



В. А. Ковальова, Ю. М. Юсипович, Ю. І. Шаловило, Н. І. Груник, Р. Т. Гут

Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ГЕНОТИПІВ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ ЗА ПОЛІМОРФІЗМОМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ ДЕФЕНЗИНІВ

Наведено результати дослідження генотипів сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) із використанням молекулярних маркерів на підставі генетичного поліморфізму довжини інтронів генів дефензинів *PsDef1-4*. Виявлено високу інформативність маркерів на підставі інтрону гена *PsDef2* (IPL-*PsDef2*) для дослідження внутрішньовидового поліморфізму в сосни звичайної. Встановлено межі осередка інфекції кореневої губки (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) в сосновому насадженні за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням видоспецифічних праймерів. Проведено ДНК-профілювання модельних дерев способом електрофоретичного розділення ампліконів IPL-*PsDef2* маркерів. За результатами поліморфізму довжини інтронів генів дефензинів здійснено кластеризацію генотипів сосни звичайної із використанням алгоритму UPGMA. на підставі дендрограми виділено два кластери генотипів зі 100 % бутстреп підтримкою, які відрізняються за стійкістю до кореневої губки. Методом К-середніх визначено значущість кожного з ампліконів для диференціації генотипів сосни на групи. Виявлено амплікони, які можуть бути генетичними маркерами для оцінки потенційної стійкості генотипів сосни звичайної до кореневої губки. Отримані дані щодо поліморфізму локусів генів дефензинів, а також результати кластерного аналізу вказують на перспективність використання IPL-*PsDef2* маркерів для генотипування сосни звичайної.

Ключові слова: *Pinus sylvestris* L.; генетичний поліморфізм; коренева губка; кластерний аналіз.

Вступ. Сосна звичайна, завдяки своїй здатності рости в різних лісорослинних умовах, займає значний ареал на євразійському континенті, що є наслідком високого поліморфізму цього виду, який виражається в утворенні форм, пристосованих до конкретної амплітуди коливань чинників довкілля. Інтенсивне лісокористування, глобальні кліматичні зміни, забруднення навколишнього середовища призвели до скорочення природних деревостанів *Pinus sylvestris* L., до зниження біотичного потенціалу популяцій, збіднення їх генофонду, втрати продуктивності та стійкості соснових лісів. В останні десятиріччя спостерігають ослаблення та вихання соснових лісів у Західному та Малому Поліссі та в інших регіонах Європи (Bigler et al., 2006; Siitonen, 2014; Andreieva et al., 2018). Дієвим підходом до підвищення біологічної стійкості лісів є селекція резистентних до стресів форм рослин, яка базується на широкому діапазоні їх природної мінливості за ступенем сприйнятливості до стресових чинників довкілля. Для генетичного супроводу селекційних програм дедалі частіше використовують молекулярні маркери на підставі ДНК поліморфізму.

У лісовій генетиці традиційно використовують декілька систем молекулярних маркерів RFLP, AFLP,

SSR, RAPD, SNP та інші (Dzialuk et al., 2014; Eveno et al., 2007; Lučić et al., 2011; Williams & Neale, 1992). Порівняно новим є метод генетичного маркування на підставі поліморфізму довжини інтронів генів (intron length polymorphism – ILP), які в геномах представлені родинними, зокрема генів β -тубуліну (Choi et al., 2004). Маркери ILP є унікальними, оскільки вони є геноспецифічними, ко-домінантними, гіперваріабельними, нейтральними, зручними та надійними. Поліморфізм можна виявити за допомогою ПЛР із праймерами, які розроблено на підставі послідовностей екзонів, що фланкують цільовий інтрон. Ці маркери, незважаючи на те, що вони походять від послідовностей конкретних генів, показали вищий, за інші види маркерів, внутрішньовидовий поліморфізм у рослин. За допомогою методу ILP побудовано філогенетичне дерево для 9 видів хвойних рослин, але для дослідження внутрішньовидового поліморфізму сосни звичайної ці маркери досі не використовували (Chen et al., 2011).

Дефензини в геномах рослин представлені мультигенними родинними. Ці захисні протеїни мають однотипну будову: один інтрон, який розташований у фіксованому локусі в межах двох екзонів. Клоновані нами кДНК генів дефензинів *PsDef1* (*Pinus sylvestris* дефен-

Інформація про авторів:

Ковальова Валентина Андріївна, канд. біол. наук, ст. наук. співробітник, кафедра лісівництва. Email: kovaleva@nltu.edu.ua;
<https://orcid.org/0000-0002-3099-2747>

Юсипович Юрій Михайлович, канд. біол. наук, ст. наук. співробітник, кафедра лісівництва. Email: jojusse@gmail.com

Шаловило Юлія Ігорівна, канд. біол. наук, ст. наук. співробітник, кафедра лісівництва. Email: yulya.shalovylo@gmail.com

Груник Наталія Ігорівна, мол. наук. співробітник, кафедра лісівництва. Email: hrunykn@gmail.com

Гут Роман Тарасович, д-р біол. наук, професор, кафедра лісівництва. Email: rgoutmollab@ukr.net

Цитування за ДСТУ: Ковальова В. А., Юсипович Ю. М., Шаловило Ю. І. та ін. Диференціація генотипів сосни звичайної за поліморфізмом довжини інтронів генів дефензинів. Науковий вісник НЛТУ України. 2018, т. 28, № 8. С. 40–44.

Citation APA: Kovaleva, V. A., Yusypovych, Yu. M., Shalovylo, Y. I., et al. (2018). Differentiation of scots pine genotypes by intron length polymorphism of defensin genes. *Scientific Bulletin of UNFU*, 28(8), 40–44. <https://doi.org/10.15421/40280808>

зин 1), *PsDef2*, *PsDef3* та *PsDef4* (GenBank Acc.No EF455616.1, EF455617.1, JN980401.1 і KJ 601732.1, відповідно) є високогомологічними (Kovalyova et al., 2007, 2008; Kovaleva et al., 2009), і тому можна припустити, що гени дефензинів можна використати для генетичного маркування на підстаї поліморфізму довжини інтронів їх генів.

Метою дослідження є з'ясування інформативності маркерів на підстаї поліморфізму довжини інтронів генів дефензинів і перспективності їх використання для оцінки потенційної стійкості генотипів сосни звичайної до біошкودження.

Матеріали й методи дослідження. Для проведення генетичних і фітопатологічних досліджень у сосновому деревостані, який розташований у кварталі 67 Соснівського лісництва ДП "Жовківське лісове господарство", заклали тимчасову пробну площу (30×60 м²) згідно з СОУ 02.02-37-476:2006. Тип лісу – свіжий дубовий субір. Деревостан двоярусний, перший ярус утворений сосною звичайною I-II класу бонітету, у другому ярусі – дуб звичайний. Склад насадження 6С4Д. Підлісок відсутній. Ґрунт супіщаний. Санітарний стан дерев визначали згідно з "Санітарними правилами у лісах України", затвердженими наказом № 136 Міністерства аграрної політики та продовольства України від 21.03.2012 р. Зразки деревини (керни) відбирали віковим буровом Преслера.

Сумарну ДНК із рослинного матеріалу виділяли за допомогою броміду цетилтриамонію (Chang et al., 1993). Якість та кількість ізольованої ДНК визначали електрофорезом у 1 % агарозному гелі у трис-боратній буферній системі та спектрофотометрично ("Biotech Photometer UV1101/1101T"). Зразки ДНК зберігали за -70 °С до їхнього використання. Діагностику взірців деревини на присутність ДНК кореневої губки *Heterobasidion annosum* s.s. визначали за описаною раніше методикою (Yusurovuch et al., 2012). Для проведення генетичного маркування дерев сосни за локусами генів дефензинів здійснили підбір праймерів із використанням мережевого ресурсу Primer3-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), послідовності яких наведено в таблиці.

Таблиця. Праймери, які використані для ампліфікації інтронів генів дефензинів сосни звичайної

№	Ген	Послідовності праймерів (5'→3')
1	<i>PsDef1</i>	Fw: CAGTCGACTCAGCACTCT Rw: AGGGCAGGGTTTGTAAC
2	<i>PsDef2</i>	Fw: CCACTCAGTGCCSCTTTTC Rw: AGCACTTTCGGCTGGTGAT
3	<i>PsDef3</i>	Fw: AACCATTTGGGATGATGGC Rw: GCACTTTCGGCTGGTGAC
4	<i>PsDef4</i>	Fw: TGTGCTGCTCGTCTAG Rw: CGTTGGAACCCCTCAGTA

ПЛР здійснювали за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler TC020A (Labnet International Inc., США). Кожну ПЛР проводили у двох повторностях. Реакційна суміш містила 2,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ дНТФ (Fermentas); по 0,2 мкМ обох праймерів, 100 нг ДНК та 1 U TaqPol ДНК-полімерази (Fermentas). Умови ПЛР: початкова денатурація 95 °С, 5 хв та 40 циклів: денатурація 95 °С, 30 с; віджиг 54 °С, 30 с; елонгація 72 °С, 2хв і після останнього циклу ще 7 хв елонгації за температури 72 °С. Продукти ПЛР розділяли в 6 % поліакриламідному гелі у 1хТВЕ буфері, рН 8,3 і забарвлювали 0,1 % нітратом срібла (Benbouza et al., 2006). Цифрові

фотографії аналізували з використанням програми GelProAnalyzer. Довжину ампліфікованих фрагментів визначали за допомогою маркерів Gene Ruler 1Kb and 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

У випадку незбігання профілів амліконів у паралельних зразках, проводили додаткову ампліфікацію і під час аналізу використовували тільки загальні смуги для двох послідовних ПЛР. на підстаї виявлених амліконів створили бінарну матрицю для проведення статистичного аналізу за допомогою пакету комп'ютерних програм GenAlEx 6.053, Statistica 10. Значення коефіцієнтів подібності Нея та Лі використовували для кластерного аналізу і побудови філогенетичних дерев методом UPGMA. Результати кластеризації оцінювали на підстаї 1000 бутстрепів. Рівень поліморфізму маркерів оцінювали за середнім значенням PIC (Polymorphism Information Content), яке розраховували, як описали Hongtrakul et al. (1997).

Результати дослідження та їх обговорення. В останні два десятиліття стрімко розвивається новий напрям у селекції рослин на стійкість до фітопатогенних організмів – це селекція із застосуванням молекулярних маркерів, найбільш ефективними з яких є ті, що базуються на структурних особливостях генів, які визначають цінну ознаку. Одними з селекційно-перспективних генів стійкості сосни звичайної можуть бути гени дефензинів, продукти яких показали високу активність проти широкого кола фітопатогенів грибної і бактеріальної етіології (Kovaleva et al., 2009; Khairutdinov et al., 2017). Встановлено, що генетичний поліморфізм по локусам генів дефензинів у людини пов'язаний із індивідуальною стійкістю до захворювань (Vankeerberghen et al., 2005). Ми припустили, що подібна залежність може існувати і в сосни звичайної (рис. 1).

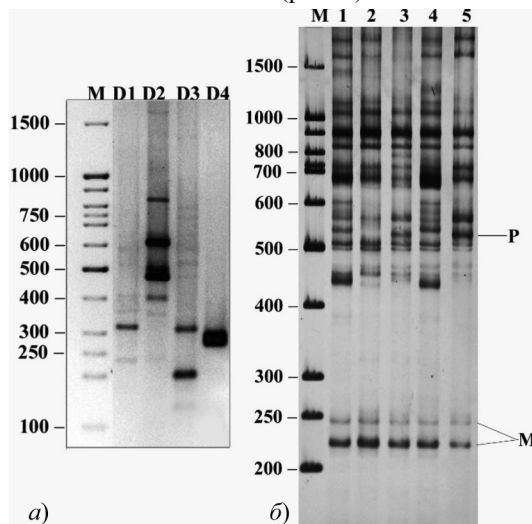


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації ДНК сосни звичайної зі специфічними до генів дефензинів праймерами: а) амлікони, отримані з використанням праймерів до генів *PsDef1-4* (доріжки D1-D4); б) спектри амліконів зі специфічними до *PsDef2* праймерами. Позначення: М – 100 bp+1 Kbp DNA markers (Thermo Fisher Scientific); 1–5 – різні екземпляри сосни звичайної; М, Р – мономорфні та поліморфний фрагменти, відповідно

Для дослідження поліморфізму генів дефензинів у сосни звичайної ми використали ПЛР маркери, які сконструйовані на підстаї нуклеотидних послідовностей екзонів генів *PsDef1-4* (див. таблиця). Аналіз продуктів ампліфікації кожної пари праймерів із геномною

ДНК сосни звичайної показав, що тільки одна пара праймерів, яка специфічна до дефензину 2 (IPL-*PsDef2*), утворює широкий спектр ампліфікованих продуктів, що свідчить про перспективність використання їх для дослідження поліморфізму генотипів сосни звичайної (рис. 1,а). Така поліморфність, очевидно, є результатом присутності в геномі сосни високогомологічних до дефензину 2 генів, про що свідчать результати аналізу бази даних UniGene транскриптів *Pinus taeda* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>), в якій виявлено ідентичні до *PsDef2* послідовності, які транскрибуються із різних локусів Pta.5572, Pta.5438, Pta.188 та Pta.432, і, ймовірно, мають інтрони різної довжини, подібно як у *Medicago truncatula* (Hanks et al., 2005).

Для того, щоб з'ясувати інформативність IPL-*PsDef2* маркерів для дослідження генетичного поліморфізму ми проаналізували 196 дерев сосни звичайної і виявили 38 фрагментів у діапазоні від 218 до 1780 пар нуклеотидів (п.н.), серед яких 15 були мономорфними (рис. 1,б). Середнє значення PIC становило 0,287, що є достатньо високим і свідчить про високу внутрішньовидову диференціальну здатність маркерів (Breviario et al., 2007).

Для виявлення можливого зв'язку IPL поліморфізму за генами дефензинів зі стійкістю сосни до фітозахворювань ми провели генетичні дослідження в сосновому насадженні з візуальними ознаками поширення кореневої губки. Зокрема на пробній площі спостерігали зону активного всихання дерев ("вікно"), на пеньках – плодове тіло, за морфологічними ознаками характерні для кореневої губки, значна кількість дерев III-VI категорії санітарного стану. Ми вибрали 30 модельних дерев різного санітарного стану для їхнього генотипування за допомогою IPL-методу та молекулярної діагностики *Heterobasidion annosum s.s.* (рис. 2).

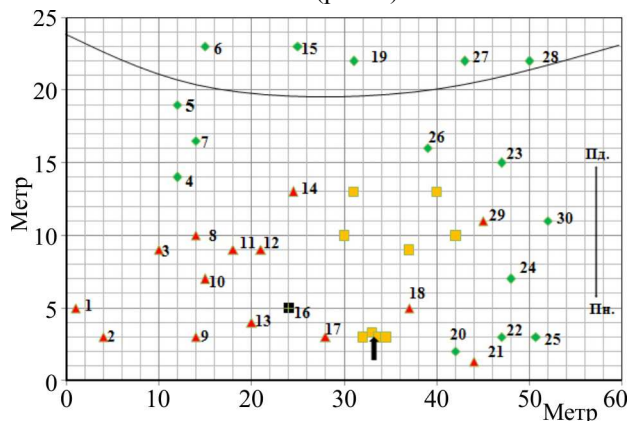


Рис. 2. Схема розміщення модельних дерев на ділянці поширення кореневої губки в сосновому деревостані: ■ – всохла сосна; ▲ – сосни, у деревині яких виявлено ДНК кореневої губки; ◆ – дерева, у яких не виявлено ДНК патогену; □ – пеньки; — — лінія схилу; стрілка вказує на місце виявлення плодового тіла *H. annosum s.s.*

Високоякісну ДНК використали у ПЛР зі специфічними до *Heterobasidion annosum s.s.* праймерами. Специфічний продукт ампліфікації довжиною 100 пар нуклеотидів визначили в пеньку, на якому знайшли плодове тіло кореневої губки, та в керні зі свіжого сухостою (дерево 16), що підтвердило причину його всихання (рис. 3). ДНК кореневої губки виявили також у деревах 11, 12, 13, 14, 17, 18 і 29, які знаходяться у зоні активного всихання (див. рис. 2). За результатами молекулярної діагностики дерева 1, 2, 3, 8, 9 і 10 також уражені цим

патогеном, що свідчить про його поширення вогнища у східному напрямку.

ДНК кореневої губки не виявлено в кореневій шийці дерев 6, 15, 19, 27, 28, які ростуть на вершині пагорба. Можна припустити, що стійкими до кореневої губки є здорові дерева 4, 20, 22, 23, 24, 25 і 26, які ростуть у таких же лісорослинних умовах, що й уражені дерева.

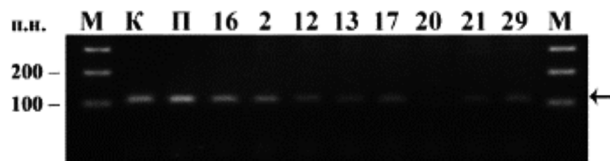


Рис. 3. Молекулярна діагностика ДНК кореневої губки в деревині сосен із використанням видоспецифічних праймерів: М – маркери 100 bp DNA LadderPlus (Thermo Fisher Scientific); К – позитивний контроль (архівна ДНК кореневої губки), П – ДНК із плодового тіла *H. annosum*, знайденого на досліджуваній ділянці. Нумерація доріжок відповідає номерам дерев на рис. 2. Стрілкою зазначено специфічний для *H. annosum s.s.* амплікон

Серед селекційних методів оцінки стійких до ураження кореневою губкою дерев найчастіше використовують екземпляри, які вижили в осередках поширення патогена. Такі дерева вважають імунними, а насінневий матеріал з них використовують для створення стійких до ураження кореневою губкою культур сосни звичайної. Для створення ефективних лісонасінневих плантацій та штучних хвойних деревостанів доцільно визначити генетичні маркери, за якими стійкі до кореневої губки рослини відрізняються від сприйнятливих. За даними Коршикова та Демковича, такими маркерами можуть бути окремі, характерні для стійких дерев, ізoferментні локуси (Korshikov & Demkovich, 2008). Для молекулярного маркування модельних дерев сосни ми використали IPL-метод на підставі генів дефензинів, протеїнові продукти яких безпосередньо залучені до пригнічення росту міцелію фітопатогенних грибів. Продукти ампліфікації ДНК сосни із праймерами, які фланкують інтрон гена *PsDef2*, фракціонували у 6 % поліакриламідному гелі за неденатуруючих умов (рис. 4,а).

Дані електрофоретичного аналізу ампліконів кожного дерева були переведені в бінарну систему (1 – наявність ампліфікованого фрагменту, 0 – його відсутність) і використані для визначення коефіцієнтів подібності Нея і Лі для побудови матриці подібностей між генотипами. Отриману матрицю було використано під час кластерного аналізу методом UPGMA та побудові дендрограми (рис. 4,б).

Із дендрограми видно, що проаналізовані дерева диференціюються на два кластери із 100 % бутстреп підтримкою. До I кластеру увійшли переважно дерева I категорії санітарного стану. Дерева 20, 23, 24, 25, 26 перебувають на межі осередку ураження кореневою губкою і, ймовірно, вони локалізували поширення інфекції у західному напрямку. І хоча в кореневій шийці дерева 21 виявлено ДНК *H. annosum*, санітарний стан дерева свідчить про високу опірність його захисної системи до інвазії. Окрему гілку в цьому кластері утворюють дерева 6, 8, 14 і 15 із бутстреп підтримкою 63 %. Дерева 8 і 14, які ростуть у зоні очевидного поширення кореневої губки, є менш стійкими до цього патогену, ніж інші представники цього кластеру, про що свідчить їхній санітарний стан (II категорія) та присутність ДНК *H. annosum* у деревині. Ймовірно, що дерева 6 і 15, які рос-

туть на вершині пагорба поза осередком інфекції, можуть бути сприйнятливими до кореневої губки. Виходячи із отриманих результатів, можна припустити, що стійкість до цього кореневого патогена контролюється групою генів, і дефензини є тільки одними з них.

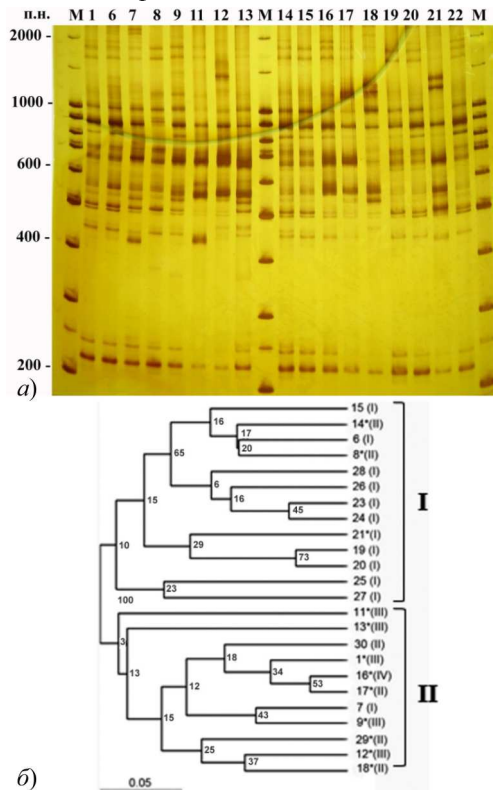


Рис. 4. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів дефензинів у сосни звичайної: а) електрофореграма продуктів ампліфікації геномної ДНК сосни звичайної зі специфічними до PsDef2 праймерами. Позначення: М – маркери 100 bp + 1kb DNA LadderPlus (Thermo Fisher Scientific). Зверху зазначено номери дерев; б) дендрограма, яку побудовано методом UPGMA на підставі значень коефіцієнтів подібності Нея та Лі. У дужках вказано категорію санітарного стану дерева. Зірочкою позначено інфіковані кореневою губкою

Кластер II утворюють дерева II-IV категорій санітарного стану, в деревині яких діагностовано кореневу губку. Не виявлено ДНК патогена в дереві 30, але його санітарний стан свідчить, що це дерево піддається впливу стресових чинників. До цього кластеру увійшло також здорове дерево 7 (I категорії санітарного стану), яке росте поза зоною очевидного поширення кореневої губки. На дендрограмі воно утворює гілку із сильно ослабленим деревом 9, що вказує на потенційну сприйнятливість цього генотипу до *H. annosum*.

Аналіз ієрархічних кластерів методом К-середніх визначив значущість кожного з ампліконів для диференціації генотипів сосни на дві групи. Найбільш значущу різницю між кластерами ($p < 0,05$) показали фрагменти довжиною 705, 670, 660, 605, 565, 555, 545, 465 та 455 п.н. Так, амплікони довжиною 705, 695, 660, 605 та 455 п.н. присутні в електрофоретичному спектрі тільки тих дерев, які належать кластеру I. Натомість продукти довжиною 755, 735, 670, 545, 465 є характерними для представників кластеру II. Отже, зазначені вище амплікони можуть бути генетичними маркерами для оцінки потенційної стійкості сосни звичайної до кореневої губки.

Висновок. Кластерний аналіз даних генотипування дерев із використанням методу поліморфізму довжини

інтронів генів дефензинів показав, що стійкі та сприйнятливі до патогенів генотипи сосни звичайної об'єднуються в окремі групи, що свідчить про адекватність такого підходу для оцінки потенційної стійкості дерев до біотичного стресу. Генетичне маркування за локусами генів дефензинів селекційного матеріалу сосни звичайної можна використати для розробки екологічно чистих технологій підвищення стійкості покращеного генетичного матеріалу сосни звичайної до біотичного стресу.

Перелік використаних джерел

- Andreieva, O. Y., Guzii, A. I., & Vyshnevskiy, A. V. (2018). Poshyrennia oseredkiv masovoho rozmnozhenia koroidiv u sosnovykh nasadzhenniakh Rivnenskoho Polissia [Spread of bark beetles foci in pine stands of Rivne Polissya]. *Scientific Bulletin of UNFU*, 28(3), 14–17. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.15421/40280302>
- Benbouza, H., Jean-Marie, J., & Jean-Pierre, B. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silverstaining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 10(2), 77–81.
- Bigler, C., Bräker, O. U., Bugmann, H., Dobbertin, M., & Rigling, A. (2006). Drought as an inciting mortality factor in Scots pine stands of the Valais, Switzerland. *Ecosystems*, 9, 330–343. <https://doi.org/10.1007/s10021-005-0126-2>
- Breviario, D., Baird, W. V., Sangoi, S., Hilu, K., Blumetti, P., & Giannini S. (2007). High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined b-tubulin introns. *Molecular Breeding*, 20(3), 249–259. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9087-9>
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113–116. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- Chen, X., Zhang, G., & Wu, W. (2011). Investigation and utilization of intron length polymorphisms in conifers. *New Forests*, 41, 378–388. <https://doi.org/10.1007/s11056-010-9229-9>
- Choi, H.-K., Kim, D., Uhm, T., Limpens, E., Lim, H., Mun, J.-H., & Cook, D. R. (2004). A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics*, 166(3), 1463–1502. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.3.1463>
- Dzialuk, A., Chybicki, I., Gout, R., Maczka, T., Fleischer, P., Konrad, H., Curtu, A. C., Sofletea, N., & Valadon, A. (2014). No reduction in genetic diversity of Swiss stone pine (*Pinus cembra* L.) in Tatra Mountains despite high fragmentation and small population size. *Conservation Genetics*, 15(6), 1433–1445. <https://doi.org/10.1007/s10599-014-0105-9>
- Eveno, E., Collada C., Guevara, M. A., Leger, V., Soto, A., Diaz L., Leger, P., Santiago, C., Gonzalez-Martinez, S. C., Cervera, M. T., Plomion, C., & Garnier-Gere, P. H. (2007). Contrasting patterns of selection at *Pinus pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 25(2), 417–437. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm272>
- Hanks, J. N., Snyder, A. K., Graham, M. A., Shah, R. K., Blaylock, L. A., Harrison, M. J., & Shah, D. M. (2017). Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. *Plant Molecular Biology*, 58(3), 385–399. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5567-7>
- Hongtrakul, V., Huestis, G., & Knapp, S. (1997). Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(3), 400–407. <https://doi.org/10.1007/s001220050576>
- Khairutdinov, B. I., Ermakova, E., Yusypovych, Y. M., Bessolicina, E. K., Tarasova, N. B., Toporkova, Y. Y., Kovaleva, V., Zuev, Y. F., & Nesmelova, I. V. (2017). NMR structure, conformational dynamics, and biological activity of PsDef1 defensin from *Pinus sylvestris*. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1865(8), 1085–1094. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.012>

- Korshikov, I. I., & Demkovich, A. E. (2008). Genetic features of root fungus-resistant scotch pine trees in artificial stands in the steppe zone of Ukraine. *Cytology and Genetics*, 42(5), 323–328. <https://doi.org/10.3103/S0095452708050058>
- Kovaleva, V. A., Kiyamova, R. G., Cramer, R., Krynytskyi, H. T., Gout, I. T., Filonenko, V. V., & Gout, R. (2009). Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings. *Peptides*, 30(12), 2136–2143. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.08.007>
- Kovalyova, V. A., & Gout, I. T. (2008). Molecular cloning and characterization of Scotch pine defensin 2. *Cytology and Genetics*, 42(6), 408–412. <https://doi.org/10.3103/S0095452708060042>
- Kovalyova, V. A., Gout, I. T., Kiyamova, R. G., Filonenko, V. V., & Gout, R. T. (2007). Cloning and analysis of defensin 1 cDNA from Scots pine. *Biopolymers and Cell*, 23(5), 398–404. <https://doi.org/10.7124/bc.000779>
- Lučić, A., Isajev, V., Rakonjac, L., Ristić, D., Kostadinović, M., Babić, V., & Nikolić, A. (2011). Genetic divergence of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Serbia revealed by RAPD. *Archives of Biological Sciences*, 63(2), 371–380. <https://doi.org/10.2298/ABS1102371L>
- Siitonen, J. (2014). *Ips acuminatus* kills pines in southern Finland. *Silva Fennica*, 48(4), article id 1145. <https://doi.org/10.14214/sf.1145>
- Vankeerberghen, A., Scudiero, O., De Boeck, K., Macek, M. Jr., Pignatti, P. F., Van Hul, N., Nuytten, H., Salvatore, F., Castaldo, G., Zemkova, D., Vavrova, V., Cassiman, J. J., & Cuppens, H. (2005). Distribution of human beta-defensin polymorphisms in various control and cystic fibrosis populations. *Genomics*, 85(5), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.02.003>
- Williams, C. G., & Neale, D. B. (1992). Conifer wood quality and marker-aided selection: a case study. *Canadian Journal of Forest Research*, 22(7), 1009–1017. <https://doi.org/10.1139/x92-135>
- Yusypovych, Y. M., Kovaleva, V. A., & Gout, R. (2012). Diahnostyka korenevoi hubky (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. S. STR.) metodom polimerazno-lantsiuhovoi reaktsii [Identification of *Heterobasidion annosum* s. str. by polymerase-chain reaction]. *Scientific Bulletin of UNFU*, 22(6), 43–49. [In Ukrainian].

В. А. Ковалёва, Ю. М. Юсипович, Ю. И. Шаловьло, Н. И. Грунык, Р. Т. Гут

Національний лесотехнічний університет України, г. Львів, Україна

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГЕНОТИПОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ ИНТРОНОВ ГЕНОВ ДЕФЕНЗИНОВ

Представлены результаты исследования генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) с использованием молекулярных маркеров на основе генетического полиморфизма длины интронов генов дефензинов *PsDef1-4*. Выявлена высокая информативность маркеров на основе интрона гена *PsDef2* (IPL-*PsDef2*) для исследования внутривидового полиморфизма у сосны обыкновенной. Установлены границы очага инфекции корневой губки (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) в сосновом насаждении с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием видоспецифических праймеров. Выполнено ДНК-профилирование модельных деревьев путем электрофоретического разделения ампликонов IPL-*PsDef2* маркеров. По результатам полиморфизма длины интронов генов дефензинов осуществлена кластеризация генотипов сосны обыкновенной с использованием алгоритма UPGMA. На основе дендрограммы выделено два кластера генотипов со 100 % бутстреп поддержкой, которые отличались по устойчивости к корневой губке. Методом К-средних определена значимость каждого из ампликонов для дифференциации генотипов сосны на группы. Выявлены ампликоны, которые могут служить генетическими маркерами для оценки потенциальной устойчивости генотипов сосны обыкновенной к корневой губке. Полученные данные в части выявленного полиморфизма локусов генов дефензинов, а также результаты кластерного анализа указывают на перспективность использования IPL-*PsDef2* маркеров для генотипирования сосны обыкновенной.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; генетический полиморфизм; корневая губка; кластерный анализ.

V. A. Kovaleva, Yu. M. Yusypovych, Yu. I. Shalovylo, N. I. Hrunyk, R. T. Gout

Ukrainian National Forestry University, Lviv, Ukraine

DIFFERENTIATION OF SCOTS PINE GENOTYPES BY INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF DEFENSIN GENES

The search for highly informative DNA markers to support the breeding programs aimed at increasing the productivity and biological stability of forest stands is an urgent task, especially in the context of global climate change. In this paper, we first investigate a new type of genetic markers based on the intron length polymorphism (ILP) of defensin genes to determine their informativeness and promising use for the estimation of the potential resistance of pine genotypes to biological damage. In the course of our study we applied the following methods: total DNA isolation by STAB method, PCR amplification with specific primers to pine defensin genes and *Heterobasidion annosum* s. s., electrophoretic separation of PCR fragments on a polyacrylamide gel under non-denaturing conditions, and also data analysis using software GenAlEx 6.053 and Statistica 10. Having conducted the research, we can present the following results. To investigate the defensin genes polymorphism in pine trees, we used ILP markers. These markers were developed based on the nucleotide sequences of the exons of *PsDef1-4* genes. Analysis of PCR fragments obtained after amplification of each pair of primers with genomic DNA of pine showed that only one pair of primers, which is specific to defensin 2 (IPL-*PsDef2*), forms a wide range of amplified products, indicating their promising use for genetic characterization of genotypes of Scots pine. To clarify the use of IPL-*PsDef2* markers for the study of genetic polymorphism we analyzed 196 trees and revealed that the average PIC was 0.287. IPL-*PsDef2* markers were used to analyze the different genotypes of Scots pine on the areas affected by root rot disease. Based on the results of cluster analysis, the samples were divided into two groups, which differ in resistance to the root sponge. In addition, we identified PCR fragments that are specific to each of these groups and can serve as markers for the evaluation of the resistance of pine genotypes to *Heterobasidion annosum*. Thus, our conclusion is as follows: genotyping of defensin genes loci of pine breeding material is promising for the development of environmentally friendly technologies in order to enhance the sustainability of improved genetic material of pine trees to biotic stress.

Keywords: *Pinus sylvestris* L.; genetic polymorphism; root sponge; cluster analysis.