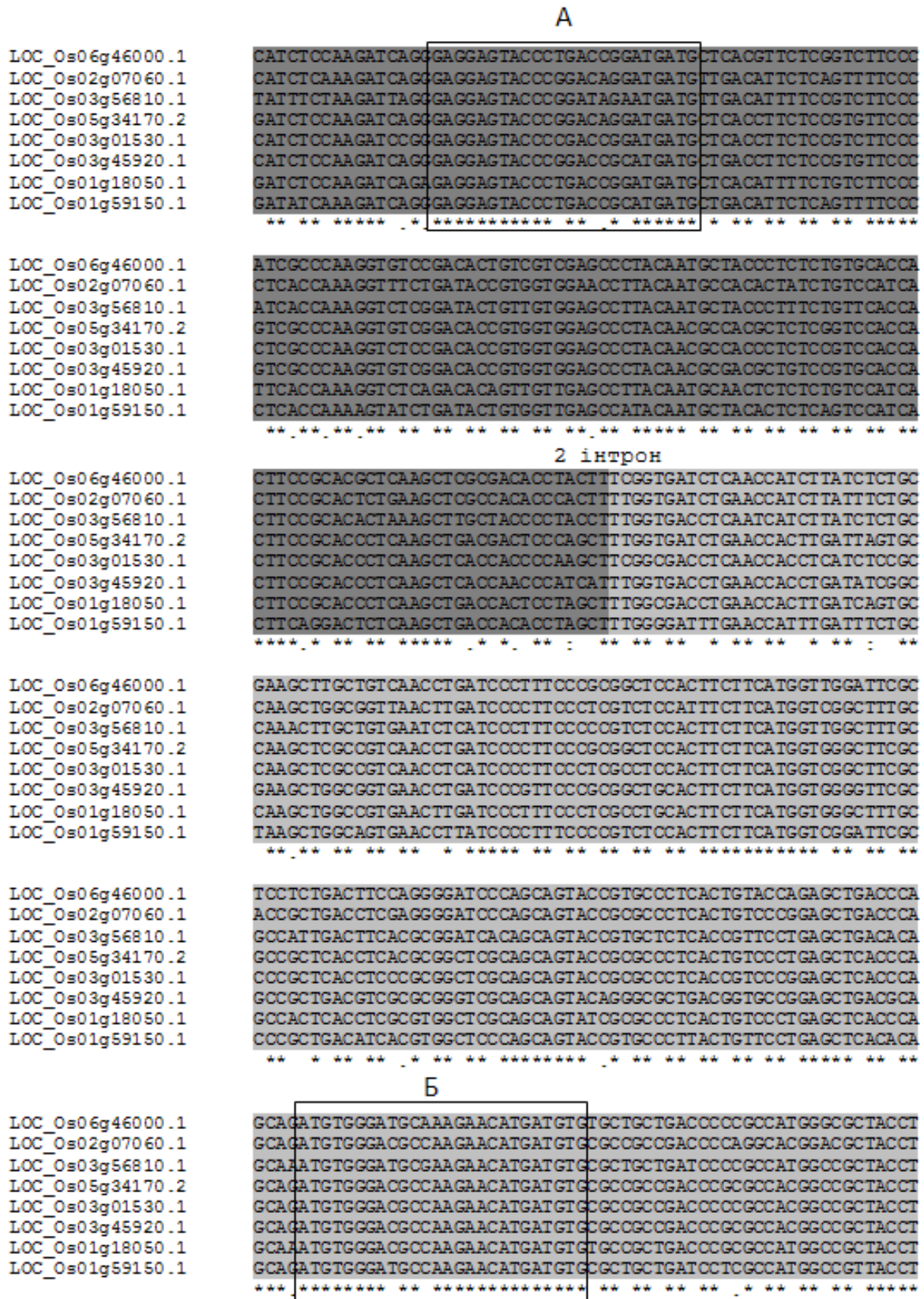


Рис. 3.20. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів β-тубуліну *O. sativa*, що оточують II-ий інтрон.

A – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

З метою більш однозначно дати відповідь щодо поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну саме у *D. antarctica*, на підставі аналізу частини кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (HM208297) (рис. 3.21), були розроблені та синтезовані специфічні праймери для виявлення поліморфізму довжин другого інтрона β -тубуліну у цього виду:

cTBPdesch F: 5'-GAGAATGCTGATGAGTGCATG-3' та

cTBPdesch R: 5'-CAAAGCCAACCATGAAGAAATG-3'.

```
>HM208297 TUB mRNA Deschampsia antarctica beta-tubulin, partial cds
GAACTGGCTCTGGCATGGGTACCCTGCTCATCTCAAAGATCAGGGAGGAGTACCCAGACAGGATGATGTT
GACATTCTCAGTCTTCCCATCCCCAAAGGTGTCTGACACTGTGGTGGAACTTACAATGCAACACTCTCT
GTCCATCAACTTGTTGAGAATGCTGATGAGTGCATGGTCCTTGACAATGAGGCTCTCTACGACATCTGCT
TCCGCACCCCTGAAGCTTGCTACACCCACTTTTGGTGATCTGAACCATCTTATTTCTGCAACAATGAGTGG
TGTTACTTGCTGCCTGCGCTTCCCTGGGCAGCTGAACTCTGACCTCCGGAAACTTGACAGTCAACCTGATC
CCTTCCACGCTTCATTTCTTCATGGTTGGCTTTGCCACCACTGACCTCAAGGGGTTCTCAGCAGTACC
GTGCCCTCACTGTTCTGAGTTGACTCAGCAGATGTGGGATTCAAAGAACATGATGTGTGCTGCTGACCC
TAGGCACGGTCGCTACCTCACAGCCTCTGCTATGTTCCGTGGGAAGATGAGCACCAAGGAGTTGATGAA
CAGATGCTGAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCGTACTTTGTTGAGTGGATTCCCAACAACGTGAAGTCGA
GTGTGTGTGACATCCCTCCCACTGGCCTTTCAATGTCAATCCACCTTTGTTCGGCAACTCAACCTCAATCCA
GGAGATGTTCCGTCGTGTGAGTGAGCAGTTCACAGCTATGTTTCAGGAGGAAGGCTTTCTTGCACCTGGTAC
ACCGGGGAGGGCATGGATGAGATGGAGTTCAGGCTGAGAGCAACATGAACGATCTGGTGGCCGAGT
ACCAGCAGTACCAGGATGCCACAGCTGATGAGGAGGAAGAGTACGATGAGGAGGAGGAGCAGGAGGCTGA
TGCCTAA
```

■ -exon2 ■ - exon 3 □ -pair of primers

Рис. 3.21. Послідовність кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (HM208297).

Для пошуку консенсуєсних послідовностей гомологів генів β -тубуліну у льону-довгунця (*L. usitatissimum*) було використано наступні послідовності: Lus10017217, Lus10021094, Lus10036069, Lus10016448, Lus10027476, Lus10038458, Lus10039231, Lus10023348, Lus10040712, Lus10026813, що наведено в базі даних Phytozome v 9.1. В подальшому множинне

вирівнювання зазначених послідовностей дало можливість обрати найбільш зручні ділянки екзонів з максимально консервативними сіквенсами для майбутнього дизайну праймерів. Враховуючи те, що гени бета-тубуліну у *L. usitatissimum* містять по 2 інтрони, то можливо розробити дві пари праймерів для оцінки поліморфізму довжин I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну в геномі льону (рис.3.22, 3.23).

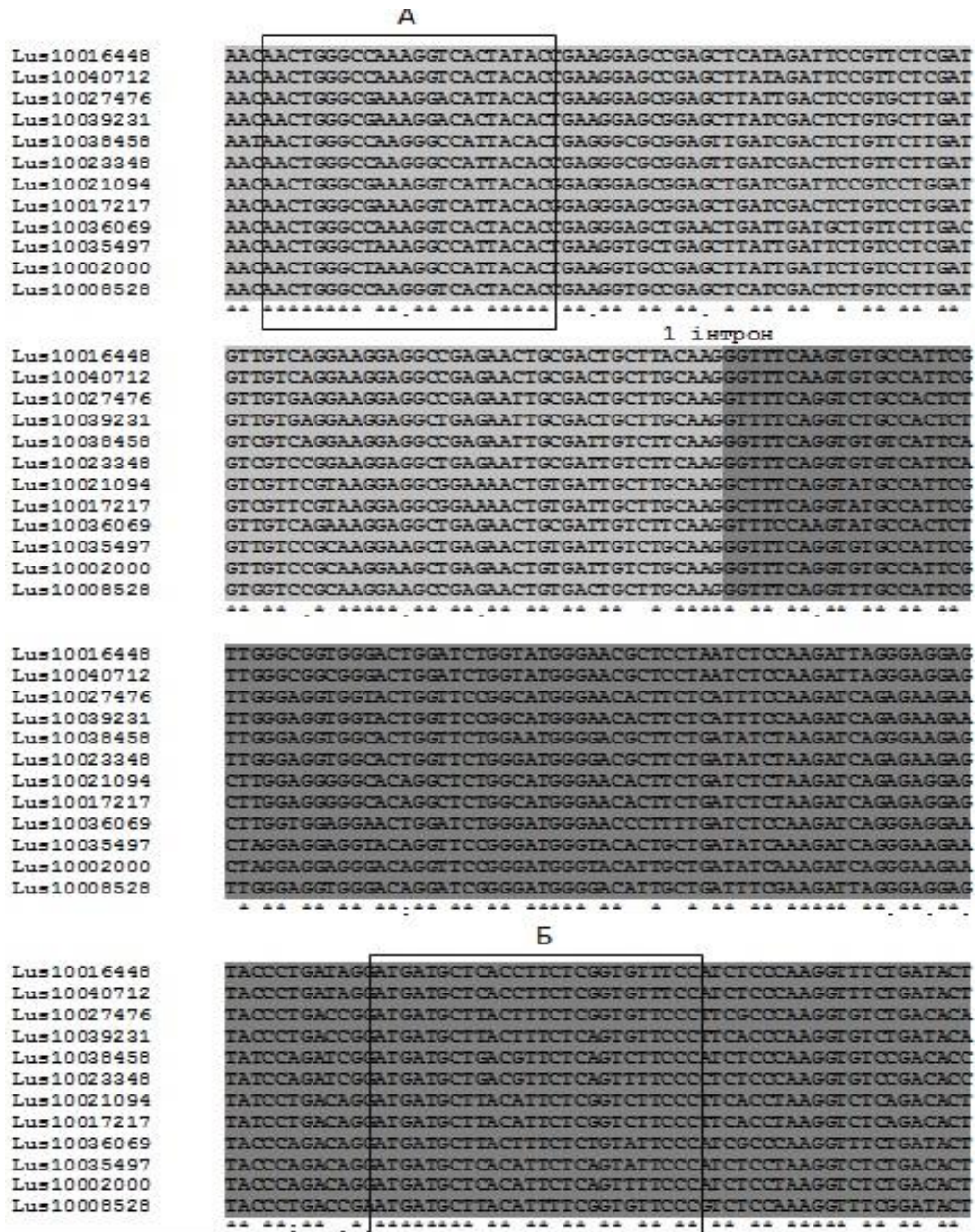


Рис. 3.22. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів β -тубуліну *L. usitatissimum*, що оточують I-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

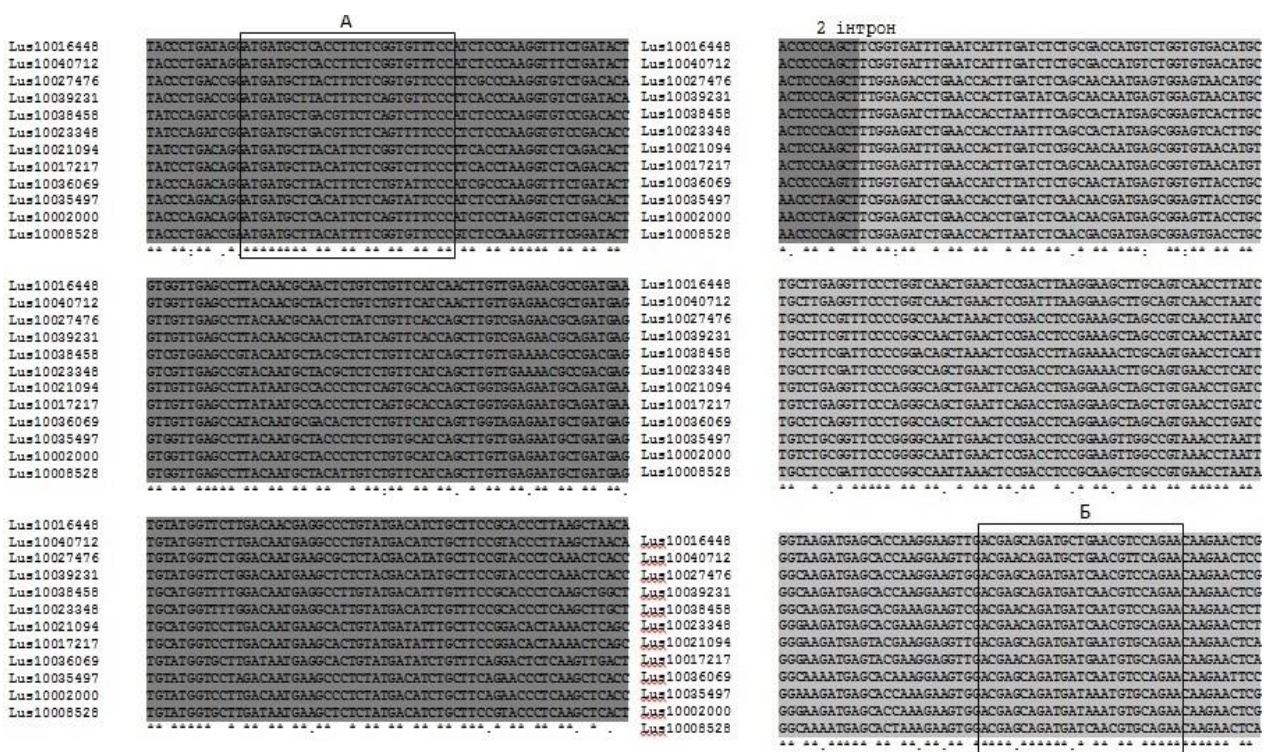


Рис. 3.23. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів β -тубуліну *L. usitatissimum*, що оточують II-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

Для пошуку консервусних послідовностей гомологів генів в-тубуліну у геномі картоплі (*S. tuberosum*) було використано наступні послідовності: PGSC0003DMG400011088, PGSC0003DMG400028193, PGSC0003DMG400019131, PGSC0003DMG400029337, PGSC0003DMG400014296, PGSC0003DMG400029926, PGSC0003DMG400020850, PGSC0003DMG400030431, які представлені в базі даних Phytozome v9.1. У якості послідовностей для майбутнього дизайну праймерів для генів β -тубуліну у геномі *S. tuberosum* можуть бути використані ділянки екзонів з максимально консервативними сіквенсами. Враховуючи те, що гени β -тубуліну у *S. tuberosum* містять по 2 інтрони, можливо оцінити поліморфізм довжин як I-го так і II-го інтронів за допомогою двох пар праймерів (рис. 3.24, 3.25).

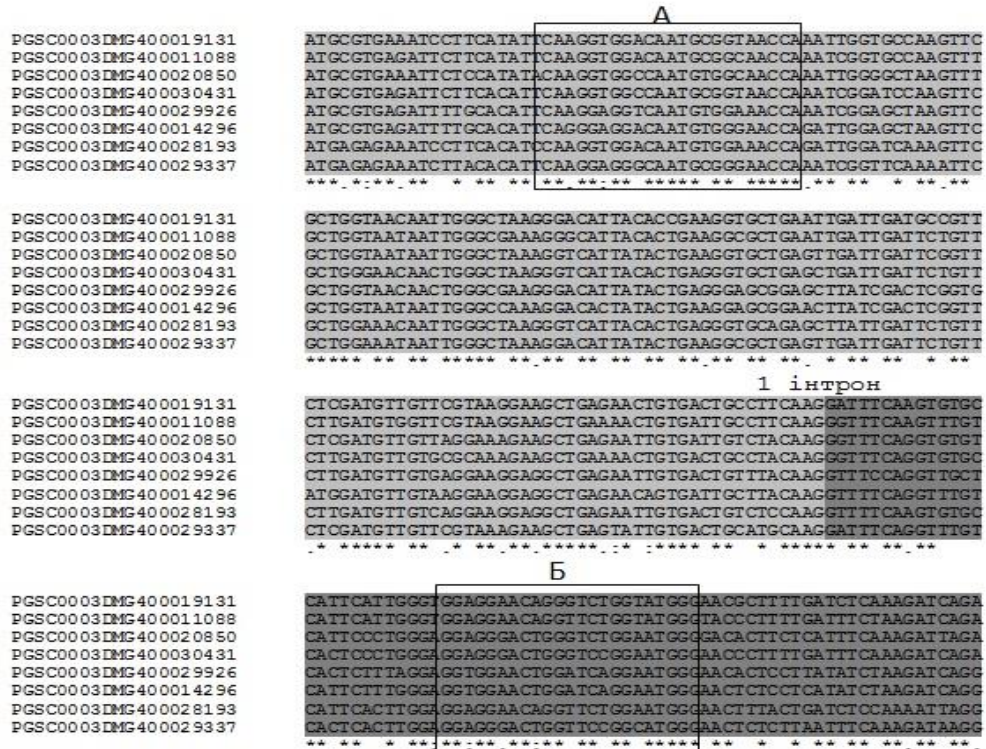


Рис. 3.24. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів β-тубуліну *S. tuberosum*, що оточують I-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;
 Б – можливе розташування реверсного праймеру.

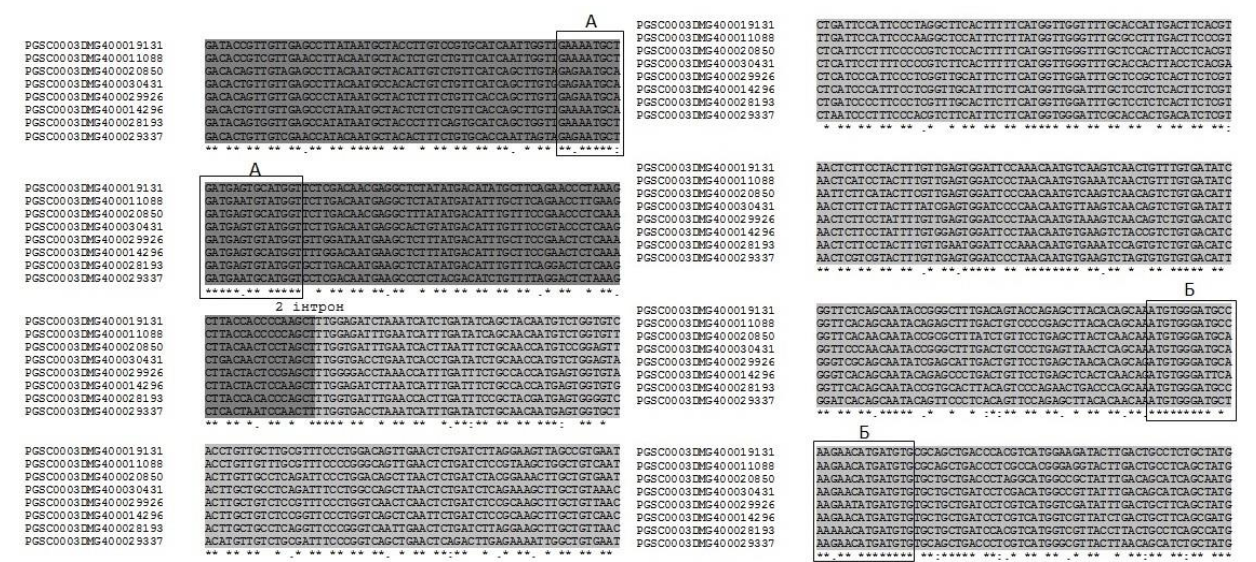


Рис. 3.25. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів β-тубуліну *S. tuberosum*, що оточують II-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;
 Б – можливе розташування реверсного праймеру.

Для пошуку консенсусних послідовностей гомологів генів β -тубуліну в геномі томату (*S. lycopersicum*) було використано наступні послідовності: Solyc04g081490, Solyc10g085020, Solyc12g089310, Solyc10g080940, Solyc06g035970, Solyc06g005910, Solyc03g025730, Solyc03g118760, Solyc06g076640, Solyc10g086760. Враховуючи те, що гени β -тубуліну у *S. lycopersicum* містять по 2 інтрони, можливо побудувати дві пари праймерів для виявлення поліморфізму 1 та 2 інтронів (рис. 3.26, 3.27).

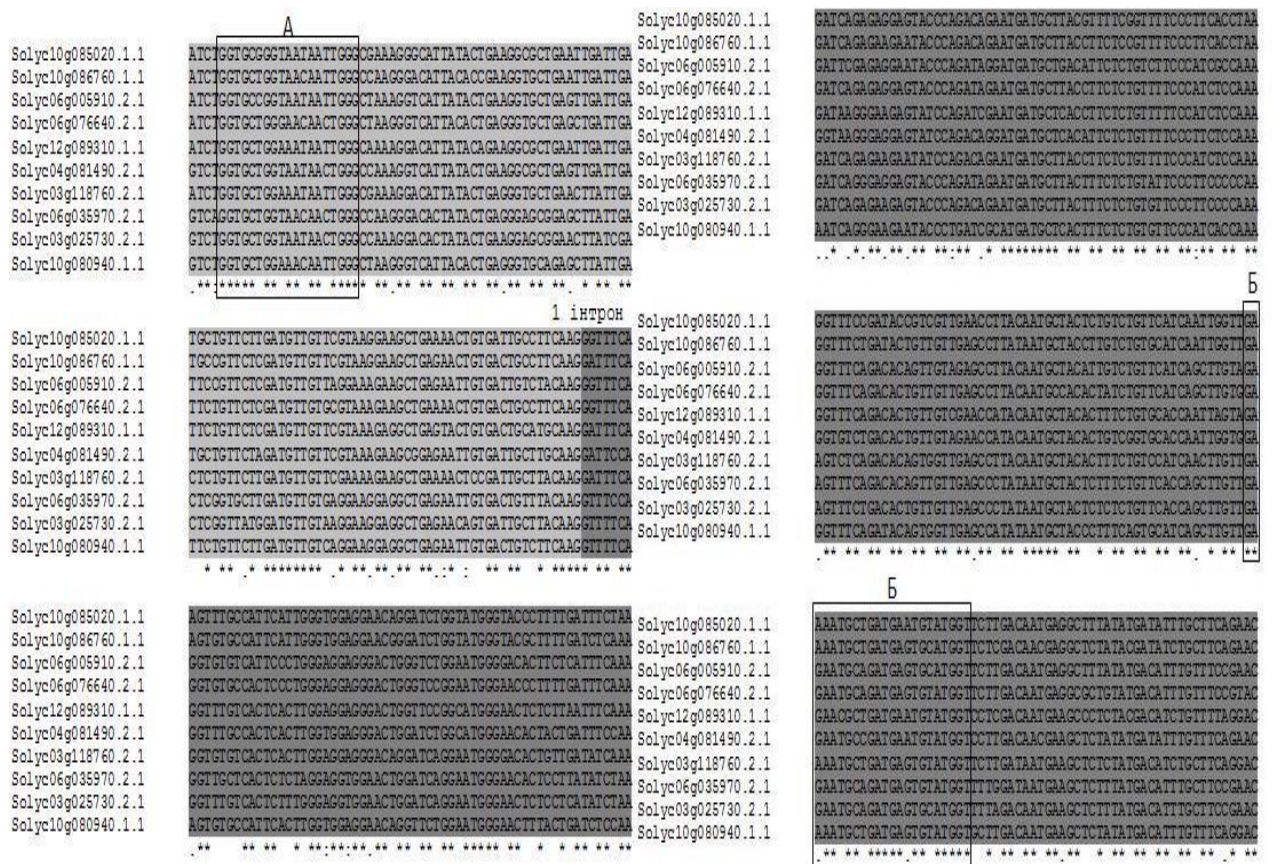


Рис. 3.26. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів β -тубуліну *S. lycopersicum*, що оточують I-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

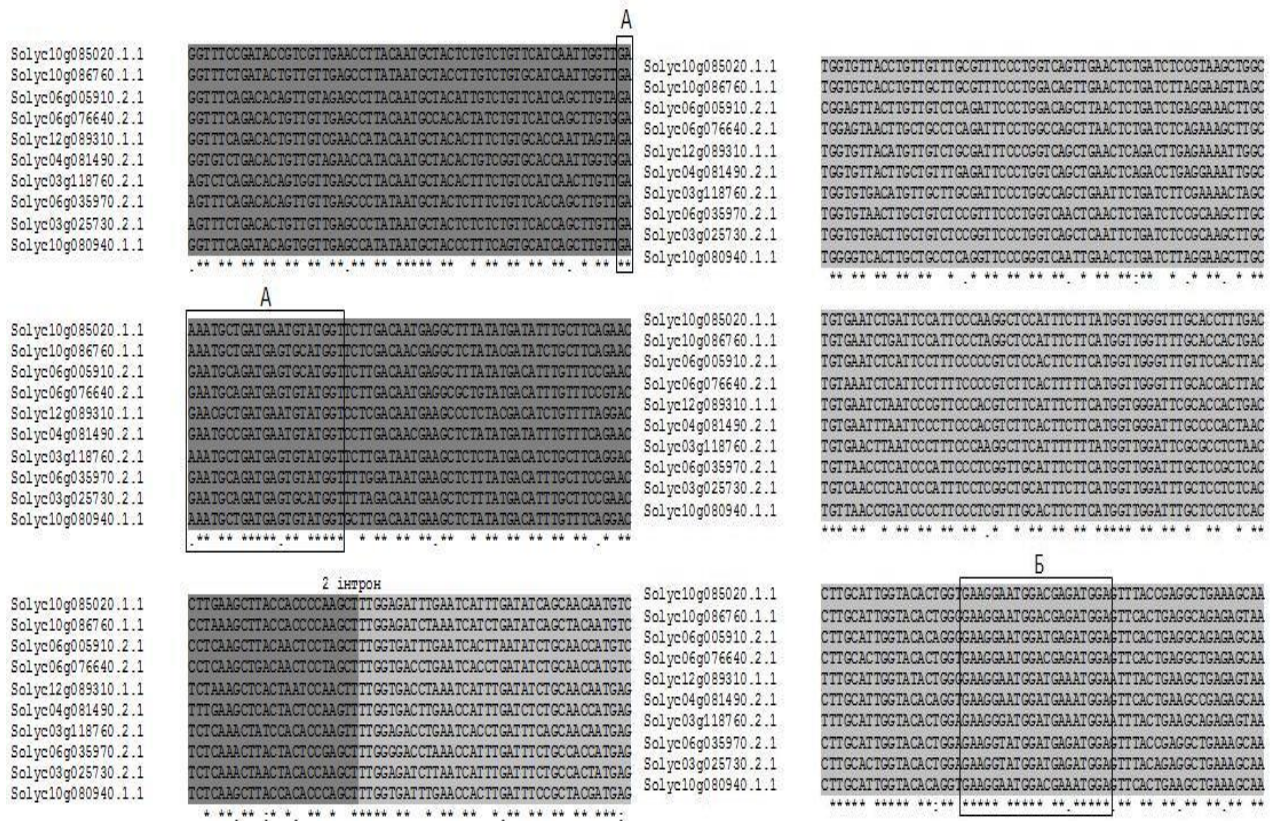


Рис. 3.27. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів β-тубуліну *S. lycopersicum*, що оточують II-ий інтрон.

- А – можливе розташування форвардного праймеру;
- Б – можливе розташування реверсного праймеру.

Також, за результатами проведеного аналізу послідовностей, були виявлені найбільш консервативні ділянки 1-го, 2-го та 3-го екзонів (рис. 3.28, 3.29), що дає підстави для дизайну в майбутньому 2 пар універсальних вироджених праймерів з метою оцінки поліморфізму довжини 1-го та 2-го інтронів генів β-тубуліну у різних видів рослин.

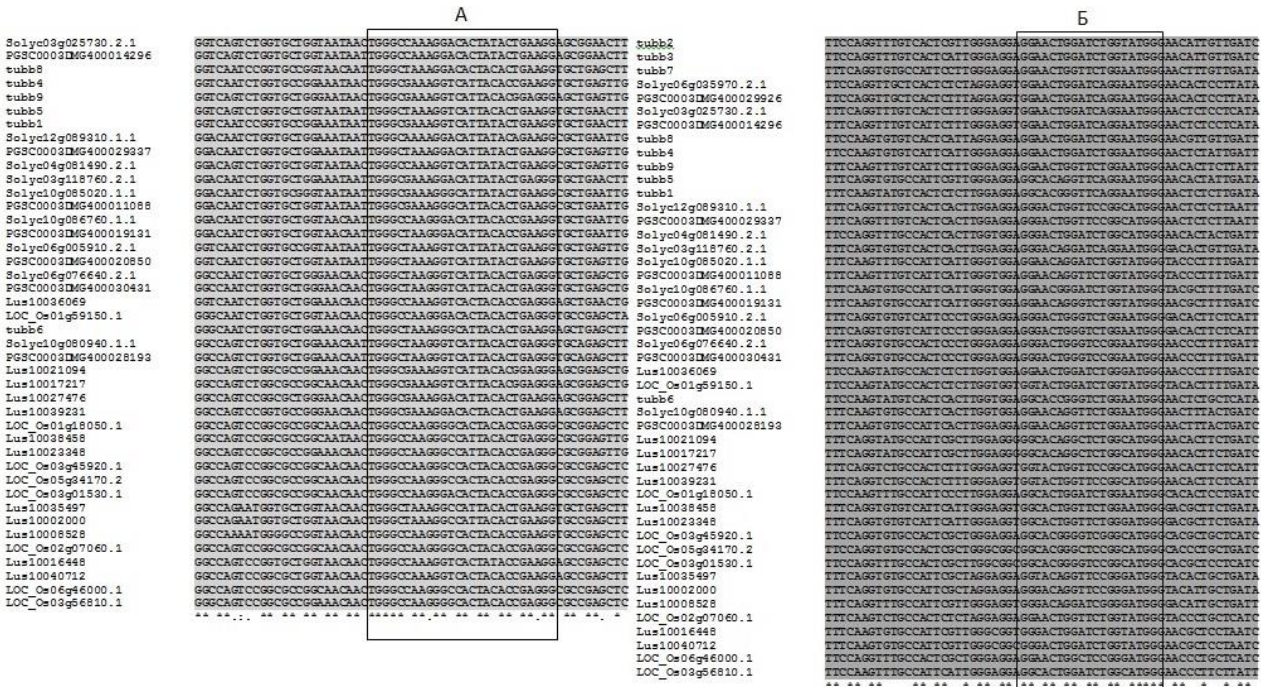


Рис. 3.28. Фрагменти вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок всіх генів β-тубуліну, що оточують I-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру

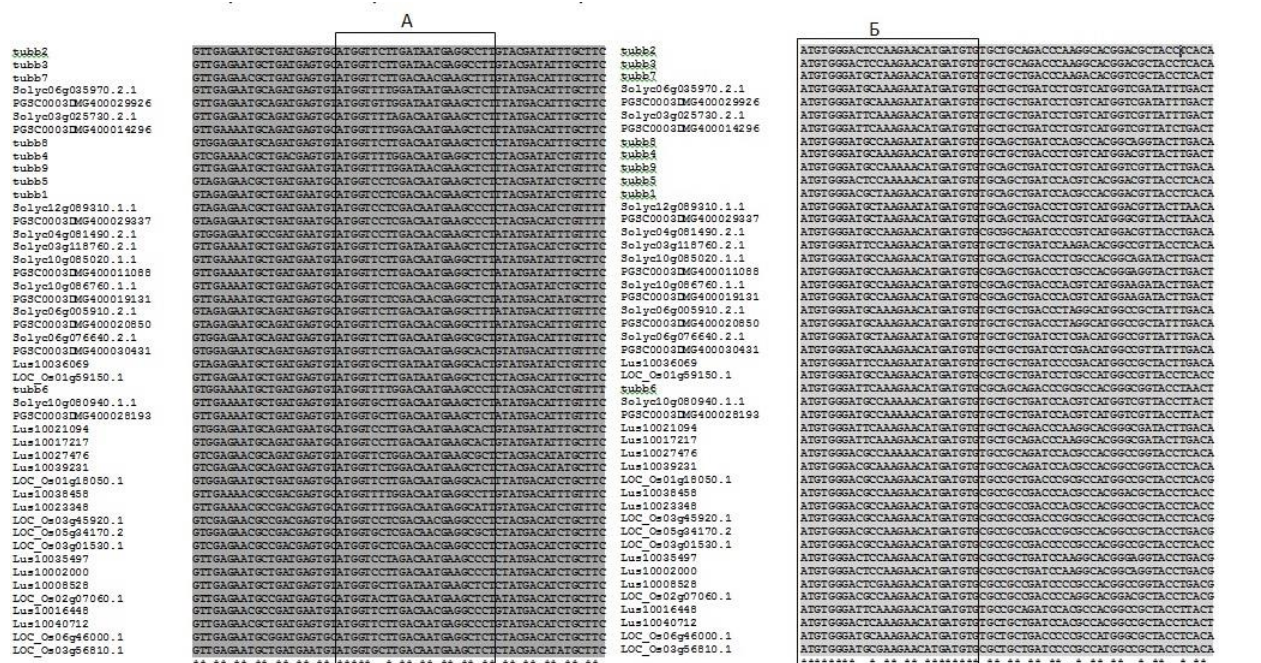


Рис. 3.29. Фрагменти вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок всіх генів β-тубуліну, що оточують II-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

Слід зазначити, що виявлені нами ділянки консенсусних послідовностей співпали з ділянками віджигу ТВР праймерів (ТВР-F: ААСТGGGCBAARGGNCAУТАУАС та ТВР-R: АССАТРСАУТСРТCDGCRTTYТС), які використовуються для визначення поліморфізму довжин інтронів β -тубуліну [34].

Таким чином, біоінформатично була підтверджена доцільність використання їх для аналізу поліморфізму ДНК різних видів рослин (рис. 3.30, 3.31).

	ТВР-F
Solyc03g025730.2.1	GGTCAGTCTGGTGTGGTAAATAAC TGGGCCAAAGGACACTATACTGAAGGAGCGGAACCTI
PGSC0003DMG400014296	GGTCAGTCTGGTGTGGTAAATAAC TGGGCCAAAGGACACTATACTGAAGGAGCGGAACCTI
tubb8	GGTCAATCCGGTGCCGGTAAACAAT TGGGCTAAAGGACACTACACTGAAGGTGCTGAGCTT
tubb4	GGTCAATCTGGTGCCGGAAATAAC TGGGCGAAAGGTCA TTACACC GAAGGTGCTGAGTTG
tubb9	GGTCAGTCTGGTGTGGGAAATAAC TGGGCGAAAGGTCA TTACACC GAGGGAGCTGAGTTG
tubb5	GGTCAGTCTGGTGTGGTAAATAAC TGGGCTAAAGGTCA TTACACT GAAGGTGCTGAACCTI
tubb1	GGTCAATCCGGTGCCGGAAATAAC TGGGCGAAAGGTCA TTATACT GAAGGTGCTGAACCTI
Solyc12g089310.1.1	GGACAATCTGGTGTGGAAATAAC TGGGCAAAAGGACATTATACTGAAGGCGCTGAATTG
PGSC0003DMG400029337	GGACAATCTGGTGTGGAAATAAC TGGGCTAAAGGACATTATACTGAAGGCGCTGAGTTG
Solyc04g081490.2.1	GGACAGTCTGGTGTGGTAAATAAC TGGGCCAAAGGTCA TTATACT GAAGGCGCTGAGTTG
Solyc03g118760.2.1	GGACAATCTGGTGTGGAAATAAC TGGGCGAAAGGACATTATACTGAGGGTGTGAACCTI
Solyc10g085020.1.1	GGACAATCTGGTGCCGGTAAATAAC TGGGCGAAAGGGCA TTATACTGAAGGCGCTGAATTG
PGSC0003DMG400011088	GGACAATCTGGTGTGGTAAATAAC TGGGCGAAAGGGCA TTACACTGAAGGCGCTGAATTG
Solyc10g086760.1.1	GGACAATCTGGTGTGGTAAACAAT TGGGCCAAGGGACATTACACC GAAGGTGCTGAATTG
PGSC0003DMG400019131	GGACAATCTGGTGTGGTAAACAAT TGGGCTAAGGGACATTACACC GAAGGTGCTGAATTG
Solyc06g005910.2.1	GGTCAATCTGGTGCCGGTAAATAAC TGGGCTAAAGGTCA TTATACT GAAGGTGCTGAGTTG
PGSC0003DMG400020850	GGTCAATCTGGTGTGGTAAATAAC TGGGCTAAAGGTCA TTATACT GAAGGTGCTGAGTTG
Solyc06g076640.2.1	GGCCAATCTGGTGTGGGAAACAAC TGGGCTAAGGGTCA TTACACTGAGGGTGTGAGCTG
PGSC0003DMG400030431	GGCCAATCTGGTGTGGGAAACAAC TGGGCTAAGGGTCA TTACACTGAGGGTGTGAGCTG
Lus10036069	GGTCAATCTGGTGTGGAAACAAC TGGGCCAAAGGTCACTACACC GAGGGAGCTGAACCTG
LOC_Os01g59150.1	GGGCAATCTGGTGTGGTAAACAAC TGGGCCAAGGGACACTACACTGAGGGTCCGAGCTA
tubb6	GGGCAATCTGGTGTGGAAACAAC TGGGCTAAGGGCA TTACACTGAAGGAGCTGAGCTI
Solyc10g080940.1.1	GGCCAGTCTGGTGTGGAAACAAT TGGGCTAAGGGTCA TTACACTGAGGGTGCAGAGCTI
PGSC0003DMG400028193	GGCCAGTCTGGTGTGGAAACAAT TGGGCTAAGGGTCA TTACACTGAGGGTGCAGAGCTI
Lus10021094	GGCCAGTCTGGCCGCGGAAACAAC TGGGCGAAAGGTCA TTACACC GAGGGAGCGGAGCTG
Lus10017217	GGCCAGTCTGGCCGCGGCAACAAC TGGGCGAAAGGTCA TTACACC GAGGGAGCGGAGCTG
Lus10027476	GGCCAGTCCGGCCGCTGGGAAACAAC TGGGCGAAAGGACATTACACTGAAGGAGCGGAGCTI
Lus10039231	GGCCAGTCCGGTGCCGGGAAACAAC TGGGCGAAAGGACACTACACTGAAGGAGCGGAGCTI
LOC_Os01g18050.1	GGCCAGTCCGGCCGCGGCAACAAC TGGGCCAAGGGCACTACACC GAGGGCGCGGAGCTC
Lus10038458	GGCCAGTCCGGCCGCGGCAACAAC TGGGCCAAGGGCA TTACACTGAGGGCGCGGAGTTG
Lus10023348	GGCCAGTCCGGCCCGGAAACAAC TGGGCCAAGGGCA TTACACC GAGGGCGCGGAGTTG
LOC_Os03g45920.1	GGCCAGTCCGGCCGCGGCAACAAC TGGGCCAAGGGCACTACACC GAGGGCGCGGAGCTC
LOC_Os05g34170.2	GGCCAGTCCGGCCGCGGCAACAAC TGGGCCAAGGGCACTACACC GAGGGCGCGGAGCTC
LOC_Os03g01530.1	GGCCAGTCCGGCCGCGGCAACAAC TGGGCCAAGGGACACTACACC GAGGGCGCGGAGCTC
Lus10035497	GGCCAGAAATGGTGTGGTAAACAAC TGGGCTAAGGGCA TTACACTGAAGGTGCTGAGCTI
Lus10002000	GGCCAGAAATGGTGTGGTAAACAAC TGGGCTAAGGGCA TTACACTGAAGGTGCTGAGCTI
Lus10008528	GGCCAAAATGGGGCCGGTAAACAAC TGGGCCAAGGGTCACTACACC GAAGGTGCTGAGCTC
LOC_Os02g07060.1	GGCCAGTCCGGCCGCGGCAACAAC TGGGCCAAGGGCACTACACC GAGGGCGCGGAGCTC
Lus10016448	GGCCAGTCCGGTGTGGTAAACAAC TGGGCCAAGGTCACTATACTGAAGGAGCGGAGCTC
Lus10040712	GGCCAGTCCGGCCGCTGGTAAACAAC TGGGCCAAGGTCACTACACC GAAGGAGCGGAGCTI
LOC_Os06g46000.1	GGCCAGTCCGGCCGCGGCAACAAC TGGGCCAAGGGCACTACACC GAGGGCGCGGAGCTC
LOC_Os03g56810.1	GGCCAGTCCGGCCGCGGAAACAAC TGGGCCAAGGGCACTACACC GAGGGCGCGGAGCTC

Рис. 3.30. Фрагмент вирівнювання всіх послідовностей генів бета-тубуліну. Світло-сірим виділена ділянка першого ексона; ТВР-F – розташування форвардного праймера [22].

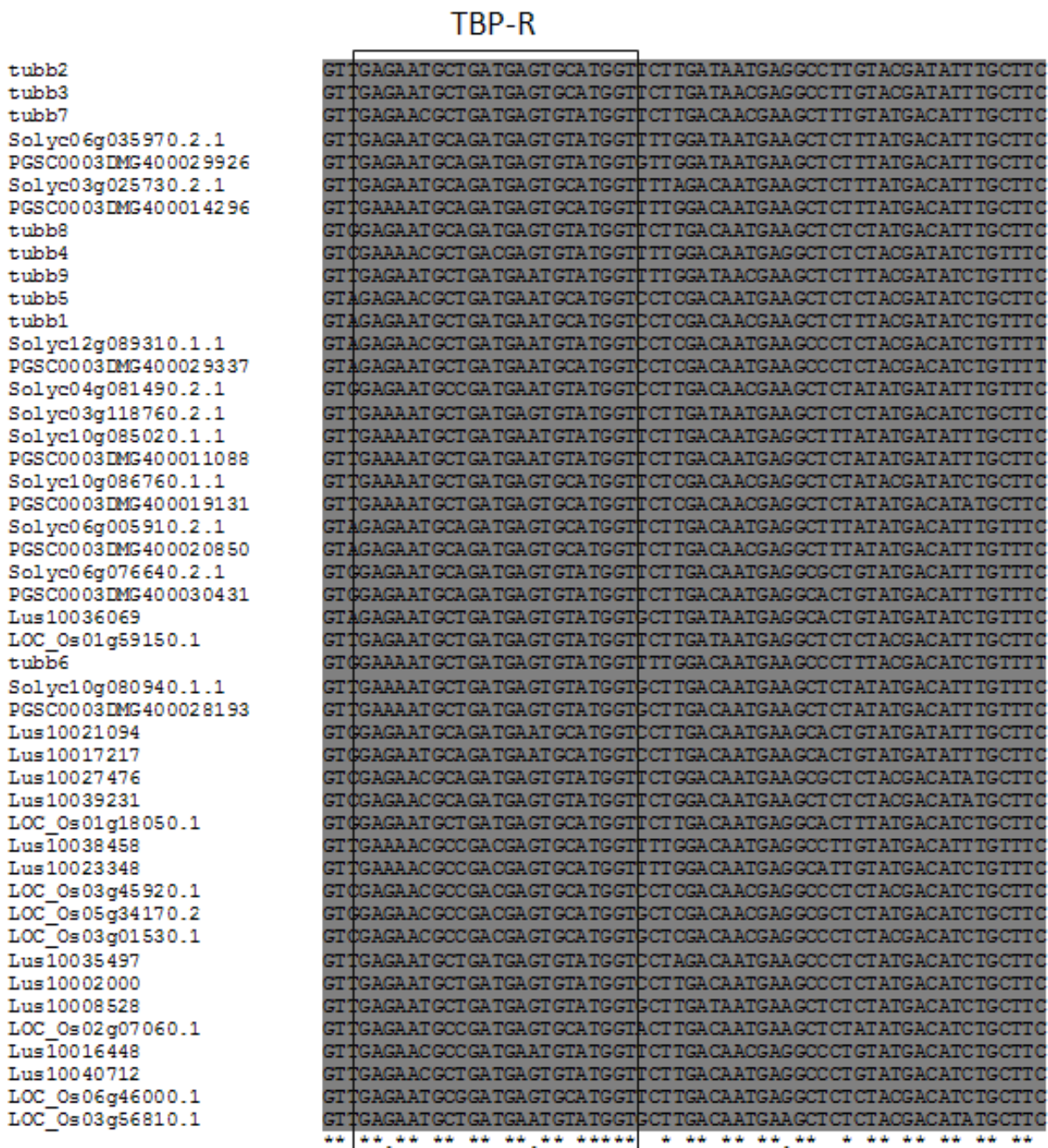


Рис. 3.31. Фрагмент вирівнювання всіх послідовностей генів β -тубуліну. Сірим виділена ділянка другого ексона; TBP-R – розташування реверсного праймера [22].

Наступним етапом дослідження було встановлено відсоток ідентичності гомологів генів α -тубуліну. В результаті проведеного біоінформатичного аналізу, ступінь ідентичності кодуєчих ділянок (лише екзони), відібраних нами гомологів генів α -тубуліну, складає в середньому 77 % (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Ступінь ідентичності кодуючих ділянок гомологів генів α -тубуліну (%)

Вид рослин	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	78	78,5	78	78
<i>O. sativa</i>	78	100	78	71	71
<i>L. usitatissimum</i>	78,5	78	100	77	77
<i>S. tuberosum</i>	78	71	77	100	84,5
<i>S. lycopersicum</i>	78	71	77	84,5	100
В середньому	77				

За результатами порівняння амінокислотних послідовностей тих самих гомологічних послідовностей, відсоток ідентичності складає в середньому 90,5% (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

Ступінь ідентичності трансльованих амінокислотних послідовностей гомологів генів α -тубуліну (%)

Вид рослин	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	89	91	87	88
<i>O. sativa</i>	89	100	92	91	92
<i>L. usitatissimum</i>	91	92	100	89,5	91
<i>S. tuberosum</i>	87	91	89,5	100	95
<i>S. lycopersicum</i>	88	92	91	95	100
В середньому	90,5				

Таким чином, було встановлено, що відсоток ідентичності екзонів та трансльованих амінокислотних послідовностей гомологів генів α -тубуліну у п'ятьох видів вищих рослин виявився достатньо високим. Це є свідченням

того, що саме екзони є найбільш консервативними ділянками генів.

Наступним етапом дослідження було виявлення найбільш консервативних ділянок екзонів генів α -тубуліну, з метою подальшого дизайну праймерів для виявлення поліморфізму довжин інтронів генів α -тубуліну. У якості послідовностей для майбутнього дизайну праймерів для гомологів генів α -тубуліну в межах кожного виду окремо будуть використані ділянки екзонів з максимально схожими сіквенсами.

Оскільки в геномі *A. thaliana* є анотована послідовність гену tubulin-alpha 6 (*tua6*), що містить лише перший інтрон в своєму складі, то послідовності аналізувалися таким чином, щоб в майбутньому отримати багатократну ампліфікацію перших інтронів послідовностей генів. Результати аналізу представлені на рис. 3.32 - 3.36.

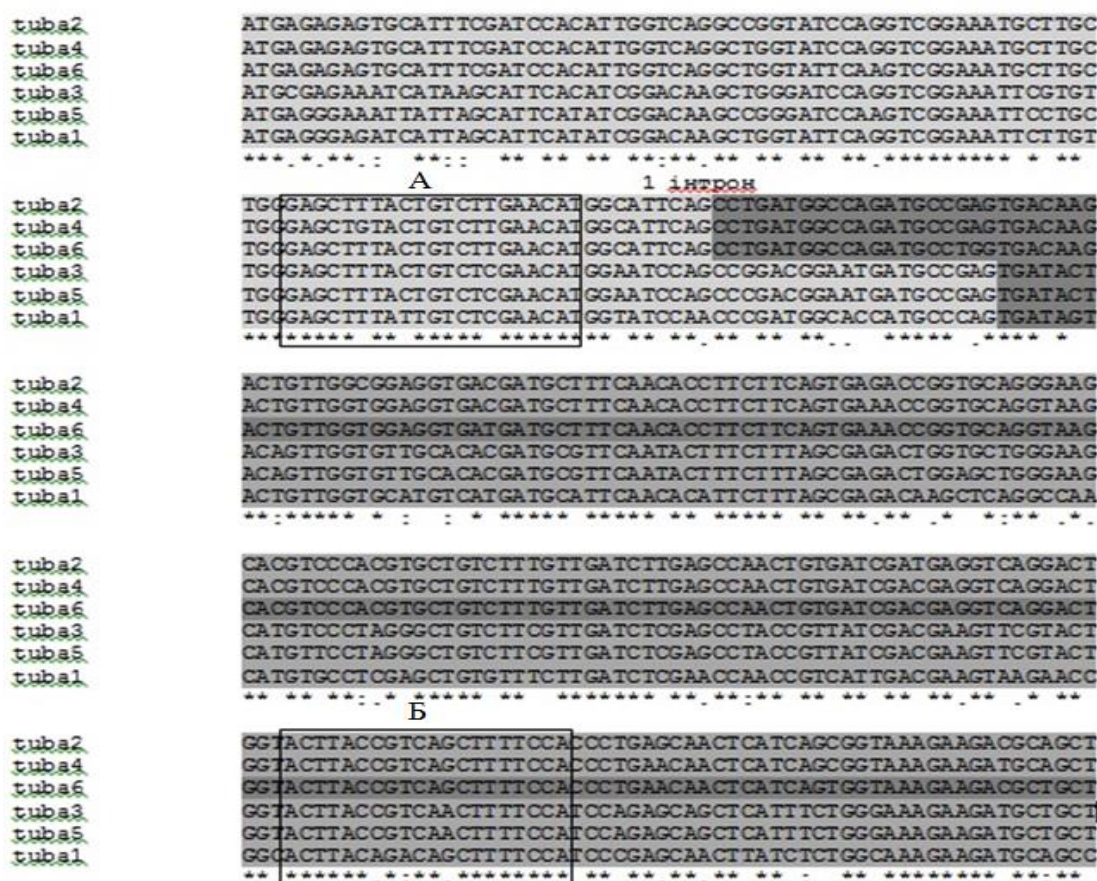


Рис. 3.32. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів α -тубуліну *A. thaliana*, що оточують І-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

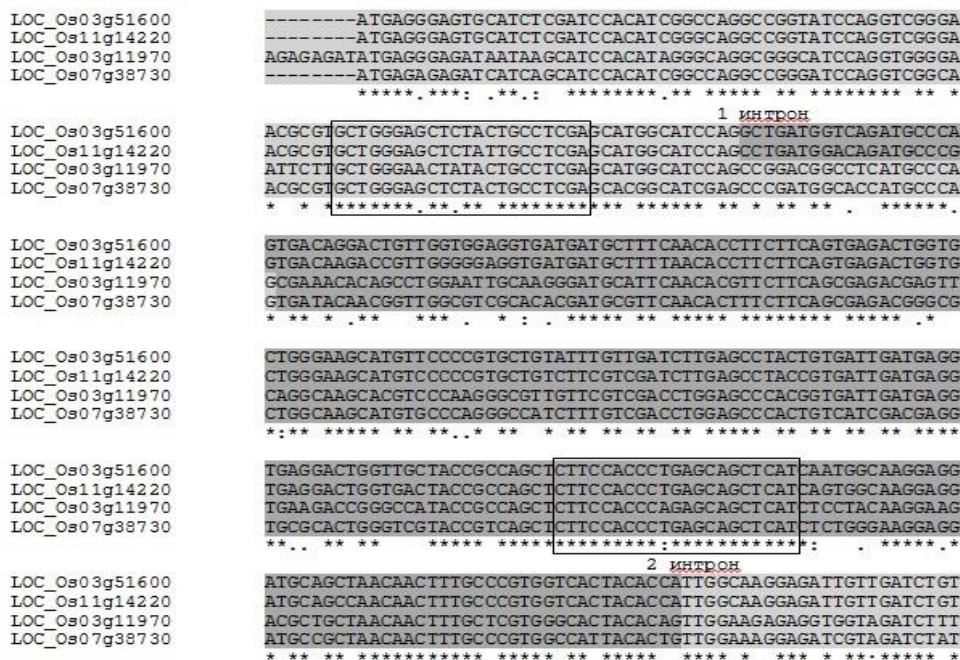


Рис. 3.33. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів α -тубуліну *O. sativa*, що оточують І-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

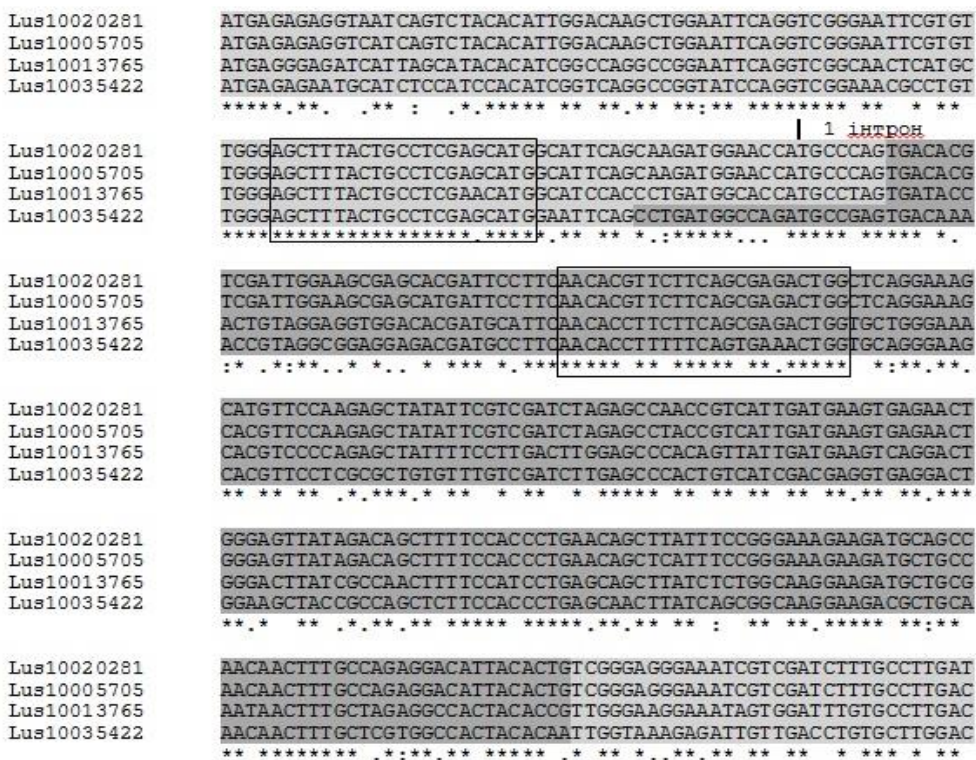


Рис. 3.34. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів α -тубуліну *L. usitatissimum*, що оточують І-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

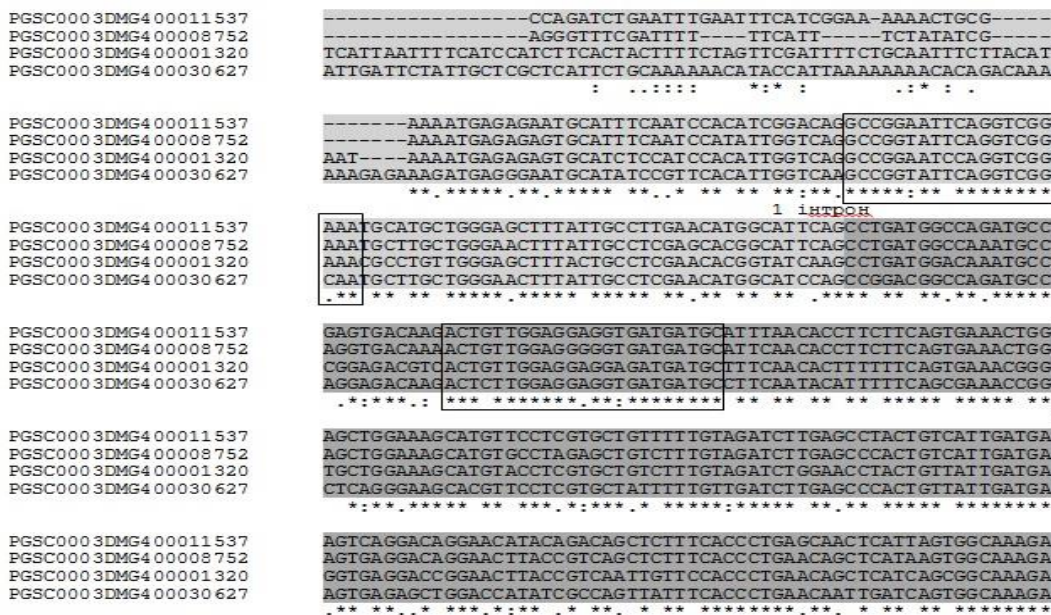


Рис. 3.35. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів α -тубуліну *S. tuberosum*, що оточують I-ий інтрон.

- А** – можливе розташування форвардного праймеру;
- Б** – можливе розташування реверсного праймеру.

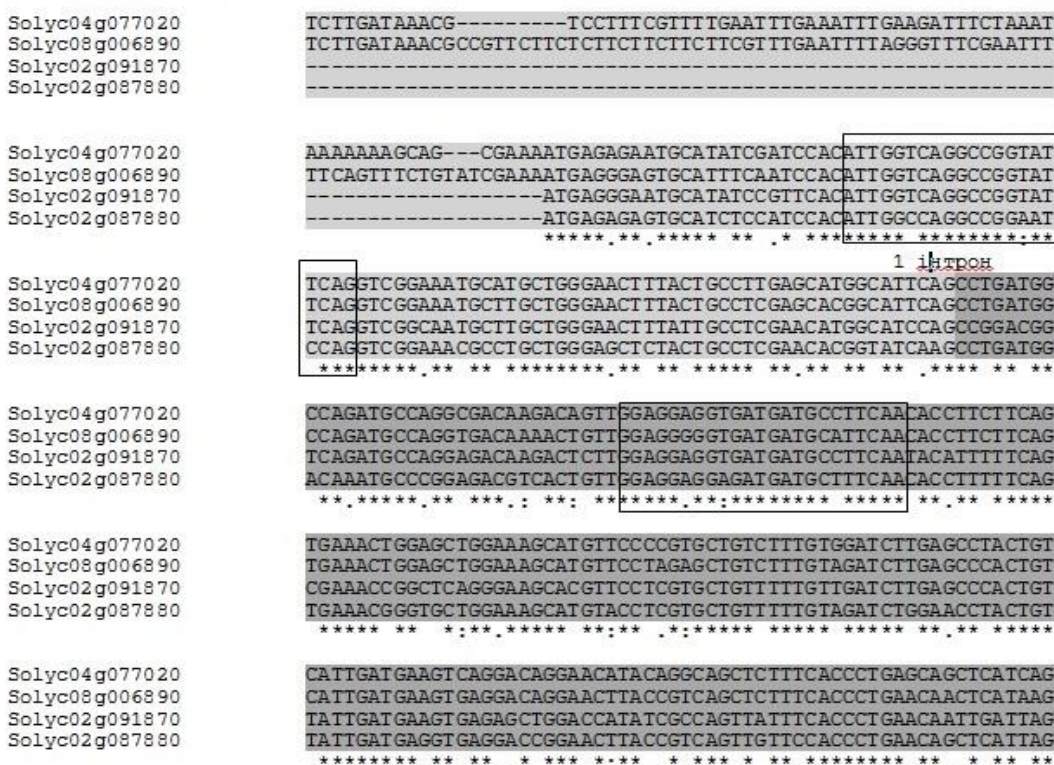


Рис. 3.36. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів α -тубуліну *S. lycopersicum*, що оточують I-ий інтрон.

- А** – можливе розташування форвардного праймеру;
- Б** – можливе розташування реверсного праймеру.

В подальшому з метою виявлення консенсусної (результуючої) послідовності для гомологів генів α -тубуліну у *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* було проведене множинне вирівнювання всіх наявних послідовностей генів α -тубуліну. В результаті виявлені найбільш консервативні ділянки екзонів (рис. 3.37, 3.38), які в подальшому були використані для дизайну вироджених праймерів з метою оцінки поліморфізму довжин I-го інтрону генів α -тубуліну у різних видів рослин. Праймери були наступними (табл. 3.22.): TUA_1in F: TGG GAR CTN TAY TGY CTY GA, R: TCR CTR AAR AAN GTR TTR AAN GMA TC

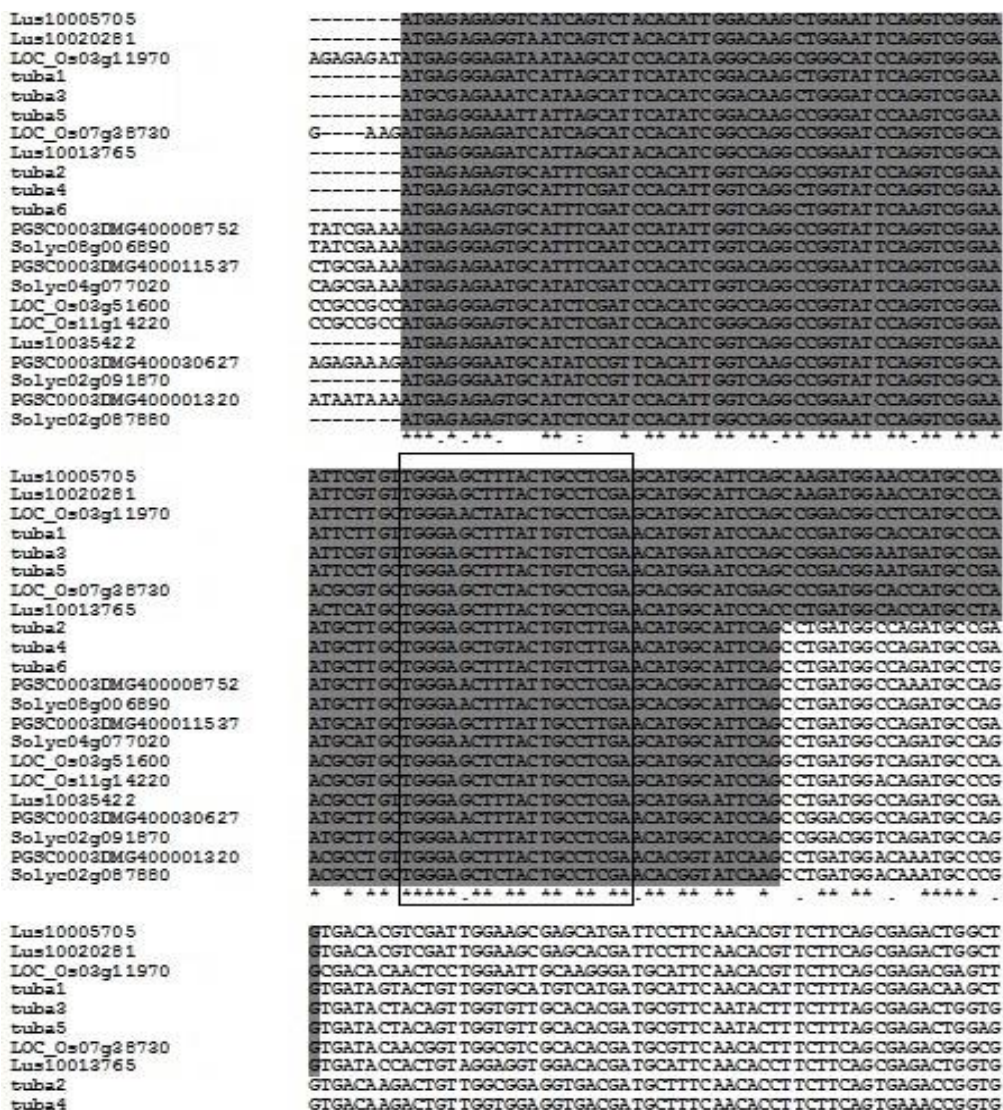


Рис. 3.37. Фрагмент вирівнювання всіх послідовностей α -тубуліну. Темно-сірим виділена область першого екзона, а прямокутником зазначена ділянка можливого відпалу форвардного праймеру.

```

Lus10005705      ATTGCT GTTGGGA GCTTTAC TGCCTCGA GCATGGC ATTCCAGC AAGATGGA AACCATGC CCA
Lus10020281      ATTGCT GTTGGGA GCTTTAC TGCCTCGA GCATGGC ATTCCAGC AAGATGGA AACCATGC CCA
LOC_0=03q11970  ATTCTT GCTGGGA ACTATAC TGCCTCGA GCATGGC ATCCAGC CCGACGG CCTCATGC CCA
tuba1            ATTCTT GTTGGGA GCTTTAT TGTCTCGA ACATGGT ATCCAAC CCGATGG CACCATGC CCA
tuba3            ATTGCT GTTGGGA GCTTTAC TGTCTCGA ACATGGA ATCCAGC CCGACGG AATGATGC CGA
tuba5            ATTCTT GCTGGGA GCTTTAC TGTCTCGA ACATGGA ATCCAGC CCGACGG AATGATGC CGA
LOC_0=07g38720  ACGCGT GCTGGGA GCTCTAC TGCCTCGA GCACGGC ATCCAGC CCGATGG CACCATGC CCA
Lus10013765      ACTCAT GCTGGGA GCTTTAC TGCCTCGA ACATGGC ATCCACC CTGATGG CACCATGC CTA
tuba2            ATGCTT GCTGGGA GCTTTAC TGTCTTGA ACATGGC ATTCCAGC CTGATGG CCGATGC CGA
tuba4            ATGCTT GCTGGGA GCTGTAC TGTCTTGA ACATGGC ATTCCAGC CTGATGG CCGATGC CGA
tuba6            ATGCTT GCTGGGA GCTTTAC TGTCTTGA ACATGGC ATTCCAGC CTGATGG CCGATGC CTG
PGSC0003DMG400008752  ATGCTT GCTGGGA ACTTTAT TGCCTCGA GCACGGC ATTCCAGC CTGATGG CCAATGC CAG
Solyc06g006890  ATGCTT GCTGGGA ACTTTAC TGCCTCGA GCACGGC ATTCCAGC CTGATGG CCGATGC CAG
PGSC0003DMG400011537  ATGCAAT GCTGGGA GCTTTAT TGCCTTGA ACATGGC ATTCCAGC CTGATGG CCGATGC CGA
Solyc04g077020  ATGCAAT GCTGGGA ACTTTAC TGCCTTGA GCATGGC ATTCCAGC CTGATGG CCGATGC CAG
LOC_0=03g51600  ACGCGT GCTGGGA GCTCTAC TGCCTCGA GCATGGC ATCCAGC CTGATGG TCAGATGC CCG
LOC_0=11g14220  ACGCGT GCTGGGA GCTCTAT TGCCTCGA GCATGGC ATCCAGC CTGATGG ACAGATGC CCG
Lus10035422      ACGCGT GTTGGGA GCTTTAC TGCCTCGA GCATGGA ATTCCAGC CTGATGG CCGATGC CGA
PGSC0003DMG400030627  ATGCTT GCTGGGA ACTTTAT TGCCTCGA ACATGGC ATCCAGC CCGACGG CCGATGC CCA
Solyc02g091870  ATGCTT GCTGGGA ACTTTAT TGCCTCGA ACATGGC ATCCAGC CCGACGG TCAGATGC CAG
PGSC0003DMG400001320  ACGCGT GTTGGGA GCTTTAC TGCCTCGA ACGCGT ATCAAGC CTGATGG ACAAAATGC CCG
Solyc02g087880  ACGCGT GCTGGGA GCTCTAC TGCCTCGA ACGCGT ATCAAGC CTGATGG ACAAAATGC CCG
* * * * *
Lus10005705      GTGACA CGTCGAT TGGAA GC GAGCAG GA TTCCCTTCAACACGT TCTTCAG CGAGACTGGCT
Lus10020281      GTGACA CGTCGAT TGGAA GC GAGCAG GA TTCCCTTCAACACGT TCTTCAG CGAGACTGGCT
LOC_0=03g11970  GCGACA CAACTCC TGGAA TT GCAAGG GA TGCATTCAACACGT TCTTCAG CGAGACTGGCT
tuba1            GTGATA GTACTGT TGGTGA TGTCAI GA TGCATTCAACACAT TCTTTAG CGAGACTGGCT
tuba3            GTGATA CTACAGT TGGTGT GCACAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTTAG CGAGACTGGCT
tuba5            GTGATA CTACAGT TGGTGT GCACAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTTAG CGAGACTGGCT
LOC_0=07g38720  GTGATA CAACTGT TGGCGTC GCACAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTCAG CGAGACTGGCT
Lus10013765      GTGATA CCACTGT AGGAGGT GGACAG GA TGCATTCAACACTT TCTTCAG CGAGACTGGCT
tuba2            GTGACA AGACTGT TGGCGGA GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTCAG TGAACCGGTG
tuba4            GTGACA AGACTGT TGGTGG GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTCAG TGAACCGGTG
tuba6            GTGACA AGACTGT TGGTGG GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTCAG TGAACCGGTG
PGSC0003DMG400008752  GTGACA AAACTGT TGGAGGG GGTGAG GA TGCATTCAACACTT TCTTCAG TGAACCTGGAG
Solyc06g006890  GTGACA AAACTGT TGGAGGG GGTGAG GA TGCATTCAACACTT TCTTCAG TGAACCTGGAG
PGSC0003DMG400011537  GTGACA AGACTGT TGGAGGA GGTGAG GA TGCATTCAACACTT TCTTCAG TGAACCTGGAG
Solyc04g077020  GCGACA AGACTGT TGGAGGA GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTCAG TGAACCTGGAG
LOC_0=03g51600  GTGACA GGACTGT TGGTGG GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTCAG TGAACCTGGAG
LOC_0=11g14220  GTGACA AGACTGT TGGGGA GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TCTTCAG TGAACCTGGAG
Lus10035422      GTGACA AAACTGT AGGCGGA GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TTTTCAG TGAACCTGGCT
PGSC0003DMG400030627  GAGACA AGACTCT TGGAGGA GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TTTTCAG CGAACCCTGGT
Solyc02g091870  GAGACA AGACTCT TGGAGGA GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TTTTCAG CGAACCCTGGT
PGSC0003DMG400001320  GAGACG TCACCTGT TGGAGGA GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TTTTCAG TGAACCGGTG
Solyc02g087880  GAGACG TCACCTGT TGGAGGA GGTGAG GA TGCCTTCAACACTT TTTTCAG TGAACCGGTG
* * * * *

```

Рис. 3.38. Фрагмент вирівнювання всіх послідовностей α -тубуліну. Темно-сірим виділена область другого екзона, а прямокутником – можлива ділянка відпалу реверсного праймеру.

Для пошуку консенсусних послідовностей генів γ -тубулінів з метою подальшого підбору праймерів, що дозволять оцінити поліморфізм довжини інтронів у різних видів рослин, використали 7 послідовностей, що кодують γ -тубулін, таких видів рослин: *Z. mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *A. thaliana* (AT3G61650), *L. usitatissimum* (Lus10010986.g, Lus10007851.g), для яких екзон-інтронна структура генів є доступною в базі даних Phytozome. В результаті множинного вирівнювання встановлено, що у процесі ампліфікації вдасться оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону γ -тубуліну *A. thaliana*; II-го інтрону, III-го екзону та III-го інтрону – для *Z. mays*; а також I-го інтрону, II-го екзону та II-го інтрону – для *L. usitatissimum* (рис. 3.39).

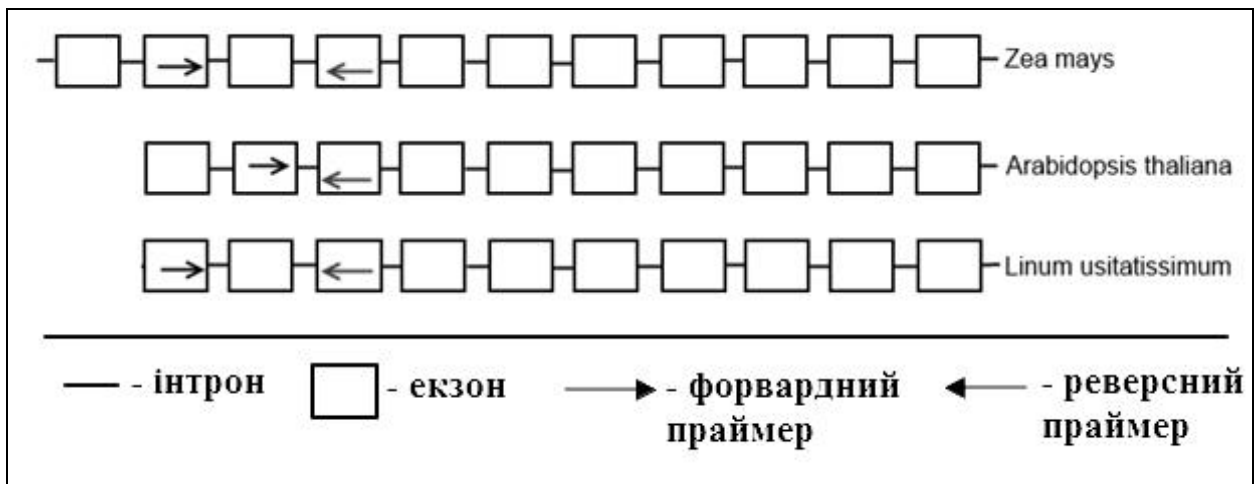


Рис. 3.39. Схематичне зображення місць відпалу вироджених праймерів.

В результаті проведеного біоінформатичного аналізу, ступінь ідентичності кодуючих ділянок (екзонів) відібраних нами гомологів генів актину складає в середньому 77 % (табл. 3.20). За результатами порівняння амінокислотних послідовностей тих самих генів, відсоток ідентичності складає для гомологів актину в середньому 92 % (табл. 3.21).

Таблиця 3.20

Ступінь ідентичності кодуючих ділянок гомологів генів актину (%)

Вид рослин	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	71	75	80	80
<i>O. sativa</i>	71	100	73	71	71
<i>L. usitatissimum</i>	75	73	100	70	77
<i>S. tuberosum</i>	80	71	70	100	84
<i>S. lycopersicum</i>	80	71	77	84	100
В середньому	77				

Таблиця 3.21

**Ступінь ідентичності трансльованих амінокислотних послідовностей
гомологів генів актину (%)**

Вид рослин	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	95	96	86	95
<i>O. sativa</i>	95	100	95	87	95
<i>L. usitatissimum</i>	96	95	100	88	96
<i>S. tuberosum</i>	86	87	88	100	87
<i>S. lycopersicum</i>	95	95	96	87	100
В середньому	92				

Для пошуку консенсусних послідовностей гомологів генів актину у геномі арабідопсіса (*A. thaliana*) було використано наступні анотовані послідовності генів актину *act1*, *act2*, *act3*, *act4*, *act7*, *act8*, *act11* та *act12*, що містяться в базі даних GeneBank. Гени актину *A. thaliana* містять по 3 інтрони та 4 екзони. Варто зазначити, що в гені *act 2* відсутній перший інтрон, що притаманний всім іншим послідовностям. В подальшому було здійснено множинне вирівнювання цих послідовностей за допомогою програми CLUSTAL X 2.0 та аналіз консенсусної послідовності в програмі UGENE. У якості послідовностей для дизайну праймерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину у *A. thaliana*, було взято ділянки екзонів з максимально консервативними сіквенсами. Спираючись на результати вирівнювання можна констатувати, що на увагу заслуговують консенсусні послідовності для виявлення поліморфізму I-го (для всіх генів, крім *act2*) та II-го інтронів (рис. 3.40, 3.41).

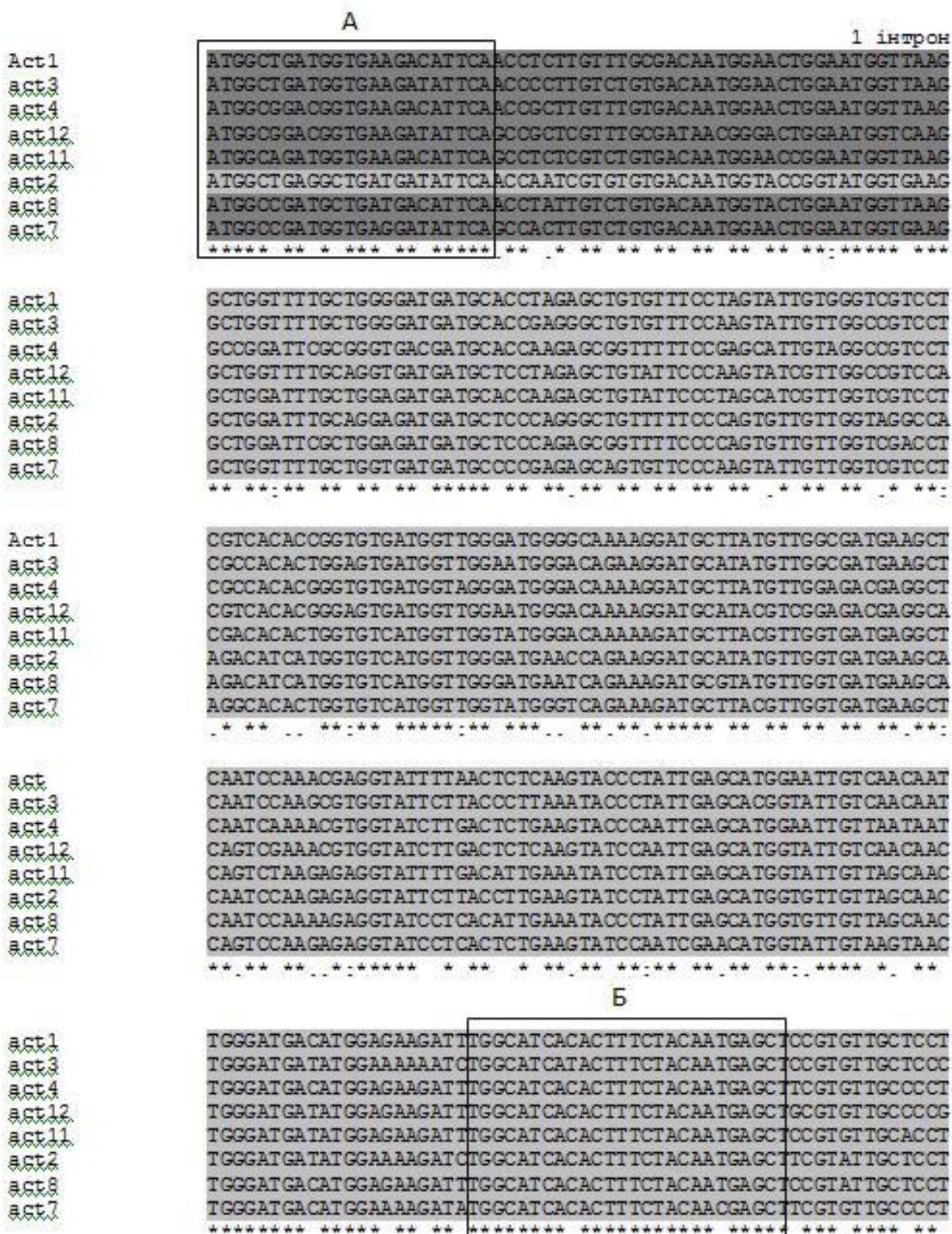


Рис. 3.40. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів актину *A. thaliana*, що оточують I-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

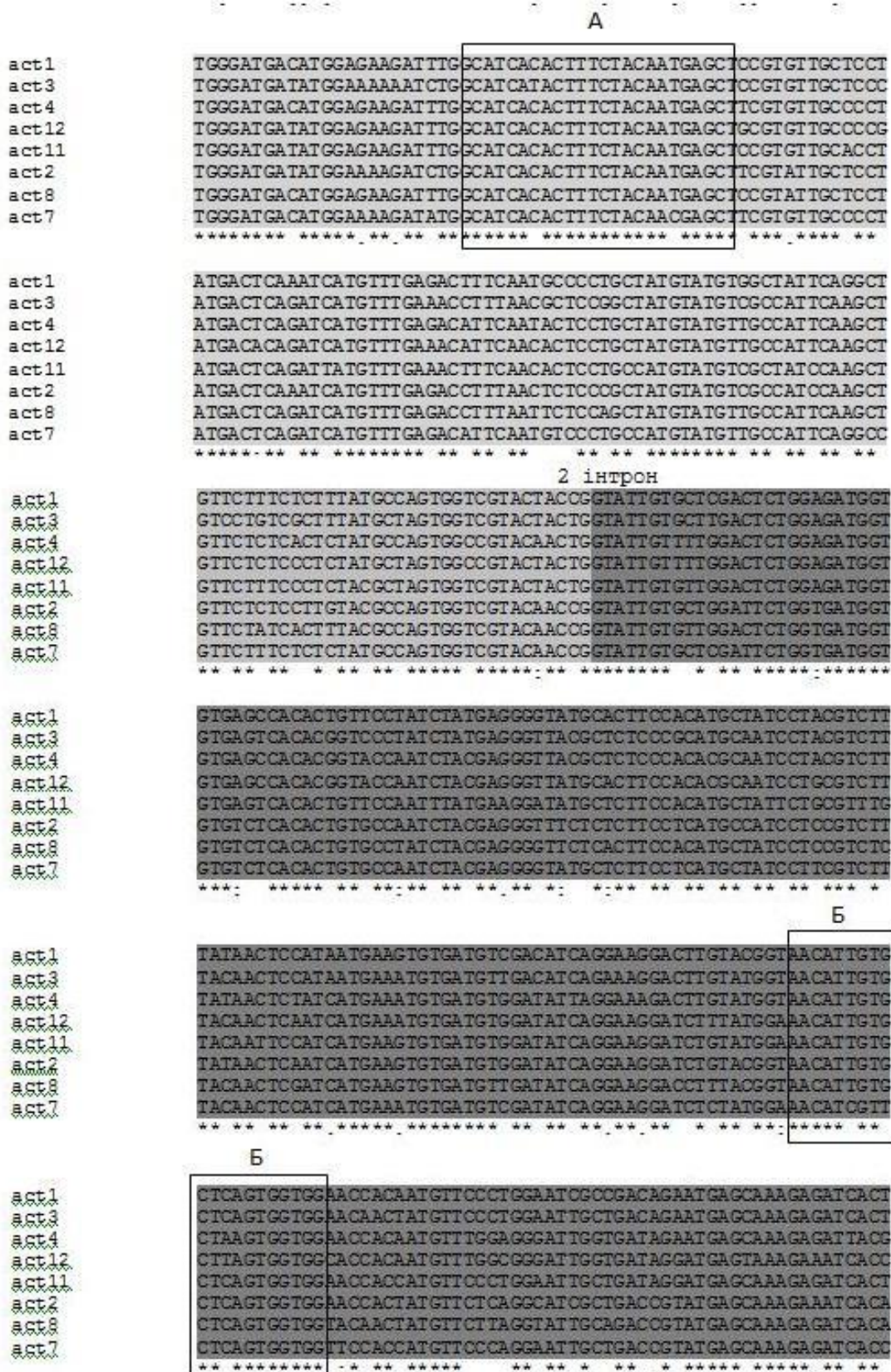


Рис. 3.41. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів актину *A. thaliana*, що оточують II-й інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

Пошук консенсусних послідовностей гомологів генів актину у рису (*O. sativa*) було здійснено для наступних сиквенсів: LOC_Os03g61970, LOC_Os03g50885, LOC_Os11g06390, LOC_Os01g73310, LOC_Os05g36290, LOC_Os05g01600, LOC_Os10g36650, LOC_Os12g06660, LOC_Os01g64630, що містяться в базі даних Phytozome v9.1. Гени актину в геномі *O. sativa* у переважній більшості містять по 3 інтрони та 4 екзони, окрім гену закодованому в локусі LOC_Os11g06390 (по 2 інтрони та 3 екзони) Для подальшого дизайну праймерів для *O. sativa* можуть бути використані ділянки екзонів з максимально схожими сиквенсами. Враховуючи результати множинного вирівнювання, як об'єкт для досліджень може бути використаний другий інтрон (рис. 3.42).

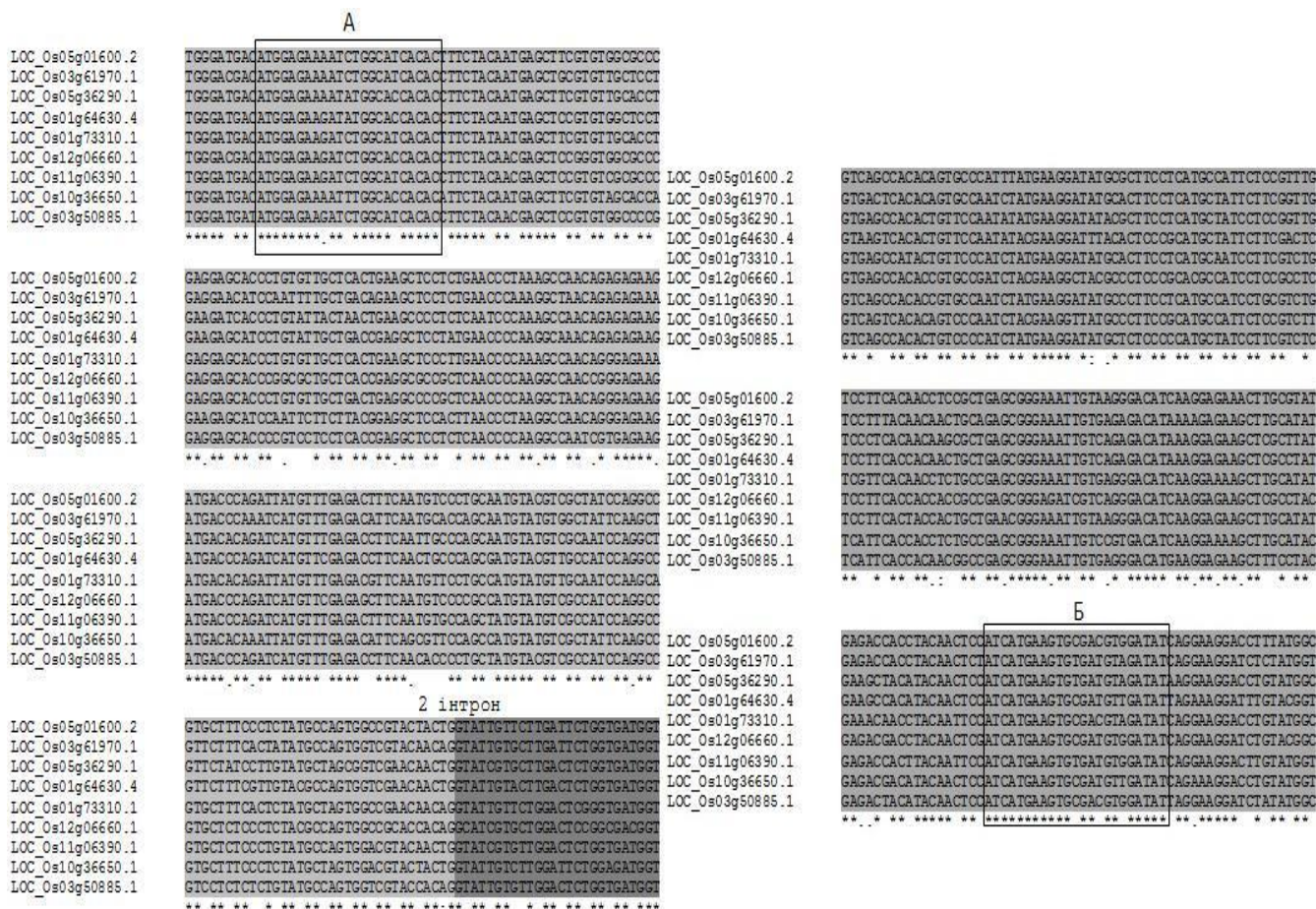


Рис. 3.42. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів актину у *O. sativa*, що оточують II-й інтрон.

- А** – можливе розташування форвардного праймеру;
- Б** – можливе розташування реверсного праймеру.

Для пошуку консенсусних послідовностей серед гомологів генів актину у геномі льону-довгунця (*L. usitatissimum*) було використано послідовності Lus10005163, Lus10006783, Lus10006784, Lus10005819, Lus10005820, Lus10029286, Lus10004169, Lus10021057, Lus10016259, Lus10016558, Lus10005457, Lus10001694, Lus10040826, Lus10004956, Lus10001693, які раніше були визначені в базі даних Phytozome v 9.1. Оскільки послідовності генів актину є дуже подібними, були визначені ділянки екзонів з максимально схожими (консервативними) сіквенсами. Враховуючи те, що всі гени актину *L. usitatissimum* містять по 3 інтрони, мінімальна кількість таких праймерів може сягати 6 (3 пари) і, відповідно, є можливість виявлення поліморфізму довжин 1, 2 та 3 інтронів генів актину (рис. 3.43 - 3.45).

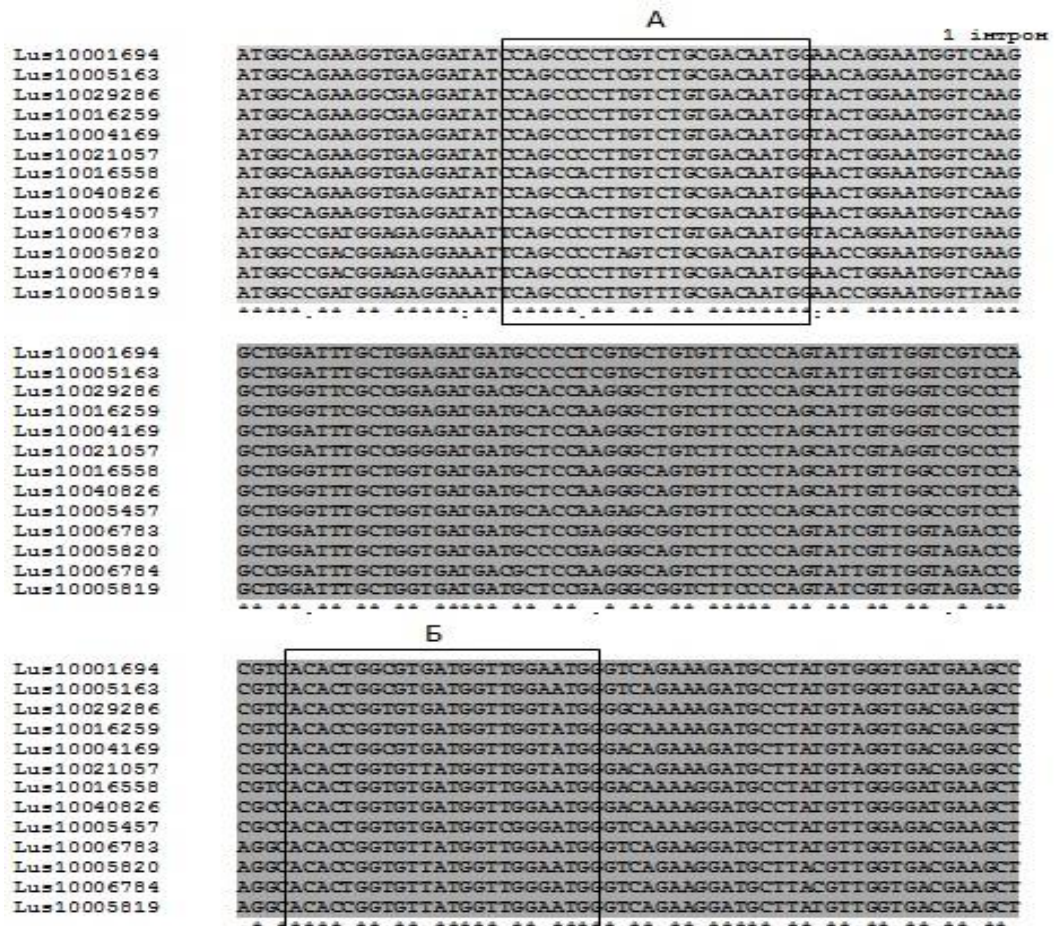


Рис. 3.43. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів актину *L. usitatissimum*, що оточують I-ий інтрон.

А – можливе розташування форвардного праймеру;

Б – можливе розташування реверсного праймеру.

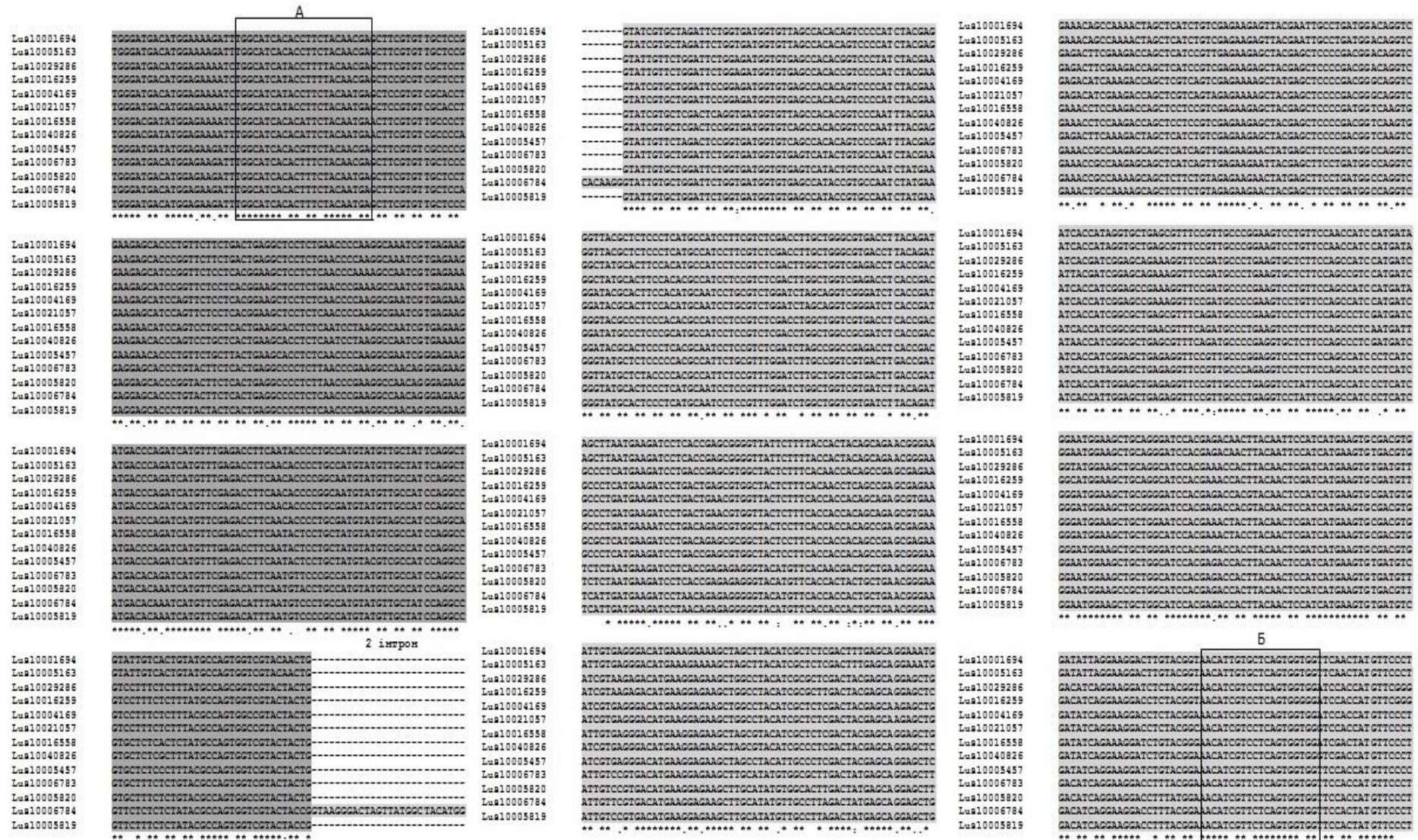


Рис. 3.44. Фрагмент віривання генов актину (екзонних) ділянок генов актину *L. usitatisimum*, що оточують II-ий інтрон. А – можливе розташування форвардного праймеру; Б – можливе розташування реверсного праймеру.

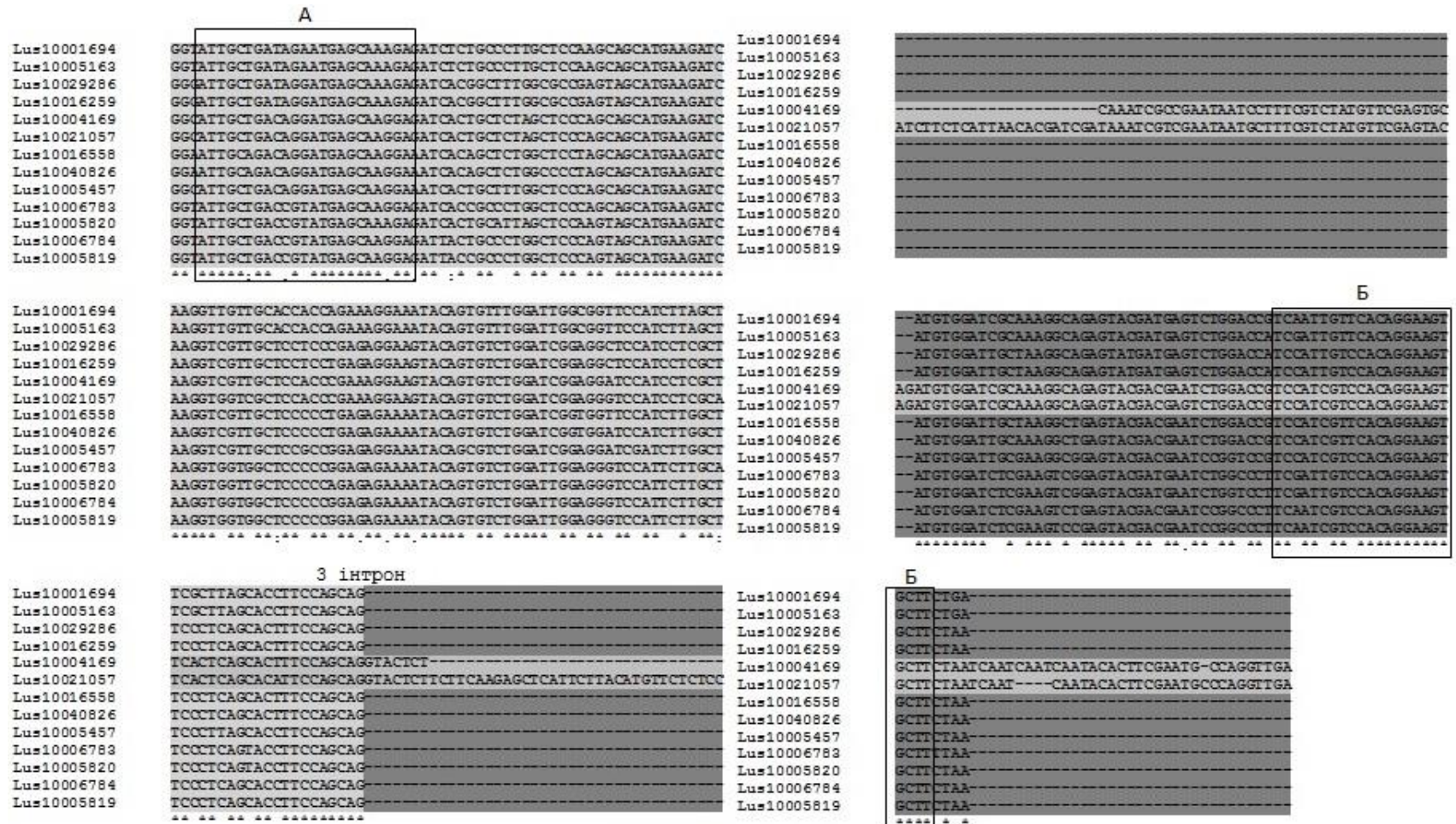


Рис. 3.45. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів актину *L. usitativum*, що оточують III-й інтрон. А – можливе розташування форвардного праймеру; Б – можливе розташування реверсного праймеру.

Для пошуку консенсусних послідовностей гомологів генів актину у картоплі (*S. tuberosum*) було використано наступні сіквенси: PGSC0003DMG400003985, PGSC0003DMG400000439, PGSC0003DMG400018449, PGSC0003DMG400027746, PGSC0003DMG400023708, PGSC0003DMG400019204, PGSC0003DMG400008912, PGSC0003DMG400036865, PGSC0003DMG400029121, PGSC0003DMG400008619, PGSC0003DMG400008618, що раніше були визначені в базі даних Phytozome v 9.1. Як послідовності для майбутнього дизайну праймерів можуть бути взяті ділянки екзонів з максимально схожими сіквенсами. Враховуючи результати множинного вирівнювання, до таких належать ділянки, що оточують II-ий інтрон генів актину *S. tuberosum* (рис. 3.46).

Пошук консенсусних послідовностей генів актину у геномі томату (*S. lycopersicum*) було здійснено для наступних послідовностей: Solyc00g017210, Solyc01g104770, Solyc03g078400, Solyc04g011500, Solyc04g071260, Solyc05g054480, Solyc06g076090, Solyc10g080500, Solyc10g086460, Solyc11g005330, Solyc11g065990, що містяться в базі даних Phytozome v9.1. Більшість послідовностей містять по 3 інтрони та 4 екзони, Однак, ген актину, закодований в локусі Solyc11g065990 має лише 2 інтрони у своєму складі, оскільки відсутній 2-й інтрон, який притаманний всім іншим послідовностям.

Зважаючи на результати множинного вирівнювання відібраних послідовностей, можна підібрати дві пари праймерів, для виявлення поліморфізму другого (рис. 3.47) та третього (рис. 3.48) інтронів генів актину в геномі *S. lycopersicum*.



Рис. 3.46. Фрагмент вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів актину *S. tuberosum*, що оточують II-ий інтрон. А – можливе розташування форвардного праймеру; Б – можливе розташування реверсного праймеру.

А

```

Solyc11g065990 AAGGAAATCACC GCCTTGGCTCCAGCAGCATGAAGATTAA GGTGTGCTCCACC GGAG
Solyc06g076090 AAAGAAATTA CTGCATTGGCTCCAAGCAGCATGAAAATTAA GGTGGTTGCTCCACC TGAA
Solyc11g005330 AAGGAAATCACC GCCTTGGCTCCAGCAGCATGAAGATTAA GGTGTGCTCCACC GGAG
Solyc03g078400 AAGGAAATCACTGCTTTGGCTCCAAGCAGCATGAAAATTAA GGTGTGTCACCACC TGAG
Solyc04g011500 AAAGAAATTA CTGCATTGGCTCCTAGCAGCATGAAGATTAA GGTGGTCGCTCCACCAGAG
Solyc05g054480 AAAGAAC TTACC GCGTTGGCTCCGAGCAGCATGAAGATTAA GGTGTGTCACCACCAGAA
Solyc10g080500 AAGGAAATTA CTGCATTGGCTCCTAGTAGCATGAAGATCAA GGTGTGCGCCACCACC TGAG
Solyc10g086460 AAGGAGATCACC GCGTTGGCTCCTAGCAGCATGAAGATTAA GGTGTGTCGCCCCC TGAA
Solyc00g017210 AAAGAGATCACTGCTTTGGCTCCAAGCAGCATGAAGATCAA AGTCGTTGCCCTCCAGAG
Solyc04g071260 AAGGAAATCACTGCTCTGGCTCCAAGCAGCATGAAGATCAA AGTCGTTGCCACCACC TGAA
Solyc01g104770 AAGGAAATTA CTGCATTGGCTCCAGCAGTATGAAAATCAA GGTAGTGGCGCCTCC TGAA
**..** : ** ** * ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

3 інтрон

```

Solyc11g065990 AGAAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGATCCATCCTTGCACTACTTAGCACCITCCAGCAG
Solyc06g076090 AGGAAGTATAGTGTGGATTGGAGGATCCATTTTAGCTTCCTAAGTACCITCCAACAG
Solyc11g005330 AGAAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGATCCATCCTTGCACTACTTAGCACCITCCAGCAG
Solyc03g078400 AGGAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGATCCATCCTTGCACTCCTCAGCACAITCCAGCAG
Solyc04g011500 AGGAAATACAGTGTCTGGATTGGAGGATCCATCTTGGCTTCCCTCAGCACCITCCAGCAG
Solyc05g054480 AGGAAATATAGTGTCTGGATTGGAGGATCCATTTTGGCTTCCCTCAGTACCITCCAGCAG
Solyc10g080500 AGGAAGTACAGTGTCTGGATCGGAGGATCCATTTTGGCTCCTCAGCACAITCCAGCAG
Solyc10g086460 AGGAAGTACAGTGTGTGATTGGAGGATCCATCTTGGCTCCTCAGTACCITCCAGCAG
Solyc00g017210 AGGAAATACTCTGTCTGGATTGGAGGATCCATCTTGGCTCCTCAGTACCITCCAGCAG
Solyc04g071260 AGGAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGATCCATCTAGCTTCCCTCAGTACTITCCAACAA
Solyc01g104770 CGGAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGATCCATCTAGCTTCCCTCAGCACCITCCAACAG
**..** : ** ** * ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

Б

```

Solyc11g065990 ATGTGGA TTGCA AAGGCCAGATATGATGAATCTGGTC CATCCATTGTGCATAGAAAATGC
Solyc06g076090 ATGTGGA TTGCA AAGGCCAGATACGATGAATCTGGCCCTTCCATCGTCCACAGGAAATGC
Solyc11g005330 ATGTGGA TTGCA AAGGCCAGATACGACGAGTCTGGTCCATCCATTGTCCACAGGAAATGC
Solyc03g078400 ATGTGGA TCTCA AAGGCCAGATATGATGAGTCTGGTCTTCCATTGTCCACAGAAAATGC
Solyc04g011500 ATGTGGA TTGCA AAGGCCAGATATGACGAATCTGGTCCCTTATTGTCCACAGGAAATGC
Solyc05g054480 ATGTGGA TTGCA AAGGCCAGATACGATGAATCAGGTC CGTCCATCGTCCACAGAAAATGC
Solyc10g080500 ATGTGGA TAGCTAAGGCCAGATATGATGAATCTGGACCTTCAATCGTCCACAGGAAATGC
Solyc10g086460 ATGTGGA TTGCA AAGGCCAGATTTGATGAGTCTGGCCATCAATTGTGCATAGGAAATGC
Solyc00g017210 ATGTGGA TCGCA AAGGCCAGATATGACGAGTCAAGTCCATCGATTGTTCCACAGGAAATGC
Solyc04g071260 ATGTGGA TAACGAAGGCCAGATATGATGAATCTGGTCCAGCAATTGTCCATAGGAAATGC
Solyc01g104770 ATGTGGA TTACGAAGGGTGAATATGATGAATCTGGCCCTTCCATTGTCCACCGTAAATGC
***** * **** ** : ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

Рис. 3.48. Фрагмент вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів актину *S. lycopersicum*, що оточують III-й інтрон. А – можливе розташування форвардного праймеру; Б – можливе розташування реверсного праймеру.

З метою дизайну універсальної пари вироджених праймерів для оцінки поліморфізму інтронів генів актину у різних видів рослин, було проведене множинне вирівнювання всіх відібраних послідовностей генів актину у геномах *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*.

В результаті були виявлені найбільш консервативні ділянки 2-го та 3-го екзонів, які в подальшому були використані для дизайну універсальних праймерів (рис. 3.49, 3.50).



Рис. 3.49. Фрагмент вирівнювання всіх послідовностей генів актину. Темно-сірим виділена ділянка другого ексона; А – можливе розташування форвардного праймеру.

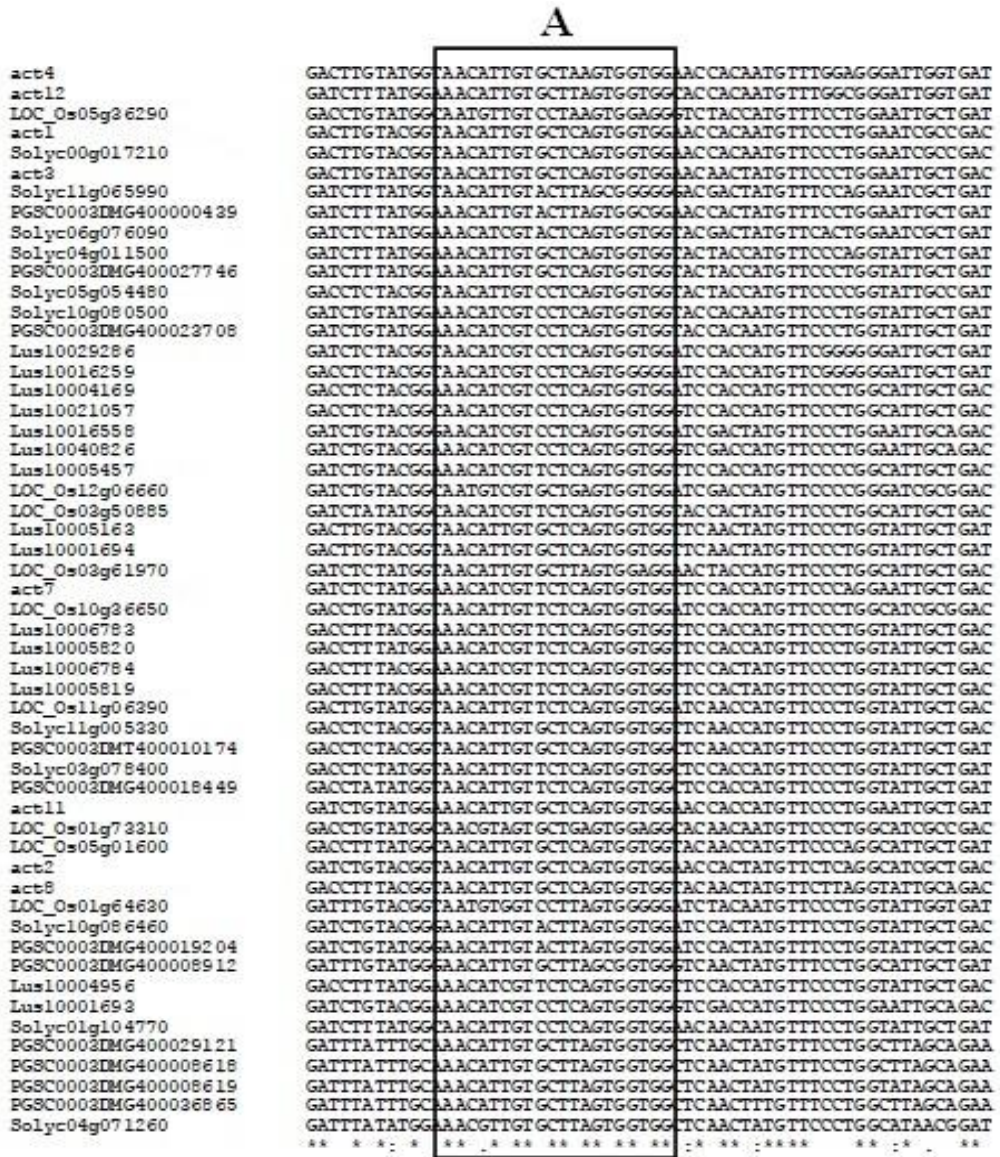


Рис. 3.50. Фрагмент вирівнювання всіх послідовностей генів актину. Світло-сірим виділена ділянка третього ексона; А – можливе розташування реверсного праймеру.

Отже, вдалося створити праймери для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в межах кожного модельного виду, а також були розроблені та синтезовані універсальні АВР (actin base polymorphism) праймери для оцінки поліморфізму II-го інтрону генів актину у всіх видів рослин.

В цілому, за результатами проведеного біоінформатичного аналізу були підібрані праймери для дослідження поліморфізму інтронів різних генів, що кодують білки цитоскелету клітини (табл. 3.22).

Таблиця 3.22

Праймери підібрані для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів білків цитоскелету рослин

Назва праймеру	Послідовність прямого та зворотнього праймерів (5'-->3')	Вид рослини	Інтрон	Температура відпалу (°C)	Приблизний (розрахунковий) розмір ампліконів (п.н.)
α-тубулін					
TUA_Ath_1in	F: GAG CTK TAY TGT CTY GAA CAT R: TGG AAA AGY TGW CKG TAA GT	<i>A. thaliana</i>	I	55	359, 616, 281, 608, 282, 397
TUA_Osat_1in	F: GCT GGG ARC TMT AYT GCC TCG A R: ATG AGC TGC TCW GGG TGG AAG	<i>O.sativa</i>	I	64	1130, 1112, 673, 1166
TUA_Lus_1in	F: AGC TTT ACT GCC TCG ARC ATG R: CCA GTY TCR CTG AAR AAS GTG TT	<i>L. usitatissimum</i>	I	60	531, 507, 441, 562
TUA_Stub_1in	F: GCC GGW ATY CAG GTC GGM AA R: GCA TCA TCW CCY CCT CCA ASA GT	<i>S. tuberosum</i>	I	64	4569, 261, 197, 1376
TUA_Slyc_1in	F: ATT GGY CAG GCC GGW ATY CAG R: TTG AAD GCA TCA TCW CCY CCT CC	<i>S. lycopersicum</i>	I	64	1261, 1119, 227, 404
TUA_1in	F: TGG GAR CTN TAY TGY CTY GA R: TCR CTR AAR AAN GTR TTR AAN GMA TC	Універсальні	I	57	Для <i>A. thaliana</i> : 264, 566, 186, 513, 187, 302 Для <i>O. sativa</i> : 1014, 996, 540, 1050 Для <i>L. usitatissimum</i> : 556, 505, 439, 560 Для <i>S. tuberosum</i> : 4563, 255, 291, 1370 Для <i>S. lycopersicum</i> :

					1240, 1054, 206, 383
β-тубулін					
Ath_tub_1in	F: ATG GAT YTD GAG CCT GGD ACY ATG GA R: TTC CCA TWC CWG AHC CNG TKC CTC C	<i>A. thaliana</i>	I	67	982, 277, 279, 320, 1209, 283, 374, 318, 272
Ath_tub_2in	F: GAG GMA CNG GDT CWG GWA TGG GAA R: TCC ATD CCT CWC CTG TGT ACC AAT G	<i>A. thaliana</i>	II	66	850, 1263, 1245, 850, 841, 973, 902, 850, 870
Osat_tub_1in	F: AAC TGG GCC AAG GGV CAC TA R: CAT CAT BCK RTC VGG GTA CTC CTC	<i>O. sativa</i>	I	64	1299, 2284, 271, 902, 908, 440, 1015, 296
Osat_tub_2in	F: GAG GAG TAC CCB GAY MGV ATG ATG R: CAT CAT GTT CTT BGC RTC CCA CAT	<i>O. sativa</i>	II, окрім LOC_Os03g01530	66	412, 406, 726, 848, 870, 709, 1302
Lus_tub_1in	F: AAC TGG GCY AARG GHC ART ACA C R: GGG AAN ACH GAR AAH GTV AGC ATC AT	<i>L. usitatissimum</i>	I	64	1198, 1174, 569, 316, 643, 515, 814, 488, 318, 324, 311, 319
Lin_tub_II in	F: ATG ATG CTB ACD TTY TCD GTN TTC CC R: TTC TGS ACR TTR AKC ATC TGY TCG T	<i>L. usitatissimum</i>	II	64	440, 440, 432, 437, 847, 844, 869, 1079, 1066, 526, 438, 526
Stub_tub_I in	F: CAA GGW GGN CAA TGY GGN AAC CA R: CCC ATD CCD GAW CCW GTY CCW CC	<i>S. tuberosum</i>	I	66	288, 305, 303, 1041, 670, 1032, 1242, 865
Stub_tub_2in	F: GAR AAT GCW GAT GAR TGY ATG GT R: CAC ATC ATR TTY TTD GMA TCC CAC AT	<i>S. tuberosum</i>	II	62	486, 600, 568, 636, 624, 830, 843, 636
Slyc_tub_1 in	F: TGG TGC BGG DAA YAA YTG GG R: ACC ATR CAY TCA TCD GCR TTY TC	<i>S. lycopersicum</i>	I	62	1259, 411, 1140, 1229, 732, 452, 946, 390
Slyc_tub_2 in	F: GAR AAY GCH GAT GAR TGY ATG GT R: TCC ATY TCR TCC ATH CCT TCH CC	<i>S. lycopersicum</i>	II	63	368, 374, 523, 491, 739, 738, 437, 541, 823, 387
All_tub_1in	F: TGG GCB AAR GGN CAY TAY GAR GG R: CCC ATN CCV GAN CCH GTN CC	Універсальні	I	64	Для <i>A. thaliana</i> : 935, 230, 232, 273, 1162, 236,

					<p>327, 271, 225</p> <p>Для <i>O. sativa</i>: 1247, 2232, 219, 850, 856, 388, 963, 244</p> <p>Для <i>L. usitatissimum</i>: 1126, 1102, 497, 244, 571, 443, 742, 416, 246, 252, 239, 247</p> <p>Для <i>S. tuberosum</i>: 237, 254, 252, 990, 619, 981, 1191, 814</p> <p>Для <i>S. lycopersicum</i>: 1085, 237, 966, 1055, 558, 278, 772, 216</p>
All_tub_2in	<p>F: ATG GTK CTN AAY GAR GCN CT</p> <p>R: CAC ATT CAT BGM RTC CCA CAT</p>	Універсальні	II	57	<p>Для <i>A. thaliana</i>: 392, 805, 787, 392, 383, 515, 444, 392, 409</p> <p>Для <i>O. sativa</i>: 403, 397, 717, 534, 861, 700, 1293</p> <p>Для <i>L. usitatissimum</i>: 407, 407, 399, 404, 814, 811, 836, 1046, 1033, 493, 403, 493</p> <p>Для <i>S. tuberosum</i>: 408, 522, 490, 558, 546, 752, 765, 941</p> <p>Для <i>S. lycopersicum</i>: 392, 398, 547, 515, 763, 762, 461, 565, 847, 411</p>

Актин					
Act_Ath_1in	F: ATG GCN GAY GST GAD GAY ATT CA R: AGC TCR TTG TAG AAA GTR TGA TGC CA	<i>A. thaliana</i>	I, окрім act 2	64	423, 425, 378, 381, 359, 399, 369
Act_Ath_2in	F: GCA TCA YAC TTT CTA CAA YGA GCT R: CCA CCA CTD AGM ACR ATG TT	<i>A. thaliana</i>	II	60	387, 365, 370, 435, 373, 383, 442, 386
Act_Osat_2in	F: ATG GAG AAR ATH TGG CAY CAC AC R: ATA TCH ACR TCR CAC TTC ATG AT	<i>O. sativa</i>	II	60	485, 641, 466, 609, 469, 724, 660, 851, 506
Act_Lus_1in	F: CAG CCM CTH GTY TGY GAC AAT GG R: CCA THC CRA CCA TYA CRC CRG TGT	<i>L. usitatissimum</i>	I, окрім Lus10001693	67	473, 205, 216, 215, 207, 233, 226, 214, 233, 215, 218, 448, 222, 224
Act_Lus_2in	F: TGG CAT CAY ACN TTY TAC AAY GA R: CCM CCA CTD AGV ACR ATG TT	<i>L. usitatissimum</i>	II	64	716, 729, 752, 751, 732, 985, 945, 950, 1005, 945, 971, 737, 764, 822, 736
Act_Lus_3in	F: ATT GCW GAY MGD ATG AGC AAR GA R: AAG CAC TTC CTG TGR ACR ATB GA	<i>L. usitatissimum</i>	III, окрім Lus10004169 та Lus10021057	62	294, 681, 305, 308, 594, 285, 293, 285, 289, 294, 279, 293, 299
Act_Stub_2in	F: ATG GAR AAR ATH TGG CAT CA R: CTR ATA TCN ACR TCR CWY TTC AT	<i>S. tuberosum</i>	II, окрім PGSC0003DMG 400000439	55	1199, 1199, 1199, 1199, 1199, 1199, 914, 1241, 1247, 1229
Act_Slyc_2in	F: ATG GAG AAR ATH TGG CAT CA R: CTY ATY TCN ACY TCY CAR TTC AT	<i>S. lycopersicum</i>	II, окрім Solyc11g065990	57	458, 623, 418, 530, 410, 728, 407, 545, 819, 409, 405
Act_Slyc_3in	F: GCT CCN AGY AGY ATG AAR ATY AA R: TCN SCC TTH GHD ATC CAC AT	<i>S. lycopersicum</i>	III	59	222, 248, 215, 234, 227, 397, 219, 418, 206, 226, 201
Act_in	F: TGG CAT CAY ACN TTY TAC AAY GA R: CCM CCA CTT DAG VAC RAT GTT	Універсальні	II, окрім PGSC0003DMG	59	Для <i>A. thaliana</i> : 750, 728, 733, 798, 736,

			400000439 (<i>S. tuberosum</i>)		746, 805, 749 Для <i>O. sativa</i> : 743, 899, 724, 867, 727, 982, 1118, 764 Для <i>L. usitatissimum</i> : 737, 729, 749, 751, 732, 1005, 945, 950, 1005, 945, 971, 737, 764, 822, 736 Для <i>S.</i> <i>tuberosum</i> : 733, 738, 851, 870, 1129, 825, 873, 731, 727, 731 Для <i>S.</i> <i>lycopersicum</i> : 782, 947, 742, 854, 734, 1052, 731, 869, 1143, 733, 729
γ-тубулін					
TUG-in	F: GAY GTB TTY TTT TAC CAR GCK GA R: GAG TTG TAR GGY TGG ACR AC	Універсальні	II (<i>A. thaliana</i>) II+III (<i>Z. mays</i>) I+II (<i>L. usitatissimum</i>)	58	520 п.н. та 560 п.н. 687 п.н. 569 п.н.

РОЗДІЛ 4

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ ТА АКТИНУ

Генотипування сортів, ліній і гібридів сільськогосподарських рослин є важливим елементом сучасної селекції та насінництва. Наявність ДНК-паспорту суттєво полегшує ведення справ щодо захисту авторських прав на приватні сорти. Впровадження нових молекулярних маркерів, поряд з уже існуючими, які застосовуються для ідентифікації нових сортів рослин, дозволяє суттєво підвищити надійність результатів аналізу та скоротити строки їх генетичного моніторингу.

4.1. Генотипування однодольних рослин за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну

4.1.1. Генетична диференціація видів роду *Eleusine* L. з використанням поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну

Eleusine – невеликий рід, що об'єднує близько 10 видів одно- та багаторічних рослин родини злакові. Зустрічаються в тропічних і субтропічних країнах Азії та Африки. На особливу увагу заслуговує пальчасте просо (*E. coracana*), яка з давніх часів вважається цінною зерною і кормовою культурою в Африці та Індії. Для багатьох народів тропічної Азії та Африки вона є основною їжею, що замінює рис, просо, сорго. Відома вона і як лікарська рослина. У посушливих і напівпосушливих районах Південно-Східної Азії, Індії, Індонезії, Африки, Китаю, Японії, Південної і Північної Америки *E. coracana* займає значні посівні площі. Однак попри всі переваги, ця культура довгий час ігнорувалась. Проте останнім часом, у зв'язку з розвитком геномних технологій, розуміння механізмів стресостійкості та

використання генів для покращення зернових культур, її почали активно досліджувати та впроваджувати в сільське господарство і в ряді європейських країн [155]. Зрошувані землі півдня України, північного Кавказу і частково Середньої Азії визнані перспективними для вирощування пальчастого проса як зернофуражної посухостійкої культури. В Україні ця культура інтродукована в Національному ботанічному саду ім. М. М. Гришка НАН України [411]. Елевсина індійська або гусяча трава (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) є диким родичем Елевсини коракан (*E. coracana*). Як бур'ян зустрічається на Закавказзі, Середній Азії та в Америці [298]. Проте насіння та молоді рослини гусячої трави є їстівними, тому вона може розглядатися як перспективна кормова рослина.

E. coracana – тетраплоїд ($2n=4x=36$). За морфологічними ознаками схожа з *E. africana* ($2n=36$) та *E. indica* ($2n=18$). Вважається, що *E. indica* – донор одного з геномів (AA) культурного виду *E. coracana* (AABB) [74]. На сьогодні вже є роботи, де за допомогою молекулярних маркерів (здебільшого SNP, SSR, ISSR) охарактеризовано ці види рослин [17, 90, 121, 131, 194, 266, 319, 407], проте робіт із застосуванням ILP-маркерів досі небагато [36]. На даний момент все ще недостатньо інформації щодо будови геному пальчастого проса, що дуже обмежує дослідження її генетичного поліморфізму та диференціації за допомогою молекулярно-генетичних маркерів. Тому оцінка генетичного різноманіття вище зазначених видів, а також філогенетичних взаємовідносин між ними за допомогою молекулярно-генетичних маркерів, зокрема на підставі аналізу поліморфізму інтронів генів, є дуже актуальним завданням [407].

Було продемонстровано диференціюючу здатність ТВР-методу на сортах української селекції роду *Eleusine* (Рис. 4.1). Проаналізовано 2 сорти (Тропіканка та Євгенія), два соматоклональні варіанти (SE-1, SE-4), а також 2 генотипи (CAL 4A-21, CAL 4A-1) *E. coracana* та 1 дику (природну) популяцію *E. indica*. До того ж, хоча частина ампліконів є однаковою для всіх зразків, імовірно через те, що вони є специфічними для роду *Eleusine*,

відмінності легко помітні як між різними видами, так і між сортами в межах одного виду.

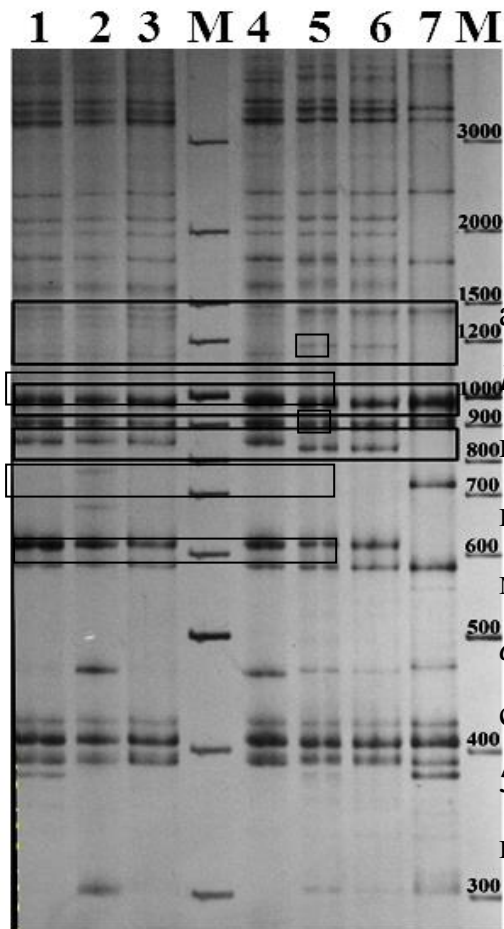


Рис. 4.1. Електрофореграма з ампліконами інтронів гена β -тубуліну *Eleusine*. Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; к – контроль; 1–7 (у верхній частині малюнка) – номери зразків. 1–4: *E. coracana* (Тропіканка, Євгенія, соматоклональні варіанти SE-4 та SE-1), 5–7: *E. indica* (CAL 4A-21, CAL 4A-1, природна (дика) популяція);

Результати електрофоретичного аналізу свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються продукти довжиною від 100 до 4440 п.н. Однак більш чіткі смуги розташовуються в діапазоні від 370 до 4440 п.н. Відмінність між двома видами полягає в тому, що у *E. coracana* спостерігаються смуги 855 п.н., 1190 п.н., 1440 п.н, а у *E. indica* – 830 п.н., 980 п.н., 1410 п.н. Крім того, смуга 450 п.н. є у всіх зразків *E. indica*, а у *E. coracana* тільки у сортів Євгенія, Тропіканка і соматоклонального варіанту SE-1. Найбільші відмінності від інших рослин має зразок *E. indica* (природна популяція) – у нього відсутній цілий ряд ампліконів, характерних для виду *E. coracana*: 610 п.н, 830 п.н, 980 п.н, 1575 п.н., 2130 п.н., 2370 п.н., 3640 п. н. ; та є унікальні фрагменти – 370 п.н., 560 п.н., 735 п.н.

Отже виявляється, що для диференціації видів роду *Eleusine* достатньо використовувати лише I-й інтрон гена β -тубуліну. Коефіцієнт генетичної дистанції Нея (D_N) дорівнював нулю між двома генотипами *E. indica* (CAL 4A-21, CAL 4A-1), а максимальне його значення виявилось між сортом Євгенія *E. coracana* та природною популяцією *E. indica* – 0,487. Коефіцієнт подібності Нея та Лі варіював від 0,591, між сортом Євгенія *E. coracana* та природною популяцією *E. Indica*, до 1 – між двома генотипами *E. Indica*: CAL 4A-21 та CAL 4A-1.

Отже можна з впевненістю заключити, що ТВР-аналіз може бути успішно застосований для молекулярно-генетичних досліджень представників роду *Eleusine*, в тому числі для маркування генотипів та оптимізації довготривалого традиційного селекційного процесу.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.1.1 наведено в публікації:

Рабокoнь АН, Пирко ЯВ, Демкович АЕ, Блюм ЯБ. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. Молекулярная и прикладная генетика (Минск). 2015; 19: 35–44. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

4.1.2. Генотипування *Aegilops biuncialis* Vis. за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну

Ae. biuncialis Vis. ($2n = 4x = 28$ хромосом) – дикий родич пшениці, який є природним джерелом корисних ознак для покращення її агрономічних характеристик. *Ae. biuncialis*, що зростає в посушливих місцях, володіє кращою, ніж у пшениці, посухостійкістю і може бути використаний для створення більш посухостійких сортів пшениці [361]. Було встановлено, що *Ae. biuncialis* є стійким до деяких хвороб злаків, зокрема іржі [72], вірусу

жовтої карликовості ячменю [216]. Під час селекційної роботи при формуванні колекцій ресурсів диких видів та оцінці генетичного різноманіття популяційних генофондів необхідні більш прості експрес-методи аналізу, засновані на вивченні структурно-функціональної організації генів. Отже важливим було оцінити можливості застосування поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, в генетичних дослідженнях виду *Ae. biuncialis* на основі аналізу 15 кримських популяцій цього виду, а також порівняти диференціюючу здатність ТВР-методу та його модифікацій між собою на даному об'єкті.

В результаті проведеного ТВР-аналізу було виявлено смуги розміром 395 п.н. – 3900 п.н. Більш чіткі смуги візуалізуються в межах 395–433 п.н., 673–706 п.н., 843–907 п.н., 1764–3900 п.н. Діапазон смуг від 1000 до 1700 п.н. – досить нечіткий, тому ці амплікони не аналізувалися. Всього було виявлено 27 смуг, 6 з яких виявилися мономорфними для всіх 15 зразків *Ae. biuncialis*, (396 п.н., 408 п.н., 427 п.н., 860 п.н., 1766 п.н., 1885 п.н.) Таким чином всього було виявлено 21 поліморфний фрагмент ДНК. На Рис. 4.2 зображено електрофореграму зі смугами в діапазоні від 395 п.н. до 3900 п.н., що були отримані для різних зразків *Ae. biuncialis*.

Більшість досліджуваних зразків характеризувались своїм специфічним набором ампліконів, відмінності між якими базуються як на присутності специфічних смуг, так і на їх відсутності. Наприклад, зразок НК_ММВ-1 відрізняється від зразка НК_ММ7-3 наявністю 12, 19, 20, 21 смуг та відсутністю 5, 11, 14, 17 смуг (табл. 4.3).

Дані фінгерпринтингу за першим інтроном гена β -тубуліну були використані для здійснення кластерного аналізу за допомогою методу UPGMA (рис. 4.2) та розрахунку значень PIC. З отриманої дендрограми видно, що більшість генотипів *Ae. biuncialis* відрізняються за своїми молекулярними профілями. Середнє значення PIC (за формулою 1 для біалельних маркерів) для 21 поліморфного фрагмента складає 0,320.

Коефіцієнт Нея і Лі коливався від мінімуму 0,2 у зразках NK_010 та NK_B1-1 до максимуму 1.

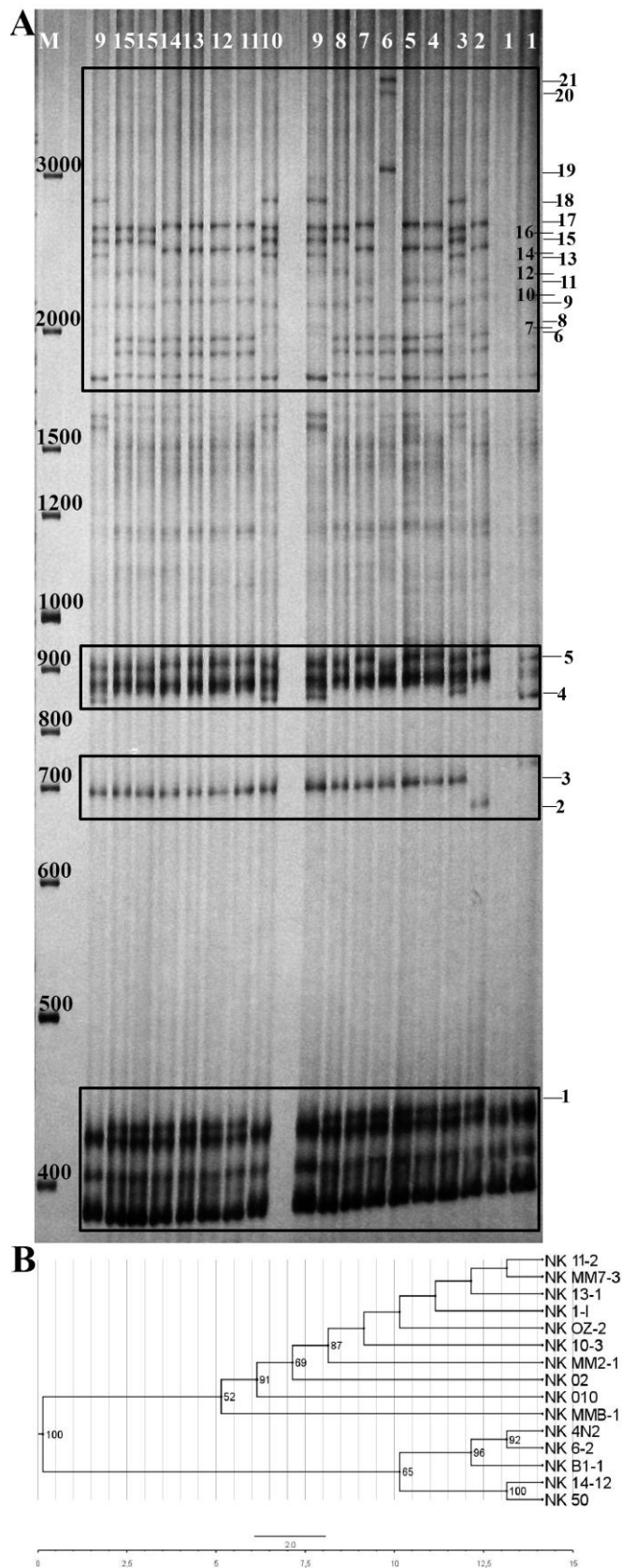


Рис. 4.2.

A. Електрофореграма з ампліконами інтронів гена β -тубуліну кримських популяцій *Ae. biuncialis* (ТВР-аналіз).

Прямокутниками виділені поліморфні зони; м – маркер; 1–15 (зверху) – номери зразків; 1–21 (збоку) – номери смуг.

B. Дендрограма UPGMA, що базується на ТВР-фрагментах досліджених генотипів *Ae. biuncialis*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки зразків, %.

Результати кластерного аналізу матриць коефіцієнтів подібності Нея та Лі для ТВР-методу виявили, що з 100% бутстреп-підтримкою зразки диференціюються на дві групи: NK_11-2, NK_MM7-3, NK_13-1, NK_1-1, NK_0Z-2, NK_10-3, NK_MM2-1, NK_02, NK_010, NK_MMB-1 та NK_4N2, NK_6-2, NK_B1-1, NK_14-12, NK_50. Цей поділ може відображати масивний географічний бар'єр для двох груп популяцій виду. Перша група зразків характеризується високою підтримкою галуження– 92% – 100% бутстреп-підтримки (NK_4N2, NK_6-2, NK_B1-1, NK_14-12, NK_50). Можливо, зразки цієї групи мають близьке географічне розташування. Друга група зразків не має явної структурованості. В ній виокремлюються 6 зразків (NK_11-2, NK_MM7-3, NK_13-1, NK_1-1, NK_0Z-2, NK_10-3), які не мають явного злиття всередині групи, із зразком NK_MM2-1(87% бутстреп-підтримки), який може бути представником їх батьківської популяції. Далі йде «драбина» зі зразками NK_02, NK_010 та NK_MMB-1 з досить високою бутстреп-підтримкою. Така картина часто проявляється за наявності міграційних процесів на популяційному рівні.

Отже, отримані результати свідчать про те, що за допомогою стандартного ТВР-методу можна досить чітко диференціювати популяції *Ae. biuncialis*.

За допомогою hТВР-аналізу зразків з кримських популяцій *Ae. biuncialis* було виявлено 24 відтворювані чіткі смуги в діапазоні від 466 п.н. до 3400 п.н., 21 з яких виявилися поліморфними. Характерно, що у всіх зразків спостерігається лише 1 мономорфна смуга в районі 1244 п.н. В ПЛР-продуктах для зразків NK_B1-1, NK_11-2 і NK_0Z-2 спостерігається фрагмент розміром 486 п.н. Однак він був виключений з подальшого аналізу, оскільки відтворюваність його складала менше 50%. Так само для аналізу не враховувалися нечіткі смуги, зафіксовані в інших діапазонах розмірів фрагментів. Чіткі смуги мали приблизні розміри 473–538 п.н, 657–693 п.н., 1168–1430 п.н. та 2313–3340 п.н. (рис. 4.3).

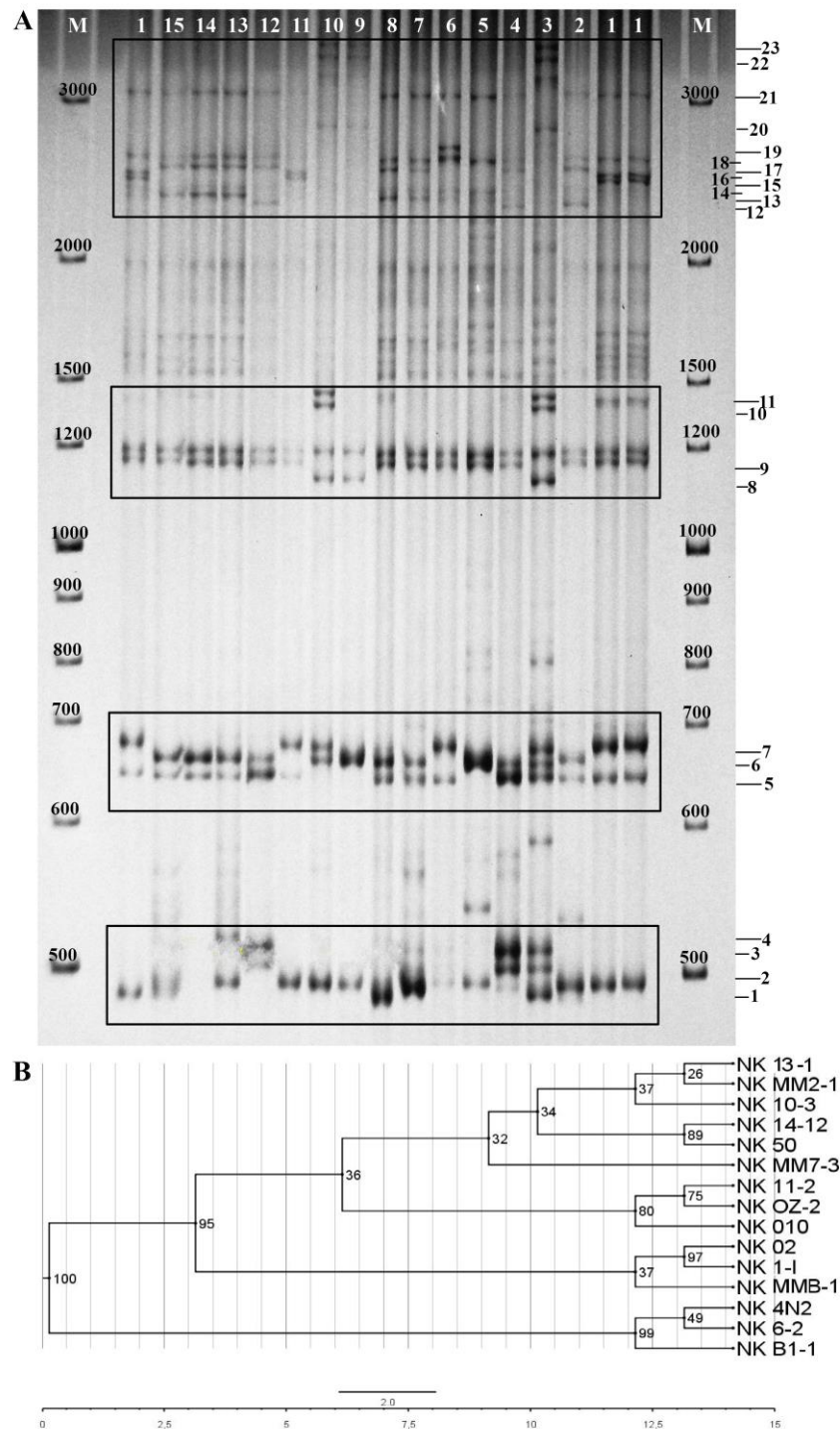


Рис. 4.3. **А** Електрофореграма з ампліконами, що містять інтрони генів β -тубуліну, досліджених популяцій *Ae. biuncialis* (hTBP-аналіз). Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; 1–15 (зверху) – номери зразків; 1–23 (збоку) – номери смуг. **В** Дендрограма UPGMA, побудована на підставі аналізу поліморфних hTBP-фрагментів досліджених зразків *Ae. biuncialis*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %

Всім поліморфним смугам ТВР- та hТВР-профілів були надані номери в порядку збільшення їх довжини (табл. 4.1). Для кожного зразку виявився свій специфічний набір смуг. Це означає, що за набором поліморфних фрагментів ДНК кожен зразок виявився унікальним і відрізнявся хоча б однією смугою (як її наявністю, так і її відсутністю) від інших зразків. Значення PIS склало 0,309. На рис. 4.3 показана дендрограма, отримана за допомогою проведеного кластерного аналізу. Коефіцієнти подібності Нея та Лі варіюють від 0,111 між зразками NK_B1-1 і NK_MM7-3, NK_50 і NK_4N2, NK_4N2 і NK_14-12 до 1 між зразками NK_11-2 та NK_OZ-2, NK_50 та NK_14-12.

Таблиця 4.1

ТВР- та hТВР-профілі кримських популяцій *Ae. biuncialis*

Назва зразка	Номера смуг	Назва зразка	Номера смуг
ТВР-профіль			
NK 02	3, 4, 5, 6, 10, 11, 14, 17	NK 6-2	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 18
NK 010	1, 2, 5, 6, 10, 14, 17	NK 4N2	3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 18
NK B1-1	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18	NK 1-1	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17
NK 11-2	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17	NK OZ-2	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17
NK MM7-3	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17	NK 10-3	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17
NK MMB-1	1, 3, 6, 10, 12, 19, 20, 21	NK MM2-1	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17
NK 13-1	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17	NK 14-12	1, 3, 5, 6, 9, 12, 15, 16
NK 50	1, 3, 5, 6, 9, 12, 15, 16	Total:	21 polymorphic bands
hТВР-профіль			
NK 02	2, 5, 7, 9, 15, 16, 18, 21	NK 6-2	2, 6, 8, 20, 22, 23
NK 010	2, 5, 6, 9, 12, 17, 18, 21	NK 4N2	2, 6, 7, 8, 10, 11, 20, 22, 23
NK B1-1	1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 20, 22, 23	NK 1-1	2, 5, 7, 9, 15, 16, 18, 21, 23
NK 11-2	2, 3, 5, 6, 9, 12, 17, 18, 21	NK OZ-2	2, 3, 5, 6, 9, 12, 17, 18, 21
NK MM7-3	2, 6, 9, 13, 14, 18, 21	NK 10-3	2, 4, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21

Продовження табл. 4.1

NK MMB-1	2, 5, 7, 9, 13, 14, 18, 19, 21	NK MM2-1	2, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21
NK 13-1	2, 3, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21	NK 14-12	1, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21
NK 50	1, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21	Total:	23 polymorphic bands

Дендрограма, побудована на підставі результатів hTBP-аналізу, дещо відрізняється від попередньої (рис. 4.2). Разом з тим, кластер популяцій *Ae. biuncialis* NK_B1-1, NK_6-2, NK_4N2 однаково і з великим рівнем бутстреп-підтримки відтворюється на основі обох типів TBP-маркерів (TBP, hTBP). Група зразків NK_14-12–NK_50 зберігає високу бутстреп-підтримку (95%), але розташовується в іншому кластері, до якого належать зразки, які раніше не мали нічого спільного. Таким же чином кластер зразків NK_MMB-1–NK_02–NK_1-I (з 95% бутстреп-підтримкою) складається із зразків, що за іншими видами TBP-аналізу не утворювали спільний кластер на будь-якому значимому рівні. Це пов'язано з більшою диференційною здатністю hTBP-аналізу.

Для досліджуваних зразків *Ae. biuncialis* здійснено також сTBP-аналіз. Було виявлено найбільшу кількість (42 чітких відтворюваних фрагменти) в діапазоні від 395 п.н. до 2880 п.н., 29 з яких виявилися поліморфними. Мономорфними було 14 смуг, які мали приблизний розмір 360 п.н., 365 п.н., 375 п.н., 378 п.н., 475 п.н., 595 п.н., 620 п.н., 875 п.н., 1280 п.н., 1865 п.н., 2000 п.н., 2230 п.н. та 2550 п.н.. Середнє значення PIS становить 0,231. Цей показник є дещо нижче від значень PIS, отриманих за допомогою TBP- та hTBP-аналізу (приблизно 0,3). Це пояснюється тим фактом, що під час сTBP-аналізу утворюється значно більше фрагментів (42), як поліморфних так і мономорфних. Проте їх можна вважати високими з урахуванням того, що для будь-якого біалельного маркера максимальна оцінка PIS складає 0,5 [36].

На основі отриманих профілів зразків було побудовано UPGMA-дендрограму (рис. 4.4). Майже всі зразки диференціюються один від одного з високим відсотком бутстреп-підтримки. Виняток – це зразки NK_11-2, NK_13-1, NK_OZ-2 та NK_10-3, що утворюють спільну гілку,

виокремлюючись від зразка NK_MM2-1 (67 % бутстреп-підтримка). Крім того, між даними зразками коефіцієнт подібності Нея та Лі має максимальне значення – 1. Мінімальне значення коефіцієнта – 0,6 – спостерігається між двома зразками NK_V1-1 та NK_02.

Древо, що побудоване на підставі результатів сТВР-аналізу (рис. 4.4) є дуже подібним до hТВР дендрограми (див. рис. 4.3).

Загалом всі зразки поділяють на три великі групи. Першу (зі 100% бутстреп-підтримкою) утворюють три зразки NK_4N2, NK_6-2 та NK_V-1, як і у випадку з hТВР. Другу групу також формують NK_02, NK_1-I та NK_MMB-1, однак вже з меншою бутстреп-підтримкою – 63%. В третю групу увійшли всі інші зразки, проте вони добре диференціюються один від одного. В цілому характер кластеризації досліджених зразків *Ae. biuncialis* з використанням різних типів ТВР-маркерів дещо відрізняється, хоча групи зразків, що мають найбільшу бутстреп-підтримку, зберігаються.

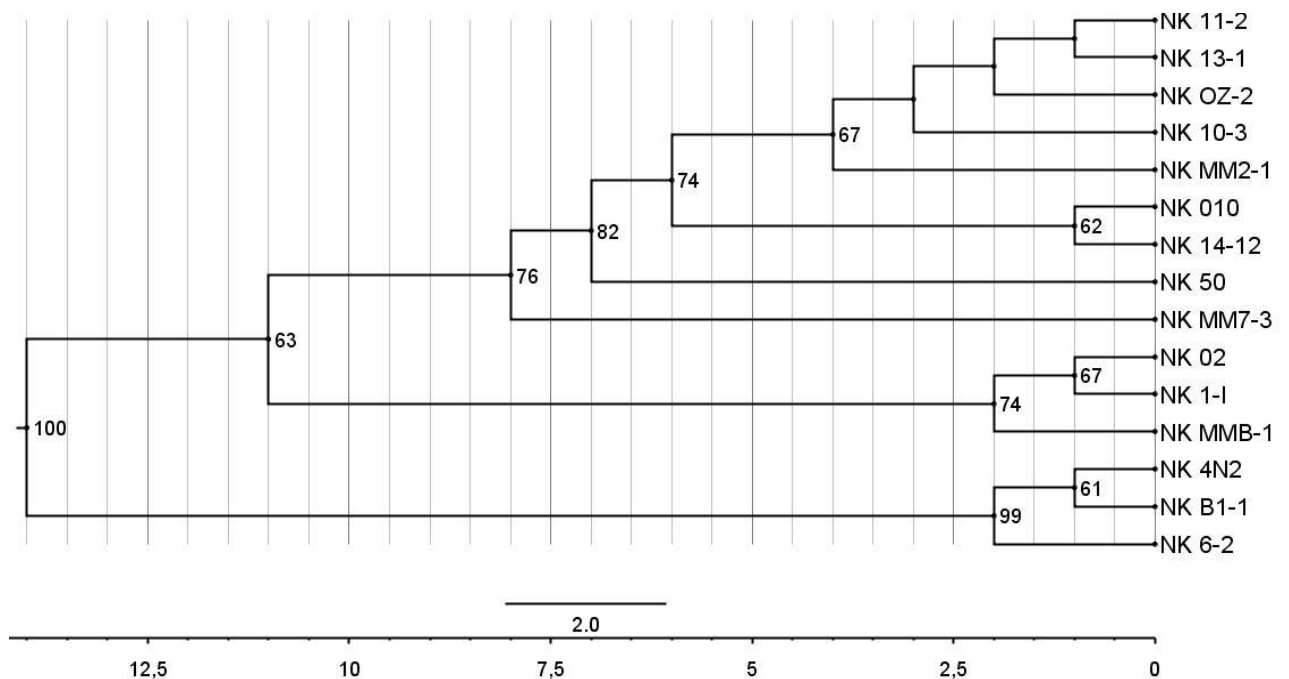


Рис. 4.4. Дендрограма UPGMA, побудована на підставі аналізу поліморфних сТВР-фрагментів досліджених зразків *Ae. biuncialis*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %

Таким чином, результати сТВР-аналізу *Ae. biuncialis* свідчать на користь високої диференціюючої здатності даної модифікації цього методу та можливість її використання окремо або у поєднанні з іншими методами оцінки генетичного поліморфізму цього виду рослин та фінгерпринтингу його природних популяцій.

Отже, при вивченні зразків *Ae. biuncialis* з кримських популяцій за допомогою різних ТВР-методів виявлено досить високий рівень генетичного поліморфізму, який може бути ефективно використаний для диференціації генотипів *Ae. biuncialis* та бути корисною для подальших досліджень в області молекулярної генетики егілопсів, зокрема, їх маркер-залежної селекції, що може значно оптимізувати важкий селекційний процес.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.1.2 наведено в публікаціях:

1. Rabokon A, Demkovich A, Sozinov A, Kozub N, **Pirko Ya**, Blume Ya Intron length polymorphism of v-tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. Cell. Biol. Int. 2017; 43(9): 1031-1039. DOI: 10.1002/cbin.10886 (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

2. Rabokon A, **Pirko Ya**, Kalafat L, Kozub N, Sozinov I, Demkovych A, BlumeYa The second intron length polymorphism of v-tubulin genes of *Aegilops biuncialis*. Abstract of the 7th Baltic Genetics Congress, October 24-27, Riga. 2018, p.243.

4.1.3. Оцінка генетичної різноманітності природних популяцій *Aegilops biuncialis* за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів актину

Аналіз популяцій *Ae. biuncialis* показав стабільне утворення фрагментів з інтронами генів актину, які розподілялися в межах від 600 до 2000 п. н.,

утворюючи специфічні ДНК-профілі. Найбільша кількість ампліконів з інтронами розподілилася в діапазоні від 600 п. н. до 1000 п. н. В кожному проаналізованому зразку *Ae. biuncialis* утворювалось від 10 до 14 фрагментів. В межах даної вибірки лише 4 зони з ампліконами інтронів були мономорфними, а саме з довжинами близько 709 п. н., 745 п. н., 761 п. н. та 815 п. н. Саме наявність цих фрагментів в ДНК-профілях всіх зразків може свідчити про їх приналежність до одного виду. Однак, переважна більшість фрагментів виявилися поліморфними, оскільки їх розподіл та кількість значно відрізнялися між проаналізованими популяціями *Ae. biuncialis*. Наприклад, популяція НК 02 (рис. 4.5, зразок 1) відрізняється від всіх інших досліджених популяцій, оскільки вона має два унікальні фрагменти з довжинами близько 697 п. н. та 1424 п. н., і зовсім відсутні амплікони в діапазоні від 1000 до 1200 п. н. На електрофореграмі розташування поліморфних фрагментів позначене стрілками. Варто зазначити, що трикратне повторення аналізу не призвело до появи нових ампліконів або зміни ДНК-профілів, що свідчить про відсутність продуктів неспецифічного зв'язування праймерів під час ПЛР.

Було встановлено, що кожен з проаналізованих зразків *Ae. biuncialis* має унікальний алельний фенотип. Загалом, виявлено 14 алельних фенотипів, що характеризує дану популяційну вибірку *Ae. biuncialis* як високо гетерогенну та генетично-неоднорідну. Дані, отримані з використанням ДНК-маркерної системи, що заснована на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів актину, підтверджують дані, отримані з використанням інших ДНК маркерів, зокрема AFLP, ISSR, TBP [171, 287]. Наприклад, під час аналізу цих популяцій за допомогою TBP вдалося диференціювати зразки на дві групи (НК_50, НК_14-12, НК_В1-1, НК_6-2, НК_4N2 та НК_ММВ-1, НК_010, НК_02, НК_ММ2-1, НК_10-3, НК_0Z-2, НК_1-1, НК_13-1, НК_ММ7-3, НК_11-2), що може бути пов'язано з існуванням географічного бар'єру для двох груп популяцій виду. Перша група зразків характеризується високою підтримкою галуження, так зразки НК_50–НК_14-12 – 100%

бутстреп-підтримки, NK_6-2–NK_4N2 – 92% бутстреп-підтримки, (NK_6-2–NK_4N2)–NK_B1-1 – 96% бутстреп-підтримки. Можливо, зразки цієї групи мають близьке географічне розташування.

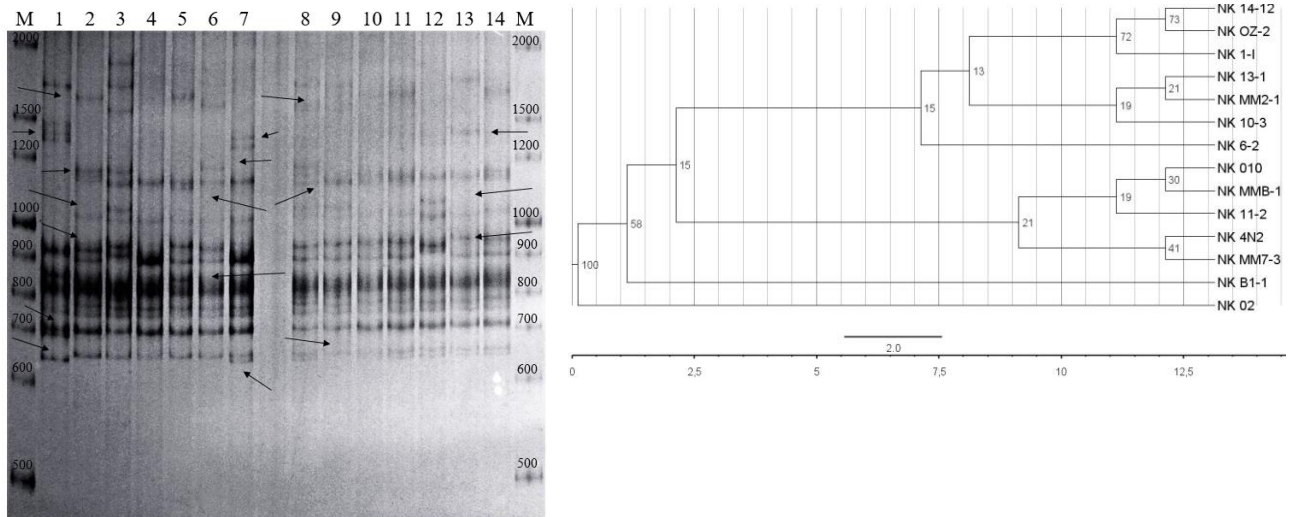


Рис. 4.5. А Електрофореграма з ампліконами, що містять інтрони генів актину у зразків *Ae. biuncialis*. 1 – 14 (у верхній частині рисунків) – номери зразків: 1 – NK 02, 2 – NK 010, 3 – NK B1-1, 4 – NK 11-2, 5 – NK MM7-3, 6 – NK MMB-1, 7 – NK 13-1, 8 – NK 6-2, 9 – NK 4N2, 10 – NK 1-I, 11 – NK OZ-2, 12 – NK 10-3, 13 – NK MM2-1, 14 – NK 14-12, М – маркер молекулярної довжини O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™). Стрілками позначені поліморфні зони. Б Дендрограма UPGMA, що базується на аналізі поліморфізму інтронів генів актину у досліджених генотипів *Ae. biuncialis*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки зразків, %

В той же час кластеризація зразків за поліморфізмом інтронів генів актину (рис. 4.5, Б) не показала однозначної диференціації на групи. Більше того, характер кластеризації відрізняється від того, що було отримано під час ТВР-аналізу. Чітка диференціація за інтронами актину простежується для зразків NK_14-12, NK_0Z-2, NK_1-1 (високий рівень бутстреп – підтримки). Також з високим рівнем бутстреп – підтримки диференціюються зразки

NK_02 та NK_B1-1. В той же час якихось закономірностей в характері кластеризації досліджених зразків егілопсів встановити не вдалося.

В цілому метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину продемонстрував здатність генотипувати природні популяції *A. biuncialis*. Виявлено спільні фрагменти інтронів генів актину, які характеризують досліджувані зразки як представників одного виду. Вдалося ідентифікувати велику кількість поліморфних зон, що дозволило оцінити ДНК-профілі кожної з популяцій. Отже, ДНК-маркери, які оцінюють поліморфізм довжини інтронів генів актину, виявилися придатними для генотипування природних популяцій *A. biuncialis* і можуть бути використані у подальшому молекулярно-генетичному аналізі й інших злакових культур. В той же час, якщо порівнювати його з ТВР-аналізом, то поліморфізм інтронів генів актину виявився гіршим інструментом щодо диференціації природних популяцій егілопсів, тому може бути рекомендований як додатковий метод аналізу.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.1.3 наведено в публікації:

Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як новий метод для оцінки генетичного поліморфізму різних природних популяцій *Aegilops biuncialis*. Третя конференція молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія»; 2017 трав. 16–18; Київ. Київ: ДУ «ІХБГ НАН України»; 2017: 61–62.

4.1.4. Генетичне профілювання острівних популяцій *Deschampsia antarctica* E. Desv. за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну

Deschampsia antarctica E. Desv. є одним з двох видів судинних рослин Антарктики. Ареал виду в Антарктиці є дуже протяжний в широтному напрямі та складається значною мірою з ізольованих острівних популяцій. Ця

рослина зростає в екстремальних умовах довкілля і змушена адаптуватися як до локальної мозаїки мікрокліматів, так і до глобальних екологічних змін. Зростання за таких умов здатне зумовити появу змін у геномі, які можуть проявлятися на молекулярно-генетичному рівні.

Нещодавно з району Аргентинських островів були описані нові хромосомні форми *D. antarctica* [244, 464]. Водночас використання AFLP та хлоропластних маркерів показало доволі низьку генетичну гетерогенність виду в морській Антарктиці [55, 376]. Отже актуальним є подальше дослідження генетичних відмінностей між популяціями, що зростають у різних мікрокліматичних умовах (на різних островах).

Однією з задач було розробити власні праймери для ампліфікації другого інтрону гена β -тубуліну *D. antarctica* і за допомогою різних варіантів ТВР-аналізу дослідити молекулярно-генетичні відмінності між різними популяціями цього виду в Антарктиці. Відповідно, для оцінки поліморфізму другого інтрону генів β -тубуліну у *D. antarctica* використали власноруч розроблені специфічні праймери з урахуванням інформації, яка міститься у геномних базах даних (рис. 3.21).

В роботі використовували зразки ДНК, яка була виділена з рослин *D. antarctica* з різних популяцій, що зростають на о. Галіндез, о. Скуа, о. Ялур, о. Расмусен, о. Дарбо, о. Берселот, о. Уругвай та о. Пітерман (рис. 4.6).

Для ТВР-методу було отримано 12 чітких та відтворюваних фрагментів у діапазоні приблизно від 295 пар нуклеотидів (п. н.) до 1300 п.н.; для hТВР – 6 фрагментів у діапазоні від 1100 п.н. до 1700 п.н.; для сТВР з використанням вироджених праймерів – 17 фрагментів в діапазоні від 320 п.н. до 1750 п.н.; для с-ТВР із специфічними праймерами (власнорозробленими) – 8 фрагментів від 345 п.н. до 1180 п.н. Слід зазначити, що за умов аналізу сТВР як з використанням вироджених, так і специфічних праймерів, ампліфікуються майже ті ж самі фрагменти (виняток – фрагменти 700 п.н. та 750 п.н. при специфічному сТВР і 4 фрагменти, що групуються попарно (705 – 715 п.н. та 760 – 780 п.н.) при звичайному сТВР. В обох випадках

спостерігаються один чи два чітких фрагмента, що знаходяться вище 3000 п.н., але вони не враховувалися під час проведення аналізу. Цікаво, що кількість отриманих фрагментів у двох методах дещо відрізняється.

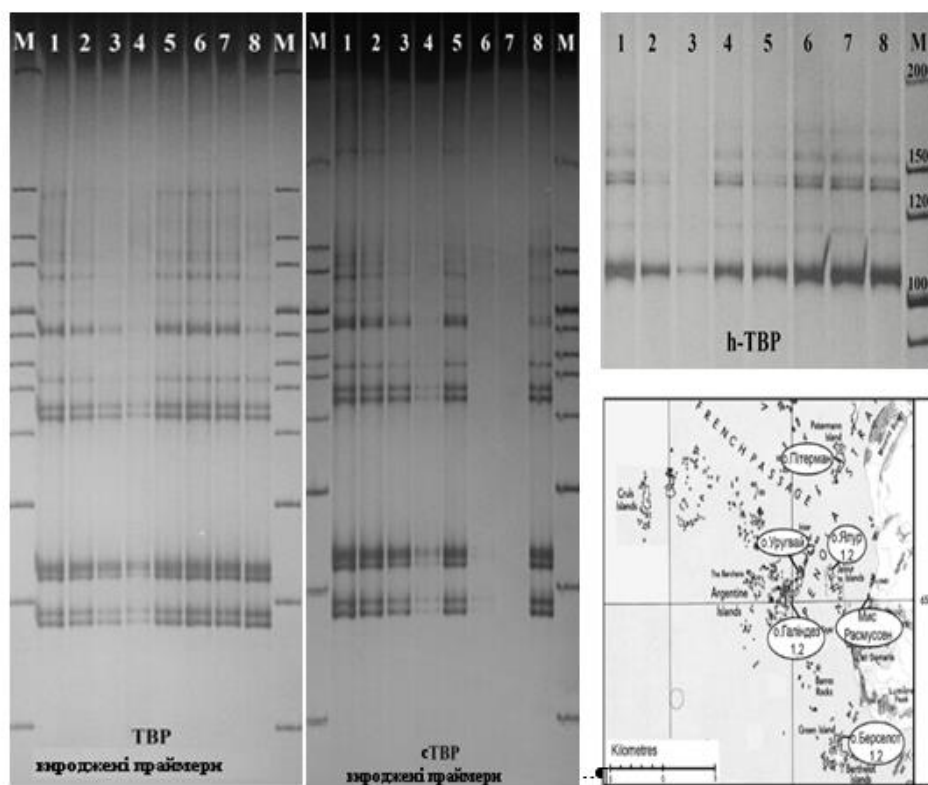


Рис. 4.6. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів бета-тубуліна вивчених популяцій *D. antarctica*: м – ДНК-маркер, 1-8 (зверху)- номери зразків з різних популяцій: 1 - о. Галиндез; 2 - о. Скуа; 3 - о. Ялур; 4 - о. Расмусен; 5 - о. Дарбо; 6 – о. Берселот; 7 – о. Уругвай; 8 – о. Пітерман.

Загалом, при проведенні ТВР-аналізу з використанням специфічних праймерів (сТВРdesch) ампліфікуються фрагменти довжиною: 345 п.н., 350 п.н., 420 п.н., 700 п.н., 750 п.н., 930 п.н., 1100 п.н та 1180п.н. При цьому відсутні фрагменти, що спостерігаються за умов проведення звичайного с-ТВР-аналізу: 320 п.н, 490 п.н, 525 п.н, 620 п.н, 990 п.н, 1630 п.н., 1630 п.н., а також 705-715 п.н. та 760 -780 п.н.. Напевно, така кількість фрагментів, що ампліфікуються при звичайному с-ТВР, пояснюється тим, що специфічність даних праймерів менша, тому і ампліконів може утворюватися більше.

Оцінка поліморфізму довжини І-го інтрону генів β -тубуліну 37 разків з усіх восьми досліджуваних популяцій виявили 12 чітких та відтворюваних фрагментів, що варіювали в межах 295–1300 п.н. Фрагмент розміром приблизно 295 п.н. був наявний практично у всіх відібраних зразках, хоча в деяких з них він не завжди проявлявся, наприклад, з оазису Томас і півострова Філдес (острів Кінг Джордж), а також острова Роберта. Цей фрагмент 295 п.н. відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона гена β -тубуліну з короткими послідовностями довколишніх екзонів [36].

Фрагмент 310 п.н. чітко візуалізувався в зразках № 6 (острів Леоні), №12 (острів Плено), №13, №17 (оазис Расмуссен), №23 (оазис Томас) і № 36 (острів Роберт). А фрагмент довжиною 300 п.н. виявлений у 3 з 5 зразків з точки Гамаж і в 1 з 4 зразків з острова Плено (рис. 4.7).

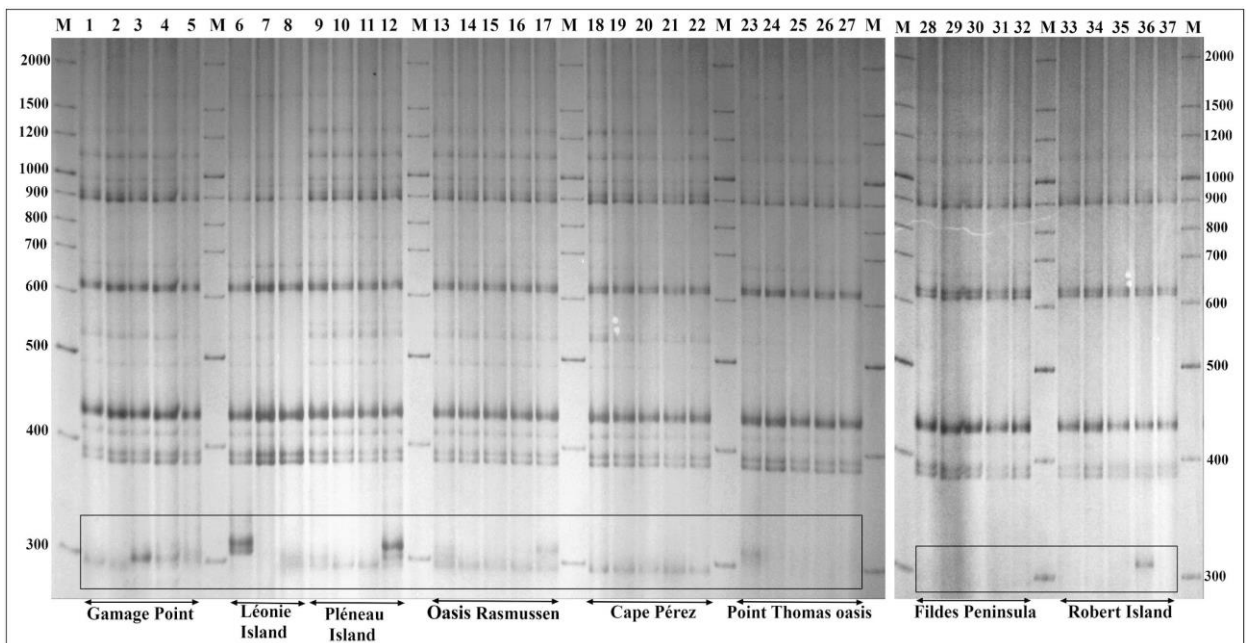


Рис. 4.7. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, що містять інтрони генів β -тубуліну *D. antarctica* з ізольованих популяцій. 1–37 (верхня частина рисунка) - кількість зразків: 1–5 - точка Гамаж; 6–8 - острів Леоні; 9–12 - острів Плено; 13–17 - Оазис Расмуссен; 18–22 - мис Перез; 23–27 - оазис Томас; 28–32 - півострів Філдес; 33–37 - острів Роберт; М - маркер ДНК (O'GeneRuler™ 100bp Plus).

Отже, в результаті проведених досліджень не вдалося встановити які-небудь відмінності у зразках з 8 різних місцезростань *D. antarctica* за використання h-ТВР, с-ТВР та с-ТВР із специфічними праймерами. У всіх досліджених зразків спостерігаються однакові (в межах методу) набори ампліконів. Вірогідним поясненням цьому може бути те, що *D. antarctica* є досить стародавнім видом і всі арктичні популяції, ймовірно, походять з однієї прапопуляції. А різні мікрокліматичні умови зростання досліджених популяцій поки не внесли значних змін в геном рослин, або, можливо, просто не зачепили гени бета-тубуліна. В той же час, збільшивши кількість аналізованих рослин у кожній популяції до 5 штук та застосувавши лише ТВР-аналіз, було виявлено внутрішньопопуляційний поліморфізм за I-им інтроном генів β -тубуліну.

В цілому отримані результати свідчать, що ТВР-метод може бути корисний для фінгерпринтінгу різних популяцій *D. antarctica*. Водночас, отримані результати можуть вказувати на низький рівень генетичного поліморфізму цього виду в дослідженому регіоні. Подібні дані вказують на низьку генетичну диференціацію антарктичних популяцій виду і були отримані раніше за допомогою інших типів ПЛР-маркерів [55, 376].

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.1.4 наведено в публікаціях:

1. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Андреев ІО, Парнікоза ІЮ, Козерецька ІА, Кунах ВА, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у *Deschampsia antarctica* Desv. з морської Антарктики. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20:104–108. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

2. Rabokon AM, **Pirko YV**, Demkovych AYe, Andreev IO, Parnikoza IYu, Kozeretska IA, Yu Z, Kunakh VA, Blume YB. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in *Deschampsia antarctica* E. Desv. across the western coast of the

Antarctic Peninsula. Polar Science. 2019; 19: 151-154. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.11.001>. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

4.1.5. Генотипування сортів пшениці та ячменю за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну

У попередньо проведеному ТВР-аналізі на обмеженій кількості сортів пшениці та ячменю, застосовуючи розділення фрагментів в 1,5% агарозному гелі після проведення ПЛР з виродженими праймерами не вдалося виявити поліморфізм інтронів генів β -тубуліну [273]. В той же час ТВР-аналіз був застосований як основний метод для виявлення *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L в складних сумішах [113, 279, 280], що створило передумови для проведення досліджень із вітчизняними сортами згаданих видів рослин із застосуванням більшої вибірки для аналізу.

Аналізували 7 сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) вітчизняної селекції та 30 сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.). Кожному сорту присвоювали порядковий номер, який наведено у табл. 2.1 розділу 2.

Загалом діапазон отриманих фрагментів збігається з теоретично-передбачуваними, адже відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона з невеликими ділянками екзонів. Однак не можна виключати утворення високомолекулярних гомо- та/або гетеродимерів [192].

Результати електрофоретичного аналізу ампліконів свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються фрагменти розміром приблизно від 94 п. н. до 3000 п. н. – для пшениці, та від 97 п. н. до 1500 п. н. – для ячменю. При цьому більша частина чітких та поліморфних смуг у ячменю візуалізується в діапазоні 300–1500 п. н., а у пшениці – 300–3000 п. н. Нижче цих зон спостерігаються мономорфні нечіткі смуги, характерні для ПЛР-продуктів неповної ампліфікації. В подальшому ці амплікони не враховувалися у аналізі. Слід також відмітити, що для всіх сортів ячменю характерною є дуже

чітка, проте ідентична для всіх сортів смуга, що відповідає ПЛР-продукту в районі 104 п. н.

На рис. 4.8 зображено електрофореграми з ампліконами в діапазоні 300 - 1500 п.н., отриманими для різних сортів ячменю, а на рис. 4.9 – продукти ампліфікації для різних сортів пшениці. Всім відтворюваним смугам, що відповідали ампліконам певної довжини, були надані номери в порядку зростання їх розмірів (див. табл. 4.5).

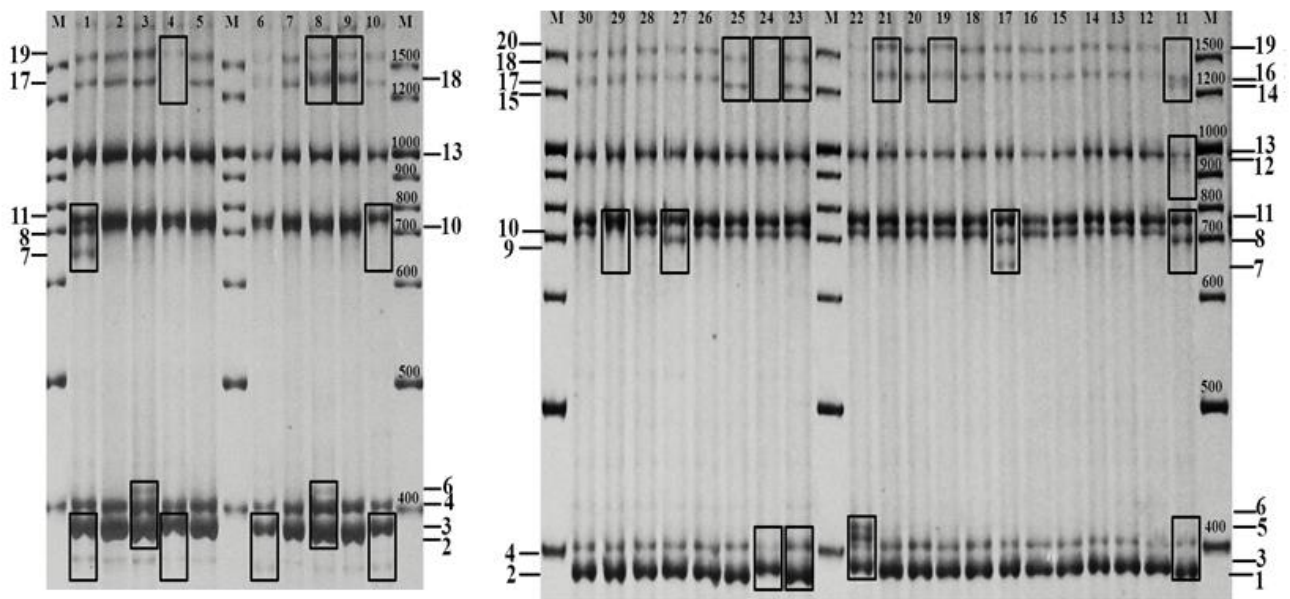


Рис. 4.8. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну сортів ячменю (інтервал 300–1500 п.н.), отриманими за допомогою ТВР-аналізу. Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – ДНК-маркер; 1-30 (у верхній частині рисунку) – номери сортів; 1-20 (з боків рисунку) – номери смуг.

Більшість досліджених зразків характеризуються своїм специфічним набором смуг з певними відмінностями. Кількість смуг відрізняється як між сортами, так і між видами. Різниця в наборі ампліконів базується не лише на наявності специфічних смуг, але і на їх відсутності. Наприклад, для сорту ячменю «Чарівний» характерні смуги номер 2, 4, 10, 11, 13, 17, 19, а для сорту «Зоряний» - номери 3, 4, 10, 11, 13; тобто амплікони №17 та №19 відсутні, що і вирізняє цей сорт від інших. Кількість ампліконів, виявлених у

сортів пшениці була більшою, ніж у сортів ячменю – 45 (№21 - №65) та 20 (№1 - №20), відповідно.

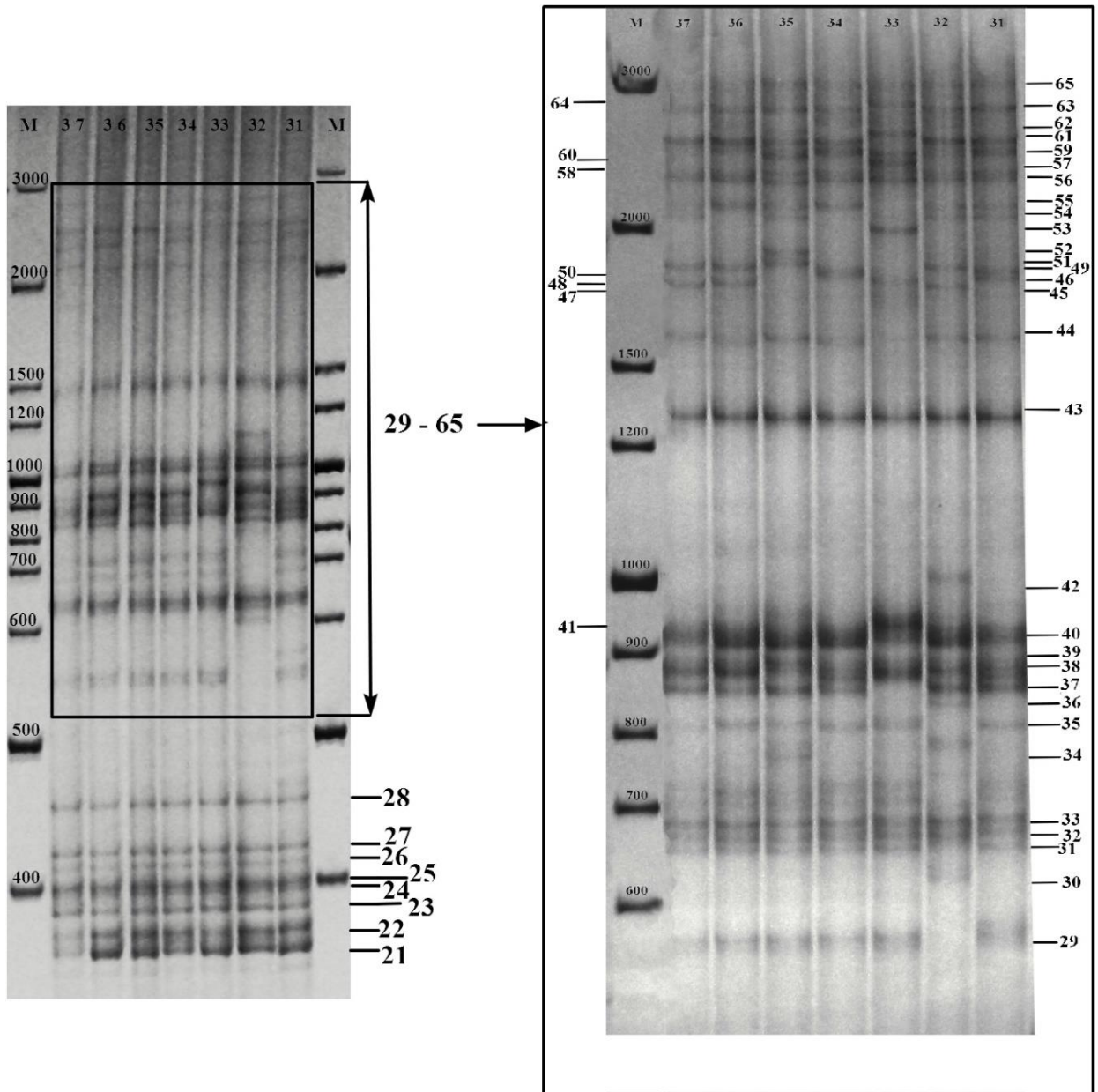


Рис. 4.9. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну сортів пшениці (інтервал 300–3000п. н.), отриманими за допомогою ТВР-методу. Праворуч – поліморфна зона; м – ДНК-маркер; 31-37 (у верхній частині рисунку) – досліджені сорти (див. табл. 2); 21- 65 (з боків рисунку) - номери смуг

Отже в результаті роботи за допомогою ТВР-аналізу було виявлено міжсортний поліморфізм в межах досліджених видів *H. vulgare* та *T. aestivum*. Результати продемонстрували в цілому непогану диференціюючу спроможність цього методу для оцінки генетичного поліморфізму рослин та можливість використання його для фінгерпринт-аналізу сортів пшениці та ячменю. Продемонстровано швидкість, простоту та надійність ТВР-методу, який не вимагає наявності великої попередньої інформації про геном об'єкту і може бути широко задіяний в генетичних дослідженнях рослин.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.1.5 наведено в публікаціях:

1. **Пірко ЯВ.** Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліна. Промышленная ботаника (Сборник научных трудов). Донецк, Донецкий ботанический сад. 2011; 11: 152–156. <http://dspace.nbuu.gov.ua/bitstream/handle/123456789/67402/25-PirkoNEW.pdf?sequence=1> (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті*).

2. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015; 17:82–86. (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю*).

4.1.6. Генотипування сортів пшениці, ячменю та рису за допомогою поліморфізму інтронів генів актину

Проведений аналіз скми сортів ярої пшениці з використанням власно розробленої маркерної системи, що ґрунтується на вивченні поліморфізму

довжини інтронів генів актину, дозволив отримати специфічні ДНК-профілі та генотипувати досліджувані сорти пшениці. На електрофореграмі показані утворені фрагменти з інтронами генів актину, які розподілялися в діапазоні довжини від 600 п. н. до 1500 п. н. Найбільша кількість ампліконів спостерігається в межах від 700 п. н. до 900 п. н.

Фрагменти ДНК, які містили інтрони генів актину пшениці, розподілялися в діапазоні від 600 п. н. до 1500 п. н. Загалом більшість утворених фрагментів ДНК виявилися мономорфними, однак на рис. 7.3 зазначено три поліморфні зони, виділені прямокутниками. У сорту X 12 (зразок 4) відсутній фрагмент ДНК розміром близько 676 п. н, що вирізняє ДНК-профіль цього сорту пшениці серед усіх інших. Поліморфна смуга спостерігається в межах від 900 п. н. до 1000 п. н., де містяться фрагменти ДНК розміром близько 932 п. н. та 964 п. н. Ще одна поліморфна зона візуалізується у межах 1139–1204 п. н.

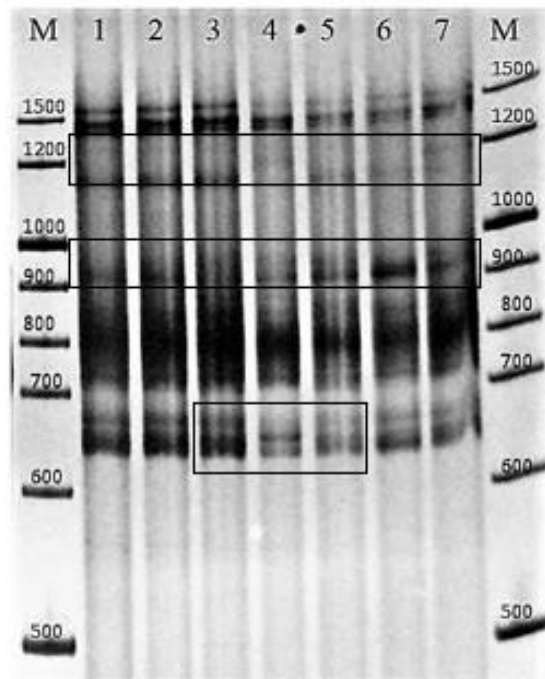


Рис. 4.10. Електрофореграма з ампліконами, що містять інтрони генів актину у різних сортів пшениці (*T. aestivum* L.) (прямокутниками позначені зони, що містять поліморфні фрагменти з інтронами генів актину).

Досліджувані сорти: 1 – ‘Черемшина’, 2 – ‘Елегія’, 3 – ‘Етюд’, 4 – ‘X 12’, 5 – ‘Retown’, 6 – ‘Недра’, 7 – ‘Selkirk’, (Канада); М – ДНК-маркер

У більшості проаналізованих сортів пшениці, а, саме, сортів ‘Черемшина’, ‘Елегія’, ‘Етюд’, ‘Retown’ та ‘Недра’ (зразки 1–3, 5, 6) присутній лише один фрагмент розміром близько 1139 п. н. Для сорту X 12 (зразок 4) спостерігається фрагмент розміром близько 1204 п. н., а у випадку сорту ‘Selkirk’ (зразок 7) відмічена поява одночасно двох фрагментів (1139 п. н. та 1204 п. н.), що вирізняє цей сорт пшениці серед всіх інших проаналізованих сортів. В цілому у проаналізованих сортів пшениці виявлено 4 різні алельні фенотипи, з яких унікальні мали сорти ‘X 12’ та ‘Selkirk’. Значення PIC склало 0,69, що свідчить про досить високий рівень поліморфізму в даній вибірці сортів пшениці.

В подальшому за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину було проведене генетичне профілювання сортів ячменю (*H. vulgare*). Результати аналізу свідчать про стабільне утворення ДНК-профілів зі специфічними фрагментами ДНК, що містять інтрони генів актину (рис. 4.11).

Загалом для кожного проаналізованого сорту ячменю характерним є утворення трьох фрагментів. Утворені амплікони, що містять інтрони генів актину, розподілялися в межах від 700 п. н. до 1000 п. н. Розмір мономорфних фрагментів ДНК складала близько 769 п. н. та 884 п. н. Поліморфізм довжини інтронів виявлений лише в межах верхньої смуги фрагментів. Для більшості проаналізованих сортів ячменю були характерні амплікони розміром близько 938 п. н. Це стосується, насамперед, сортів ‘Медікум 46’, ‘Одеський 18’, ‘Южний’, ‘Нутанс 106’, ‘Південний’, ‘Гетьман’ тощо. У сортів ‘Паллідум 32’, ‘Одеський 9’, ‘Одеський 14’, ‘Степовий’, ‘Престиж’ та інших виявлено присутність фрагменту ДНК довжиною 908 п. н. Оцінивши вибірку ячменю, встановлено наявність двох різних алельних фенотипів. Значення PIC склало 0,43, що свідчить про достатній рівень поліморфізму у проаналізованій вибірці сортів ячменю.

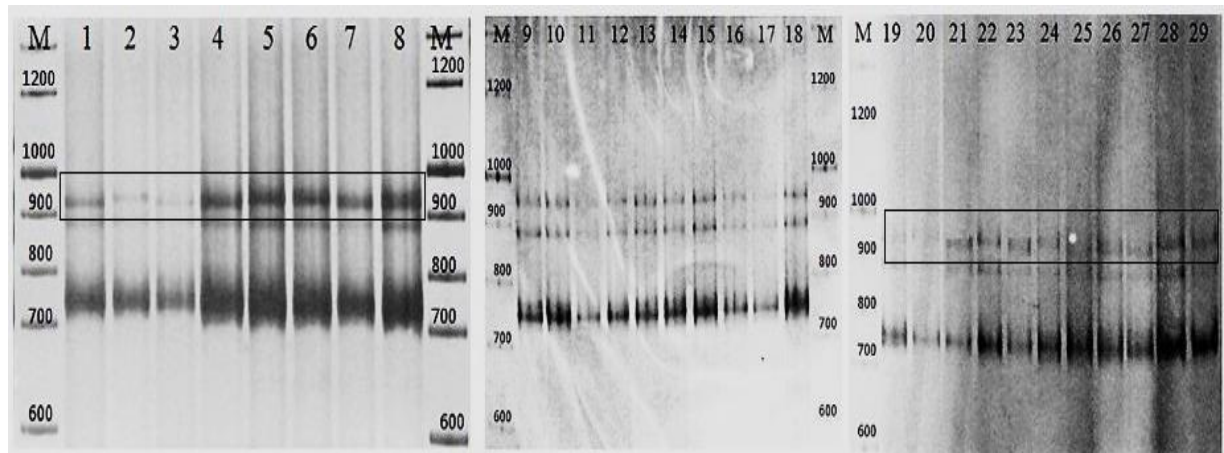


Рис. 4.11. Електрофореграма з ампліконами, що містять інтрони генів актину у досліджених сортів ячменю (*H. vulgare* L.) (прямокутниками позначені зони, що містять поліморфні фрагменти з інтронами генів актину). Досліджувані сорти: 1 – ‘Паллідум 32’, 2 – ‘Медікум 46’, 3 – ‘Одеський 9’, 4 – ‘Одеський 14’, 5 – ‘Одеський 18’, 6 – ‘Южний’, 7 – ‘Степовий’, 8 – ‘Нутанс 106’, 9 – ‘Південний’, 10 – ‘Гетьман’, 11 – ‘Оболонь’, 12 – ‘Чудовий’, 13 – ‘Чарівний’, 14 – ‘Чорноморець’, 15 – ‘Нутанс 244’, 16 – ‘Славутич’, 17 – ‘Одеський 70’, 18 – ‘Нутанс 518’, 19 – ‘Незалежний’, 20 – ‘Едем’, 21 – ‘Престиж’, 22 – ‘Одеський 131’, 23 – ‘Ітиль’, 24 – ‘Одеський 82’, 25 – ‘Одеський 69’, 26 – ‘Одеський 36’, 27 – ‘Романтик’, 28 – ‘Тайфун’, 29 – ‘Одеський 115’; М – ДНК-маркер

Також нами було проведено аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у 6 сортів рису посівного (*O. sativa*) української селекції та одного з підвидів рису, а саме, *O. sativa japonica* (рис. 4.12).

У всіх проаналізованих зразках рису посівного амплікони інтронів генів актину варіювали в діапазоні від 500 п. н. до 1200 п. н. (рис. 4.12). Розміри фрагментів ДНК мали довжину близько 560 п. н., 708 п. н., 770 п. н., 840 п. н., 963 п. н. та 1191 п. н. Всі досліджувані сорти рису виявилися генетично гомогенними за даним видом ДНК-маркерів, оскільки не було виявлено жодної поліморфної зони та охарактеризований лише один алейний фенотип.

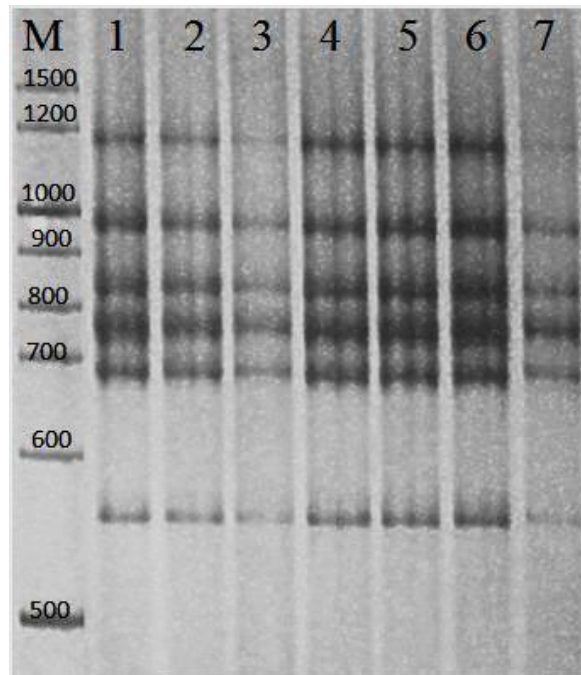


Рис. 4.12. Електрофореграма з ампліконами, що містять інтрони генів актину у рису посівного (*Oryza sativa*). 1 – *O. sativa japonica*; 2 – ‘YIP-4970’, 3 – ‘YIP-4558’, 4 – ‘Лазурит’, 5 – ‘Віконт’, 6 – ‘Преміум’, 7 – ‘Консул’; М – ДНК-маркер

Отже, проведене генетичне профілювання та генотипування сортів пшениці, ячміню та рису шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволило отримати чіткі ДНК-профілі кожного з проаналізованих видів. Кількість алельних фенотипів у вибірках сортів пшениці, ячменю та рису становила чотири, два та один відповідно. Загалом поліморфізм довжини інтронів генів актину був виявлений у сортах пшениці та ячменю, які були охарактеризовані як генетично гетерогенні. Одночасно, сорти рису виявилися генетично однорідними за даним видом ДНК-маркерів. Таким чином, оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину може бути використана як додатковий інструмент для генетичного профілювання та диференціації сортів злакових культур.

В цілому, якщо порівнювати два підходи у генотипуванні злаків, а саме поліморфізм інтронів генів β -тубуліну та актину, то інтрони генів β -тубуліну є більш пріоритетною системою для диференціації злаків, оскільки сама

кількість утворюваних поліморфних зон під час аналізу інтронів β -тубуліну є значно більшою, у порівнянні з інтронами генів актину. Це можна пояснити хоча б тим, що в залежності від обраного підходу можна аналізувати I-ий, II-ий інтрон генів β -тубуліну, а також їх комбінацію, коли мова йде про hTBR. В той же час в арсеналі генів актину тільки один інтрон, який може забезпечити диференціацію досліджуваних генотипів. Таким чином поліморфізм інтронів комплексу цитоскелетних генів, зокрема, генів β -тубуліну та актину може бути використаний для генотипування та диференціації різних видів злаків.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.1.6 наведено в публікації:

Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний засіб генетичного профілювання злакових (Poaceae L.). Доповіді НАН України. 2019; (2): 78-83. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.02.078> (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).

4.2. Генетичне профілювання дводольних рослин за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину

4.2.1. Генотипування *Camelina sativa* L. Cranz за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину

Серед олійних рослин рижій посівний або *Camelina sativa* L. Cranz (родина *Brassicaceae*) є однією з перспективних культур в якості альтернативного ресурсу для виробництва біопалива [102, 147] в тому числі як біопаливо для літаків [147], за рахунок високого вмісту у насінні жирних кислот [146].

Рижій має геном близько 750 Мбп та число хромосом $2n = 40$ [146]. Поліплоїдну природу також було припущено Hutcheon et al. [146], які вивчали організацію генів, залучених у біосинтез жирних кислот, та Galasso et al., які аналізували мультигенну родину β -тубуліну [106, 107]. Розшифрування геному рижію показало, що *C. sativa* є поліплоїдом [167].

Варто відзначити, що раніше було проведено вивчення генетичного поліморфізму і філогенії рослин роду *Camelina* за допомогою методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну [106, 107]. Встановлено, що родина генів β -тубуліну у *C. sativa* складається більш ніж з 20 різних генів (CsTUB1 – CsTUB2), що є підтвердженням плоїдності виду [218]. Проте дослідження вітчизняних сортів та сортозразків рижію, які можуть стати в нагоді під час створення генотипів більш придатних для виробництва біодизеля не проводилися.

Для цього було проведено ТВР-аналіз українських найбільш олійних сортів та сортозразків *C. sativa*, які якнайкраще підходили би для виробництва біодизеля. Під час ПЛР у досліджених зразків *C. sativa* утворюється значна кількість продуктів ампліфікації (близько 50), які добре візуалізуються на електрофореграмі, розмір ампліконів варіює в діапазоні 295 п.н. – 3200 п.н. (рис. 4.13).

Доволі велика їх кількість як раз може пояснюватися тим, що *C. sativa* є поліплоїдною рослиною. Значна частина смуг виявилася мономорфною. Загалом спостерігається до 4 чітких поліморфних смуг, що мають приблизний розмір 295–300 п.н., 370–375 п.н., 650–660 п.н., 1085–1110 п.н. Проте смуга 295 п.н. проявлялася епізодично. Частина фрагментів характерна лише для невеликої кількості зразків. Так для зразків ФЕОРЖЯФ-5 і ФЕОРЖЯФ-ЧП характерні фрагменти розміром 370 п.н., у інших зразків утворюються амплікони 375 п.н. Для досліджених зразків: Міраж, ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-ЧП спостерігається смуга 660 п.н., у решти – 650 п.н. Фрагмент розміром 1085 п.н. є тільки у сорту ‘Міраж’.

Крім того, у цього сорту в більшості повторів утворюється ще один амплікон розміром 1150 п.н.

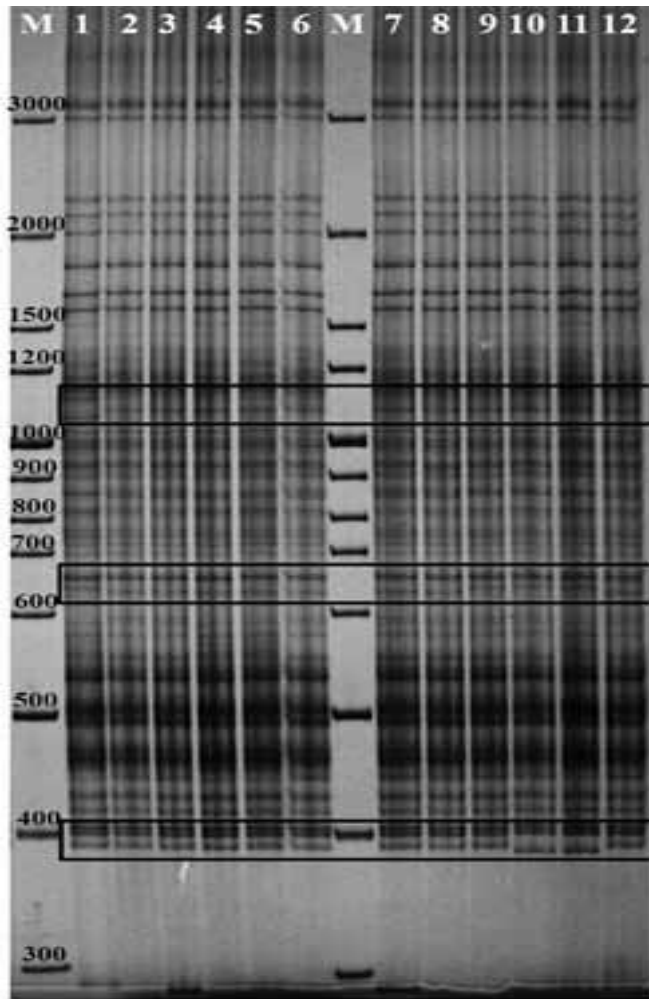


Рис. 4.13. Електрофореграма з ампліконами I-го інтрону генів β -тубуліну *Camelina sativa* (ТВР-аналіз). Поліморфні зони позначені прямокутниками; номери зразків: 1 – ‘Міраж’, 2 – ФЕОРЖЯФ-2, 3 – ФЕОРЖЯФ-3, 4 – ‘Євро-12’, 5 – ФЕОРЖЯФ-4, 6 – ‘Перемога’, 7 – ‘Клондайк’, 8 – ФЕОРЖЯФ-Ч, 9 – ФЕОРЖЯФ-1, 10 – ФЕОРЖЯФ-5, 11 – ФЕОРЖЯФ-ЧП, 12 – ФЕОРЖЯФ-Д; М – ДНК-маркер.

З дендрограми, побудованої на підставі коефіцієнта подібності Нея та Лі, видно, що зразки в цілому діляться на три групи (рис. 4.14). До найбільшої групи з низьким рівнем диференціації відносяться три сорти: ‘Євро-12’, ‘Перемога’, ‘Клондайк’ та п’ять сортозразків: ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-Ч, ФЕОРЖЯФ-Д *C. sativa* (бутстреп-підтримка – 88%). До другої групи відносяться три сортозразки ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-ЧП, ФЕОРЖЯФ-5 (бутстреп-підтримка – 55%). До третьої найменшої групи відноситься лише сорт ‘Міраж’, який найбільше відрізняється від інших генотипів (бутстреп-підтримка – 100%).

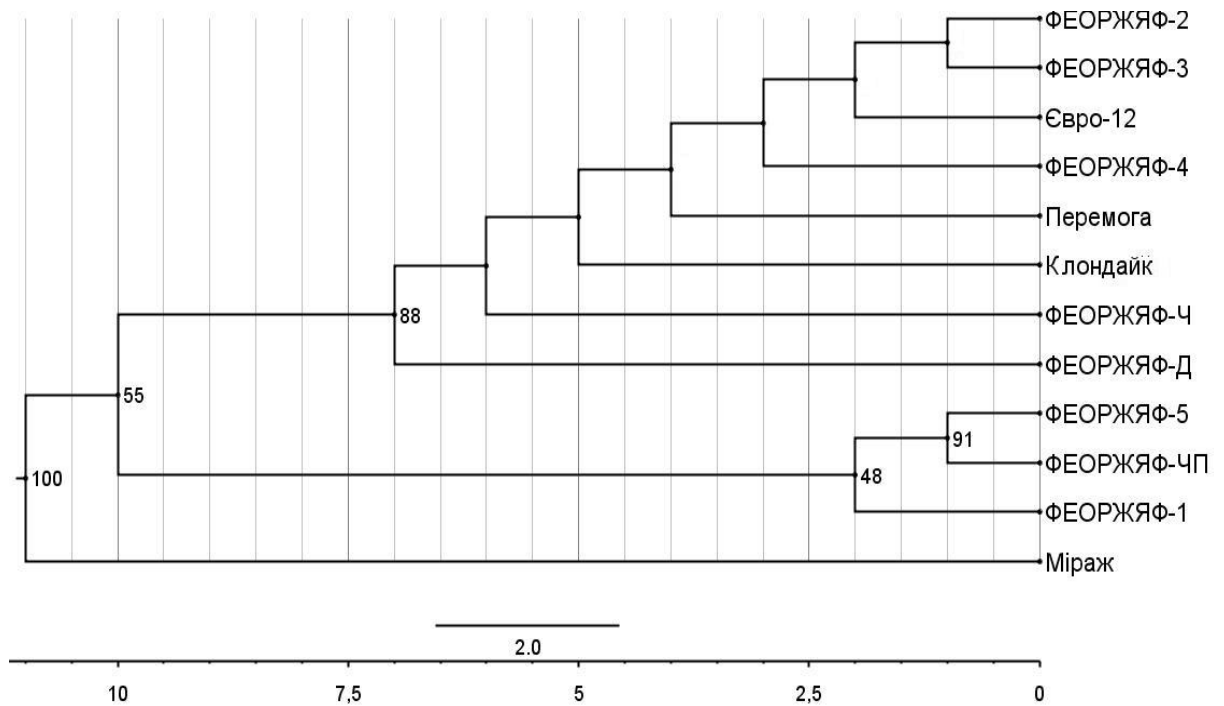


Рис. 4.14. Дендрограма UPGMA, побудована на підставі аналізу поліморфних ТВР-фрагментів *Camelina sativa*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %

Таким чином, провівши ТБП-аналіз, в якості методу використавши поліморфізм довжини першого інтрону генів β -тубуліну вдалося дещо диференціювати різні сорти та сортозразки *C. sativa*. В той же час майже половина зразків мало дуже схожий генетичний профіль. Тому для доповнення отриманої інформації та з метою більш точного профілювання зразків дослідили поліморфізм довжини другого інтрону генів β -тубуліну (сТВР-аналіз). Від hТВР-аналізу довелося відмовитися, оскільки під час ампліфікації утворюється велика кількість ампліконів, що важко піддається аналізу.

В результаті сТВР-аналізу також утворюється значна кількість продуктів ампліфікації з розміром від 350 п.н. до 2990 п.н., проте чіткі та відтворювані фрагменти виявлені лише в межах від 350 п.н. до 1190 п.н. (рис. 4.15). Саме тому до аналізу були залучені фрагменти розміром до 1190 п.н. Більшість отриманих ампліконів були мономорфними для всіх досліджених зразків. Всього виявлено сім поліморфних фрагментів розміром 515 п.н., 520

п.н., 525 п.н., 550 п.н., 570 п.н., 795 п.н. та 1015 п.н., більшість зразків чітко диференціювались між собою, маючи свій унікальний профіль ДНК.

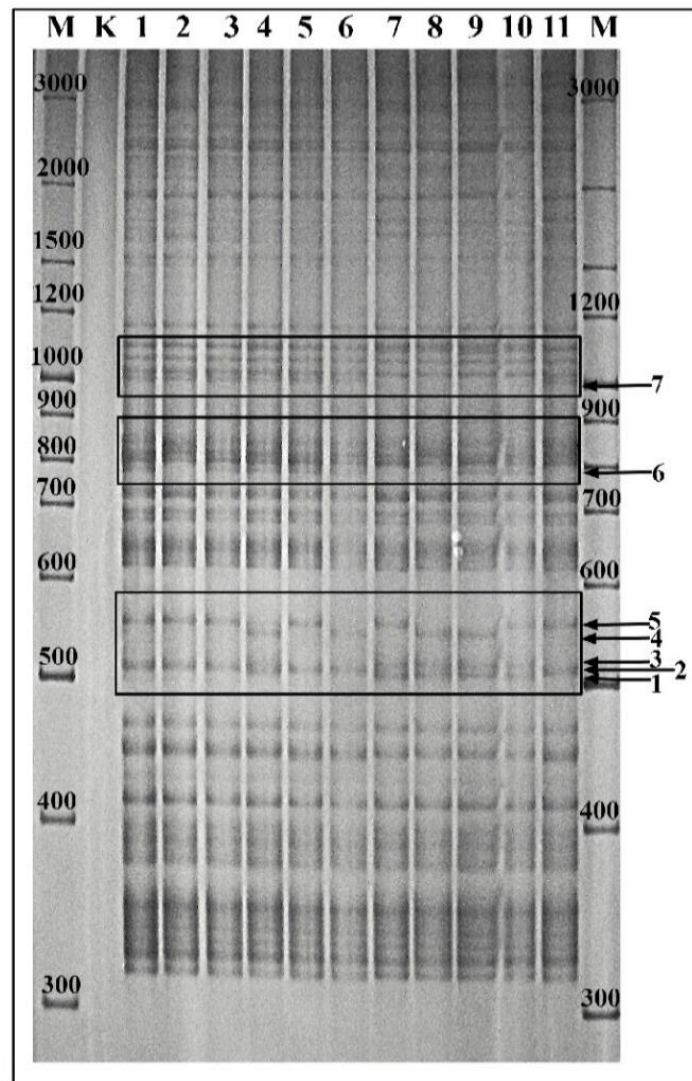


Рис. 4.15. Електрофореграма з ампліконами II-го інтрону генів β -тубуліну *C. sativa* (сТВР-аналіз). Прямокутниками позначено поліморфні зони; стрілками та номерами відмічені поліморфні фрагменти; М – ДНК маркер; к – контроль; номери зразків: 1 – ‘Перемога’, 2 – ФЕОРЖЯФ-ЧП, 3 – ФЕОРЖЯФ-Д, 4 – ФЕОРЖЯФ-1, 5 – ‘Клондайк’, 6 – ФЕОРЖЯФ-2, 7 – Євро-12, 8 – ‘Міраж’, 9 – ФЕОРЖЯФ-3, 10 – ФЕОРЖЯФ-5, 11 – ФЕОРЖЯФ-4.

Значення коефіцієнта генетичної дистанції Нея варіював від 0 до 1,099, а подібності Нея та Лі – від 0 до 1. З дендрограми, побудованої на основі коефіцієнтів подібності Нея та Лі видно, що за сТВР-профілями зразки

розподіляються на дві великі групи (бутстреп-підтримка – 100%), які в свою чергу поділяються на підгрупи з майже однаковою бутстреп-підтримкою (79 % та 80 %) (рис. 4.16).

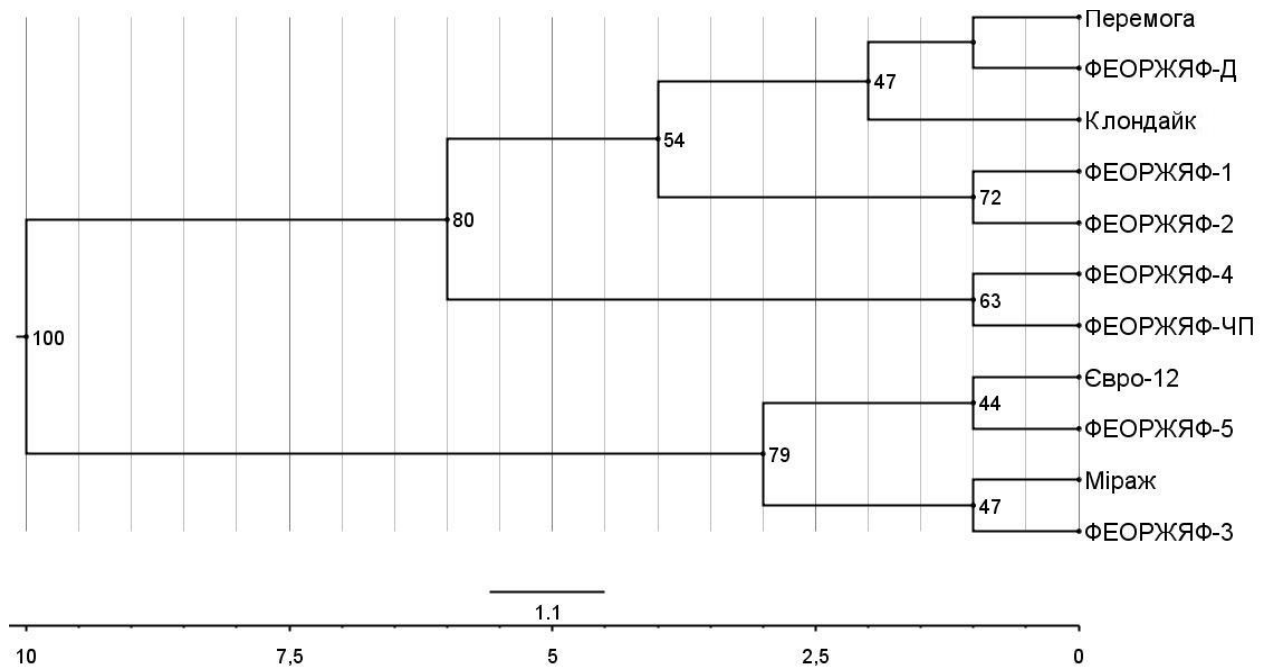


Рис. 4.16. Дендрограма UPGMA, побудована на підставі аналізу сТВР-фрагментів зразків *C. sativa*. Цифри в основі внутрішніх вузлів – значення бутстреп-підтримки, %.

Одна з груп об'єднує дві підгрупи до яких входять по одному сорту та одному сортозразку: сорт Євро-12 утворює підгрупу з сортозразком ФЕОРЖЯФ-5 (бутстреп-підтримка – 44%) та сорт Міраж – з сортозразком ФЕОРЖЯФ-3 (бутстреп-підтримка – 47%). Друга група поєднує три підгрупи: перша – сорт Перемога з сортозразком ФЕОРЖЯФ-Д та сорт Клондайк (бутстреп-підтримка – 47%); друга – сортозразки ФЕОРЖЯФ-1 та ФЕОРЖЯФ-2 (бутстреп-підтримка 72%); та третя – сортозразки ФЕОРЖЯФ-4 та ФЕОРЖЯФ-ЧП (бутстреп-підтримка 63%). Таким чином завдяки сТВР-аналізу вдалося дещо краще розділити досліджувані зразки ріжю.

Отримані за допомогою ТВР та сТВР-аналізу дендрограми дещо відрізняються, але низькі значення бутстреп-підтримки вказують, що між

дослідженими зразками рижію міжсортний поліморфізм за обома ТБП-методами є низьким, що вказує на високу генетичну спорідненість цих сортів та сортозразків. Однак, як за ТБП, так і за сТБП-аналізом лише сорт Міраж виокремлюється від інших досліджених генотипів, тоді як сорти з різних місць селекції належать до спільної класи: сорт 'Перемога' (селекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка) та сорт 'Клондайк' (селекція Інституту олійних культур НААН України). Важливо, що за допомогою аналізу поліморфізму довжини другого інтрону вдалося диференціювати зразки ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, 'Євро-12', ФЕОРЖЯФ-4 ФЕОРЖЯФ-Д, які не відрізнялися за поліморфізмом довжини першого інтрону. Таким чином, тільки використавши обидва підходи оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР та сТВР), які доповнили один одного, вдалося диференціювати досліджені сорти та сортозразки рижію.

Результати аналізу поліморфізму довжини першого інтрону гена актину показали, що смуги утворюються в діапазоні 370-1000 п.н., до того ж вісім смуг виявилися поліморфними. Таким чином, використовуючи цей аналіз можливо отримати профілювання частини зразків (сорт 'Євро-12', сортозразки ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-Д), які за аналізом поліморфізму першого інтрону генів β -тубуліну не диференціювалися.

В цілому було показано, що найбільш ефективним інструментом при подальшій роботі селекціонерів з дослідженими сортозразками рижію може бути залучення до генетичного аналізу дводольних рослин не тільки поліморфізм довжини першого інтрону гену β -тубуліну, але й поліморфізм довжини другого інтрону гену β -тубуліну та поліморфізм довжини інтронів генів актину.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.2.1. наведено в публікаціях:

1. Рабокoнь АН, Пирко ЯВ, Демкович АЕ, Блюм ЯБ. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. Молекулярная и прикладная генетика (Минск). 2015; 19: 35–44. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

2. **Pirko Ya.**, Rabokon A., Postovoitova A., Kalafat L., Bilonozhko Yu., Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin and actin genes as efficient tool for *Camelina sativa* genotyping. Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health And Quality of Human and Bees Life”, (11th–13th September 2019, Nitra, Slovakia), P.125.

4.2.2. Генетичне профілювання *Achillea glaberrima* Клок. та *Achillea leptophilla* Віб. за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну

Вдалим ТВР-аналіз може виявитися у дослідженні генетичного різноманіття та філогенетичних взаємовідносин у перехреснозапильних покритонасінних рослин, популяції яких охороняються. Зокрема це стосується представників роду *Achillea* L.: *Achillea glaberrima* Клок. та *Achillea leptophilla* Віб.

На електрофореграмі спостерігається доволі значна кількість ампліконів задовільної якості (120 п.н., 160 п.н., 210 п.н., 230 п.н., 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н.), які можна використовувати у аналізі. До речі, у обох видів вдалося виявити внутрішньовидовий поліморфізм за деякими з них, а саме, 230 п.н. – у *A. leptophilla*, 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н. - у *A. glaberrima* та *A. leptophilla* (Рис.4.18).

За останні десятиліття популяції *A. glaberrima* та спорідненого до нього

A. leptophilla суттєво скоротилися внаслідок антропогенного впливу. Вид *A. glaberrima* як рідкісна рослина був занесений до Червоної книги України [470]. У зв'язку з чим дослідження генетичного різноманіття цих видів має важливе значення для розробки концепції щодо збереження і, можливо, відтворення їхніх популяцій.

В цілому можна з впевненістю зазначити, що ТВР-метод може бути успішно застосований для молекулярно-генетичних досліджень представників багатьох родів трав'янистих рослин, в тому числі для маркування генотипів та оптимізації довготривалого традиційного селекційного процесу, а також розроблення довгострокових програм із збереження та відновлення популяцій ендемічних рослин.

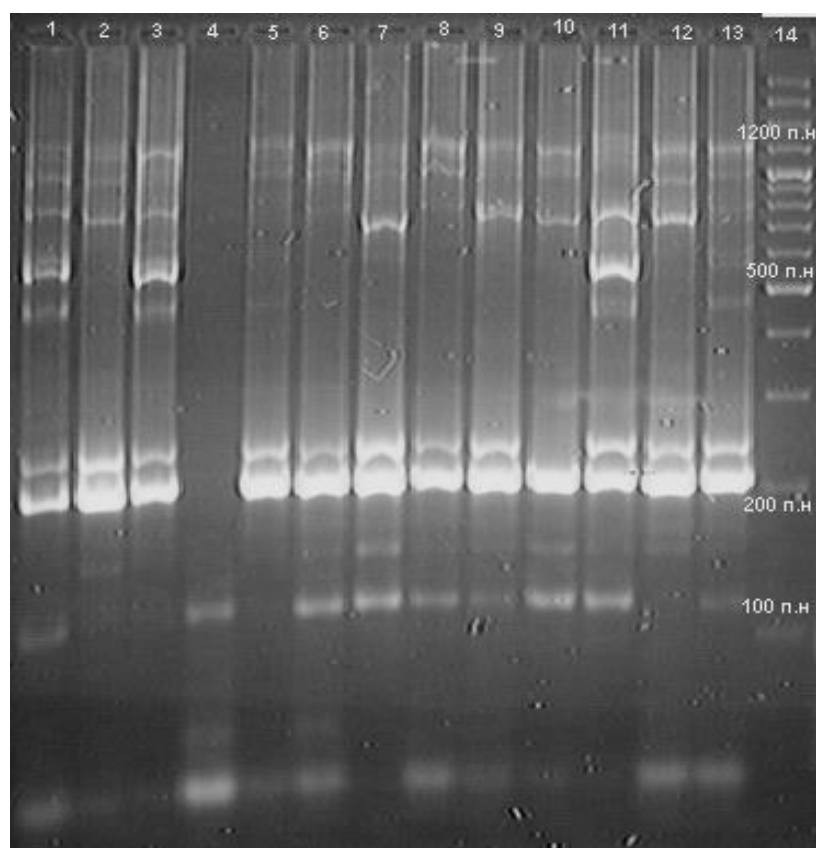


Рис. 4.17. Зразки 1-3 – *Achillea glaberrima* Клок.; 4 – зразок без додавання ДНК (контроль); зразки 5-13 – *Achillea leptophilla* Vieb.; 14 – ДНК маркер

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.2.2 наведено в публікації:

Пірко ЯВ. Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліна. Промышленная ботаника (Сборник научных трудов). Донецк, Донецкий ботанический сад. 2011; 11: 152 – 156.

4.2.3 Генотипування різних видів льону за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину

Льон культурний (*Linum usitatissimum* L.) – найдавніша сільськогосподарська рослина, що широко використовується в різних галузях народного господарства [160]. Це одна з п'яти основних олійних культур світу і третя за величиною прядильна культура. Оскільки льон є самозапильною однорічною трав'янистою рослиною, то він є вдалим модельним об'єктом для досліджень волокнистих рослин [263].

На сьогодні різні види і генотипи льону активно вивчаються за допомогою RAPD, ISSR-, SSR-маркерів [22, 34, 432]. В той же час маркери, які ґрунтуються на вивченні послідовностей конкретних генів, наприклад, генів тубулінів та актину, досі ще не використовувалися.

4.2.3.1. Генетичне профілювання різних видів роду *Linum* L. за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну

Диференціюючу здатність ТВР-аналізу перевіряли на п'яти видах льону, а саме: *L. usitatissimum*, *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. humile* та *L. perenne*. Слід зазначити, що систематика роду *Linum* L. і по цей час залишається не зовсім однозначною. Ряд авторів, спираючись на морфологічні, фізіологічні та географічні показники, вважають підвидами

L. usitatissimum деякі з наведених вище видів, або розглядають як один вид *L. angustifolium* та *L. bienne* [48, 57, 89].

В результаті ТБП-аналізу досліджених зразків льону зафіксовано 46 ампліфікованих фрагментів різного розміру, які добре візуалізуються на електрофореграмі, розмір ампліконів варіює в діапазоні від 400 п.н. до 1900 п.н. (рис. 4.18). З 46 зафіксованих фрагментів ДНК – 17 є унікальними та зустрічаються тільки у виду *L. perenne*. З 29 різних фрагментів, характерних для інших видів: *L. humile* (св. Еврика та св. Орфей), *L. angustifolium*, *L. usitatissimum* та *L. bienne*, 16 – є поліморфними з приблизним розміром ампліконів: 400 п.н., 457 п.н., 460 п.н., 480 п.н., 670 п.н., 690 п.н., 795 п.н., 800 п.н., 815 п.н., 1030 п.н., 1080 п.н., 1130 п.н., 1600 п.н., 1700 п.н., 1865 п.н. Значення РС за цими зразками склало 0,210 (за формулою 1).

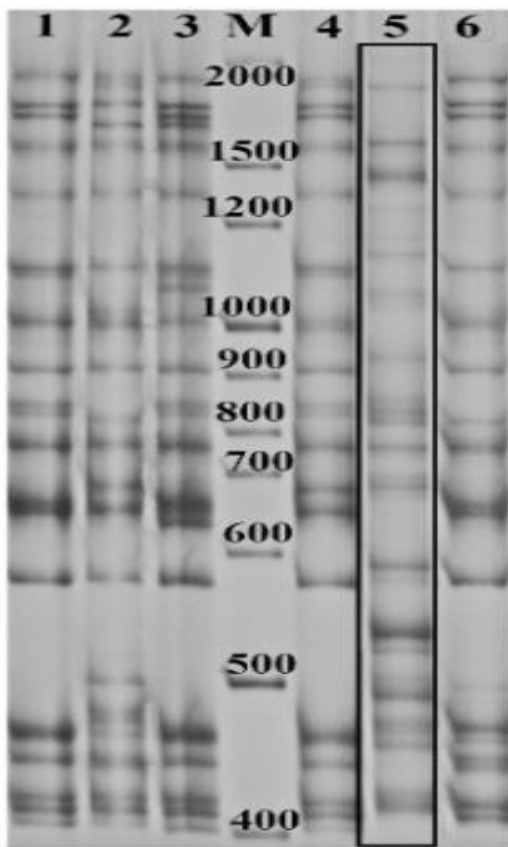


Рис. 4.18. Електрофореграма з ампліконами, що містять перший інтрон генів β -тубуліну представників роду *Linum*; номери зразків: 1 – *L. bienne*, 2 – *L. angustifolium*, 3 – *L. usitatissimum*, 4 – *L. humile* св. Еврика, 5 – *L. perenne*, 6 – *L. humile* св. Орфей; М – ДНК-маркер

Для *L. perenne* характерний набір з 25 фрагментів: 407 п.н., 415 п.н., 440 п.н., 457 п.н., 480 п.н., 515 п.н., 530 п.н., 580 п.н., 595 п.н., 680 п.н., 690

п.н., 710 п.н., 760 п.н., 795 п.н., 810 п.н., 820 п.н., 940 п.н., 1070 п.н., 1080 п.н., 1150 п.н., 1180 п.н. 1350 п.н., 1470 п.н., 1570 п.н., 1865 п.н., які відрізняються від фрагментів інших видів. Причому 17 фрагментів є унікальними для цього виду і тільки 8 фрагментів (457 п.н., 480 п.н., 580 п.н., 690 п.н., 760 п.н., 795 п.н., 1080 п.н., 1865 п.н.) є схожими з фрагментами інших зразків. Ймовірно, що *L. perenne* є віддаленим родичем досліджуваних видів, що супроводжується високим рівнем відмінностей в морфології і екології даного виду. Значення PIS для *L. perenne* склало 0,323 (за формулою 1). Середнє значення PIS для всіх інших випадків становить 0,266, що можна порівняти, наприклад, з оцінками, отриманими для *Eleusine* [36], і є досить високим значенням.

Найбільше значення коефіцієнту подібності Нея та Лі було між парою зразків *L. usitatissimum* та *L. bienne*, що мають дуже подібний набір ампліконів (0,923), а найменше – між *L. perenne* та *L. bienne* (0,046), що також вказує на відмінності виду *L. perenne*. Дані генетичного аналізу зразків було використано для відображення диференціації досліджених видів на основі значень коефіцієнту подібності Нея та Лі (рис. 4.19).

З отриманої дендрограми видно, що всі досліджені зразки льону чітко відрізняються за їх ТВР-профілем. *L. angustifolium* та *L. perenne* виділяються в окремі гілки (бутстреп-підтримка 100%). До них приєднується *L. humile* cv. Орфей (бутстреп-підтримка 52%), далі *L. humile* cv. Еврика (бутстреп-підтримка 57%), а *L. usitatissimum* та *L. bienne* утворюють одну групу (бутстреп-підтримка 75%). В цілому, результати дослідження із застосуванням ТВР-аналізу, дають можливість диференціювати та ідентифікувати вивчені види роду *Linum* L.

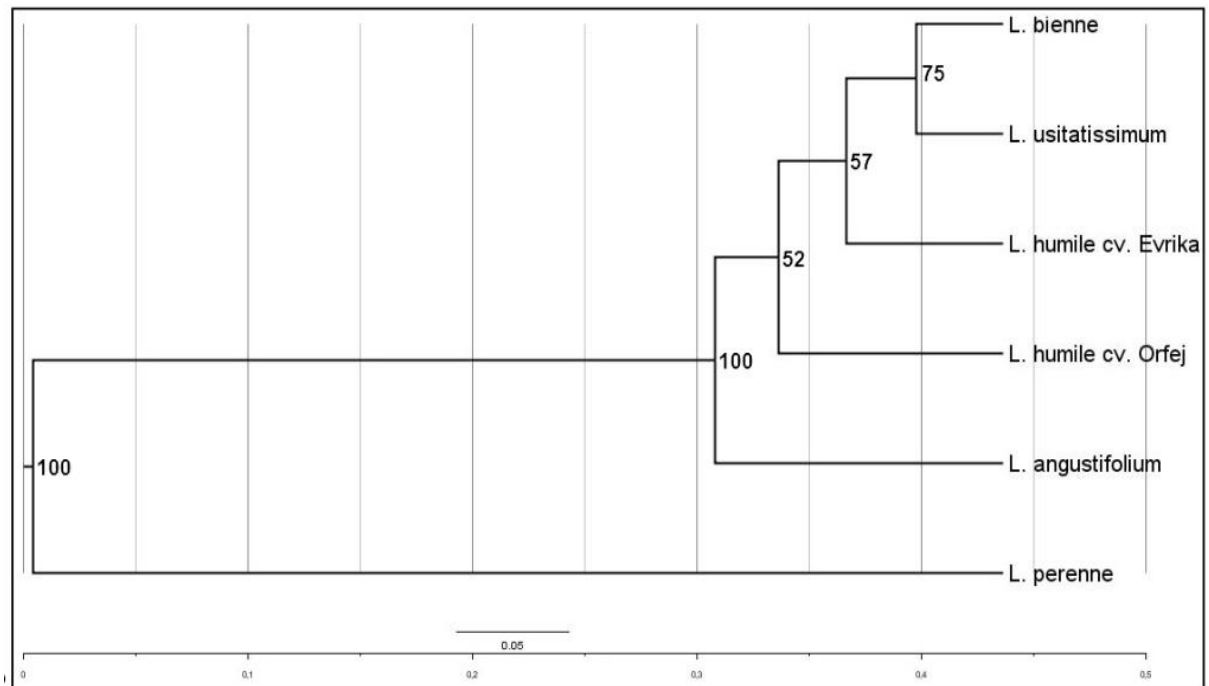


Рис. 4.19. UPGMA-дендрограма, побудована на підставі аналізу ТВР-профілей різних представників роду *Linum* L.

За результатами сТВР-аналізу в цілому виявлено 28 фрагментів (рис. 4.20), з яких дев'ять (330 п.н., 345 п.н., 350 п.н., 605 п.н., 675 п.н., 755 п.н., 895 п.н., 955 п.н.) є унікальними також лише для *L. perenne*. Фрагмент 320 п.н. був виявлений у всіх досліджених видів.

За результатами сТВР-аналізу значення РІС виявилися вищими, ніж при використанні ТВР і становлять 0,313 та 0,345 за виключенням зразка *L. perenne*. Найбільше значення коефіцієнту подібності Нея та Лі (1) було між зразками *L. angustifolium* та *L. humile* cv. Орфей, а найменше (0,083), як і для ТБП-аналізу, було між *L. perenne* та всіма зразками. Із побудованої дендрограми (рис. 4.21) видно, що зразки добре диференціюються один від одного, а ще кластеризуються майже так само, як за ТВР-методом. *L. perenne* з 100% бутстреп-підтримкою утворює окрему гілку; також окремі групи утворюють *L. bienne* та *L. usitatissimum* (бутстреп-підтримка 56%) та *L. humile* cv. Еврика з *L. angustifolium* та *L. humile* cv. Орфей (бутстреп-підтримка 82%).

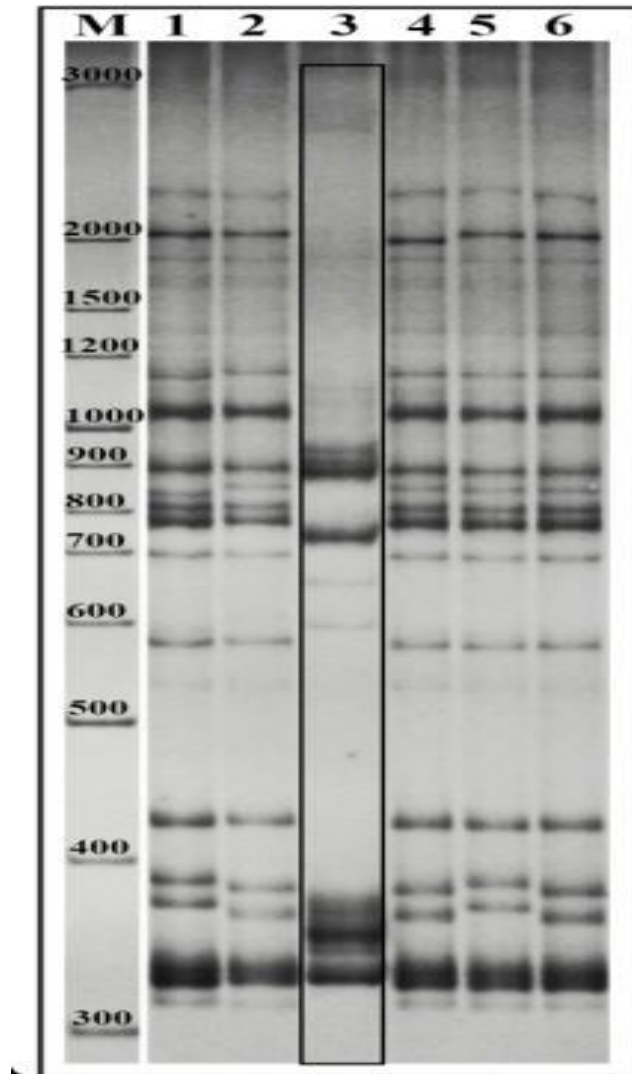


Рис. 4.20. Електрофореграма з ампліконами другого інтрону генів β -тубуліну представників роду *Linum* (сТВР-аналіз); номери зразків: 1 – *L. bienne*, 2 – *L. angustifolium*, 3 – *L. perenne*, 4 – *L. humile* cv. Эврика, 5 – *L. usitatissimum*, 6 – *L. humile* cv. Орфей; М – ДНК-маркер.

В цілому сТВР-аналіз підтвердив отримані раніше результати ТВР - аналізу. Побудовані дендрограми за обома методами вказують на схожу картину кластеризації досліджених видів, з чого можна зробити висновок, що, можливо, *L. bienne* є підвидом *L. usitatissimum*, а *L. angustifolium* та *L. bienne* є різними видами.

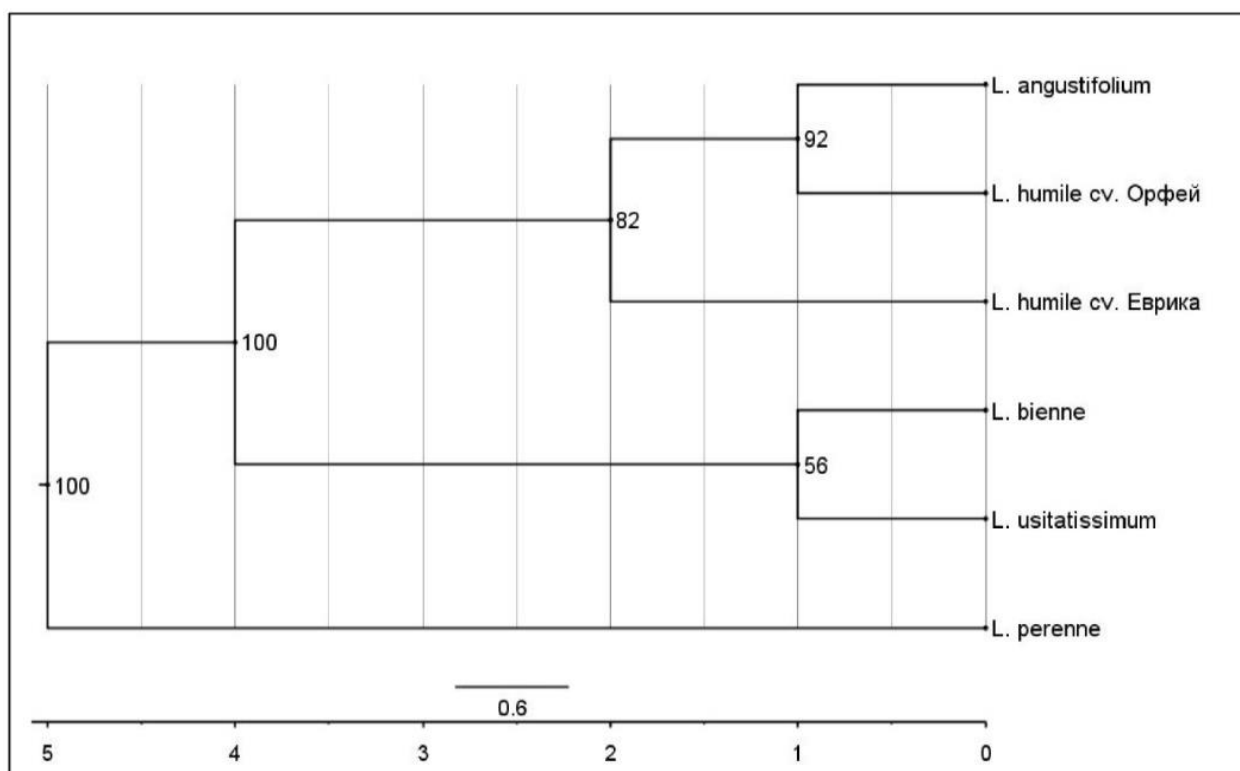


Рис. 4.21. UPGMA дендрограма, що побудована на підставі сТВР-профілей досліджених видів роду *Linum* L.

Результати ТВР/сТВР-методів дають можливість ідентифікувати та диференціювати вивчені види роду *Linum*, що характеризуються унікальними патернами ампліконів на електрофореграмах. Тому ці підходи можуть бути застосовані в молекулярно-генетичному та філогенетичному аналізі видів роду *Linum* L.

4.2.3.2. Порівняльний аналіз використання поліморфізму інтронів генів β -тубуліну, актину та мікросателітних локусів для генетичного профілювання сортів льону української селекції

Оцінка міжсортного і внутрішньосортного поліморфізму льону є необхідним для ефективного використання його генетичних ресурсів та проведення програм з сертифікації насіння [29]. Ідентифікація генотипів є важливим етапом на всіх стадіях селекції льону, починаючи з добору

батьківських ліній і закінчуючи кінцевим використанням отриманої сировини [263, 317, 434]. На цей час для льону існує лише невелика кількість ефективних генетичних маркерів, внаслідок чого його генетичні карти й досі залишаються неповними [27, 252]. Вивчення генетичного поліморфізму льону вже було проведено різними маркерними системами: AFLP [89], RAPD [104], ISSR [264] та SSR [152, 176], але їхня відтворюваність іноді була низькою.

Для ідентифікації сортів сільськогосподарських рослин все частіше використовують SSR-маркери [152, 176, 254, 318]. Кодомінантність, гіперваріабельність, мультиалельність, відтворюваність, висока щільність і рівномірність розподілу по геному роблять їх ефективним засобом вивчення між- і внутрішньовидової різноманітності [175]. В ряді робіт показано досить високу ефективність використання SSR-аналізу як засобу для ідентифікації генотипів [176, 263, 264, 318].

На цей час все більшої популярності для ДНК-профілювання набувають інтрони. Поліморфізм довжини інтронів, зокрема TBP, став зручним методом для генетичного картування та універсальним засобом для філогенетичних досліджень, ідентифікації та генетичної диференціації різних видів організмів.

Враховуючи це, було досліджено внутрішньосортний поліморфізм за допомогою TBP-, SSR-аналізу та аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину, встановлено генетичну однорідність сортів льону української селекції, а також проведено оцінку ефективності використання цитоскелетних PLP-маркерів у порівнянні з мікросателітними маркерами.

В ході аналізу генетичного поліморфізму сортів льону української селекції було виявлено 25 фрагментів різної довжини, з яких вісім виявилися поліморфними. З усіх досліджуваних зразків найбільш унікальним та відмінним від всіх інших за TBP-профілем виявився сорт 'Надія' (рис. 4.22).

Значення PIC для досліджених сортів дорівнює 0,48. Коефіцієнти подібності Нея та Лі варіюють в діапазоні від 0,25 до 1,0. Дані генетичного аналізу зразків льону було використано для відображення диференціації

досліджених сортів на основі значень коефіцієнту подібності Нея та Лі за допомогою методу UPGMA (рис. 4.23).

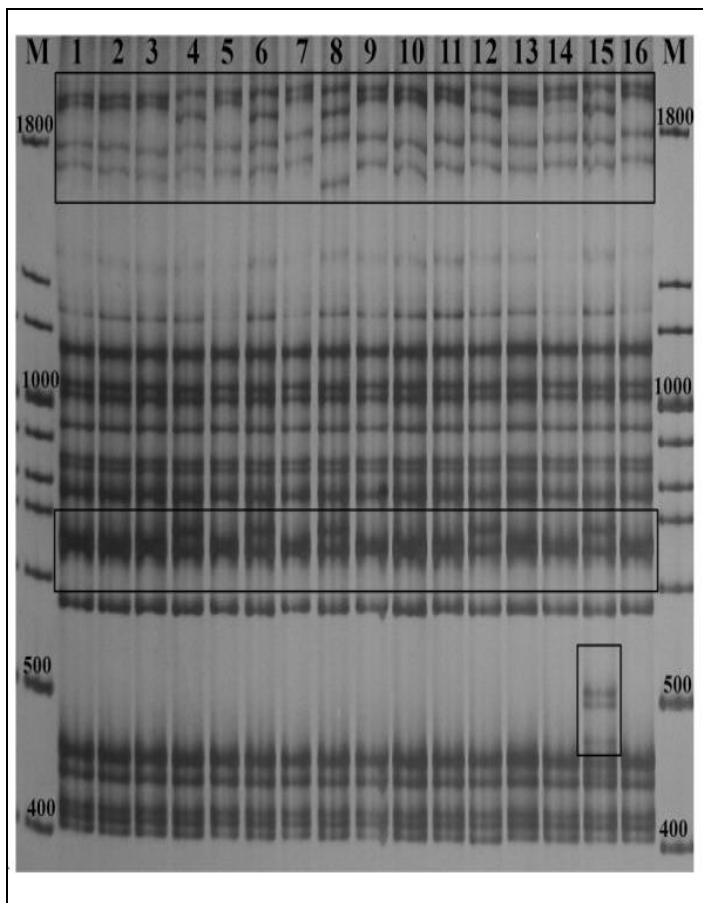


Рис. 4.22. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну досліджуваних сортів льону; номери зразків: 1- 'Есмань', 2- 'Чарівний', 3 – 'Зоря 87', 4 – 'Сіверський', 5 – 'Каменярь', 6 – 'Журавка', 7 – 'Глухівський ювілейний', 8 – 'Іванівський', 9 – 'Глобус', 10 – 'Вручий', 11 – 'Глазур', 12 – 'Міандр', 13 – 'Рушничок', 14 – 'Гладіатор', 15 – 'Надія', 16 – 'Глінум'; М – ДНК-маркер

З отриманої дендрограми видно, що досліджувані зразки льону чітко розділилися на дві групи (бутстреп підтримка 100%). До більшої групи увійшло 11 сортів (бутстреп-підтримка 88%). Десять сортів, які увійшли до цієї групи: 'Есмань', 'Глухівський ювілейний', 'Глобус', 'Глазур', 'Гладіатор', 'Чарівний', 'Зоря 87', 'Каменярь', 'Вручий', 'Рушничок' мали однаковий алельний фенотип, тому і склали одну кладу, причому шість з них – 'Есмань', 'Глухівський ювілейний', 'Глобус', 'Глазур', 'Гладіатор', 'Чарівний', мали однакове походження. Можливо, ці сорти мають схожі ТВР-профілі через те, що під час їх створення був використаний один і той самий вихідний селекційний матеріал. В другу групу увійшли сорти 'Сіверський', 'Журавка', 'Іванівський', 'Міандр', 'Надія', хоча мали різне походження.

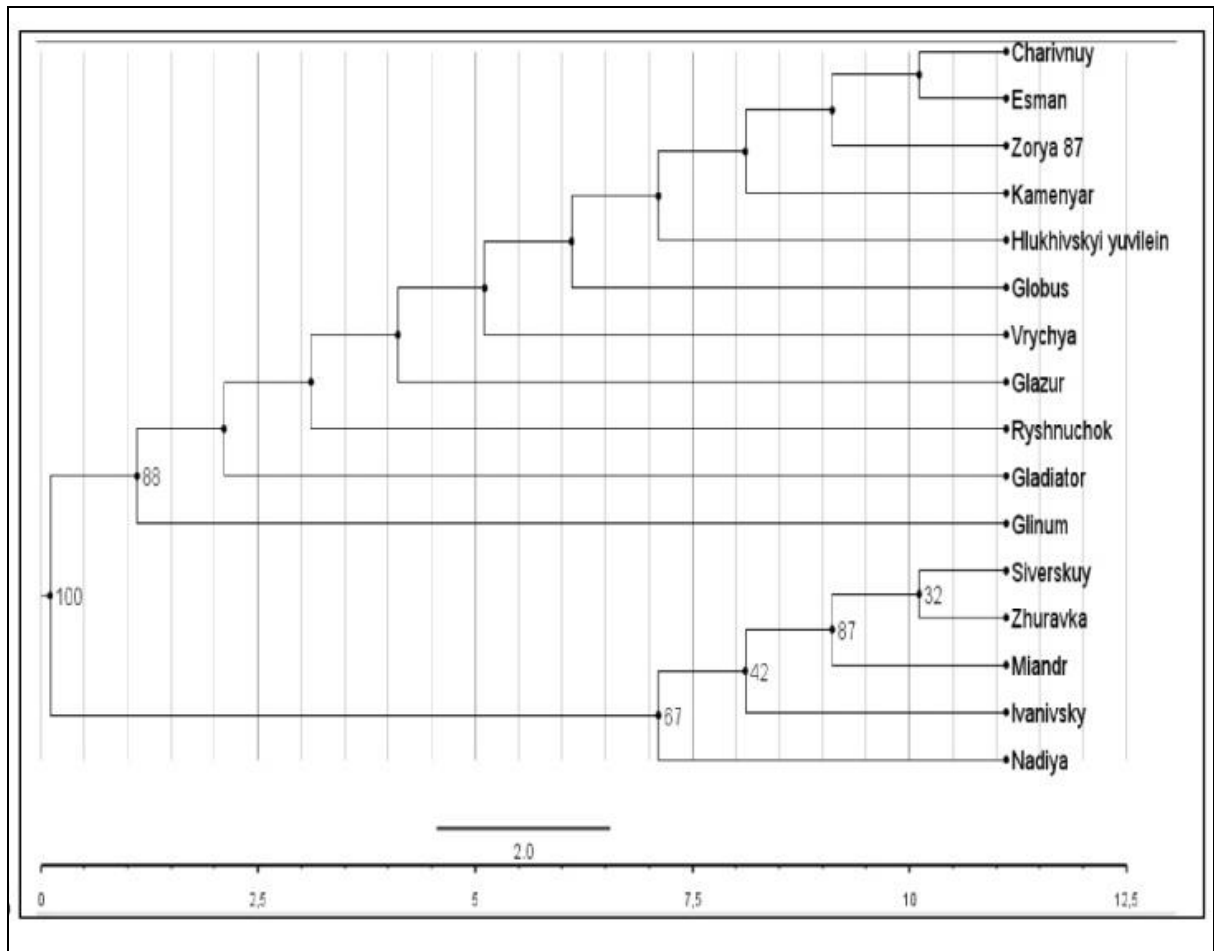
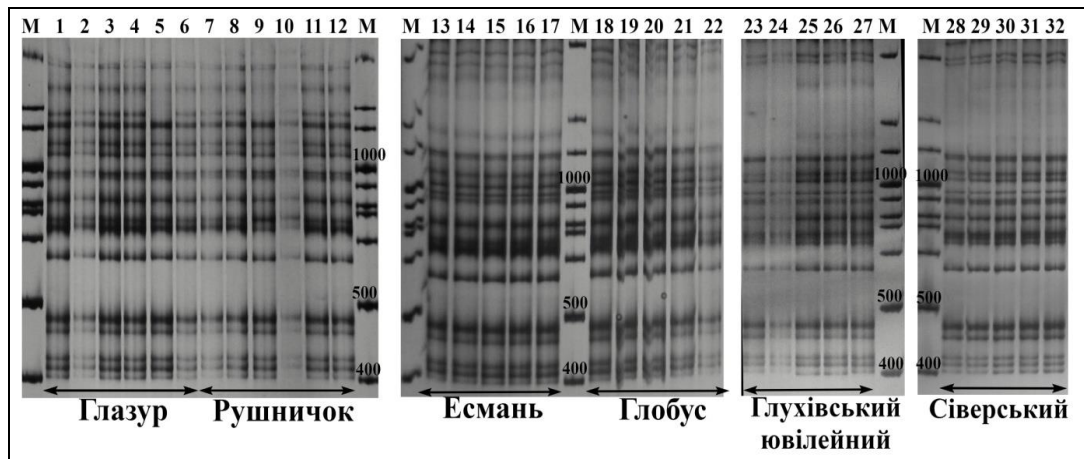


Рис. 4.23. UPGMA дендрограма, що побудована на підставі аналізу довжини інтронів генів β -тубуліну у досліджених зразків льону.

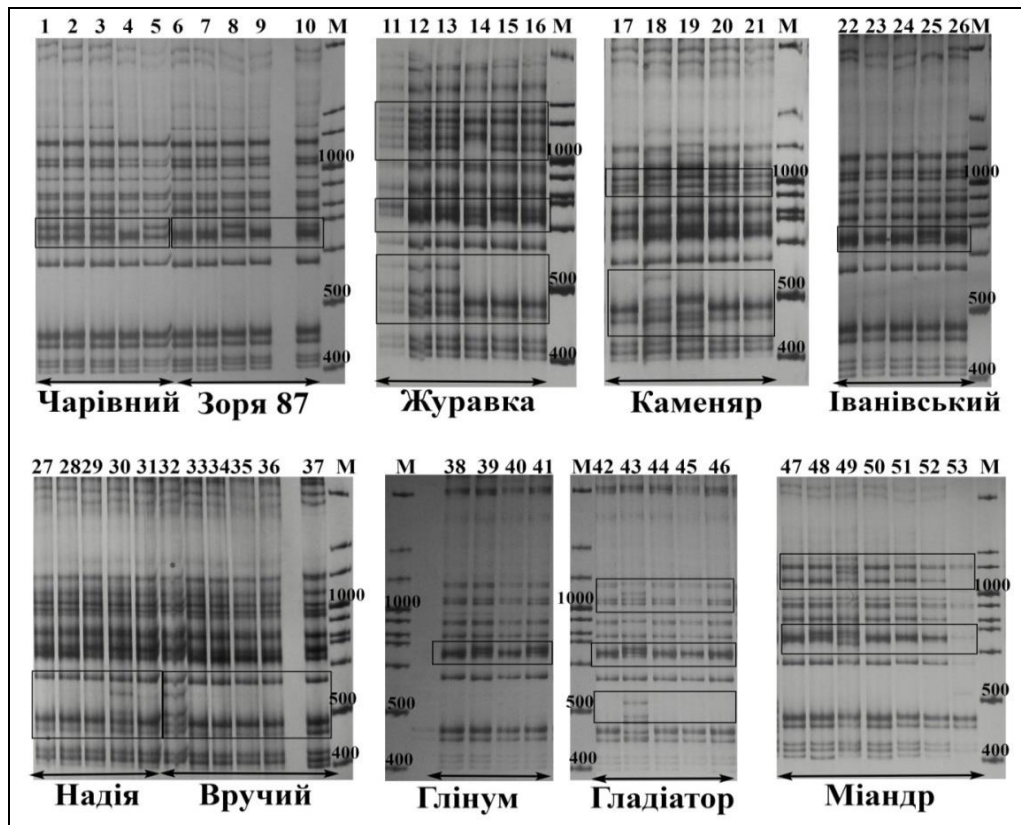
В результаті ТБП-аналізу внутрішньосортowego поліморфізму досліджуваних сортів льону виявлено шість сортів, які були гомогенними, причому п'ять з них походили з ДСЛК, інші десять сортів були з різним рівнем поліморфізму (рис. 4.24). Наявність гетерогенності, кількість алельних фенотипів та значення РС в межах кожного сорту наведені у табл. 4.2. Гомогенними виявилися сорти 'Есмань', 'Рушничок', 'Глобус', 'Глухівський ювілейний', 'Сіверський' та 'Глазур', тобто за ТВР-аналізом ці сорти льону характеризуються як мономорфні.

ТВР-аналіз десяти гетерогенних сортів вказує на те, що всі вони є генетично неоднорідними (рис. 4.24 Б). Найменшим значенням РС (0,28) характеризується сорт Вручий, а найбільшим – сорт 'Журавка' (0,61). В цілому, за результатами аналізу інтронів генів в β -тубуліну вдалося

встановити міжсортний та внутрішньосортний поліморфізм досліджених сортів льону української селекції.



А



Б

Рис. 4.24. А – Молекулярні профілі шести гомогенних сортів льону: 'Глазур', 'Рушничок', 'Есмань', 'Глобус', 'Глухівський ювілейний', 'Сіверський'; Б – 10 гетерогенних сортів льону, отриманих за допомогою ТВР-аналізу: 'Чарівний', 'Зоря 87', 'Журавка', 'Каменярь', 'Іванівський', 'Надія', 'Вручий', 'Глінум', 'Гладіатор', 'Міандр'; 1-32 (А) та 1-53 (Б) – номери зразків відповідних сортів; М – ДНК-маркер, прямокутниками позначені зони поліморфізму

Таблиця 4.2

**Результати аналізу генетичного поліморфізму досліджених сортів льону
української селекції**

№	Назва сорту	Кількість алельних фенотипів			PIC			Наявність гетерогенності, + / -		
		ssr_lu1	ssr_lu25	TBP	ssr_lu1	ssr_lu25	TBP	ssr_lu1	ssr_lu25	TBP
1	Есмань	2	1	1	0,44	0,00	0,00	+	-	-
2	Сіверський	1	1	1	0,00	0,00	0,00	-	-	-
3	Глухівський ювілейний	3	3	1	0,61	0,65	0,00	+	+	-
4	Глобус	1	1	1	0,00	0,00	0,00	-	-	-
5	Глазур	1	1	1	0,00	0,00	0,00	-	-	-
6	Гладіатор	3	3	2	0,61	0,56	0,32	+	+	+
7	Чарівний	2	2	2	0,28	0,32	0,32	+	+	+
8	Гліnum	4	1	2	0,72	0,00	0,50	+	-	+
9	Зоря 87	4*	4	2	0,67	0,72	0,48	+	+	+
10	Каменяр	3	3	3	0,61	0,61	0,56	+	-	+
11	Міандр	2	2	3	0,50	0,32	0,50	+	+	+
12	Рушничок	2	1	1	0,44	0,00	0,00	+	-	-
13	Іванівський	2	2*	2	0,44	0,28	0,32	+	+	+
14	Вручий	3	1	2	0,72	0,00	0,28	+	-	+
15	Журавка	3	3	3	0,50	0,64	0,61	+	+	+
16	Надія	4*	4*	2	0,67	0,64	0,32	+	+	+
	Загалом	8	10	6	0,81**	0,61**	0,48**	13	8	10

* – виявлено гетерозиготи; ** – міжсортове значення PIC (розраховували для 16 сортів)

Для оцінки внутрішньосортного поліморфізму досліджуваних сортів льону за допомогою SSR-аналізу відібрано пари мікросателітних маркерів – LU_1 та LU_25, які, згідно літературних даних, мають високий рівень поліморфізму [263]. Значення PIC між дослідженими сортами за цими локусами складає в середньому 0,81 та 0,61, відповідно (за формулою 1) (див.

табл. 4.2). Кількість алельних фенотипів за обома локусами в межах сорту була від одного до чотирьох. Загалом за локусом LU_1 виявлено вісім алельних фенотипів в діапазоні 130–179 п.н., а за локусом LU_25 – десять в діапазоні 154–225 п.н. (рис. 4.25 А, Б), що виявилось більшим значенням, ніж в сортах з Індії [263].

Побудовані за двома SSR-локусам дендрограми дуже відрізняються (рис. 4.25 В, Г). Так, у випадку генетичного аналізу за SSR-маркером LU_1 на дендрограмі сорти льону розділяються на шість груп, незалежно від походження, лише один сорт Глінум виокремлюється від інших сортів (бутстреп-підтримка 100 %). Відносно SSR-маркера LU_25 можна зазначити, що на дендрограмі досліджені сорти поділяються на три групи: Каменярь, Зоря, Журавка (бутстреп-підтримка 100%); Надія, Сіверський, Іванівський, Есмань (бутстреп-підтримка 30%), інші дев'ять сортів (бутстреп-підтримка 70%).

Під час вивчення внутрішньосортного поліморфізму льону локус LU_1 налічував шість алелів (130 п.н., 146 п.н., 159 п.н., 166 п.н., 174 п.н., 179 п.н.). З досліджених сортів льону 13 були гетерогенними та лише три сорти (Сіверський, Глазур, Глобус) були гомогенними (рис. 4.26). Ці сорти також були гомогенними також і за ТБП-аналізом. З виявлених гетерогенних сортів у двох сортів встановлено гетерозиготи – Зоря (166 п.н., 174 п.н.) та Надія (166 п.н., 179 п.н.). За локусом LU_25 виявлено вісім алелей (154 п.н., 162 п.н., 172 п.н., 180 п.н., 200 п.н., 210 п.н., 213 п.н., 225 п.н.) (рис. 4.27). За цим локусом встановлено сім гомогенних сортів ('Сіверський', 'Глазур', 'Глобус', 'Рушничок', 'Есмань', 'Вручий', 'Глінум') та дев'ять гетерогенних, причому гетерозиготи були також у двох сортах: 'Іванівський' (162 п.н., 200 п.н.) та 'Надія' (170 п. н, 210 п.н.), як і за локусом LU_1. Наявні деякі відмінності у діапазоні, розмірах та кількості алелів у отриманих іншими авторами результатах [113], які могли виникнути внаслідок багатьох причин, зокрема умов проведення ПЛР та особливостей інших сортів льону.

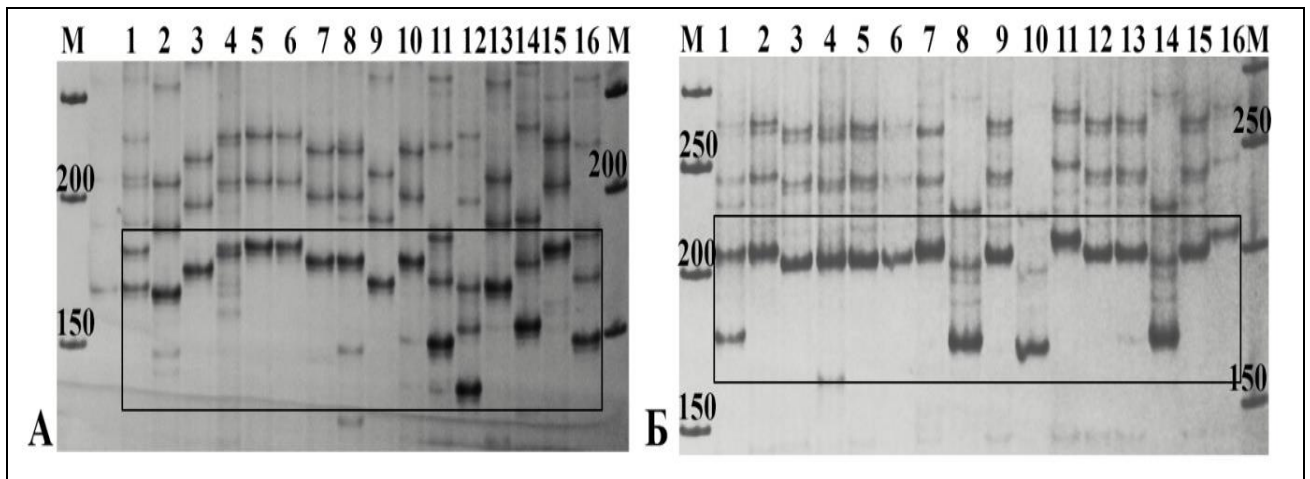
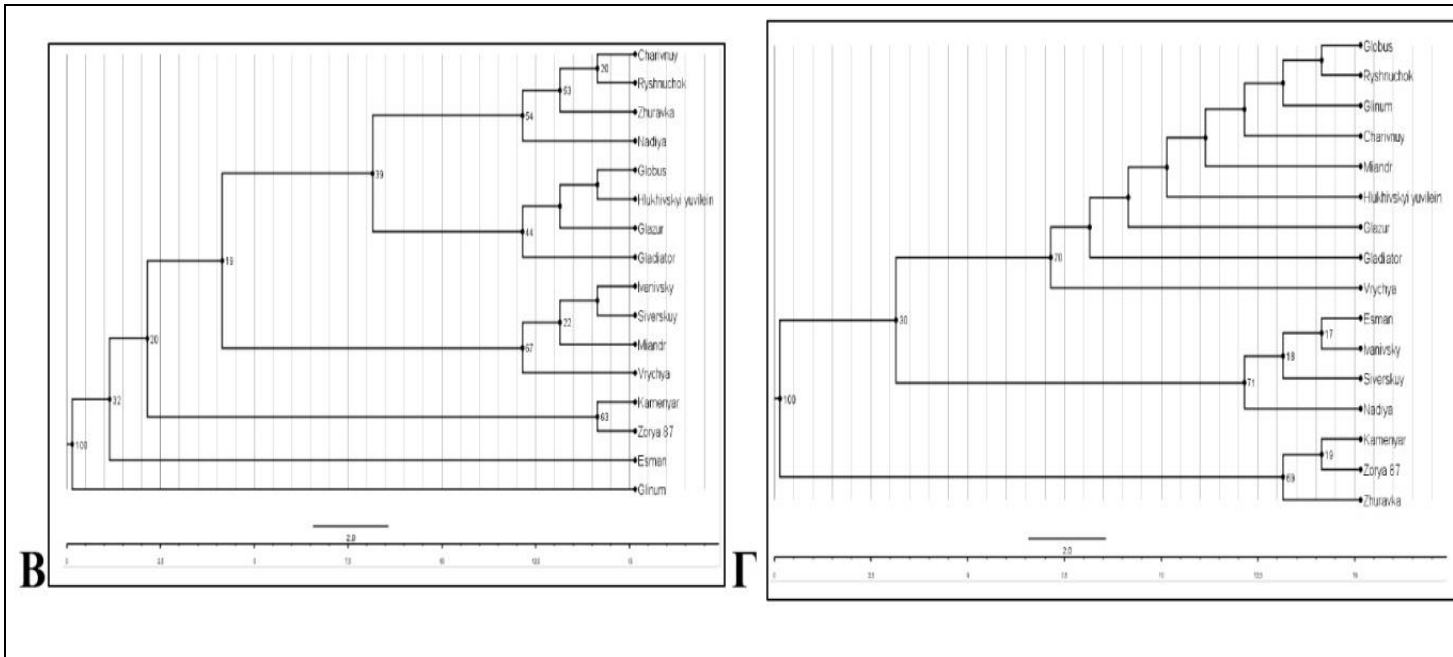


Рис. 4.25. Молекулярно-генетичні профілі 16 сортів льону, отриманих за допомогою SSR-маркерів LU_1 (А) та LU 25_(Б); 1–16 – сорти ‘Надія’, ‘Журавка’, ‘Вручий’, ‘Гладіатор’, ‘Глазур’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Міандр’, ‘Сіверський’, ‘Чарівний’, ‘Іванівський’, ‘Зоря 87’, ‘Глінум’, ‘Рушничок’, ‘Есмань’, ‘Глобус’, ‘Каменярь’, відповідно; М - ДНК-маркер. Прямокутниками позначені зони аналізу SSR локусів. В, Г – UPGMA дендрограми, що відображають генетичну схожість за SSR маркерами LU_1 (В) та LU_25 (Г) досліджених сортів льону.

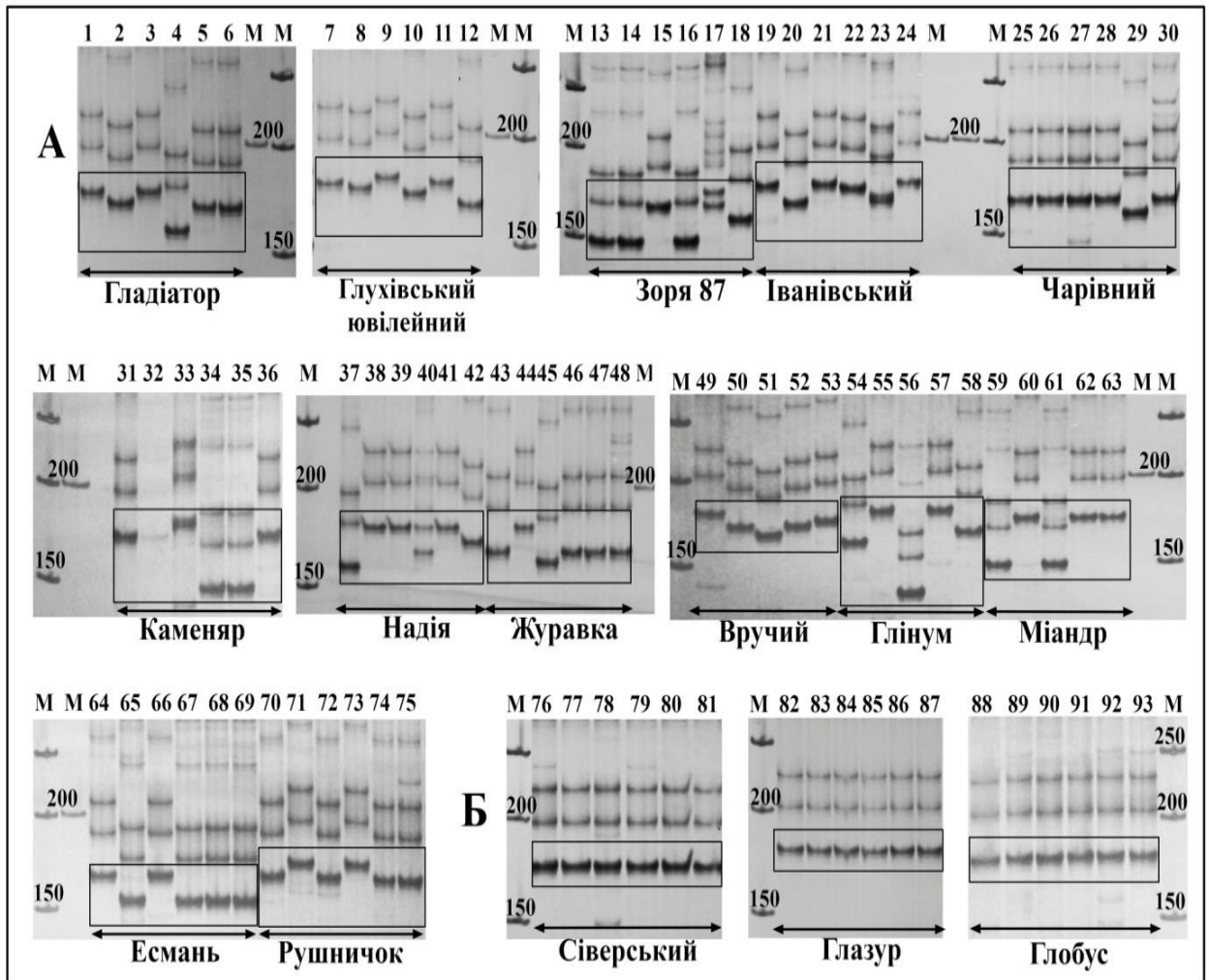


Рис. 4.26. Молекулярні профілі 13 гетерогенних (А) та 3 гомогенних (Б) сортів льону, отримані за допомогою SSR-маркера LU_1: 1–6 – ‘Гладіатор’, 7–12 – ‘Глухівський ювілейний’, 13–18 – ‘Зоря 87’, 19–24 – ‘Іванівський’, 25–30 – ‘Чарівний’, 31–36 – ‘Каменярь’, 37–42 – ‘Надія’, 43–48 – ‘Журавка’, 49–53 – ‘Вручий’, 54–58 – ‘Гліну́м’, 59–63 – ‘Міандр’, 64–69 – ‘Есмань’, 70–75 – ‘Рушничок’, 76–81 – ‘Сіверський’, 82–87 – ‘Глазур’, 88–93 – ‘Глобус’; М – ДНК – маркер. Прямокутниками позначені зони, що аналізувалися

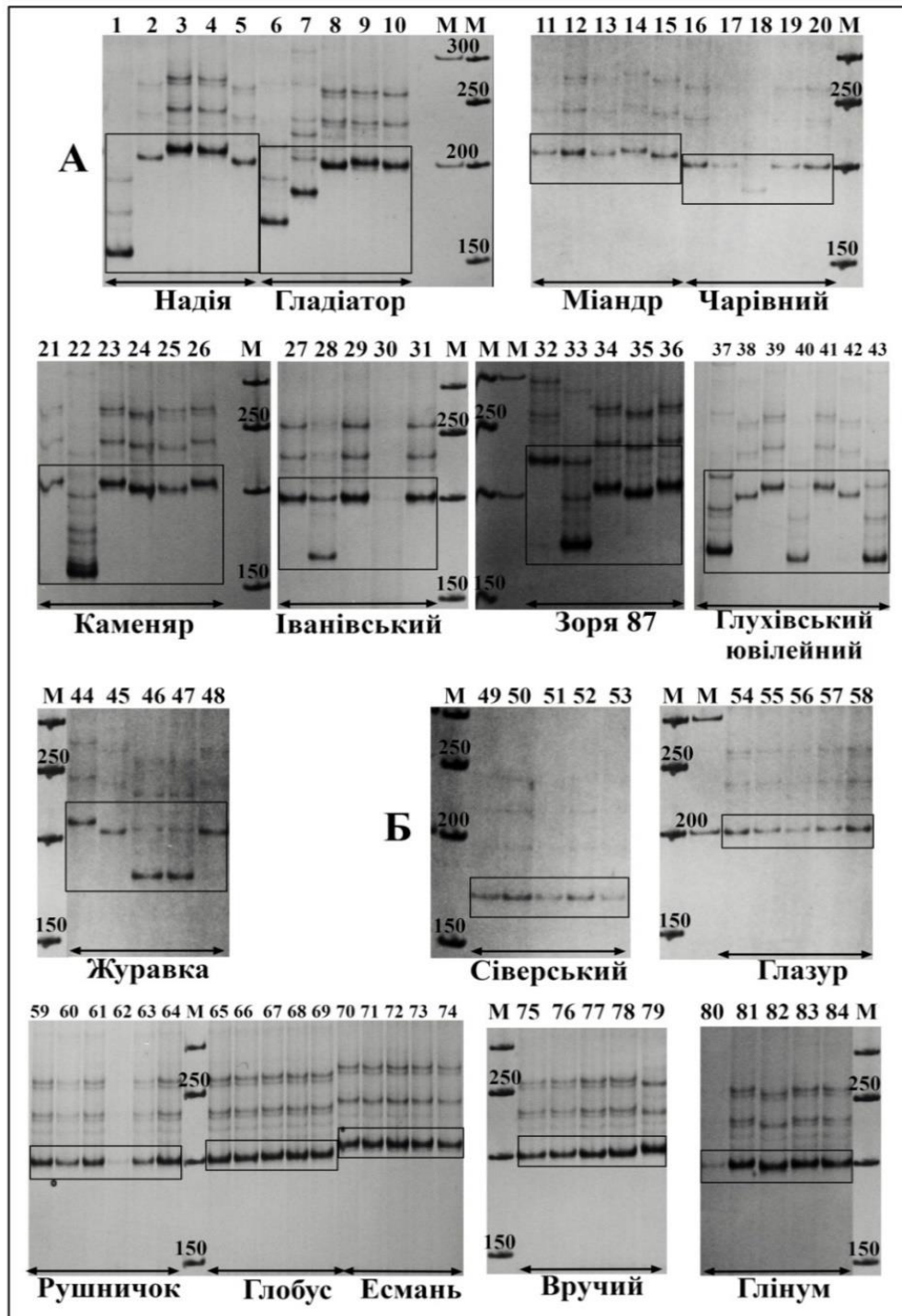


Рис. 4.27. Молекулярні профілі 9 гетерогенних (А) та 7 гомогенних (Б) сортів льону, отримані за допомогою SSR-маркера LU_25: 1–5 – ‘Надія’, 6–10 – ‘Гладіатор’, 11–15 – ‘Міандр’, 16–20 – ‘Чарівний’, 21–26 – ‘Каменярь’, 27–31 – ‘Іванівський’, 32–36 – ‘Зоря 87’, 37–43 – ‘Глухівський ювілейний’, 44–48 – ‘Журавка’, 49–53 – ‘Сіверський’, 54–58 – ‘Глазур’, 59–64 – ‘Рушничок’, 65–69 – ‘Глобус’, 70–74 – ‘Есмань’, 75–79 – ‘Вручий’, 80–84 – ‘Глінум’; М – ДНК-маркер. Прямокутниками позначені зони, що аналізувалися.

Проведений аналіз генетичного поліморфізму сортів льону вказує на те, що сорти Глобус, Глазур та Сіверський виявилися генетично однорідними як за ТБП-маркером, так і за обома мікросателітними локусами, сорти Есмань, Рушничок – за ТБП-маркером та локусом LU_25, сорт Глухівський ювілейний – лише за ТБП-маркером, а сорти Глінум та Вручий – лише за SSR-маркером LU_25. Проведений аналіз за всіма маркерами показав, що сім сортів виявилися генетично неоднорідними за дослідженими трьома маркерами, вісім сортів – за обома мікросателітними локусами та чотири – за локусом LU_1. У гомогенних сортів внутрішньосортний поліморфізм за маркерами відсутній.

В цілому для більшості досліджених сортів льону української селекції за ТБП- та певними SSR-маркерами встановлений внутрішньосортний поліморфізм. Тобто сорти є генетично неоднорідними. Це необхідно враховувати під час створення молекулярно-генетичних паспортів даних сортів.

Також було оцінено можливість використання маркерної системи, що базується на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів актину для встановлення внутрішньовидової мінливості сортів льону-довгунця (*L. usitatissimum*) української селекції та дослідження генетичної однорідності сортів льону-довгунця української селекції шляхом виявлення внутрішньосортного поліморфізму довжини інтронів генів актину та SSR-локусів.

Для виявлення поліморфізму довжин інтронів генів актину попередньо були розроблена пара вироджених праймерів ActIn, що є універсальними для всіх видів рослин (табл. 2.11).

В ході аналізу генетичного поліморфізму сортів льону української селекції за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину було виявлено щонайменше 10 фрагментів різної довжини в межах від 650 п.н. до 1500 п.н. (рис. 4.28). Найбільш чіткими виявилися поліморфні зони з довжиною 700-850 п.н., які містять щонайменше п'ять фрагментів інтронів

генів актину. Фрагменти, розташовані вище 900 п.н., виявилися мономорфними для всіх зразків [450].

Гомогенними виявилися чотири сорти 'Есмань', 'Сіверський', 'Глазур' та 'Чарівний', з яких сорти 'Сіверський' та 'Глазур' були мономорфними і за дослідженими раніше маркерами (ТБР та SSR), інші 12 сортів були з різним рівнем поліморфізму (рис. 4.28). В цих гетерогенних сортах ('Глухівський ювілейний', 'Глобус', 'Глінум', 'Зоря 87', 'Каменярь', 'Міандр', 'Журавка', 'Надія', 'Рушничок', 'Іванівський', 'Вручий') виявили по дві поліморфні зони ампліконів інтронів генів актину. Виняток складає сорт 'Гладіатор', який був найбільш гетерогенним і характеризувався п'ятьма фрагментами різної довжини [450].

В результаті АВР-аналізу досліджуваних сортів льону встановлено, що вони є генетично неоднорідними, за винятком чотирьох мономорфних сортів. Значення PIS коливаються в межах від 0,28 до 0,72 (табл. 4.3). Найменшим значенням PIS (0,28) характеризувались сорти 'Вручий' (як і за ТБР-аналізом) та Надія, а найбільшим (0,72) – сорт 'Гладіатор'. Для інших сортів значення PIS було 0,32–0,48. В ході проведених досліджень вдалося виявити поліморфні амплікони в більшості сортів за виключенням 'Есмань', 'Сіверський', 'Глазур' та 'Чарівний'. В цілому, за результатами аналізу інтронів генів актину також, як і за іншими маркерами, вдалося встановити внутрішньосортовий поліморфізм досліджених сортів льону української селекції.

Для оцінки внутрішньосортного поліморфізму досліджуваних сортів льону за допомогою SSR-аналізу відібрано ще пару мікросателітних маркерів – та LU_21, які, згідно літературних даних, теж мають високий рівень поліморфізму (значення PIS для LU_7 – 0,750, для LU_21 – 0,625) [263]. В сортах льону з Індії максимальна кількість алельних фенотипів за локусом LU_7 складає чотири, а за локусом LU_21 – три. Все вищезгадане доводить той факт, що ці два маркери є можуть бути придатними для оцінки генетичної однорідності сортів льону-довгунця.

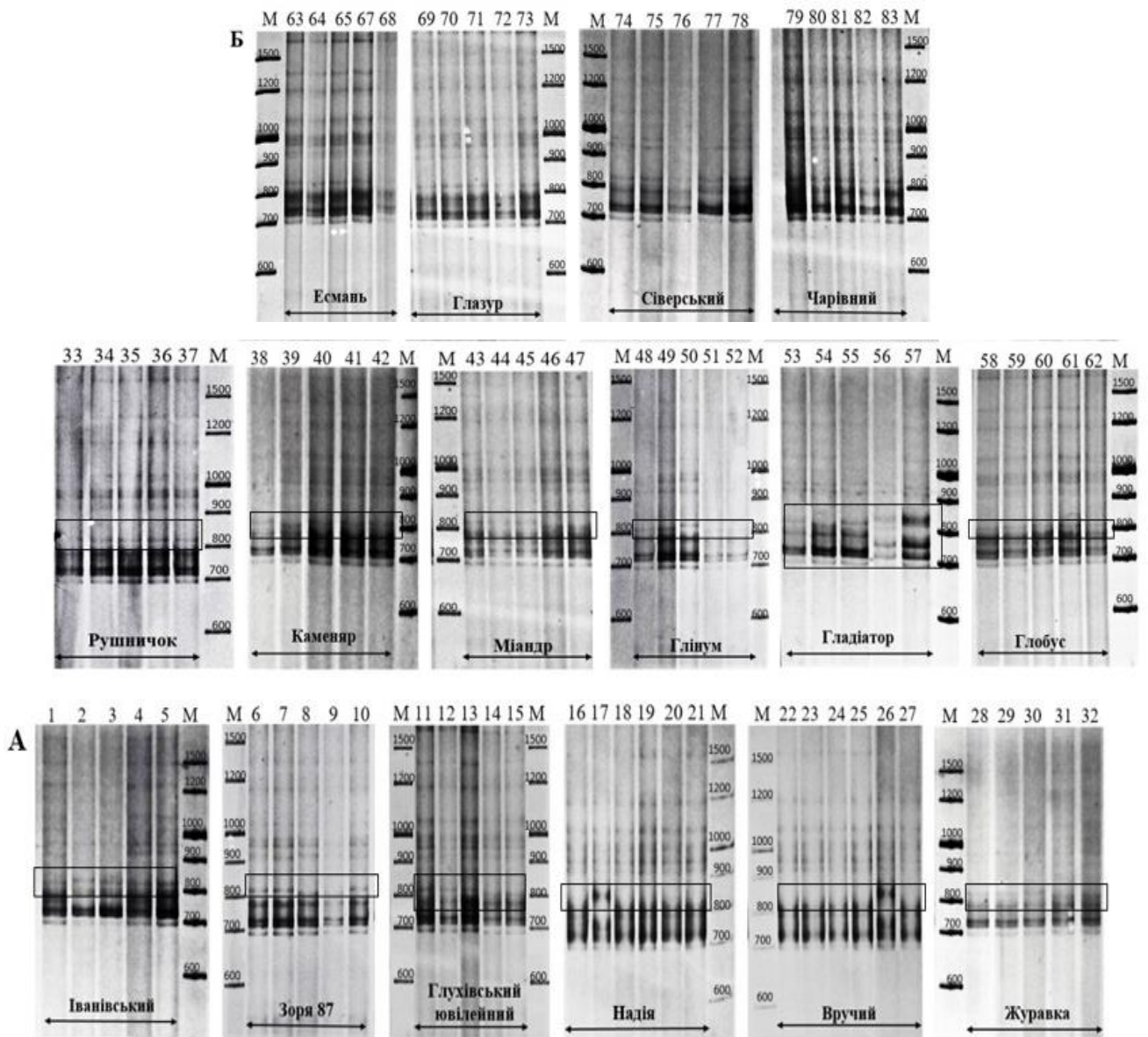


Рис. 4.28. Аналіз сортів льону-довгунця української селекції з використанням вироджених праймерів ActIn. *A* – гетерогенні сорти: 1–5 – ‘Іванівський’; 6–10 – ‘Зоря 87’; 11–15 – ‘Глухівський ювілейний’; 16–21 – ‘Надія’; 22–27 – ‘Вручий’; 28–32 – ‘Журавка’; 33–37 – ‘Рушничок’; 38–42 – ‘Каменярь’; 43–47 – ‘Міандр’; 48–52 – ‘Глінум’; 53–57 – ‘Гладіатор’; 58–62 – ‘Глобус’; *B* – гомогенні сорти: 63–68 – ‘Есмань’; 69–73 – ‘Глазур’; 74–78 – ‘Сіверський’; 79–83 – ‘Чарівний’; М – ДНК-маркер. Прямокутниками виділено зону розташування поліморфних ампліконів інтронів генів актину [450]

Таблиця 4.3

**Аналіз сортів льону-довгунця з використанням поліморфізму
довжини інтронів генів актину**

№	Назва сорту	ActIn		
		Кількість алельних фенотипів	PIC	Наявність гетерогенності, + / –
1	‘Есмань’	1	0,00	-
2	‘Сіверський’	1	0,00	-
3	‘Глухівський ювілейний’	2	0,48	+
4	‘Глобус’	2	0,48	+
5	‘Глазур’	1	0,00	-
6	‘Гладіатор’	4	0,72	+
7	‘Чарівний’	1	0,00	-
8	‘Глінум’	2	0,32	+
9	‘Зоря 87’	2	0,48	+
10	‘Каменярь’	2	0,32	+
11	‘Міандр’	2	0,48	+
12	‘Журавка’	2	0,48	+
13	‘Надія’	2	0,28	+
14	‘Рушничок’	2	0,32	+
15	‘Іванівський’	2	0,32	+
16	‘Вручий’	2	0,28	+

На рис. 4.29 наведено результати аналізу льону досліджуваних сортів української селекції за мікросателітним локусом LU 7. Згідно літературних джерел, очікували появу чотирьох алелей SSR локусу LU 7 довжиною приблизно 134–154 п.н. [263]. Використання SSR-маркеру LU 7 показало

стабільне утворення шести алелей різної довжини, а саме: 135 п.н., 141 п.н., 145 п.н., 147 п.н., 149 п.н., та 154 п.н., що не зовсім узгоджується з раніше опублікованими даними.

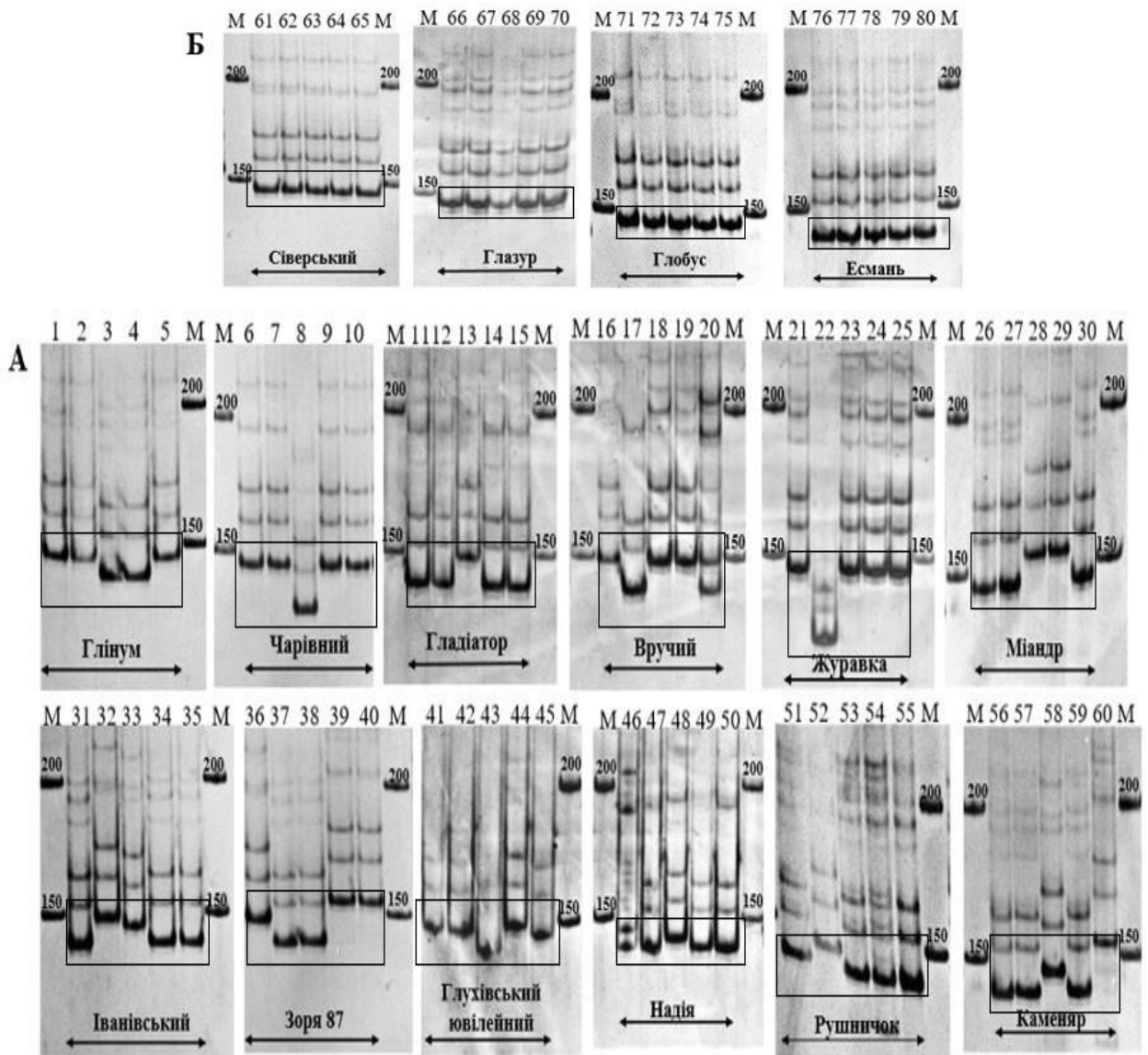


Рис. 4.29. Аналіз сортів льону-довгунця української селекції з використанням SSR-маркеру LU 7. *А* – гетерогенні сорти, 1–5 – Глінум, 6–10 – Чарівний, 11–15 – Гладіатор, 16–20 – Вручий, 21–25 – Журавка, 26–30 – Міандр, 31–35 – Іванівський, 36–40 – Зоря 87, 41–45 – Глухівський ювілейний, 46–50 – Надія, 51–55 – Рушничок, 56–60 – Каменяр. *Б* – гомогенні сорти, 61–65 – Сіверський, 66–70 – Глазур, 71–75 – Глобус, 76–80 – Есмань, М – ДНК-маркер (O'GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder). Прямокутниками виділено зони розташування алелей [450]

Більшість сортів виявились гетерогенними. Вони містили в своєму складі по 2–3 алеля. Сорти Глінум, Чарівний, Гладіатор, Вручий, Журавка та Міандр мали по два алеля різної довжини та в різній кількості. В межах сортів Іванівський, Зоря 87, Глухівський ювілейний, Надія, Рушничок та Каменяр виявлено по два алеля. Важливо зазначити, що в зразках 20 (сорт Вручий) та 46 (сорт Надія) зафіксовано появу одразу двох алелей одночасно (149 п. н. та 141 п. н. і 147 п. н. та 141 п. н. відповідно), що свідчить про їх гетерозиготність за SSR-маркером LU 7. Деякі сорти виявилися повністю мономорфними за SSR-маркером LU 7. Зразки сортів Сіверський, Глазур та Глобус містили лише один алель мікросателіту LU 7 довжиною 147 п. н., а сорт Есмань – лише фрагмент 141 п. н.

Для оцінки рівня внутрішньо сортового поліморфізму для кожного сорту льону був використаний показник вмісту поліморфної інформації (PIC). Було встановлено, що для мікросателітного локусу LU_7 у досліджених сортів PIC варіює від 0,00 (гомогенні сорти Есмань, Глобус, Глазур та Сіверський) до 0,64 у сорту Зоря 87, Міандр (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Аналіз сортів льону-довгунця з використанням SSR-маркерів

Назва сорту	LU 7			LU 21		
	Полімор- фізм (+/-)	Алельний фенотип (к-сть)	PIC	Полімор- фізм (+/-)	Алельний фенотип (к-сть)	PIC
‘Есмань’	-	1	0,00	-	1	0,00
‘Сіверський’	-	1	0,00	-	1	0,00
‘Глухівський ювілейний’	+	3	0,56	+	2	0,48
‘Глобус’	-	1	0,00	-	1	0,00
‘Глазур’	-	1	0,00	-	1	0,00

‘Гладіатор’	+	2	0,32	+	2	0,32
‘Чарівний’	+	2	0,32	+	2	0,32
‘Глінум’	+	2	0,48	+	2	0,48
‘Зоря 87’	+	3	0,64	+	4	0,72
‘Каменяр’	+	3	0,56	+	3	0,56
‘Міандр’	+	3	0,64	+	2	0,32
‘Журавка’	+	2	0,32	+	2	0,32
‘Надія’	+	3	0,56	+	2	0,32
‘Рушничок’	+	3	0,56	+	2	0,32
‘Іванівський’	+	3	0,56	+	3	0,56
‘Вручий’	+	3	0,56	+	3	0,56

Під час дослідження внутрішньосортного поліморфізму сортів льону SSR-локус LU_21 налічував п'ять алелів (141 п.н., 145 п.н., 147 п.н., 151 п.н., та 155 п.н.) (рис. 4.30). З досліджених сортів льону 12 були гетерогенними та лише чотири сорти (Есмань (145 п. н.), Глобус (151 п. н.), Глазур (151 п. н.) та Сіверський (151 п. н.)) були гомогенними. Гетерогенні сорти: Глухівський ювілейний, Гладіатор, Чарівний, Глінум, Міандр, Надія, Журавка, Рушничок містили по два алеля мікросателітного локусу LU_21, Сорти Каменяр, Іванівський та Вручий мали по три алелі, а сорт Зоря 87 – чотири фрагменти (145 п. н., 147 п. н., 151 п. н. та 155 п. н.). До того ж сорти Рушничок та Вручий виявилися гетерозиготними.

При оцінці рівня внутрішньосортного поліморфізму льону значення PIS для проаналізованих зразків було в межах від 0,00 (для гомогенних сортів Есмань, Глобус, Глазур та Сіверський, як і для локусу LU_7) до 0,72 – сорт Зоря 87 (також найбільше значення для локусу LU_7) (див. табл. 4.4).

Проведений аналіз за маркерами LU_7 та LU_21 показав, що 12 сортів виявилися генетично неоднорідними за дослідженими маркерами (сорти Зоря 87 (найбільш гетерогенний), Каменяр, Рушничок, Іванівський, Глінум, Глухівський ювілейний, Міандр, Надія, Вручий, Гладіатор, Журавка,

Чарівний) (табл. 4.4). У гомогенних сортів внутрішньосортовий поліморфізм за маркерами відсутній.

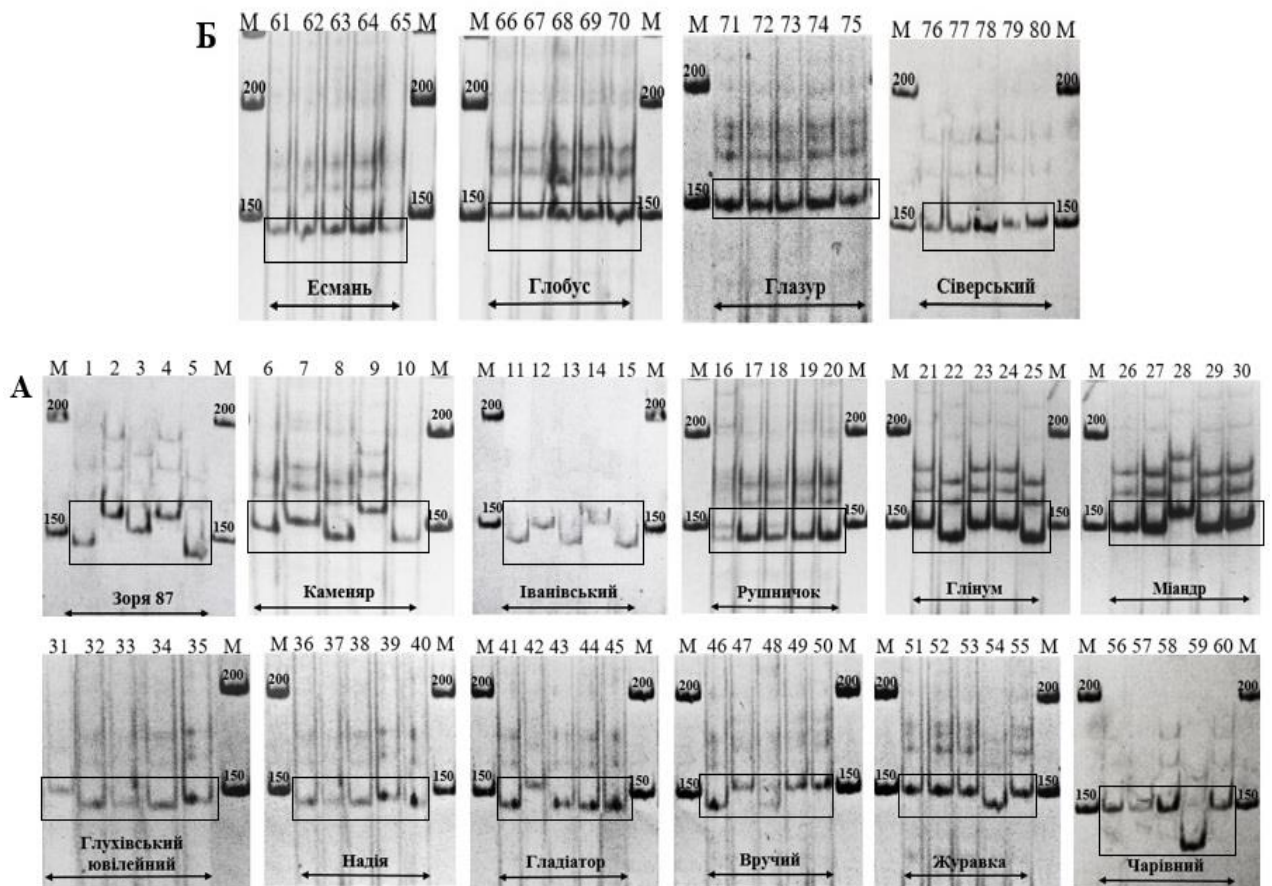


Рис. 4.30. Аналіз сортів льону-довгунця української селекції з використанням SSR-маркера LU 21. *А* – гетерогенні сорти, сорти. 1–5 – Зоря 87, 6–10 – Каменярь, 11–15 – Іванівський, 16–20 – Рушничок, 21–25 – Глінум, 26–30 – Міандр, 31–35 – Глухівський ювілейний, 36–40 – Надія, 41–45 – Гладіатор, 46–50 – Вручий, 51–55 – Журавка, 56–60 – Чарівний, *Б* – гомогенні 61–65 – Есмань, 66–70 – Глобус, 71–75 – Глазур, 76–80 – Сіверський, М – ДНК-маркер. Прямокутниками виділено зони розташування алелей.

В цілому результати аналізу сортів льону-довгунця української селекції з використанням різних ДНК-маркерів (поліморфізм довжин інтронів генів актину та SSR) свідчать про доцільність використання обох маркерних систем для оцінки генетичної однорідності сортів. Оцінивши поліморфізм довжини інтронів генів актину встановлено, що генетично неоднорідними виявилися сорти Зоря 87, Іванівський, Глухівський ювілейний, Вручий, Надія, Журавка, Каменярь, Рушничок, Глінум, Міандр, Гладіатор та Глобус.

За SSR-локусами LU 7 та LU 21 алельний поліморфізм виявлено у сортів Зоря 87, Іванівський, Глухівський ювілейний, Вручий, Надія, Журавка, Каменярь, Рушничок, Глінум, Міандр, Гладіатор, та Чарівний. Дослідивши поліморфізм довжин інтронів генів актину встановлено, що генетично мономорфними є сорти Есмань, Сіверський, Глазур та Чарівний, а за SSR-маркерами – Есмань, Сіверський, Глазур та Глобус. Важливим є те, що всі генетично однорідні сорти були створені на базі Дослідної станції луб'яних культур Інституту сільського господарства Північного Сходу НААН України.

Також варто зазначити, що у сорту Чарівний не виявлено поліморфізму довжини інтронів генів актину, однак цей сорт виявляється генетично неоднорідним за SSR-маркерами LU 7 та LU 21. Також, сорт Глобус є мономорфним за обома мікросателітними маркерами, однак було виявлено значну кількість поліморфних фрагментів інтронів генів актину, що все ж таки характеризує цей сорт льону-довгунця як гетерогенний. Отримані результати аналізу внутрішньосортової різноманітності сортів льону-довгунця свідчать про те, що оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину є не менш інформативним джерелом даних у порівнянні розповсюдженою маркерною системою, що ґрунтується на аналізі мікросателітних локусів. Ці принципово різні підходи можуть використовуватися для оцінки генетичної однорідності сортів льону-довгунця окремо або/і разом як взаємодоповнювальні ДНК-маркери, з метою отримання більш точних та достовірних генетичних даних.

Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину (АВР) є принципово новим підходом у популяційно-генетичних дослідженнях рослин. Так, в геномі льону-довгунця виявлено та проаналізовано 15 генів актину [285, 439], які і було використано для розробки ДНК-маркерів. Тому досить очевидно є відмінність цих маркерів у порівнянні з SSR-маркерами, що підтверджується різними значеннями РС під час оцінки однорідності сортів льону-довгунця української селекції. РС для мікросателітних локусів

в цілому був вищим, в порівнянні з РІС, отриманими за допомогою маркерів, що засновані на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів актину. Однак, це не вказує на недостатню роздільну здатність запропонованого підходу, оскільки SSR-маркери для аналізу навмисно обиралися з найвищими значеннями РІС. Навпаки, отримані результати слід інтерпретувати на користь додаткових можливостей методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, як нових ДНК-маркерів, разом з широко розповсюдженими SSR-маркерами.

Таким чином, для оцінки генетичної різноманітності сортів льону можна використовувати як виявлення поліморфізму довжин інтронів генів актину, так і оцінку алельного складу мікросателітних локусів.

SSR-маркери є важливим інструментом генетичного профілювання. Але надійність генотипування часто залежить від кількості SSR-маркерів, що використовуються одночасно [48], а кількість даних, що утворюються під час застосування SSR-маркерів вимагає значних затрат часу для проведення аналізу та відповідного програмного забезпечення. Окрім того, за умов генотипування за допомогою SSR-маркерів застосовують контрольні алелі, розмір яких може відрізнятися у різних лабораторіях, що часто призводить до зменшення сумісності отриманих даних.

З огляду на це було порівняно ефективність застосування молекулярних маркерів на основі аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину з мікросателітними маркерами. Показано, що застосування TBP- та ABP-аналізу дозволяє не менш надійно ідентифікувати та диференціювати сорти та генотипи льону, ніж за допомогою SSR-аналізу. І хоча в деяких випадках значення РІС, отримані за умов використання TBP- та ABP-методів є меншими за величинами, ніж РІС для SSR-аналізу, це не ознакою гіршої диференціюючої здатності підходу. Це є, насамперед, результатом того, що для порівняльної оцінки ДНК-маркерів були цілеспрямовано відібрані SSR-послідовності з найвищими значеннями РІС [263], бо з самого початку за мету ставилась перевірка ефективності

застосування TBP- та ABP-методів в порівнянні з SSR-маркерами для ідентифікації та диференціації видів.

Згідно даних, наведених в табл. 4.5, тільки два сорти, Сіверський та Глазур, селекції ДСЛК (Інститут луб'яних культур НААН України) виявилися гомогенними. Всі інші сорти, хоча б за одним видом маркерів мали поліморфізм. У сорту Есмань поліморфізм був встановлений тільки за одним з SSR-маркерів – Lu-1. Сорт Глухівський ювілейний виявився поліморфним за мікросателітними маркерами та інтронами генів актину, в той же час TBP-аналіз не виявив гетерогенності цього сорту. Сорт Глобус мав поліморфізм за інтронами генів актину, хоча за мікросателітними локусами та інтронами генів β -тубуліну виявити поліморфізм не вдалося. В той же час у сорту Чарівний було встановлено гетерогенність за допомогою мікросателітних локусів та поліморфізму інтронів генів β -тубуліну, а за інтронами генів актину такої закономірності не спостерігалось. У більшості випадків (10 сортів з 16) результати аналізу за обома видами маркерів давали однакові результати, тобто як за мікросателітними маркерами, так і за TBP-, ABP-маркерами було встановлено гетерогенність сортів.

Варто зазначити, що TBP- та ABP-методи можуть не завжди адекватно працювати на різних таксономічних рівнях, оскільки їх чутливість залежить від біологічних особливостей та характеру розмноження рослин. Як правило, високоалогамні види добре ідентифікуються та диференціюються за допомогою ILP-аналізу [273]. Оскільки льон вирощується людиною багато тисяч років, то процес його запилення постійно контролюється. Це в цілому робить зміни його генетичної структури незначними на сортовому або популяційному рівнях. Можливо, це є однією з причин того, що на міжсортівному рівні відмінності між зразками не були настільки великими. В той же час, за допомогою TBP- та ABP-методів вдалося ідентифікувати та диференціювати окремі генотипи льону, встановити рівень внутрішньосортівного поліморфізму.

Ефективність застосування генетичних маркерів, заснованих на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину, в порівнянні з SSR-маркерами на прикладі аналізу гетерогенності сортів льону-довгунця

Назва сорту	Поліморфізм довжини інтронів генів актину		Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (TBP)		SSR (LU1 / LU7 / LU21 / LU25)	
	Поліморфізм (+/-)	PIC	Поліморфізм (+/-)	PIC	Поліморфізм (+/-)	PIC
‘Есмань’	–	0,00	–	0,00	+ / – / – / –	0,44 / 0,00 / 0,00 / 0,00
‘Сіверський’	–	0,00	–	0,00	– / – / – / –	0,00 / 0,00 / 0,00 / 0,00
‘Глухівський ювілейний’	+	0,48	–	0,00	+ / + / + / +	0,61 / 0,56 / 0,48 / 0,65
‘Глобус’	+	0,48	–	0,00	– / – / – / –	0,00 / 0,00 / 0,00 / 0,00
‘Глазур’	–	0,00	–	0,00	– / – / – / –	0,00 / 0,00 / 0,00 / 0,00
‘Гладіатор’	+	0,72	+	0,32	+ / + / + / +	0,61 / 0,32 / 0,32 / 0,56
‘Чарівний’	–	0,00	+	0,32	+ / + / + / +	0,28 / 0,32 / 0,32 / 0,32
‘Глінум’	+	0,32	+	0,50	+ / + / + / –	0,72 / 0,48 / 0,48 / 0,00
‘Зоря 87’	+	0,48	+	0,48	+ / + / + / +	0,67 / 0,64 / 0,72 / 0,72

‘Каменяр’	+	0,32	+	0,56	+ / + / + / -	0,61 / 0,56 / 0,56 / 0,61
‘Міандр’	+	0,48	+	0,50	+ / + / + / +	0,50 / 0,64 / 0,32 / 0,32
‘Журавка’	+	0,48	+	0,61	+ / + / + / +	0,50 / 0,32 / 0,32 / 0,64
‘Надія’	+	0,28	+	0,32	+ / + / + / +	0,67 / 0,56 / 0,32 / 0,64
‘Рушничок’	+	0,32	-	0,00	+ / + / + / -	0,44 / 0,56 / 0,32 / 0,00
‘Іванівський’	+	0,32	+	0,32	+ / + / + / +	0,44 / 0,56 / 0,56 / 0,28
‘Вручий’	+	0,28	+	0,28	+ / + / + / -	0,72 / 0,56 / 0,56 / 0,00

+ - наявність поліморфізму; - - відсутність поліморфізму

Використання ТВР та АВР дає певні переваги в практичному плані, а саме, економію часу та реагентів, оскільки одна і та ж сама пара праймерів використовується для ПЛР незалежно від того, який вид досліджується. Для проведення ТВР- та АВР-аналізу немає потреби мати якийсь контрольний алель, тому що зразки ідентифікуються і диференціюються за їх ТВР-, АВР-профілями, і можуть складатися з багатьох смуг. Завдяки своїй простоті цей метод не потребує якихось складних обчислень та дає можливість створити просту базу даних для перевірки ідентичності нових сортів [113]. Таким чином, ТВР та АВР поєднують в собі надійність і швидкість отримання вихідних даних, а також простоту їх аналізу.

В цілому, в результаті проведених досліджень з використанням ТВР, АВР та SSR-методів досліджено внутрішньосортний та міжсортний поліморфізм сортів льону української селекції. Встановлено, що більшість з досліджених сортів є генетично гетерогенним. Показано, що ТВР-, АВР-методи є швидкими, простими та надійними молекулярно-генетичними інструментами, які можуть бути використані як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами для молекулярно-генетичного аналізу льону.

4.2.3.3. Генотипування білоруських ландрас льону за допомогою поліморфізму інтронів генів *β*-тубуліну

Зменшення генетичної різноманітності сільськогосподарських культур робить їх більш уразливими до хвороб і шкідників, а, в перспективі, ставить під загрозу можливість їх сталого генетичного поліпшення. Тому в останні десятиліття в світі все більше приділяється увага характеристиці та збереженню генетичного різноманіття. Головні його джерела, на думку ряду вчених [80, 183, 336], зосереджені в стародавніх місцевих сортах і популяціях - ландрасах (landrace), які набули свої відмінні ознаки в результаті

багаторічного вирощування і супутнього відбору в селянських (фермерських) господарствах в конкретній місцевості.

Зазвичай терміном «ландрас» визначається як культивований, генетично неоднорідний сорт, який розвинувся в певній екогеографічній області і тому адаптований до ґрунто-кліматичних умов, а також до традиційних методів ведення господарства [44]. Тому вивчення ландрас може дозволити визначити не тільки генетичну різноманітність культурного виду, яка в сучасних сортах вельми обмежена, але і виявити генотипи, які можуть бути корисні як донори рідкісних алелей генів господарсько цінних ознак [412]. Однак більшість ландрас зберігаються тепер тільки в колекціях генетичних банків. В Білорусі була створена та підтримується досить велика колекція сортів, в тому числі і ландрас льону [431]. Ці сорти досліджуються за допомогою молекулярно-генетичного аналізу, тому для більш повного визначення генетичної різноманітності стародавніх сортів льону використали й один із зручних методів, що базується на наявності інтрон-специфічного поліморфізму ДНК у родині генів β -тубулінів (tubulin-based polymorphism (ТВР)), для дослідження [22].

При дослідженні внутрішньосортного поліморфізму 30 ландрас *L. usitatissimum* було виявлено гомогенні молекулярні профілі лише у п'яти з 30 ландрас, а саме: *K-783*, *K-5455*, *K-5465*, *K-5992*, *K-6221*. На рис. 4.31 представлені результати електрофорезу продуктів ампліфікації з використанням ТВР-методу 24 з 30 проаналізованих сортів. Більшість візуалізованих ампліконів інтронів (ДНК-фрагментів) розподілялись в діапазоні від 400 п. н. до 1900 п. н., що є характерним для роду *Linum* [287, 451]. Назви ландрас, їх тип, наявність гетерогенності, кількість фенотипів та значення РІС в межах кожного сорту наведені у табл. 4.6. Значення РІС досліджених ландрас становило 0,78, що є досить високим, враховуючи, що зазвичай максимальне значення РІС становить 0,5 [142]. Найбільше значення РІС (0,72) виявилось у зразків *K-186*, *K-604*, *K-5475*. Найменше значення (0,32) було характерним для п'яти зразків (*K-594*, *K-780*, *K-790*, *K-1430*, *K-*

6601). П'ять гомогенних зразків: *K-783*, *K-5455*, *K-5465*, *K-5992*, *K-6221* (РІС дорівнює нулю) характеризуються як мономорфні.

Таблиця 4.6

**Результати аналізу генетичного поліморфізму
білоруських ландрас льону**

№	Назва сорту та його характеристика	Наявність гетерогенності, +/-	Кількість алельних фенотипів	Значення РІС в межах сорту
1	<i>K-37</i> (стародавній довгунцевий)	+	3	0,56
2	<i>K-186</i> (довгунцевий)	+	4	0,72
3	<i>K-594</i> (довгунцевий)	+	2	0,32
4	<i>K-603</i> (олійний)	+	2	0,32
5	<i>K-604</i> (олійний)	+	4	0,72
6	<i>K-777</i> (довгунцевий)	+	3	0,64
7	<i>K-780</i> (довгунцевий)	+	2	0,32
8	<i>K-783</i> (довгунцевий)	-	1	0,00
9	<i>K-790</i> (довгунцевий)	+	2	0,32
10	<i>K-1042</i> (довгунцевий)	+	2	0,48
11	<i>K-1430</i> (довгунцевий)	+	2	0,32
12	<i>K-1431</i> (довгунцевий)	+	3	0,56
13	<i>K-1453</i> (довгунцевий)	+	2	0,48
14	<i>K-4219</i> (довгунцевий)	+	2	0,48
15	<i>K-5330</i> (довгунцевий)	+	2	0,48
16	<i>K-5451</i> (довгунцевий)	+	3	0,56
17	<i>K-5452</i> (довгунцевий)	+	3	0,56
18	<i>K-5453</i> (довгунцевий)	+	3	0,64
19	<i>K-5455</i> (довгунцевий)	-	1	0,00

20	<i>K-5465</i> (довгунцевий)	–	1	0,00
21	<i>K-5475</i> (довгунцевий)	+	4	0,72
22	<i>K-5476</i> (довгунцевий)	+	3	0,56
23	<i>K-5483</i> (довгунцевий)	+	3	0,56
24	<i>K-5990</i> (довгунцеві-олійний)	+	2	0,48
25	<i>K-5991</i> (довгунцеві-олійний)	+	3	0,64
26	<i>K-5992</i> (олійний)	–	1	0,00
27	<i>K-6212</i> (довгунцевий)	+	3	0,64
28	<i>K-6221</i> (довгунцевий)	–	1	0,00
29	<i>K-6601</i> (стародавній олійний)	+	2	0,32
30	<i>K-7236</i> (покращений довгунцевий)	+	3	0,56
Загалом (міжсортний поліморфізм)			7	0,78

При порівнянні внутрішньосортного поліморфізму білоруських ландрас льону та сортів української селекції виявилось, що вони є більш різноманітними за поліморфізмом довжини інтронів генів β -тубуліну. Так, загальна кількість фенотипів у ландрас складає сім, а українських сортів – шість. Значення PIS між білоруськими ландрасами теж більше: в цілому становить 0,78, варіюючи в межах кожного сорту від 0,32 до 0,72, а між українськими сортами становить 0,48, в межах кожного сорту варіює від 0,28 до 0,61. Отримані дані легко пояснити, оскільки ландраси – це стародавні сорти, які формувались в різних еколого-географічних умовах, і тому є більш гетерогенними.

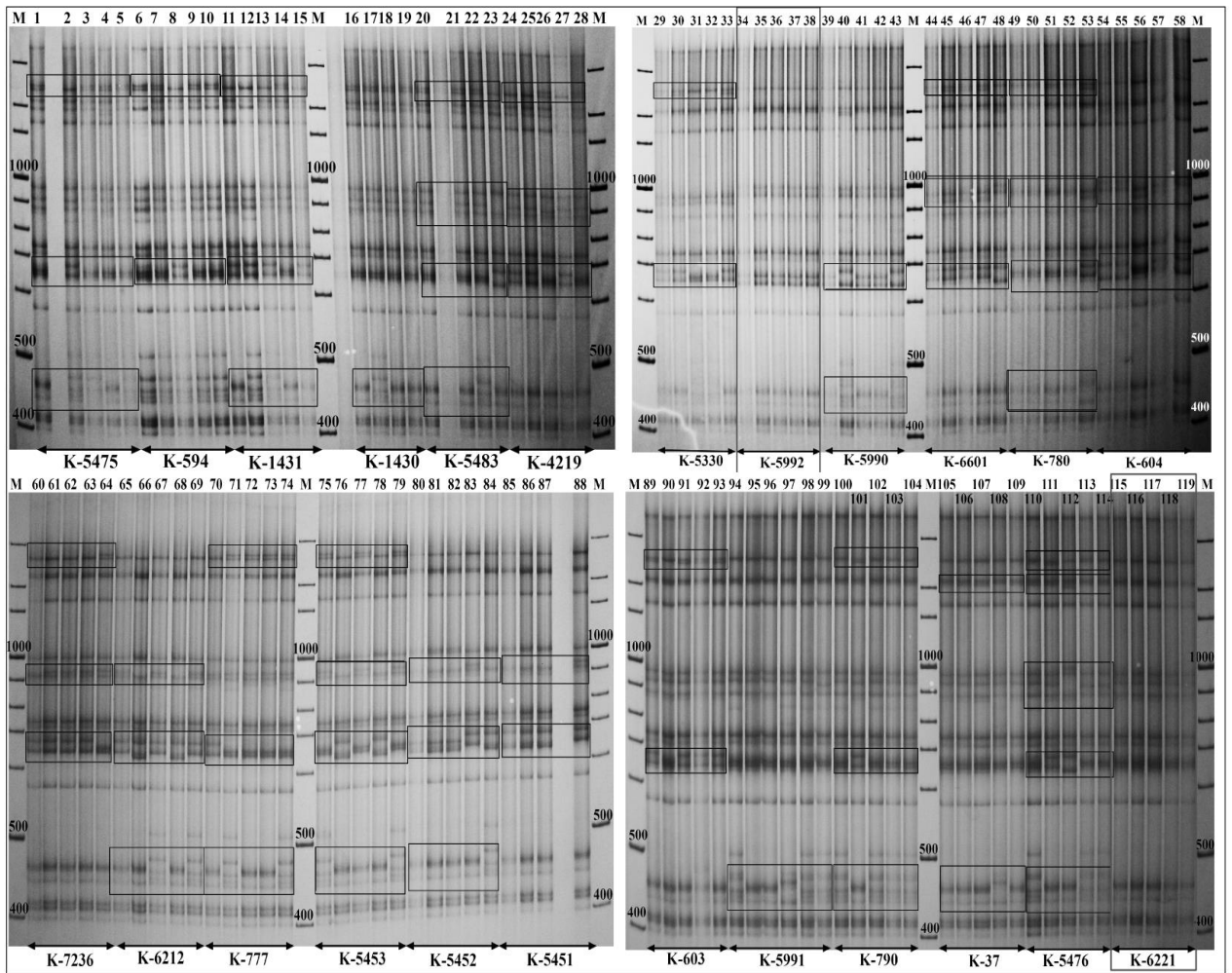


Рис. 4.31. Молекулярні профілі 24 ландрас льону, отримані за допомогою ТВР-методу: 1-119 – номери зразків; М – ДНК-маркер. Прямокутниками позначені зони поліморфізму, К-5992 та К 6221 відмічено як гомогенні сорти (див. Табл. 2.6).

При дослідженні внутрішньосортового поліморфізму білоруських ландрас *L. usitatissimum* за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів актину (АВР) власнорозробленими універсальних праймерів ActIn виявлено молекулярні видоспецифічні ДНК-профілі. Більшість візуалізованих ампліконів інтронів генів актину представлені 10 фрагментами, довжини яких варіювали в межах від 700 п.н. до 1200 п.н. На рис. 4.32 представлені результати електрофорезу продуктів ампліфікації з використанням АВР-методу. Для диференціації генотипів ландрас льону між собою

використовували поліморфні смуги в діапазоні довжин від 800 п.н. до 900 п.н.

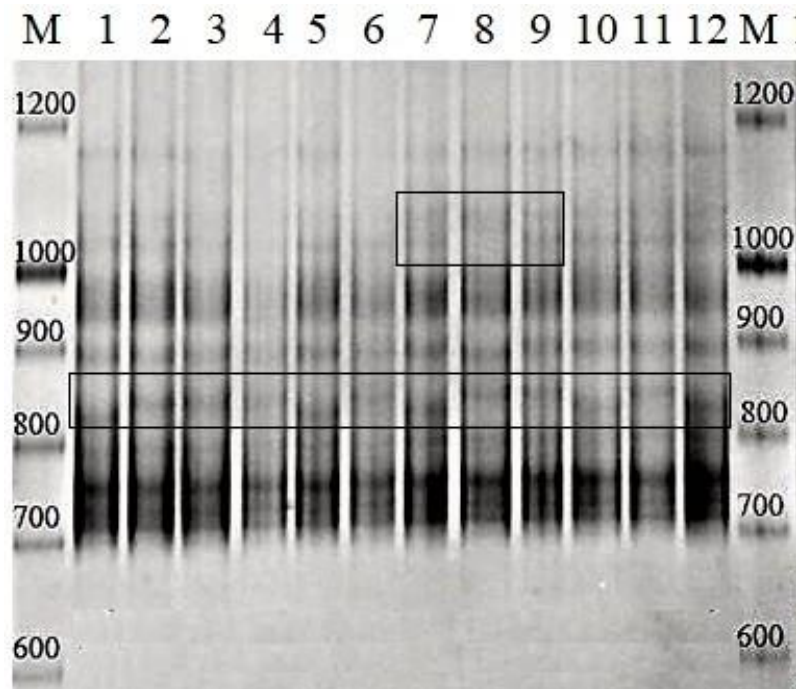


Рис. 4.32. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у білоруських ландрас льону; зразки 1 – К-790, 2 – К-5330, 3 – К-5455, 4 – К-5451, 5 – К-5460, 6 – К-5992, 7 – К-603, 8 – К-604, 9 – К-5990, 10 – К-6601, 11 – К-37, 12 – К-7236, М – молекулярний маркер; прямокутниками позначені зони поліморфізму

Встановлено, що для білоруських ландрас льону за умов аналізу за допомогою АВР-методу характерна поява трьох різних алельних фенотипів, а РІС дорівнює 0,57. Отримані результати зайвий раз засвідчили, що зразки льону-довгунця білоруської селекції виявилися генетично гетерогенними.

В цілому, в результаті проведених досліджень з використанням ТВР- та АВР-методів встановлено високий внутрішньосортовий поліморфізм стародавніх сортів льону білоруської селекції, виявлено високу їх генетичну варіабельність. Таким чином, разом з іншими молекулярно-генетичними маркерами краще використовувати і аналіз поліморфізму довжин інтронів β -тубуліну і актину для дослідження філогенезу сортів, оцінки їх генетичної

гетерогенності та у селекційно-генетичних програмах з покращення генофонду льону.

Результати підрозділу 4.2.3 наведено в наступних публікаціях:

1. Рабокoнь АН, Пoстoвoйтoвa АС, **Пиркo ЯВ**, Блюм ЯБ. Анализ гомологов генов основных белков цитоскелета у различных видов высших растений. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014; 14: 76–78. *(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).*
2. Рабокoнь АН, **Пиркo ЯВ**, Демкович АЕ, Блюм ЯБ. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. Молекулярная и прикладная генетика (Минск). 2015; 19: 35–44. *(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).*
3. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пиркo ЯВ**, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:43– 46. *(Зі співавторами проведено дослідження та опрацьовано дані).*
4. Rabokon AN, **Pirko YaV**, Demkovych AYe, Blume YaB. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. Cytol. Genetics. 2018; 52(1):3–15. *(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).*
5. Рабокoнь АМ, **Пиркo ЯВ**, Калафат ЛО, Гузенко ЄВ, Богданова МВ, Сакович ВІ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів β -тубуліну у білоруських ландрас *Linum usitatissimum* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018; 22:180–185. *(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).*

6. Постовойтова АС, Йотка ОЮ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Аналіз поліморфізму довжин інтронів генів актину у представників роду *LINUM* L. Третя конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». 2017, 16-18 травня, Київ, Україна, 2017. с. 41.
7. Postovoitova AS, Yotka OYu, **Pirko YaV**, Blume Ya B. Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci. *Cytol. Genetics*. 2018; 52(6): 448–460. [https://doi.org/ 10.3103/S0095452718060099](https://doi.org/10.3103/S0095452718060099) (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

4.2.4. Генотипування представників родини *Solanaceae* (*Solanum tuberosum* L. та *S. lycopersicum* L.) за допомогою поліморфізму інтронів генів актину

Пасльонові (*Solanaceae*) вважається однією з найчисельніших родин покритонасінних рослин, налічує близько 2 678 видів рослин, які поділені на 115 родів (www.theplantlist.org).

Серед представників родини *Solanaceae* до найбільш поширених сільськогосподарських культур належать картопля (*S. tuberosum* L.) та томат (*S. lycopersicum* L.). Також ці види активно вивчаються сучасними генетиками та селекціонерами і вважаються модельними об'єктами родини. У дослідженнях родини *Solanaceae* для створення генетичних карт господарсько цінних ознак, встановлення філогенетичних зв'язків, а також в порівняльній геноміці та селекційному доборі використовують ДНК-маркери, зокрема: RFLP, RAPD, AFLP, SSR, тощо [300, 314]. Нещодавно були опубліковані дані щодо повного секвенування геномів картоплі (The Potato Genome Sequencing Consortium 2011) та томату (The Tomato Genome Consortium 2012), через це стало можливим створення ген-специфічних ДНК-

маркерних систем, до таких належить і АВР (actin based polymorphism), що базується на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів актину.

Аналіз чотирьох сортів картоплі за допомогою АВР-методу показав, що основна область розподілення фрагментів знаходиться в межах від 700 п.н. до 2000 п.н., всього було зафіксовано у кожного із зразків не менше 15 фрагментів різної довжини (рис. 4.33, А). Фрагменти, які візуалізувались вище 2000 п.н. не враховувались, проте вони є досить розмиті та не детектувались кожного разу, а також не були передбачені біоінформатичним аналізом (на підставі аналізу геному картоплі в базі даних Phytozome інтрони такої довжини відсутні). При порівнянні електрофоретичних профілів для сортів картоплі можна відмітити, що різні фенотипи відрізняються різною кількістю поліморфних зон (на рис. 4.34 деякі позначені стрілками). У чотирьох сортів виявлено унікальні фрагменти, наприклад, сорт Зарево (зразок № 3), фрагмент 630 п.н., а сама вибірка сортів картоплі охарактеризована як генетично гетерогенна. В цілому, новорозроблена ДНК-маркерна система, яка базується на оцінці довжини інтронів генів актину, може бути застосована для генетичного аналізу генотипів картоплі.

За допомогою аналізу довжини інтронів генів актину 12 сортів томату встановлено у кожного із зразків не менше ніж 7 фрагментів, основна зона розподілення яких знаходиться в діапазоні від 700 п.н. до 1500 п.н. (рис. 4.33, Б). Довжини утворених фрагментів у більшості сортів склали близько 846, 870, 963, 1033, 1411 та 1486 п.н. Слід зазначити, що нижня смуга складається з двох фрагментів 743 п.н. та 753 п.н., які під час електрофорезу розділялися нечітко. В порівнянні з сортами картоплі, сорти томату за електрофоретичними спектрами виявилися достатньо однорідними, за виключенням сорту Американський Синій (зразок № 10), у нього був виявлений фрагмент, довжиною близько 1351 п.н. (на рис. 4.33 позначено стрілкою). Загалом генетичне профілювання сортів томату з використанням АВР-методу показало, що вибірка сортів томату в цілому є низько

поліморфною, в переважній більшості в ній виявлено мономорфні фрагменти.

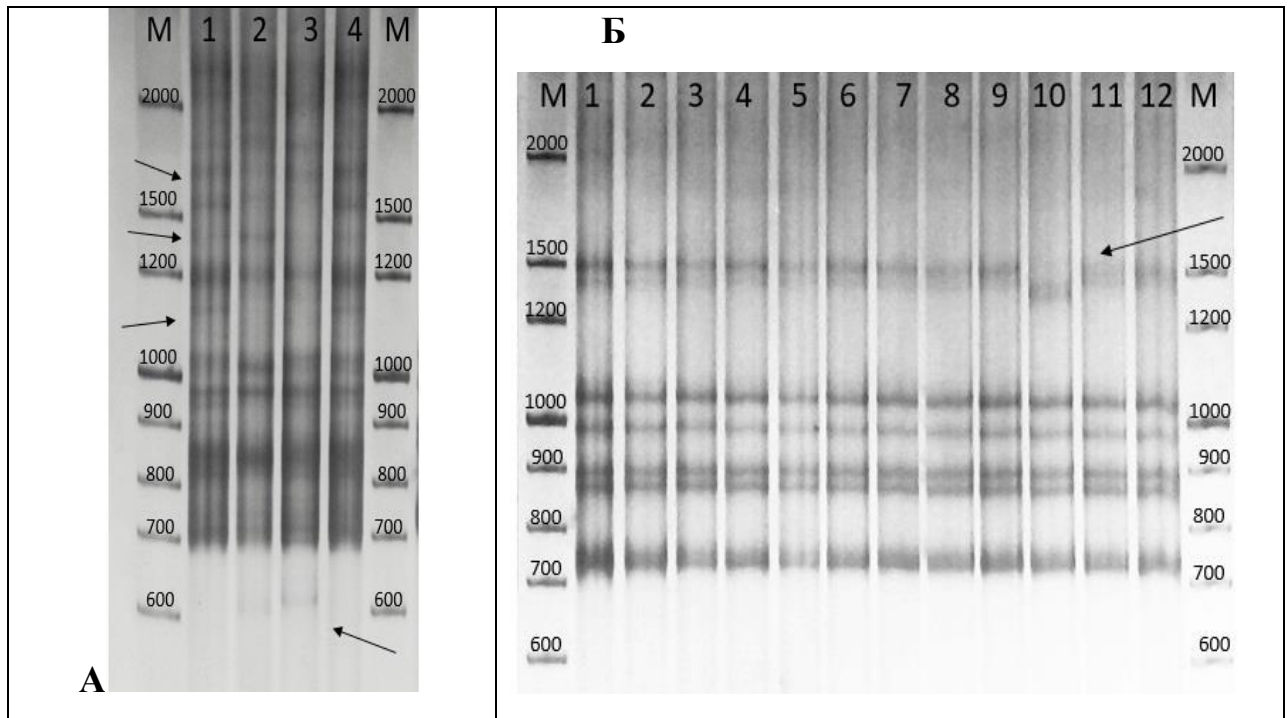


Рис. 4.33. АВР-профілі чотирьох сортів картоплі (*S. tuberosum*) - **А** номера зразків: 1 – Світанок, 2 – Левада, 3 – Зарево, 4 – Вернісаж; та 12 сортів томату (*S. lycopersicum*) – **Б**: номери зразків: 1 – Money Maker, 2 – Перлина, 3 – Волгоградський, 4 – Балконне Чудо золоте, 5 – Де Барао чорний, 6 – Тарасенко рожевий 7 – Ефемер, 8 – Шапка Мономаха, 9 – Валютній, 10 – Американський Синій, 11 – Золотий Горіх, 12 – Де Барао рожевий; М – ДНК- маркер; стрілками позначені поліморфні зони.

В цілому, порівнюючи результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів картоплі та томату, як у найбільш розповсюджених та широкоживаних представників родини *Solanaceae*, показано, що розподіл та кількість утворених фрагментів відрізнялися. Зокрема сорти картоплі. В порівнянні з сортами томату, містять значно більше фрагментів, майже у тих самих діапазонах (рис. 4.33). Імовірно це

пов'язано з особливостями селекційного добору сортів картоплі та томату, а також з особливостями запилення представників родини *Solanaceae*.

В результаті проведеного аналізу виявлено ряд спільних ампліконів, наявних як у сортів томату, так і картоплі. Ці фрагменти мають довжини близько 753, 743, 846 та 870 п. н. Наявність однакових ампліконів є передбачуваним явищем та чітко свідчить про приналежність томату та картоплі до одного роду *Solanum* та родини *Solanaceae*. Отримані результати підтверджують генетичну спорідненість та спільне філогенетичне походження даних видів сільськогосподарських культур.

Отже, ДНК маркерна система, що заснована на оцінці поліморфізму інтронів генів актину, в цілому виявилася придатною для ДНК-профілювання та генотипування видів родини *Solanaceae*, незважаючи на те, що диференціація сортів томату за цим видом маркерів була невисокою. Дану маркерну систему доцільно використовувати в парі з іншими ДНК-маркерами для генотипування та диференціації сортів рослин родини *Solanaceae* під час проведення генетико-селекційних досліджень.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.2.4 наведено в публікації:

Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм інтронів генів актину як інструмент генотипування представників родини *Solanaceae*. Науковий Вісник НУБІП України. 2018; 287: 70-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.31548/biologiya2018.287.071> (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

4.3. Застосування поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для дослідження генетичної мінливості деревних рослин

Вперше поліморфізм інтронів β -тубуліну був застосований нами під час досліджень *Pinus mugo* Turra та *Pinus sylvestris* L. Розділяюча здатність електрофорезу в агарозному гелі не дала можливості отримати достатньо велику кількість фрагментів. Детектувалися фрагменти розміром від 210 до 340 п.н. [273]. В той же час проведений пізніше аналіз чотирьох представників родини *Pinaceae* з використанням електрофоретичного розділення в ПААГ та подальшою візуалізацією фрагментів за допомогою нітрату срібла показав, що основна площа розподілу ампліконів коливалася від 301 п.н. до 2705 п.н. Проаналізовано лише фрагменти від 301 п.н. до 1133 п.н. (рис. 4.34). Амплікони, які візуалізувались вище 1200 п.н. не враховувались, оскільки є необхідність в подальшому дослідженні їх походження. В цілому було виявлено 57 фрагментів різної довжини. Зокрема, аналіз фрагментів *P. pungens* виявив сім ампліконів та 10 ампліконів для *P. abies*, довжина яких становила від 416 п.н. до 1113 п.н. та від 420 п.н. до 1126 п.н. відповідно. Дослідження електрофореграм з *P. sylvestris* виявило 18 смуг, довжина яких варіювала від 307 п.н. до 580 п.н. Найбільша кількість ампліконів (25) виявлена у *Abies alba* L. з різним розміром фрагментів від 301 до 1116 п.н. [271].

При порівнянні досліджених видів хвойних не було виявлено загальних для всіх фрагментів. Однак три поширені мономорфні фрагменти з приблизною довжиною 453 п.н., 840 п.н. та 863 п.н. були виявлені у *P. abies* та *P. pungens*. Ймовірно, це пов'язано з тим, що ці представники належать до того самого роду – *Picea*. У *P. pungens* спостерігали лише два поліморфні фрагменти 426 п.н. та 1032 п.н. Значення РІС цього виду становило 0,063, що є досить низьким, враховуючи, що максимальне значення РІС зазвичай становить 0,5 [142].

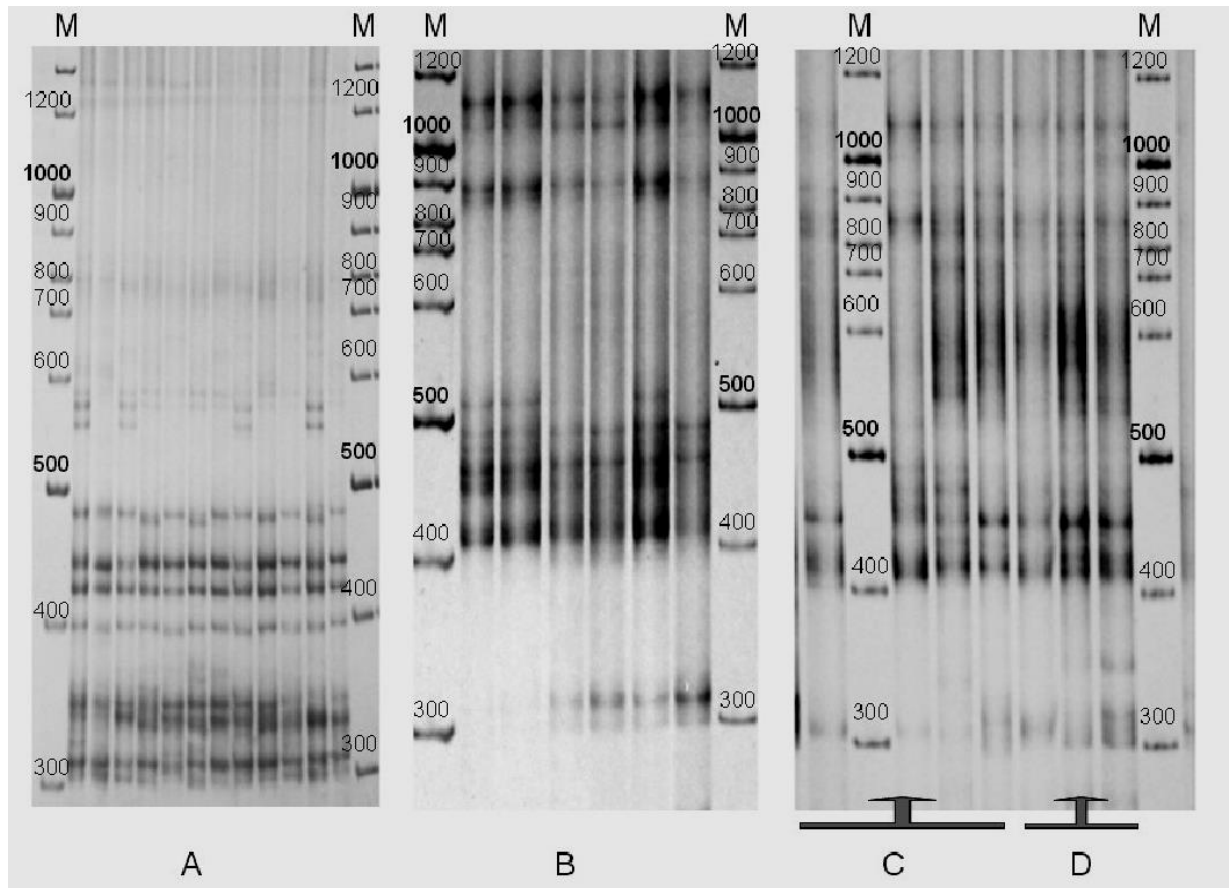


Рис. 4.34. Електрограми ампліконів інтронів генів β -тубуліну у представників родини Pinaceae: А - *Pinus sylvestris* L., В - *Abies alba* Mill., С - *Picea abies* (L.) H. Karst., D - *Picea pungens* Engelm., М - ДНК- маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use).

У *P. abies* спостерігали чотири поліморфні фрагменти, що вдвічі більше, ніж у *P. pungens*. Їх довжина становила 476 п.н., 490 п.н., 929 п.н., 947 п.н. Значення РС для *P. abies* становило 0,107, майже вдвічі вище, ніж у *P. pungens*. Загалом порівняно низький рівень поліморфізму цих двох видів спостерігався, можливо, через клональне походження штучних насаджень та малу кількість аналізованих зразків. Аналіз *P. sylvestris* за допомогою ТВР показав, що 14 з 18 аналізованих фрагментів були поліморфними, і лише 4 – мономорфними (315 п.н., 346 п.н., 418 п.н., 436 п.н.). Набір ампліконів, типових для поліморфних фрагментів, склав: 307 п.н., 312 п.н., 334 п.н., 338 п.н., 341 п.н., 390 п.н., 392 п.н., 417 п.н., 476 п.н., 560 п.н., 565 п.н., 570 п.н., 575 п.н. та 580 п.н. Коефіцієнт РС у цього виду становив 0,313. Найбільша

кількість поліморфних фрагментів (24 з 25 наявних) відзначена у *A. alba*. Їх розмір склав: 301 п.н., 308 п.н., 314 п.н., 402 п.н., 406 п.н., 412 п.н., 428 п.н., 436 п.н., 442 п.н., 444 п.н., 454 п.н., 458 п.н., 472 п.н., 480 п.н., 488 п.н., 500 п.н., 527 п.н., 682 п.н., 865 п.н., 875 п.н., 1038 п.н., 1046 п.н., 1066 п.н., 1116 п.н.. Значення PIC у *A. alba* становило 0,354, що є досить високим показником, порівняно з іншими видами рослин [36]. Слід зазначити, що високий рівень поліморфізму зразків *A. alba*, ймовірно, пов'язаний з природним походженням цього виду та репрезентативною вибіркою рослин. Загалом, порівнюючи електрофоретичні профілі чотирьох представників родини Pinaceae за ТВР, можна помітити, що значна кількість ампліконів розподіляється в діапазоні від 300 п.н. до 500 п.н. у *Pinus sylvestris* (Рис.4.32). Більшість фрагментів візуалізуються в діапазоні від 400 п.н. до 500 п.н. та від 800 п.н. до 1200 п.н. у *A. alba*, *P. abies* та *P. pungens*. Можна припустити, що використовуючи метод, заснований на аналізі поліморфізму інтронів генів β -тубуліну, можна чітко диференціювати види та знаходити деякі еволюційні зв'язки між подібними видами або родинами [271].

Аналіз інших двадцяти видів деревних рослин за допомогою ТВР з використанням розділення фрагментів в неденатуруючому ПААГ показав, що основна область розподілення ампліконів знаходилась в межах від 275 п.н. до 1500 п.н. (рис. 4.35). У досліджених видів рослин всього було зафіксовано 275 ампліфікованих фрагмента різної довжини. *Robinia pseudoacacia* мала вісім ампліконів, довжина яких варіювала в межах від 306 п.н. до 871 п.н.— це найменша їх кількість. Водночас 55 ампліконів (366 п.н. – 1352 п.н.) у *Tilia cordata* —було найбільшим серед досліджених деревних рослин. Загальна структура зон, виявлених в результаті електрофорезу ампліконів від кожної рослини, дуже поліморфна у межах одного роду, однак має характерні ознаки для кожного з родів, що пов'язано із високим поліморфізмом інтронів генів β -тубуліну [427].

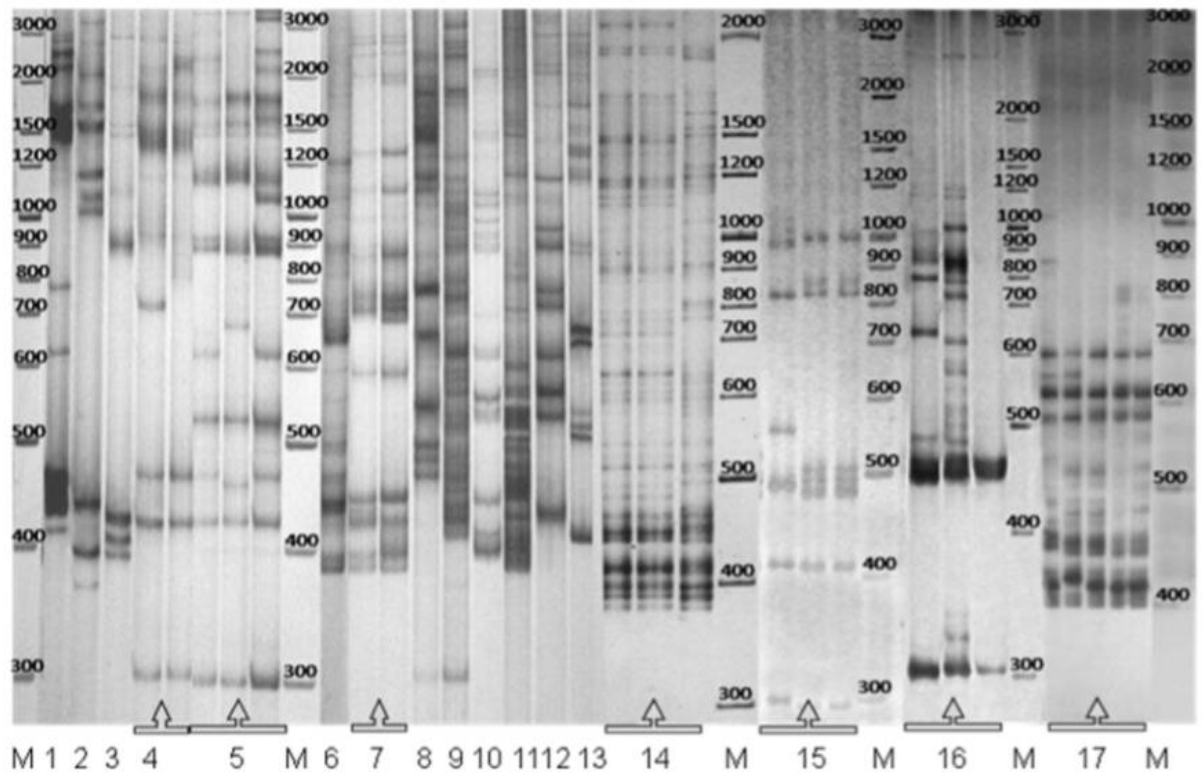


Рис. 4.35. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну у окремих видів рослин: 1 — робінія звичайна (*Robinia pseudoacacia*), 2 — шовковиця біла (*Morus alba*), 3 — в'яз шорсткий (*Ulmus glabra*), 4 — береза повисла (*Betula pendula*), 5 — бук звичайний (*Fagus sylvatica*), 6 — клен сріблястий (*Acer saccharinum*), 7 — клен гостролистий (*Acer platanoides*), 8 — катальпа бігнієподібна (*Catalpa bignonioides*), 9 — липа серцелиста (*Tilia cordata*), 10 — гіркокаштан звичайний (*Aesculus hippocastanum*), 11 — тополя чорна (*Populus nigra*), 12 — горіх волоський (*Juglans regia*), 13 — ясен звичайний (*Fraxinus excelsior*), 14 — осика звичайна (*Populus tremula*), 15 — дуб черешчатий (*Quercus robur*), 16 — вільха чорна (*Alnus glutinosa*), 17 — клен ясенелистий (*Acer negundo*), М — ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use) [427]

Рослини порядку Fagales поширені в Азії, Європі та Північній Америці, де вони створюють великі неперервні ліси, слугуючи важливими природними ресурсами. Окрім вкладу в економіку вони є ключовими видами лісових екосистем і основними генераторами лісового біорізноманіття. Разом

з тим, ступінь використання для їх вивчення генетичних маркерів набагато нижче ніж для хвойних, що пов'язано із певними біологічними обмеженнями для застосування багатьох методів (зокрема високим віком покоління та довговічністю рослин) [189]. Проаналізовані представники порядку Букоцвіті (*Alnus glutinosa*, *Betula pendula*, *Juglans regia*, *Quercus robur*, *Fagus sylvatica* та *Fagus sylvatica f. salicifolia*) відрізнялись кількістю ампліфікованих фрагментів. Зокрема для всіх зразків в межах виду *Betula pendula* з 15 проаналізованих фрагментів різної довжини спостерігалися спільні бенди з приблизною довжиною 300 п.н., 425 п.н. та 465 п.н., у *Alnus glutinosa* — з 19 виявлених довжин ампліконів, спільні бенди спостерігали з приблизною довжиною ампліконів 300 п.н. та 460 п.н. [427]. Індекс поліморфного інформаційного змісту у цих видів склав 0,319 та 0,380 відповідно, що є відносно високим значенням, оскільки максимальна оцінка PIC складає 0,5 [142]. У *Quercus robur* виявлено 19 фрагментів, з яких спільними для рослин виду були фрагменти з приблизною довжиною ампліконів 500 п.н., 880 п.н., 1100 п.н. Індекс поліморфного інформаційного змісту у цього виду склав 0,295. При порівнянні дерев різних форм роду *Fagus* L. (*Fagus sylvatica* та *Fagus sylvatica f. Salicifolia*) з 16 ампліфікованих фрагментів було виявлено спільні для представників виду бенди з приблизною довжиною 300 п.н., 535 п.н., 1150 п.н. та 1435 п.н. Значення PIC у цього виду також було високим та дорівнювало 0,375. Дереву *Juglans regia* мали 9 ампліфікованих фрагментів, з яких усі були мономорфними, поясненням чого, на наш погляд, можуть бути з одного боку малі об'єми вибірок, а з іншого - клональна природа рослин. Варто зазначити, що порівняння електрофореграм представників порядку Букоцвіті поміж собою, зокрема, *Alnus glutinosa*, *Quercus robur* *Betula pendula* та *Fagus sylvatica* вказує на існування спільного мажорного фрагменту, розмір якого варіює в межах 290–305 п.н. У рослин *Betula pendula* та *Fagus sylvatica* відмічено ще два бенди, що знаходились в межах 400–500 п.н. (див. рис. 4.35). Серед всіх проаналізованих представників порядку Fagales особливий профіль належав лише *Juglans regia*. Роди *Acer* L. та *Aesculus* L. є

важливими декоративними садово-парковими рослинами. Аналіз видів роду *Acer* за допомогою ТВР виявив у *A. negundo* та *A. saccharinum* 20 фрагментів з яких у *A. negundo* шість були мономорфними (приблизно 400 п.н., 435 п.н., 530 п.н., 640 п.н., 685 п.н., 770 п.н.), а у *A. saccharinum* — 10 мономорфних (приблизно 380 п.н., 390 п.н., 415 п.н., 425 п.н., 440 п.н., 465 п.н., 490 п.н., 500 п.н., 555 п.н., 595 п.н.). У *A. platanoides* — 14 бендів, з них 9 — мономорфних (приблизно 390 п.н., 400 п.н., 425 п.н., 450 п.н., 595 п.н., 865 п.н., 1000 п.н., 1100 п.н., 1295 п.н.) [427]. Індекс поліморфного інформаційного змісту PIS у цих видів склав 0,251, 0,262 та 0,179, відповідно. У рослин *Aesculus hippocastanum* спостерігалось 14 фрагментів, серед яких п'ять бендів були мономорфними (приблизно 400 п.н., 415 п.н., 445 п.н., 530 п.н., 995 п.н.) [427]. Оцінка рівня поліморфізму PIS у даного виду склала 0,321. Значення PIS у цього виду дорівнювало 0,321. За даними мікросателітних локусів при дослідженні двох видів роду *Aesculus* L. з Чехії середнє значення PIS складо 0,43 [Vyhnánek 2013]. Схожість фрагментів у межах близько 400 п.н. виявлено при порівнянні молекулярних профілів для всіх проаналізованих видів порядку Sapindales, зокрема, *Aesculus hippocastanum*, *Acer platanoides* та *Acer saccharinum*, (див. рис. 4.35). Під час аналізу дерев *Morus alba* та *Ulmus glabra* (порядок Rosales) детектовано 11 ампліфікованих фрагментів у цих видів. Три бенди у *M. alba* виявилися мономорфними з довжиною приблизно 380 п.н., 405 п.н., 430 п.н. У *U. glabra* такий фрагмент з довжиною приблизно 420 п.н. описано лише один. Незважаючи на приналежність зазначених вище видів до одного порядку, їх електрофоретичні профілі значно відрізняються. Значення PIS для двох цих видів було однаковим та склало 0,364. Інформаційний індекс Шеннона за ТВР для *M. alba* дорівнює 0,44, що у 2 рази вище у порівнянні з оцінками за іншими (SRAP) маркерами для цього виду ($I = 0,22$) [Вайраї 2014]. Для *U. glabra* значення PIS, оцінене за допомогою ТВР, знаходиться на рівні оцінок поліморфізму отриманих за SSR маркерами (PIS = 0,141–0,899) у представників даного виду з Піренейського півострова [69]. У рослин *Populus tremula* спостерігали 49 ампліфікованих

фрагментів. П'ять фрагментів з довжиною приблизно 365 п.н., 375 п.н., 670 п.н., 1100 п.н., 1130 п.н. виявилися спільними для рослин, що були досліджені. Значення рівня поліморфізму PIS для даного виду дорівнювало 0,346. Види роду *Tilia* L. (*T. cordata* та *T. platyphyllos*) відрізнялись максимальною кількістю фрагментів (55) серед усіх досліджених видів деревних рослин. Тільки три з 55 з довжиною приблизно 415 п.н., 430 п.н. та 460 п.н. були спільними. PIS для *T. cordata* дорівнювало 0,343. До порядку Laminales відносяться роди *Fraxinus* L., *Catalpa* Scop. У *Fraxinus excelsior* з 30 досліджених локусів спостерігався один мономорфний (біля 520 п.н.). Цей вид відрізнявся серед інших проаналізованих видів максимальним значенням PIS, що склало 0,430. Під час мікросателітного аналізу, який було виконано, наприклад, для північних популяцій *Fr. excelsior* аналогічно спостерігається дуже високий внутрішньовидовий поліморфізм ($H_O = 0,730$, $H_E = 0,871$ та від 18 до 52 алелів на локус) [341]. Дуже високий внутрішньовидовий поліморфізм ($H_O = 0,730$, $H_E = 0,871$ та від 18 до 52 алелів на локус) виявлено за допомогою мікросателітного аналізу для північних популяцій *Fr. excelsior* [341].

Рослини з найменшою кількістю ампліконів відносяться до різних порядків Laminales (*Catalpa bignonioides*) — 9 фрагментів та Fabales (*Robinia pseudoacacia*) — 8 фрагментів мали три (приблизно 540 п.н., 650 п.н., 780 п.н.) та п'ять (приблизно 420 п.н., 440 п.н., 460 п.н., 675 п.н., 870 п.н.) мономорфних фрагмента [427]. Значення PIS у *C. bignonioides* та *R. pseudoacacia* дорівнювало 0,333 та 0,188, відповідно. Оцінка PIS у *C. bignonioides* та *R. pseudoacacia* склала 0,333 та 0,188, відповідно. Водночас за літературними даними середнє значення PIS для праймерів до EST-SSR *R. pseudoacacia* було приблизно в 2 рази вище та дорівнювало 0,397, ефективна кількість алелів та середня кількість алелів на локус склали 2,123 та 4,267 відповідно [128]. Нижчий поліморфізм за ТВР для *R. pseudoacacia*, порівняно оціненого для неї за допомогою EST-SSR маркерів, можна пояснити тим, що відібраний рослинний матеріал нами отримано з

близькоспоріднених (інтродукційних) насаджень рослин. Аналіз, проведений за допомогою EST-SSR праймерів, підібраних до інших видів роду *Catalpa* Scop. (*C. bungei*, *C. fargesii*, *C. duclouxii*, *C. ovata*), показав досить невисоку середню кількість алелів на локус – 7, а H_O , H_E — 0,53 та 0,75 відповідно [362]. Необхідно зауважити, що високий рівень значень PIC багатьох проаналізованих представників досліджуваних видів, може бути пов'язаний як з малими об'ємами вибірок для окремих видів, що вивчалися, так і з окремими продуктами ПЛР (окремими випадковими фрагментами ДНК, рослинними вторинними продуктами та інш.). Водночас використання ТВР маркерів не вплинуло на можливість розрізняти окремі родини, види та форми. Отримана оціночна інформація про характер поліморфізму ТВР локусів окремих видів є базовою для подальшого використання ТВР-метода в генотипуванні та популяційних дослідженнях. Відповідно до рисунку 4.36 відзначаємо, що такі показники поліморфізму як інформаційний індекс Шенона (I), ефективна кількість алелів на локус (N_e) та очікувана гетерозиготність (H_E) найбільші у *Fagus sylvatica* (0,503; 1,603 та 0,343 відповідно) та *Fraxinus excelsior* (0,524; 1,574 та 0,348), а найменші у *Acer platanoides* (0,242; 1,283 та 0,166) та *Robinia pseudoacacia* (0,227; 1,265 та 0,155), прямо корелюють із значеннями PIC , при цьому PIC є трохи більш чутливою оцінкою [427].

При порівнянні електрофоретичних профілів, отриманих на основі ТВР-методу для досліджених представників різних видів, можна відмітити, що види рослин відрізняються за кількістю ампліконів та їх розподілом за розмірами. Ці висновки погоджуються з UPGMA дендрограмою, отриманою на основі матриці генетичних відмінностей (DN) [245] за даними ТВР (1000 бутстрепів), котра відокремлює рослини на рівні видів та родів, в деяких випадках і родин. Треба відмітити, що на високому таксономічному рівні розподільна здатність ТВР-методу досить невисока, як видно із зниження значень бутстреп підтримки з переходом з рівня видів і родів до рівня родин [427].

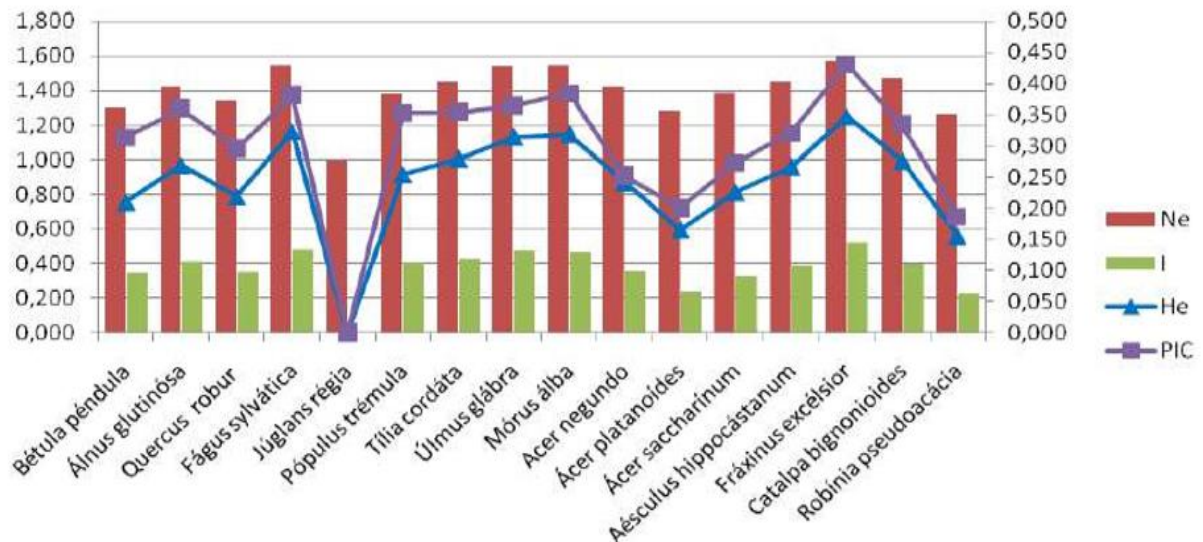


Рис. 4.36. Основні параметри генетичного різноманіття деревних видів за ТВР-маркерами.

В цілому застосований ТВР-метод дозволяє чітко диференціювати види одного роду між собою, отримувати інформацію про внутрішньовидовий поліморфізми рослин. Це має велике значення для екологічних досліджень, при аналізі популяційної динаміки деревостанів, швидкій діагностиці випадків гібридогенного походження, вивчені поліплоїдії рослин [129]. ТВР-метод виявився мало придатним для порівняльного аналізу на високому таксономічному рівні. Основною причиною цього є значна частка шумової компоненти мінливості ТВР на рівні родини та вище, що виникає за рахунок високої швидкості змін у інтронах генів тубулінів, яка співставна із швидкістю еволюції на рівні родин. Відповідно досить висока кількість поліморфізмів на високих таксономічних рівнях не є спільною для всіх його представників, а виникала і зникала неодноразово за різних обставин і у різних представників таксону. Водночас на нижчих таксономічних рівнях, навпаки, значна частина поліморфізму має спільне походження в межах таксону, що і дозволяє вдало ідентифікувати види та роди рослин і вивчати внутрішньовидову мінливість. В цілому, за допомогою ТВР-методу вдалося ідентифікувати унікальні патерни для 20 деревних видів рослин та створити молекулярні профілі

кожного з цих видів, знайти деякі спільні фрагменти, які притаманні окремим родам в межах родини [427].

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.3 наведено в таких публікаціях:

1. Калафат ЛО, Пірко Н М, Демкович АЄ, Приваліхін СМ, Рабоконт А М, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Оцінка генетичної різноманітності різних видів деревних рослин за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2017; 15 (2): 160-167. DOI: <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.15.2.874> (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

2. Pirko NN, Demkovych AYe, Kalafat LO, Privalikhin SN, Rabokon AN, **Pirko YaV**, Blume YaB. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in different representatives of Pinaceae Lindl. family. Journ. of Bot. 2016; VIII, 2(13): 5–9. https://ibn.idsi.md/en/vizualizare_articol/50009 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*)

4.3.1. Дослідження генетичної структури деревостанів *Quercus robur* L. на антропогенно змінених територіях за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну

Дуб звичайний (*Quercus robur* L.) – аборигений вид української флори, одна з головних лісоутворювальних порід, насадження якої займають близько 24 % від усієї площі лісів України [71, 272], відзначається високою екологічною пластичністю та має велике господарське значення. Цей вид здатний існувати в різноманітних ектопах та едафотоплах, поширений від

півночі Скандинавії до півдня Європи, від Піренейського півострова до Уральських гір, є ключовим в багатьох біомах. При цьому історично відбувалася як еволюція та розділення дубів на окремі види, так існував і продовжує існувати процес обміну генетичним матеріалом [198, 224]. Дуб звичайний є вітрозапилюваним, проте більша частина насіння дуба розповсюджується поблизу від материнських рослин, а значні відстані долає лише за рахунок переносників – птахів, гризунів, людини [115]. Цей вид вибагливий до родючості ґрунту, але досить стійкий до промислових викидів і активно використовується при створенні санітарних зон промислових підприємств, внутрішньоміських деревостанів та в зеленому будівництві. Дуб використовується в якості головної породи в полезахисних і протиерозійних насадженнях [251]. Зелені насадження також пом'якшують локальні кліматичні умови, понижаючи температуру до 6 °, що знижає перегрів міських жителів [66, 251, 370]. Приміськи дубові ліси здатні до ефективного поглинання забруднювачів, зокрема зниження газоподібних концентрацій NH₃, з середнім зменшенням 29-38% [110].

Місто Київ має багатовікову історію, протягом якої активно використовувалися, а надалі і штучно поновлювалися місцеві деревостани. Один з основних видів, що вирубався та висаджувався, був дуб звичайний. Тому на сьогодні наряду з молодими дубовими деревостанами штучного та природного походження досить часто зустрічаються і вікові дерева дуба, які можуть бути залишковою частиною колишніх природних деревостанів. Значна частина цих дерев дуба звичайного має охоронний статус та потребує більш детального вивчення походження, приналежності до місцевих деревостанів тощо.

До багатих на старі дерева територій у м. Києві належить Голосіївський ліс. Цей ліс являє собою залишки суцільного лісового масиву, який знаходився на південно-західних підступах до Києва ще за часів Київської Русі [348]. Натепер Голосіївський ліс - найбільший лісовий масив в межах міста Києва, повністю оточений житловими районами. Цей лісовий масив

площею понад 1000 га знаходиться в південній частині м. Києва. Це переважно грабово-дубовий ліс, що сформувався на сірих і світлосірих лісових ґрунтах на лесових відкладах [257, 259]. Більша його частина входить до Голосіївського національного природного парку (НПП) [283]. За лісовпорядкувальними даними у межах території в постійному користуванні НПП площа лісових виділів з деревами більше 200 років становить 143 га (20% площі лісової рослинності), у всіх випадках основним домінуючим видом, за яким визначається вік, є дуб звичайний (*Q. robur*) [258]. Дорослі рослини дуба звичайного в районі парку «Голосіївський» розташовані досить близько один від одного. Часто спостерігається закономірність зростання старих дерев саме вздовж стежок парку, на відміну від більш молодих дерев.

Потужний розвиток, довговічність рослин дуба звичайного роблять його уживаним в якості модельного виду для різнопланової оцінки генетичних процесів, при лісовідновленні на антропогенно порушених територіях чи збереженні існуючих деревостанів в умовах підвищеного антропогенного навантаження [103, 247, 270, 272]. Завдячуючи популярності *Q. robur*, залежно від напрямів досліджень щодо нього застосовуються методи починаючи з морфологічних [308], ізоферментів, ПЛР- методів [5, 126, 134, 190] і закінчуючи повногеномним секвенуванням [274].

Тому основною метою було на підставі ТВР-аналізу отримати дані, щодо поліморфізму вибірок вікових дерев *Q. robur* НПП «Голосіївський», провести аналіз просторової компоненти генетичної мінливості, оцінити антропогенний вплив на генетичну структуру деревостанів.

ТВР-аналіз 55 дерев дуба звичайного загалом виявив 41 фрагмент (рис. 4.37). При цьому 40 з 41 – є поліморфними. Мономорфною для всіх зразків була зона з приблизним розміром фрагменту 880 п.н. Розміри фрагментів розподіляються в діапазоні від 250 п. н. до 1300 п.н. [272].

Частоти алелів, отриманих за ТВР-аналізом, у рослин *Q. robur* представлено на рис. 4.38. Частота більшої частини фрагментів (а саме 27) складає менше 20 %: 19 фрагментів з частотою менше ніж 10 % та 8

фрагментів з частотою від 10 % до 19 %. У межах від 20 % до 39 % знаходяться 6 фрагментів, а від 30 % до 69 % – лише 3 фрагменти. Найчастіше зустрічаються фрагменти з приблизним розміром 275 п. н., 490 п. н., 500 п. н., 1110 п. н. (частота складає від 70 % до 90 %) та 880 п.н. (частота 100 %). Рівень генетичної різноманітності видів часто пов'язаний з певними характеристиками, такими як довжина життєвого циклу, спарювання та репродукція, розмір географічного діапазону та генетичний обмін [111, 138, 203]. Більша частка фрагментів, виявлених під час аналізу ТВР-поліморфізму в нашому дослідженні відноситься до рідкісних. Лише 3 фрагменти зустрічаються у 30 – 70 % дерев. При цьому для кожної з вибірок спостерігались близька ефективна кількість алелів на локус (1,174 – 1,268).

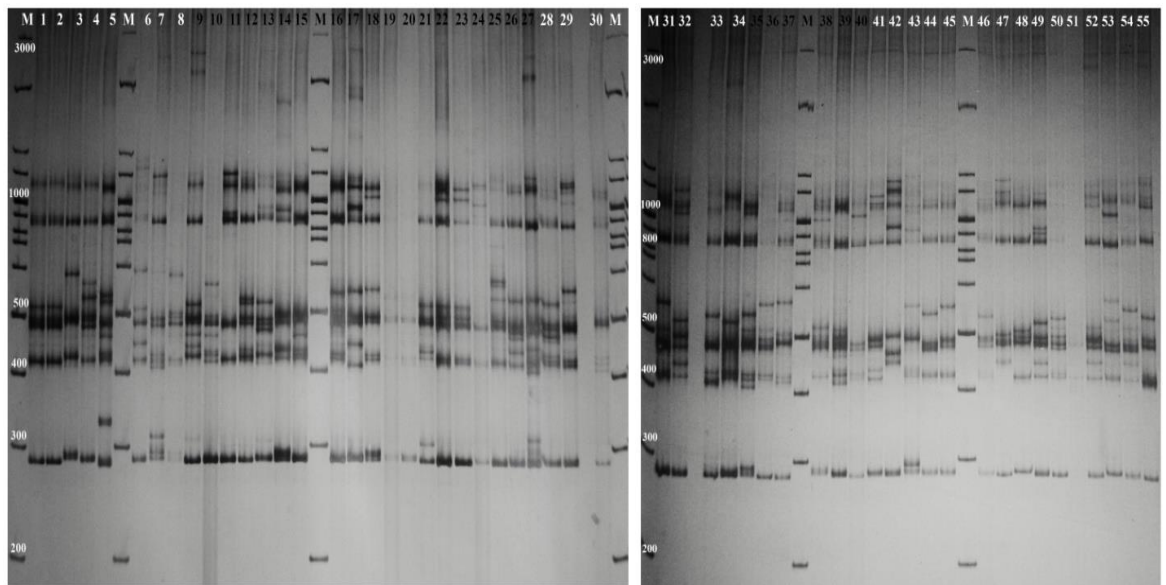


Рис. 4.37. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну досліджених дерев *Quercus robur*: 1-55 (зверху) – номери зразків п'яти вибірок; м – ДНК-маркер.

Такий великий поліморфізм, може бути пов'язаний із механізмами стійкості дубів за рахунок підвищення генетичної варіабельності на рівні особини. як було продемонстровано [275]. При цьому за інформаційним індексом Шенона (0,204 – 0,269) відмінності між вибірками знаходяться в межах похибки – значимих відмінностей генетичного поліморфізму у всіх досліджених груп рослин дуба звичайного не виявлено. Аналогічні

результати спостерігалися для 3 природних популяцій *Q. petrea* [281]. Треба відмітити, що одним з джерел мінливості для дубу, як довговічної рослини можуть виступати прояви соматичної мінливості, до того ж це може бути пов'язано із механізмами стійкості рослин [275].

Оцінка показників алельного поліморфізму, проведена для окремих вибірок, виявила практично однакову ефективну кількість алелів на локус (1,174 – 1,268), враховуючи похибки отриманих значень (рис. 4.39). За інформаційним індексом Шенона (0,204 – 0,269) відмінності між вибірками знаходяться в межах похибки. Тобто не виявлено значимих відмінностей генетичного поліморфізму у всіх досліджених груп рослин дуба звичайного.

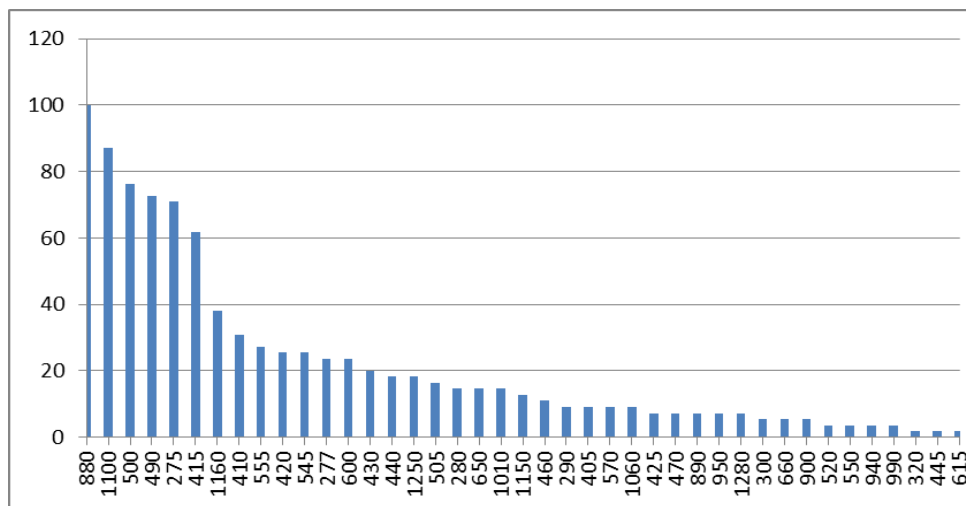


Рис. 4.38. Частоти ТВР-фрагментів у рослин *Quercus robur* парку «Голосіївський»

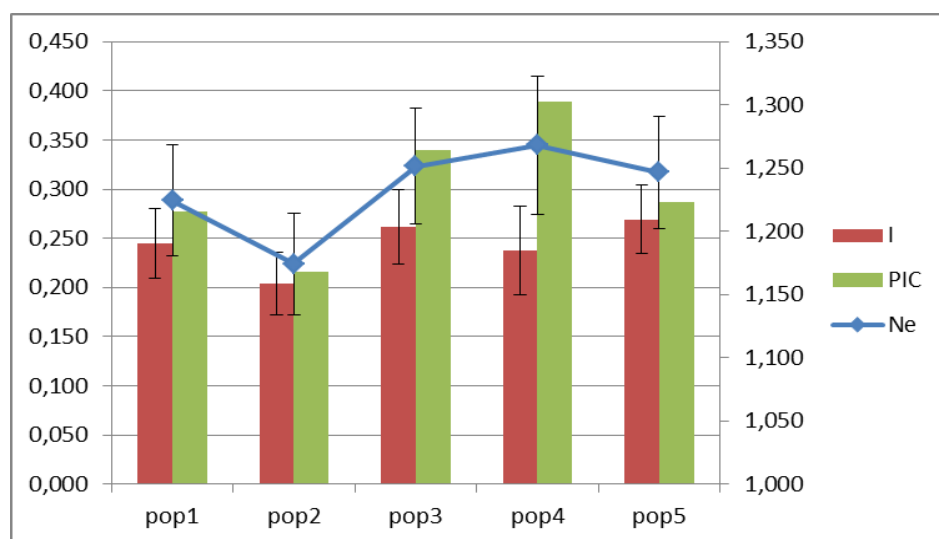


Рис. 4.39. Основні показники алельного різноманіття у проаналізованих вибірках рослин дуба звичайного за ТВР-маркерами

РІС варіювало від 0,22 до 0,39 і в середньому склало близько 0,3. Це можна вважати високим значенням з урахуванням того, що для будь-якого біалельного маркера максимальна оцінка РІС становить 0,5 [142, 272].

Подальший аналіз молекулярної варіанси (АМОВА) виявив практично повну відсутність міжвибіркової підрозділеності (рис. 4.40). Так у складі загальної генетичної гетерогенності виду 93% генетичного різноманіття *Q. robur* приходить на внутрішньо вибірковий поліморфізм, і лише 6 % складає частка міжвибіркового поліморфізму (географічний поліморфізм можна не враховувати, оскільки на його частку приходить лише 1%). Відсутність міжвибіркової підрозділеності продемонстрована за допомогою аналізу молекулярної варіанси (АМОВА) може бути пов'язана з цілою низкою причин. Так, в аналогічних дослідженнях природних популяцій дубів (*Quercus acutissima*) ситуацію зі зменшенням міжвибіркової мінливості, порівняно з міжіндивідуальною пов'язують з високим рівнем ауткросингу в дубових деревостанах [54]. Під час аналізу більш ніж 300 дерев з використанням AFLP у трьох деревостанів *Q. suber* в Італії продемонстровано також дуже невисокий рівень мінливості на міжпопуляційному рівні.

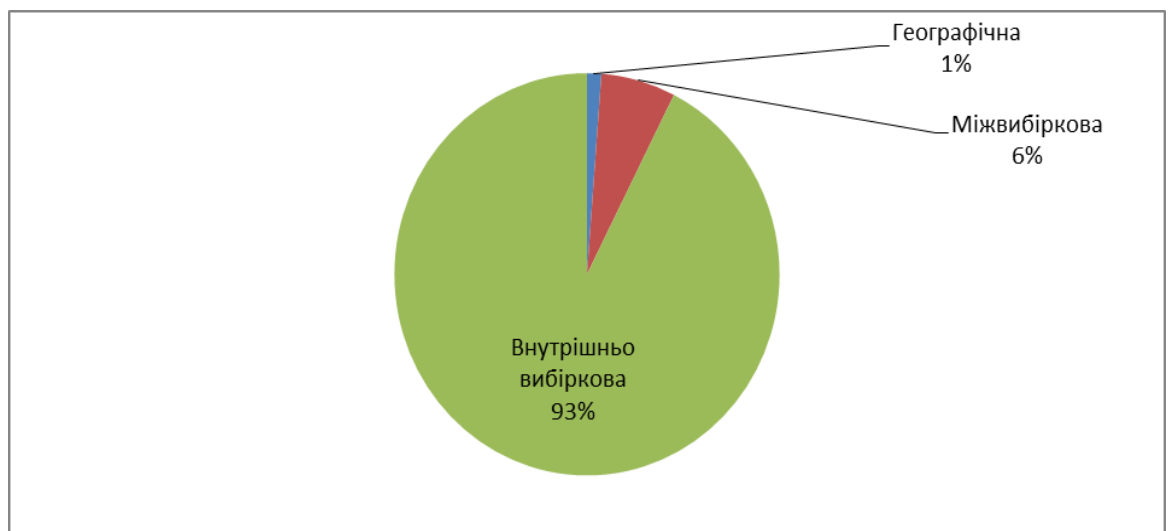


Рис. 4.40. Розподіл молекулярної варіанси (АМОВА) у дуба звичайного

Так серед всієї оціненої різноманітності *Q. ruber* тільки 1.7% було віднесено до відмінностей між популяціями. Аналіз AMOVA, аналогічний нашому показав, що більшість генетичної варіабельності зберігається на надвибірковому рівні 96%, а серед окремих популяцій - 3,6% ($F_{st} = 0,036$, $P < 0,001$). При цьому відмінності між популяціями в межах географічних також підтримуються зовсім невисоким рівнем генетичної мінливості – 2,6% ($F_{sc} = 0,026$, $P < 0,001$) від загальної варіації і лише 1,3% ($F_{ct} = 0,013$, $P = 0,007$) пояснюється варіацією між регіонами, що характеризують невелику диференціацію популяцій у діапазоні 700 км. [58]. В дослідженні природних популяцій дубів (*Quercus acutissima*) мінливість, пов'язана з популяційною структурою була у сім разів нижча за міжіндивідуальну мінливість, що, вірогідно, пов'язано із переважаючим ауткросингом в дубових деревостанах [54].

В цілому, висока генетична варіабельність, що спостерігається у популяціях дубів, пов'язана з біологічними ознаками довгоживучих видів, такими як вітряне перехресне запилення, великий ефективний розмір популяції та великий потік пилку серед популяцій [327, 328, 387]. В цілому оцінки генетичного різноманіття, виявлені в нашому дослідженні були близькими до зареєстрованих в інших видів *Quercus* у Южній, Північній Америці та Європі [4, 16, 98, 261].

Таким чином, в результаті проведених досліджень здійснено генотипування 55 вікових дерев *Q. robur* НПП «Голосіївський». Виявлено 40 поліморфних і один мономорфний (біля 880 п.н.) ТВР-фрагмент. Висока частота зустрічальності фрагментів з приблизним розміром 275 п.н., 490 п.н., 500 п.н. та 1110 п. н. складає від 70% до 90%. Генетичний поліморфізм вікових дерев *Q. robur* НПП «Голосіївський» є досить високим, PI_C (0,22 – 0,39), ефективна кількість алелів на локус (1,174 – 1,268) інформаційний індекс Шенона (0,204 – 0,269). У вікових дерев *Q. robur* НПП «Голосіївський» не виявлено географічну диференціацію генетичної структури вибірок. На частку міжвибіркової генетичної варіабельності

(AMOVA) припадає біля 6% генетичної мінливості, на географічну компоненту – біля 1%. Близько 93% генетичної мінливості зосереджено на індивідуальному рівні. При використанні ТВР-методу вставлено, що досліджені деревостани дуба звичайного не мають стабілізованої генетичної структури, але водночас володіють досить великим генетичним різноманіттям [272].

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.3.1 наведено в статті:

Pirko YV, Demkovich AE, Kalafat LO, Blume YB., Lykholat OA. Studying the genetic structure of *Quercus robur* forest stands on anthropogenically transformed territories using introns of the β -tubulin gene. *Biosystems Diversity*. 2018; 26(4): 269-275. DOI <https://doi.org/10.15421/011841> (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*)

4.3.2. Генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur* L. за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів

Впродовж багатовікової історії міста Київ в озелененні використовувався *Quercus robur* L. На сьогодні у місті наряду з молодими дубовими деревостанами штучного та природного походження досить часто зустрічаються вікові дерева *Q. robur*, які можуть бути залишковою частиною колишніх природних популяцій. До багатих на старі дерева територій у м. Києві належить один із найстаріших лісових масивів Європи – грабова діброва, що є основою парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва загальнодержавного значення «Феофанія» [436, 442]. В цих природного походження деревостанах *Q. robur* зустрічаються рослини диверсифіковані за часом виникнення фенологічних фаз. В максимальному своєму проявленні

вони розрізняються як дві чітко виділені форми (вперше, описані Черняєвим в 1858 р.): *Q. robur* var. *praecox* – рання фенологічна форма і *Q. robur* var. *tardiflora* Czern. – пізня фенологічна форма, відмінні як за часом виникнення фенологічних фаз, так і за фенотипом взагалі. Основні діагностичні ознаки за якими диференціюються *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* наступні: 1) розкриття бруньок, цвітіння, початок росту пагонів та більшість інших фенологічних фаз виникають у *Q. robur* var. *tardiflora* на 2 – 3 тижні пізніше, ніж у *Q. robur* var. *praecox*, 2) на відміну від *Q. robur* var. *praecox*, листя *Q. robur* var. *tardiflora* не падає, залишаючись на гілках до кінця зими, 3) *Q. robur* var. *tardiflora* менше уражується шкідниками та хворобами, 4) порівняно з *Q. robur* var. *praecox*, *Q. robur* var. *tardiflora* має вищу і більш регулярну форму крони, ширший стовбур і вищу якість деревини, віддає перевагу більш зволоженому місцезростанню [471]. Визначено, що ці різновиди мають значні відмінності у стійкості до середовища, зростанні та розвитку [345, 410, 437, 438, 439, 453, 458]. Виявлено приуроченість фенологічних форм до різних типів ландшафту: ранньої фенологічної форми *Q. robur* до низинних форм рельєфу, а пізньої – до височинних [458, 459]. Рослини ранньої форми *Q. robur* краще переносять нестачу вологи у ґрунті в порівнянні з пізньою формою, що дозволяє їм зростати у сухих місцях, однак вони пошкоджуються весняними заморозками і листогризучими комахами. Пізні форми *Q. robur* більш стійкі до низьких температур весною, однак пошкоджуються літньою посухою [68, 284, 438]. Вони є багатообіцяючими та перспективними і вже широко використовуються для штучного формування зелених зон у європейських країнах [65].

Варто відмітити, що в природних популяціях існують багато перехідних форм та різновидів на рівні окремих організмів [345], тому, як правило, виділяють ранню та пізню фенологічні форми *Q. robur*, більше зважаючи на комплекс фенологічних ніж на комплекс фенотипових ознак, хоча приймаються до уваги й останні. Фенологічні особливості *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* не завжди можна вважати наслідком

звичайної мінливості, пов'язаної з екологічними особливостями зростання *Q. robur* [23, 437, 438, 439, 453, 458].

Фенологічна мінливість в аналогічних ґрунтових та гідрологічних умовах знаходиться під впливом генетичних факторів [23, 53]. Генетична ідентифікація ранніх та пізніх фенологічних форм *Q. robur* надає змогу окреслити генетичне різноманіття цього та інших тісно пов'язаних різновидів. Молекулярно-генетичний аналіз може допомогти виявити найбільш цінні зразки для розповсюдження через культуру *in vitro* і масового виготовлення посадкового матеріалу. Найбільш ефективно це завдання можна виконати за допомогою молекулярних методів, що базуються на використанні ДНК-маркерів, а саме SSR та TBP [446].

Поліморфізм ядерних мікросателітних локусів у ранніх та пізніх фенологічних форм *Q. robur*

Електрофореграми з ПЛР-продуктами мікросателітних локусів *qiru-GA-1C08*, *qiru-GA-0C19*, *QPZAG9* наведено на рисунках 4.41, 4.42 та 4.43, а частоти алелів – на рис. 4.44. Всього виявлено 30 алелів, 9 з яких були унікальними для ранньої форми (*qiru-GA-1C08*: 266, 282, 284, 286; *qiru-GA-0C19*: 219, 228; *QPZAG9*: 180, 194, 212), 5 – унікальними для пізньої форми (*qiru-GA-1C08*: 262, 268; *qiru-GA-0C19*: 323, 258; *QPZAG9*: 206) [446].

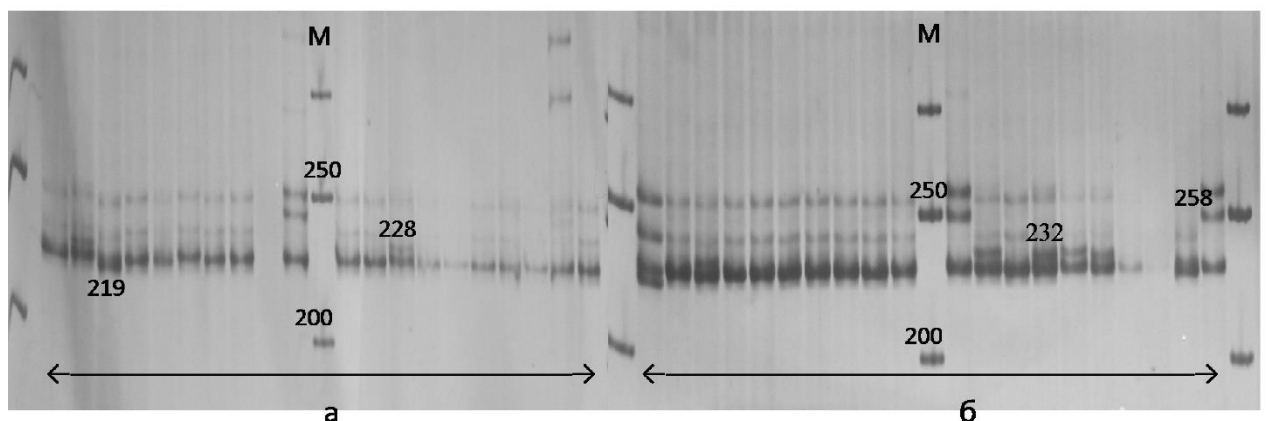


Рис. 4.42 Електрофореграма продуктів ПЛР локуса *qiru-GA-0C19* у досліджених деревах *Quercus robur* L.: а – *Q. robur* var. *praecox*; б – *Q. robur* var. *tardiflora*; м – ДНК-маркер

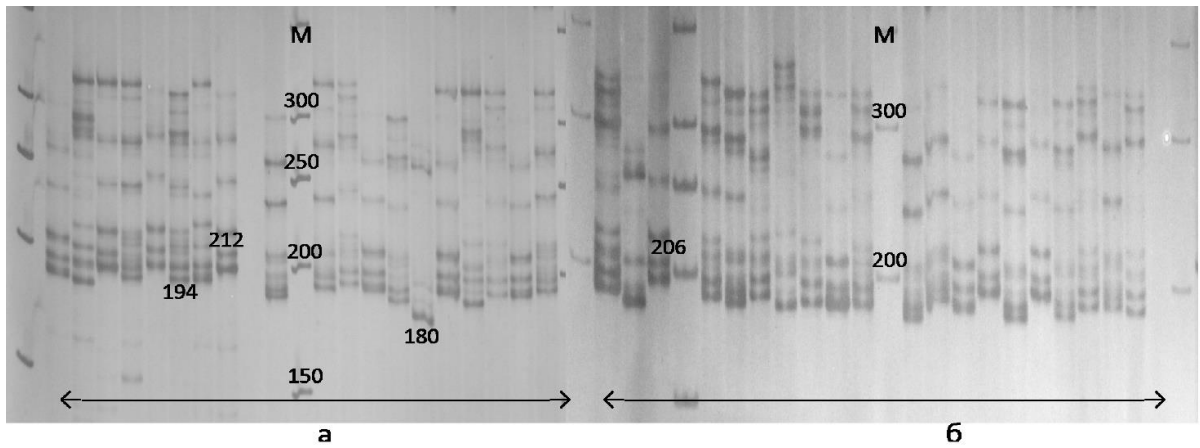


Рис. 4.43. Електрофореграма продуктів ПЛР локуса QPZAG9 у досліджених дерев *Quercus robur* L.: а – *Q. robur* var. *praecox*; б – *Q. robur* var. *tardiflora*; м – ДНК-маркер

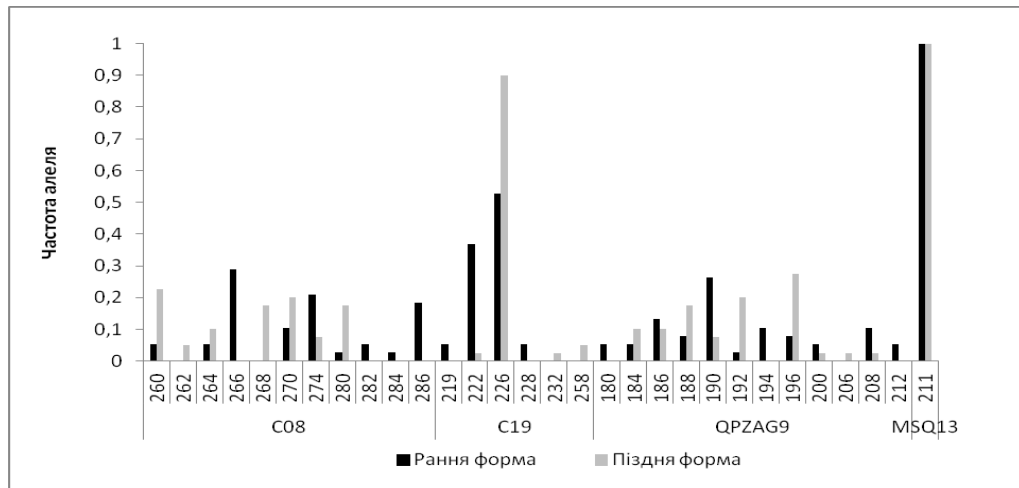


Рис. 4.44 Частоти алелів чотирьох мікросателітних локусів вибірок рослин ранньої та пізньої фенологічних форм *Quercus robur* L.

За локусом *qru-GA-1C08* виявлено 11 ампліконів із довжинами від 260 до 286 п.н., за локусом *qru-GA-0C19* – 6 алелів (розмах мінливості 219–258 п.н.). Локус QPZAG9 характеризувався наявністю 12 алелів розміром 180–211 п.н.. Локус MSQ13 виявився мономорфним у обох проаналізованих груп рослин з одним алелем 211 п.н. відповідно. Раніше, при аналізі вибірок *Q. robur*, нами виявлявся невисокий алельний поліморфізм локусу MSQ13 з ідентичним предомінантним алелем 211 (неопубліковані дані). Для вибірки вікових дерев *Q. robur* з Святогір'я виявлено 4 алеля для локуса C19 та 9

алелів для C08 [419]. Для більш масштабних досліджень європейських деревостанів *Q. robur* кількість алелів, що виявлялася, як правило, була вищою [7, 21, 64, 127, 157, 247, 358].

Відмінності між алельним складом вибірок ранніх та пізніх форм *Q. robur* значимі на рівні $p \leq 0,01$ для локусу QPZAG9, та на рівні $p \leq 0,001$ для локусів quru-GA-1C08, quru-GA-0C19 [446] (табл. 4.7, модифікований χ^2 метод).

Таблиця 4.7

Відмінності між алельним складом вибірок рослин ранньої та пізньої форми *Quercus robur* L.

Локус\алель	Значення критерію χ^2 (ступені свободи)
quru-GA-1C08	43,204 (10) ***
260	4,789 (1) *
262	1,950 (1) n.s.
264	0,621 (1) n.s.
266	13,489 (1) ***
268	7,311 (1) **
270	1,347 (1) n.s.
274	2,959 (1) n.s.
280	4,680 (1) *
282	2,161 (1) n.s.
284	1,066 (1) n.s.
286	8,099 (1) **
quru-GA-0C19	22,803 (5) ***
219	2,161 (1) n.s.
222	14,803 (1) ***
226	13,438 (1) ***
228	2,161 (1) n.s.
232	0,962 (1) n.s.
258	1,950 (1) n.s.
QPZAG9	27,265 (11) **
180	2,161 (1) n.s.
184	0,621 (1) n.s.
186	0,190 (1) n.s.
188	1,617 (1) n.s.

190	4,967 (1) *
192	5,759 (1) *
194	4,438 (1) *
196	5,091 (1) *
200	0,402 (1) n.s.
206	0,962 (1) n.s.
208	2,095 (1) n.s.
212	2,161 (1) n.s.

Примітка. Відмінності достовірні при * – $P \leq 0,05$, ** – $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$; n.s. – відмінності недостовірні

Оцінка значущості наявності/відсутності окремих алелів локусу QPZAG9 підтверджує таку на рівні $p < 0,05$ для окремих алелів. В одному випадку це притаманний для ранньої форми алель (194), в інших трьох значно відрізняється частота алелів 190, 192, 196 (алелі 192, 196 більш представлені у пізньої фенологічної форми, а алель 190 – у ранньої). За локусом *qug-GA-1C08* диференціація між пізньою та ранньою фенологічними формами відбувається за алелями 260 та 280 на рівні $p < 0,05$ (більш представлені у пізньої форми), алелями 266, 268, 286, з яких 266 та 286 притаманні для ранньої форми на рівні $p < 0,001$ та $p < 0,01$, відповідно, а алель 268 – для пізньої фенологічної форми на рівні значущості $p < 0,01$.

За локусом *qug-GA-0C19* відмінності на рівні $p < 0,001$ між вибірками ранніх та пізніх дерев існують за двома передомінантними алелями (222 та 226) і обумовлені підвищеною частотою алеля 222 у вибірці дерев ранньої фенологічної форми (біля 50%) та переважанням алеля 226 у вибірці пізньої фенологічної форми, де його частота сягає більше 80%. При цьому другий за частотою для ранньої форми алель – 222 у вибірці пізніх дерев практично не представлений і складає менше ніж 5%.

Основні оцінки поліморфізму вибірок ранніх та пізніх форм *Q. robur* за проаналізованими мікросателітними локусами наведені на рис. 4.45. Середня кількість алелів склала 6,25 та 5,25 на локус у ранньої та пізньої форм відповідно, при цьому досить невелика частка відносилась до рідкісних

алелів. Ефективна кількість алелів на локус була майже однаковою у співвідношенні алельного різноманіття і складала близько 66% та 65% від загального числа виявлених алелів у ранніх та пізніх фенологічних форм *Q. robur* відповідно (за абсолютними показниками ефективна кількість алелів на локус була більше на 0,6 одиниць у рослин ранньої фенологічної форми *Q. robur*).

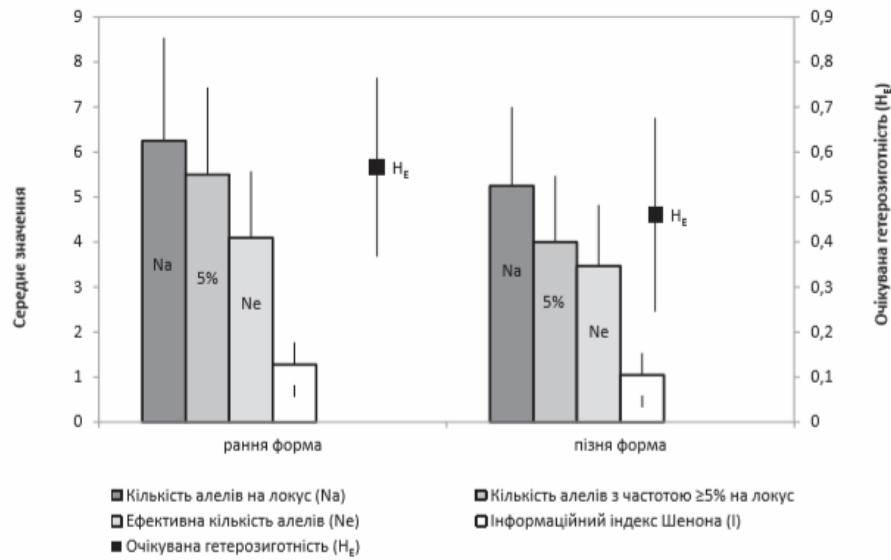


Рис. 4.45. Оцінки генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами ранньої та пізньої фенологічних форм *Quercus robur* L.

У проаналізованих вибірок рослин встановлено невисокі показники генетичної мінливості ($H_E=0,566\pm 0,199$ у ранньої та $H_E=0,461\pm 0,216$ у пізньої фенологічних груп), у порівнянні з європейськими природними популяціями *Q. robur* ($0,821\pm 0,002$ відповідно). Оцінки наявної гетерозиготності вибірок ранніх та пізніх форм *Q. robur* за аналізованими локусами також сильно занижені ($H_O=0,342\pm 0,208$ та $0,288\pm 0,136$ порівняно із $0,798\pm 0,010$ у європейських популяцій [358]. Відповідно в українській популяції спостерігається значний дефіцит гетерозиготних генотипів (індекс фіксації Райта у ранньої фенологічної форми склав $0,462\pm 0,247$, а у пізньої – $0,259\pm 0,179$). Хоча при аналізі 20 мікросателітних локусів у *Q. robur* в природних популяціях із Греції, Болгарії, Німеччини, Британії, Центральної Європи та Балканського півострова також був встановлений досить значний

рівень відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга, але середній коефіцієнт інбридингу складав 0,100, варіюючи від -0,100 до 0,590 [64, 247, 358]. Слід відмітити, що цей ефект може бути пов'язаний із властивостями використаних для аналізу мікросателітних локусів, наприклад, для популяцій *Quercus trojana* Webb аналогічного розміру при використанні шести мікросателітних локусів жоден з яких не був мономорфним отримано вищі оцінки різноманітності (середні H_o/H_e для популяцій складала 0,6/ 0,71) [43].

Виявлено пару алельних варіантів за локусом *qugu-GA-0C19*, за частотами яких існує значна різниця між ранніми та пізніми фенологічними формами *Q. robur*. Алель *qugu-GA-0C19-222* практично не представлений у пізньої форми *Q. robur*, натомість у цієї форми переважає *qugu-GA-0C19-226*. Аналогічно алель *qugu-GA-1C08-266* представлений виключно у ранньої фенологічної форми *Q. robur* і відсутній у пізньої. В подальшому наявність чи відсутність цих алелів може бути використана для діагностичних потреб (фінгерпринтингу) [446].

Поліморфізм ТВР фрагментів у ранніх та пізніх фенологічних форм *Q. robur*

Електрофоретичний ТВР аналіз 40 дерев *Q. robur* обох форм загалом виявив 46 фрагментів, зона розподілу яких знаходиться в діапазоні від 298 п. н. до 1430 п.н. (рис. 4.45).

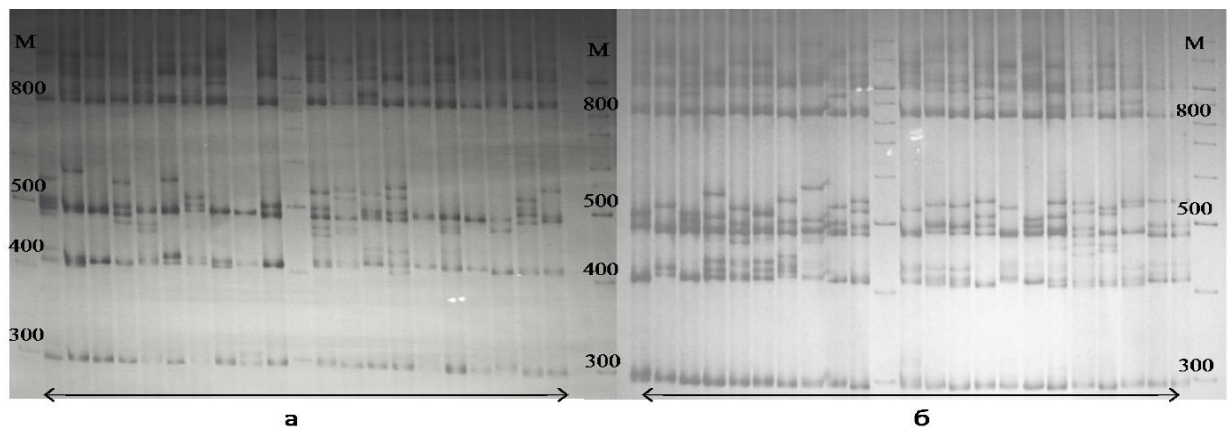


Рис. 4.45. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну у досліджених дерев *Quercus robur* L.: **а** – *Q. robur* var. *praecox*; **б** – *Q. robur* var. *tardiflora*; М – ДНК-маркер.

З виявлених фрагментів унікальними для ранньої фенологічної форми *Q. robur* були чотири (з приблизним розміром 310 п.н., 400 п.н., 405 п.н., 480 п.н.) та для пізньої форми – п'ять фрагментів (з приблизним розміром 425 п.н., 440 п.н., 445 п.н., 515 п.н. та 1330 п.н.). Рідкісних алелів (частота яких складає менше 10 %) виявлено у ранньої форми – 13, у пізньої – 9. Найчастіше у обох форм зустрічаються фрагменти: з приблизним розміром 850 п.н. (частота 100 %) та 1170 п.н. (частота складає від 70% до 75 %) [446] (рис. 4.46).

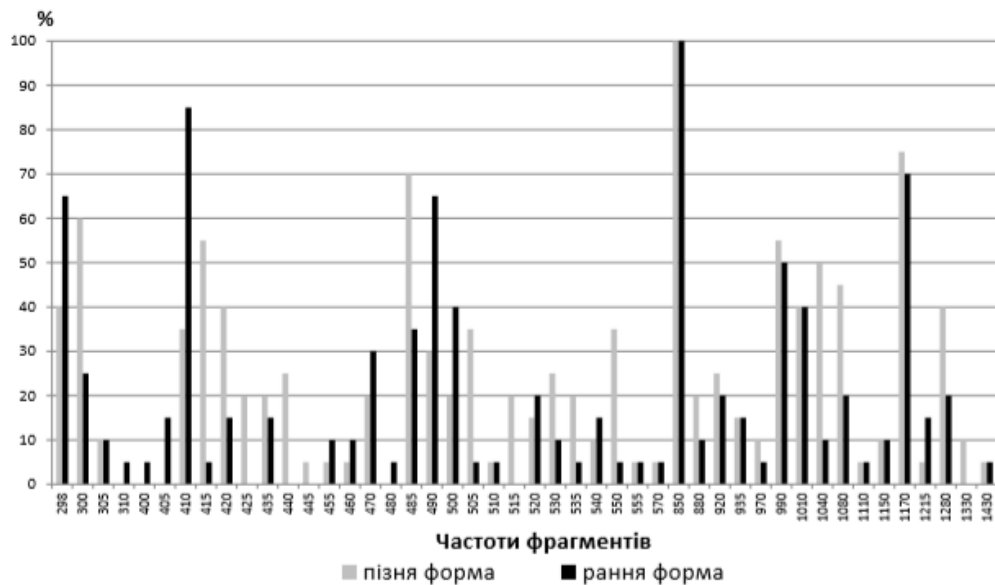


Рис. 4.46. Частоти алелів ТВР-маркерів у рослин *Quercus robur* L. ранньої та пізньої форм.

Оцінка показників поліморфізму за ТВР-маркерами, проведена для досліджених форм *Q. robur*, виявила зниження кількості фрагментів у ранньої ($N_e = 1,218 \pm 0,040$), порівняно з пізньою фенологічною формою *Q. robur* ($N_e = 1,294 \pm 0,042$) [446] (рис. 4.47).

За інформаційним індексом Шенона також спостерігаються відмінності між ранньою ($I = 0,253 \pm 0,0290$) та пізньою ($I = 0,320 \pm 0,031$) фенологічними формами. Оскільки дані, отримані за ТВР методом, є бінарними, то доцільно було використання показника вмісту поліморфної інформації (PIC) для оцінки генетичного різноманіття досліджених рослин. Значення PIC було

більше у пізньої фенологічної форми *Q. robur* ($PIС = 0,274 \pm 0,025$), ніж у ранньої форми ($PIС = 0,209 \pm 0,022$) [446]. Для будь-якого біалельного маркера максимальна оцінка $PIС$ становить 0,5 [142]. В цілому дерева досліджених фенологічних форм *Q. robur* мають відмінності за ТВР-профілями. Фрагменти, які представлено тільки в одній із форм можна використовувати для генетичного маркування.

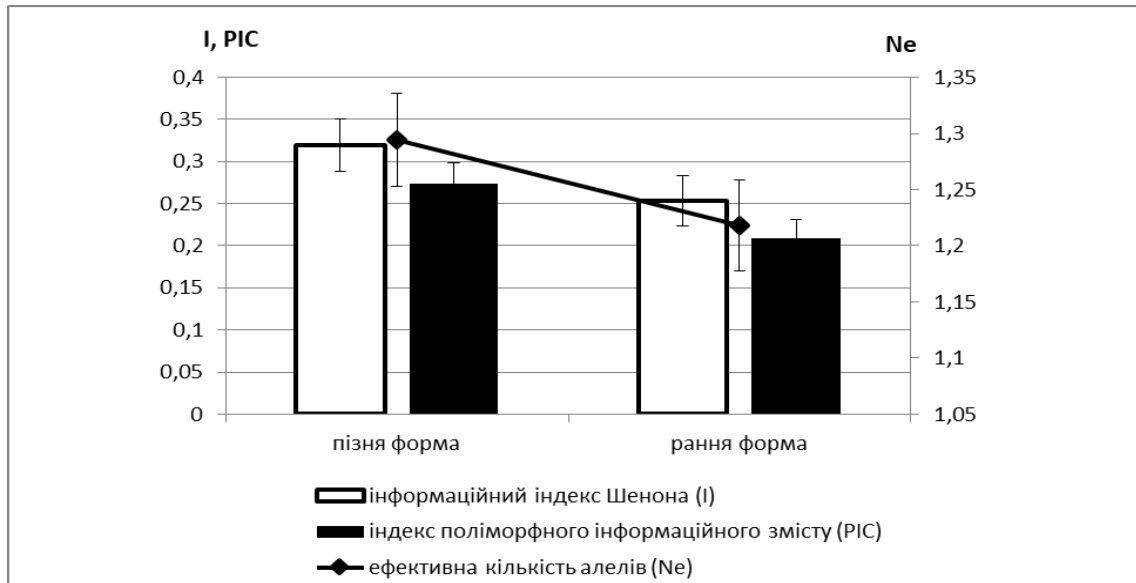


Рис. 4.47. Основні показники алельного різноманіття у рослин *Quercus robur* L. ранньої та пізньої фенологічних форм за ТВР-маркерами.

В цілому в результаті проведеного аналізу з'ясовано генетичні відмінності між ранньою та пізньою фенологічними формами *Quercus robur*. У дерев *Q. robur* var. *praecox* виявлено 9 унікальних алелів за мікросателітними локусами та 4 фрагменти за ТВР-маркерами, а у *Q. robur* var. *tardiflora* – 5 унікальних алелів за мікросателітними локусами та 5 фрагментів за ТВР-маркерами. Виявлено відмінності за частотою предомінантних алелів *qugu-GA-0C19-222* (практично відсутній у вибірці пізньої фенологічної форми) та *qugu-GA-0C19-226* (частота сягає більше 80% у ранньої фенологічної форми і лише біля 50% у пізньої). Виявлений поліморфізм фенологічних форм *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* вказує на те, що відмінності можуть бути генетично обумовлені, а різні види

ДНК-маркерів використані для генетичного профілювання та паспортизації *Q. robur* [446].

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.3.2 наведено в статті:

Пірко ЯВ, Нецветов МВ, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабоконт АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Блюм ЯБ. Генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur* (Fagaceae) за даними аналізу поліморфізму нітронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів. Український ботанічний журнал. 2018;75(5): 489–500. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.05.489> (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*)

4.3.3. Дослідження генетичної структури *Ulmus pumila* та *U. suberosa* в Степовому Придніпров'ї за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів

Вивчення впливу інвазивних неаборигенних видів рослин на стан природної флори й рослинності тісно пов'язано зі збереженням біорізноманіття, екологічної рівноваги в природі та розв'язанням проблем біобезпеки. Проблема фітоінвазій (фітозабруднення) нині є однією з глобальних проблем, яка все більше привертає увагу ботаніків, екологів, спеціалістів сільського господарства, ресурсознавців, медиків та ін., оскільки фітозабруднення спричиняє багато негативних наслідків для суспільства [433].

Інтенсивна господарська діяльність людини, економічний розвиток промислового регіону призводить до виникнення значних площ вторинних, антропогенних місць існування, які заселяються адвентивними рослинами.

Вони в свою чергу впливають на структуру як природних так і штучних рослинних угруповань.

Адвентизація флори, як наслідок порушень природного середовища, є досить актуальною проблема в багатьох країнах світу [433]. Традиційно під адвентизацією розуміють зростання відносної кількості та значення адвентивних рослин у флорі. Успіх інвазивного виду багато в чому обумовлений сприятливістю умов регіону вторинного ареалу, що виникають в результаті складних взаємодій між природними та антропогенними чинниками [144, 399]. Свій вплив також чинять шкідники, пожежі, посухи, урагани, бурі у повітрі, кліматичне потепління, практика управління, туристична, господарська та економічна діяльність людини [10, 76].

Сучасний рослинний покрив Середнього Придніпров'я надзвичайно трансформований господарською діяльністю людини. Найбільші площі в регіоні займають антропогенні екотопи, на яких розвивається синантропна флора. Встановлено, що група інвазивних видів у регіоні представлена 40 видами. Синантропна флора регіону налічує 853 види судинних рослин, з яких 574 – адвентивні, решта – апофіти. Серед адвентивних видів переважають кенофіти – 438, археофітів – 136 видів [421].

З-поміж адвентивних деревних і чагарникових видів регіону зареєстровані такі: *Acer negundo* L., *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, *Armeniaca vulgaris* Lam., *Caragana arborescens* Lam., *Cerasus vulgaris* Mill., *C. mahaleb* (L.) Mill., *Elaeagnus argentea* Pursh, *E. angustifolia* L., *Gleditsia triacanthos* L., *Lycium barbarum* L., *Morus alba* L., *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch., *Ribes aureum* Pursh, *Robinia pseudoacacia* L., *Salix fragilis* L., *Ulmus pumila* L. Особливо широко на території міста розповсюджені такі адвентивні види, як *Acer negundo*, *Robinia pseudoacacia*, *Ulmus pumila*, *Amorpha fruticosa* L., *Parthenocissus quinquefolia*. Нині вони набувають рангу інвазивних і засмічують природні та штучні фітоценози, беруть основну участь у самозарощуванні територій, що призводить до загального збіднення аутохтонної (місцевої) флори [404, 456].

Ulmus pumila L. (*U. pinnato-ramosa* Dieck. ex Koehne) — ксенофіт східно-азійського походження; на території України культивується у садах і парках на півдні Степу, на Сиваші та в Криму, вирощується як цінна декоративна рослина та для полезахисних смуг у посушливих районах. Останнім часом вид дичавіє, активно поширюється та зростає вздовж доріг і залізничних колій в містах Черніговської, Харківської, Закарпатської областей, в Буковинському Передкарпатті, Середньому Придніпров'ї, Причорномор'ї тощо [418].

Досить агресивно він проявив себе і на території інших країн (Китай, Італія) [25, 141, 388]. На території республіки Башкортостан *U. pumila* віднесено до потенційно інвазивних видів, здатних до відновлення в місцях заноса [36]. Цей вид також вважається інвазивним на території 41 штату США [388]. В лісостепових регіонах Росії йому надано статус найвищої інвазивності [460].

Ulmus suberosa Moench, або *Ulmus campestris* var. *suberosa* Wahl – в'яз корковий, також інвазивний вид, розповсюджений майже по всій території України (крім Карпат і крайнього півдня), Західній Європі, Малій Азії, північному Ірану, півдні європейської частині Росії та Кавказі [446].

На успішне поширення цих видів впливає рівень генетичного поліморфізму, який залежить як від кількості особин, що утворюють інвазивні популяції та перезапильються в її межах, так і від походження інвазивних/інтродукованих екземплярів [299]. Генетичне різноманіття інвазивних видів залежить також від гібридизаційних процесів зі спорідненими нативними видами місцевої флори [389]. Чужорідні види здатні утворювати гібриди з аборигенними, в результаті чого виникають нові види здатні до подальшої експансії, а іноді навіть до повного витіснення батьківських видів.

Дотепер мало відомостей щодо генетичних факторів, котрі дозволяють цим видам в'язів успішно адаптуватись, конкурувати та поширюватись у різних кліматичних зонах та екологічних нішах. Моніторингові дослідження

мають надати комплексну інформацію про об'єкт, що вивчається. Оцінка та прогноз змін у структурі їх популяцій здійснюється з метою збереження біологічного різноманіття та забезпечення стійкого стану та раціонального використання рослинних ресурсів [125, 237, 302, 313].

Однією з адаптаційних характеристик природних популяцій є гетерогенність. Важливим показником гетерогенності можна назвати генетичний поліморфізм. Вивчення внутришньопопуляційного поліморфізму може дати пояснення складним механізмам підтримання генетичної структури популяцій та адаптації окремих організмів. У випадку добору на користь гетерозигот генетичні відмінності можуть супроводжуватися і фенотиповими, які як правило мають адаптивне значення.

Відомо, що введення видів рослин в нові райони існування може призводити до значних екологічних та генетичних змін у аборегенних видів [28, 141, 334]. Багатогранний підхід до дослідження генетичної структури інвазивних видів рослин забезпечує більш повне уявлення про роль генетичних сил у опануванні території [366]. Більш повному розумінню мікроеволюційних процесів, пов'язаних із адаптивними можливостями рослинних видів сприятиме також оцінка мінливості молекулярно-генетичної структури популяцій.

Генетичне різноманіття серед особин у межах одного виду відбивається при наявності різних генотипів в генофонді, а отже, і різних генотипів всередині популяцій. Раніше для встановлення генетичних взаємовідносин використовували методи якісної фенетики, електрофорез білків з насіння, ізоферментний аналіз. Згодом поширення отримали молекулярні маркери на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), серед яких активно використовуються для потреб популяційної генетики мікросателітні повтори (SSR) [5, 326]. В той же час як джерело ДНК-поліморфізму все більшої популярності набувають інтрони. Такми чином на внутрішньовидовому рівні є доцільним використання маркерних систем, заснованих на поліморфізмі інтронів, зокрема на поліморфізмі довжини інтронів генів β -тубуліну [22]. Ця

система маркерів є нейтральною, стабільною та специфічною, що обумовлює можливість її використання в генетичному аналізі рослин.

Важливим етапом досліджень з використанням ТВР-маркерів є оцінка генетичного поліморфізму та патернів мінливості на видовому рівні. Наявність попередньої інформації такого плану є запорукою успішного використання цього методу в прикладному застосуванні, наприклад, оцінки біорізноманіття, ступеня клональності, виявлення антропогенного впливу на генетичну та популяційну структуру видів, що придатні для використання у рекультиваційних роботах та володіють достатнім потенціалом при створенні стійких до антропогенних впливів деревостанів.

Сучасні технології, що базуються на застосуванні систем на базі ДНК-маркерів (RAPD, SSR, ISSR), успішно використовуються для молекулярно-генетичної характеристики гібридів та їх батьківських форм. Застосування SSR-маркерів у порівнянні з іншими методами забезпечує високу ступінь надійності та відтворюваність. Кодомінантний характер прояву цих маркерів дозволяє відрізнити гомо- та гетерозиготні рослини, що має велике значення для раннього виявлення гібридів [455].

Для *U. pumila* встановлена висока здатність до перехресної гібридизації. В дослідженнях ряду авторів було показано, що природна гібридизація між занесеними та близькими до них природними видами зустрічається досить часто і може створити серйозні проблеми збереження біорізноманіття [86, 295]. Подальша гібридизація може призвести до генетичної асиміляції та можливих втрат родових таксонів [137, 293]. Гібридизація між видами також може стимулювати посилення інвазивності шляхом збільшення генетичної різноманітності та створення нових генотипів [86, 137].

В дослідженнях популяцій рослин з використанням ізозимів, ISSR та RAPD було показано, що на території Європи найчастіше зустрічаються природні гібриди між *U. pumila* та *U. carpinifolia*. Це може допомогти у з'ясуванні взаємозв'язку між гібридизацією та рівнем інвазивності виду. Було

використано генетичні маркери для вивчення ступені гібридизації між цими двома видами, а також оцінено рівень генетичної різноманітності між гібридами і двома батьківськими формами. Подібні дослідження між гібридами цих двох видів в'язу проведено і на території Сполучених штатів Америки [390]. На території Італії вивчалися міжвидові гібриди між *U. pumila* та *U. minor*. Визначено потенційну інвазивність *U. pumila* [41].

При дослідженні *U. pumila*, що зростає по всій території Китайської Народної Республіки було використано 23 мікросателітних локуси, що дозволили оцінити генну різноманітність виду в цьому регіоні [390].

Комплексний аналіз популяційної структури за молекулярними маркерами інвазивних видів роду *Conyza* (Asteraceae) на півдні Бразилії показав наявність стійких біотипів, які мають великий потенціал для колонізації нових областей, що дозволяє робити висновки про ступінь інвазивності [219].

4.3.3.1 Поліморфізм мікросателітних локусів у *Ulmus pumila* та *U. suberosa*

В ході аналізу п'яти ядерних мікросателітних локусів рослин *U. pumila* та *U. suberosa* виявлено 28 алелів (рис. 4.48–4.52).

Частоти алелей для кожного з досліджених мікросателітних локусів представлено на рис. 4.53. В кожній вибірці виявлено унікальні алелі: найбільше для П1 – 5 (UR138: 240 п.н.; UR153: 200 п.н., 208 п.н.; UR101: 122 п.н., 131 п.н.); для П2 – 3 (UR158: null, 183 п.н.; UR101: null); для П3 – 1 (UR153: 189 п.н.), для П4 – 2 (UR153: 191 п.н.; UR158: 177 п.н.). У *U. suberosa* всі досліджені мікросателітні локуси були мономорфні [189].

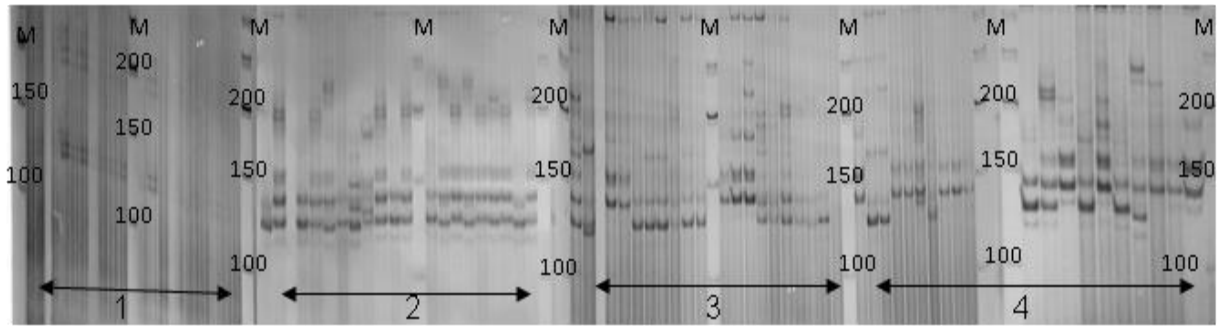


Рис. 4.48. Електрофореграма з ампліконів за мікросателітним локусом UR101: 1 – ділянка П4 *U. suberosa*, 2 – П1, 3 – П2, 4 – П3 *U. pumila*, М – ДНК-маркер

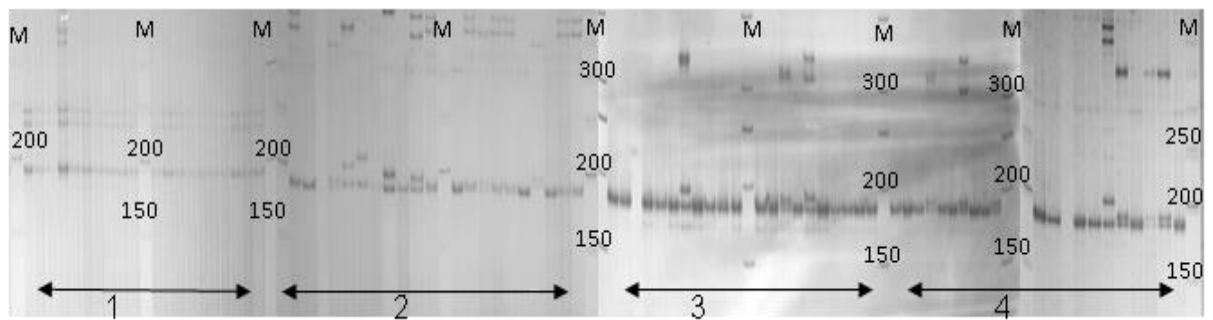


Рис. 4.49. Електрофореграма з ампліконів за мікросателітним локусом UR138: 1 – ділянка П4 *U. suberosa*, 2 – П1, 3 – П2, 4 – П3 *U. pumila*, М – ДНК-маркер

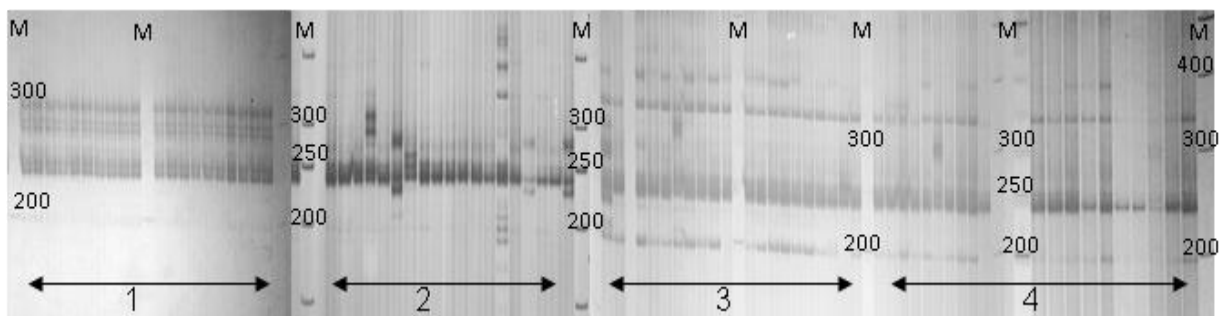


Рис. 4.50. Електрофореграма з ампліконів за мікросателітним локусом UR153: 1 – ділянка П4 *U. suberosa*, 2 – П1, 3 – П2, 4 – П3 *U. pumila*, М – ДНК-маркер

У *U. pumila* локус UR101 налічував сім алелей, мінливість яких складала 120-150 п.н. За локусом UR153 виявлено шість алелей в діапазоні 178–208 п.н. За локусом UR158 виявлено п'ять ампліконів з розміром фрагментів – від 175 п.н. до 187 п.н. Локус UR138 характеризувався п'ятью алелями розміром

224–242 п.н. За локусом UR173b виявлено три алеля (розмах мінливості від 153 п.н. до 168 п.н.). За локусами UR101 та UR158 у рослин на ділянці П2 виявлено ще null аллель. Кількість алелей, виявлених за локусом UR153 співпадало з кількістю алелей цього локусу для інших вибірок дерев *U. pumila* з Китаю [391]. Кількість алелей для локусів UR138 була меншою ніж у вибірок Китаю (8 алелей). За локусами UR101, UR158 та UR173b в китайських популяціях виявлено меншу кількість алелей [391].

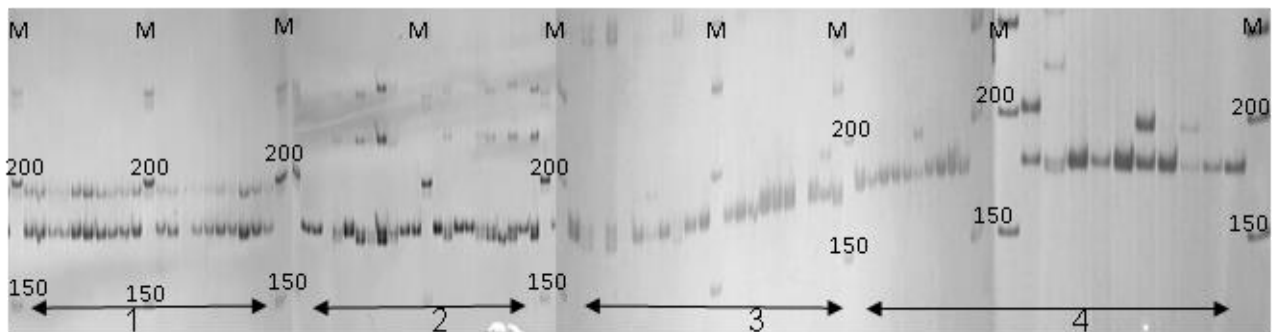


Рис. 4.51. Електрофореграма з ампліконів за мікросателітним локусом UR158: 1 – ділянка П4 *U. suberosa*, 2 – П1, 3 – П2, 4 – П3 *U. pumila*, М – ДНК-маркер

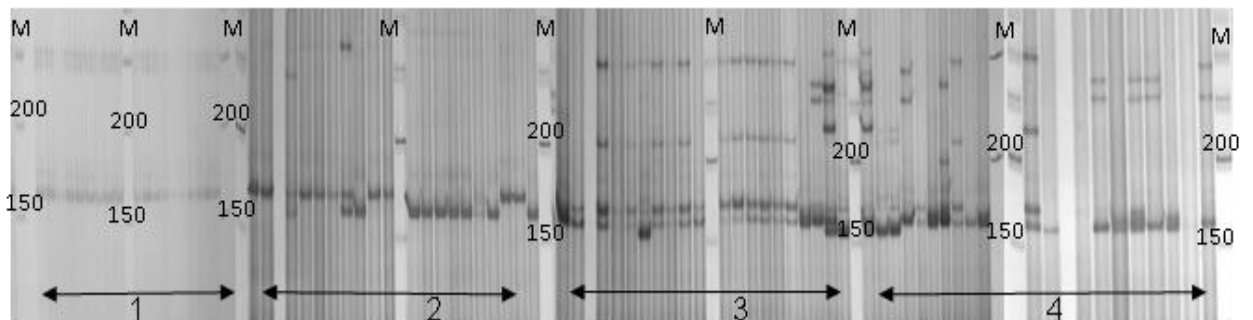


Рис. 4.52. Електрофореграма з ампліконів за мікросателітним локусом UR173b: 1 – ділянка П4 *U. suberosa*, 2 – П1, 3 – П2, 4 – П3 *U. pumila*, М – ДНК-маркер

Алелі, яких не відмічено у популяціях Китаю частіше були присутні у вибірці П1. Для дерев *U. rubra* (з якими *U. pumila* може гібридизуватись) кількість алелей в досліджених локусах була меншою (UR101: 3 алеля, UR138: 5, UR153: 3, UR158: 3, UR173b: 1) [391]. Локуси UR 153, UR 158 у

всіх ділянках виявилися більш гетерозиготними ніж UR 101, UR 138 та UR 173b, у яких був надлишок гомозигот. Наявна гетерозиготність (H_o) для локусів UR 138, UR 173b та UR 101 варіювала від 0,125 до 0,325, і була нижче за очікувану гетерозиготність (H_e) (0,181–0,463), для локусів UR153, UR158 наявна гетерозиготність (0,213; 0,325) була більшою, ніж очікувана (0,198; 0,287, відповідно).

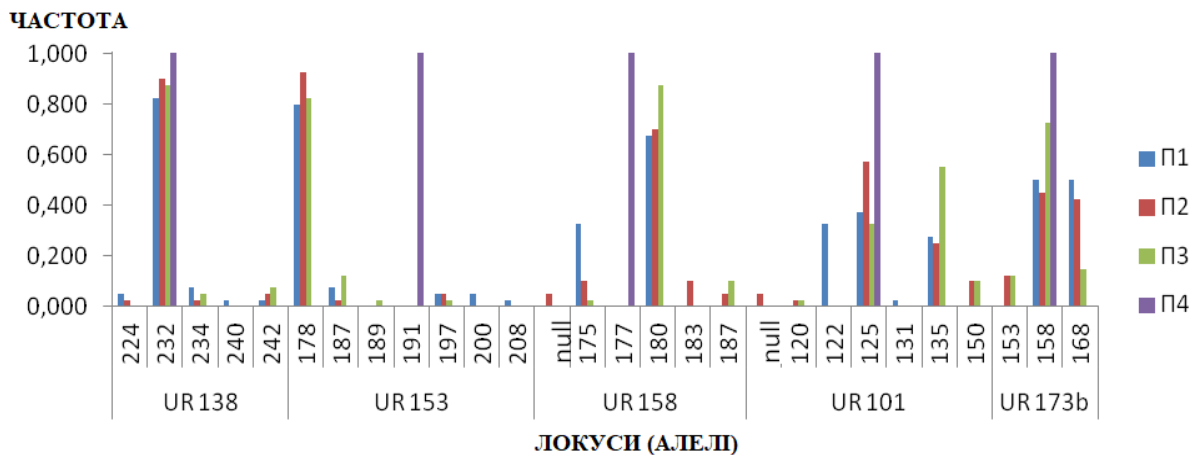


Рис. 4.53 Частоти алелів мікросателітних локусів вибірок рослин *U. pumila* та *U. suberosa*

Оцінка відмінності між алельним складом порівнюваних вибірок за частотами кожного з проаналізованих алелей виявила значимі відмінності (модифікований χ^2 метод) між дослідженими вибірками, окрім локусів UR138 та UR153. Середня кількість алелей за даними, отриманими для мікросателітних локусів склала 3,4 аллеля на локус у рослин *U. pumila* на ділянці П3 та 3,6 і 4,0 аллеля на локус на ділянках П1 та П2. Кількість рідкісних алелей (з частотою $<0,05$) була найбільшою на ділянці П2 (3,2 аллеля на локус) та найнижчою (2,6) у вибірці дерев ділянки П3. Основні оцінки поліморфізму вибірки рослин *U. pumila* за проаналізованими мікросателітними локусами наведені на рис. 4.54.

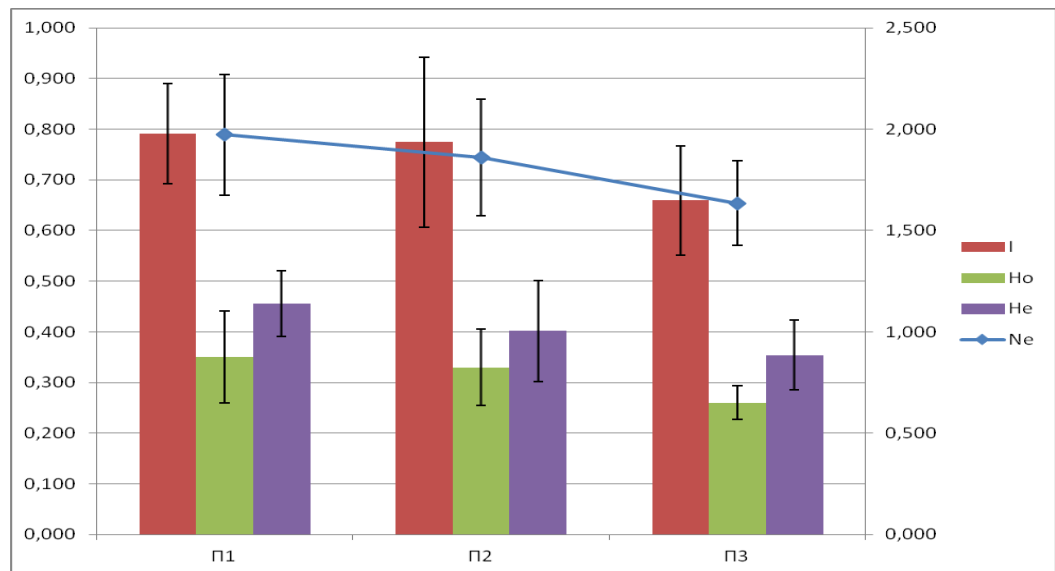


Рис. 4.54. Оцінки генетичного поліморфізму вибірок рослин *U. pumila*

Ефективна кількість алелей на локус була мінімальною на ділянці П3 ($N_e = 1,635$) та вищою на ділянках П1 ($N_e = 1,973$) та П2 ($N_e = 1,861$). Інформаційний індекс Шенона значимо не відрізнявся у порівнюваних вибірок та був також самим низьким у рослин ділянки П3 ($I = 0,660$) та вищим і майже однаковим на ділянках П1 та П2 ($I = 0,791$ та $0,775$, відповідно). У всіх досліджених вибірок спостерігали помірний рівень очікуваної гетерозиготності. Найбільший її рівень був властивий деревам *U. pumila* на ділянці П1 ($H_e = 0,455$), яка характеризувалась моновидовим угрупованням з високою щільністю дерев. На ділянках, де були присутні інші деревні рослини, значення H_e були нижчими: на ділянках П2 та П3 ($H_e = 0,402$ та $0,354$, відповідно). Наявна гетерозиготність за мікросателітними локусами на всіх ділянках була нижчою очікуваної за рахунок надлишку гомозиготних генотипів ($H_o = 0,350$; $0,330$; $0,260$, відповідно). У досліджених вибірок майже за всіма локусами (окрім локусу UR153 у всіх вибірках, і локусу UR158 у вибірці П1 та П3 і локусу UR101 у вибірці П1) підтверджено наявність відхилень від рівноваги Харді-Вайнберга (в сторону дефіциту гетерозиготних генотипів) [189].

У проаналізованих вибірок рослин невисокі показники генетичної мінливості, порівняно із 53 популяціями Північної Америки східноазійського

походження ($H_e = 0,36-0,62$) [389], що може свідчити про збідненість генетичної структури.

Наявна гетерозиготність досліджених вибірок *U. pumila* за аналізованими локусами нижча порівняно із гетерозиготністю східноазійських популяцій ($H_o = 0,35-0,70$) [389], особливо у вибірці ПЗ ($H_o = 0,260$). Для усіх вибірок був характерний значний дефіцит гетерозиготних генотипів: найбільший – у вибірці П1 ($F = 0,217$), дерева якої мали найбільшу щільність, а найменший ($F = 0,136$) – у дерев вибірки П2, де найменша щільність рослин. Для популяцій Північної Америки східноазійського походження коефіцієнт інбридингу варіював від $-0,14$ до $0,10$) [389].

Аналіз розподілу молекулярно-генетичної мінливості (AMOVA) вказує на деяку підрозділеність досліджених вибірок рослин рис 4.55. Так на міжвибіркову мінливість припадає 9 % загальної мінливості.

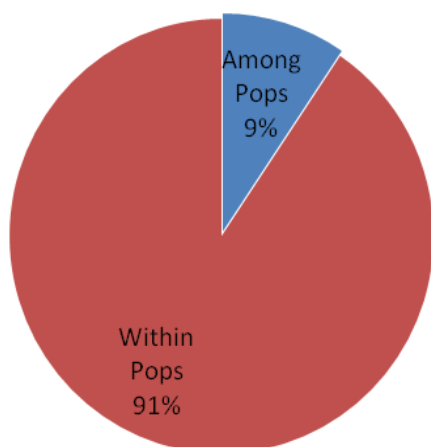


Рис. 4.55. Співвідношення міжвибіркової та внутрішньо-вибіркової генетичної мінливості вибірок рослин *U. pumila*

Таким чином, у проаналізованих вибірок рослин *U. pumila* встановлено надлишкову кількість гомозиготних генотипів, що опосередковано говорить про певний рівень інбредності аналізованих рослин, що, вірогідно, пов'язано як з умовами середовища, так і залежить від вихідної генетичної структури висаджених материнських для деревостанів рослин [189]. Ділянка з високою щільністю моновидових дерев характеризувалися більшою кількістю рідкісних унікальних алелей, ніж рослини ділянки з меншою щільністю рослин (на пустирі з незначно порушеним ґрунтовим покривом).

4.3.3.2. Поліморфізм інтронів β -тубуліна у рослин *Ulmus pumila* та *U. suberosa*

ТВР-аналіз у дерев *U. pumila* загалом виявив 17 фрагментів (рис. 4.56). При цьому 9 з 10 фрагментів двох досліджених ділянок виявилися поліморфними. Мономорфними були фрагменти з приблизним розміром 380 п.н. для ділянки П2 та 1030 п.н. для ділянки П1. Зона розподілу всіх чітких та відтворюваних фрагментів знаходилася в діапазоні від 380 п.н. до 450 п.н. та від 820 п.н. до 1100 п.н. Вище цієї зони також спостерігаються фрагменти, проте вони є досить розмиті та не детектуються кожного разу. Зона від 500 п.н. до 800 п.н. проявлялася нестабільно, тому у розрахунках не враховувалась. Однак у цій зоні спостерігаються фрагменти, характерні для кожної ділянки. При порівнянні електрофоретичних профілів, отриманих на основі ТВР-аналізу, для *U. pumila* можна відмітити, що ділянки рослин незначно відрізняються за кількістю ампліконів та їх розподілом за розмірами.

ТВР-аналіз у дерев *U. suberosa* загалом виявив 10 фрагментів. При цьому всі вони були мономорфними, як і за мікросателітними маркерами.

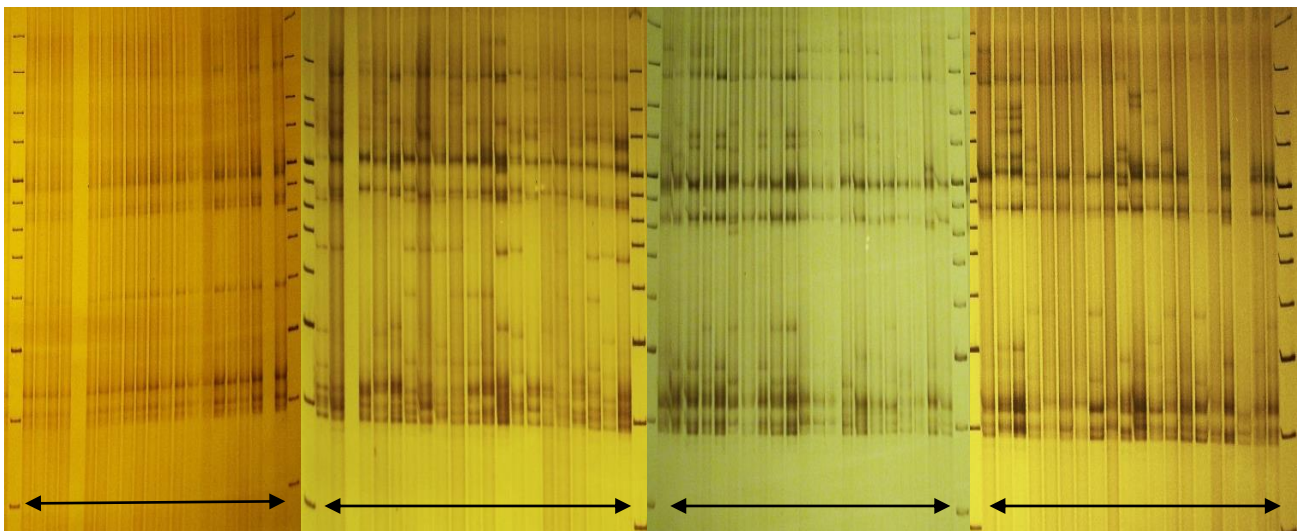


Рис. 4.56. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну дерев: 1 – ділянка П4 *U. suberosa*, 2 – П1, 3 – П2, 4 – П3 *U. pumila*, М – ДНК-маркер

Частоти фрагментів, отриманих під час ТВР-аналізу, у рослин представлено на рис. 4.57, 4.58. Найчастіше зустрічаються фрагменти з приблизним розміром 435 п. н. (частота складає від 50% до 65%), 400 п. н. (частота складає від 50% до 70%), 890 п. н. (частота складає від 80% до 95%), 380 п. н. (частота складає від 85% до 100%) та 1030 п. н. (частота складає від 90% до 100%). Кумулятивна частота семи виявлених фрагментів складає менше 20 %, які можна віднести до рідкісних (рис. 4.57). У рослин *U. suberosa* виявлено фрагменти, які відсутні у рослин *U. pumila* (рис. 4.58).

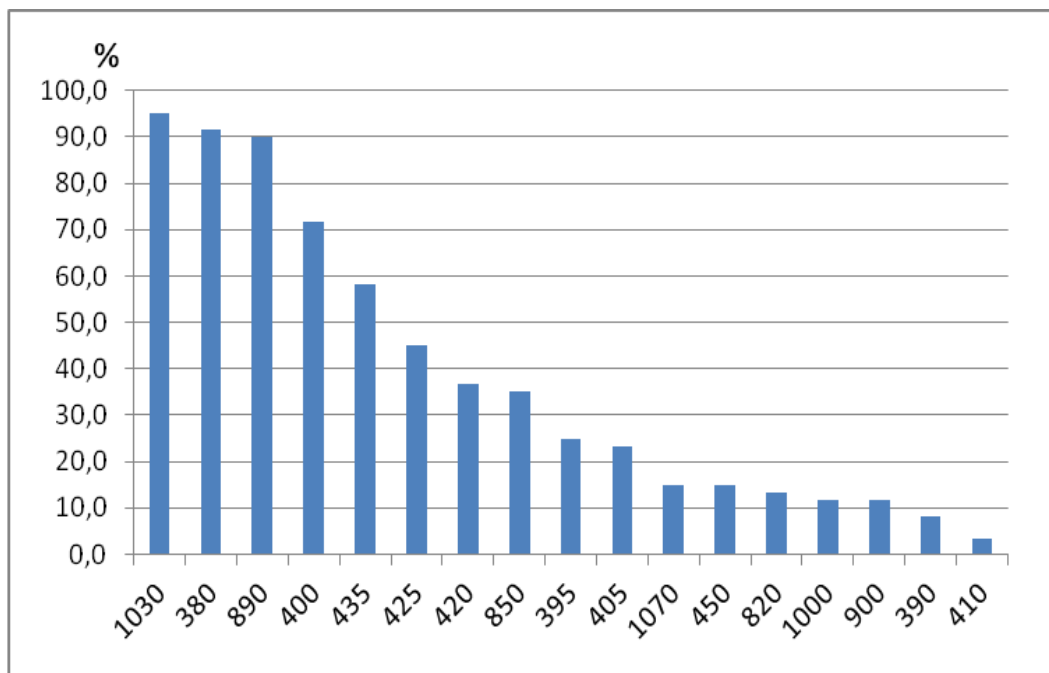


Рис. 4.57. Розподіл частот ТВР-фрагментів у рослин *U. pumila*

Оцінка показників поліморфізму за ТВР-методом, проведена для досліджених територій, виявила зниження, як і за мікросателітними маркерами, кількості фрагментів на локус на ділянці П3 ($N_e = 1,239$), порівняно з ділянками П1 та П2 ($N_e = 1,525$ та $1,402$ відповідно) (рис. 4.59). За інформаційним індексом Шенона також спостерігаються відмінності між ділянкою П3 ($I = 0,252$) та іншими ділянками П1 та П2 ($I = 0,460$ та $0,395$ відповідно).

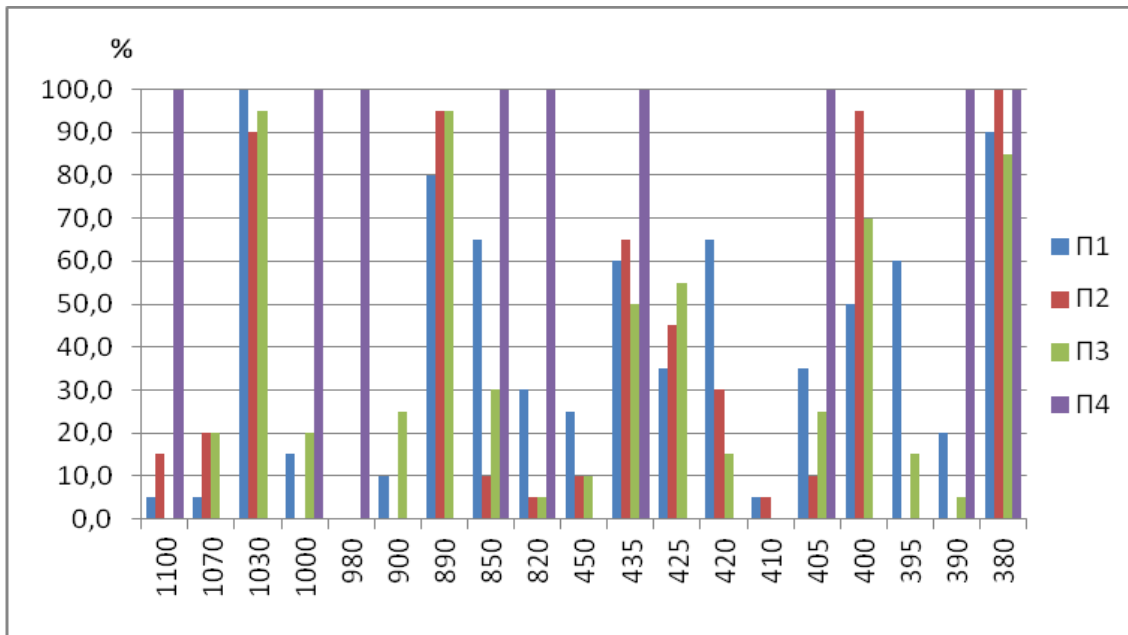


Рис. 4.58. Частоти ТВР-фрагментів у рослин *U. pumila* та *U. suberosa*

Саме низьке значення РІС відмічено для ділянки П3 (0,155), а найвище у рослин ділянок П1 (0,307) та П2 (0,253). Значимі відмінності генетичного поліморфізму досліджених дерев *U. pumila* виявлено між ділянками П3 та П1, П2. Тобто дерева на ділянці П3 виявилися за ТВР-аналізом менш генетично різноманітними.

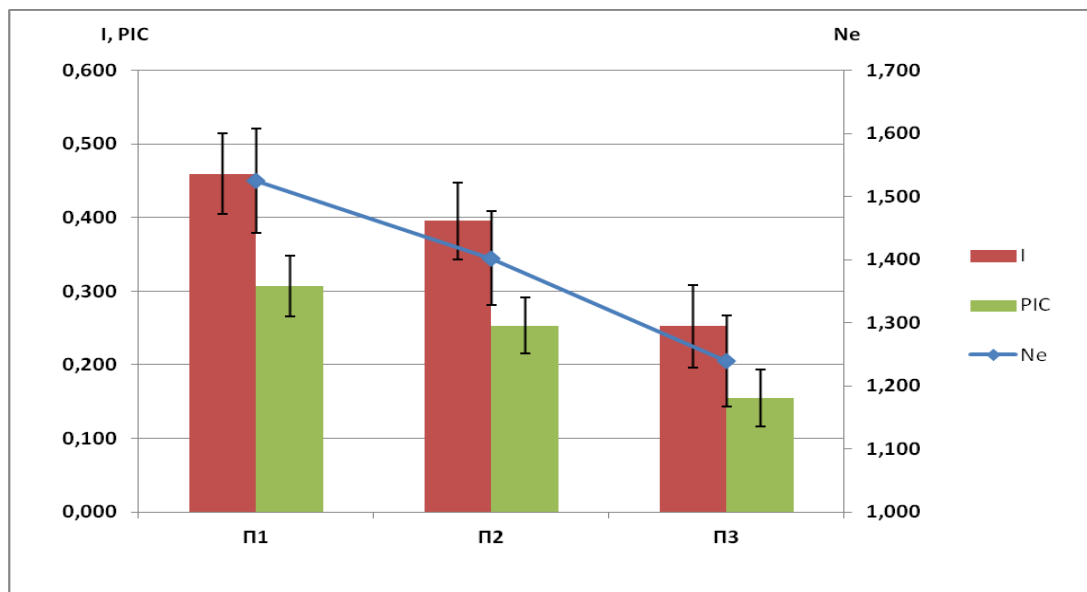


Рис. 4.59. Основні показники генетичного різноманіття у рослин *Ulmus pumila* за ТВР

Подальший аналіз молекулярної варіанси (AMOVA) виявив незначну відмінність досліджених вибірок рослин (рис. 4.60). Так у складі загальної генетичної гетерогенності виду за ТВР-маркерами 88% генетичного різноманіття *U. pumila* приходить на внутрішньовибірковий поліморфізм, і 12 % складає доля міжвибіркового поліморфізму. В дослідженні природних популяцій *U. glabra* Іберійського півострова міжпопуляційна мінливість складала значну частку – 34 %, мінливість пов'язана з популяційною структурою складала 76 %, що, вірогідно, пов'язано із невеликою кількістю рослин в окремих популяціях і підвищенням впливу клонального відновлення популяцій *U. glabra* на порушених ділянках [248].

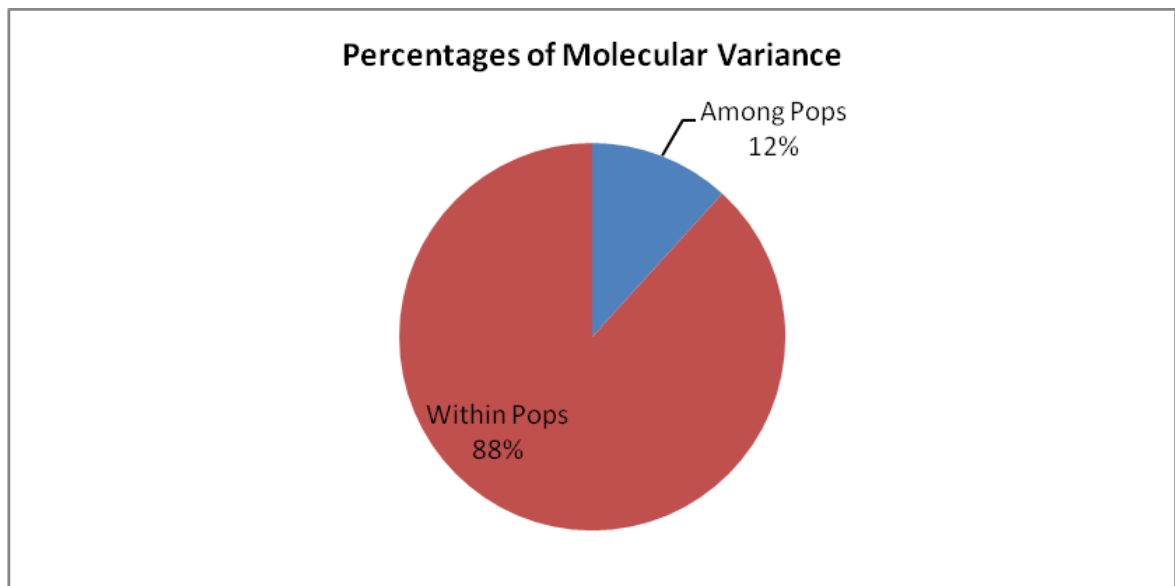


Рис. 4.60. Співвідношення міжвибіркової та внутрішньовибіркової генетичної мінливості вибірок рослин *U. pumila*

Таким чином, за умов використання ТВР-аналізу встановлено, що *U. pumila* та *U. suberosa* у Степовому Придніпров'ї за дослідженими маркерами характеризується відносно низьким рівнем генетичної мінливості.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.3.3 наведено в публікаціях:

1. **Пірко ЯВ**, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабоконт АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Кравець О А, Алексеева АА, Хромих Н О, Лихолат ЮВ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у рослин *Ulmus pumila* L. в степовому придніпров'ї. Вісн. укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2018;16(1):28-34. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vutgis_2018_16_1_7 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

2. Kravets OA, **Pirko YaV**, Kalafat LO, Rabokon AM, Postovoirova AS, Bilonozhko Yu O, Privalikhin SN, Lykholat YuV & Blume YaB. Genetic and Reproductive State Assessment of *Ulmus pumila* and *U. suberosa* Invasive Populations in the Dnieper Steppe under Climate Change. Cytol. Genetics., 2020; 54(1): 1–9 DOI: 10.3103/S0095452720010090 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*)

4.4. Генетичне профілювання мікроводоростей за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну

Представники відділів *Chlorophyta*, *Ochrophyta* та *Euglenophyta* є невід'ємною складовою біорізноманіття різних екосистем. Багато видів зелених водоростей широко застосовуються для вирішення технічних, господарських та наукових задач людини [51, 446, 465, 468]. На сьогодні існує проблема ідентифікації різних видів мікроводоростей, в основі якої лежить поліфілетичне походження багатьох видів зелених водоростей та наявність видів-двійників. Морфологічні методи не дають змоги відрізнити зовнішньо ідентичних представників не лише різних видів, а й родів. Зазвичай їх диференціюють за відмінностями у репродуктивній фазі, або

тривалості клітинного циклу. Такі методи потребують довгострокових спостережень за живими клітинами водоростей, суттєвих знань їх морфології та порівняння значного об'єму інформації [51, 465]. Все частіше для з'ясування питань філогенетики та видоїдентифікації застосовують різноманітні молекулярно-генетичні маркери [375, 435, 446].

Для вирішення багатьох питань міжвидової та внутрішньовидової диференціації організмів в останні роки застосовують дослідження поліморфізму довжини інтронів різних генів [381]. Метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну вважається надійною та стабільно працюючою для різних видів вищих рослин системою молекулярно-генетичних маркерів [22]. Тож можна припустити, що дослідження поліморфізму інтронів генів β -тубуліну може стати надійним інструментом для генетичного профілювання різних таксонів зелених мікроводоростей [446].

Варто зазначити, що ТВР-маркерна система раніше використовувалася для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну виключно у вищих рослин. Проведений аналіз 10 штамів мікроводоростей з використанням ТВР-маркерів показав, що переважна більшість чітких та поліморфних смуг (ампліконів інтронів генів β -тубуліну) візуалізувалася в діапазоні 290–1200 п. н. (рис. 4.61). Окрім того, на електрофореграмі спостерігається поява нечітких смуг, характерних для ПЛР-продуктів неповної ампліфікації. В подальшому ці амплікони не аналізувалися [446]. Діапазон розмірів утворених фрагментів з інтронами генів β -тубуліну в цілому відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона з невеликими ділянками першого та другого екзонів [22, 446].

Для кожного зразку спостерігається утворення ДНК-профілю зі специфічним набором та розподілом ампліконів інтронів генів β -тубуліну з певними відмінностями. При цьому ТВР-профілі відрізнялися на різних таксономічних рівнях (міжродовому, міжвидовому та між окремими штамми). Зокрема, спостерігалася утворення ДНК-специфічних профілів,

що містили фрагменти інтронів генів β -тубуліну для кожного з п'яти родів мікроводоростей, а саме родів: *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Dunaliella*, родів *Tribonema* та *Euglena*. На міжвидовому рівні виявлений поліморфізм інтронів генів β -тубуліну у видів *A. acuminatus*, штам IBASU-A 245 та *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251 та штам IBASU-A 344). Також були проаналізовані різні види роду *Desmodesmus*. Встановлено, що *D. armatus*, штам IBASU-A 263 та *D. subspicatus*, штам IBASU-A 408 містили спільний амплікон розміром близько 620 п. н., хоча у *D. armatus*, (штам IBASU-A 338 - цей фрагмент відсутній). Для *Dunaliella salina*, штам IBASU-A 4 та *D. minuta* штам IBASU-A 40 показано утворення відмінних ТВР-профілів з лише одним спільним фрагментом довжиною близько 595 п. н. [447].

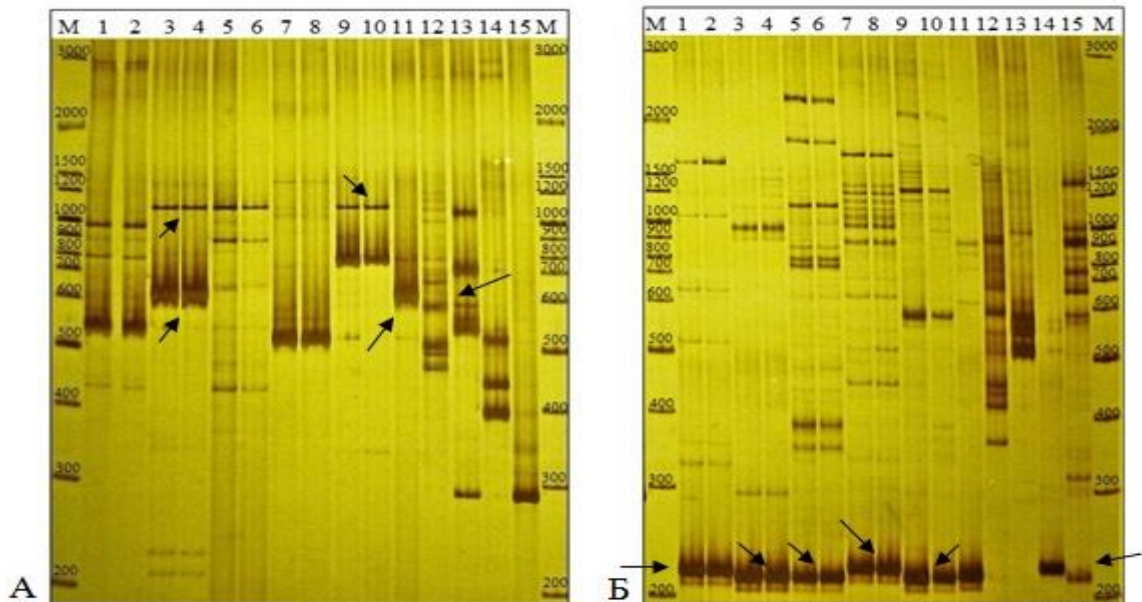


Рис. 4.61. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну водоростей (інтервал 200–3300 п. н.), отримана за допомогою (А) ТВР- та (Б) сТВР-методів: 1 – 15 (зверху) - номери зразків 1 – *Acutodesmus dimorphus*, штам IBASU-A 251, 2 – *Acutodesmus dimorphus*, штам IBASU-A 251, 3 – *Desmodesmus armatus*, штам IBASU-A 263, 4 – *Desmodesmus armatus*, штам IBASU-A 263, 5 – *Acutodesmus dimorphus*, штам IBASU-A 344, 6 – *Acutodesmus dimorphus*, штам IBASU-A 344, 7 – *Acutodesmus acuminatus*, штам IBASU-A 245, 8 – *Acutodesmus acuminatus*, штам IBASU-A 245, 9 – *Desmodesmus armatus*, штам IBASU-A 338, 10 – *Desmodesmus armatus*, штам IBASU-A 338, 11 – *Desmodesmus subspicatus*, штам IBASU-A 408, 12 – *Dunaliella minuta*, штам IBASU-A 40, 13 – *Dunaliella salina*, штам IBASU-A 4, 14 – *Tribonema ulotrichoides*, штам IBASU-A 520, 15 – *Euglena* sp., штам IBASU-A 498, М – ДНК-маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder [447].

З метою генетичного профілювання та диференціації мікроводоростей на рівні окремих штамів в межах одного виду проаналізовано по два штами *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251 - і штам IBASU-A 344) та *D. armatus* (штам IBASU-A 338). ТВР-аналіз дозволив виявити незначні відмінності в ДНК-профілях штамів. Два штами *A. dimorphus* містили унікальні амплікони інтронів генів β -тубуліну, а у штамів *D. armatus* виявлено певну кількість спільних фрагментів. Поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в межах досліджених штамів не було виявлено. Для кожної пари зразків одного штаму утворювалися ідентичні амплікони інтронів [447].

Дані фінгерпринтингу за першим інтроном були використані для кластерного аналізу методом UPGMA. З отриманої дендрограми (рис. 4.62) видно, що з одного боку, всі зразки з високою бутстреп підтримкою диференціюються один від одного, а з іншого – розподілилися на три кластери згідно їх таксономічної класифікації, при цьому в межах кожного кластеру зберігається генотипова приналежність [447].

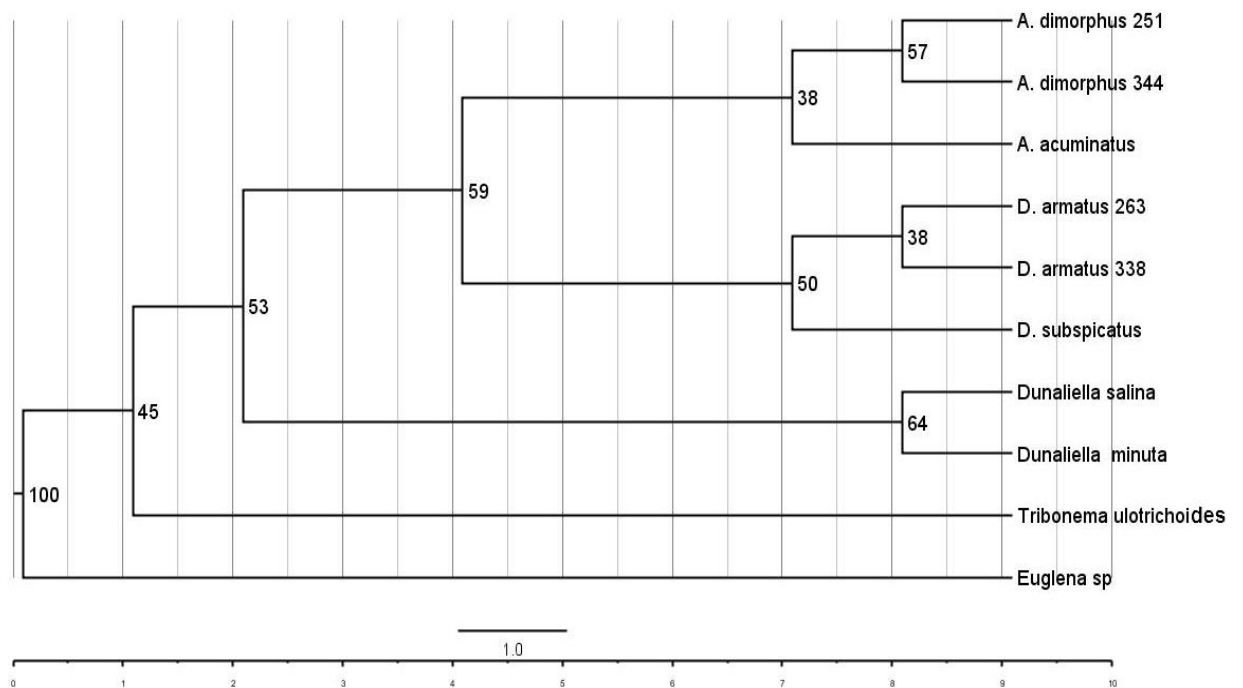


Рис. 4.62. UPGMA дендрограма, що базується на поліморфізмі довжини інтронів генів β -тубуліну у досліджених зразків мікроводоростей

В подальшому для цих же 10 штамів була здійснена варіація ТВР-аналізу, яка передбачає оцінку поліморфізму довжини другого інтрону генів β -тубуліну – сТВР метод [34]. Раніше сТВР підхід використовувався виключно для генотипування вищих рослин. Тож в цьому дослідженні вперше показані результати сТВР-аналізу у мікроводоростей. У кожному з проаналізованих з використанням сТВР-маркерів зразків утворювалися чіткі і відтворювані фрагменти другого інтрону генів β -тубуліну, які розташовувалися в діапазоні від 200 до 3000 п. н. [447] (рис. 4.61Б).

На міжродовому рівні для кожного з п'яти досліджуваних родів мікроводоростей показано утворення ДНК-профілів, які значно відрізнялися один від одного. Варто зазначити, що смуга поліморфних ампліконів, розташованих вище 200 п. н. є характерною для представників всіх проаналізованих родів. Виключенням є штами роду *Dunaliella*: *D. salina*, штам IBASU-A 4 та *D. minuta* штам IBASU-A 40, у яких ці фрагменти повністю відсутні [447].

На міжвидовому рівні виявлений поліморфізм ампліконів інтронів генів β -тубуліну у видів *A. acuminatus*, штам IBASU-A 245 та *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251 та штам IBASU-A 344). До того ж ДНК-профілі даних видів не містили спільних фрагментів інших інтронів генів β -тубуліну, окрім фрагментів довжиною близько 214 п. н. у зразків *A. dimorphus*, штам IBASU-A 251 та *A. acuminatus*, штам IBASU-A 245. сТВР аналіз різних видів роду *Desmodesmus*: *D. armatus* (штам IBASU-A 338 та штам IBASU-A 263) та *D. subspicatus*, штам IBASU-A 408, показав, що ДНК-профілі даних видів містили лише один спільний фрагмент інтронів генів β -тубуліну розміром близько 206 п. н. [447].

Для двох видів *Dunaliella salina*, штам IBASU-A 4 та *D. minuta* штам IBASU-A 40 показано утворення відмінних сТВР-профілів та відсутність спільних ампліконів другого інтрону генів β -тубуліну. Встановлено

утворення ідентичних ДНК-профілів та відсутність поліморфізму другого інтрону генів β -тубуліну у окремих штамів в межах досліджених видів [447].

Порівнюючи отримані результати з використанням двох споріднених підходів – ТВР та сТВР – можна зробити висновок, що обидві маркерні системи дозволяють якісно генотипувати різні зразки мікроводоростей. Кожна з використаних ДНК-маркерних систем дозволила отримати ряд чітких та відтворюваних фрагментів, що містили перший (для ТВР) та другий (для сТВР) інтрони генів β -тубуліну. Специфічні ТВР- та сТВР-профілі значно відрізнялися між собою за кількістю та розташуванням цільових ампліконів, однак дозволили чітко диференціювати генотипи мікроводоростей на різних таксономічних рівнях. Окрім того, обидві маркерні системи однозначно підтвердили однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму. Отримані результати в цілому свідчать про доцільність подальшого використання даних ДНК-маркерів для генотипування та аналізу різних таксонів водоростей [447].

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.4 наведено в статті:

Пірко ЯВ, Рабоконь АМ, Постовойтова АС, Білоножко ЮО, Калафат ЛО, Борисова ОВ, Царенко ПМ, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у мікроводоростей. Доповіді НАН України. 2019;(1): 93-99. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.093> (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).

РОЗДІЛ 5

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ α -ТУБУЛІНУ

Необхідною умовою для розробки та застосування різних видів ІЛР-маркерів є отримання попередньої інформації про послідовності нуклеотидів, які кодують цільові гени. Найпопулярнішими на сьогодні є ІЛР-маркерні системи, в основі яких лежить оцінка поліморфізму довжин інтронів генів [206, 339], зокрема, кодуючих ферменти електронно-транспортного ланцюга [99], та ключових білків цитоскелету клітини (β -тубуліну та актину) [22, 287, 282, 439].

Гени α -тубуліну також належать до мультигенної родини генів тубулінів. Добре дослідженими є гени α -тубуліну *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Їх 6 і вони кодують 4 ізотипи білка [93, 187, 449]. α -тубулін разом з β -тубуліном є дуже консервативними білками, які виконують важливі функції в еукаріотичній клітині, зокрема входять до складу мікротрубочок – основної складової цитоскелету [100]. Амінокислотні послідовності α -тубуліну проявляють високу консервативність і в кодуючих ділянках генів, що дозволяє розглядати можливість використання генів α -тубуліну для створення універсальної ІЛР-маркерної системи, яка могла б бути застосованою при проведенні молекулярно-генетичного аналізу генотипів різних вищих рослин.

З метою розроблення такої системи було здійснено аналіз екзон-інтронної структури генів α -тубуліну у геномі декількох видів рослин. Нами були використано 5 видів рослин, геноми яких на сьогодні є повністю секвенованими. Серед досліджуваних видів арабідопсис – *A. thaliana*, льон – *L. usitatissimum*, рис – *O. sativa*, картопля – *S. tuberosum* та помідор – *S. lycopersicum*.

На цей час в базі даних Gene Bank є 6 анотованих послідовностей α -тубуліну. Всі вони виявлені у геномі *A. thaliana* (P11139_TUBA1, B9DG7_TUBA2, Q56WH1_TUBA3, Q0WV25_TUBA4, B9DHO0_TUBA5, P29511_TUBA6) і були в використанні в нашому дослідженні. Інформація про структуру генів α -тубуліну, закодованих в геномах *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, на сьогодні є не відомою. В якості матриці при пошуку генів α -тубуліну в геномах досліджуваних видів рослин використовували нуклеотидну послідовність гена α -тубуліну *A. thaliana* TUBA1. За результатами пошуку в базі даних Phytozome v. 11 у геномі *O. sativa* виявлено 4 послідовності (Os07g0574800; Os07g0574800, Os03g11970 та Os03g51600.), які, ймовірно, кодують α -тубулін. При цьому LOC_Os07g0574800 та LOC_Os07g0574800, були визначені як гени TUBA1 та TUBA2 відповідно. В геномі *L. usitatissimum* ідентифіковано 6 нуклеотидних послідовностей генів α -тубуліну (Lus10005705, Lus10020281, Lus10013765, Lus10035422, Lus10031032, Lus10039169); 4 послідовності у *S. tuberosum* (PGSC0003DMG400011537, PGSC0003 DMG400030627, PGSC0003 DMG4000 01320, PGSC0003 DMG400008752) та чотири – у *S. lycopersicum* (Solyc08g006890, Solyc04g77020, Solyc02g87880, Solyc02g91870) [449].

В результаті проведеного аналізу екзон-інтронної структури генів TUBA1 та TUBA5 у арабідопсиса було виявлено, що вони складаються з трьох п'яти екзонів та чотирьох інтронів. В структурі генів TUBA2 та TUBA3 – ідентифікується по чотири екзони та три інтрони. Найбільш значні відмінності від інших генів α -тубуліну мали гени TUBA4 та TUBA6. Вони в своєму складі мають лише три екзони та два інтрони (TUBA4), а у випадку TUBA6 – два екзони та один інтрон. Розмір екзонів коливається в межах 93–1259 п. н., а інтронів — 77–512 п. н. [449].

В екзон-інтронній структурі генів α -тубуліну у *O. sativa* також виявлено особливості. Так було показано, що гени Os07g38730 та Os03g11970 містять по п'ять екзонів і чотири інтрони, а Os11g14220 та

Os03g51600 мають лише чотири екзони та три інтрони. Довжина екзонів становить 93–657 п. н., тоді як інтронів – 81–1081 п. н. П'ять екзонів та чотири інтрони генів α -тубуліну заковані в геномі *L. usitatissimum*. Однак ген Lus10035422 є виключенням, оскільки має в своєму складі чотири екзони та три інтрони. Розмір екзонів варіює в межах від 93 до 654 п. н., інтронів – від 77 до 456 п. н.[449]. Варто зазначити, що дані щодо аналізу генів α -тубуліну *L. usitatissimum* були нещодавно опубліковані [285]. Нами було встановлено, що всі гени α -тубуліну у *S. tuberosum* містять по чотири екзони та три інтрони. Кількість пар нуклеотидів екзонних ділянок генів α -тубуліну *S. tuberosum* складає 93–657 п. н., а розмір інтронів – 77–4459 п. н. У геномі *S. lycopersicum* всі гени, які кодують α -тубулін мають по чотири екзони та три інтрони. Розмір екзонів генів α -тубуліну складає 93–657 п. н., а інтронів – 77–1136 п. н. [285, 449]. Детальні дані щодо екзон-інтронного аналізу всіх генів α -тубуліну, закованих у геномах рослин залучених до дослідження (*A. thaliana*, *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*) наведено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Екзон-інтронна структура генів, що кодують α -тубулін

Ген	I екзон	I інтрон	II екзон	II інтрон	III екзон	III інтрон	IV екзон	IV інтрон	V екзон
<i>Arabidopsis thaliana</i>									
TUBA1	113	160	215	512	200	72	509	86	316
TUBA2	93	462	235	93	371	85	654	-	-
TUBA3	212	82	215	77	200	111	497	-	-
TUBA4	93	409	606	83	654	-	-	-	-
TUBA5	113	83	215	77	200	111	509	91	316
TUBA6	93	198	1259	-	-	-	-	-	-
<i>Oryza sativa</i>									
Os07g38730	113	910	215	81	200	557	509	119	316
Os11g14220	93	892	235	86	371	112	657	-	-
Os03g11970	113	436	215	443	200	1081	509	92	313
Os03g51600	93	946	235	86	371	108	657	-	-

<i>Linum usitatissimum</i>									
Lus10005705	114	452	215	77	200	82	509	109	319
Lus10020281	113	401	215	81	200	82	509	107	319
Lus10013765	113	335	215	86	200	204	509	129	316
Lus10035422	93	456	235	82	371	104	654	-	-
Lus10031032	93	458	235	93	371	106	654	-	-
Lus10039169	113	300	228	86	200	207	509	164	316
<i>Solanum tuberosum</i>									
PGSC0003DM G400011537	93	4459	235	77	371	89	657	-	-
PGSC0003DM G400030627	93	151	235	91	371	160	657	-	-
PGSC0003DM G400001320	93	87	235	96	371	89	654	-	-
PGSC0003DM G400008752	93	1266	235	79	371	78	654	-	-
<i>Solanum lycopersicum</i>									
Solyc08g006890	93	1136	235	79	371	77	657	-	-
Solyc04g77020	93	950	235	88	371	90	655	-	-
Solyc02g87880	93	102	235	91	371	94	654	-	-
Solyc02g91870	94	279	235	95	371	157	657	-	-

Представлені результати аналізу екзон-інтронної структури генів α -тубуліну, закодованих в геномах *A. thaliana*, *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, в цілому продемонстрували, що більшість генів мають у своєму складі по 4–5 екзонів, а також 3–4 інтрони. Нами було виявлено декілька винятки, зокрема ген α -тубуліну у *A. thaliana* (TUBA6), який містить лише 2 екзони та 1 інтрон, а також ген TUBA4 у цього ж виду рослин – 3 екзони та 2 інтрони [449]. Найімовірніше, така відмінність у структурі цих генів може бути зумовлена із екзогенізацією інтронних ділянок. Наслідком такого процесу може змінюватися зчитування гену, і тоді інтрон,

разом із розташованими поряд екзонами, розпізнається як одна суцільна екзонна ділянка.

Подібне явище екзогенізації раніше було виявлено та описано і для інших генів білків цитоскелету рослин, зокрема для генів актину та β -тубуліну [177, 285]. Крім того, простежується певна системність у кількості пар нуклеотидів в складі екзонів, тоді як довжини інтронних ділянок у межах одного виду може значно відрізнятись. Що в свою чергу свідчить про певну консервативність кодуєчих ділянок генів α -тубуліну та гіперваріабельність інтронних ділянок [449].

Отже розглянувши екзон-інтронну структуру генів α -тубуліну у досліджуваних видів вищих рослин, ми можемо передбачити перспективність використання інтронів цих генів для розроблення нової ПЛР-маркерної системи. Найбільш ефективно це може спрацювати при використанні I-го інтрону. З метою створення такої ДНК-маркерної системи, яка б дозволила оцінити поліморфізм довжини інтронів генів α -тубуліну, на підставі попередньо здійсненого вирівнювання була розроблена пара вироджених праймерів для проведення ПЛР [449]. Беручи до уваги той факт, що ген TUBA6 *A. thaliana* містить лише I інтрон, вироджені праймери були підібрані таким чином, щоб оцінити поліморфізм довжини I інтрону всіх відомих генів α -тубуліну. Прямий та зворотний праймери (TUA_1in_F: 5' – TGG GAR CTN TAY TGY STYGA – 3'; TUA_1in_R: 5' – TCR CTR AAR AAN GTR TTR AAN GMA TC – 3') відпалюються на консервативних ділянках I та II екзонів і дозволяють проводити ампліфікацію ділянки гена α -тубуліну, яка розташована між праймерами та містить I інтрон (рис. 5.1).

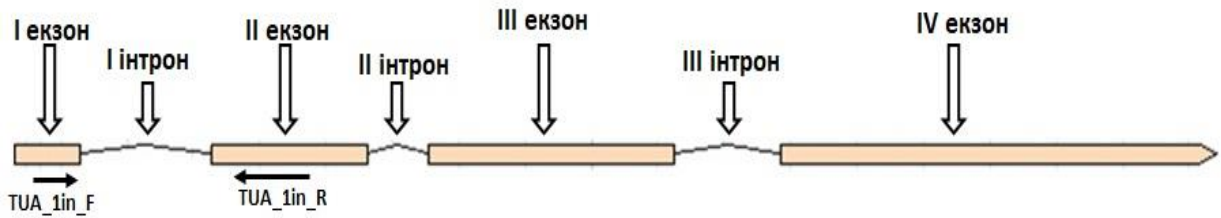


Рис. 5.1. Схема гена α -тубуліну [449].

Зважаючи на гіперваріабільність інтронних ділянок генів α -тубуліну, можна передбачити поліморфізм фрагментів утворюваних під час ПЛР. На рис. 5.2 представлені результати аналізу *A. thaliana*, різних сортів *L. usitatissimum* та *O. sativa* з використанням розробленої ДНК-маркерної системи [449].

На специфічному ДНК-профілі *A. thaliana* дикого типу, в якому фрагменти з інтронами α -тубуліну варіюють в діапазоні довжин 340–1800 п. н (див. рис.5.2, зразку 1). Найбільш чіткі амплікони інтронів мають розміри близько 340 та 607 п. н. Утворення низки менш чітких фрагментів спостерігається у діапазоні 500–600 п. н. і двох ампліконів, що мали розміри приблизно 1371 та 1666 п. н. Природа появи останніх двох, досить великих фрагментів, у ДНК-профілі *A. thaliana* потребує додаткового дослідження та детального вивчення, оскільки такі амплікони інтронів не були передбачені попереднім біоінформатичним аналізом. Результати аналізу поліморфізму довжин інтронів генів α -тубуліну у різних сортів *L. usitatissimum* представлено на рис. 5.2 (зразки 2–6). Як можна помітити утворені фрагменти з інтронами розподіляються в діапазоні 400–2000 п. н. Для всіх проаналізованих сортів *L. usitatissimum* показана наявність спільних ампліконів інтронів α -тубуліну, що свідчить про утворення видоспецифічних ДНК-профілів. Більшість фрагментів інтронів *L. usitatissimum* є мономорфними. Слід зазначити, що сорт 'Чарівний' (рис. 5.2, зразок 2) містить амплікони розміром 754 та 1764 п. н. (помічені стрілками), що відрізняє ДНК-профіль цього сорту від інших. Також сорт 'Сіверський' (рис. 5.2, зразок 3) містить унікальний амплікон довжиною близько 336 п. н.

(помічений стрілкою). Ми припускаємо, що при умові розширення вибірки досліджуваних сортів *L. usitatissimum*, можна буде виявити більшу кількість поліморфних фрагментів з інтронами генів α -тубуліну [449].

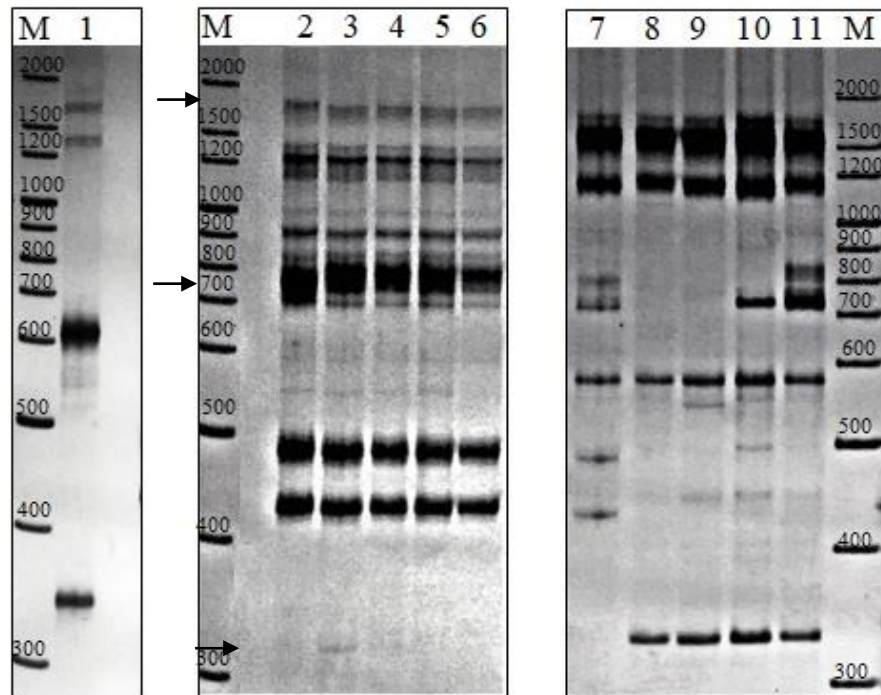


Рис. 5.2. Електрофореграма з продуктами ПЛР, що утворюються під час ампліфікації ДНК з праймерами до I-го інтрону генів α -тубуліну у *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum* та *Oryza sativa*. 1 – *Arabidopsis thaliana* – дикий тип, 2–6 – сорти *Linum usitatissimum*, 2 – 'Чарівний', 3 – 'Сіверський', 4 – 'Каменярь', 5 – 'Журавка', 6 – 'Іванівський', 7–11 – сорти *Oryza sativa*, 7 – 'Преміум', 8 – 'Консул', 9 – 'Віконт', 10 – 'YIP-4970', 11 – 'YIP-4558'. М – маркер молекулярної довжини O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™) [449]

На рис. 5.2 (див. зразки 7–11) приведені результати аналізу поліморфізму довжини I інтрону генів α -тубуліну в різних сортах *O. sativa*. У процесі проведення ПЛР-аналізу амплікони інтронів генів α -тубуліну *O. sativa* розподілились у досить широкому діапазоні від 340 до 1800 п. н. Характерним для всіх проаналізованих зразків *O. sativa* є те, що всі утворені ДНК-профілі є унікальними за рахунок розподілу та кількості візуалізованих

фрагментів інтронів. Мономорфними є зони з довжиною фрагментів близько 590, 1177, 1539 та 1704 п. н. Інша частина утворених фрагментів виявилася різномірною. Зокрема у сорту 'Преміум' (рис. 5.2, зразок 7) наявні унікальні амплікони з розміром фрагментів близько 423, 425, 487 і 814 п. н., проте не відтворюється фрагмент 343 п. н. Таким чином особливості отриманого ДНК-профілю сорту 'Преміум' відрізняють його від інших зразків у вибірці. Загалом ДНК-маркери, засновані на виявленні поліморфізму довжини I інтрону генів α -тубуліну. З їх допомогою вдалося ефективно генотипувати різні сорти *O. sativa* та продемонструвати значну кількість поліморфних ампліконів інтронів [449].

На рис. 5.3 представлені результати аналізу поліморфізму довжини I інтрону генів α -тубуліну в сортів *S. lycopersicum* та *S. tuberosum*. ДНК-профілі п'яти сортів *S. lycopersicum* представлені на зразках 1–5 (рис. 5.3). Утворені фрагменти інтронів генів α -тубуліну розподілилися в широкому діапазоні довжин, від 200 до 2000 п. н. Більшість зон розподілу ампліконів є мономорфними, однак спостерігається поява поліморфних фрагментів, переважно у верхній частині електрофореграми від 1000 до 2000 п. н. Слід зазначити, що сорт 'Американський синій' (рис. 5.3, зразок 5) містить декілька унікальних ампліконів з довжинами близько 205, 268 та 396 п. н., що значно відрізняє цей сорт від інших залучених у дослідження. Загалом кожен з проаналізованих сортів, що має унікальний ДНК-профіль, відрізняється один від одного за рахунок кількості та розподілу ампліконів інтронів генів α -тубуліну [449].

Також на рис. 5.3 продемонстровані ДНК-профілі інтронів 4 сортів (зразки 4–9) *S. tuberosum*, проаналізовані з використанням ДНК-маркерів, які виявляють поліморфізм довжини I інтрону генів α -тубуліну.

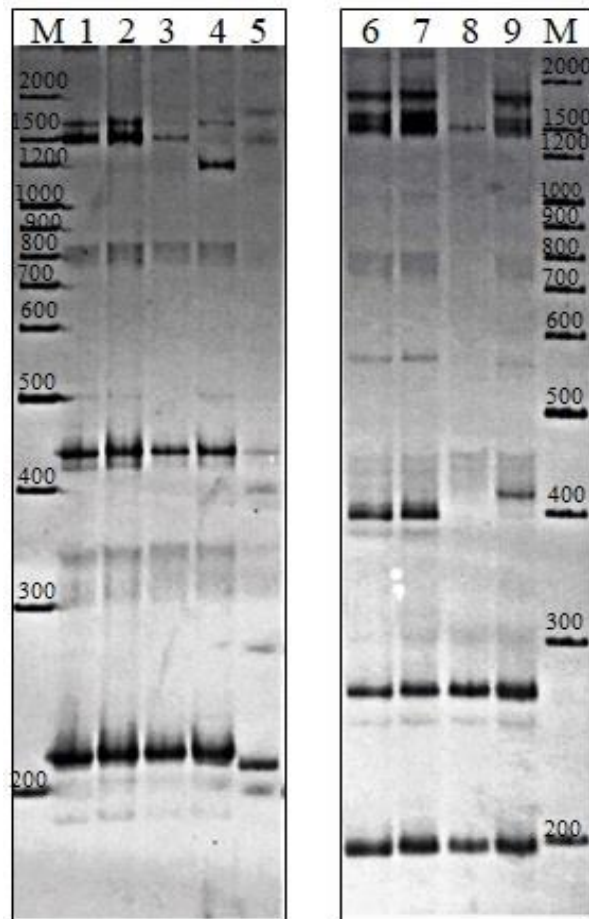


Рис.5.3. Електрофореграма продуктів ПЛР ДНК рослин з праймерами до I інтрону генів α -тубуліну у *S. lycopersicum* та *S. tuberosum*. 1–5 – сорти *S. lycopersicum*, 1 – 'Money Maker', 2 – 'Перлина', 3 – 'Волгоградський', 4 – 'Балконне чудо золоте', 5 – 'Американський синій', 6–9 – сорти *S. tuberosum*, 6 – 'Зарево', 7 – 'Левада', 8 – 'Світанок', 9 – 'Вернісаж'. М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™) [449]

Утворені амплікони інтронів візуалізувалися в діапазоні 150–2000 п. н. Більшість фрагментів є мономорфними, хоча були присутні й поліморфні фрагменти. У зразка 9 сорту 'Вернісаж' наявний фрагмент 410 п. н., що відрізняє ДНК-профіль цього сорту від інших. Нами було відмічено, що сорт 'Світанок' має характерну ознаку – відсутність декількох ампліконів у ДНК-профілі. Загалом, за допомогою ДНК-маркерів, що оцінюють поліморфізм довжин інтронів генів α -тубуліну, вдалося диференціювати генотипи різних сортів *S. tuberosum* [449].

Отже, результати проведеного аналізу свідчать про те, що розроблений підхід дозволяє генотипувати різні рослини та ідентифікувати поліморфізм довжини інтронів генів α -тубуліну на міжсорттовому та міжвидовому рівнях. Слід зазначити, що ряд утворених фрагментів ДНК з великою довжиною потребує додаткових досліджень, оскільки вони не були передбачені попереднім біоінформатичним аналізом і за своєю природою можуть бути гетеродимерами. В цілому запропонована ІLP-маркерна система, що дозволяє оцінити поліморфізм довжини I інтрону генів α -тубуліну у різних видів рослин є універсальною й дає можливість проводити генотипування та диференціацію різних видів (сортів) вищих рослин, поєднуючи в собі надійність, швидкість отримання вихідних даних і простоту їхнього аналізу. Вона може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу вищих рослин як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами [449].

Результати експериментальних досліджень розділу 5 наведено в наступних публікаціях:

1. Pydiura N, **Pirko Ya**, Galinousky D, Postovoitova A, Yemets A, Kilchevsky A, Blume Ya. Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterisation of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). Cell Biol. Intl. 2019; 43: 1010-1018. DOI: 10.1002/cbin.11001. *(Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).*

2. **Пірко ЯВ**, Постовойтова АС, Рабоконт АМ, Калафат ЛО, Приваліхін СМ, Білоножко ЮО, Пірко НМ, Блюм ЯБ. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну як метод аналізу генетичної диференціації рослин. Український ботанічний журнал. 2018; 75(6). 576-584. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.06.576> *(Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті)*

РОЗДІЛ 6

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ АНАЛІЗУ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ γ - ТУБУЛІНУ

До складу мікротрубочок клітини крім α - та β -тубуліну входить γ -тубулін, як відомо він є критично необхідним для їх нуклеації. У філогенетично різних живих організмів амінокислотна послідовність γ -тубуліну є високонсервативною [260, 285]. Отже розроблення нового варіанта ПЛР-методу, що базувався б на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну, представляє неабиякий інтерес для молекулярних біологів, генетиків та селекціонерів [448].

Для цього було проведено пошук консервативних ділянок екзонів генів γ -тубуліну, що оточують інтрони, для подальшого підбору до них праймерів таким чином, щоб під час ПЛР можна було отримати копії послідовностей інтронів. З використанням послідовностей генів γ -тубулінів таких видів рослин, як *Zea mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *Arabidopsis thaliana* (AT3G61650) та *Linum usitatissimum* (Lus10010986.g, Lus10007851.g) нами було підібрано праймери. Саме для цих рослин екзон-інтронна структура гена γ -тубуліну є доступною в базі даних Phytozome.v12 (www.phytozome.net). Після вирівнювання послідовностей генів з використанням алгоритму MUSCLE та програмного забезпечення UniproUGENE [254] було обрано найбільш консервативні ділянки екзонів, до яких було підібрано пару вироджених праймерів [448]: F: 5'-GAYGTBTTTCTTTTACCARGCKGA-3'; R: 5'-GAGTTGTARGGYTGG-ACRAC-3' (рис 6.1).

Було показано, що у складі ампліконів інтронів γ -тубуліну продукти ампліфікації *Arabidopsis thaliana* містять повну послідовність II-го інтрону, продукт *Zea mays* – II-го інтрону, III-го екзону та III-го інтрону, продукт *Linum usitatissimum* – I-го інтрону, II-го екзону та II-го інтрону (рис. 6.2).

У діапазоні довжин від 500 до 900 п.н. для льону виявлена значно більша кількість фрагментів (рис. 6.2,а). Тому можна зробити припущення, що в геномі льону може міститися більша кількість генів γ -тубуліну, ніж у арабідопсису. Важливо, що сорт ‘Глобус’ у випадку *Linum usitatissimum* найбільше за профілем інтронів виокремлюється серед інших. Однак даний сорт льону слабо диференціюється від інших зразків у процесі дослідження з використанням TBP- та SSR-аналізу, що було показано нам раніше [287]. Сорти ‘Міандр’ та ‘Каменярь’ також значно різняться за спектрами фрагментів ДНК, як і у випадку використання TBP та SSR-маркерів [448].

Оскільки розроблені нами праймери є виродженими, то, є досить велика імовірність, що вони працюватимуть і на інших видах рослин. У зв’язку з цим розроблену пару праймерів було застосовано для дослідження поліморфізму інтронів генів γ -тубуліну в організмів, для яких ще невідома екзон-інтронна структура цих генів (див. рис. 6.2, б). При дослідженні трьох сільськогосподарських культур — картоплі, рису та пшениці було виявлено, що для *S. tuberosum* характерне утворення одного та двох фрагментів ДНК: приблизно 800 і 910 п.н. (сорт ‘Левада’) та лише 910 п.н. (сорт ‘Світанок’). У всіх досліджених сортів *O. sativa* виявлено чіткий фрагмент ДНК завдовжки приблизно 895 п.н. та два менш яскравих — 505 п.н. (сорт ‘Преміум’) і 560 п.н. (сорт ‘Консул’). Результати електрофоретичного аналізу зразків *T. aestivum* свідчать про наявність фрагментів ДНК у діапазоні від 500 до 1000 п.н. [448].

Отже, запропонований нами метод, що базується на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну, дає змогу однозначно розрізняти різні види рослин і навіть досліджувати їх генетичний поліморфізм на рівні генотипів (сортів) на основі отриманих електрофоретичних профілів. Розроблена пара вироджених праймерів може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу рослин без наявності попередньої інформації про екзон-інтронну структуру їх генів γ -тубуліну. Крім того, надалі можна буде додатково доповнити метод новими варіаціями,

наприклад, підвищити виродженість праймерів, залучивши до біоінформатичного аналізу більшу кількість послідовностей гена γ -тубуліну, або, навпаки, розробити специфічні праймери для конкретного виду рослин, підвищивши за рахунок цього чутливість методу. Таким чином, доведено, що запропонований метод є простим, надійним молекулярно-генетичним інструментом, який може бути ефективно застосований для фінгерпринтингу та молекулярно-генетичного аналізу різних видів та сортів рослин як у поєднанні з іншими маркерними системами, так і самостійно [448].

Результати експериментальних досліджень розділу 6 наведено в публікаціях:

1. **Пірко ЯВ**, Буй ДД, Постовойтова АС, Рабокоть АМ, Калафат ЛО, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів γ -тубуліну як новий підхід до генотипування рослин. Доповіді НАН України. 2018;(12): 87-92. DOI:10.15407/dopovidi2018.12.087. *(Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті)*

2. **Pirko Ya.**, Buy D., Rabokon A., Postovoitova A., Kalafat L., Blume Ya. Genomic fingerprinting of *Linum usitatissimum* L. cultivars using intron length polymorphism of γ -tubulin. Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health And Quality of Human and Bees Life, (11th–13th September 2019, Nitra, Slovakia), P.124.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В рамках виконання дисертаційного дослідження на підставі аналізу екзон-інтронної структури генів, що кодують цитоскелетні білки (α -, β -, γ -тубулін, а також актин) у рослин, розроблено та впроваджено молекулярно-генетичні маркери, які ґрунтуються на вивченні поліморфізму інтронів, для подальшого застосування у молекулярно-генетичних дослідженнях. За допомогою розроблених маркерів здійснено генотипування (генетичне профілювання) та оцінено генетичну диференціацію окремих популяцій, сортів та видів рослин. Вперше на підставі результатів аналізу поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину проведено генетичне профілювання деяких видів рослин, зокрема, господарсько цінних: льону-довгунця, рису посівного, пшениці, ячміню, томату та картоплі. Також завдяки оцінці поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину досліджено генетичну мінливість та диференціацію природніх популяцій егілопсів (*A. biuncialis*) з Кримського півострову. Оцінений міжсортівий та внутрішньосортівий поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну та актину у різних сортів льону-довгунця з використанням розроблених універсальних ILP-маркерів. Показана висока ефективність застосування ILP – маркерів, що базуються на оцінці поліморфізму інтронів генів цитоскелетних білків у порівнянні з SSR-маркерами на прикладі аналізу родів *Linum* L., *Quercus* L., *Ulmus* L. Продемонстровано зручність та надійність застосування ТВР-аналізу для молекулярно-генетичного маркування трав'янистих та деревних рослин, а також для вивчення окремих аспектів внутрішньовидового поліморфізму господарчо цінних, садовопаркових та лісоутворюючих порід. Вперше за допомогою ТВР-методу ідентифіковано унікальні патерни для 20 деревних видів рослин та створено молекулярні профілі кожного з цих видів. Також вперше отримано

специфічні ТВР-профілі мікрowodоростей, які дозволили чітко диференціювати генотипи на різних таксономічних рівнях, підтвердити однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму.

Для пошуку гомологічних послідовностей було відібрано декілька видів вищих рослин, геноми яких повністю сіквеновані, але до кінця не анотовані. Об'єктами дослідження насамперед були геном арабідопсіса (*A. thaliana*), оскільки на сьогодні він є розшифрованим та найбільш вивченим, а також геноми рису посівного (*O. sativa*), льону-довгунця (*L. usitatissimum*), картоплі (*S. tuberosum*) та томату (*S. lycopersicum*).

Встановлено, що проаналізовані анотовані послідовності генів β -тубуліну *A. thaliana* містять по два інтрони та по три екзони, довжина інтронів варіює в доволі широких межах – від 78 до 1019 п. н., в той же час варіювання розмірів екзонів виявилось доволі обмеженим: перший екзон варіював в межах 393-397 п. н., розмір другого екзону склало – 270 п.н., а розмір третього екзону варіював в межах 671-689 п.н.

На основі інформації, представленої в базі даних Phytozome, проведено аналіз екзон-інтронної структури генів β -тубуліну в геномах *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. У переважній більшості випадків геноми рослин містили два інтрони та три екзони. Виключення хіба що склав *S. lycopersicum*, в генах β -тубуліну якого було встановлено наявність третього інтрону та четвертого екзону (гени Solyc10g085020, Solyc06g005910 та Solyc06g076640). Загалом проведений екзон-інтронний аналіз відібраних гомологів генів β -тубуліну продемонстрував консервативність кількісного складу екзонів генів, оскільки перший екзон в переважній більшості генів містив 394 п. н., другий – 270 п. н., третій – близько 680 п. н. Одночасно жодної консервативності в складі інтронів генів β -тубуліну виявлено не було.

В результаті проведеного екзон-інтронного аналізу анотованих послідовностей генів α -тубуліну *A. thaliana* та відібраних гомологів даних генів в геномах чотирьох видів вищих рослин (*O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S.*

tuberosum та *S. lycopersicum*), було встановлено, що послідовності мають відносно схожу екзон-інтронну структуру. Кількість інтронів складає переважно 3 - 4, а екзонів – 4 - 5. Окрім того за даними, представленими в таблицях, очевидно, що в кількісному складі екзонів спостерігається певна системність, що вказує на їх консервативність. В той же час, інтрони мають різну кількість нуклеотидів, яка варіює в широких межах, та жодної системності не спостерігається.

Зважаючи на обмежену кількість даних щодо складу та кількості генів γ -тубуліну в геномах вищих видів рослин було проаналізовано послідовності генів γ -тубулінів таких видів, як *Zea mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *A. thaliana* (AT3G61650), *L. usitatissimum* (Lus10010986, Lus10007851), для яких екзон-інтронна структура гена γ -тубуліну є доступною в базі даних Phytozome.v12. Всього було проаналізовано 7 послідовностей (4 для кукурудзи, 2 для льону, 1 для арабідопсису). В цілому гени γ -тубулінів склалися з 10 - 11 екзонів (по 10 екзонів у арабідопсису та льону і 11 - у кукурудзи) та 9 – 10 інтронів.

В подальшому був проведений біоінформатичний пошук та аналіз екзон інтронної структури генів актину вищих видів рослин. У переважній більшості випадків гени актину мали три інтрони та чотири екзони. Виключення складають послідовності: *act 2*, LOC_Os11g06390, Lus10021057, Lus10004169, PGSC0003DMG400000439, PGSC0003DMG400029121, PGSC0003DMG400008619, PGSC0003DMG400008618, Solyc00g017210, Solyc11g065990.

В цілому за результатами проведеного аналізу екзон-інтронної структури анотованих послідовностей генів актину, α -, β - та γ -тубуліну *A. thaliana* та відібраних гомологів цих генів в геномах інших видів вищих рослин було встановлено, що послідовності мають схожу екзон-інтронну структуру. Кількість інтронів для генів актину складає переважно 3-4, для генів β -тубуліну - переважно по 2 інтрони, α -тубуліну – 3-4, а для γ -тубуліну – 9-10. Окрім того за даними, представленими в геномних базах даних,

інтрони мають різну кількість нуклеотидів і варіюють в доволі широких межах. Отже, отриманні дані вказують на те, що в геномах рослинних організмів саме за рахунок складу та довжин інтронів підвищується варіабельність нуклеотидних послідовностей генів як в межах одного виду, так і при міжвидовому порівнянні.

На наступному етапі роботи був проведений пошук консенсусних послідовностей генів, що кодують білки цитоскелету клітини, та розроблено олігонуклеотидні праймери (геноспецифічні, видоспецифічні та універсальні) для дослідження поліморфізму інтронів.

За умов генетичного профілювання рослин за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину. Було продемонстровано диференціюючу здатність ТВР-методу на сортах української селекції роду *Eleusine*. Проаналізовано 2 сорти ('Тропіканка' та 'Євгенія'), два соматоклональних варіанти (SE-1, SE-4), а також 2 генотипи (CAL 4A-21, CAL 4A-1) *E. coracana* та 1 дику (природну) популяцію *E. indica*. Результати електрофоретичного аналізу свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються фрагменти довжиною від 370 до 4440 п.н. Відмінність між двома видами полягає в тому, що у *E. coracana* спостерігаються смуги, які відсутні у *E. Indica*. Найбільші відмінності від інших рослин мав зразок *E. indica* (природна популяція) – у нього відсутній цілий ряд ампліконів, характерних для виду *E. indica*, в той же час виявлені унікальні фрагменти, характерні тільки для цієї популяції. Також було встановлено, що частина ампліконів з інтронами β -тубуліну є однаковими для всіх зразків, імовірно через те, що вони виявилися в цілому специфічними для роду *Eleusine*. Відмінності були легко помітні як між різними видами, так і між сортами в межах одного виду. Встановлено, що для диференціації видів роду *Eleusine* достатньо використання лише I-го інтрону гена β -тубуліну.

Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну також був використаний для генотипування *Ae. biuncialis* Vis. В результаті проведеного

ТВР-, сТВР та hТВР-аналізу було чітко диференційовано кримські популяції *Ae. biuncialis* між собою. В цілому отримані результати свідчать про те, що за допомогою стандартного ТВР-аналізу можна досить чітко диференціювати популяції *Ae. biuncialis*. За сТВР- та hТВР-профілями для кожного дослідженого зразку виявився свій специфічний набір смуг. Це означає, що за набором поліморфних фрагментів ДНК кожен зразок виявився унікальним і відрізнявся хоча б однією смугою від інших зразків. Загалом всі зразки *Ae. biuncialis* за сТВР- та hТВР-профілями вдалося диференціювати на три великі групи. Першу групу утворюють NK_4N2, NK_B-1 та NK_6-2. Другу – формують зразки NK_02, NK_1-I та NK_MMB-1. В третю – увійшли всі інші, проте вони добре диференціюються один від одного. В цілому характер кластеризації досліджених зразків *Ae. biuncialis* з використанням різних типів ТВР-маркерів дещо відрізняється, хоча групи зразків, що мають найбільшу бутстреп-підтримку, зберігаються.

Також генетичну різноманітність природних популяцій *Aegilops biuncialis* вивчали за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів актину. ДНК-профілі зразків містили фрагменти з інтронами генів актину в межах від 600 до 2000 п. н. Найбільша кількість ампліконів була в діапазоні від 600 п. н. до 1000 п. н. Встановлено, що кожен з проаналізованих зразків *Ae. biuncialis* має унікальний алельний фенотип. Загалом, виявлено 14 алельних фенотипів, що характеризує вибірку *Ae. biuncialis* як високо гетерогенну та генетично-неоднорідну. В той же час кластеризація зразків за поліморфізмом інтронів генів актину не показала однозначної диференціації на групи. Більше того, характер кластеризації відрізняється від того, що було отримано під час ТВР-аналізу. В цілому метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину продемонстрував здатність генотипувати природні популяції *A. biuncialis*. Вдалося ідентифікувати велику кількість поліморфних зон, що дозволило оцінити ДНК-профілі кожної з популяцій. Отже ДНК-маркери, що оцінюють поліморфізм довжини інтронів генів актину, виявилися придатними для генотипування природних популяцій *A. biuncialis* і можуть бути використані

у подальшому молекулярно-генетичному аналізі й інших злакових культур. В той же час, якщо порівнювати його з ТВР-аналізом, то поліморфізм інтронів генів актину виявився гіршим інструментом щодо диференціації природних популяцій егілопсів, тому може бути рекомендований як додатковий метод аналізу.

Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну був застосований для генетичного профілювання острівних популяцій *Deschampsia antarctica* E. Desv. *D. antarctica* є одним з двох видів судинних рослин Антарктики. Ця рослина зростає в екстремальних умовах довкілля і змушена адаптуватися як до локальної мозаїки мікрокліматів, так і до глобальних екологічних змін. Зростання за таких умов здатне зумовити появу змін у геномі, які можуть проявлятися на молекулярно-генетичному рівні.

Оцінка поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну у 37 разків з усіх восьми досліджуваних популяцій виявила 12 чітких та відтворюваних фрагментів, що варіювали в межах 295–1300 п.н. Фрагмент розміром приблизно 295 п.н. був наявний практично у всіх відібраних зразках, хоча в деяких з них він не завжди проявлявся, наприклад, в зразках з оазису Томас і півострова Філдес (острів Кінг Джордж), а також острова Роберта. Цей фрагмент 295 п.н. відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона гена β -тубуліну з короткими послідовностями довколишніх екзонів [36]. Фрагмент 310 п.н. чітко візуалізувався в зразках № 6 (острів Леоні), №12 (острів Плено), №13, №17 (оазис Расмуссен), №23 (оазис Томас) і № 36 (острів Роберт). А фрагмент довжиною 300 п.н. виявлений у 3 з 5 зразків з точки Гамаж і в 1 з 4 зразків з острова Плено.

В результаті проведених досліджень не вдалося встановити значних відмінностей у зразках з 8 різних місцезростань *D. antarctica* за використання h-ТВР, c-ТВР та c-ТВР із специфічними власно розробленими праймерами. У всіх досліджених зразків спостерігаються майже однакові (в межах методу) набори ампліконів. В той же час було виявлено внутрішньопопуляційний поліморфізм за I-им інтроном генів β -тубуліну. Отримані результати можуть

вказувати на низький рівень генетичного поліморфізму цього виду в дослідженому регіоні, що підтверджує дані, одержані з використанням інших типів ПЛР-маркерів [55, 376]. В цілому, результати свідчать про те, що ТВР-аналіз може бути корисним для фінгерпринтингу різних популяцій *D. antarctica*.

Здійснено генотипування сортів пшениці, ячменю та рису за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину. Аналізували 7 сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) вітчизняної селекції та 30 сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.). Результати електрофоретичного аналізу ампліконів інтронів генів β -тубуліну свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються фрагменти розміром приблизно від 94 п. н. до 3000 п. н. – для пшениці, та від 97 п. н. до 1500 п. н. – для ячменю. При цьому більша частина чітких та поліморфних смуг у ячменю візуалізується в діапазоні 300–1500 п. н., а у пшениці – 300–3000 п. н. В цілому отримані результати продемонстрували досить високу диференціюючу спроможність ТВР-методу для оцінки генетичного поліморфізму рослин та можливість використання його для фінгерпринт-аналізу сортів пшениці та ячменю.

Генотипування сортів пшениці, ячміню та рису шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволило отримати відносно чіткі ДНК-профілі кожного з проаналізованих видів. Кількість алельних фенотипів у вибірках сортів пшениці, ячменю та рису становила чотири, два та один відповідно. Загалом поліморфізм довжини інтронів генів актину був виявлений у сортах пшениці та ячменю, які були охарактеризовані як генетично гетерогенні. Тоді як, сорти рису виявилися генетично однорідними за даним видом ДНК-маркерів. Таким чином, оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину може бути використана як додатковий інструмент для генетичного профілювання та диференціації сортів злакових культур. В цілому, якщо порівнювати два підходи у генотипуванні злаків, а саме поліморфізм інтронів генів β -тубуліну та актину, то інтрони генів β -тубуліну

є більш пріоритетною системою для диференціювання злаків, оскільки сама кількість утворених поліморфних зон під час аналізу виявилася значно більшою, у порівнянні з інтронами генів актину. Це можна пояснити тим, що в залежності від обраного підходу можна аналізувати I-ий, II-ий інтрони генів β -тубуліну, а також їх комбінацію, коли мова йде про hTBR. Тоді як в арсеналі генів актину тільки один інтрон, який може забезпечити диференціацію досліджуваних генотипів. Також варто зважати на плоідність досліджуваних організмів. Чим більше плоідність, тим більшу кількість фрагментів можна очікувати під час проведення аналізу. В цілому поліморфізм інтронів комплексу цитоскелетних генів, зокрема, генів β -тубуліну та актину, може бути використаний для генотипування та диференціації злакових культур.

Поліморфізм довжини інтронів β -тубуліну та актину було застосовано як інструмент генотипування *Camelina sativa* L. Cranz. Серед олійних рослин рижій посівний або *C. sativa* є однією з найбільш перспективних культур. Останнім часом ця рослина привернула увагу дослідників як ресурс для виробництва біопалива [102]. Генетичний поліморфізм і філогенія сортів *C. sativa* на основі аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну на даний момент добре вивчена. В той же час вітчизняні сорти та сортозразки рижію, які можуть стати в нагоді під час створення генотипів більш придатних для отримання біодизеля, залишаються слабо дослідженими.

В результаті аналізу поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну *C. sativa* встановлено, що смуги знаходились в діапазоні 295–3200 п.н. При цьому лише 7 смуг виявилися поліморфними і спостерігались у частини зразків. Тобто всі зразки не могли бути диференційовані за допомогою цього виду маркеру. Результати аналізу поліморфізму довжини I-го інтрону гена актину показали, що смуги утворюються в діапазоні 370-1000 п.н., до того ж 8 смуг виявилися поліморфними. Таким чином стало можливим диференціювати частину зразків (ФЕОРЖЯФ-3, Євро-12, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-Д), яка не відрізнялася за аналізом I-го інтрону

генів β -тубуліну. Також для більш точного профілювання зразків був задіяний аналіз довжини II-го інтрона генів β -тубуліну (сТВР-метод). Виявлено смуги в межах 350–1990 п.н. Шість смуг були поліморфними. В цьому випадку більшість генотипів *C. sativa* були чітко диференційовані між собою, маючи свій власний унікальний ДНК-профіль. Таким чином було встановлено, що аналіз поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, а також актину можуть бути ефективними для генетичного профілювання *C. sativa*.

Вдалим виявилось застосування ТВР-аналізу для дослідження генетичного різноманіття та філогенетичних взаємовідносин у перехреснозапильних покритонасінних рослин, популяції яких охороняються. Зокрема це стосується представників роду *Achillea* L.: *Achillea glaberrima* Клок. та *Achillea leptophilla* Vieb. На електрофореграмах спостерігається доволі значна кількість ампліконів задовільної якості (120 п.н., 160 п.н., 210 п.н., 230 п.н., 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н.), які можна використовувати для аналізу. У обох видів вдалося виявити внутрішньовидовий поліморфізм за деякими з них, а саме, 230 п.н. – у *A. leptophilla*, 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н. – у *A. glaberrima* та *A. leptophilla*. В цілому можна зазначити, що ТВР-метод може бути успішно застосований для молекулярно-генетичних досліджень представників багатьох родів трав'янистих рослин, в тому числі для маркування генотипів і розроблення довгострокових програм із збереження та відновлення популяцій ендемічних рослин.

Поліморфізм інтронів генів β -тубуліну та актину застосували для генотипування різних видів роду *Linum* L. Зокрема диференціюючу здатність ТВР-аналізу перевіряли на п'яти видах льону, а саме: *L. usitatissimum*, *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. humile* та *L. perenne*. Варто зазначити, що систематика роду *Linum* L. і по цей час залишається неоднозначною. Деякі з наведених вище видів вважають підвидами *L. usitatissimum*, або розглядають *L. angustifolium* та *L. bienne* як один вид. Результати аналізу різних зразків

льону за допомогою ТВР свідчать про те, що основна зона розподілу фрагментів ДНК знаходиться в діапазоні від 400 до 1900 п.н. Всього було зафіксовано 46 ампліфікованих фрагментів різного розміру, 17 з них є унікальними, що зустрічаються виключно у виду *L. perenne*. Дані генетичного аналізу зразків було використано для відображення диференціації досліджених видів на основі кластерного аналізу методом UPGMA. З отриманої дендрограми видно, що всі досліджені зразки льону чітко відрізняються за їх ТВР-профілем. В цілому, результати дослідження із застосуванням ТВР-аналізу, дають можливість диференціювати та ідентифікувати вивчені види роду *Linum* L. За результатами сТВР-аналізу в цілому виявлено 28 фрагментів, 9 з яких (330 п.н., 345 п.н., 350 п.н., 605 п.н., 675 п.н., 755 п.н., 895 п.н., 955 п.н.) властиві лише *L. perenne*. Один фрагмент (320 п.н.) був виявлений у всіх досліджених видів. В цілому сТВР-аналіз підтвердив отримані раніше результати ТВР-аналізу. Побудовані дендрограми вказують на схожу картину кластеризації досліджених видів, що дає підстави зробити висновок про те, що *L. angustifolium* та *L. bienne* є різними видами, до того ж, можливо, *L. bienne* є підвидом *L. usitatissimum*. В цілому результати ТВР/сТВР-методів дозволяють ідентифікувати та диференціювати вивчені види роду *Linum*, що характеризуються унікальними патернами ампліконів на електрофореграмах. Тому ці підходи можуть бути застосовані в молекулярно-генетичному та філогенетичному аналізі видів роду *Linum* L.

Узагальнено дані щодо оцінки внутрішньосортного та міжсортного поліморфізму льону-довгунцю із застосуванням ТВР-, АВР- та SSR-аналізу. Згідно цих даних тільки два сорти, 'Сіверський' та 'Глазур', селекції ДСЛК (Інститут луб'яних культур НААН України) виявилися гомогенними за всіма видами маркерів. Всі інші сорти, хоча б за одним видом маркерів мали поліморфізм. У сорту 'Есмань' поліморфізм був встановлений тільки за одним з SSR-маркерів – Lu-1. Сорт 'Глухівський ювілейний' виявився поліморфним за мікросателітними маркерами та інтронами генів актину, в

той же час ТВР-аналіз не виявив гетерогенності цього сорту. Сорт ‘Глобус’ мав поліморфізм за інтронами генів актину, хоча за мікросателітними локусами та інтронами генів β -тубуліну виявити поліморфізм не вдалося. В той же час у сорту ‘Чарівний’ було встановлено гетерогенність за допомогою мікросателітних локусів та інтронами генів β -тубуліну, а за інтронами генів актину гетерогенності не спостерігалось.

У більшості випадків (у 10 сортах з 16) результати аналізу за всіма видами маркерів давали однакові результати. Тобто як за мікросателітними маркерами, так і за ТВР-, АВР-маркерами було встановлено гетерогенність сортів. В цілому, в результаті проведених досліджень з використанням ТВР-, АВР- та SSR-методів встановлено, що більшість з досліджених сортів є генетично гетерогенними. Показано, що ТВР-, АВР- методи є швидкими, простими та надійними молекулярно-генетичними інструментами, які можуть бути використані як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами, зокрема SSR-маркерами, для молекулярно-генетичного аналізу льону.

Було досліджено внутрішньосортний поліморфізм 30 ландрас *L. usitatissimum* за ТВР- та АВР-маркерами. Більшість візуалізованих ДНК-фрагментів за умов ТВР-аналізу знаходилась в діапазоні від 400 п. н. до 1900 п. н., що є характерним для роду *Linum*. Гомогенними за наявністю фрагментів виявилось лише 5 з 30 проаналізованих ландрас. Загалом при дослідженні внутрішньосортного поліморфізму у ландрас льону встановлено, що вони суттєво розрізняються за поліморфізмом довжини інтронів генів β -тубуліну. Так, загальна кількість фенотипів у ландрас складає 7, а значення PIC в цілому становить 0,78, варіюючи в межах кожного сорту від 0,32 до 0,72. Встановлено, що у порівнянні з сучасними сортами української селекції білоруські ландраси є більш різноманітними за довжиною інтронів генів β -тубуліну. Отримані дані можна пояснити тим, що ландраси – це стародавні сорти, які сформувались в різних еколого-географічних умовах, і тому є більш гетерогенними. В результаті аналізу

поліморфізму інтронів генів актину (АВР-метод) за допомогою власнорозроблених універсальних праймерів (ActIn) продемонстровано утворення видоспецифічних ДНК-профілів, що містили амплікони інтронів генів актину. ДНК-профіль кожного зразка льону-довгунця білоруської селекції був представлений як мінімум 10 фрагментами, розміри яких варіювали в межах від 700 п. н. до 1200 п. н. Загалом проаналізовані генотипи льону-довгунця містили поліморфні смуги в діапазоні довжин від 800 п. н. до 900 п. н., що дало можливість диференціювати їх між собою. Встановлено, що для сортів льону-довгунця білоруської селекції за умов аналізу за допомогою АВР-методу характерна поява трьох різних алельних фенотипів, а *PIC* дорівнює 0,57. Отримані результати підтвердили, що зразки льону-довгунця білоруської селекції виявилися генетично гетерогенними. В цілому, в результаті проведених досліджень з використанням ТВР- та АВР-методів аналізу встановлено високий внутрішньосортний поліморфізм стародавніх сортів льону білоруської селекції, виявлено високу їх генетичну варіабельність. Отримані дані можуть бути використані разом з іншими результатами молекулярно-генетичного аналізу для дослідження філогенезу сортів та у селекційно-генетичних програмах з покращення генофонду льону.

Здійснено генотипування представників родини *Solanaceae* (*Solanum tuberosum* L. та *Solanum lycopersicum* L.) за допомогою поліморфізму інтронів генів актину. АВР-профілі *S. tuberosum* мають значну кількість фрагментів, що розподіляються в діапазоні від 780 п. н. до 2000 п. н. Проведений міжсортний аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину картоплі дозволив генотипувати та диференціювати кожний із зразків. У чотирьох сортів картоплі показана наявність унікальних алельних фенотипів, а сама вибірка сортів виявилася генетично гетерогенною. В результаті АВР-аналізу 12 сортів томату на електрофореграмі спостерігаються чіткі смуги, що мають довжину від 700 п. н. до 1500 п. н. Кожен із досліджуваних зразків містив не менше ніж 7 ампліконів. Генетичне профілювання томату з використанням АВР-методу показало, що досліджувана вибірка виявилася низько

поліморфною. Встановлено ряд спільних ампліконів, наявних як у сортів томату, так і картоплі. Ці фрагменти мають розмір близько 743 п.н., 753 п.н., 846 п.н. та 870 п. н. Наявність однакових ампліконів є передбачуваним явищем та засвідчує про приналежність томату та картоплі до одного роду *Solanum* та родини *Solanaceae*.

Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну був застосований для дослідження генетичної мінливості деревних рослин. Зокрема він був використаний для генотипування представників родини *Pinaceae* (*Pinus sylvestris* L., *Abies alba* Mill., *Picea abies* (L.) H. Karst., *Picea pungens* Engelm). Основна область розподілу ампліконів варіює в межах від 301 п.н. до 2705 п.н.. В цілому було виявлено 57 фрагментів різної довжини. Зокрема, у *P. pungens* – сім ампліконів, довжина яких склала 416 п.н. – 1113 п.н., у *P. abies* – 10 ампліконів – 420 п.н. – 1126 п.н., відповідно. Під час дослідження *P. sylvestris* виявлено 18 смуг, довжина яких варіювала від 307 п.н. до 580 п.н. Найбільша кількість ампліконів (25) спостерігалася у *Abies alba* L. з різним розміром фрагментів від 301 до 1116 п.н. При порівнянні досліджених видів хвойних не було встановлено загальних для всіх видів фрагментів. Однак три поширені мономорфні смуги з приблизною довжиною 453 п.н., 840 п.н. та 863 п.н. були наявні у *P. abies* та *P. pungens*. Ймовірно, це пов'язано з тим, що ці представники належать до одного роду *Picea*. Аналіз інших двадцяти видів деревних рослин за допомогою ТВР показав, що основна область розподілення ампліконів знаходилась в межах від 275 п.н. до 1500 п.н.. У досліджених видів рослин всього було зафіксовано 275 ампліфікованих фрагмента різної довжини. Найменшу кількість ампліконів мали *Robinia pseudoacacia* (306 п.н. — 871 п.н., вісім ампліконів), а найбільшу — *Tilia cordata* (55 ампліконів), довжина яких варіювала в межах від 366 п.н до 1352 п.н. Загальна організація фрагментів, виявлених в результаті електрофорезу ампліконів у межах одного роду, має ознаки, притаманні тільки цьому роду. Проаналізовані представники п'яти родів (*Betula pendula*, *Alnus glutinosa*, *Quercus robur*, *Fagus sylvatica*, *Fagus sylvatica* f. *salicifolia* та *Juglans regia*)

мали різну кількість ампліфікованих фрагментів. Зокрема у *Betula pendula* з 15 проаналізованих фрагментів різної довжини спостерігалися спільні для всіх зразків в межах виду фрагменти з приблизною довжиною 300 п.н., 425 п.н. та 465 п.н., у *Alnus glutinosa* — з 19 виявлених ампліконів, спільні фрагменти були з приблизною довжиною ампліконів 300 п.н. та 460 п.н. Рівень поліморфізму (PIC) у даних видів склав 0,319 та 0,380, що є досить високим значенням для деревних рослин [142]. У *Quercus robur* виявлено 19 фрагментів, з яких спільними для рослин виду були фрагменти з приблизним розміром ампліконів 500 п.н., 880 п.н., 1100 п.н. Значення PIC у даного виду дорівнювало 0,295. При порівнянні дерев різних форм роду *Fagus* L. (*Fagus sylvatica* та *Fagus sylvatica* f. *Salicifolia*) з 16 ампліфікованих фрагментів було виявлено спільні для представників роду фрагменти з приблизним розміром 300 п.н., 535 п.н., 1150 п.н. та 1435 п.н. Значення PIC у даного роду склало 0,375. Рослини *Juglans regia* мали дев'ять ампліфікованих фрагментів, з яких усі були мономорфними, що може бути пов'язане як із малими об'ємами вибірок, так і з клональною природою рослин. Слід зауважити, що при порівнянні електрофоретичних профілів представників порядку Fagales між собою, зокрема, *Betula pendula*, *Fagus sylvatica*, *Alnus glutinosa* та *Quercus robur*, можна спостерігати спільний мажорний фрагмент, розмір якого, варіював в межах 290 – 305 п.н. В цілому, аналіз поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну дозволяє чітко диференціювати види одного роду між собою, отримувати інформацію про індивідуальний поліморфізм рослин. Це має велике значення для екологічних досліджень, при аналізі популяційної динаміки деревостанів, швидкій діагностиці випадків гібридного походження рослин.

Дуб звичайний (*Quercus robur* L.) – аборигений вид української флори, одна з головних лісоутворювальних порід, насадження якої займають близько 24 % від усієї площі лісів України [71], відзначається високою екологічною пластичністю та має велике господарське значення. Довговічність рослин дуба звичайного роблять його зручним модельним

об'єктом для різнопланової оцінки генетичних процесів, при лісовідновленні на порушених територіях чи збереженні існуючих деревостанів в умовах підвищеного антропогенного навантаження [103, 247, 270]. В результаті проведених досліджень *Q. robur* НПП «Голосіївський» було здійснено генотипування 55 вікових дерев. Виявлено 40 поліморфних і один мономорфний (біля 880 п.н.) ТВР-фрагмент. Частота фрагментів з приблизним розміром 275 п.н., 490 п.н., 500 п.н. та 1110 п. н. складає від 70% до 90%. Генетичний поліморфізм вікових дерев *Q. robur* є досить високим, PIS (0,22 – 0,39), ефективна кількість алелей на локус (1,174 – 1,268), інформаційний індекс Шенона (0,204 – 0,269). У вікових дерев *Q. robur* не виявлено географічну диференціацію генетичної структури вибірок. На частку міжвибіркової генетичної варіабельності (AMOVA) припадає біля 6% генетичної мінливості. Близько 93% генетичної мінливості зосереджено на індивідуальному рівні. При використанні ТВР-методу вставлено, що досліджені деревостани дуба звичайного не мають стабілізованої генетичної структури, але водночас володіють досить великим генетичним різноманіттям.

Також було вивчено генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur* L. за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів. В деревостанах *Q. robur* природного походження зустрічаються рослини, диверсифіковані за часом виникнення фенологічних фаз. В максимальному своєму проявленні вони розрізняються як дві чітко виділені форми (вперше, описані Черняєвим в 1858 р. [471]): *Q. robur* var. *praecox* – рання фенологічна форма і *Q. robur* var. *tardiflora* Czern. – пізня фенологічна форма, відмінні як за часом виникнення фенологічних фаз, так і за фенотипом взагалі. Визначено, що ці різновиди мають значні відмінності у стійкості до середовища, зростанні та розвитку [345, 410, 458]. Рослини ранньої форми *Q. robur* краще переносять нестачу вологи у ґрунті в порівнянні з пізньою формою, що дозволяє їм зростати у сухих місцях, однак вони пошкоджуються весняними заморозками і листогризучими комахами.

Пізні форми *Q. robur* більш стійкі до низьких температур весною, однак пошкоджуються літньою посухою [68, 284, 438]. Вони є багатообіцяючими та перспективними і вже широко використовуються для штучного формування зелених зон у європейських країнах [65].

Фенологічні особливості *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* не завжди можна вважати наслідком звичайної мінливості, пов'язаної з екологічними особливостями зростання *Q. robur* [23, 438, 458]. Фенологічна мінливість в аналогічних ґрунтових та гідрологічних умовах знаходиться під впливом генетичних факторів [23, 53]. Генетична ідентифікація ранніх та пізніх фенологічних форм *Q. robur* надає змогу окреслити генетичне різноманіття цього та інших тісно пов'язаних різновидів. Молекулярно-генетичний аналіз може допомогти виявити найбільш цінні зразки для розповсюдження через культуру *in vitro* і масового виготовлення посадкового матеріалу. Найбільш ефективно це завдання можна виконати за допомогою молекулярних методів, що базуються на використанні ДНК-маркерів, а саме SSR та TBP.

В результаті аналізу електрофореграм з ПЛР-фрагментами мікросателітних локусів *quru-GA-1C08*, *quru-GA-0C19*, *QPZAG9* виявлено 30 алелів, 9 з яких були унікальними для ранньої форми (*quru-GA-1C08*: 266, 282, 284, 286; *quru-GA-0C19*: 219, 228; *QPZAG9*: 180, 194, 212), 5 – унікальними для пізньої форми (*quru-GA-1C08*: 262, 268; *quru-GA-0C19*: 323, 258; *QPZAG9*: 206). Відмінності між алельним складом вибірок ранніх та пізніх форм *Q. robur* виявилися значимими на рівні $p \leq 0,01$ для локусу *QPZAG9*, та на рівні $p \leq 0,001$ для локусів *quru-GA-1C08*, *quru-GA-0C19*. Оцінка значущості наявності/відсутності окремих алелів локусу *QPZAG9* підтверджує таку на рівні $p < 0,05$ для окремих алелів. В одному випадку це притаманний для ранньої форми алель (194), в інших трьох значно відрізняється частота алелів 190, 192, 196 (алелі 192, 196 більш представлені у пізньої фенологічної форми, а алель 190 – у ранньої). За локусом *quru-GA-1C08* диференціація між пізньою та ранньою фенологічними формами

відбувається за алелями 260 та 280 на рівні $p < 0,05$ (більш представлені у пізньої форми), алелями 266, 268, 286, з яких 266 та 286 притаманні для ранньої форми на рівні $p < 0,001$ та $p < 0,01$, відповідно, а алель 268 – для пізньої фенологічної форми на рівні значущості $p < 0,01$. Виявлено пару алельних варіантів за локусом *qugu-GA-0C19*, за частотами яких існує значна різниця між ранніми та пізніми фенологічними формами *Q. robur*. Алель *qugu-GA-0C19-222* практично не представлений у пізньої форми *Q. robur*, натомість у цієї форми переважає *qugu-GA-0C19-226*. Аналогічно алель *qugu-GA-1C08-266* представлений виключно у ранньої фенологічної форми *Q. robur* і відсутній у пізньої. В подальшому наявність чи відсутність цих алелів може бути використана для діагностичних потреб (фінгерпринтингу).

ТВР-аналіз 40 дерев *Q. robur* обох форм загалом виявив 46 фрагментів, що варіюють за розміром в діапазоні від 298 п. н. до 1430 п.н.. З виявлених фрагментів унікальними для ранньої фенологічної форми *Q. robur* були чотири (310 п.н., 400 п.н., 405 п.н., 480 п.н.), а для пізньої форми – п'ять (425 п.н., 440 п.н., 445 п.н., 515 п.н. та 1330 п.н.). Рідкісних алелів (менше 10 %) виявлено у ранньої форми – 13, у пізньої – 9. Найчастіше у обох форм зустрічаються фрагменти з приблизним розміром 850 п.н. (100 %) та 1170 п.н. (від 70% до 75 %).

В цілому в результаті проведеного аналізу з'ясовано генетичні відмінності між ранньою та пізньою фенологічними формами *Quercus robur*. У дерев *Q. robur* var. *praecox* виявлено 9 унікальних алелей за мікросателітними локусами та 4 фрагменти за ТВР-маркерами, а у *Q. robur* var. *tardiflora* – 5 унікальних алелей за мікросателітними локусами та 5 фрагментів за ТВР-маркерами. Виявлено відмінності за частотою предомінантних алелів *qugu-GA-0C19-222* (практично відсутній у вибірці пізньої фенологічної форми) та *qugu-GA-0C19-226* (частота сягає більше 80% у ранньої фенологічної форми і лише біля 50% у пізньої). Виявлений поліморфізм фенологічних форм *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* вказує на те, що відмінності можуть бути генетично обумовлені, а різні види

ДНК-маркерів використані для генетичного профілювання та паспортизації *Q. robur*.

В результаті дослідження генетичної структури *Ulmus pumila* L. та *Ulmus suberosa* Moench в Степовому Придніпров'ї за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів встановлено, що під час аналізу п'яти ядерних мікросателітних локусів рослин *U. pumila* та *U. suberosa* виявлено 28 алелей. В кожній вибірці *U. pumila* виявлено унікальні алелі: найбільше в П1 – 5 (UR138: 240 п.н.; UR153: 200 п.н., 208 п.н.; UR101: 122 п.н., 131 п.н.); в П2 – 3 (UR158: null, 183 п.н.; UR101: null); П3 – 1 (UR153: 189 п.н.), П4 – 2 (UR153: 191 п.н.; UR158: 177 п.н.). У *U. suberosa* всі досліджені мікросателітні локуси виявилися мономорфними. У всіх досліджених вибірок спостерігали помірний рівень очікуваної гетерозиготності. Найбільший її рівень був властивий деревам *U. pumila* на ділянці П1 ($H_e = 0,455$), яка характеризувалась моновидовим угрупованням з високою щільністю дерев. На ділянках, де були присутні інші деревні рослини, значення H_e були нижчими: на ділянках П2 та П3 ($H_e = 0,402$ та $0,354$, відповідно). Наявна гетерозиготність за мікросателітними локусами на всіх ділянках була нижчою ніж очікувана за рахунок надлишку гомозиготних генотипів ($H_o = 0,350$; $0,330$; $0,260$, відповідно). У досліджених вибірок майже за всіма локусами (окрім локусу UR153 у всіх вибірках, і локусу UR158 у вибірці П1 та П3 і локусу UR101 у вибірці П1) підтверджено наявність відхилень від рівноваги Харді-Вайнберга в сторону дефіциту гетерозиготних генотипів. В цілому у проаналізованих вибірок рослин *U. pumila* встановлено надлишкову кількість гомозиготних генотипів, що опосередковано говорить про певний рівень інбредності аналізованих рослин, що, вірогідно, пов'язано як з умовами середовища, так і залежить від вихідної генетичної структури висаджених материнських для деревостанів рослин.

ТВР-аналіз у дерев *U. pumila* загалом виявив 17 фрагментів. При цьому 9 з 10 фрагментів двох досліджених ділянок виявилися поліморфними.

Мономорфними були фрагменти з приблизним розміром 380 п.н. для ділянки П2 та 1030 п.н. для ділянки П1. Зона розподілу всіх чітких та відтворених фрагментів знаходилася в діапазоні від 380 п.н. до 450 п.н. та від 820 п.н. до 1100 п.н. Зона від 500 п.н. до 800 п.н. проявлялася нестабільно, тому у розрахунках не враховувалась. Однак у цій зоні спостерігаються фрагменти, специфічні для кожної ділянки. При порівнянні електрофоретичних профілів, отриманих на основі ТВР-аналізу, для *U. pumila* можна відмітити, що ділянки рослин незначно відрізняються за кількістю ампліконів та їх розподілом за розміром. ТВР-аналіз у дерев *U. suberosa* загалом виявив 10 фрагментів. При цьому всі вони були мономорфними, як і за умов аналізу мікросателітних маркерів.

Під час ТВР-аналізу у рослин *U. pumila* найчастіше візуалізуються фрагменти з приблизним розміром 435 п. н. (частота складає від 50% до 65%), 400 п. н. (від 50% до 70%), 890 п. н. (від 80% до 95%), 380 п. н. (від 85% до 100%) та 1030 п. н. (частота складає від 90% до 100%). У рослин *U. suberosa* виявлено фрагменти, які відсутні у рослин *U. pumila*. Оцінка показників поліморфізму за ТВР-маркерами, проведена для досліджених територій, виявила зниження, як і за мікросателітними маркерами, кількості фрагментів на локус на ділянці П3 ($N_e = 1,239$), порівняно з ділянками П1 та П2 ($N_e = 1,525$ та $1,402$ відповідно). За інформаційним індексом Шенона також спостерігаються відмінності між ділянкою П3 ($I = 0,252$) та іншими ділянками П1 та П2 ($I = 0,460$ та $0,395$ відповідно).

Саме низьке значення PIS у рослин було зафіксовано на ділянці П3 (0,155), а найвище – у рослин ділянок П1 (0,307) та П2 (0,253). Значимі відмінності генетичного поліморфізму досліджених дерев *U. pumila* виявлено між ділянкою П3 та П1, П2. Тобто дерева на ділянці П3 виявилися за ТВР-маркерами менш генетично різноманітними.

В цілому проведений аналіз мінливості мікросателітних локусів та ТВР-аналіз свідчать, що *U. pumila* та *U. suberosa* у Степовому Придніпров'ї

за дослідженими маркерами характеризується відносно низьким рівнем генетичної мінливості.

Представники відділів *Chlorophyta*, *Ochrophyta* та *Euglenophyta* є невід'ємною складовою біорізноманіття різних екосистем. Багато видів зелених водоростей широко застосовуються для вирішення технічних, господарських та наукових задач людини [51, 465, 468]. На сьогодні існує проблема ідентифікації різних видів мікроводоростей. Морфологічні методи не завжди дають змогу відрізнити зовнішньо ідентичних представників не лише різних видів, а й родів. Зазвичай їх диференціюють за відмінностями у репродуктивній фазі, або тривалості клітинного циклу. Такі методи потребують довгострокових спостережень за живими клітинами водоростей, суттєвих знань їх морфології та порівняння значного об'єму інформації [51, 465]. Тому для з'ясування питань філогенії та видоідентифікації застосовують різноманітні молекулярно-генетичні маркери [375, 435].

Проведений аналіз 10 штамів мікроводоростей з використанням ТВР-маркерів показав, що переважна більшість чітких та поліморфних смуг (ампліконів інтронів генів β -тубуліну) візуалізувалася в діапазоні 290–1200 п. н.. Діапазон розмірів утворюваних фрагментів з інтронами генів β -тубуліну в цілому відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона з невеликими ділянками першого та другого екзонів [22]. Для кожного зразку спостерігається утворення ДНК-профілю зі специфічним набором та розподілом ампліконів інтронів генів β -тубуліну з певними відмінностями. При цьому ТВР-профілі відрізнялися на різних таксономічних рівнях (міжродовому, міжвидовому та між окремими штамми). Зокрема, спостерігалася утворення ДНК-специфічних профілів, що містили фрагменти інтронів генів β -тубуліну для кожного з п'яти родів мікроводоростей, а саме родів: *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Dunaliella*, родів *Tribonema* та *Euglena*. На міжвидовому рівні виявлений поліморфізм інтронів генів β -тубуліну у видів *A. acuminatus*, штам IBASU-A 245 та *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251 та штам IBASU-A 344). Також були проаналізовані різні види роду

Desmodesmus. Встановлено, що *D. armatus*, штам IBASU-A 263 та *D. subspicatus*, штам IBASU-A 408 містили спільний амплікон розміром близько 620 п. н., хоча у *D. armatus* (штам IBASU-A 338) – цей фрагмент відсутній. Для *Dunaliella salina*, штам IBASU-A 4 та *D. minuta* штам IBASU-A 40 показано утворення відмінних ТВР-профілів з лише одним спільним фрагментом довжиною близько 595 п. н. З метою генетичного профілювання та диференціації мікродоростей на рівні окремих штамів в межах одного виду проаналізовано по два штами *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251 - і штам IBASU-A 344) та *D. armatus* (штам IBASU-A 338). Поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в межах досліджених штамів не виявлено. Для кожної пари зразків одного штаму утворювалися ідентичні амплікони інтронів. Дані фінгерпринтингу за першим інтроном були використані для кластерного аналізу методом UPGMA. З отриманої дендрограми було видно, що з одного боку всі зразки з високою бутстреп підтримкою диференціюються один від одного, а з іншого – розподілилися на три кластери згідно їх таксономічної класифікації, при цьому в межах кожного кластеру зберігається генотипова приналежність.

В подальшому для цих же 10 штамів була здійснена варіація ТВР-аналізу, яка передбачає оцінку поліморфізму довжини другого інтрону генів β -тубуліну – сТВР метод [34]. Раніше сТВР підхід використовувався виключно для генотипування вищих рослин. Тож в цьому дослідженні вперше показані результати сТВР-аналізу у мікродоростей. У кожному з проаналізованих з використанням сТВР-маркерів зразків утворювалися чіткі і відтворювані фрагменти другого інтрону генів β -тубуліну, які розташовувалися в діапазоні від 200 до 3000 п. н.. На міжродовому рівні для кожного з п'яти досліджуваних родів мікродоростей показано утворення ДНК-профілів, які значно відрізнялися один від одного. Варто зазначити, що смуга поліморфних ампліконів, розташованих вище 200 п. н. є характерною для представників всіх проаналізованих родів. Виключенням є штами роду

Dunaliella: *D. salina*, штам IBASU-A 4 та *D. minuta* штам IBASU-A 40, у яких ці фрагменти повністю відсутні.

В цілому, порівнюючи отримані результати з використанням двох споріднених підходів – ТВР та сТВР – можна зробити висновок, що обидві маркерні системи дозволяють якісно генотипувати різні зразки мікроводоростей. Кожна з використаних ДНК-маркерних систем дозволила отримати ряд чітких та відтворюваних фрагментів, що містили перший (для ТВР) та другий (для сТВР) інтрони генів β -тубуліну. Специфічні ТВР- та сТВР-профілі значно відрізнялися між собою за кількістю та розташуванням цільових ампліконів, однак дозволили чітко диференціювати генотипи мікроводоростей на різних таксономічних рівнях. Окрім того, обидві маркерні системи однозначно підтвердили однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму. Отримані результати в цілому свідчать про доцільність подальшого використання даних ДНК-маркерів для генотипування та аналізу різних таксонів водоростей.

Гени α -тубуліну належать до мультигенної родини генів тубулінів. Добре дослідженими є гени α -тубуліну *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. їх шість і вони кодують чотири ізотипи білка [93, 187]. α -тубулін разом з β -тубуліном є дуже консервативним білком, що виконує важливі функції в еукаріотичній клітині, зокрема він входить до складу мікротрубочок – основної складової цитоскелету [100]. Консервативність амінокислотної послідовності α -тубуліну відображена в послідовностях кодуючих ділянок генів. Цей факт дозволяє припустити, що гени α -тубуліну можуть бути використані для створення універсальної ІЛР-маркерної системи, придатної для проведення молекулярно-генетичного аналізу різних генотипів вищих рослин. Для розроблення такої системи було здійснено аналіз екзон-інтронної структури генів α -тубуліну геномів різних видів вищих рослин.

Результати аналізу екзон-інтронної структури генів α -тубуліну, закодованих в геномах *A. thaliana*, *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, показали, що більшість генів мають у своєму складі по 4–5

екзонів та 3–4 інтрони. Однак є декілька винятків, зокрема ген α -тубуліну *A. thaliana* (TUBA6), який містить лише 2 екзони та 1 інтрон, а ген TUBA4 – 3 екзони та 2 інтрони. З метою створення ДНК-маркерної системи, яка б дозволила оцінити поліморфізм довжини інтронів генів α -тубуліну, на підставі попередньо здійсненого вирівнювання, була розроблена пара вироджених праймерів для проведення ПЛР. Зважаючи на той факт, що ген TUBA6 *A. thaliana* містить лише I інтрон, вироджені праймери підібрані таким чином, щоб оцінити поліморфізм довжини I інтрону всіх відомих генів α -тубуліну. Прямий та зворотний праймери (TUA_1in_F: 5' – TGG GAR CTN TAY TGY CTYGA – 3'; TUA_1in_R: 5' – TCR CTR AAR AAN GTR TTR AAN GMA TC – 3') відпалюються на консервативних ділянках I та II екзонів і дозволяють проводити ампліфікацію ділянки гена α -тубуліну, що розташована між відповідними праймерами та містить I-ий інтрон.

Під час ПЛР із розробленими праймерами у *A. thaliana* утворюються фрагменти з інтронами α -тубуліну, які мають розміри близько 340 та 607 п. н. Також спостерігається утворення низки високомолекулярних фрагментів. В результаті аналізу поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну у сортів *L. usitatissimum* утворюються фрагменти з інтронами в діапазоні 400–2000 п. н. Для всіх проаналізованих сортів *L. usitatissimum* показана наявність спільних ампліконів інтронів α -тубуліну, що свідчить про утворення видоспецифічних ДНК-профілів. Більшість фрагментів інтронів *L. usitatissimum* є мономорфними, однак сорт 'Чарівний' містить амплікони розміром 754 та 1764 п. н., які відрізняють ДНК-профіль цього сорту від інших. Також сорт 'Сіверський' містить унікальний амплікон довжиною близько 336 п. н. Ймовірно, що розширення вибірки сортів дозволить виявити більшу кількість поліморфних фрагментів з інтронами генів α -тубуліну.

У результаті аналізу поліморфізму довжини I інтрону генів α -тубуліну в різних сортах *O. sativa* амплікони інтронів генів α -тубуліну розподілились у широкому діапазоні від 340 до 1800 п. н. Характерним для

проаналізованих зразків *O. sativa* є те, що всі утворені ДНК-профілі є унікальними за рахунок розподілу та кількості візуалізованих фрагментів. Мономорфними виявилися зони з довжиною фрагментів близько 590, 1177, 1539 та 1704 п. н. Інша частина утворених фрагментів була різномірною. Зокрема у сорту 'Преміум' (рис. 30, зразок 7) наявні унікальні амплікони з розміром фрагментів близько 423, 425, 487 і 814 п. н., проте відсутній фрагмент 343 п. н. Такий ДНК-профіль сорту 'Преміум' відрізняє його від інших зразків у вибірці. Загалом ДНК-маркери, засновані на виявленні поліморфізму довжини I інтрону генів α -тубуліну, вдало генотипували сорти *O. sativa* та продемонстрували значну кількість поліморфних смуг.

Фрагменти інтронів генів α -тубуліну у *S. lycopersicum* розподілилися в широкому діапазоні розмірів, від 200 до 2000 п. н. Більшість зон розподілу ампліконів є мономорфними, однак спостерігається поява поліморфних фрагментів, переважно у верхній частині електрофореграми від 1000 до 2000 п. н. Слід зазначити, що сорт 'Американський синій' містить декілька унікальних ампліконів з довжинами близько 205, 268 та 396 п. н., що значно відрізняє цей сорт від інших. Загалом кожен з проаналізованих сортів, що має унікальний ДНК-профіль, відрізняється один від одного за рахунок кількості та розподілу ампліконів інтронів генів α -тубуліну. ДНК-профілі 4 сортів *S. tuberosum*, проаналізовані з використанням ДНК-маркерів, які виявляють поліморфізм довжини I-го інтрону генів α -тубуліну, мали амплікони інтронів, що візуалізувалися в діапазоні 150–2000 п. н. Більшість фрагментів виявилися мономорфними, хоча були присутні й поліморфні фрагменти. У сорту 'Вернісаж' наявний фрагмент 410 п. н., що відрізняє ДНК-профіль цього сорту від інших. Характерною ознакою сорту 'Світанок' є відсутність декількох ампліконів у ДНК-профілі. Загалом, за допомогою ДНК-маркерів, що оцінюють поліморфізм довжини інтронів генів α -тубуліну, вдалося диференціювати генотипи різних сортів *S. tuberosum*. Отже, результати проведеного аналізу свідчать про те, що розроблений підхід дозволяє

генотипувати різні рослини та ідентифікувати поліморфізм довжини інтронів генів α -тубуліну на міжсорттовому та міжвидовому рівнях.

В цілому запропонована ILP-маркерна система, яка дозволяє оцінити поліморфізм довжини I інтрону генів α -тубуліну у різних видів рослин, є універсальною й дає можливість проводити генотипування та диференціацію різних видів (сортів) вищих рослин, поєднуючи в собі надійність, швидкість отримання вихідних даних і простоту їхнього аналізу. Вона може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу вищих рослин як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами.

Крім α - та β -тубуліну до складу мікротрубочок входить γ -тубулін, який є критично необхідним для їх нуклеації. До того ж його амінокислотна послідовність є високонсервативною серед філогенетично різних організмів [260, 285]. Тому розроблення варіанта ILP-методу, що базувався б на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну, представляв певний інтерес для молекулярних біологів. Для цього було проведено пошук консервативних ділянок екзонів генів γ -тубуліну, що оточують інтрони, для подальшого підбору до них праймерів таким чином, щоб під час ПЛР можна було отримати копії послідовностей інтронів. Праймери підібрано з використанням послідовностей генів γ -тубулінів таких видів рослин, як *Zea mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *Arabidopsis thaliana* (AT3G61650), *Linum usitatissimum* (Lus10010986.g, Lus10007851.g), для яких екзон-інтронна структура гена γ -тубуліну є доступною в базі даних Phytozome (www.phytozome.net). Після вирівнювання послідовностей генів з використанням алгоритму MUSCLE та програмного забезпечення UniproUGENE [254] було обрано найбільш консервативні ділянки екзонів, до яких було підібрано пару вироджених праймерів: F: 5'-GAYGTBTTYTTTTACCARGCKGA-3'; R: 5'-GAGTTGTARGGYTGG-ACRAC-3').

У складі ампліконів з інтронами γ -тубуліну продукти ампліфікації *A. thaliana* містять повну послідовність II-го інтрону, продукт *Zea mays* – II-го

інтрону, III-го екзону та III-го інтрону, продукт *L. usitatissimum* – I-го інтрону, II-го екзону та II-го інтрону. Середня очікувана довжина продуктів ПЛР (інтронів) для вказаних видів рослин складає 500 п.н. та вище. Як видно з наведених даних, для *A. thaliana* характерні два фрагменти ДНК завдовжки приблизно 520 та 560 п.н. Їх розміри цілком узгоджуються з даними біоінформатичного аналізу. На сьогодні в базі даних Uniprot (<http://www.uniprot.org/help/sequence-alignments>) розміщені дві достовірно анотовані послідовності γ -тубулінів з геному *A. thaliana* (TUBG1, TUBG2).

Для *L. usitatissimum* наразі немає достовірно анотованих послідовностей γ -тубуліну (згідно з Uniprot). Проте для нього характерна значно більша кількість фрагментів у діапазоні довжин від 500 до 900 п.н. Тому можна припустити, що в геномі льону може міститися більша кількість генів γ -тубуліну, ніж у арабідопсису. Важливо, що у випадку *L. usitatissimum* найбільше за профілем інтронів виокремлюється серед інших сорт Глобус (має чіткий амплікон 500 п.н.). Слід зазначити, що даний сорт льону слабо диференціюється від інших зразків у процесі TBP- та SSR-аналізу, що було показано нами раніше [287]. Що стосується сортів ‘Міандр’ та ‘Каменяр’, то вони також значно різняться за спектрами фрагментів ДНК, як і у випадку використання TBP та SSR-маркерів. Оскільки розроблені праймери є виродженими та універсальними, то, не виключено, що вони працюватимуть і на інших видах рослин. У зв’язку з цим розроблену пару праймерів було застосовано для дослідження поліморфізму інтронів генів γ -тубуліну в організмів, для яких ще невідома екзон-інтронна структура цих генів. Для прикладу було досліджено три сільськогосподарські культури — картоплю, рис та пшеницю. Для *S. tuberosum* характерне утворення одного та двох фрагментів ДНК: приблизно 800 і 910 п.н. (‘Левада’) та лише 910 п.н. (‘Світанок’). У всіх досліджених сортів *O. sativa* виявлено чіткий фрагмент ДНК завдовжки приблизно 895 п.н. та два менш яскравих — 505 п.н. (‘Преміум’) і 560 п.н. (‘Консул’). Результати електрофоретичного аналізу зразків *T. aestivum* свідчать про наявність фрагментів ДНК у діапазоні від 500

до 1000 п.н. Отже, запропонований метод, що базується на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну, дає змогу однозначно розрізнити різні види рослин і навіть досліджувати їх генетичний поліморфізм на рівні генотипів (сортів) на основі отриманих електрофоретичних профілів. Розроблена пара вироджених праймерів може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу рослин без наявності попередньої інформації про екзон-інтронну структуру їх генів γ -тубуліну. Крім того, надалі можна додатково доповнити метод новими варіаціями, наприклад, підвищити виродженість праймерів, залучивши до біоінформатичного аналізу більшу кількість послідовностей гена γ -тубуліну, або, навпаки, розробити специфічні праймери для конкретного виду рослин, підвищивши за рахунок цього чутливість методу. Таким чином, запропонований метод є простим, надійним молекулярно-генетичним інструментом, який може бути ефективно застосований для фінгерпринтингу та молекулярно-генетичного аналізу різних видів та сортів рослин як у поєднанні з іншими маркерними системами, так і самотійно.

Підсумовуючи інформацію, наведену вище, можна заключити, що ДНК-маркерні системи, які засновані на оцінці поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубуліну та актину, є простими, ефективними, відтворюваними та інформативними інструментами для проведення молекулярно-генетичного аналізу та дослідження генетичної мінливості рослин. Доведена доцільність використання поліморфізму інтронів генів цитоскелетних білків для проведення генотипування, ідентифікації та диференціації генотипів, а також для дослідження генетичного різноманіття рослин на міжвидовому, міжсортівому, міжпопуляційному та внутрішньосортівому рівнях.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень доведено, що ДНК-маркерні системи, засновані на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів α -, β -, γ -тубуліну та актину, є ефективним та добре відтворюваним інструментом для молекулярно-генетичного аналізу та дослідження генетичної мінливості рослин. Продемонстрована доцільність використання методу оцінки поліморфізму інтронів генів цих цитоскелетних білків для проведення генотичної диференціації, ідентифікації, а також для дослідження генетичного різноманіття рослин на внутрішньосорттовому, міжсорттовому, популяційному, видовому та міжвидовому рівнях.

1. За результатами аналізу екзон-інтронної структури анотованих послідовностей генів α -, β - та γ -тубуліну та актину *A. thaliana* та гомологів цих генів в геномах інших видів вищих рослин встановлено закономірності екзон-інтронної структури генів цих білків. Кількість інтронів для генів актину складає переважно 3-4, для генів β -тубуліну - переважно 2, α -тубуліну – 3-4, а для γ -тубуліну – 9-10. Окрім того, отриманні дані вказують на те, що в геномах рослин саме за рахунок складу та довжини інтронів підвищується варіабельність нуклеотидних послідовностей генів як в межах одного виду, так і при міжвидовому порівнянні.

2. Гомологи генів α -, β -, γ -тубуліну та актину у різних видів рослин мають консенсусні послідовності консервативних ділянок екзонів, які були використані для дизайну видоспецифічних та універсальних вироджених праймерів з метою визначення поліморфізму довжини інтронів вище зазначених генів у різних видів рослин. Розміри утворюваних під час ПЛР з розробленими праймерами фрагментів співпадали з теоретично розрахованими.

3. Продемонстровано високий ступінь диференціюючої здатності ТВР-аналізу на генотипах та видах роду *Eleusine*. За результатами досліджень з використанням двох українських сортів та двох соматоклональних варіантів

(SE-1, SE-4) пальчастого проса (*E. coracana*), отриманих від сорту Тропіканка, а також трьох генотипів гусячої трави (*E. indica*), один з яких є природною популяцією цього виду, а два інші (*E. indica* 4A-21, *E. indica* 4A-1) є стійкими до дії динітроанілінових гербіцидів, встановлено чіткі генетичні відмінності як між різними видами, так і між генотипами в межах одного виду.

4. За результатами ТВР-аналізу, а також аналізу поліморфізму інтронів генів актину проведено генотипування кримських популяцій егілопсу (*Ae. biuncialis*) та виявлено їх генетичну гетерогенність, що свідчить про доцільність подальшого використання цих ДНК-маркерних систем для молекулярно-генетичного аналізу диких видів родини *Poaceae*. В той же час порівняння АВР-методу з ТВР-аналізом свідчить про більш високий рівень ефективності ТВР-методу для диференціації природних популяцій егілопсів.

5. За результатами аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну (сТВР, hТВР-аналіз) не встановлено значущої різниці між популяційними вибірками *D. antarctica* в Антарктиці, що вказує на низький рівень генетичного різноманіття цього виду в досліджуваному регіоні. В той же час було виявлено внутрішньопопуляційний поліморфізм за I-им інтроном генів β -тубуліну.

6. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину дозволила отримати видоспецифічні ДНК-профілі досліджених сортів пшениці (*T. aestivum*), ячменю (*H. vulgare*) та рису (*O. sativa*). Вдалося диференціювати між собою сорти пшениці та ячміню, а їх внутрішньосортові вибірки охарактеризовано як генетично гетерогенні. В той же час сорти рису виявилися генетично однорідними за результатами аналізу поліморфізму інтронів генів актину. Таким чином, оцінка поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину в цілому може бути використана як інструмент для генотипування та диференціації злакових культур.

7. ТВР/сТВР-аналіз та аналіз поліморфізму інтронів генів актину виявилися ефективними інструментами для фінгерпринтингу сортів та

сортотразків *C. sativa* української селекції. Більшість генотипів *C. sativa* були чітко диференційовані між собою, маючи свій власний унікальний ДНК-профіль.

8. Результати TBP-аналізу сортів *L. usitatissimum* свідчать про те, що всі досліджені зразки мають досить чіткі ДНК-профілі, за якими їх можна ідентифікувати та диференціювати один від одного. На підставі аналізу TBP- та сTBP-профілів різних видів *Linum* L. побудовано дендрограми, які демонструють схожу картину філогенії видів роду. TBP- та ABP-аналіз дозволив диференціювати ландраси *L. usitatissimum* білоруської селекції та дослідити їх внутрішньосортову гетерогенність.

9. Аналіз 16 сортів льону (*L. usitatissimum*) української селекції виявив міжсортний поліморфізм інтронів генів β -тубуліну та актину. Подальше дослідження українських сортів льону на внутрішньосортовому рівні за допомогою TBP-, ABP- та SSR-маркерів виявило, що більшість сортів льону української селекції є генетично гетерогенними. Лише тільки два сорти, Сіверський та Глазур, селекції Інституту луб'яних культур НААН України, виявилися гомогенними, всі інші сорти мали поліморфізм хоча б за одним видом маркерів. Продемонстрована досить висока ефективність використання ILP-аналізу для диференціації генотипів льону в порівнянні з SSR-маркерами.

10. За допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину та α -тубуліну генотиповано сорти томату (*S. lycopersicum*) та картоплі (*S. tuberosum*), отримано специфічні ДНК-профілі досліджених сортів. Більш поліморфною виявилася вибірка сортів картоплі, в той час як сорти томату мали значну генетичну спорідненість.

11. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у видів деревних рослин дозволяє чітко диференціювати види одного роду між собою та отримувати інформацію про внутрішньовидовий поліморфізм цих рослин.

12. У дерев ранньої фенологічної форми (*Q. robur* var. *praecox*) виявлено 9 унікальних алелів за мікросателітними локусами (qugu-GA-1C08: 266, 282, 284, 286; qugu-GA-0C19: 219, 228; QPZAG9: 180, 194, 212) та 4 фрагменти за ТВР-маркерами (з приблизним розміром 310 п.н., 400 п.н., 405 п.н., 480 п.н.), а у *Q. robur* var. *tardiflora* – 5 унікальних алелей за мікросателітними локусами (qugu-GA-1C08: 262, 268; qugu-GA-0C19: 323, 258; QPZAG9: 206) та 5 фрагментів за ТВР-маркерами (з приблизним розміром 425 п.н., 440 п.н., 445 п.н., 515 п.н. та 1330 п.н.). Охарактеризовано відмінності за частотою предомінантних алелів qugu-GA-0C19-222 (практично відсутній у вибірці пізньої фенологічної форми) та qugu-GA-0C19-226 (частота сягає більше 80% у ранньої фенологічної форми і лише біля 50% у пізньої). Виявлений поліморфізм фенологічних форм *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* вказує на те, що відмінності можуть бути генетично обумовлені, а різні види ДНК-маркерів використані для генетичного профілювання *Q. robur*.

13. Встановлено, що інвазивні види Степового Придніпров'я - в'яз карликовий (*U. pumila*) та в'яз корковий (*U. suberosa*) - мають чіткі генетичні відмінності за п'ятьма мікросателітними локусами (UR138, UR153, UR158, UR173b, UR101) та ТВР-маркерами. Зокрема, у в'язу коркового ці мікросателітні локуси виявилися мономорфними, а алелі UR153: 191 п.н.; UR158: 177 п.н. були відсутні у *U. pumila*.

14. Продемонстровано, що *U. pumila* і *U. suberosa* у Степовому Придніпров'ї як за мікросателітними локусами, так і за ТВР-маркерами характеризуються відносно низьким рівнем генетичної мінливості. Значення показників, що характеризують генетичний поліморфізм *U. pumila* за мікросателітними локусами, варіюють в межах: $N_e = 1,635 - 1,973$, $I = 0,660 - 0,791$, $H_e = 0,354 - 0,455$, $H_o = 0,260 - 0,350$. Наявна гетерозиготність за цим видом генетичних маркерів на всіх ділянках була значно нижчою очікуваною за рахунок надлишку гомозиготних генотипів, що опосередковано говорить про певний рівень інбредності аналізованих рослин. Низький рівень

генетичної мінливості також встановлено за результатами ТВР-аналізу. У *U. pumila* виявлено амплікони довжиною від 380 п.н. до 1100 п.н. ТВР-аналіз дерев *U. suberosa* загалом виявив 10 мономорфних фрагментів. Показники, що характеризують генетичний поліморфізм *U. Pumila* за ТВР-маркерами варіювали в межах: $N_e = 1,239 - 1,525$, $I = 0,252 - 0,460$, $PI_C = 0,155 - 0,395$.

15. ТВР- та сТВР-методи дозволяють якісно генотипувати різні види та штами мікрводоростей, які належать до зелених (Chlorophyta), жовто-зелених (Ochrophyta) та еугленофітових (Euglenophyta) водоростей. Специфічні ТВР- та сТВР-профілі у досліджених зразків мікрводоростей значно відрізнялися між собою за кількістю та розташуванням цільових ампліконів, що дозволило чітко диференціювати різні генотипи мікрводоростей. Окрім того, обидві маркерні системи однозначно підтвердили однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму. Отримані результати в цілому свідчать про доцільність подальшого використання даних ІЛР-маркерів для генотипування та аналізу різних таксонів водоростей.

16. ІЛР-маркерна система, яка дозволяє оцінити поліморфізм довжини І інтрону генів α -тубуліну у різних видів рослин, є універсальною і дозволяє проводити генотипування та диференціацію різних видів (сортів) рослин, поєднуючи в собі надійність та швидкість отримання вихідних даних і простоту їхнього аналізу. Вона може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу вищих рослин як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abdollahi Mandoulakani B, Nasri S, Dashchi S, Arzhang S, Bernousi I, Holasou HA. Preliminary evidence for associations between molecular markers and quantitative traits in a set of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and breeding lines. *C.R. Biol.* 2017; 340(6/7): 307–313.
2. Abou-Taleb EM, Aboshosha SM, El-Sherif EM, El-Komy MH. Genetic diversity among late blight resistant and susceptible potato genotypes. *Saudi. J. Biol. Sci.* 2010; 17(2): 133–138.
3. Akbari M, Wenzl P, Caig V, Carling J, Xia L, Yang S, Uszynski G, Mohler V, Lehmensiek A, Kuchel H, Hayden MJ, Howes N, Sharp P, Vaughan P, Rathmell B, Huttner E, Kilian A. Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor Appl Genet.* 2006; 113(8): 1409–1420.
4. Aldrich PR, Cavender-Bares J. *Quercus*. In: Kole C (Ed.) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Forest Trees*. Springer-Verlag, Berlin, 2011: 89–129.
5. Aldrich PR, Jagtap M, Michler CH, Romero-Severson J. Amplification of north american red oak microsatellite markers in european white oaks and chinese chestnut. *Silvae Genetica.* 2003; 52(3-4): 176–179.
6. Aldrich PR, Michler CH, Sun W, Romero-Severson J. Microsatellite markers for northern red oak (Fagaceae: *Quercus rubra*). *Mol. Ecol. Notes.* 2002; 2(4): 472–474.
7. Aldrich PR, Parker GR, Michler CH, Romero-Severson J. Whole-tree silvic identifications and the microsatellite genetic structure of a red oak species complex in an Indiana old-growth forest. *Can. J. Forest Res.* 2003; 33(11): 2228–2237.
8. Allaby RG, Peterson GW, Merriwether DA, Fu YB. Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the sad2 locus. *Theor. Appl. Genet.* 2005; 112(1): 58–65.

9. Andersen J.R., Lubberstedt T. Functional markers in plants. *Trends Plant Sci.* 2003; 8(11): 554–560.
10. Andersen M.C. Adams H., Hope B., Powell M. Risk Assessment for Invasive Species. *Risk Analysis.* 2004; 24(4): 787–793.
11. Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome.* 1993; 36: 181–186.
12. Andrade-Navarro MA. The Dictionary of genomics, transcriptomics, and proteomics. *BioEssays.* 2009; 31: 1367–9.
13. Angaji SA. QTL mapping: a few key points. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 2009; 2(2): 1–3.
14. Antonyuk MZ, Prokopyk DO, Martynenko VS, Ternovska TK. Identification of the genes promoting awnedness in the *Triticum Aestivum/Aegilops Umbellulata* introgressive line. *Cyt. Genet.* 2012; 46(3): 136-143.
15. Antonyuk M, Navalikhina A, Ternovska T. Beta-amylase gene variability in introgressive wheat lines. *J Appl Genetics.* 2017; 58(2): 143–149.
16. Ashley MV, Abraham ST, Backs JR, Koenig WD. Landscape genetics and population structure in Valley Oak (*Quercus lobata* Ne'e). *Am J Bot.* 2015; 102(12): 2124–2131.
17. Babu B, Senthil N, Gomes S, Biji K, Rajendraprasad N, Kumar S, Babu R. Assessment of genetic diversity among finger millet (*Eleusine coracana* L.) accessions using molecular markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 2007; 54: 399–404.
18. Badoni S, Das S, Sayal YK, Gopalakrishnan S, Singh AK, Rao AR, Agarwal P, Parida SK, Tyagi AK. Genome-wide generation and use of informative intron-spanning and intron-length polymorphism markers for high-throughput genetic analysis in rice. *Sci. Rep.* 2016; 6: 23765.
19. Baird WV, Meagher RB. A complex gene superfamily encodes actin in petunia. *EMBO J.* 1987; 6(11): 3223–3231.

20. Bajpai PK, Warghat AR, Sharma RK, Yadav A, Thakur AK, Srivastava RB, Stobdan T. Structure and genetic diversity of natural populations of *Morus alba* in the Trans-Himalayan Ladakh region. *Biochem Genet.* 2014; 52(3-4): 137–152.
21. Ballian D, Belletti P, Ferrazzini D, Bogunik F, Kajba D. Genetic variability of Pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in Bosnia and Herzegovina. *Periodicum Biologorum.* 2010; 112 (3) : 353–362.
22. Bardini M, Lee D, Donini P, Mariani A, Giani S, Toschi M, Lowe C, Breviaro D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome.* 2004; 47(2): 281–291.
23. Batos B, Miljkovic D, Ninic-Todorovic J. Length of vegetation period as parameter of common oak (*Quercus robur* L.) phenological variability. *Genetika.* 2012; 44 (1): 139–152.
24. Batzoglou S, Pachter L, Mesirov JP, Berger B, Lander ES. Human and mouse gene structure: comparative analysis and application to exon prediction. *Genome Res.* 2000; 10: 950–58.
25. Bertolasi B, Leonarduzzi C, Piotti A, Leonardi S, Zago L, Gui L, Gorian F, Vanetti I, Binelli G. A last stand in the Po valley: genetic structure and gene flow patterns in *Ulmus minor* and *U. pumila*. *Ann Bot.* 2015; 115(4): 683–692.
26. Bhattacharya D, Aubry J, Twait EC, Jurk S. Actin gene duplication and the evolution of morphological complexity in land plants. *J. Phycol.* 2000; 36(5): 813–820.
27. Bishoyi AK, Sharma A, Kavane A, Geetha KA. Varietal discrimination and genetic variability analysis of *Cymbopogon* using RAPD and ISSR markers analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016; 179(4): 659–670.
28. Blair AC, Wolfe LM. The evolution of an invasive plant: an experimental study with *Silene latifolia*. *Ecology.* 2004; 85(11): 3035–3042.

29. Blakeney M. Intellectual property, biological diversity and agricultural research in Australia. *Austral. J. Agric. Res.* 2002; 53: 127–147.
30. Blume Ya, Lloyd CV, Yemets AI. Plant tubulin phosphorylation. *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for agrobiotechnology*. Berlin; Heidelberg; NY: Springer-Verlag. 2008; 145–159.
31. Blume YaB, Baird WV, Yemets AI, Breviario D. The plant cytoskeleton: key tool for agro–biotechnology. Berlin, Heidelberg, NY: Springer–Verlag. 2008: 457.
32. Bornet B, Goraguer F, Joly G, Branchard M. Genetic diversity in european and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome*. 2002; 45(3): 481–484.
33. Braglia L, Gavazzi F, Giovannini A, Nicoletti F, De Benedetti L, Breviario D. TBP–assisted species and hybrid identification in the genus *Passiflora*. *Mol Breeding*. 2014; 33: 209–219.
34. Braglia LB, Manca AM, Mastromauro FM, Breviario D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)–based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity*. 2010; 2(4): 572–585.
35. Branco CJ, Vieira EA, Malone G, Kopp MM, Malone E, Bernardes A et al. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *J. Appl. Genet.* 2007; 48(2): 107–113.
36. Breviario D, Baird WV, Sangoi S, Hilu K, Blumetti P, Giani S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined β –tubulin introns. *Mol. Breed.* 2007; 20(3): 249–259.
37. Breviario D, Gian S, Morello L. Multiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications. *Plant J.* 2013; 75(2): 202–218.
38. Breviario D, Gianì S, Ponzoni E, Mastromauro F, Morello L. Plant tubulin intronics. *Cell Biol. Int.* 2008; 32: 571–573.
39. Breviario D. *Plant Tubulin Genes: Regulatory and Evolutionary Aspects*. Berlin Heidelberg, Springer–Verlag: Plant Cell Monogr; 2008.

40. Brummett RE, Noble R. Aquaculture for African Smallholders. ICLARM Tech. Rep. 1995; 46: 69.
41. Brunet J, Zalapa J.E., Pecori F., Santini A. Hybridization and introgression between the exotic Siberian elm, *Ulmus pumila*, and the native Field elm, *U. minor*, in Italy. *Biol Invasions*. 2013; 10: 53–66.
42. Campanaccia V, Urvoasa A, Cantos-Fernandesa S, Aumont-Nicaisea M, Artenia AA, Velours C, Valerio-Lepiniec M, Dreier B, Plückthun A, Pilon A, Poüs C, Minard P, Gigant B. Insight into microtubule nucleation from tubulin-capping proteins. *PNAS*. 2019; 116(20): 9859–9864.
43. Carabeo M, Cherubini M, Simeone MC. Estimating the genetic diversity and structure of *Quercus trojana* Webb populations in Italy by SSRs: implications for management and conservation. *Can. J. For. Res.* 2017; 47(3): 331–339.
44. Casacas F, Simy J, Casals J, Prohens J. An evolved concept of landrace. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 145.
45. Castelo AT, Martins W, Gao GR. ROLL-tandem repeat occurrence locator. *Bioinformatics*. 2002; 18(4): 634–636.
46. Castro AJ, Capettini F, Corey AE, Filichkina T, Hayes PM, Kleinhofs A, Kudrna D, Richardson K, Sandoval-Islas S, Rossi C, Vivar H. Mapping and pyramiding of qualitative and quantitative resistance to stripe rust in barley. *Theor Appl Genet.* 2003; 107(5): 922–930.
47. Cervera MT, Ruiz-Garcia L, Martínez-Zapater JM. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol. Genet. Genomics*. 2002; 268: 543–552.
48. Chandrawati, Singh N, Kumar R, Kumar S, Singh PK, Yadav VK, Ranade SA, Yadav HK. Genetic diversity, population structure and association analysis in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Physiol Mol Biol Plants*. 2017; 23(1): 207–219.
49. Chaudhary V, Kumar M, Sharma S, Kumar N, Kumar V, Yadav HK, Sharma S, Sirohi U. Assessment of genetic diversity and population structure in

- gladiolus (*Gladiolus hybridus* Hort.) by ISSR markers. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2018; 24(3): 493–501.
50. Chen X, Zhang G, Wu W. Investigation and utilization of intron length polymorphisms in conifers. *New Forests*. 2010.
 51. Chikkaswamy BK, Paramanik RCh. Molecular Distinction of algae using molecular marker. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2016; 5(9): 489–495.
 52. Choi HK, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun JH, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR. A Sequence-Based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of Marker Colinearity with *M. sativa*. *Genetics*. 2004; 166(3): 1463–1502.
 53. Chokheli V, Kozlovsky B, Sereda M, Lysenko V, Fesenko I, Varduny T, Kapralova O, Bondarenko E. Preliminary comparative analysis of phenological varieties of *Quercus robur* by ISSR-Markers. *Journal of Botany*. 2016: 1–7.
 54. Chung MY, Nason J, Chung MG, Kim KJ, Park CW, Sun BY, Pak JH. Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *Amer. J. Bot.* 2002; 89(8): 1229–1236.
 55. Chwedorzewska KJ, Giełwanowska I, Szczuka E, Bochenek A. High anatomical and low genetic diversity in *Deschampsia antarctica* Desv. from King George Island, the Antarctic. *Pol. Polar Res*. 2008; 29(4): 377–386.
 56. Cloix C, Tutois S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosomespecific polymorphisms. *Genom Res*. 2000; 10: 679–690.
 57. Cloutier S, Ragupathy R, Miranda E, Radovanovic N, Reimer E, Walichnowski A, Ward K, Rowland G, Duguid S, Banik M. Integrated consensus genetic and physical maps of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Theor Appl Genet*. 2012; 125(8): 1783–1795.
 58. Coelho AC, Lima MB, Neves D, Cravador A. Genetic diversity of two evergreen oaks (*Quercus suber* L. and *Q. (ilex) rotundifolia* Lam.) in Portugal using AFLP markers. *Silvae Genetica*. 2006; 55(3): 105–118.

59. Cole CT. Genetic variation in rare and common plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2003; 34:213–237.
60. Collard BC, Mackill DJ. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): a simple and novel method for generating DNA markers in plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2009; 27: 558–562.
61. Collard BC, Mackill DJ. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2008; 363(1491): 557–572.
62. Comeron, JM, Kreitman M. The correlation between intron length and recombination in *Drosophila*: Dynamic equilibrium between mutational and selective forces. *Genetics.* 2000; 156: 1175–1190.
63. Côte-Real HBSM, Dixon DR, Holland PWH. Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Mar. Biol.* 1994; 120: 407–413.
64. Cottrell JE, Munro RC, Tabbener HE, Milner AD, Forrest GI, Lowe AJ. Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oak woods differing in population history. *Forest Ecology and Management*, 2003, 176(1-3): 287–303.
65. Coutinho JP, Carvalho A, Lima-Brito J. Taxonomic and ecological discrimination of Fagaceae species based on internal transcribed spacer polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *AoB Plants.* 2015; 7(1): 79.
66. Cummins SK, Jackson RJ. The built environment and children's health. *Pediatric Clinics of North America.* 2001; 48(5): 1241–1252.
67. Curtu AL, Craciunesc I, Enescu CM, Vidalis A, Sofletea N. Fine-scale spatial genetic structure in a multi-oak-species (*Quercus* spp.) forest. *iForest - Biogeosciences and Forestry.* 2015; 8(3): 324–332.
68. Dantec CF, Ducasse H, Capdevielle X, Fabreguettes O, Delzon S, Desprez-Loustau M. Escape of spring frost and disease through phenological

- variations in oak populations along elevation gradients. *J. Ecol.* 2015; 103(4): 1044–1056.
69. del Puerto MM, García MF, Mohanty A, Martín J. Genetic diversity in relict and fragmented populations of *Ulmus glabra* Hudson in the central system of the Iberian peninsula. *Forests.* 2017; 8(5): 143.
70. Demirkiran A, Marakli S, Temel A, Gozukirmizi N. Genetic and epigenetic effects of salinity on in vitro growth of barley. *Genet. Mol. Biol.* 2013; 36(4): 566–570.
71. Derzhavne ahentstvo lisovykh resursiv Ukrayiny [State Forest Resources Agency of Ukraine], 2016. [Electronic resource] (in Ukrainian).
72. Dhaliwal HS, Harjit–Singh, William M. Transfer of rust resistance from *Aegilops ovata* into bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and molecular characterisation of resistant derivatives. *Euphytica.* 2002; 126(2): 153–159.
73. Dhingani RM, Umrana VV, Tomar RS, Parakhia MV, Golakiya BA. Introduction to QTL mapping in plants. *Ann. Plant Sci.* 2015; 4(04): 1072–1079.
74. Dida MM, Devos KM, eds. Kole C. Genome mapping and molecular breeding in plants. Cereal and millets: Finger millet. Heidelberg: Springer. 2006: 297.
75. Diwan N, Cregan PB. Automated sizing of fluorescent–labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor Appl Genet.* 1997; 95: 723–33.
76. Dix M.E., Buford M., Slavicek J, Solomon AM. Invasive species and disturbances: Current and future roles of Forest Service Research and Development. *Invasive Species.* 2009: 91–102.
77. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 2011; 40: 169–186.
78. Dow BD, Ashley MV, Howe HF. Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor. Appl. Genetics.* 1995; 91(1): 137–141.

79. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987; 19: 11–15.
80. Duvick DN. Genetic diversity in major farm crops on the farm and in reserve. *Econom. Bot.* 1984; 38(2): 161–178.
81. Dzialuk AB. Pcr–multiplex of six chloroplast microsatellites for population studies and genetic typing in *Pinus sylvestris*. *Silvae Genet.* 2004; 53(5–6): 246–248
82. Ebert D, Peakall RO. 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; 9(3): 673–690.
83. Edwards SR, Johnson TL. Intron RNA sequences help yeast cells to survive starvation. *Nature*. 2019; 565(7741): 578-579.
84. Elakhdar A, El-Sattar MA, Amer K, Rady A, Kumamaru T. Population structure and marker-trait association of salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *C. R. Biol.* 2016; 339(11/12): 454–461.
85. Ellis R, Burke JM. EST–SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*. 2007; 99: 125–132.
86. Ellstrand NC, Schierenbeck K. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2000; 97: 7043–7050.
87. El-Rabey HA, Badr A, Schafer-Pregl R, Martin W, Salamini F. Speciation and Species Separation in *Hordeum* L. (*Poaceae*) Resolved by Discontinuous Molecular Markers. *Plant Biol.* 2002; 4: 567–575.
88. Erturk FA, Nardemir G, Hilal AY, Arslan E, Agar G. Determination of genotoxic effects of boron and zinc on *Zea mays* using protein and random amplification of polymorphic DNA analyses. *Toxicol. Ind. Health.* 2015; 31(11): 1015–1023.
89. Everaert I, Riek JD, Loose MD, Waes JV, Bockstaele EV. Most similar variety grouping for distinctness evaluation of flax and linseed (*Linum*

- usitatissimum* L.) varieties by means of AFLP and morphological data. *Plant Var. Seeds*. 2001; 14: 69–87.
90. Fakrudin B, Shashidhar HE, Kulkarni RS, Hittalmani S. Genetic diversity assessment of finger millet, *Eleusine coracana*, germplasm through RAPD analysis. *Plant Genet. Res. Newsl.* 2004; 138:50–54.
 91. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*. 2007; 7: 574–578.
 92. Farache D, Emorine L, Haren L, Merdes A. Assembly and regulation of γ -tubulin complexes. *Open Biol.* 2018; 8(3): 170266.
 93. Favery B, Ryan E, Foreman J, Linstead P, Boudonck K, Steer M, Shaw P, Dolan L. KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* 2001; 15: 79–89.
 94. Feltus FA, Singh HP, Lohithaswa HC, Schulze SR, Silva TD, Paterson AH. A comparative genomics strategy for targeted discovery of single nucleotide polymorphisms and conserved–noncoding sequences in orphan crops. *Plant Physiol.* 2006; 140:1183–1191.
 95. Feng S, Zhu Y, Yu C, Jiao K, Jiang M, Lu J, Shen C, Ying Q, Wang H. Development of species-specific SCAR markers, based on a SCoT analysis, to authenticate *Physalis* (Solanaceae) species. *Frontiers in Genetics*. 2018; 9: 192.
 96. Feng Y, Sun W, Romero-Severson J. Heterogeneity and Spatial Autocorrelation for Chloroplast Haplotypes in Three Old Growth Populations of Northern Red Oak. *Silvae Genetica*. 2008; 57(1–6): 212–220.
 97. Fernandez E, Figueiras M, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.* 2002; 104(5): 845–851.

98. Fernandez-M JF, Sork VL. Mating patterns of a subdivided population of the Andean oak (*Quercus humboldtii* Bonpl., Fagaceae). *Journal of Heredity*. 2005; 96: 635–643.
99. Ferreira AO, Cardoso HG, Macedo ES, Breviario D, Arnholdt-Schmitt B. Intron polymorphism pattern in AOX1b of wild St John's wort (*Hipericum perforatum*) allows discrimination between individual plants. *Physiol. Plant*. 2009; 137: 520–531.
100. Findeisen P, Mühlhausen S, Dempewolf S, Hertzog J, Zietlow A, Carlomagno T, Kollmar M. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol*. 2014; 6(9): 2274–2288.
101. Fiume E, Christou P, Gianì S, Breviario D. Introns are key regulatory elements of rice tubulin expression . *Planta*. 2004; 218: 693–703.
102. Frohlich A, Rice B. Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production. *Ind Crops Prod*. 2005; 21: 25–31.
103. Frouz J, Vobořilová V, Janoušová I, Kadochová Š, Matějčiček L. Spontaneous establishment of late successional tree species English oak (*Quercus robur*) and European beech (*Fagus sylvatica*) at reclaimed alder plantation and unreclaimed post mining sites. *Ecol. Engineering*. 2015; 77: 1–8.
104. Fu YB. Redundancy and distinctiveness in flax germplasm as revealed by RAPD dissimilarity. *Plant Genet Resour*. 2006; 4: 117–124.
105. Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C. The tubulin code at a glance. *J Cell Sci*. 2017; 130(8): 1347–1353.
106. Galasso I, Manca A, Braglia L, Martinelli T, Morello L, Breviario D. h-TBP: an approach based on intron-length polymorphism for the rapid isolation and characterization of the multiple members of the b-tubulin gene family in *Camelina sativa* (L.) Crantz . *Mol Breeding*. 2011; 28: 635–645.
107. Galasso I, Manca A, Braglia L, Ponzoni E, Breviario D. Genomic fingerprinting of *Camelina* Species using cTBP as molecular marker. *American J. Plant Sci*. 2015; 6(8): 1184-1200.

108. Ganopoulos IV, Kazantzis K, Chatzicharisis I, Karayiannis I, Tsaftaris AS. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. *Euphytica: Netherlands J Plant Breed.* 2011; 181(2): 237–251.
109. Gao L, Tang J, Li H, Jia J. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Mol Breed.* 2003; 12(3): 245–261.
110. García-Gómez H, Aguillaume L, Izquieta-Rojano S, Valiño F, Àvila A, Elustondo D, Santamaría JM, Alastuey A, Calvete-Sogo H, González-Fernández I, Alonso R. Atmospheric pollutants in peri-urban forests of *Quercus ilex*: evidence of pollution abatement and threats for vegetation. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016; 23(7): 6400-6413.
111. Gaudeul M, Taberlet P, Till BI. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology.* 2000; 9: 1625–1637.
112. Gavazzi F, Braglia L, Mastromauro F, Gianm S, Morello L, Breviario D. The tubulin-based-polymorphism method provides a simple and effective alternative to the genomic profiling of grape. *Plos One.* 2016; 11(9): e0163335.
113. Gavazzi F, Casazza AP, Depedro C, Mastromauro F, Breviario D. Technical improvement of the TBP (tubulin-based polymorphism) method for plant species detection, based on capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2012; 33(18): 2840–2551.
114. Gehringer A, Friedt W, Lühs W, Snowdon RJ. Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). *Genome.* 2006; 49: 1555–1563.
115. Gerber S, Chadœuf J, Gugerli F, Lascoux M, Buiteveld J, Cottrell J, Dounavi A, Fineschi S, Forrest LL, Fogelqvist J, Goicoechea PG, Jensen JS, Salvini D, Vendramin GG, Kremer A. High rates of gene flow by pollen and seed in oak populations across Europe. *PLoS ONE.* 2014; 9(1), e85130.

116. Ghamkhar K, Croser J, Aryamanesh N, Campbell M, Kon'kova N, Francis C. Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an Alternative Oilseed: Molecular and Ecogeographic Analyses. *Genome*. 2010; 53(7): 558–567.
117. Ghislain M, Andrade D, Rodríguez F, Hijmans RJ, Spooner DM. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theor. Appl. Genet.* 2006; 113(8): 1515–1527.
118. Gian S, Breviario D. Rice β -tubulin mRNA levels are modulated during flower development and in response to external stimuli. *Plant Sci.* 1996; 116: 147–157.
119. Gianì S, Di Cesare V, Gavazzi F, Morello L, Breviario D. Tubulin-based polymorphism genome profiling: a novel method for animal species authentication in meat and poultry. *Plant Methods*. 2020; 10.
120. Gilliland LU, Pawloski LC, Kandasamy MK, Meagher RB. Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *Plant J.* 2003; 33(2): 319–328.
121. Gimode D, Odeny DA, de Villiers EP, Wanyonyi S, Dida MM, Mnene EE, Muchugi A, Machuka J, de Villiers SM. Identification of SNP and SSR Markers in Finger Millet Using Next Generation Sequencing Technologies. *Plos One*. 2016; 11(7): e0159437.
122. Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 1178-1186.
123. Gostimskii SA, Kokaeva ZG, Konovalov FA. Studying plant genome variation using molecular markers. *Genetika*. 2005; 41(4): 480–92 (in Russian).
124. Gowda CLL, Upadhyaya HD, Sharma S, Varshney RK, Dwivedi SL. Exploiting genomic resources for efficient conservation and use of chickpea, groundnut, and pigeonpea collections for crop improvement. *Plant Genome-U.S.* 2013; 6.

125. Grice AC. The impacts of invasive plant species on the biodiversity of Australian rangelands. *The Rangeland Journal*. 2006; 28: 27–35.
126. Grivet D, Sork VL, Westfall RD, Davis FW. Conserving the evolutionary potential of California valley oak (*Quercus lobata* Née): a multivariate genetic approach to conservation planning. *Molecular ecology*, 2008; 17(1): 139–156.
127. Gugerli F, Brodbeck S, Holderegger R. Utility of multilocus genotypes for taxon assignment in stands of closely related European white oaks from Switzerland. *Annals of botany*. 2008; 102 (5): 855–863.
128. Guo Q, Wang JX, Su LZ, Lv W, Sun YH, Li Y. Development and evaluation of a novel set of EST-SSR markers based on transcriptome sequences of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) *Genes*. 2017; 8(7): 177.
129. Guo W, Hou J, Yin T, Chen Y. An analytical toolkit for polyploid willow discrimination. *Sci. Repts*. 2016; 6: 37702.
130. Gupta PK, Rustgi S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct. Integr. Genomics*. 2004; 4(3): 139–162.
131. Haftom B, Teklehaimanot H, Kassahun T. Genetic diversity and population structure of Ethiopian finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn) genotypes using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Afr J Biotechnol*. 2017; 16(21):1203–1209.
132. Hai L, Wagner C, Friedt W. Quantitative structure analysis of genetic diversity among spring bread wheats (*Triticum aestivum* L.) from different geographical regions. *Genetica*. 2007; 130(3): 213–225.
133. Hamidi H, Talebi R, Keshavarzi F. Comparative efficiency of functional gene-based markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Res. Commun*. 2014; 42(4): 558–567.

134. Hampe A, Pemonge MH, Petit RJ. Efficient mitigation of founder effects during the establishment of a leading-edge oak population. *Proceedings of the Royal Society B*. 2013; 280(1764): 20131070.
135. Han Z, Wang C, Song X, Guo W, Gou J, Li C, Chen X, Zhang T. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton. *Theor Appl Genet*. 2006; 112(3): 430–439.
136. He C, Liu H, Su S, Lu Y, Luo B, Nie Z, Wu L, Liu D, Zhang X, Rong T, Gao S, Léon J . Genome-wide identification of candidate phosphate starvation responsive genes and the development of intron length polymorphism markers in maize. *Plant Breed*. 2015; 134(1): 11–16.
137. Hedge SG, Nason JD, Clegg JM, Ellstrand NC. The evolution of California's wild radish has resulted in the extinction of its progenitors. *Evolution*. 2006; 60: 1187–1197.
138. Hellmanna JJ, Pineda-Krch M. Constraints and reinforcement on adaptation under climate change: Selection of genetically correlated traits. *Biological Conservation*. 2007; 137(4): 599–609.
139. Heubl G. DNA-based authentication of TCM-plants: current progress and future perspectives. *Evidence and National Based Research on Chinese Drugs*. Eds H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich. Vienna:Springer Vienna. 2013.
140. Hillis DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biol*. 1993; 42: 182–192.
141. Hirsch H, Brunet J, Zalapa JE, von Wehrden H, Hartmann M, Kleindienst C, Schlautman B, Kosman E, Wesche K, Renison D, Hensen. Intra- and interspecific hybridization in invasive Siberian elm. *Biol. Invasions*. 2017; 19(6): 1889–1904.
142. Hongtrakul V, Huestis GM, Knapp SJ. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *TAG Theor. Appl. Genet*. 1997; 95(3): 400–407.

143. Huang SR, An YQ, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB. The *Arabidopsis* ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Mol. Biol.* 1997; 33: 125–139.
144. Hulme PE., Nentwig W, Pyšek P, Vilà M. Common market, shared problems: time for a coordinated response to biological invasions in Europe? In: *Biological Invasions*. 2009; 8: 3–19.
145. Hussey PJ, Snustad DP, Silflow CD. Tubulin gene expression in higher plants. In: Lloyd CW (ed) *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. London: Academic Press, 1991: 15–27.
146. Hutcheon C, Ditt RF, Beilstein M, Comai L, Schroeder J, Goldstein E, Shewmaker CK, Nguyen T, De Rocher J, Kiser J. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes. *BMC Plant Biol.* 2010; 10: 233.
147. IATA Report “Report on alternative fuels” 5th Edition Ref. Montreal–Geneva. 2010; 9709–03: 88.
148. Igea J, Juste J, Castresana J, et al. Novel intron markers to study the phylogeny of closely related mammalian species. *BMC Evolutionary Biology.* 2010; 10: 369.
149. Inada DC, Bashir A, Lee C, Thomas BC, Ko C, Goff SA, Freeling M. Conserved noncoding sequences in the grasses. *Genome Res.* 2003; 13: 2030–2041.
150. Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO, Kunakh VA, Volkov RA. Molecular Organization of 5S Ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol Genet.* 2018; 52(6): 416–421.
151. Ishikawa G, Yonemaru J, Saito M, Nakamura T. PCR–based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes. *BMC Genomics.* 2007; 8:135.

152. Ivanovych Y, Volkov R. Genetic relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from Ukraine determined by microsatellite markers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2018; 93: 64–72.
153. Ivanovych YaI, Udovychenko KM, Bublyk MO, Volkov RA. ISSR-PCR fingerprinting of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Cytol. Genet.* 2017; 51(1): 40–47.
154. Jacobsen R, Forbes VE, Skovgaard O. Genetic population structure of the prosobranch snail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) in Denmark using PCR-RAPD fingerprints. *Proc Biol Sci.* 1996; 263(1373): 1065-70.
155. Jagadeesh SN, Muthukumar M, Hifzur R, Senthil N, Raveendran M. Development and validation of SSR markers in Finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn). *International Journal of Tropical Agriculture.* 2015; 33(3): 2055–66.
156. Jaikishan I, Rajendrakumar P, Madhusudhana R, Elangovan M, Patil JV . Development and utility of PCR-based intron polymorphism markers in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 2015; 18: 309–318.
157. Jensen J, Larsen A, Nielsen LR, Cottrell J. Hybridization between *Quercus robur* and *Q. petraea* in a mixed oak stand in Denmark. *Annals of Forest Science.* 2009; 66 (7): 706.
158. Jensen JS, Olrik DC, Siegismund HR, Lowe AJ. Population Genetics and Spatial Autocorrelation in an Unmanaged Stand of *Quercus petraea* in Denmark. *Scandinavian Journal of Forest Research.* 2003; 18(4): 295–304.
159. Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Kim C, An G. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, OsTubA1, mediated by the first intron. *Plant Physiol.* 2000; 123(3): 1005–1014.
160. Jhala AJ, Hall LM. Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current uses and future applications. *Austral J Basic Appl Sci.* 2010; 4(9): 4304–4312.
161. Jian LC, Sun LH, Liu ZP. Studies on microtubule cold stability in relation to plant cold hardiness. *Acta Bot. Sinica.* 1989; 31: 737–741.

162. Jiang L, Zang D. Analysis of genetic relationships in *Rosa rugosa* using conserved DNA-derived polymorphism markers. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2018; 32(1): 88–94.
163. Jiang Y, Zhao Y, Rodemann B, Plieske J, Kollers S, Korzun V, Ebmeyer E, Argillier O, Hinze M, Ling J, Röder MS, Ganai MW, Mette MF, Reif JC. Potential and limits to unravel the genetic architecture and predict the variation of Fusarium head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Heredity (Edinb)*. 2015; 114(3): 318–326.
164. Jing HC, Bayon C, Kanyuka K, Berry S, Wenzl P, Huttner E, Kilian A, Hammond-Kosack KE. DArT markers: diversity analyses, genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in *Triticum monococcum*. *BMC Genomics* 2009; 10: 458.
165. Joshi CP, Nguyen T. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. *Plant Sci.* 1993; 93: 95–103.
166. Joyce CM, Villemur R, Snustad DP, Silflow CD. Tubulin gene expression in maize (*Zea mays* L.): Change in isotype expression along the developmental axis of seedling root. *J. MOI. Biol.* 1992; 227(1): 97–107.
167. Kagale S, Koh C, Nixon J, Bollina V, Clarke WE, Tuteja R, Spillane C, Robinson SJ, Links MG, Clarke C, Higgins EE, Huebert T, Sharpe AG, Parkin IA. The Emerging Biofuel Crop *Camelina sativa* Retains a Highly Undifferentiated Hexaploid Genome Structure. *Nat Commun.* 2014; 5: 3706.
168. Kalendar R, Flavell AJ, Ellis T.H., Sjakste T, Moisy C, Schulman AH. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity.* 2011; 106(4): 520–530.
169. Kalendar R, Schulman AH. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols.* 2006; 1(5): 2478–2484.
170. Kalendar R, Schulman AH. Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1115: 233–255.

171. Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 2011; 177(3): 309–334.
172. Kalkıs O, Okcu M, Okcu Z, Karabulut B, Yildirim N, Agar G. Relationships among some pears genotypes (*Pyrus communis* L.) based on ISSR and RAPD analysis. *Erwerbs-Obstbau*. 2016; 58(4): 259–264.
173. Katičić Bogdan I, Kajba D, Šatović Z, Schüler S, Bogdan S. Genetic Diversity of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.) in Clonal Seed Orchards in Croatia, Assessed by Nuclear and Chloroplast Microsatellites. *South-east European forestry*. 2018; 9 (1): 29–46.
174. Kerr GP, Carter JV. Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation. *Plant Physiol*. 1990; 93: 77–82.
175. Khlestkina EK. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2014; 4 (3): 236–244.
176. Kilchevsky AV, Khotyleva LV. (Eds.) Genetic aspects of plant breeding: Biotechnology in plant breeding. Genomics and Genetic Engineering. Minsk: Belaruskaya Navuka; 2014; 4 (in Russ.).
177. Kim E, Wriggers W, Phillips M, Kokabi K, Rubenstein PA, Reisler E. Cross-linking constraints on F-actin structure. *J. Mol. Biol.* 2000; 299: 421–429.
178. Kim J, Jo BH, Lee KL, Yoon ES, Ryu GH, Chung KW. Identification of new microsatellite markers in *Panax ginseng*. *Mol Cells*. 2007; 24(1): 60–68.
179. Kim JK, An GH, Ahn SH, Moon YH, Cha YL, Bark ST, Choi YH, Suh SJ, Seo SG, Kim SH, Koo BC. Development of SCAR marker for simultaneous identification of *Miscanthus sacchariflorus*, *M. sinensis* and *M. x giganteus*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012; 35: 55–59.
180. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge University Press; 1983.
181. King BR, Moritz M, Kim H, Agard DA, Asbury CL, Davis TN. XMAP215 and γ -tubulin additively promote microtubule nucleation in purified solutions *bioRxiv*. 2020; 109561.

182. Koebner RMD, Powell W, Donini P. Contributions of DNA molecular marker technologies to the genetics and breeding of wheat and barley. *Plant Breed Rev.* 2001; 21:181–220.
183. Koeyer DL, Phillips RL, Stuthman DD. Changes in genetic diversity during seven cycles of recurrent selection for grain yield in oat, *Avena sativa* L. *Plant Breed.* 1999; 118(1): 37–43,
184. Kofler R, Schlotterer C, Lelley T. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics.* 2007; 23(13): 1683–1685.
185. Kolodinska Brantestam A, von Bothmer R, Dayteg C, Rashal I, Tuveesson S, Weibull J. Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. *Hereditas.* 2004; 141(2): 186–192.
186. Kondratyuk AV, Kilchevsky AV, Kuzminova EI. Microsatellite loci polymorphism analysis of Belarusian and foreign breeding potato varieties. *Mol Appl Genetics (Minsk).* 2005; 13: 24–29.
187. Koczak SD, Haas NA, Hussey PJ, Silflow CD, Snustad DP. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *Plant Cell,* 1992; 4: 539–547.
188. Korzun V. Use of molecular markers in cereal breeding. *Cellular and Molecular Biology Letters.* 2002; 7: 811–820.
189. Kravets OA, Pirko YaV, Kalafat LO, Rabokon AM, Postovoitova AS, Bilonozhko Yu O, Privalikhin SN, Lykholat YuV & Blume YaB. Genetic and Reproductive State Assessment of *Ulmus pumila* and *U. suberosa* Invasive Populations in the Dnieper Steppe under Climate Change. *Cytol. Genetics.* 2020; 54(1): 1–9.
190. Kremer A, Abbott AG, Carlson JE, Manos PS., Plomion C, Sisco P, Staton ME, Ueno S, Vendramin GG. Genomics of Fagaceae. *Tree Genetics Genomes.* 2012; 8(3): 583–610.

191. Kremer A, Petit RJ. Gene diversity in natural populations of oak species. *Annals of Forest Science*. 1993; 50(1): 186–202.
192. Kuhn BC, Lopez-Ribera I, da Silva Machado Mde F, Vicient CM. Genetic diversity of maize germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Electrophoresis*. 2014; 35(12-13): 1921–1927.
193. Kulibaba RA, Liashenko YV. Influence of the PCR artifacts on the genotyping efficiency by the microsatellite loci using native polyacrylamide gel electrophoresis. *Cytol Genet*. 2016; 50(3): 162–167.
194. Kunakh VA, Mel'nyk VM, Drobyk NM, Andreev IO, Spiridonova KV, Twardovska MO, Konvalyuk II, Adonin VI. Genetic Variation Induced by Tissue and Organ Culture in *Gentiana* Species. In: *The Gentianaceae. Biotechnology and Applications*. Ed. by. Rybczyński JJ, Davey MR, Mikula A. Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer. 2015; 2: 199–238.
195. Kumar A, Sharma N, Panwwar P, Gupta A. Use of SSR, RAPD markers and protein profiles based analysis to differentiate *Eleusine coracana* genotypes differing in their protein content. *Mol Biol Rep*. 2012; 39: 4949–60.
196. Larkin MA, Blackshields NP, Brown R, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23(21): 2947–2948.
197. Le Gall L, Lelong C, Rusig AM, Favrel P. Characterization of an actin gene family in *Palmaria palmata* and *Porphyra purpurea* (Rhodophyta). *Cah. Biol. Mar.* 2005; 46: 311–322.
198. Leroy T, Roux C, Villate L, Bodénès C, Romiguier J. Extensive recent secondary contacts between four European white oak species. *New Phytologist*. 2017; 214: 865–878.
199. Lessa EP, Applebaum G. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol Ecol*. 1993; 2: 119–129.
200. Lessa EP. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Mol Biol Evol*. 1992; 9: 323–330.

201. Li D, Xia Z, Deng Z, Liu X, Feng F. Development, characterization, genetic diversity and cross-species/genera transferability of ILP markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Genes Genom.* 2013; 35: 719–731.
202. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Eviatar N. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 2002; 11: 2453–2465.
203. Li JH, Jin ZX, Lou WY, Li JM. Genetic diversity of *Lithocarpus harlandii* populations in three forest communities with different succession stage. *Frontiers of Forestry in China.* 2008; 3(1): 106–111.
204. Li JN, Chong H, Peng G, Peng Zh, Dan L. A workflow of massive identification and application of intron markers using snakes as a model. *Ecol Evol.* 2017; 7(23): 10042–10055.
205. Li W, Zhang P, Fellers JP, Friebe B, Gill BS. Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. *Plant J.* 2004; 40(4): 500–511.
206. Li X, Tan L, Wang L; Hu S, Sun C. Isolation and characterization of conserved non-coding sequences among rice (*Oryza sativa* L.) paralogous regions. *Mol. Genet. Genomics.* 2009; 281: 11–18.
207. Li YH, Li W, Zhang C, Yang L, Chang RZ, Gaut BS, Qiu LJ. Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci. *New Phytol.* 2010; 188(1): 242–253.
208. Li YY. Screening of CDDP molecular marker primers for Tree Peony and analysis of its polymorphism. *J. Nucl. Agric. Sci.* 2013; 27(8): 1099–1105.
209. Liaud MF, Brinkmann H, Cerff R. The β -tubulin gene family of pea: primary structures, genomic organization and intron-dependent evolution of genes. *Plant Mol Biol.* 1992; 18: 639–651.
210. Lim J, Moon YH, An G, Jang SK. Two rice MADS domain proteins interact with OsMADS1. *Plant Mol. Biol.* 2000; 44(4): 513–527.

211. Lind-Riehl J, Gailing O. Fine-scale spatial genetic structure of two red oak species, *Quercus rubra* and *Quercus ellipsoidalis*. *Plant Systematics and Evolution*. 2015; 301(6): 1601–1612.
212. Lindström L, Li T, Malycheva D, Kancharla A, Nilsson H, Vishnu N, Mulder H, Johansson M, Rosselló CA, Alvarado-Kristensson M. The GTPase domain of gamma-tubulin is required for normal mitochondrial function and spatial organization. *Commun Biol*. 2018; 1(37).
213. Liu Y, Xue JY, Wang B, Li L, Qiu YL. The mitochondrial genomes of the early land plants *Treubia lacunosa* and *Anomodon rugelii*: dynamic and conservative evolution. *PLoS One*. 2011; 6(10): e25836.
214. Lu X, Bing-guang X, Yong-ping L, Yi-jie G, Yu W, Long-jiang F. Diversity arrays technology (DArT) for studying the genetic polymorphism of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Journal of Zhejiang University science*. 2013; 14: 570–577.
215. Madhumati B. Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *Int. J. Pure App. Biosci*. 2014; 2(1): 169–188
216. Makkouk K, Ghulam W, Comeau A. Resistance to barley yellow dwarf luteovirus in *Aegilops* species. *Can J Plant Sci*. 1994; 74: 631–634.
217. Manca A, Galasso I. Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Minerva Biotec*. 2010; 2: 43-45.
218. Manca A, Pecchia P, Mapelli S, Masella P, Galasso I. Evaluation of genetic diversity in a *Camelina sativa* (L.) Crantz collection using microsatellite markers and biochemical traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2012; 60: 1223–1236.
219. Marochio CA, Bevilaqua MRR, Takano HK, Mangolim CA, de Oliveira Junior RS, Machado MFPS. Genetic admixture in species of *Conyza* (Asteraceae) as revealed by microsatellite markers. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringa*. 2017; 39(4): 437–445.

220. McDowell JM, An YQ, Huang SR, McKinney EC, Meagher RB. The *Arabidopsis* ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiol.* 1996; 111(3): 699–711.
221. McDowell JM, Huang SR, McKinney EC, An YQ, Meagher RB. Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* 1996; 142(2): 587–602.
222. McGregor CE, Lambert CA, Greyling MM, Louw JH, Warnich L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica.* 2000; 113: 135–144.
223. McKean PG, Vaughan S, Gull K. The extended tubulin superfamily. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 2723-2733
224. McVay JD, Hipp AL, Manos PS. A genetic legacy of introgression confounds phylogeny and biogeography in oaks. *Proceedings of the Royal Society B.* 2017; 284: 20170300.
225. Meagher RB, McKinney EC, Kandasamy MK. Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family. *Plant Cell.* 1999; 11(6): 995–1005.
226. Meudt HM, Clarke AC. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant. Sci.* 2007; 12(3): 106–117.
227. Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics.* 2001; 157: 1819–1829.
228. Miah G, Rafii MY, Ismail MR, Puteh AB, Rahim HA, Islam KhN, Latif MA. A Review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(11): 22499–22528.
229. Mlinarec J, Franjevic D, Bockor L, Besendorfer V. Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe Anemoneae (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Bot. J. Linn. Soc.* 2016; 182(1): 80–99.

230. Molin D, Coelho CJ, Maximo DS, Ferreira FS, Gardingo JR, Matiello RR. Genetic diversity in the germplasm of tropical maize landraces determined using molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 2013; 12(1): 99–114.
231. Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity.* 2009; 1(1): 19–35.
232. Moose SP, Mumm RH. molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol.* 2008; 147: 969–977.
233. Morello L, Bardini M, Sala F, Breviario D. A long leader intron of the OsTub16 rice beta-tubulin gene is required for high level gene expression and can autonomously promote transcription both in vivo and in vitro. *Plant J.* 2002; (1): 33–44
234. Morello L, Breviario D. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste. *Curr. Genomics.* 2008; 9: 227–238.
235. Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 2002; 30(2): 194–200.
236. Morita S, Tsukamoto S, Sakamoto A, Makino H, Nakauji E, Kaminaka H, Masumura T, Ogihara Y, Satoh S, Tanaka K. The japanese society for plant cell and molecular biology differences in intron-mediated enhancement of gene expression by the first intron of cytosolic superoxide dismutase gene from rice in monocot and dicot plants. *Plant Biotechnology.* 2012; 29: 115–119.
237. Morse LE, Randall JM, Benton N, Hiebert R., Lu S. An Invasive Species Assessment Protocol. Evaluating Non-Native Plants for Their Impact on Biodiversity. 2004.
238. Mosula MZ, Andreev IO, Mel'nyk VM, Konvalyuk II, Drobyk NM, Kunakh VA. Molecular markers to assess genetic diversity of *Gentiana lutea* L. from the Ukrainian Carpathians. *Plant Genet. Resour.* 2015; 13(3): 266–273.

239. Muthamilarasan M, Venkata Suresh B, Pandey G, Kumari K, Parida SK, Prasad M. Development of 5123 intron-length polymorphic markers for large-scale genotyping applications in foxtail millet. *DNA Res.* 2014; 21(1): 41–52.
240. Nadeem MA, Nawaz MA, Shahid MQ, Dogan Y, Comertpay G, Yıldız M, Hatipoğlu R, Ahmad F, Alsaleh A, Labhane N, Özkan H, Chung G, Baloch FS. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2018; 32(2): 261–285.
241. Nagasaki H, Sakamoto T, Sato Y, Matsuoka M. Functional analysis of the conserved domains of a rice KNOX homeodomain protein, OSH15. *Plant Cell.* 2001; 13(9): 2085–2098.
242. Nasri S, Abdollahi Mandoulakani B, Darvishzadeh R, Bernousi I. Retrotransposon insertional polymorphism in Iranian bread wheat cultivars and breeding lines revealed by IRAP and REMAP markers. *Biochem. Genet.* 2013; 51(11/12): 927–943.
243. Navalihina A, Antonyuk M, Pasichnyk T, Ternovska T. Identification of *Oryza sativa*'s awn development regulatory gene orthologs in Triticinae accessions. *Cyt. Genet.* 2019; 53(4): 3–12.
244. Navrotska DO, Andreev IO, Parnikoza IYu, Spiridonova KV, Poronnik OO, Miryuta NYu, Myryuta GYu, Zahrychuk OM, Drobyk NM, Kunakh VA. Comprehensive characterization of cultivated *in vitro Deschampsia antarctica* E. Desv. plants with different chromosome numbers. *Cyt. Genet.* 2017. 51 (6): 422–431.
245. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76(10): 5269–5273.
246. Nei M. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 1972; 106: 283–292.
247. Neophytou C, Aravanopoulos F, Fink S, Dounavi A. Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species

- (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. *Forest Ecol. Management*. 2010; 259(10): 2026–2035.
248. Nielsen LR; Kjær ED. Gene flow and mating patterns in individuals of Wych elm (*Ulmus glabra*) in forest and open land after the influence of Dutch elm disease. *Conserv. Genet*. 2010; 11: 257–268.
249. Nocente F, Gazza L, Pasquini M. Evaluation of leaf rust resistance genes Lr1, Lr9, Lr24, Lr47 and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection. *Euphytica*. 2007; 155: 329–336.
250. Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem*. 2000; 69: 277–302.
251. Nowak DJ, McHale PJ, Ibarra M, Crane D, Stevens JC, Luley CJ. Modeling the effects of urban vegetation on air pollution. In: Gryning, Sven-Erik; Chaumerliac, Nadine, eds. *Air pollution modeling and its application XII*. New York: Plenum Press, 1998: 399–407.
252. Oh TJ. RFLP and RAPD mapping in flax (*Linum usitatissimum*). *Theor Appl Genetics*. 2000; 101: 590–593.
253. Ohresser M, Borsa Ph, Delsert C. Intron-length polymorphism at the actin gene locus mac-1: A genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. *Molecular marine biology and biotechnology*. 1997; 6(2): 123–130.
254. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28: 1166–1167.
255. Okumus AF. Uzun Genetic and geographic variation of bulbous barley (*Hordeum bulbosum* L.) assessed by RAPD markers. *Genetika*. 2007; 43(3): 377–381.
256. Olivera PD, Kilian A, Wenzl P, Steffenson BJ. Development of a genetic linkage map for Sharon goatgrass (*Aegilops sharonensis*) and mapping of a leaf rust resistance gene. *Genome*. 2013; 56(7): 367–376.

257. Onyshchenko VA, Pryadko OI, Virchenko VM, Arap RYa, Orlov OO, Datsiuk VV. Vascular plants and bryophytes of Hološivskyi national nature park. Kyiv: Alterpress, 2016 (in Ukrainian).
258. Onyshchenko VA. Forest vegetation of Hološivsky wood (Kyiv). Scientific herald of Chernivtsy university. Biology (Biological systems). 2013; 5(1): 93–115.
259. Onyshchenko VA. Old oaks of Hološivsky wood. Reserved case. 2015; 1(21), 19–23.
260. Ovechkina Y, Oakley Berl R. Gamma tubulin in plant cells. Methods in Cell Biology. 2001; 67: 195–212.
261. Oyama K, Ramírez-Toro W, Peñaloza-Ramírez J M, Pérez Pedraza A E, Torres-Miranda CA, Ruiz-Sánchez E, González-Rodríguez A.. High Genetic Diversity and Connectivity Among Populations of *Quercus candicans*, *Quercus crassifolia*, and *Quercus castanea* in a Heterogeneous Landscape in Mexico. Tropical Conservation Sci. 2018; 11: 1–14.
262. Pakniyat H, Tavakol E. RAPD markers associated with drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Pak. J. Biol. Sci. 2007; 10(18): 3237–3239.
263. Pali V, Verma KS, Xalxo MS, Saxena RR, Mehta N, Verulkar SB. Identification of microsatellite markers for fingerprinting popular Indian flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars and their utilization in seed genetic purity assessments. Austral. J. Crop Sci. 2014; 8(1): 119–126.
264. Pali V, Mehta N, Balkrishna VS, Xalxo MS, Saxena RR. Molecular diversity in flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by DNA based markers. Vegetos. 2015; 28(1): 157–165.
265. Palumbi S, Baker C. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. Mol Biol Evol. 1994; 11: 426–435.
266. Parani M, Rajesh K, Lakshmi M, Parducci L, Szmids AE, Parida A. Species identification in seven small millet species using polymerase chain reaction–

- restriction fragment length polymorphism of trnS –psbS gene region. *Genome*. 2001;44: 459–499.
267. Patil PD, Gude VG, Deng S. Biodiesel production from *Jatropha curcas*, waste cooking, and *Camelina sativa* oils. *Ind Eng Chem Res*. 2009; 48: 10850–10856.
268. Pavlicek A, Hrda S, Flegr J. FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biol*. 1999; 45: 97–99.
269. Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2010; 67(10): 630–634.
270. Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, Burg K, Coart E, Cottrell J, van Dam B, Deans JD, Glaz I, Dumolin-Lapegue S, Fineschi S, Finkelday R, Gillies A, Goicoechea PG, Jensen JS, König A, Lowe AJ, Madsen SF, Mátyás G, Munro RC, Pemonge MH, Popescu F, Slade D, Tabbener H, Turchini D, de Vries SMG, Ziegenhagen B, Kremer A. Chloroplast DNA variation in European white oaks. *Forest Ecol. Management*. 2002; 156(1–3): 5–26.
271. Pirko N, Demkovych A, Kalafat L, Privalikhin S, Rabokon A, Pirko Ya., Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in different representatives of Pinaceae Lindl. family. *J. Bot*. 2016; VIII, 2 (13): 5–9.
272. Pirko YV, Demkovich AE, Kalafat LO, Blume YB., Lykholat OA. Studying the genetic structure of *Quercus robur* forest stands on anthropogenically transformed territories using introns of the β -tubulin gene. *Biosystems Diversity*. 2018; 26(4): 269-275.
273. Pirko YaV. Studying of genetic diversity different species of plants by analyzing polymorphism of introns of β -tubulin genes. *Industr. Botany*. 2011; 11: 152–156 (in Ukr).
274. Plomion C, Aury JM, Amselem J, Alaeitabar T, Barbe V, Belser C. Decoding the oak genome: public release of sequence data, assembly, annotation and publication strategies. *Molecular Ecology Resources*. 2016; 16(1): 254–265.

275. Plomion C, Aury JM, Amselem J, Leroy T, Murat F. Oak genome reveals facets of long lifespan. *Nature plants*. 2018; 4(7): 440–452.
276. Poczai P, Cernák I, Gorji AM, Nagy S, Taller J, Polgár Z. Development of intron targeting (IT) markers for potato and cross–species amplification in *Solanum nigrum* (Solanaceae). *Am J Bot*. 2010; 97: e142–145.
277. Poczai P, Varga I, Bell NE. Genetic diversity assessment of bittersweet (*Solanum dulcamara*, *Solanaceae*) germplasm using conserved DNA-derived polymorphism and intron-targeting markers. *Ann. Appl. Biol*. 2011; 159: 141–153.
278. Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JP, Hyvönen J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*. 2013; 9(1): 6–37.
279. Ponzoni E, Breviario D, Mautino A, Gianì S, Morello L. A multiplex, bead–based array for profiling plant–derived components in complex food matrixes. *Anal Bioanal Chem*. 2013; 405: 9849–9858.
280. Ponzoni E, Morello L, Gianì S, Breviario D. Traceback identification of plant components in commercial compound feed through an oligonucleotide microarray based on tubulin intron polymorphism. *Food Chemistry*. 2014; 162: 72–80.
281. Pospíšková M, Dostálek J. *Quercus petraea* populations: a case study from the Křivoklátsko Protected Landscape Area (Czech Republic). *Biodiversity Research and Conservation*. 2010; 13(1): 37–42.
282. Postovoitova AS, Yotka OYu, Pirko YaV, Blume YaB. Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci. *Cytol Genetics*. 2018; 52(6): 448–460.
283. Pryrodno-zapovidnyy fond Ukrayiny [Nature Reserve Fund of Ukraine] [Electronic resource] (in Ukrainian).

284. Puchalka R, Koprowski M, Gričar J, Przybylak R. Does tree-ring formation follow leaf phenology in Pedunculate oak (*Quercus robur* L.)? *Eur. J. Forest Res.* 2017; 136: 259–268.
285. Pydiura N, Pirko Ya, Galinousky D, Postovoitova A, Yemets A, Kilchevsky A, Blume Ya. Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterisation of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). *Cell Biol. Intl.* 2019; 43(9): 1010-1019.
286. Qiu T, Dong YZ, Yu XM, Zhao N, Yang YF. Analysis of allopolyploidy-induced rapid genetic and epigenetic changes and their relationship in wheat. *Genet. Mol. Res.* 2017; 16(2): 1–14.
287. Rabokon AN, Pirko YaV, Demkovych AYe, Blume YaB. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.* 2018; 52(1): 1-10.
288. Rafalski JA, Tingey SV. RFLP map of soybean (*Glycine max*) 2N = 40. In: *Genetic Maps* (O'Brien, S.J., ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. 1993: 149–156.
289. Rai GK, Singh M, Rai NP, Bhardwaj DR, Kumar S. In vitro propagation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb.) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. *Physiol Mol Biol Plants.* 2012; 18: 273–280.
290. Rajwade AV, Arora RS, Kadoo NY, Harsulkar AM, Ghorpade PB, Gupta VS. Relatedness of Indian flax genotypes (*Linum usitatissimum* L.): an inter-simple sequence repeat (ISSR) primer assay. *Mol. Biotechnol.* 2010; 45(2): 161–170.
291. Rambaut A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. 2009. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
292. Reiter RS, Williams JG, Feldmann KA, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using

- recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(4): 1477–1481.
293. Rhymer JM, Simberloff D. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1996; 27: 83–109.
294. Ridha Farajalla M, Gulick PJ. The alpha-tubulin gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation. *Genome*. 2007; 50: 502–519.
295. Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*. 2003; 301(5637): 1211–1216.
296. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. 1985; 5: 69–76.
297. Rose AB. Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *RNA*. 2002; 8(11): 1444–1453.
298. Saidi N, Kadir J, Wei L. Hong Genetic Diversity and Morphological Variations of Goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn] Ecotypes in Malaysia. *Weed Turf Sci*. 2016; 5(3): 144–154.
299. Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN, Weller SG. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 2001; 32: 305–332.
300. Saliba-Colombani V, Causse M, Gervais L, Philouze J. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome*. 2000; 43(1): 29–40.
301. Sambrook J, David WR. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor, 2001; 2.

302. Sandvik H, Sæther B, Holmern T, Tufto J, Engen S, Roy HE. Generic ecological impact assessments of alien species in Norway: a semi-quantitative set of criteria. Springer. 2012; 24:37–62.
303. Saunders IW, Brohede J, Hannan GN. Estimating genotyping error rates from Mendelian errors in SNP array genotypes and their impact on inference. Genomics. 2007; 90:291–296.
304. Schalk M, Nedelkina S, Schoch G, Batard Y, Werck-Reichhart D. Role of unusual amino acid residues in the proximal and distal heme regions of a plant P450, CYP73A1. Biochemistry. 1999; 38(19): 6093–6103.
305. Schulman AH. Molecular markers to assess genetic diversity. Euphytica. 2007; 158: 313–21.
306. Schwarzerova K, Vondrakova Z, Fischer L, Borikova P, Bellinvia E, Eliášová K, Havelková L, Fiserová J, Vágner M, Opatrný Z. The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. BMC Plant Biol. 2010; 10: 89.
307. Semagn K, Bjornstad A, Ndjioudjop MN. An overview of molecular marker methods for plants. Afr. J. Biotechnol. 2006; 5(25): 2540–2568.
308. Semerikov LF. Variability of the oak quiver (*Quercus robur* L.) on the eastern border of the range. Ecology. 1976; 5: 13–21 (in Russian).
309. Senturk Akfirat F, Uncuoglu AA. Genetic diversity of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) revealed by SSR markers. Biochem. Genet. 2013; 51(3/4). 223–229.
310. Shamim G, Ranjan SK, Kandasamy T, Mohanasundaram A, Sharma KK, Ramani R. Phylogenetic study of Lac Insects of *Kerria* spp. using intron length polymorphism (EPIC-PCR). J. of Entomology and Zoology Studies. 2014; 2(4): 258–264.
311. Sharma H, Bhandawat A, Rahiml MS, Kumar P, Choudhoury MP, Roy J. Novel intron length polymorphic (ILP) markers from starch biosynthesis genes reveal genetic relationships in Indian wheat varieties and related species. Molecular Biology Reports. 2020; 47: 3485–3500.

312. Sharma V, Nandineni MR. Assessment of genetic diversity among Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) collection using microsatellite and retrotransposon based marker systems. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2014; 73: 10–17.
313. Sheley R, James J, Smith B, Vasquez E. Applying Ecologically Based Invasive-Plant Management. *Rangeland Ecology & Management.* 2010; 63(6): 605–613.
314. Shirasawa K, Kishitani S, Nishio T. Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence. *Mol. Breed.* 2004; 14(3): 283–292
315. Shu Y, Li Y, Zhu Y, Zhu Z, Lv D, Bai X, Cai H, Ji W, Guo D. Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential use as SCAR molecular markers in the soybean. *Theor. Appl. Genet.* 2010; 121(1): 1–8.
316. Simon L, Rabanal FA, Dubos T, Oliver C, Lauber D, Poulet A, Vogt A, Mandlbauer A, Le Goff S, Sommer A, Duborjal H, Tatout C, Probst AV. Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.* 2018; 46(6): 3019–3033.
317. Singh P, Mehta N, Sao A. Genetic purity assessment in linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties using microsatellite markers. *The Bioscan.* 2015; 10(4): 2031–36.
318. Singh P, Mehta N, Sao A. Genetic purity assessment in linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties using microsatellite markers. *Bioscan.* 2015; 10(4): 2031–2036.
319. Sinha A, Pande A. Finger printing of *Eleusine coracana* L. (Gaertn.) using microsatellite markers. *Bioresearch Bull.* 2010; 2: 51–58.
320. Sivasamy M, Vinod S, Tiwari RS, Tomar et al. Introgression of useful linked genes for resistance to stem rust, leaf rust and powdery mildew and their molecular validation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian J. Genet.* 2009; 69(1): 17–27.

321. Slade RW, Moritz C, Heideman A, Hale PT. Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Mol Ecol.* 1993; 2: 359–373.
322. Slafer GA, Araus JL, Royo C, Del Moral LFG. Promising eco-physiological traits for genetic improvement of cereal yields in Mediterranean environments. *Ann. Appl. Biol.* 2005; 146(1): 61–70.
323. Slajcherova K, Fiserova J, Fischer L, Schwarzerova K. Multiple actin isoforms in plants: diverse genes for diverse roles? *Front. Plant Sci.* 2012; 3: 1–8.
324. Smith PH, Hadfield J, Hart NJ, Koebner RMD, Boyd LA. STS markers for the wheat yellow rust resistance gene *Yr5* suggest a NBS–LRR-type resistance gene cluster. *Genome.* 2007; 50(3): 259–265.
325. Snustad DP, Haas NA, Kopczak SD, Silflow CD. The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed beta-tubulin genes. *Plant Cell.* 1992; 4(5): 549–556.
326. Sork VL, Davis FW, Westfall R, Davis FW. Conserving the evolutionary potential of California valley oak (*Quercus lobata* Née): a multivariate genetic approach to conservation planning. *Mol Ecol.* 2008; 17(1): 139–156.
327. Sork VL, Davis FW, Smouse PE, Apsit VJ, Dyer RJ, Fernandez-M JF, Kuhn B. Pollen movement in declining populations of California valley oak, *Quercus lobata*: Where have all the fathers gone? *Mol Ecol.* 2002; 11(9): 1657–1668.
328. Sork VL, Smouse PE. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecol.* 2006; 21: 821–836.
329. Steele KA, Edwards G, Zhu J, Witcombe JR. Marker-evaluated selection in rice: shifts in allele frequency among bulks selected in contrasting agricultural environments identify genomic regions of importance to rice adaptation and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2004; 109(6): 1247–1260.
330. Stefunova V. Detection of the genetic variability of amaranthus by RAPD and ISSR markers. *Pak. J. Bot.* 2015; 47(4): 1293–1301.

331. Stegniĭ VN, Chudinova IuV, Salina EA. RAPD analysis of the flax (*Linum usitatissimum* L.) varieties and hybrids of various productivity. *Genetika*. 2000; 36(10): 1370-1373.
332. Steinkellner H, Fluch S, Turetschek E, Lexer C, Streiff R, Kremer A, Burg K, Gloszl J. Identification and characterization of (GA/CT) n-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Mol. Biol.* 1997; 33(6): 1093–1096.
333. Stelmach K, Macko-Podgorni A, Machaj G, Grzebelus D. Miniature Inverted repeat transposable element insertions provide a source of intron length polymorphism markers in the carrot (*Daucus carota* L.). *Front Plant Sci.* 2017; 8: 725.
334. Strauss SY, Lau JA, Carroll SP. Evolutionary responses of natives to introduced species: What do introductions tell us about natural communities? *Ecology Letters*. 2006; 9: 357–374.
335. Sunar S, Yildirim N, Sengul M, Agar G. Genetic diversity and relationships detected by ISSR and RAPD analysis among *Aethionema* species growing in Eastern Anatolia (Turkey). *C. R. Biol.* 2016; 339: 147–151.
336. Tanksley SD, McCouch SR. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*. 1997; 277(5329): 1063–1066.
337. Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.* 2001; 11(8): 1441–1452.
338. Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2003; 106(3): 411–422.
339. Thomas BC, Rapaka L, Lyons E, Pedersen B, Freeling M. Arabidopsis intragenomic conserved noncoding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 3348–3353.
340. Thuillet AC, Bru D, David J, Roumet P, Santoni S, Sourdille P, Bataillon T. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat,

- Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp durum Desf. Mol. Biol. Evol. 2002; 19: 122–125.
341. Tollefsrud MM, Myking T, Sønstebø JH, Lygis V, Hietala AM, Heuertz M. Genetic Structure in the Northern Range Margins of Common Ash, *Fraxinus excelsior* L. PLoS ONE. 2016; 11(12): e0167104.
342. Trethowan RM, Reynolds M, Sayre K, Monasterio IO. Adapting wheat cultivars to resource conserving farming practices and human nutritional needs. Ann. Appl. Biol. 2005; 146: 405–413.
343. Tripp R. Biodiversity and modern crop varieties: sharpening the debate. *Agricult. Human Values*. 1996; 13 (4): 48–63.
344. Tynkevich YO, Volkov RA. 5S Ribosomal DNA of distantly related quercus species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* 2019; 53: 459–466.
345. Utkina I.A., Rubtsov V.V. Studies of phenological forms of pedunculate oak. *Contemporary Problems of Ecology*, 2017, 10(7): 804–811.
346. Van Inghelandt D, Melchinger AE, Lebreton C, Stich B. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *Theor. Appl. Genet.* 2010; 120(7): 1289–1299.
347. Varshney RK, Mahendar T, Aggarwal RK, Borner A. Genetic molecular markers in plants: development and applications. *Genom. Assist. Crop Improv.* 2007; 1: 13–29.
348. Vasylyuk O, Kostyushyn V, Norenko K, et al. Natural reserve fund of the Kiev region. Kyiv: National Ecological Center of Ukraine, 2012 (in Ukrainian).
349. Vellve R. The decline of diversity in European agriculture. *Ecologist*. 1993; 23(2): 64–69
350. Vieira ML, Santini L., Diniz AL, Munhoz Cde F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* 2016; 39(3): 312–328.

351. Villemur R, Joyce CM, Haas NA, Goddard RH, Kopczak SD, Hussey PJ, Snustad DP, Silflow CD. The α -tubulin gene family of maize (*Zea mays* L.): Evidence for two ancient α -tubulin genes in plants. *J. Mol. Biol.* 1992; 227(1): 81–96.
352. Vitale A, Wu RJ, Cheng ZQ, Meagher RB. Multiple conserved 5' elements are required for high-level pollen expression of the Arabidopsis reproductive actin ACT1. *Plant Mol. Biol.* 2003; 52: 1135–1151.
353. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V. Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* 2017; 17(1): 1–15.
354. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk LG, Borisjuk MV. Plant rDNA: Organization, evolution, and using. *Cytol. Genet.* 2003; 37(1): 68–72.
355. Volkov RA, Panchuk II. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders.* 2014; 12(1): 3–11.
356. Volkov RA, Zanke C, Panchuk II, Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2001; 103(8): 1273–1282.
357. Vollmann J, Grausgruber H, Stift G, Dryzhyruk V, Lelley T. Genetic Diversity in *Camelina* germplasm as Revealed by Seed Quality Characteristics and RAPD Polymorphism. *Plant Breeding.* 2005; 124: 446–453.
358. Vranckx G, Jacquemyn H, Mergeay J, Cox K, Kint V, Muys B, Honnay O. Transmission of genetic variation from the adult generation to naturally established seedling cohorts in small forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Forest Ecology and Management.* 2014; 312: 19–27.
359. Vyhnánek T, Bačovský V, Vlašínová H, Havel L, Sedivá J, Mertelík J. The study of genetic variability in the genus *Aesculus* L. by SSR markers. *Zprávy Lesnického Výzkumu.* 2013; 58(3): 244–249.

360. Wakefield JG, Moores CA, Tovey CA, Conduit PT. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes and beyond. *Essays Biochem.* 2018; 62 (6): 765–780.
361. Wang J, Zhang W, Zhao H, Li FR, Wang ZG, Ji J, Zhang XQ, Wang DW, Li JM. Molecular cytogenetic characterization of the *Aegilops biuncialis* karyotype. *Genet Mol Res.* 2013; 12(1): 683–692.
362. Wang P, Ma Y, Ma L, Li Y, Wang S, Li L, Yang R, Wang Q. Development and Characterization of EST-SSR Markers for *Catalpa bungei* (Bignoniaceae). *Appl. Plant Sci.* 2016; 4(4): 1500117.
363. Wang X, Li L, Zhao J, Li F, Guo W, Chen X. Effects of different preservation methods on inter simple sequence repeat (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers in botanic samples. *C. R. Biol.* 2017; 340(4): 204–213.
364. Wang X, Zhao X, Zhu J, Wu W. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 2005; 12(6): 417–427.
365. Wang Z, Hobson N, Galindo L, Zhu S, Shi D, McDill J, Yang L, Hawkins S, Neutelings G, Datla R, Lambert G, Galbraith DW, Grassa CJ, Gerald A, Cronk QC, Cullis C, Dash PK, Kumar PA, Cloutier S, Sharpe AG, Wong GK, Wang J, Deyholos MK. The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled de novo from short shotgun sequence reads. *Plant J.* 2012; 72: 461–473.
366. Ward S. Genetic analysis of invasive plant populations at different spatial scales. *Biological Invasions.* 2006; 8: 541–552.
367. Ward S.M., Gaskin J.F., Wilson L.M. Ecological Genetics of Plant Invasion: What Do We Know? *Invasive Plant Science and Management.* 2008; 1(1): 98-109.
368. Wei H, Fu Y, Arora R. Intron-flanking EST-PCR markers: from genetic marker development to gene structure analysis in *Rhododendron*. *Theor Appl Genet.* 2005; 111: 1347–1356.

369. Weining S, Langridge P. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor Appl Genet.* 1991; 82: 209–216.
370. Wenting W, Yi R, Hengyu Z. Investigation on Temperature dropping effect of urban green space in summer in Hangzhou. *Energy Procedia.* 2012; 14: 217–222.
371. Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinhofs A, Kilian A. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(26): 9915–20.
372. Williams JG, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 1993; 218: 704–740.
373. Williams L, Frances MK. New Genetic Markers of Age-Related Hearing PhDAuthor Information. *The Hearing Journal.* 2020; 73(1): 6.
374. Wolch JR, Byrn J, Newell JP. Urban green space, public health, and environmental justice: The challenge of making cities ‘just green enough’. *Landscape and Urban Planning.* 2014; 125: 234–244.
375. Wongsawad Ph, Peerapornpisal Yu. Molecular identification and phylogenetic relationship of green algae, *Spirogyra ellipsospora* (Chlorophyta) using ISSR and rbcL markers. *Saudi J. Biol. Sci.* 2014; 21: 505–510.
376. Wouw MVD, Dijk PV, Huiskes A. Regional genetic diversity patterns in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.). *J. Biogeogr.* 2007; 35: 365–376.
377. Wu J, Shahid MQ, Chen L, Chen Z, Wang L, Liu X, Lu Y. Polyploidy enhances F1 pollen sterility loci interactions that increase meiosis abnormalities and pollen sterility in autotetraploid rice. *Plant Physiol.* 2015; 169(4): 2700–2717.
378. Wu M, Comeron JM, Yoon HS, Bhattacharya D. Unexpected dynamic gene family evolution in algal actins. *Mol. Biol. Evol.* 2009; 26(2): 249–253.

379. Xena EN. A decade of the RAPD method: possibilities and limitations for plant genetics relationship studies. *Acta. Cient. Venez.* 2000; 51(4): 197–206.
380. Xia X, Luan LL, Qin G, Yu LF, Wang ZhW, Dong WC, Song Yu, Qiao Yu, Zhang XS, Sang YL, Yang L. Genome-wide analysis of SSR and ILP markers in trees: diversity profiling, alternate distribution, and applications in duplication. *Scientific Reports.* 2017; 7: 17902.
381. Xia X, Luan LL, Qin G, Yu LF, Wang ZhW, Dong WCh, Song Yu, Qiao Yu, Zhang XS, Sang YL, Yang L. Genome-wide analysis of SSR and ILP markers in trees: diversity profiling, alternate distribution, and applications in duplication. *Sci. Reports.* 2017; 7(1): 17902.
382. Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol.* 2005; 137(1): 176–189.
383. Yamanaka S, Suzuki E, Tanaka M, Takeda Y, Watanabe JA, Watanabe KN. Assessment of cytochrome P450 sequences offers a useful tool for determining genetic diversity in higher plant species. *Theor. Appl. Genet.* 2003; 108: 1–9.
384. Yang L, Jin G, Zhao X, Zheng Y, Xu Z, Wu W. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics.* 2007; 3: 2174–2177.
385. Yang L, Wang W, Yang W, Wang M. Marker-assisted selection for pyramiding the waxy and opaque-16 genes in maize using cross and backcross schemes. *Mol. Breed.* 2013; 31(4): 767–775.
386. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13: 134.
387. Young AG, Pickup M. Low S allele numbers limit mate availability, reduce seed set and skew fitness in small populations of a self-incompatible plant. *J. Appl. Ecol.* 2010; 47: 541–548.

388. Zalapa JE, Brunet J, Guries RP. Patterns of hybridization and introgression between invasive *Ulmus pumila* (Ulmaceae) and native *U. rubra*. *Amer. J. Bot.* 2009; 96(6): 1116–1128.
389. Zalapa JE, Brunet J, Guries RP. The extent of hybridization and its impact on the genetic diversity and population structure of an invasive tree, *Ulmus pumila* (Ulmaceae). *Evol. Appl.* 2010; 3: 157–168.
390. Zalapa JE, Brunet J, Guries RP. Isolation and characterization of microsatellite markers for red elm (*Ulmus rubra* Muhl.) and cross-species amplification with Siberian elm (*Ulmus pumila* L.). *Mol. Ecol.* 2008; 8: 109–112
391. Zalapa JE, Brunet J, Raymond P, Guries RP. Genetic diversity and relationships among Dutch elm disease tolerant *Ulmus pumila* L. accessions from China. *Genome.* 2008; 51(7): 492–500.
392. Zhang X, Wei X, Xiao J, Yuan C, Wu Y, Cao A, Xing L, Chen P, Zhang S, Wang X, Wang H. Whole genome development of intron targeting (IT) markers specific for *Dasypyrum villosum* chromosomes based on next-generation sequencing technology. *Mol. Breed.* 2017; 37(9): 115.
393. Zhao X, Yang L, Zheng Y, Xu Z, Wu W. Subspecies-specific intron length polymorphism markers reveal clear genetic differentiation in common wild rice (*Oryza rufipogon* L.) in relation to the domestication of cultivated rice (*O. sativa* L.). *J. Genet. Genom.* 2009; 36(7): 435–442.
394. Zhao XQ, Wu WR. Construction of a genetic map based on ILP markers in rice. (Article in Chinese). 2008; 30(2): 225–230.
395. Zheng Y, Jung MK, Oakley BR. γ -Tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and homo sapiens and is associated with the centrosome. *Cell.* 1991; 65(5): 817–823.
396. Zhou R, Wu Z, Cao X, Jiang FL. Genetic diversity of cultivated and wild tomatoes revealed by morphological traits and SSR markers. *Genet. Mol. Res.* 2015; 14(4): 13868–13879.

397. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994; 20(2): 176–183.
398. Zimnoch-Guzowska E, Marczewski W, Lebecka R., Flis B, Schäfer-Pregl R., Salamini F., Gebhardt C. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci*. 2000; 40(4): 1156–1167.
399. Абдулоєва О, Карпенко Н. Показники інвазійного потенціалу чужинних рослин як основа процедури оцінки ризику. *Вісник КНУ ім Т. Шевченко*. 2013; 16: 51–53.
400. Азарин КВ, Маркин НВ, Лотник ВС, Усатов АВ. ДНК маркеры в селекции растений: учеб. пособие. Ростов-на-Дону: Изд-тво Южн. федерал. ун-та. 2012; 16.
401. Александров ОС, Евтухов АВ, Киселёв ИИ, Карлов ГИ. Молекулярно-генетические особенности нетранскрибируемого спейсера 5S-рДНК у *Hipporhae rhamnoides* L. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология*. 2016; 4: 57–60.
402. Алтухов ЮП, Салменкова ЕА. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике. *Генетика*, 2002; 38: 1173–1195.
403. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003: 432.
404. Бабицький А., Серга О. Інвазії деревних видів рослин в урболандшафтах лісостепу Укра їни. *Матеріали конф. студ. і аспірант*. 2015: 16–17.
405. Баер ГЯ, Емець АИ, Стадничук НА, Рахметов ДБ, Блюм ЯБ. Сомаклональная вариабельность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. *Цитол. генет.* 2007; 41: 9– 15
406. Баер ГЯ, Рахметов ДБ, Стадничук НА, Емець АИ, Блюм ЯБ. Сомаклональная вариабельность в культуре in vitro как источник

- получения селекционного материала пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. Физиол. биохим. культ. растений. 2009; 35:1–8.
407. Баер ГЯ, Пірко ЯВ, Стаднічук НО, Рахметов ДБ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Дослідження генетичної мінливості генотипів *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. та *Eleusine indica* (L.) Gaertn. за допомогою ISSR–аналізу. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2013;13: 6–9.
408. Банникова АА. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих. Журн. общей биологии. 2004; 65: 278–305.
409. Баранов ВС. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009: 528.
410. Барна М.М., Барна Л.С., Карплюк Н.А. Біологія цвітіння ранньої (var. *praecox* Czern.) і пізньої (var. *tardiflora* Czern.) форм дуба звичайного (*Quercus robur* L.) в умовах західного Поділля. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. 2017; 4(71): 8–23.
411. Блюм Я, Рахметов Д, Стаднийчук Н. Пальчатое просо, или элевсина: находка для небольших хозяйств. Зерно: всеукраинский журнал современного агропромышленника. 2012; 4: 66–72.
412. Богданова МВ. Выявление потенциально адаптивных белорусских ландрас льна (*Linum usitatissimum* L.), несущих инсерцию LIS–1. Экологическая стабилизация аграрного производства. Научные аспекты решения проблемы. Сб. докл. Межд. научно-практ. конф-ции мол. ученых и специалистов (18-19 марта 2015 г., Саратов), ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока», 2015: 13–18.
413. Боронникова СВ, Календарь РН. Использование IRAP метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений. Генетика. 2010; 46(1): 44–50.
414. Брик АФ, Календарь РН, Стратула ОР, Сиволап ЮМ. IRAP и REMAP-анализ сортов ячменя одесской селекции. Цитол. генет. 2006; 40(3): 24–33.

415. Волкова НЕ. Молекулярно-генетичні дослідження ядерного геному кукурудзи. Одеса: Астропринт, 2015: 120.
416. Волкова НЕ, Мізерна НА. Типування сортів сої культурної (*Glycine max* (L.) Merr.) за мікросателітним маркером *Satt100* гена *E7* фотоперіодичної чутливості. Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2017; 13(4): 373-378.
417. Давидюк ЮМ, Молода ОО, Волков РА. Молекулярна організація 5S рДНК *Solanum betaceum* Cav. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2013; 11(1): 14–19.
418. Двірна ТС. Знахідки видів адвентивних рослин на території роменсько-полтавського геоботанічного округу. Укр. ботан. журн. 2012; 69(6): 847–852.
419. Демкович АЕ, Коршиков ИИ, Макогон ИВ. Полиморфізм дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на донецькому краї по мікросателітним локусам. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014; 14: 17–21.
420. Демкович АЄ. Використання мікросателітних локусів у молекулярно-генетичному аналізі видів роду *Vincetoxicum* Wolf флори України. Промышленная ботаника. 2012; 12: 152–156.
421. Джурян В.М. Синантропізація рослинного покриву України. Тези наук. доп. (м. Переяслав-Хмельницький, 27–28 вересня 2012 року). Київ–Переяслав-Хмельницький, 2012: 32-34.
422. Добровольская ОБ, Понт К, Орлов ЮЛ, Сальс Ж. Разработка новых SSR-маркеров к локусам гомеологичных генов WFZP на основе изучения строения и локализации микросателлитов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS, 2DS мягкой пшеницы. Вавиловский журн. генетики и селекции. 2015; 19(3): 303–309.
423. Дорохов ДБ, Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD-анализа растительных геномов. Генетика. 1997; 33: 476–483.

424. Дубина ЕВ, Королёва СВ, Гаркуша СВ. Использование SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян сладкого перца. Достижения науки и техники АПК. 2016; 30(8): 42–44.
425. Дьяченко ЕА, Филюшин МА, Пронин ЕП, Кочиева ЕЗ. Вариабельность интрона пластидного гена *trnL* у видов *Faboideae* (сем. *Fabaceae*). Вавиловский журн. генетики и селекции. 2014; 18(4/1): 724–731.
426. Кадырова ГД., Кадырова ФЗ., Рыжова НН, Кочиева ЕЗ. RAPD-анализ геномного полиморфизма видов и сортов рода *Fagopyrum*. Экологическая генет. 2008; VI(3): 3–10.
427. Калафат ЛО, Пірко НМ, Демкович АЄ, Приваліхін СМ, Рабоконт АМ, Пірко ЯВ, Блюм ЯБ. Оцінка генетичної різноманітності різних видів деревних рослин за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2017; 15 (2): 159-166.
428. Календарь РН, Глазко ВИ. Типы молекулярно–генетических маркеров и их применение. Физиология и биохимия культурных растений. 2002; 34(4): 279–296.
429. Калько ГВ. ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны. Труды СПб науч.-исслед. ин-та лесн. хоз-ва. 2015; 4: 19–34.
430. Кильчевский АВ, Хотылева ЛВ. Генетические основы селекции растений. Общая генетика растений. Минск : Беларус. навука, 2008; 4(1).
431. Кильчевский АВ, Хотылева ЛВ. Генетические основы селекции растений. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия. Минск: Беларус навука, 2014; 4(4): 653.
432. Лемеш ВА. Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов. Мол. и прикл. генетика: Сб. науч. тр. 2008; 8: 94–104.
433. Лисогор Л.П. Аналіз адвентивної фракції перелогів Правобережного степового Придніпров'я. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. 2016; 1(65): 6–9.
434. Логінов МІ, Кривошеєва ЛМ, Кандиба НМ, Чучвага ВІ, Йотка АК, Лапенко ОЮ. Наукові досягнення в напрямі селекції та створення нових

- сортів льону–довгунця. Вісник Сумського нац. аграр. ун-ту. Серія: Агрономія і біологія. 2016; 2: 209–213.
435. Матвеева ТВ, Павлова ОА, Богомаз ДИ, Демкович АЕ, Лутова ЛА. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. Экологическая генетика. 2011; IX(1): 32–43.
436. Матяшук РК, Небесний ВБ, Конякін СМ, Ткаченко ІВ, Прокопук ЮС. Вікові дуби «Феофанії» – пам'ятки живої природи краю. Наук. доп. НУБіП України. 2014; 6 (48).
437. Миленин АИ. Экологические особенности фенологических разновидностей дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в условиях ЦЧР. Автореферат дис. ... к. с.-х. н. Воронеж, 1997: 24.
438. Молчанов А.Г. Интенсивность фотосинтеза фенологических форм дуба черешчатого в условиях недостаточного увлажнения. Лесоведение. 2012; 4: 31–38.
439. Молчанов АГ. Интенсивность фотосинтеза рано- и позднезаспускающихся форм дуба черешчатого в условиях недостаточного увлажнения. Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений: Матер. дистанц. конф. Карельский науч. центр. Петрозаводск, Россия. 2011; 204–208.
440. Мосула МЗ, Конвалюк П, Мельник ВМ, Бублик ОМ, Андреев Ю, Дробик НМ, Кунах ВА. Аналіз генетичної різноманітності популяцій *Gentiana lutea* L. методом маркування міжретротранспозонних послідовностей (IRAP-ПЛР). Физиология растений и генетика. 2014; 46(1): 45–55.
441. Мухина ЖМ. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно–генетических исследованиях. Научный журнал КубГАУ. 2011; 66(02): 1–11.
442. Нецветов МВ, Прокопук ЮС. Вік і радіальний приріст старовікових дерев *Quercus robur* парку «Феофанія». Укр. бот. журн. 2016; 73(2): 126–133.

443. Нечаева ЮС, Боронникова СВ, Юсупов РР, Хайнце Б. Изучение полиморфизма ISSR-маркеров в природных и искусственных популяциях лиственницы. *Фундаментальные исследования*. 2013; 6: 1426–1431.
444. Омашева МЕ, Аубакирова КП, Рябушкина НА. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок. *Биотехнология. Теория и практика*. 2013; 4: 20–28.
445. Панчук П, Касіянчук РМ, Волков РА. Субповтори у 5S рДНК як молекулярний маркер у популяціях *Acer platanoides* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2019; 25: 80–85.
446. Пірко ЯВ, Нецветов МВ, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабокоть АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Блюм ЯБ. Генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur* (Fagaceae) за даними аналізу поліморфізму нітронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів. *Ukr. Bot. J.* 2018; 75 (5): 489-500.
447. Пірко ЯВ, Рабокоть АМ, Постовойтова АС, Білоножко ЮО, Калафат ЛО, Борисова ОВ, Царенко ПМ, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у мікроводоростей. *Доп. НАН України*. 2019; (1): 93-99.
448. Пірко ЯВ, Буй ДД, Постовойтова АС, Рабокоть АМ, Калафат ЛО, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів γ -тубуліну як новий підхід до генотипування рослин. *Доп. НАН України*. 2018; 12: 87–92.
449. Пірко ЯВ, Постовойтова АС, Рабокоть АМ, Калафат ЛО, Приваліхін СМ, Білоножко ЮО, Пірко НМ, Блюм ЯБ. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну як метод аналізу генетичної диференціації рослин. *Ukr. Bot. J.* 2018; 75(6): 576–584.
450. Постовойтова АС, Йотка ОЮ, Пірко ЯВ, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів актину у різних сортів льону–довгунця української селекції. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017; 20: 99–103.

451. Рабоконь АН, Демкович АЕ, Пирко ЯВ, Блюм ЯБ. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. Мол. прикл. генет. 2015; 19: 35–44.
452. Рахметов ДБ, Баер ГЯ, Стаднічук НО, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Вивчення біохімічних характеристик соматональних варіантів пальчастого проса. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2008; 5: 430–34.
453. Рубцов ВВ, Жиренко НГ, Уткина ИА. Интенсивность тока пасоки у разных фенологических форм дуба в южной лесостепи. Лесоведение, 2007, 5: 44–55.
454. Русак ОО, Петращук ВІ, Панчук ІІ, Волков РА. Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (*Acer pseudoplatanus*). Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2016; 14(2): 216–220.
455. Сахарова АН, Андреева ГН, Фесенко ИА, Хрусталева ЛИ, Карлов ГИ. Применение SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян F1 огурца. Известия ТСХА. 2011; 6: 150–155.
456. Серга О, Бабицький АІ, Китаєв ОІ, Запольський ЯС, Кривошопко ВА, Якубенко БЄ. Оцінка ступеня потенційної морозостійкості інвазійних деревних видів рослин у Правобережному лісостепу України. Вісник НУБіП. Біологія, біотехнологія, екологія. 2016; 234: 189–198.
457. Сиволап ЮМ. Молекулярные маркеры и селекция. Цитол. генет. 2013; 47(3): 71–80.
458. Сильченко ИИ. Фенологические формы дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в различных типах ландшафтов Брянской области. Вестн. Брянск. гос. ун-та. 2012; 4: 158–161.
459. Слепих ОО. Ритм розвитку і розповсюдження фенологічних форм дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) у Донецькій області. Біологічні системи. 2016, 8(2): 272–279.
460. Стародубцева ЕА, Морозова ОВ, Григорьевская АЯ. Материалы к «Чёрной книге Воронежской области». Рос. журн. биол. инвазий. 2014; 2: 133–149.

461. Стратула ОР, Коцеруба ВВ, Календарь РН. Применение генов β -амилазы в качестве филогенетических маркеров. Биотехнология. Теория и практика. 2014; 4: 10–21.
462. Супрун ИИ, Токмаков СВ, Малюченко ОП, Ушакова ЯВ, Бабаков АВ. Генотипирование сортов яблони российской селекции с использованием микросателлитных маркеров. Известия ТСХА. 2011; 6: 162–166.
463. Сухарева АС, Кулуев БР. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. Биомика. 2018; 10(1): 69-84.
464. Твардовська МО, Андрєєв ІО, Амосова АВ, Спiрiдонова КВ, Навроцька ДО, Саматадзе ТЕ. Вивчення геномiв рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з рiзних локалiтетiв прибережної Антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерiв. Фактори експериментальної еволюції органiзмiв. 2014; 14: 133–137.
465. Темралеєва АД, Минчева ЕВ, Щербаков ДЮ, Пинский ДЛ. ДНК-штрихкодирование зеленых водорослей: обзор. Альгология. 2013; 23(4): 396–418.
466. Тинкевич ЮО, Невельська АО, Чорней І, Волков РА. Організація та мінливість міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus*. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2015; 13(1): 81–87.
467. Хлесткина ЕК. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. Вавиловский журн. генет. селекц. 2013; 7(4/2): 1044–1054.
468. Царенко ПМ, Борисова ОВ, Блюм ЯБ. Мікрководорості як об'єкт біоенергетики: види колекції IBASU-A – перспективні продуценти біомаси як джерела сировини для біопалива. Вісн. НАН України. 2011; 5: 49–54.
469. Чекалов ВА, Волкова НЕ. Характеристика генотипів нуту звичайного за генами стійкості до збудника фузаріозу *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Фактори експериментальної еволюції органiзмiв. 2018; 23: 166-169.
470. Червона книга Української РСР (Ред. Ситник КМ). К.: Наук. думка, 1980: 242.

471. Черняев В.М. О лесах Украины. М.: Унив. тип.; 1858: 54.
472. Шавруков ЮН. CAPS-маркеры в биологии растений. Вавиловский журн. генет. селекц. 2015; 19(2): 205–213.
473. Шелифіст АЄ, Тинкевич ЮО, Волков РА. Молекулярна організація 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2018; 16(1): 61–68.
474. Шелифіст АЄ, Якобишен ДВ, Волков РА. Молекулярна будова 5S рДНК *Mandragora autumnalis* Bertol. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2019; 17(2): 187–190.
475. Янбаев ЮА, Боронникова СВ, Ахметов АР, Нечаева ЮС, Пришнивская Я.В. Информативность ISSR-маркеров для выявления генетического разнообразия клена остролистного на южном урале. Вестник ОГУ. 2014; 6 (167): 94-97.

ДОДАТОК

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kravets OA, **Pirko YaV**, Kalafat LO, Rabokon AM, Postovoitova AS, Bilonozhko YuO, Privalikhin SN, Lykholat YuV, Blume YaB. Genetic and reproductive state assessment of *Ulmus pumila* and *U. suberosa* invasive populations in the dnieper steppe under climate change. Cytol. Genetics. 2020; 54 (1): 1–9. doi.org/10.3103/S0095452720010090
2. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний засіб генетичного профілювання злакових (Poaceae L.). Доповіді Національної академії наук України. 2019; 2: 78-83. doi.org/10.15407/dopovidi2019.02.078
3. Rabokon AM, **Pirko YV**, Demkovych AYe, Andreev IO, Parnikoza IYu, Kozeretska IA, Yu Z, Kunakh VA, Blume YB. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in *Deschampsia antarctica* E. Desv. across the western coast of the Antarctic Peninsula. Polar Science. 2019;19:151-154. doi.org/10.1016/j.polar. 2018.11.001.
4. Rabokon A, Demkovich A, Sozinov A, Kozub N, **Pirko Ya**, Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. Cell Biol Int. 2019; 43: 1031-1039. DOI: 10.1002/cbin.10886.
5. Pydiura N, **Pirko Ya**, Galinousky D, Postovoitova A, Yemets A, Kilchevsky A, Blume Ya. Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterisation of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). Cell Biol. Intl. 2019; 43: 1010-1018. DOI: 10.1002/cbin.11001.
6. **Пірко ЯВ**, Постовойтова АС, Рабокoнь АМ, Калафат ЛО, Приваліхін СМ, Білоножко ЮО, Пірко НМ, Блюм ЯБ. Вивчення поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну як метод аналізу генетичної диференціації

- рослин. Український ботанічний журнал. 2018; 75 (6): 576-584. doi.org/10.15407/ukrbotj75.06.576.
7. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як інструмент генотипування представників родини *Solanaceae*. Науковий Вісник НУБІП України. 2018; 287: 70-78. doi.org/10.31548/biologiya2018.287.071.
 8. Postovoitova AS, Yotka OYu, **Pirko YaV**, Blume Ya B. Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci. Cytol. Genetics. 2018; 52 (6): 448-460. doi.org/10.3103/S0095452718060099.
 9. **Пірко ЯВ**, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабокoнь АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Кравець ОА, Алексєєва АА, Хромих НО, Лихолат ЮВ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у рослин *Ulmus pumila* L. в Степовому Придніпров'ї. Вісн. укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2018; 16 (1): 28-34..
 10. Rabokon AN, **Pirko YaV**, Demkovych AYe, Blume YaB. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. Cytol. Genetics. 2018; 52 (1): 1–10. doi.org/10.3103/S0095452718010115.
 11. Рабокoнь АМ, **Пірко ЯВ**, Калафат ЛО, Гузенко ЄВ, Богданова МВ, Сакович ВІ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів β -тубуліну у білоруських ландрас *Linum usitatissimum* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018; 22: 180-185. doi.org/10.7124/FEEO.v22.945.
 12. **Пірко ЯВ**, Нецветов МВ, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабокoнь АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Блюм ЯБ. Генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur* (Fagaceae) за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів. Український ботанічний журнал. 2018; 75 (5): 489-500. doi.org/10.15407/ukrbotj75.05.489.

13. **Pirko YaV**, Demkovich A E, Kalafat LO, Blume YaB, Lykholat OA. Studying the genetic structure of *Quercus robur* forest stands on anthropogenically transformed territories using introns of the β -tubulin gene. *Biosystems Diversity*. 2018; 26 (4): 269-275. doi.org/10.15421/011841.
14. **Пірко ЯВ**, Буй ДД, Постовойтова АС, Рабокoнь АМ, Калафат ЛО, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів γ -тубуліну як новий підхід до генотипування рослин. *Доповіді Національної академії наук України*. 2018; 12: 87-92. doi.org/10.15407/dopovidi2018.12.087.
15. Калафат ЛО, Пірко НМ, Демкович АЄ, Приваліхін СМ, Рабокoнь АМ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Оцінка генетичної різноманітності різних видів деревних рослин за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2017; 15 (2): 159-166. doi.org/10.7124/visnyk.utgis.15.2.874.
16. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Андрєєв ІО, Парнікоза ІЮ, Козерецька ІА, Кунах ВА, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у *Deschampsia antarctica* Desv. з морської Антарктики. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017; 20: 104-108. doi.org/10.7124/FEEO.v20.743.
17. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016; 19: 43-46.
18. Pirko NN, Demkovych AYe, Kalafat LO, Privalikhin SN, Rabokon AN, **Pirko YaV**, Blume YaB. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in different representatives of Pinaceae Lindl. family. *Journal of Botany*. 2016; 8 (2): 5-9.
19. Рабокoнь АН, **Пірко ЯВ**, Демкович АЕ, Блюм ЯБ. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. *Молекулярная и прикладная генетика (Минск)*. 2015; 19: 35-44.
20. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів *Triticum*

- aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015; 17: 82–86.
21. Постовойтова АС, Баєр ГЯ, Пидюра МО, Пастухова НЛ, **Пірко ЯВ**, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Пошук та аналіз послідовностей генів актину в геномі льону. Наукові доповіді НУБіП. 2015; 8 (57) http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/14.pdf.
 22. Рабокoнь АН, Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Аналіз гомологов генів основних білків цитоскелета у різних видів вищих рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014; 14: 76–78.
 23. **Пірко ЯВ**. Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліна. Промышленная ботаника. 2011; 11: 152-156.
 24. Рабокoнь АМ, Білоножко ЮО, Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Генетичне профілювання видів деревних рослин за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну. Матеріали міжнародної наукової конференції, присвяченої 100-річчю від дня народження професора Костянтина Малиновського «Проблеми уникнення втрат біорізноманіття українських Карпат». 2020. 14-15 травня, Львів, Україна, 2020. с.30-33.
 25. **Pirko Ya**, Buy D, Rabokon A, Postovoitova A, Kalafat L, Blume Ya. Genomic fingerprinting of *Linum usitatissimum* L. cultivars using intron length polymorphism of γ -tubulin. 4th International Scientific Conference «Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health And Quality of Human and Bees Life». 2019, 11-13 September, Nitra, Slovakia, 2019. p.124.
 26. **Pirko Ya**, Rabokon A, Postovoitova A, Kalafat L, Bilonozhko Yu, Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin and actin genes as efficient tool for *Camelina sativa* genotyping. 4th International Scientific Conference «Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health And Quality of Human and Bees Life». 2019, 11-13 September, Nitra, Slovakia, 2019. p. 125.

27. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Генотипування сортів рису посівного за допомогою оцінки поліморфізму довжини другого інтрону генів актину. Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин», 2018, 4-5 липня, Харків, Україна, 2018. с. 231-232.
28. Rabokon A, **Pirko Ya**, Kalafat L, Kozub N, Sozinov I, Demkovych A, BlumeYa. The second intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis*. Abstract of the 7th Baltic Genetics Congress, 2018, October 24-27, Riga, Latvia, 2018. с. 243.
29. Рабокoнь АМ, Демкович АС, Йотка ОЮ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Дослідження поліморфізму довжин інтронів генів β -тубуліну у сортів льону української селекції. Третя конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». 2017, 16-18 травня, Київ, Україна, 2017. с. 43.
30. Pirko NN, Kalafat LO, Demkovych AYe, Privalikhin SN, Rabokon AN, Koval OP, **Pirko YaV**, Blume YaB. Investigation of genetic variability of Fagales order by analysis of introns polymorphism of β -tubulin genes. Материали 5-ой Международной конференции-совещания «Сохранение лесных генетических ресурсов». 2017, 02-07 октября, Гомель, Беларусь, 2017. с. 172-175.
31. Постовойтова АС, Йотка ОЮ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Аналіз поліморфізму довжин інтронів генів актину у представників роду *LINUM* L. Третя конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». 2017, 16-18 травня, Київ, Україна, 2017. с. 41.
32. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Козуб НО, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів актину як новий метод оцінки генетичної диференціації природних популяцій *Aegilops biuncialis*. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин». 2017, 12 вересня, Одеса, Україна, 2017. с. 61-62.
33. Рабокoнь АН, Демкович АЕ, **Пірко ЯВ**, Богданова МВ, Сакович ВИ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов

- генов β -тубулина у ландрас *Linum usitatissimum* L. Материалы III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». 2016, 23-25 ноября, Минск, Беларусь, 2016. с. 33.
34. Blume RYa, Rabokon AN, Demkovich AYe, **Pirko YaV**, Yemets AI. Analysis of the exon-intron structure of β -tubulin genes in different plant species. Annual Meeting, 2016, Dec 3-7, San Francisco, California, USA: ASCB, 2016. p. 1177.
35. **Пирко ЯВ**, Рабокoнь АН, Постовойтова АС, Самофалова ДА, Блюм ЯБ. Анализ гомологов генов, кодирующих актин, у различных видов высших растений. Материалы III міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології». 2014, 24-27 лютого, Донецьк, Україна, 2014. с. 284–285.
36. **Пирко ЯВ**, Постовойтова АС, Рабокoнь АМ, Блюм ЯБ. Анализ экзон-интронной структуры генов “домашнего хозяйства” у различных видов растений. Материалы II конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». 2013, 24-25 грудня, Київ, Україна, 2013. с. 34.
37. Демкович АЄ, Рабокoнь АМ, **Пирко ЯВ**, Блюм ЯБ, винахідники; заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Прилад для вертикального гель-електрофорезу; Патент України на корисну модель № 102060. 2015 Жовт. 12. Бюл. 19.