

ОЦІНКА ІНФОРМАТИВНОСТІ SSR-МАРКЕРІВ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СОРТІВ ФУНДУКА УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

А.М. МІЩЕНКО¹, І.О. АНДРЕЄВ^{1, *}, Н.В. ГРИЩЕНКО¹, С.А. КРАВЧЕНКО^{1, 2}, В.А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Київський інститут Національної Гвардії України, МВС України
вул. Оборони Києва, 7, Київ, 03179, Україна

E-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

Автор для кореспонденції – Андреев І.О., e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

Мета — дослідити ефективність SSR-маркерів для ідентифікації та диференціації сортів фундука української селекції. Матеріалом для дослідження були 30 зразків *Corylus spp.*, зокрема рослини 25 сортів фундука та трьох видів ліщини з колекції Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України. Проаналізовано поліморфізм та показники інформативності дев'яти мікросателітних (SSR) локусів. Всі локуси виявилися поліморфними, кількість алелів на локус коливалась від 4 до 7. Встановлено такі значення показників інформативності: вміст інформації про поліморфізм (PIC) в межах 0,337–0,760, в середньому 0,617, очікувана гетерозиготність (H_e) — 0,367–0,791, спостережувана гетерозиготність (H_o) — 0,240–0,920. Отримані результати свідчать про високу ефективність досліджених SSR-локусів як молекулярних маркерів для ідентифікації та диференціації сортів фундука української селекції, а також про можливість їх подальшого використання у селекційному процесі.

Ключові слова: *Corylus spp.*, фундук, сорт, селекція, мікросателітні маркери.

Вступ. Ліщина європейська (*Corylus avellana* L.) займає важливе місце у світовому господарстві як джерело деревини та лікарських засобів, а її горіхи відомі як фундук, вживають у всьому світі в необробленому вигляді та у складі харчових виробів (Yilmaz et al., 2024). Останніми роками глобальний попит на фундук різко зріс, що зумовлює потребу в розширенні програм селекції фундука, спрямованих на розробку нових сортів із цінними характеристиками, такими як стійкість до хвороб, висока врожайність та придатність для промислової обробки (Fiore et al., 2022).

Україна має багату спадщину у культивуванні фундука, напрацьовану зокрема новаторськими

селекційними зусиллями Ф.А. Павленка та його сучасників наприкінці 20 століття. Серед сортів фундука української селекції чимало тих, які характеризуються великим розміром та кулястою формою, що забезпечує зручність при механічній промисловій обробці, а баланс насичених та ненасичених жирних кислот гарантує високі смакові якості та поживну цінність даних сортів. Генетична унікальність цих сортів, а також їх пристосованість до зростання у прохолодному, помірному кліматі, створюють передумови для забезпечення України місця на світовому ринку фундука не лише як джерела сільськогосподарської продукції, а й як країни походження нових промислових сортів (Kosenko et al., 2019; 2020). Детальна характеристика та паспортизація сортів є обов'язковим кроком для їх внесення до міжнародних реєстрів. Останнім часом використання молекулярних маркерів для генетичної характеристики і, зокрема, паспортизації сортів культурних рослин набуває все більшого розповсюдження. Однак, незважаючи на це, досі не проведено систематичної генетичної характеристики сортів фундука української селекції за допомогою молекулярних маркерів.

Завдяки останнім досягненням молекулярної генетики в арсеналі селекціонерів з'явилися ефективні методи генетичної диференціації рослин, зокрема аналіз поліморфізму різноманітних ДНК-маркерів із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Серед них мікросателітні маркери (SSR) виділяються завдяки великій кількості та рівномірному розподілу у геномі, високому рівню поліморфізму та кодомінантному типу успадкування. Аналіз SSR-маркерів показав себе як високоінформативний інструмент молекуляр-

но-генетичного аналізу рослин, що дозволяє доповнити звичайну морфологічну ідентифікацію сортів, яка часто є недостатньо надійною через фенотипові зміни рослин під впливом факторів навколишнього середовища (Öztürk et al., 2018; Kavas et al., 2020).

Використання ДНК-маркерів для спрямування селекційної роботи дозволяє значно спростити процес добору сортів для схрещування, перевірку отриманих форм і відстеження походження гібридів. SSR-маркери успішно застосовують в роботі з різними видами рослин, зокрема для ідентифікації, характеристики генетичних ресурсів, а також їх ефективного використання. Для ідентифікації сортів фундука SSR-маркери на сьогодні використовують в низці країн — провідних виробників цієї культури. Створено геномні бібліотеки, збагачені мікросателітними повторами, які стали основою для характеристики низки SSR-локусів фундука (Gürçan et al., 2010a; Bhattarai and Mehlenbacher 2017). В селекційній роботі SSR-маркери використали для паспортизації нових сортів фундука з метою їх патентування у Туреччині (Yılmaz et al., 2024). Подібним чином, дослідження генетичного матеріалу із використанням SSR-маркерів для визначення груп зчеплення і побудови схем схрещування, виявило значне генетичне різноманіття місцевих сортів фундука в Ірані (Erfatpour et al.,

2011). Також SSR-маркери застосовували для оцінки генетичної різноманітності сортів фундука з Італії та країн Причорномор'я (Gürçan et al., 2010b; Fiore et al., 2022).

Мета роботи полягала в дослідженні ефективності SSR-маркерів для ідентифікації та диференціації сортів фундука української селекції.

Матеріали і методи. Рослинний матеріал та виділення ДНК. Для досліджень використали 30 зразків *Corylus spp.*, до числа яких увійшли 25 сортів фундука і 5 рослин трьох видів ліщини *C. avellana*, *C. colurna* та *C. chinensis* з помологічної колекції Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України, люб'язно надані членом-кореспондентом НАН України І.С. Косенком (табл. 1).

Для виділення ДНК використовували молоде листя, зібране в травні, яке висушували з силікагелем і зберігали в герметичних пластикових пакетах із силікагелем при кімнатній температурі впродовж кількох місяців перед екстракцією. ДНК виділяли методом на основі екстракції цетилтриметиламмоній бромідом (СТАВ), який включає попереднє видалення водорозчинних вторинних метаболітів, що дозволяє підвищити якість препаратів ДНК (Mishchenko and Andreev, 2023). Якість та концентрацію отриманих препаратів ДНК перевіряли гелі-електрофорезом в агарозному гелі шляхом порівняння зі зразком стандартної

Таблиця 1. Культурні сорти фундука і рослини роду *Corylus* із колекції НДП «Софіївка» НАН України, використані для аналізу поліморфізму SSR-маркерів

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

ДНК фага λ з відомою концентрацією, а також з використанням спектрофотометра Nano-Drop 1000 (ThermoFisher Scientific).

Праймери та умови полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для ПЛР-аналізу використали праймери, які фланкують 9 SSR-локусів, описаних раніше (Akin et al., 2016) (табл. 1).

Реакційна суміш загальним об'ємом 13,5 мкл містила 1 $\times$ ПЛР-буфер на основі сульфату амонію (ThermoFisher Scientific) із 2 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ кожного дНТФ, 1 од. Taq-полімерази (ThermoFisher Scientific), 30 нг матричної ДНК, а також праймери, концентрацію яких визначали експериментально (табл. 1). Для автоматичної детекції один із праймерів у кожній парі був мічений флуоресцентною міткою Cy5 (індодикарбоціанін).

ПЛР проводили в термоциклері 5PRIMEG (Techne) за програмою: початкова денатурація: 95 °C – 5 хв; 10 циклів: 95 °C – 30 с, 62 °C із зниженням температури на 1 °C у кожному циклі – 90 с, 72 °C – 30 с; 15 циклів: 95 °C – 20 с, 52 °C – 45 с, 72 °C – 30 с; заключна елонгація: 72 °C – 6 хв.

Якість ПЛР попередньо оцінювали електрофорезом у 2%-вому агарозному гелі з 1 $\times$ SB-

буфером. Фрагментний аналіз проводили в лазерному флуориметрі ALF Express II (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.). Для аналізу 1 мкл міченого ПЛР-продукту змішували з 3 мкл розчину для нанесення на гель, до складу якого входили 95 % формаміду, 5 мг/моль синього декстрана, а також два маркери розміром 84 та 317 п.н. Суміш денатурували при 95 °C упродовж 3 хв, після чого одразу охолоджували на льоду. Зразки наносили на 8%-вий поліакриламідний гель (співвідношення акриламід : біс-акриламід – 24 : 1), що містив 0,6 $\times$ TBE-буфер та 7 М сечовину. Електрофорез проводили за температури 55 °C при 700 В, 50 мА, 35 Вт впродовж 90 хв.

Клонування і сиквенування ПЛР-продуктів. Для уточнення розмірів ПЛР-продуктів, розташованих в центральній частині аналізованого діапазону, було клоновано і визначено нуклеотидну послідовність продуктів ампліфікації чотирьох локусів (в дужках позначено номер зразку в табл. 1): BR414(6); GB950(23); BR259(27); CAC-C008(12). Після електрофоретичного розділення в 2%-вому агарозному гелі фрагменти вирізували та очищали від агарози з використанням набору реагентів Silica Bead DNA Gel

Таблиця 2. Досліджені мікросателітні локуси, їх групи зчеплення та послідовності використаних праймерів

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

Примітка. * – групи локусів, які ампліфікували разом у мультиплексній ПЛР; ** – за Akin et al., 2016.

Extraction Kit (Thermo Scientific). Виділений фрагмент ДНК лігували в плазмиду pGEM-T. Отримані плазмідні конструкції клонували в *E. coli*. Для визначення послідовності клонуваних фрагментів ДНК використали зворотний M13-праймер. Визначені послідовності були депоновані в базі даних NCBI GenBank під номерами: PV926123, PV926124, PV926125, PV926126.

Аналіз даних. На основі флуорограм, отриманих в результаті електрофоретичного фракціонування мічених продуктів ПЛР, визначали розмір фрагментів за допомогою програми Fragment Manager v.2.1 (Pharmacia Biotech).

Інформативність досліджених маркерів оцінювали за такими показниками: роздільна здатність (R_p) (Prevost and Wilkinson, 1999), очікувана та спостережувана гетерозиготність (H_e , H_o), вміст інформації про поліморфізм (PIC – від англ. Polymorphism Information Content) (Botstein et al., 1980) індекс Шенона (I), дискримінаційна здатність (D_L) та кількість недиференційованих пар (ND) (Tessier et al., 1999). H_e , H_o та I розраховували за допомогою GenAlEx (Peakall and Smouse 2006), а R_p , D_L , ND та PIC розраховували в MS Excel.

Оцінку відмінностей між середніми значеннями H_o і H_e проводили за допомогою критерію χ^2 з рівнем значущості 95 % ($p < 0,05$) з використанням онлайн ресурсу Open Source Statistics for Public Health (Sullivan et al., 2009).

Результати та їх обговорення. Ми проаналізували алельний поліморфізм 9 мікросателітних локусів, описаних раніше (Akin et al., 2016; Freixas-Coutin et al., 2019), у вибірці з 30 зразків рослин 25 сортів фундука української селекції та трьох видів *Corylus*.

Ділянки 9 SSR-локусів ампліфікували за допомогою 3 мультиплексних ПЛР по 3 локуси (табл. 2), які згрупували з урахуванням очікуваного розміру ПЛР-продуктів, щоб фрагменти, які відповідають алелям окремих локусів, не накладалися. Це дозволило застосувати мультиплексну ПЛР з праймерами, міченими одним флуоресцентним барвником. Типовий набір продуктів ПЛР для кожної з трьох груп після електрофоретичного фракціонування показано на рис. 1.

Для визначення нуклеотидної послідовності ПЛР-продуктів у центральній частині флуоро-

грами були клоновані та сиквеновані фрагменти, що відповідали гомозиготним алелям кількох локусів. Зокрема було визначено розмір алелів для таких локусів (в дужках позначено номер зразку в табл. 1): BR414(6) – 143 п.н., GB950(23) – 157 п.н., BR259(27) – 237 п.н., CAC-C008(12) – 205 п.н. Отримані дані про розмір цих фрагментів використали для коригування автоматичного розрахунку розмірів інших фрагментів на флуорограми.

Дані електрофоретичного фракціонування ПЛР-фрагментів використали для аналізу розподілу алелів (табл. 3, рис. 2).

Загалом для 9 мікросателітних локусів у вибірці з 30 зразків було виявлено 51 алель. Кількість алелів на локус коливалася від 4 до 7 (табл. 3). Найменшу кількість алелів (по 4) виявлено для локусів BR438 та BR322, а найбільшу (по 7) – для локусів BR270, CAC-C008 та BR259. Середнє значення кількості алелів на локус в нашому дослідженні склало 5,67, що є нижчим за значення, визначені іншими авторами (Akin et al., 2016; Gürcan et al., 2018; Freixas-Coutin et al., 2019; Fiore et al., 2022), де середня кількість алелів на локус коливалася від 7,67 до понад 16. Водночас така відмінність є очікуваною, оскільки згадані дослідники працювали з більшими вибірками (від 50 до 200 зразків і більше), що закономірно розширює спектр виявлених алелів. Також менша кількість алелів може бути спричинена ефектом засновника для дослідженої вибірки або різницею в розподілі алелів між нашим дослідженням та літературними даними. Виключення становили локуси GB949 та BR270, для яких було знайдено більшу кількість алелів порівняно із даними американських дослідників (Akin et al., 2016).

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

Хоча для більшості локусів було виявлено меншу кількість алелів порівняно з літературними джерелами, нижня межа діапазону розмірів алелів локусів GB949 та GB950 виявилася меншою за значення, наведені в статтях американських дослідників (Akin et al., 2016; Freixas-Coutin et al., 2019), а алелі локусу

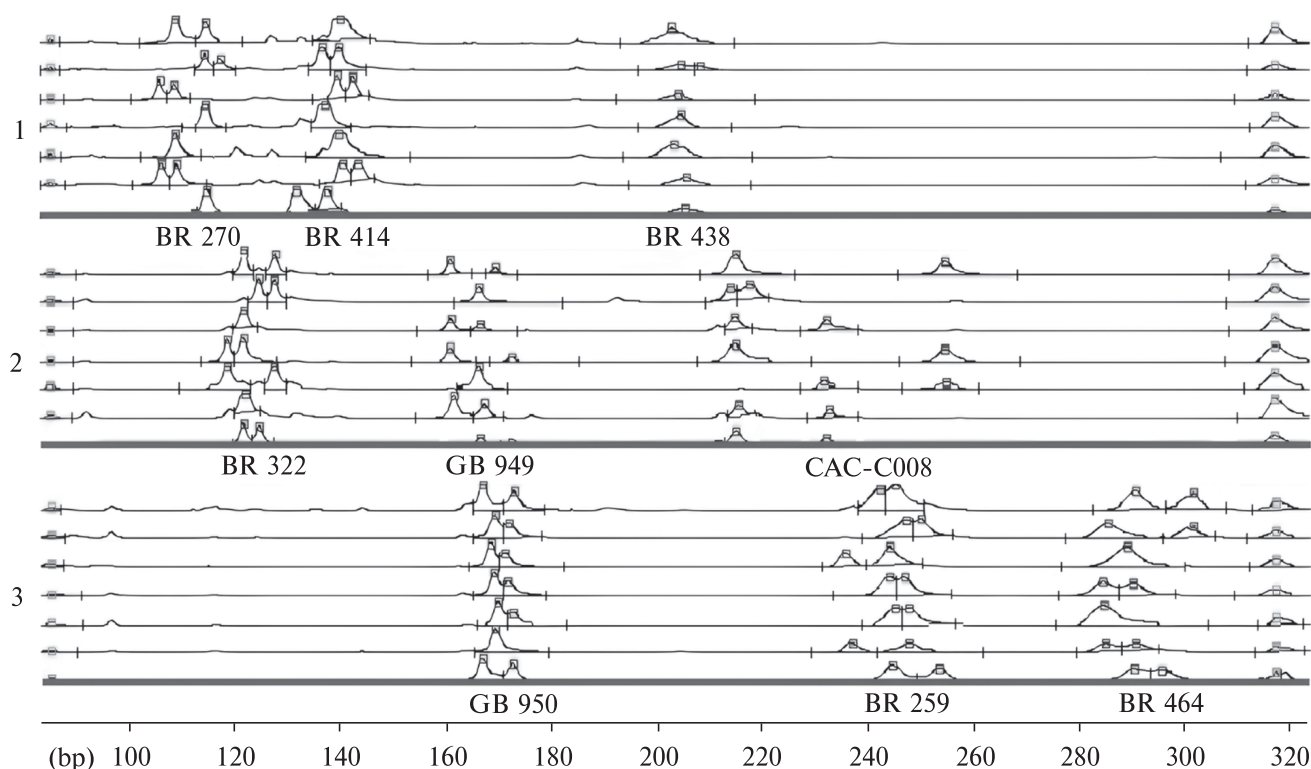


Рис. 1. Приклад флуорограми алелів дев'яти мікросателітних локусів досліджених зразків *Corylus*. 1, 2, 3 – групи локусів, аналізованих одночасно в мультиплексній ПЛР. Першими та останніми піками в кожній доріжці позначено стандарти довжини – 84 та 317 п.н.

BR270 виходили за описану раніше верхню межу, що може вказувати на особливості генетичного матеріалу окремих українських сортів.

Як відомо, для створення більшості сортів фундука впродовж минулого століття прова-

дили активний добір з природних популяцій для збільшення генетичного різноманіття селекційного матеріалу. Таким чином, відмінності в кількості та діапазонах розмірів алелів можуть свідчити про віддалену спорідненість

Таблиця 3. Кількість та діапазон розмірів алелів, виявлених для проаналізованих мікросателітних локусів

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

Примітка. * – за Akin et al., 2016; ** – за Freixas-Coutin et al., 2019.

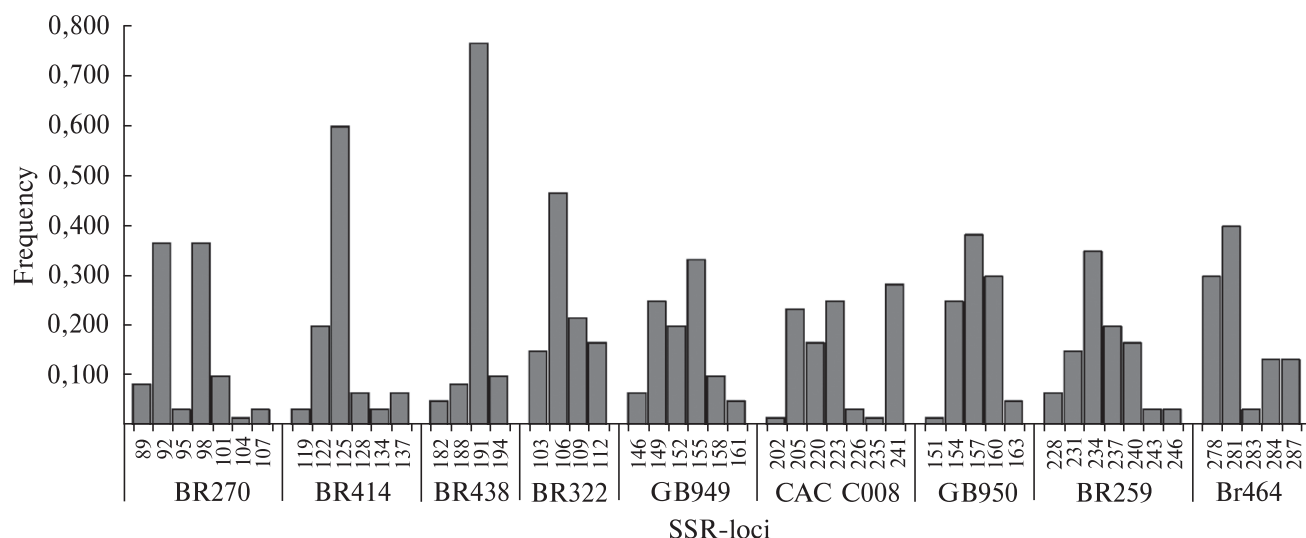


Рис. 2. Гістограма частот алелів дев'яти мікросателітних локусів у досліджених зразків фундука і видів *Corylus*

між сортами фундука українських селекціонерів та описаними у літературних джерелах.

Аналіз частот алелів досліджених SSR-локусів виявив виражену асиметрію та дисбаланс в розподілі алелів деяких з локусів (рис. 2). У більшості з них переважають один або два алелі, тоді як інші мають значно нижчу частоту. Зокрема, для локусу BR438 зафіксовано максимальне значення частоти одного з алелів (191)—0,767, що свідчить про переважаючу присутність цього алеля серед досліджених зразків. Для локусів BR414 і BR322 виявлено по одному переважаючому алелю з частотами 0,600 та 0,467, відповідно. Локуси BR270 та CAC-C008 не мали настільки явної переваги в поширеності одного з алелів перед іншими, однак їхній алельний розподіл характеризувався асиметрією. У частини локусів, зокрема BR464, GB950, GB949 та BR259, частотний розподіл алелів був наближеним до нормального.

Такий розподіл частот алелів характерний для обмеженої вибірки або зумовлений низьким рівнем різноманіття через селекційний добір.

Значення показника інформативності PIC коливалися від 0,337 (BR438) до 0,760 (BR259), із середнім значенням 0,617. Серед усіх досліджених локусів лише у BR438 значення PIC було нижчим за поріг у 0,5, який використовують для добору високополіморфних маркерів.

Отримане середнє значення PIC перевершує визначене для інших SSR-локусів на ви-

бірці з 75 зразків фундука з Сицилії (0,518) (Fiore et al., 2022), і наближається до значення, встановленого (0,662) для 300 зразків фундука, зібраних з 20 різних районів Фінляндії (Tanhuanpää et al. 2019). Вищі значення PIC, наприклад у роботах дослідників з Ірану та Китаю (Ershadi and Toolir 2022; Yang et al., 2023), можуть бути зумовлені більшим розміром вибірок або цілеспрямованим добором найбільш варіабельних маркерів для конкретної вибірки, тому пряме порівняння слід здійснювати з обережністю.

Індекс Шеннона (I) також показав відмінності між локусами за алельним різноманіттям у вибірці проаналізованих зразків. Найвищі значення спостерігались у GB949 (1,657), CAC-C008 (1,518) і BR259 (1,559), що узгоджується з високими значеннями PIC.

Величина спостережуваної гетерозиготності (H_o) становила від 0,240 для BR438 до 0,920 для BR259, а очікуваної гетерозиготності (H_e) — від 0,367 для BR438 до 0,758 для BR259, із середніми значеннями 0,676 та 0,664, відповідно. Ці значення дещо нижчі за результати аналізу гібридних сортів, отриманих шляхом схрещування *Corylus heterophylla* Fisch × *Corylus avellana* L. (Yang et al., 2023) (H_o = 0,840), що може пояснюватися меншою вибіркою та географічною специфікою сортів.

У двох із дев'яти досліджених SSR-локусів виявлено достовірні відмінності (рівень значу-

шості 95 %) між очікуваною (H_e) та спостережуваною (H_o) гетерозиготністю, що свідчить про відхилення від рівноваги Харді–Вайнберга. Зокрема, для локусу GB949 ($H_o = 0,640$; $H_e = 0,807$; $\chi^2 = 3,904$; $p = 0,02409$) зафіксовано надлишок гомозиготних генотипів. Така тенденція характерна для більшості аналізованих локусів і, ймовірно, зумовлена високим рівнем спорідненості між сортами, включеними у вибірку, що цілком очікувано з огляду на їхню спільну селекційну історію.

На противагу цьому, локус BR259 ($H_o = 0,920$; $H_e = 0,774$; $\chi^2 = 2,954$; $p = 0,04284$) продемонстрував достовірний надлишок гетерозигот. Одним із можливих пояснень може бути селективна перевага гетерозиготних форм, пов'язана з наявністю зчепленого функціонально значущого гена. Зокрема, локус BR259 розташований у п'ятій групі зчеплення (LG5) та зчеплений з S-локусом, який контролює несумісність пилку і приймочки у ліщини (pollen-stigma incompatibility). У селекційних популяціях, де відсутнє випадкове схрещування, такий зв'язок може призводити до накопичення гетерозигот, особливо якщо це забезпечує переваги у репродуктивній здатності. Крім того, надлишок гетерозигот міг виникнути внаслідок ефекту засновника: за умов селекції відносно віддалені батьківські форми могли утворити переважно гетерозиготне F_1 -покоління, яке згодом було використане як основа для виведення сорту.

Роздільна здатність (R_p), яка кількісно характеризує здатність маркера розрізняти генотипи у вибірці, у нашому дослідженні мала значення від 1,212 для BR438 до 2,727 для CAC-C008, BR322 та BR259, що свідчить про істотні відмінності між маркерами за цим показником. Найвищу роздільну здатність мали маркери на основі SSR-локусів CAC-C008 (2,727), BR322 (2,727), BR259 (2,727), GB950 (2,667), GB949 (2,485) та BR270 (2,485). Ці результати також узгоджуються з високими значеннями PIC, очікуваної гетерозиготності (H_e) та індексу Шеннона (I) для цих маркерів.

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

Аналіз кількості недиференційованих пар (ND) показав, що жоден з маркерів самостійно не дозволяє розрізнити всі генотипи у проаналізованій вибірці з 25 сортів (табл. 4). Найменше значення ND спостерігалось для CAC-C008 (31,92 пар), GB949 (32,56 пар) і BR464 (43,24 пар) тоді як маркер BR438 (213,1 пар) мав найвище значення серед усіх досліджених локусів, що підтверджує його низьку здатність до

Таблиця 4. Показники інформативності мікросателітних маркерів, розраховані на основі даних аналізу 25 сортів фундука

Локуси	PIC	PIC*	PIC**	ND	R_p	D_L	I	H_o	H_e
BR270	0,629	0,48	0,54	47,85	2,485	0,854	1,297	0,640	0,686
BR414	0,522	0,53	0,60	127,6	1,818	0,675	1,098	0,640	0,572
BR438	0,337	0,41	0,54	213,2	1,212	0,490	0,678	0,240	0,367
BR322	0,661	0,56	0,56	56,55	2,727	0,835	1,313	0,840	0,710
GB949	0,760	0,51	0,58	32,56	2,485	0,892	1,657	0,640	0,791
CAC-C008	0,724	0,77	0,78	31,92	2,727	0,899	1,518	0,800	0,765
GB950	0,611	0,64	0,72	62,00	2,667	0,831	1,197	0,760	0,676
BR259	0,724	0,82	0,79	47,56	2,727	0,864	1,559	0,920	0,758
BR464	0,589	0,46	0,58	43,24	2,182	0,901	1,180	0,600	0,652
Середнє	0,617	0,57	0,63	73,61	2,337	0,804	1,277	0,676	0,664

Примітка. * – за Akin et al., 2016; ** – за Freixas-Coutin et al., 2019. PIC – вміст інформації про поліморфізм; ND – кількість недиференційованих пар; R_p – роздільна здатність; D_L – дискримінаційна здатність; I – індекс Шеннона; H_o – спостережувана гетерозиготність; H_e – очікувана гетерозиготність.

Таблиця 5. Очікувана ефективність різних комбінацій маркерів для диференціації генотипів у вибірках різної величини

Комбінації маркерів	ND (200)	ND (500)	ND (1000)
CAC C008 + GB949	24,03	65,23	133,9
CAC C008 + GB949 + BR464	2,389	6,484	13,31
CAC C008 + GB949 + BR464 + BR270	0,263	0,713	1,464
CAC C008 + GB949 + BR464 + BR259	0,261	0,709	1,455
CAC C008 + GB949 + BR464 + BR259 + BR322	0,034	0,092	0,189

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

розрізнення досліджених сортів. Загальне значення ND для всіх 9 маркерів на вибірці з 30 зразків дорівнювало 0.

Для визначення ефективної комбінації маркерів ми оцінили здатність досліджених SSR-локусів диференціювати сорти фундука шляхом розрахунку кількості недиференційованих пар для вибірок з 200, 500 та 1000 зразків, виходячи з гіпотези про незалежність наборів утворюваних ними продуктів (табл. 5). При застосуванні комбінацій з двох маркерів з найменшими експериментальними значеннями ND, а саме CAC C008 + GB949, розрахункові показники ND були високими і становили 24,03 недиференційованих пар для вибірки з 200 зразків, і понад 100 пар для вибірки з 1000 зразків. У випадку комбінації з трьох маркерів (CAC C008 + GB949 + BR464) розрахункове значення ND зменшилося до 2,389, 6,484 та 13,31 відповідно для вибірок з 200, 500 і 1000 зразків. При використанні комбінацій з чотирьох маркерів, отриманих шляхом додавання BR270 або BR259, значення ND знижувалося до менше однієї пари для вибірок з 200 і 500 зразків, та менше двох пар для вибірки з 1000 зразків. При використанні комбінації з п'яти маркерів: CAC C008 + GB949 + BR464 + BR259 + BR322 значення ND становило 0,034 для 200 зразків, 0,092 для 500 зразків та 0,189 для 1000 зразків.

Загалом, серед досліджених локусів, BR414 та BR438 виявилися недостатньо інформативними для використання в якості маркерів для ідентифікації сортів фундука української селекції. Дані локуси характеризуються вкрай високими значеннями недиференційованих пар

127,6 та 213,1 відповідно, а також низькими значеннями інших показників.

До обмежень дослідження відноситься малий розмір та невизначена репрезентативність вибірки, а також невелика кількість використаних маркерів. Більшість досліджених зразків — це офіційно зареєстровані сорти, тоді як унікальні регіональні сорти могли залишитися поза увагою. Порівняно з іншими дослідженнями, в яких використовували по 14–16 маркерів, вивчені нами 9 маркерів достатні для диференціації досліджених 25 сортів, однак ця кількість може виявитися недостатньою при дослідженні більших за розміром вибірок, які включають споріднений генетичний матеріал.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на збільшення кількості аналізованих українських сортів, залученні зразків з інших регіонів, у тому числі дикорослих форм, а також на верифікації родоводів. Це дозволить не лише поглибити розуміння генетичної структури сортів фундука української селекції, але й забезпечити наукову основу для їх правового захисту, інтеграції у міжнародні бази та використання в процесі селекції.

Висновки. Оцінка 9 SSR-маркерів на основі аналізу вибірки з 30 зразків, до яких увійшли 25 сортів фундука української селекції та 5 рослин видів *Corylus*, показала, що 8 з них мають високі показники інформативності. Теоретичні розрахунки свідчать, що комбінація з п'яти SSR-маркерів з їхнього числа здатна диференціювати генотипи фундука у вибірках з 1000 зразків, за умови збереження того самого рівня спорідненості та генетичного різноманіття, який спостерігався у досліджуваній ви-

бірці. Отримані результати підтверджують доцільність використання досліджених маркерів для молекулярної ідентифікації та верифікації сортів, контролю сортності й вирішення селекційних завдань. Досліджені маркери можуть бути використані для подальшого аналізу сортів фундука української селекції, а також для їхньої паспортизації та сертифікації.

Автори висловлюють глибоку вдячність і пошану воїнам Збройних сил України, які надають змогу для продовження науково-дослідної роботи у воєнний час. Ми також вдячні чл.-кор. НАН України І.С. Косенку та іншим співробітникам НДП «Софіївка» НАН України за наданий матеріал, і особливо проф. А.І. Опалку за поштовх до проведення цієї роботи і критичне обговорення результатів.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Андреев І.О., Грищенко Н.В. та Міщенко А.М. отримували індивідуальну фінансову підтримку в рамках гранту IMBG Simons Foundation Grant for Ukrainian institutions No. FI-PD-Ukraine-00017453.

ASSESSMENT OF THE INFORMATIVENESS OF SSR MARKERS FOR THE IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF UKRAINIAN HAZELNUT VARIETIES

A.M. Mishchenko, I.O. Andreev,
N.V. Hryshchenko, S.A. Kravchenko, V.A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics,
NAS of Ukraine,
150 Zabolotnogo str., 03143, Kyiv, Ukraine
Kyiv Institute of the National Guard of Ukraine, MIA
of Ukraine,
7 Oborony Kyieva str., 03179, Kyiv, Ukraine
E-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

The study was aimed at assessing the efficiency of SSR markers for the identification and differentiation of hazelnut varieties of Ukrainian breeding. The studied material included 30 samples of *Corylus* spp., comprising 25 hazelnut cultivars and three *Corylus* species from the collection of the National Dendrological Park «Sofiyivka» of the NAS of Ukraine. The polymorphism and informativeness parameters of nine microsatellite

(SSR) loci were analyzed. All loci were found to be polymorphic, with the number of alleles per locus ranging from four to seven. The informativeness indices were as follows: polymorphism information content (PIC) ranged from 0.337 to 0.60 (mean 0.617); expected heterozygosity (He) ranged from 0.367 to 0.791; observed heterozygosity (Ho) ranged from 0.240 to 0.920. The results indicate the high efficiency of the analyzed SSR loci as molecular markers for the identification and differentiation of Ukrainian hazelnut cultivars, and their potential use in breeding programs.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Akin, M., Nyberg, A., Postman, J., et al., A multiplexed microsatellite fingerprinting set for hazelnut cultivar identification, *Eur. J. Hortic. Sci.*, 2016, vol. 81, pp. 327–338. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2016/81.6.6>
- Bhattacharai, G., and Mehlenbacher, S.A., In silico development & characterization of tri-nucleotide simple sequence repeat markers in hazelnut (*Corylus avellana* L.), *PLoS One*, 2017, vol. 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178061>
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Gen.*, 1980, vol. 32, pp. 314–331
- Erfatpour, M., Hamidoglu, Y., Kaviani, B., et al., Assessment of genetic diversity among some Iranian hazelnut genotypes using SSR markers, *Aust. J. Crop Sci.*, 2011, vol. 5, pp. 1286–1291
- Ershadi, A., and Toolir, J.F., Evaluation of Genetic diversity of Iranians populations of hazelnut (*Corylus avellana* L.) using SSR markers, *J. Nuts.*, 2022, vol. 13, pp. 273–288. <https://doi.org/10.22034/jon.2022.1955752.1162>
- Fiore, M.C., Marchese, A., Mauceri, A., et al., Diversity assessment and DNA-Based fingerprinting of Sicilian hazelnut (*Corylus avellana* L.) germplasm, *Plants*, 2022, vol. 11, pp. 1–18. <https://doi.org/10.3390/plants11050631>
- Freixas-Coutin, J.A., An, S., Postman, J., et al., Development of a reliable *Corylus* sp. reference database through the implementation of a DNA fingerprinting test, *Planta*, 2019, vol. 249, pp. 1863–1874. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03131-4>
- Gürçan, K., Mehlenbacher, S.A., Botta, R., and Boccacci, P., Development, characterization, segregation, and mapping of microsatellite markers for European hazelnut (*Corylus avellana* L.) from enriched genomic libraries and usefulness in genetic diversity studies, *Tree Genet. Genomes*, 2010a, vol. 6, pp. 513–531. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0269-y>

- Gürcan, K., Mehlenbacher, S.A., and Erdoğan, V., Genetic diversity in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars from Black Sea countries assessed using SSR markers, *Plant Breed*, 2010b, vol. 129, pp. 422–434. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01753.x>
- Gürcan, K., Mehlenbacher, S.A., Köse, M.A., and Balık, H.I., Population structure analysis of European hazelnut (*Corylus avellana*), *Acta Hortic.*, 2018, vol. 1226, pp. 87–92. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1226.12>
- Kavas, M., Yıldırım, K., Seçgin, Z., and Gökdemir, G., Discovery of simple sequence repeat (SSR) markers in hazelnut (*Corylus avellana* L.) by transcriptome sequencing and SSR-based characterization of hazelnut cultivars, *Scand. J. For. Res.*, 2020, vol. 35, pp. 227–237. <https://doi.org/10.1080/02827581.2020.1797155>
- Kosenko, I.S., Opalko, A.I., Balabak, O.A., et al., Hazelnut breeding in the National Dendrological Park «Sofiyivka» of the NAS of Ukraine, *Plant var. stud. prot.*, 2017, pp. 245–251. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.13.3.2017.110706>
- Kosenko, I.S., Opalko, A.I., Balabak, O.A., et al., Hazelnut (*Corylus domestica* Kos. et Opal.) research and breeding at NDP «Sofiyivka» of NAS of Ukraine, *Temp. Hortic. Sustain. Dev. Environ. Ecol. Asp.*, 2019, pp. 237–267
- Mishchenko, A., and Andreev, I., Selection and optimization of the method for DNA isolation and purification from *Corylus species* for PCR analysis, *Fakt. Eksp. Evol., Org.*, 2023, vol. 32, pp. 53–58. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v32.1535>
- Öztürk, S.C., Göktay, M., Allmer, J., et al., Development of simple sequence repeat markers in hazelnut (*Corylus avellana* L.) by Next-generation sequencing and discrimination of Turkish hazelnut cultivars, *Plant Mol. Biol. Report.*, 2018, vol. 36, pp. 800–811. <https://doi.org/10.1007/s11105-018-1120-0>
- Peakall, R., and Smouse, P.E., GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Mol. Ecol. Notes*, 2006, vol. 6, pp. 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Prevost, A., and Wilkinson, M.J., A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars, *Theor. Appl. Genet.*, 1999, vol. 98, pp. 107–112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
- Sullivan, K.M., Dean, A., and Minn Soe, M., OpenEpi: A web-based epidemiologic and statistical calculator for public health, *Public. Health. Rep.*, 2009, vol. 124, pp. 471–474. <https://doi.org/10.1177/003335490912400320>
- Tanhuanpää, P., Heinonen, M., Bitz, L., and Rokka, V.M., Genetic diversity and structure in the northern populations of European hazelnut (*Corylus avellana* L.), *Genome*, 2019, vol. 62, pp. 537–548. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0193>
- Tessier, C., David, J., This, P., et al., Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L., *Theor. Appl. Genet.*, 1999, vol. 98, pp. 171–177. <https://doi.org/10.1007/s001220051054>
- Yang, Z., Zhao, T., Liang, L., et al., Genetic analysis of the cultivars of Ping'ou hybrid hazelnut (*C. heterophylla* Fisch. × *C. avellana* L.) in China based on SSR markers, *Forests*, 2023, vol. 14, no. 7, pp. 1405. <https://doi.org/10.3390/f14071405>
- Yılmaz, M., Işık Özgüven, A., and Aka Kaçar, Y., Molecular characterization of Turkish hazelnut cultivars and genotypes using SSR markers, *Int. J. Agric. Environ. Food. Sci.*, 2024, vol. 8, pp. 88–93. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2024.1.10>

Надійшла в редакцію 11.10.2025

Після доопрацювання 03.11.2025

Прийнята до друку 18.03.2026