ДНК-АНАЛІЗ БАГАТОВІКОВИХ ДЕРЕВ *TILIA CORDATA* L. ЗА ДОПОМОГОЮ SSR-МАРКЕРІВ

С. Ю. БІЛОУС, кандидат біологічних наук, доцент

<https://orcid.org/0000-0002-1682-5352>, e-mail: forest_biotech@nubip.edu.ua

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Л. М. ПРИСЯЖНИЮК, кандидат сільськогосподарських наук

<https://orcid.org/0000-0003-4388-0485>, e-mail: prysiazhniuk_l@ukr.net

Український інститут експертизи сортів рослин

Багатовікові дерева є не тільки пам'ятками природи, а й об'єктом біологічних, генетичних та екологічних досліджень. На території України найчисельнішою групою багатовікових дерев поряд із представниками роду *Quercus* L. є *Tilia* L. Проведення генетичного аналізу багатовікових дерев липи дасть змогу оцінити генетичний поліморфізм між різними представниками одного і того самого виду, здійснити пошук еталонних співтовариств і створити генетичні карти в межах певного виду.

Серед методів молекулярного ДНК-маркування набули широкого поширення, зокрема, SSR-маркери. Для оцінювання поліморфізму *Tilia cordata* L. використано 6 SSR-маркерів (Tc5, Tc915, Tc920, Tc927, Tc937, Tc963).

Висвітлено основні етапи та результати ПЛР-методики для проведення генетичного аналізу багатовікових лип за допомогою SSR-маркерів та визначення генетичного поліморфізму між ними. Розроблено власну універсальну SSR-ПЛР-тест-систему для ДНК-ідентифікації генотипів багатовікових лип.

За результатами SSR-генотипування отримано ДНК-профілі для шести зразків історично цінних та багатовікових дерев *Tilia cordata* L. віком 400–1000 років. На основі даних мікросателітного аналізу здійснено оцінку генетичних взаємозв'язків та рівня генетичного різноманіття вибраних генотипів.

У результаті ПЛР отримали алелі очікуваних розмірів. Відповідно до розрахованого значення індексу поліморфності локуса (PIC), найбільш поліморфним виявився маркер Tc920, PIC становить 0,72, найнижче значення генетичних дистанцій – 1,73.

За результатами досліджень 6 зразків липи дрібнолистої за SSR-маркерами визначено молекулярно-генетичний поліморфізм у всіх досліджуваних зразках.

Проведений аналіз показав, що досліджувана вибірка характеризувалась низьким рівнем генетичного поліморфізму, що може бути наслідком використання обмеженої кількості батьківських форм у селекційному процесі або генетично близьких форм.

Ключові слова: поліморфізм, *Tilia cordata* L., багатовікові дерева, ДНК-маркери.

Актуальність та аналіз останніх досліджень. Багатовікові дерева є не лише пам'ятками природи, а й об'єктом біологічних, генетичних та екологічних дослі-

джень. З метою їх збереження проводять дослідження із вивчення довговічності та оцінки екосистемної полі (Slusar & Kushnir, 2015; Bilous et al., 2019).

На території України найчисельнішою групою багатовікових дерев поряд із представниками роду *Quercus* L. є *Tilia* L. Співпраця європейських країн у межах програми лісових генетичних ресурсів (Lefèvre et al., 2020) сприяє збереженню багатовікових *T. cordata* та сталому використанню лісових генетичних ресурсів, має технічні рекомендації щодо генетичного збереження й використання, зокрема, *Tilia* spp. (Svejgaard, 2003).

Європейські країни з давніми і сильними природоохоронними традиціями давно й успішно займаються інвентаризацією і охороною вікових та інших видатних дерев (Popovych et al., 2011, 2014, 2017; Oleksiichenko & Pidkhovna, 2018; Chornobrov et al., 2019), дослідженнями екосистемної ролі стиглих та перестиглих лісових масивів листяних порід з акцентом на стародавні й незаймані ліси (Bilous et al., 2019). Генетичне різноманіття за ДНК-маркерами багатовікових популяцій *Tilia cordata* активно досліджують у Данії та Великій Британії (Logan et al., 2015; Lobo et al., 2018; Erichsen et al., 2019).

В Україні проблеми, пов'язані із виявленням, дослідженням та збереженням таких дерев, розв'язуються повільно. Українські вчені ведуть дослідження з

виявлення та опису багатовікових дерев *Tilia cordata* в різних регіонах України (Masalskyi, 2015; Sovakova & Sovakov, 2015; Kushnir & Vakulyk, 2018). Зважаючи на вплив абіотичних, біотичних факторів довкілля та техногенне навантаження, може бути знищено цілі популяції деяких видів, зменшиться генетичне різноманіття залишкових популяцій. Тому актуальним залишається розроблення методів оцінки генетичного різноманіття багатовікових дерев *T. cordata* з метою визначення оптимальних шляхів їх збереження (Aerts & Honnay, 2011).

Найбільш поширеними методами вивчення поліморфізму деревних видів є морфологічна оцінка популяцій дерев та застосування білкових і ДНК-маркерів (Barreneche et al., 1998; Pohjanmies et al., 2016; Mohammad-Panah et al., 2017; Müller & Gailing, 2018). SSR (simple sequence repeat) є одними із найуживаніших ДНК-маркерів для оцінки поліморфізму ДНК багатьох видів рослин. Завдяки їх великому поширенню у геномі, високій варіабельності та кодомінтному типу успадкування SSR-маркери є ефективними для визначення генетичного різноманіття рослин, зокрема деревних культур.

Мета дослідження – оцінювання багатовікових дерев *T. cordata* з різних ре-

1. Характеристика дослідного матеріалу

Назва багатовікового дерева	Місце розташування	Вік	Географічні координати
<i>Tilia cordata</i>			
Липа Т. Г. Шевченка	м. Седнів, Чернігівська обл., садиба Лизогубів	понад 600 р.	51°63'76" N 31°56'95" E
Липа П. Могили	м. Київ, біля Андріївської церкви	понад 600 р.	50°45'75" N 30°51'71" E
Багатовікова липа ППСІМ «Феофанія»	м. Київ, ППСІМ «Феофанія»	понад 400 р.	50°43'25" N 50°43'25" E
Липа преподобного Феодосія Печерського	м. Київ, Києво-Печерська лавра	понад 700 р.	50°34'00" N 30°48'68" E
Багатовікова липа в Голосіївському лісі	м. Київ, НПП «Голосіївський»	понад 200 р.	50°72'18" N 29°44'92" E
Багатовікова липа	с. Ірша, Радомишльський р-н, Житомирська обл.	понад 200 р.	50°38'29" N 30°50'51" E

2. Характеристика SSR-маркерів для оцінки поліморфізму *T. cordata*

Назва SSR-маркерів	Нуклеотидні послідовності праймерів 5'→3'	Мотив	Очікуваний розмір ампліконів, п. н.
Tc5	F: TTTTCATACATTTAGAGACTTTTAGCA	(AG) ₁₂	150
	R: TGCATGATTTGTATGTTTAGGG		
Tc915	F: ACATCGATTGTATTTCCCTTAAAC	(CT) ₁₆	165
	R: GTTGTATTTTGGCCCTAACATTG		
Tc920	F: AAATGTCTTCAGAGTGACTAGATGG	(GA) ₂ (GT) ₁₅ (AG) ₄	232
	R: TGCCTCATTATCTCCTAATTCTC		
Tc927	F: AGTCCTCCTGTCAAATGCTG	(AG) ₁₀	157
	R: ATCACACTCGTTTATGACATCTTG		
Tc937	F: AGCCAACCAACTTTTACAATACAG	(AG) ₁₃	162
	R: AGATAAAAGCACATAAATCGATGG		
Tc963	F: CTAACCCCATCTCTTTAATTCTG	(CT) ₁₁	238
	R: GCTTTCATTTACAGTTTTCCTCTAC		

гійонів України за SSR-маркерами та перевірка наявності кореляційних зв'язків між генетичними дистанціями за SSR-маркерами та географічним розташуванням досліджуваних зразків.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом для досліджень були шість зразків багатовікових лип. Дослідження проводили на базі лабораторії молекулярно-генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин упродовж 2019 р.

ДНК екстрагували із 100 мг зеленого листа з використанням СТАБ у двох повтореннях. Отриману сумарну ДНК розчиняли в ТЕ буфері (Prysiashniuk et al., 2017). Вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму липи дрібнолистої проводили за шістьма SSR-маркерами (Phuekvilai & Wolff, 2013). Характеристики праймерів і нуклеотидні послідовності подано в табл. 2.

Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила: однократний буфер для ПЛР (10 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 50 мМ KCl; 0,01 % Triton X-100), 200 мкМ кожного dNTP, по 0,2 мкМ кожного праймера, 2 мМ MgCl₂, 50 нг ДНК, 0,5 од. Taq полімерази полімерази. Температурні параметри ПЛР: початкова денатурація – 95°C, 3 хв; далі 30 циклів: 94°C – 30 с; 54°C (60°C для Tc927) – 1 хв; 72°C –

30 с; заключна елонгація – 72°C, 3 хв. Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі T-CY (Creacon Technologies B. V., The Netherlands).

Продукти реакції ампліфікації візуалізували методом електрофорезу в 2 % агарозному гелі у 0,5×ТБЕ (трис-боратний буферний розчин) за загальноприйнятою методикою з бромистим етидієм (Tkachuk, 2015). Електрофорез проводили протягом 1,5 години за напруженості електричного поля 5 В/см.

Розмір фрагментів визначали за допомогою програмного забезпечення TotalLab 12.0 (демонстраційна версія). Для характеристики генетичної структури досліджуваних генотипів розраховували частоти ідентифікованих алелів та індекс поліморфності локуса (PIC, polymorphism information content) (Sivolar et al., 1998). З метою проведення кластерного аналізу будували матрицю, у якій наявність/відсутність певного алелю позначали 1/0 відповідно. Для аналізу застосовували метод ієрархічної кластеризації з Евклідовою мірою відстані за допомогою комп'ютерної програми STATISTICA 12.0 (демонстраційна версія). Групування у кластери досліджених генотипів проводили за допомогою незваженого методу середніх зв'язків (Unweighted pair group average) (Drozdov,

2010; Ermantraut, 2007). Кореляційні зв'язки між досліджуваними зразками за SSR-маркерами та їх географічним розташуванням визначали за генетичними дистанціями з використанням тесту Мантеля за допомогою комп'ютерної програми XLSTAT 2018 (демонстраційна версія) (Lobo et al., 2018; Tommasini et al., 2003; Legendre et al., 2010; Diniz-Filho et al., 2013; Klyachenko & Prysiashniuk, 2018).

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті електрофоретич-

ного розділення продуктів ПЛР отримано амплікони очікуваного розміру для зразків липи дрібнолистої.

За результатами аналізу визначено, що за досліджуваними SSR-маркерами ідентифіковано від 2 до 5 алелів. На рисунках 1 і 2 подано результати електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації за маркерами Тс927, Тс937 і Тс963.

Відповідно до отриманого розподілу, визначено, що за маркером Тс927 у досліджуваних зразків липи дрібнолистої ідентифіковано два алелі: 152 і 168 п. н.

Рис. 1. Результати ПЛР-зразків липи дрібнолистої за маркером Тс927: 1 – липа Т. Г. Шевченка; 2 – липа П. Могили; 3 – липа преподобного Феодосія Печерського; 4 – багатовікова липа парку-пам'ятки «Феофанія»; М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O'GeneRuler (Thermo Scientific)

Рис. 2. Результати ПЛР-зразків липи дрібнолистої за маркером Тс963: 1 – липа Т. Г. Шевченка; 2 – липа П. Могили; 3 – липа преподобного Феодосія Печерського; 4 – багатовікова липа парку-пам'ятки «Феофанія»; за маркером Тс937: 5 – липа Т. Г. Шевченка; 6 – липа П. Могили; 7 – липа преподобного Феодосія Печерського; 8 – багатовікова липа парку-пам'ятки «Феофанія»; М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O'GeneRuler (Thermo Scientific)

Причому внутрішньогенетичний поліморфізм виявлено у зразків липи Т. Г. Шевченка та багатовікової липи парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва «Феофанія». За маркерами Tc963 і Tc937 у досліджуваних зразків ідентифіковано також по два алелі: 238 і 246 п. н., 152 і 162 п. н. відповідно. Найбільшу кількість алелів – п'ять – виявлено за маркером Tc920, за маркерами Tc5 та Tc915 отримано по чотири алелі на маркер.

Відповідно до розрахованих частот ідентифікованих алелів визначено, що найбільшу частоту має алель 152 п. н., який ідентифіковано за маркером Tc927 (рис. 3). Цей алель виявлено у всіх досліджуваних зразках липи дрібнолистої. Алель 168 п. н., що також виявлений за цим маркером, має низьку частоту 0,17, тому РІС для маркера Tc927 низький і становить 0,28.

Слід зауважити, що за маркерами Tc937 і Tc963 виявлено також по два алелі, проте їх більш рівномірний розподіл дав змогу отримати вищі, ніж у маркера Tc927, РІС – 0,50 та 0,44 відповідно. Найменшу частоту (0,06) серед виявлених алелів має алель розміром 174 п. н., який ідентифіковано за маркером Tc5 лише у одного зразка – липи П. Могили.

Алель 158 п. н. також виявлено тільки в одному зразку – у липи преподобного Феодосія Печерського, однак він має вищу частоту (0,17), оскільки цей зразок виявився гомозиготним за цим маркером. Водночас у зразку липи П. Могили ідентифіковано три алелі: 154, 174 та 180 п. н. за маркером Tc5.

Найбільш поліморфним виявився маркер Tc920 (РІС 0,72), за яким отримано п'ять алелів, частоти алелів становлять 0,08–0,42. За маркером Tc915 ідентифіковано чотири алелі з розмірами 154–182 п. н. Рівномірний розподіл виявлених алелів дав змогу отримати достатньо високий РІС – 0,65. Отже, в результаті досліджень встановлено, що всі досліджувані зразки липи серцелистої виявились гетерозиготними за маркерами Tc927, Tc5, Tc920 і Tc915, на що вказує наявність більше ніж одного алеля у зразку за вказаними маркерами. Водночас за маркером Tc927 значення РІС виявилось низьким.

Отже, для визначення поліморфізму багатовікових дерев липи серцелистої найбільш ефективними виявились маркери Tc5, Tc915 і Tc920 зі значеннями РІС від 0,51 до 0,72. Дослідження, проведені Phuekvilai and Wolff (2013), за-

Рис. 3. Частоти отриманих алелів за SSR-маркерами для зразків липи дрібнолистої

свідчили, що 15 SSR-маркерів є ефективними для визначення поліморфізму *Tilia platyphyllos*. Також автори показали, що розроблені ними маркери можна використовувати для оцінки генетичного різноманіття інших видів роду *Tilia*. У поданих авторами результатах зазначено, що найбільш поліморфними маркерами при дослідженні двох популяцій *Tilia platyphyllos* виявились Tc5, Tc915, Tc927, Tc937 і Tc963. У наших дослідженнях зразків *Tilia cordata* серед цих маркерів найбільш поліморфними є маркери Tc5 і Tc915. Маркер Tc920, за яким у *Tilia platyphyllos* ідентифіковано 9 алелів (Phuekvilai & Wolff, 2013), у наших дослідженнях виявився найбільш поліморфним. У дослідженнях Logan et al. (2015) показано високий рівень поліморфізму за 13 маркерами двох видів липи *Tilia platyphyllos* і *Tilia cordata*. Найбільш поліморфним у *Tilia platyphyllos* виявився локус Tc915, у *Tilia cordata* –

Tc963. За цими маркерами було ідентифіковано 18 і 26 алелів відповідно (Logan et al., 2015). Дослідження щодо оцінки генетичного різноманіття виду *Tilia cordata* проводили Cvrčková et al. (2018). На відміну від отриманих нами результатів, у дослідженнях Cvrčková et al. (2018) найбільш поліморфним виявився локус Tc963, за яким було ідентифіковано 15 алелів. За маркерами Tc5, Tc915 і Tc920 було виявлено від 7 до 11 алелів, що також свідчить про високий рівень поліморфізму (Cvrčková et al., 2018). Отже, відповідно до отриманих даних, для дослідження зразків *Tilia cordata* можна рекомендувати маркери Tc5, Tc915 і Tc920.

Для оцінки ступеня генетичної близькості за SSR маркерами зразків липи дрібнолистої проводили кластерний аналіз. Результати кластеризації у вигляді філогенетичного дерева подано на рис. 4. Відповідно до отриманих даних за

Рис. 4. Кластерний розподіл зразків липи дрібнолистої за SSR-маркерами: Л. 1 – липа Т. Г. Шевченка; Л. 2 – липа П. Могили; Л. 3 – липа преподобного Феодосія Печерського; Л. 4 – багатовікова липа парку-пам'ятки «Феофанія»; Л. 5 – багатовікова липа (с. Ірша); Л. 6 – багатовікова липа в Голосіївському лісі

результатами аналізу сформовано чотири кластери.

У результаті досліджень визначено, що найбільш близькими є зразки липи Т. Г. Шевченка та липи преподобного Феодосія Печерського; значення генетичних дистанцій становить 1,73. В один кластер також увійшли зразки багатовікової липи (с. Ірша) та багатовікової липи в Голосіївському лісі. Значення генетичних дистанцій становить 2,00. Найбільше значення генетичних дистанцій (3,74) зауважено між зразками липи П. Могили та багатовікової липи парку-пам'ятки «Феофанія», що свідчить про те, що ці зразки є найбільш віддаленими за досліджуваними SSR-маркерами. Окремі кластери сформували зразки липи П. Могили та багатовікової липи парку-пам'ятки «Феофанія». Значення

генетичних дистанцій щодо інших досліджуваних зразків становить 2,65–3,74. Застосування SSR-маркерів для оцінки генетичного різноманіття *Tilia cordata* та *Tilia platyphyllos* у Великій Британії показано Logan et al. (2015). Обидва види засвідчили високий рівень поліморфізму. Автори отримали підтвердження внутрішньо- та міжпопуляційної генетичної структури досліджуваних видів. На основі генетичних маркерів визначено, що ця структура має слабкий зв'язок із місцем розташування (Logan et al., 2015).

Із метою перевірки наявності кореляційних зв'язків між парами зразків липи серцелистої та їхнім географічним розташуванням застосовували тест Мантеля (лінійна кореляція за Пірсоном) (рис. 5).

У результаті аналізу визначено імовірність помилки першого роду p та ко-

Рис. 5. Взаємозв'язки між генетичними дистанціями зразків липи дрібнолистої за SSR-маркерами та їхнім географічним розташуванням

ефіцієнт кореляції $r(AB)$ для теоретичного рівня значущості $\alpha=0,05$, які відповідно до інтерпретації тесту дають змогу прийняти одну із висунутих гіпотез аналізу про наявність (H_a) або відсутність кореляції (H_0).

За результатами аналізу генетичних дистанцій зразків липи дрібнолистої обчислене значення p (0,350) вище, ніж рівень значущості $\alpha=0,05$, що свідчить про відсутність кореляційних зв'язків. Коефіцієнт кореляції становить -0,255. Отже, отримані дані свідчать про відсутність кореляційних зв'язків між зразками липи серцелистої та їхнім географічним розташуванням.

У дослідженнях Lobo et al. (2018) показано оцінку генетичного різноманіття *Tilia cordata* в Данії на основі SSR-маркерів і spring phenology. Автори виявили значні відмінності між популяціями за spring phenology та ДНК-маркерами. Проте кореляції між генетичними дистанціями за ДНК-маркерами та географічним розташуванням виявлено не було. Автори вважають це наслідком фрагментації популяцій *Tilia cordata* в Данії, що могло призвести до низького потоку генів між ізолюваними популяціями (Lobo et al., 2018).

У дослідженнях охарактеризовано окремі дерева липи дрібнолистої різного віку з різних регіонів України, проте відсутність кореляції між генетичними дистанціями та географічним розташуванням може бути також пов'язана з ізоляцією популяцій, а також значними відмінностями за віком (від 200 до 1000 років) (Hutchinson & Templeton, 1999; Mylett, 2016).

Висновки і перспективи. За результатами досліджень шести зразків липи

серцелистої за SSR-маркерами визначено молекулярно-генетичний поліморфізм у всіх цих зразках. Для досліджуваних зразків липи серцелистої найвищий рівень поліморфізму було виявлено за маркером Tc920 (PIC 0,72). За результатами кластерного аналізу встановлено, що найнижче значення генетичних дистанцій (1,73) за SSR-маркерами серед досліджуваних зразків липи дрібнолистої було зауважено між липою Т. Г. Шевченка та липою преподобного Феодосія Печерського. Найбільш віддаленими виявились зразки липи П. Могили та багатовікової липи парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва «Феофанія», значення генетичних дистанцій становить 3,74. Отже, для оцінки молекулярно-генетичного поліморфізму багатовікових дерев липи серцелистої можна рекомендувати застосування SSR-маркерів як ефективної системи визначення генетичного різноманіття.

Отримані результати є основою для вивчення генетичного поліморфізму й створення ДНК-паспортів історично-цінних, багатовікових та заповідних дерев.

Визначено, що між досліджуваними зразками липи серцелистої та їхнім географічним розташуванням немає кореляційного зв'язку. Заважаючи на невелику кількість зразків і низький рівень поліморфізму частини використаних маркерів, для визначення достовірного кореляційного зв'язку та отримання повної характеристики не тільки окремих зразків, а й популяцій багатовікових дерев необхідно продовжити дослідження із залученням більшої кількості маркерів та досліджуваних зразків.

Список літератури

Barreneche, T., Bодenes, C., Lexer, C., Trontin, J. F., Fluch, S., Streiff, R., ... & Favre, J. M. (1998). A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD,

SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 (7), 1090–1103. <https://doi.org/10.1007/s001220050996>

- Bilous, A., Matsala, M., Radchenko, V., Matiaschuk, R., Boyko, S., & Bilous, S. (2019). Coarse Woody Debris in Mature Oak Stands of Ukraine: Carbon Stock and decomposition features. *Forest Ideas*, 25.1 (57), 196–219.
- Chornobrov, O., Bilous, S., Chornobrov, O., & Manko, M. (2019). Peculiarities of morphogenesis of the endangered species of willow (*Salix* spp.) *in vitro*. *Biologyja*, 65 (1), 48–55.
- Chokheli, V., Kozlovsky, B., Sereda, M., Lysenko, V., Fesenko, I., Varduny, T., ... & Bondarenko, E. (2016). Preliminary comparative analysis of phenological varieties of *Quercus robur* by ISSR-markers. *Journal of Botany*. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7910451>
- Craciunescu, I., Ciocîrlan, E., Sofletea, N., & Curtu, A. L. (2011). Genetic diversity of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in Prejmer Natural Reserve. Bulletin of the Transilvania University of Brasov. *Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering, Series II*, 4 (1), 15.
- Cvrčková, H., Komárková, M., Trčková, O., & Máchová, P. (2018). Micropropagation of *Tilia cordata* Mill. and verification of genetic diversity of donor trees. Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges. The 5th International Conference (September 10-15, 2018), Coimbra, Portugal, 43–46.
- Diniz-Filho, J. A. F., Soares, T. N., Lima, J. S., Dobrovolski, R., Landeiro, V. L., Telles, M. P. D. C., ... & Bini, L. M. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and molecular biology*, 36 (4), 475–485. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000400002>
- Drozdo, V. I. (2010). Instructions for using the Statistica 6.0. [in Russian].
- Erichsen, E. O., Wolff, K., & Hansen, O. K. (2019). Genetic and clonal structures of the tree species *Tilia cordata* mill. in remnants of ancient forests in Denmark. *Population Ecology*, 61 (3), 243–255. <https://doi.org/10.1002/1438-390X.12002>
- Ermantaut, E. R., Prysiashniuk, O. I., & Shevchenko, I. L. (2007). Statistical analysis of agronomic study data in the software suite Statistica 6.0. Kyiv [in Ukrainian].
- Galkin, S. I., Dragan, N. V., & Doiko, N. M. (2013). Experience the conservation of ancient trees and historical compositions in arboretum Olexandria of the NAS of Ukraine. *Plant Introduction*, 4, 42–50 [in Ukrainian].
- Hutchison, D. W., & Templeton, A. R. (1999). Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, 53 (6), 1898–1914. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb04571.x>
- Kampfer, S., Lexer, C., Glossl, J., & Steinkellner, H. (1998). Brief report characterization of (GA) n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas*, 129 (183), 1–86.
- Klyachenko, O., & Prysiashniuk, L. (2018). Polymorphism in sugar beet varieties and hybrids in cell selection for resistance to abiotic factors. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, (6), 602. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.7.6.602-606>
- Kushnir, A. I., & Vakulyk, I. I. (2018). Value of unique old trees - a natural monument. *Biological Resources and Nature Management*, 10 (3–4), 176–182 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.31548/bio2018.03.023>
- Lefèvre, F., Alia, R., Bakkebø Fjellstad, K., Graudal, L., Oggioni, S. D., Rusanen, M., Vendramin, G. G., & Bozzano, M. (2020). Dynamic conservation and utilization of forest tree genetic resources: indicators for in situ and ex situ genetic conservation and forest reproductive material. European Forest Genetic Resources Programme (EU-FORGEN), European Forest Institute.
- Legendre, P., & Fortin, M. J. (2010). Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Molecular ecology resources*, 10 (5), 831–844. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02866.x>
- Lobo, A., Hansen, O. K., Hansen, J. K., Erichsen, E. O., Jacobsen, B., & Kjær, E. D. (2018). Local adaptation through genetic differentiation in highly fragmented *Tilia cordata* populations. *Ecology and evolution*, 8 (12), 5968–5976. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02866.x>
- Logan, S. A., Phuekvilai, P., & Wolff, K. (2015). Ancient woodlands in the limelight: delineation and genetic structure of ancient woodland species *Tilia cordata* and *Tilia platyphyllos* (Tiliaceae) in the UK. *Tree Genetics & Genomes*, 11 (3), 52. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0872-z>
- Masalskyi, V. P. (2015). Longevity and their preservation in Ukraine. *Scientific journal of NULES of Ukraine. Series: Forestry and ornamental gardening*, 229, 271–277 [in Ukrainian].
- Mohammad-Panah, N., Shabanian, N., Khadivi, A., Rahmani, M. S., & Emami, A. (2017). Genetic structure of gall oak (*Quercus infectoria*) characterized by nuclear and chloroplast SSR markers. *Tree Genetics & Genomes*, 13 (3), 70. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1146-8>
- Müller, M., & Gailing, O. (2018). Characterization of 20 new EST-SSR markers for northern red oak (*Quercus rubra* L.) and their transferability to *Fagus sylvatica* L. and six oak species of section *Lobatae* and *Quer-*

- cus. Annals of Forest Research*, 61 (2), 211–222. <https://doi.org/10.15287/afr.2018.1191>
- Mylett, A. J. (2016). Genetic diversity and regenerative potential of *Tilia cordata* Miller in the Lincolnshire limestones. (Doctoral dissertation, University of Lincoln).
- Oleksiiuchenko, N., & Pidkhovna, S. (2018). The old-age trees of the parks-monuments as park and garden art objects a in Ternopil region. *Proceedings of the forestry academy of sciences of Ukraine*, 16, 41–49 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15421/411805>
- Phuekvilai, P., & Wolff, K. (2013). Characterization of microsatellite loci in *Tilia platyphyllos* (Malvaceae) and cross-amplification in related species. *Applications in plant sciences*, 1 (4), 1200386. <https://doi.org/10.3732/apps.1200386>
- Pohjanmies, T., Elshibli, S., Pulkkinen, P., Ruusanen, M., Vakkari, P., Korpelainen, H., & Roslin, T. (2016). Fragmentation-related patterns of genetic differentiation in pedunculate oak (*Quercus robur*) at two hierarchical scales. <https://doi.org/10.14214/sf.1510>
- Popovych, S. Yu., Stepanenko, N. P., Ustymenko, P. M., Diachenko Y. M., & Korinko, O. M. (2011). Dendrosozologichnyi katalog pryrodno-zapovidnoho fondu Lisostepu Ukrainy. NULES of Ukraine. Kyiv: Ahrar Media Hrup [in Ukrainian].
- Popovych, S. Yu., Vlasenko, A. S., Beruta, E. I., Diachenko, Yu. M., Stepanenko, N. P. (2014). Dendrososological catalog of the nature reserve fund of the Steppe of Ukraine. Kyiv: Kompyrnt [in Ukrainian].
- Popovych, S. Yu., Savoskina, A. M., Ustymenko, P. M., et al. (2017). Dendrososological catalog of the nature reserve fund of Ukrainian Polissia. NULES of Ukraine. Kyiv: Kompyrnt [in Ukrainian].
- Prisyazhniuk, L., Shytikova, Y., Dikhtiar, I., & Mizerna, N. (2019). Evaluation of genetic and morphological distances between soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Zemdirbyste-Agriculture*, 106 (2), 117–122. <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.015>
- Sandurska, E., Ulaszewski, B., & Burczyk, J. (2017). Genetic insights into ecological succession from oak-(*Quercus robur* L.) to beech-(*Fagus sylvatica* L.) dominated forest stands. *Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica*, 59 (1), 23–33. <https://doi.org/10.1515/abcsb-2017-0002>
- Sivolap, Yu. M., Kalendar, R. N., & Verbitskaya, T. G. (1998). The use of PCR analysis in genetic selection studies. Scientific guidance.. Kiev: Agrarna nauka [in Russian].
- Sliusar, S. I., & Kushnir, A. I. (2015). Modern socio-ecological aspects of the development of the methodology of research of centuries-old trees. *Scientific journal of NULES of Ukraine. Series: Forestry and ornamental gardening*, 229, 323–333 [in Ukrainian].
- Sovakova, M. O., & Sovakov, O. V. (2015). Age limes in Kyiv. *Scientific journal of NULES of Ukraine. Series: Forestry and ornamental gardening*, 229, 333–339 [in Ukrainian].
- Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., & Glössl, J. (1997). Conservation of (GA)n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 6 (12), 1189–1194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00288.x>
- Streiff, R., Labbé, T., Bacilieri, R., Steinkellner, H., Glössl, J., & Kremer, A. (1998). Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology*, 7 (3), 317–328. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1998.00360.x>
- Tkachyk, S. O. (Ed.). (2015). Regulations on the procedure and the conduct of qualification tests for suitability of crop varieties for dissemination in Ukraine. Methods of determining quality indices of crop products. Vinnytsia: Nilan-LTD [in Ukrainian].
- Tommasini, L., Batley, J., Arnold, G., Cooke, R., Donini, P., Lee, D., ... & Edwards, K. (2003). The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (6), 1091–1101. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1125-8>
- Yücedağ, C., & Gailing, O. (2013). Morphological and genetic variation within and among four *Quercus petraea* and *Q. robur* natural populations. *Turkish Journal of Botany*, 37 (4), 619–629. <https://doi.org/10.3906/bot-1205-18>

Bilous, S. Yu., Prisyazhniuk, L. M. (2020). DNA analysis of centuries-old Linden trees using SSR-markers. *Ukrainian Journal of Forest and Wood Science*, 11 (4), 4–14. <https://doi.org/10.31548/forest2020.04.001>

Centuries-old trees are not only natural monuments, but also objects of biological, genetic and ecological research. The most numerous group of perennial trees in Ukraine, along with members

of the genus *Quercus* L. is *Tilia* L. Genetic analysis of perennial linden trees will assess genetic polymorphism between different members of the same species, search for reference communities, and create genetic maps within a species. DNA markers have become widespread among molecular DNA labeling methods, in particular SSR markers.

To assess the polymorphism of ancient *Tilia cordata* L. in research were used 6 SSR markers (Tc5, Tc915, Tc920, Tc927, Tc937, Tc963).

The main stages and results of PCR technique for genetic analysis of perennial linden trees using SSR markers and determination of genetic polymorphism between them are highlighted. Our own universal SSR-PCR test system for DNA identification of genotypes of perennial lindens has been developed.

According to the results of SSR genotyping, DNA profiles were obtained for 6 samples of historically valuable and centuries-old trees of *Tilia cordata* L. aged 400-1000 years. Based on microsatellite analysis, genetic relationships and the level of genetic diversity of selected genotypes were assessed.

As a result of PCR, alleles of the expected size were obtained. According to the calculated value of the half-morphology index of the locus (RIC), the most polymorphic marker Tc920 PIC was 0.72, the lowest value of genetic distances (1.73).

According to the results of studies of 6 samples of small-leaved linden by molecular SSR markers, molecular genetic polymorphism was determined in all studied samples.

The analysis showed that the sample was characterized by a low level of genetic polymorphism, which may be due to the use of a limited number of parental forms in the selection process or genetically related forms.

Keywords: polymorphism, *Tilia cordata* L., old value trees, DNA markers.

Отримано: 2020-11-10