

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ
ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ЛИСТЬЕВ ФУНДУКА
И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ SSR-МАРКЕРОВ
ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗНООБРАЗИЯ *CORYLUS AVELLANA* L.**

Шхалахова Р.М., Конинская Н.Г., Тутберидзе Ц.В.

Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр Российской академии наук»,
г. Сочи, Россия, e-mail: shhalahova1995@mail.ru

Шхалахова Р.М. orcid.org/0000-0001-5262-7866

Конинская Н.Г. orcid.org/0000-0002-2126-5863

Тутберидзе Ц.В. orcid.org/0000-0002-1486-0787

Коллекции фундука (*Corylus avellana* L.) из приграничных субтропических районов выращивания могут быть важным источником толерантной зародышевой плазмы для выведения высокоустойчивых генотипов, адаптированных к изменяющимся условиям среды. Однако для эффективного использования этих зародышевых плазм требуется информация об их генетическом фоне. Поэтому, для характеристики и идентификации ценных образцов необходимы эффективные маркерные системы и качественный ДНК-материал. В данном исследовании проводилась оптимизация методики выделения ДНК из листьев фундука и оценивалась эффективность микросателлитных маркеров SSR для последующего генотипирования. Для выделения ДНК использовали классический СТАВ-метод и его модификации, а также два коммерческих набора. По результатам анализа, вариант с добавлением в состав СТАВ-буфера 2%-ного PVP (m. w. 40 000) показал лучший выход ДНК для ПЦР-анализа. В результате оценки эффективности, четыре из 26 SSR-маркеров, а именно A604 (Na = 2,65, He = 0,62, Ho = 0,57), A611 (Na = 2,80, He = 0,64, Ho = 0,86), B606 (Na = 2,80, He = 0,64, Ho = 0,57) показали хорошую применимость для оценки генетического разнообразия *C. avellana*. Также авторами отмечена необходимость продолжить поиск и разработку более эффективных SSR-маркеров для оценки генетического разнообразия и филогенетических исследований фундука. Полученные результаты важны для сохранения и грамотного управления генетическими ресурсами фундука на территории Западного Кавказа и могут быть использованы для оптимизации будущих исследований путём определения минимального количества образцов, на которых следует сосредоточиться при повышении эффективности разведения.

Ключевые слова: *Corylus avellana* L., SSR, выделение ДНК, микросателлитный анализ, эффективность ДНК-маркеров.

Введение. Фундук или лещина обыкновенная (*Corylus avellana* L.) является одной из важнейших орехоплодных культур с точки зрения мирового производства (в среднем более 900 тыс. т в год в 2015–2019 гг.). На страны Чёрного моря приходится большая часть годового мирового производства (в среднем за 2015–2019 гг.): Турция (более 600 тыс. т), Азербайджан (более 40 тыс. т) и Грузия (более 25 тыс. т) [9]. Как правило, коллекции *C. avellana* состоят в основном из культивируемых форм и расположены в странах, где происходит производство. Базовая коллекция *C. avellana* ФИЦ СНИЦ РАН включает морозостойкие сорта отечественной ('Зоринский', 'Сахарный', 'Московский рубин', 'Первенец' и др.) и зарубежной селекции и является ценным источником зародышевой плазмы фундука на Западном Кавказе. В большинстве случаев оценка коллекций, идентификация генотипов, сортов, линий и гибридов основывается на морфологических признаках [27, 30], однако число этих признаков ограничено, непостоянно, может зависеть от факторов среды и не всегда позволяет различить близкородственные образцы или сорта. Современные методы на основе молекулярных ДНК-маркеров являются наиболее эффективным инструментом для грамотного пользования геноресурсами, совершенствования сортимента и изучения генетического разнообразия, а также пополнения коллекции донорами новых признаков и дистантными генотипами [15, 31].

Некоторые ДНК-маркеры (AFLP, RAPD, ISSR, SSR) были ранее оценены для характеристики генетического разнообразия в коллекциях зародышевой плазмы *Corylus* по всему миру [13, 14, 19, 23]. Среди различных типов маркеров кодоминантные ядерные микросателлитные SSR (simple sequence repeats) имеют желаемые преимущества для оценки генетических особенностей видов на индивидуальном и популяционном уровнях, таких как специфичность локуса, высокая воспроизводимость, техническая простота и полиморфизм [18, 32]. Эти параметры определяют приоритетный выбор SSR-маркеров при идентификации сортов фундука и филогенетическом анализе [16, 22], генетическом картировании [7], оценке разнообразия [15, 16, 34].

Однако одним из решающих процессов и отправной точкой в любом исследовании молекулярной биологии является экстракция нуклеиновых кислот. Выделенная из *C. avellana* ДНК может использоваться для широкого спектра последующих генетических задач селекционной направленности: секвенирование ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), Саузерн-блоттинг, поиск полиморфизма длин фрагментов и одиночных нуклеотидов, подготовка геномных библиотек [10]. Наиболее часто ДНК растительных объектов выделяют из листьев. Однако листья фундука содержат фенольные соединения, дубильные вещества и другие вторичные метаболиты [3, 33], что затрудняет процесс выделения чистой и качественной ДНК, подходящей для следующих этапов исследований.

Для того, чтобы получить качественную ДНК, необходим быстрый и простой в использовании протокол, который можно адаптировать для выделения и очистки ДНК из листьев *C. avellana*. Некоторые протоколы были успешно применены ранее на других видах растений [11, 29]. Классическим методом экстракции ДНК для растений является протокол СТАВ [12]. Также существуют различные коммерческие наборы, отличающиеся меньшими по времени выполнения затратами, но зачастую не позволяющие добиваться эффективных результатов. В связи с этим, **целью данного исследования** было оптимизировать методику выделения ДНК из листьев *C. avellana* и оценить эффективность SSR-маркеров для анализа генетического разнообразия коллекции зародышевой плазмы фундука.

Материал и методы исследования. *Растительный материал.* Материалом исследования служили образцы зрелых листьев семи сортов фундука ('Шедевр', 'Кубань', 'Ламберта краснолиственный', 'Барселонский', 'Варшавский', 'Бомба', 'Кировоградский') из коллекции ФИЦ СЦ РАН.

Экстракция ДНК. Для выделения ДНК использовали классический СТАВ-метод, СТАВ-метод с модификациями (с добавлением PVP (polyvinylpyrrolidone) и два коммерческих набора (набор «Лири» (Биолабмикс, Новосибирск) и набор ИнтерЛабСервис).

Классический СТАВ-метод [12]. Состав СТАВ-буфера: 2 % СТАВ, 1,4 М NaCl, 0,2%-ный 2-меркаптоэтанол, 20 mM EDTA, 0,1 М Tris-HCl, pH 8.0.

1. Навеску листа 75–100 мг растирали пестиком в ступке в присутствии жидкого азота до состояния мелкого порошка. Гомогенат насыпали в 2 мл пробирку с подогретым до 65 °С СТАВ-буфером и перемешивали на вортексе.

2. Образцы инкубировали 30 мин при 65 °С, периодически перемешивая на вортексе.

3. Добавляли в пробирки равный объем хлороформа, тщательно перемешивали 10 мин и центрифугировали 10 мин при 4 °С 13 000 rpm.

4. Отбирали верхнюю водную фазу в чистую 1,5 мл пробирку и второй раз осаждали равным объемом хлороформа в центрифуге при тех же условиях.

5. Верхнюю фазу отбирали в новую 1,5 мл пробирку, добавляли 2/3 холодного изопропанола, перемешивали и инкубировали образцы при –20 °С 30 мин. Инкубированные образцы центрифугировали 20 мин при 4 °С и 13 000 rpm.

6. Изопропанол отбирали, а образовавшийся осадок дважды промывали холодным 75%-ным этанолом (500 мкл), центрифугируя 5 мин при 4 °С 13 000 rpm.

7. Отбирали осадок этанола пипеткой, сушили при 37 °С и растворяли в 50 мкл стерильной воды.

СТАВ-метод с модификациями. В данной методике мы добавляли в состав СТАВ-буфера РVP (m. w. 40 000) в двух вариантах концентрации 0,5%-ной и 2%-ной. Выделение ДНК проводили по ранее описанной методике.

Выделение с использованием набора «Лира» (Биолабмикс, Новосибирск). Образцы весом 100 мг гомогенизировали в 1 мл реагента «Лира» и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Добавляли 1/5 объёма хлороформа от исходного, встряхивали в течение 15 с и инкубировали 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировали образцы 10 мин при 4 °С 10 000 g. Верхнюю водную фазу аккуратно удаляли и пипетировали нижнюю фазу и интерфазу. Добавляли 300 мкл 96%-го этанола, перемешивали и инкубировали 5 мин. После инкубирования образцы центрифугировали 5 мин при 4 °С 2000 g. Этанол отбирали пипеткой и к получившемуся осадку добавляли 1 мл 0,1-ного М цитрата натрия в 10%-ном этаноле. Осадок пипетировали и инкубировали 30 мин, периодически перемешивая. После инкубации центрифугировали 5 мин при 4 °С 2000 g. К осадку добавляли 1,5 мл 75%-ного этанола, перемешивали и инкубировали 20 мин, периодически перемешивая. Центрифугировали образцы 5 мин при 4 °С 2000 g. Этанол отбирали пипеткой и сушили осадок 5–10 мин. Образцы растворяли в 50 мкл гидроксида натрия.

Выделение с использованием набора ИнтерЛабМикс. Образцы гомогенизировали в жидком азоте и добавляли в пробирки с 400 мкл буфера из набора, перемешивали на вортексе и инкубировали 10 мин. Добавляли 400 мкл буфера для нанесения на колонки, перемешивали. Магнитные частицы перемешивали на вортексе до однородности и добавляли по 50 мкл к образцам, перемешивали и инкубировали 5 мин. Пробирки с образцами помещали в магнитный штатив и инкубировали 5 мин. Отбирали супернатант из пробирок и добавляли 500 мкл буфера для промывки, пипетировали до однородности. Инкубировали пробирки в магнитном штативе 5 мин. Отбирали супернатант и повторяли промывку буфером. Сушили пробирки с магнитными частицами при 60 °С 10 мин. Добавляли в пробирки 100 мкл буфера для элюции, пипетировали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Помещали пробирки в магнитный штатив и инкубировали 10 мин. Переносили супернатант, содержащий ДНК, в чистые пробирки.

Качество полученной ДНК во всех вариантах выделения проверяли в 1%-ном агарозном геле и спектрофотометрическим методом на BioDrop μ Lite (Biodrop, Cambridge, UK).

ПЦР-анализ и визуализация. В работе использовались ранее разработанные для *S. avellana* 26 пар ядерных SSR-праймеров [6] (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика SSR-праймеров
Table 1. Characterization of SSR primers

Праймер	Сиквенс праймера (5' - 3')	Температура отжига, °C	Источник
A601	F: CGCCTTGATAGTATGTTCAAAC R: CGGCAGAATGTAGAAGTCCCC	55	[6]
A602	F: CCAATCGCCAATGAATCATC R: CCCTTCCAAACTGGGCAT	55	[6]
A604	F: GTAGCTGCACTTGATGTGCTTTAC R: AACACCATATTGAGTCTTTCAAAGC	55	[6]
A605	F: GAAATTCAATCACACCAATAAAGCA R: CCTCCCTGTCTCATCACTG	55	[6]
A606	F: CTCATGACTGCCATTTCTCG R: AGGCATGCAGGCTTCACAC	55	[6]
A611	F: CTCААТТCACTCGAACGGATAC R: AGCCGATACCAGCCTCTCGC	55	[6]
A613	F: CGCCATCTCCATTTCCCAAC R: CGCAATCGTTTTCTGCTTCAG	55	[6]
A616	F: AGAGAACGACTTTGTATGACAAAGA R: TTGAACCATTAATAACATCATGTGA	55	[6]
A635	F: СТААГСТСАССААГААГГААГТТГАТ R: GCTTCTGGGTCTCCTGCTCA	55	[6]
A640	F: GGGTCAAGATTTGATAAAGTGGGA R: GCACTCCACTTGTCCCTTTTC	55	[6]
B602	F: GTCTGGCATGGTTTTGAGAAGA R: CTTTCCCCCCCCAAACCAC	55	[6]
B603	F: CCCCACACTTCCCAATTTAC R: CACACGTTGGAGAATGGTGGT	55	[6]
B606	F: GTCCCCTTTTTAGTTTTTACCC R: GAAGTTCCAGTACCCTCATCAC	55	[6]
B612	F: AGCTCTTCGTTCGTCCGTGAC R: CACAATCCCACACCTACCATC	55	[6]
B613	F: GCATCCAAGGTGGTCCCT R: TTTCCACCCAACAACCTCTAGA	55	[6]
B625	F: TGCCTCCCCAACCATCAC R: AGCGTCCAGAGAACAATCCC	55	[6]

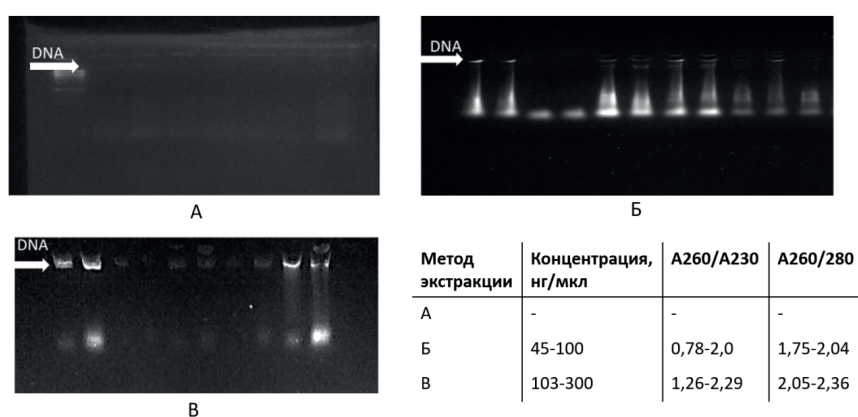
B628	F: CGTCTCCTTCCCTAACATAACCAA R: GTCCCCCTCCACTTCTACTA	55	[6]
B631	F: TTCCCCTTTGATCACCACCA R: GACCACCTCCCATTCTCCTA	55	[6]
B635	F: CCAAATCAAAAACAACCAAACC R: CCGCAGCCATCACATCTA	55	[6]
B640	F: ATGGACGAGGAATATTTTCAGC R: CCTGTTTCTCTTTGTTTTCGAG	55	[6]
B660	F: CCCAGTTGATGATTAACCTTTCA R: AGGCATGTGCCACTTAGG	55	[6]
B753	F: GAAGGAGAAACAAGGGTAGTCA R: AGAAGCGTCGTTCCATAGC	55	[6]
B652	F: CCCAGTTGATGATTAACCTTTCA R: AGGCATGTGCCACTTAGG	55	[6]
B788	F: CCGCTAAGCTGGTAGGTAAGT R: CGGTGCATCAAGTTGTAAGT	55	[6]
B789	F: ATTAGGCAACTGTCTCGTCAAC R: GGAATTTACAGTTGGAGCTGAT	55	[6]
B662	F: AGCAACAGAGGTTAGGTGTG R: GCCCATTAGCCTTCTTA	55	[6]

Реакционная смесь для SSR-анализа содержала 10 мкл 2-х реакционно-буфера HS-TaqPCR (Биолабмикс, Россия), по 0,2 мкл каждого праймера (10 мкМ), 1 мкл ДНК (20 нг/мкл) и очищенная DEPC вода. Амплификацию проводили в термоциклере MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) по двухступенчатой программе: первичная денатурация 5 мин при 95 °С, отжиг праймеров 40 циклов по 15 с при 55 °С и финальная элонгация при 72 °С в течение 7 мин. Разделение SSR-фрагментов проводили на 2%-ном агарозном геле в течение 2,5 ч при 90 В в 1×TAE-буфере.

Статистический анализ. Параметры генетического разнообразия были рассчитаны для каждого SSR-маркера с использованием программного обеспечения GeneAlex ver. 6.5 [24, 25] и онлайн-ресурса [4]. Функцию анализа «Matches» в GeneAlex ver. 6.5 использовали для идентификации генотипов с идентичными аллельными паттернами в наборе данных. Оценивались следующие параметры: N_a – общее количество различных аллелей, N_e – количество эффективных аллелей, H_e – ожидаемая гетерозиготность и H_o – наблюдаемая гетерозиготность.

Результаты и их обсуждение. Извлечение ДНК из растительных тканей является важным шагом в молекулярных исследованиях. Различные растения, в особенности древесные, часто содержат сложные химические соединения, которые затрудняют выделение чистой ДНК

[26]. Поэтому для нашей целевой культуры *C. avellana* было важно оптимизировать данную методику. В результате экстракции ДНК с использованием набора «Лири» (Биолабмикс, Новосибирск), а также с использованием протокола на основе магнитных частиц (набор Интер-ЛабСервис) показатели концентрации и чистоты ДНК фундука были низкими и не соответствовали необходимым требованиям качества. Классический СТАВ-метод является приоритетным для экстракции ДНК из растительных тканей [1, 9, 13, 20]. Однако СТАВ-методом нам также не удалось получить ДНК, пригодную для ПЦР-реакции из-за высокого содержания в листьях полифенолов (рис. 1А).



А-экстракция ДНК СТАВ-методом; Б-экстракция ДНК СТАВ-методом и 0,5% PVP; В-экстракция ДНК СТАВ-методом и 2% PVP

Рис. 1. Качество выделенной ДНК
Fig. 1. Quality of the isolated DNA

Известно, что во многих исследованиях используются различные модификации данного метода, например, с высокой концентрацией реагента СТАВ и увеличенным временем инкубации в лизирующем буфере [2], с увеличенной концентрацией 2-меркаптэтанола [21] и хлорида натрия [28] для лучшего очищения от примесей. Для древесных культур часто в состав лизирующего буфера добавляют PVP в качестве абсорбента фенольных соединений [5]. В нашем исследовании добавление 2% PVP с высокой молекулярной массой также оказалось эффективным и позволило увеличить концентрацию ДНК на выходе и получить качество, достаточное для проведения ПЦР (рис. 1Б-В). Соотношение A260/280 было выше 2,0, а A260/230 – в диапазоне от 1,2 до 2,2, что свидетельствует об эффективном удалении примесей белков, фенолов, полисахаридов и соответствует другому исследованию, где соотношения A260/280 и A260/230 были выше 1,79 и от 1,2 до 1,56, соответственно [5].

В результате последующей апробации 23 из 26 SSR-маркеров показали явный полиморфизм в выборке *C. avellana*. Среднее число различных аллелей (N_a) составило 2,92 на локус от $N_a = 2$ для B613, B628 и B635 до $N_a = 5$ для B660. Среднее эффективное число аллелей (N_e) составило 4,6 с максимальным значением 3,77 для A606 и B662 и минимальным значением 1,32 для B635 (табл. 2).

Микросателлиты, отобранные для нашего исследования, были разработаны ранее для *C. avellana* [6] и использовались несколькими исследователями для изучения генетического разнообразия [9, 13, 16]. Хотя для некоторых из SSR сообщалось о многополосном характере [8, 34], мы не наблюдали более пяти полос в каждом отдельном образце. Однако количество обнаруженных аллелей для SSR, которые наблюдались в разных исследованиях, различались в зависимости от размера исследуемого набора данных. Например, в исследовании, где набор данных включал 11 образцов *C. avellana* среднее значение N_a для SSR-маркеров составляло 2,1 [13], однако в другой работе на основе 348 образцов *Corylus L.* среднее значение N_a было 15,3 [34]. Кроме того, в других исследованиях SSR сообщалось, что причиной большего количества аллелей может быть дупликация некоторых локусов [13, 17]. Уровни средней ожидаемой гетерозиготности (H_o) и средней наблюдаемой гетерозиготности составили 0,54 и 0,26, соответственно, что было ниже, чем в других исследованиях фундука. Например, при изучении 30 образцов фундука из различных районов Италии с 9 локусами SSR средние значения H_e и H_o составили 0,67 и 0,82, соответственно [15]. Также в аналогичном исследовании, при изучении генетического разнообразия 20 образцов *C. avellana* уровни H_e и H_o составили 0,68 и 0,70, соответственно [17]. Более низкие значения, полученные в нашем исследовании, могут быть связаны с использованием небольшого количества образцов. Другой причиной может быть использование электрофореза в агарозном геле для визуализации микросателлитов. В этом случае, использование автоматизированной системы обнаружения и полиакриламидного геля, позволило бы идентифицировать аллельные вариации в более точном масштабе [13]. Наши результаты показали низкую эффективность большей части SSR-маркеров, поэтому необходимо продолжить разрабатывать более эффективные SSR-маркеры для *C. avellana* и других видов *Corylus L.* которые можно было бы использовать для генотипирования и эволюционных исследований в искусственных или естественных популяциях. Тем не менее, отдельные SSR-маркеры показали более высокие уровни H_e и H_o , такие как A604 ($H_e = 0,62$, $H_o = 0,57$), A611 ($H_e = 0,64$, $H_o = 0,86$), B606 ($H_e = 0,64$, $H_o = 0,57$) и могут быть использованы для дальнейших исследований фундука.

Таблица 2. Параметры генетического разнообразия SSR-маркеров
 Table 2. Parameters of SSR markers genetic diversity

Locus	N	Na	Ne	He	Ho
A601	7	4	3,16	0,68	0,43
A602	7	3	2,09	0,52	0,29
A604	7	3	2,65	0,62	0,57
A605	7	3	2,80	0,64	0,43
A606	7	4	3,77	0,73	0,29
A611	7	3	2,80	0,64	0,86
A613	7	4	3,38	0,70	0,14
A616	7	3	2,65	0,62	0,14
A635	7	3	2,65	0,62	0,43
A640	7	3	2,80	0,64	0,14
B602	7	3	2,58	0,61	0,29
B603	7	3	2,65	0,62	0,43
B606	7	3	2,80	0,64	0,57
B612	7	3	2,80	0,64	0,43
B613	7	2	1,69	0,40	0,00
B625	7	3	2,51	0,60	0,43
B628	7	2	1,69	0,41	0,00
B635	7	2	1,32	0,24	0,00
B640	6	3	2,88	0,65	0,50
B660	7	5	2,65	0,62	0,29
B753	7	4	3,27	0,69	0,00
B789	7	3	2,88	0,65	0,00
B662	7	4	3,77	0,73	0,00
ср. знач ±стандартная ошибка	6,9 ±0,1	2,92 ±0,2	2,51 ±0,2	0,54 ±0,1	0,26 ±0,1

Примечание: N – количество проанализированных образцов;
 Na – общее количество различных аллелей;
 Ne – количество эффективных аллелей;
 Ho – наблюдаемая гетерозиготность

Выводы. В результате исследования была проведена оптимизация методики выделения ДНК из листьев *C. avellana*. Выяснилось, что добавление в состав СТАВ-буфера 2% PVP (m. w. 40 000) позволяет выделить качественную ДНК для ПЦР-анализа.

В результате проведения апробации SSR-маркеров были определены 3 SSR-маркера (A604 (Na = 2,65, He = 0,62, Ho = 0,57), A611 (Na = 2,80, He = 0,64, Ho = 0,86), B606 (Na = 2,80, He = 0,64, Ho = 0,57), которые могут быть использованы для генотипирования базовой коллекции *C. avellana*.

Результаты исследования будут полезны для дальнейших исследований генетического разнообразия зародышевой плазмы *Corylus avellana* на Западном Кавказе. Кроме того, эти результаты ценны для дальнейшего управления коллекцией и создания новых устойчивых сортов фундука.

Публикация подготовлена в рамках реализации
ГЗ ФИЦ СХЦ РАН FGRW-2021-0006,
№ госрегистрации И123012400136-3

Список литературы/ References

1. Aboul-Maaty N.A.F., Oraby H.A.S. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method, Bull. Natl. Res. Cent. 2019; 43 : 25. DOI: 10.1186/s42269-019-0066-1.
2. Amani J., Kazemi R., Abbasi A.R., Salmanian A.H. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis, Iran J. Biotech. 2011; 9(1) : 69-71.
3. Amaral J.S., Valentão P., Andrade P.B., Martins R.C., Seabra R.M. Phenolic composition of hazelnut leaves: Influence of cultivar, geographical origin and ripening stage, Scientia horticultrae. 2010; 126(2) : 306-313. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.07.026.
4. Amiryousefi A., Hyvönen J., Poczai P. iMEC: Online Marker Efficiency Calculator, Appl. Plant Sci. 2018; 6 : e1159. DOI: 10.1002/aps3.1159.
5. Barbier F.F., Chabikwa T.G., Ahsan M.U., Cook S.E., Powell R., Tanurdzic M., Beveridge C.A. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing, Plant Methods. 2019; 15 : 62. DOI: 10.1186/s13007-019-0447-3.
6. Bassil N.V., Botta R., Mehlenbacher S.A. Microsatellite markers in hazelnut: isolation, characterization, and cross-species amplification, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2005; 130(4) : 543-549.
7. Bhattarai G., Mehlenbacher S.A., Smith D.C. Eastern filbert blight disease resistance from *Corylus americana* 'Rush' and selection 'Yoder 5' maps to linkage group 7, Tree Genet. Genomes. 2017; 13 : 45. DOI: 10.1007/s11295-017-1129-9.
8. Boccacci P., Aramini M., Valentini N., Bacchetta L., Rovira M., Drogoudi P., Silva A. P., Solar A., Calizzano F., Erdoğan V., Cristofori V., Ciarmiello L.F., Contessa C., Ferreira J.J., Marra F.P., Botta R. Molecular and morphological diversity of on-farm hazelnut (*Corylus avellana* L.) landraces from southern Europe and their role in the origin and diffusion of cultivated germplasm, Tree Genetics. Genomes. 2013; 9 : 1465-1480. DOI: 10.1007/s11295-013-0651-7.
9. Boccacci P., Aramini M., Ordidge M., van Hintum T.J., Marinoni D.T., Valentini N., Sar-

- raquigne J.P., Solar A., Rovira M., Bacchetta L., Botta R. Comparison of selection methods for the establishment of a core collection using SSR markers for hazelnut (*Corylus avellana* L.) accessions from European germplasm repositories, *Tree Genet. Genomes*. 2021; 17 : 48. DOI: 10.1007/s11295-021-01526-7.
10. Dairawan M., Shetty P.J. The evolution of DNA extraction methods, *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 2020; 8 : 39-45. DOI: 10.34297/AJBSR.2020.08.001234.
11. Deshmukh V.P., Thakare P.V., Chaudhari U.S., Gawande P.A. A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Arnot, *Electron. J. Biotechnol.* 2007; 10 : 468-472. DOI: 10.2225/vol10-issue3-fulltext-5.
12. Doyle J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*. 1990; 12 : 13-15.
13. Ershadi A., Farrokhi Toolir J. Evaluation of genetic diversity of Iranian populations of hazelnut (*Corylus avellana* L.) Using SSR Markers. *Journal of Nuts*. 2022; 13(4) : 273-288. DOI: 10.22034/JON.2022.1955752.1162.
14. Felbinger C., Kutzsche F., Mönkediek S., Fischer M. Genetic profiling: Differentiation and identification of hazelnut cultivars (*Corylus avellana* L.) using RAPD-PCR, *Food Control*. 2020; 107 : 106791. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106791.
15. Fiore M.C., Marchese A., Mauceri A., Digangi I., Scialabba A. Diversity Assessment and DNA-Based Fingerprinting of Sicilian Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Germplasm, *Plants*. 2022; 11(5) : 631. DOI: 10.3390/plants11050631.
16. Gökirmak T., Mehlenbacher S.A., Bassil N.V. Characterization of European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using SSR markers, *Genet. Resour. Crop Evol.* 2009; 56 : 147-172. DOI: 10.1007/s10722-008-9352-8.
17. Gürcan K., Mehlenbacher S.A., Erdoğan V. Genetic diversity in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars from Black Sea countries assessed using SSR markers, *Plant breeding*. 2010; 129(4) : 422-434. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2009.01753.x.
18. Hassani S.A., Salehi Sardoei A., Azad Ghouge Bigloo H., Ghasemi H., Ghorbanzadeh A. Assessment of Genetic Diversity in Iranian Apple Genotypes Using SSR Markers, *Int. J. Hortic. Sci. Technol.* 2022; 9(4) : 487-496. DOI: 10.22059/ijhst.2021.327322.483.
19. Karakaya O., Yaman M., Balta F., Yilmaz M., Balta M.F. Assessment of genetic diversity revealed by morphological traits and ISSR markers in hazelnut germplasm (*Corylus avellana* L.) from Eastern Black Sea Region, Turkey, *Genet. Resour. Crop Evol.* 2023; 70(2) : 525-537. DOI: 10.1007/s10722-022-01444-0.
20. Kulyan R., Samarina L., Shkhalakhova R., Kuleshov A., Ukhatova Y., Antonova O., Koninskaya N., Matskiv A., Malyarovskaya V., Ryndin A. InDel and SCoT Markers for Genetic Diversity Analysis in a Citrus Collection from the Western Caucasus, *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24 : 8276. DOI: 10.3390/ijms24098276.
21. Li J.T., Yang J., Chen D.C., Zhang X.L., Tang Z.S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower, *Genet. Mol. Res.* 2007; 6 : 1064.
22. Öztürk S.C., Göktay M., Allmer J., Doğanlar S., Frary A. Development of simple sequence repeat Markers in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) by next generation sequencing and discrimination of Turkish hazelnut cultivars using SSR Barcodes, *Plant Mol. Biol. Rep.* 2018; 36 : 800-811. DOI: 10.1007/s11105-018-1120-0.
23. Ozturk S.C., Ozturk S.E., Celik I., Stampar F., Veberic R., Doganlar S., Solar A., Frary A. Molecular genetic diversity and association mapping of nut and kernel traits in Slovenian hazelnut (*Corylus avellana*) germplasm, *Tree Genet. Genomes*. 2017; 13 : 16. DOI: 10.1007/s11295-016-1098-4.
24. Peakall R.; Smouse P.E. Population genetic software for teaching and research – an

- update, *Bioinformatics*. 2012; 28 : 2537-2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
25. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Mol. Ecol. Notes*. 2006; 6 : 288-295.
26. Ribeiro R.A., Lovato M.B. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genet. Mol. Res.* 2007; 6 : 173.
27. Sadat-Hosseini M., Vahdati K., Leslie C.A. Germination of Persian walnut somatic embryos and evaluation of their genetic stability by ISSR fingerprinting and flow cytometry, *HortScience*. 2009; 54(9) : 1576-1580. DOI: 10.21273/HORTSCI13787-18.
28. Sahu S.K., Thangaraj M., Kathiresan K.D.N.A. Extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol, *Mol. Biol.* 2012; 12 : 1-6. DOI: 10.5402/2012/205049.
29. Sá O., Pereira J.A., Baptista P. Optimization of DNA extraction for RAPD and ISSR analysis of *Arbutus unedo* L. leaves, *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12(6) : 4156-4164. DOI: 10.3390/ijms12064156.
30. Sarikhani S., Vahdati K. Determination of Persian walnut yield components and its correlation with phenological, morphological and biochemical traits, *Iranian Journal of Hort. Sci.* 2019; 50(3) : fa549-fa560. DOI: 10.22059/ijhs.2018.260251.1474.
31. Vahdati K., Mohseni Pourtaklu S., Karimi R., Barzehkar R., Amiri R., Mozaffari M., Woeste K. Genetic diversity and gene flow of some Persian walnut populations in southeast of Iran revealed by SSR markers, *Plant Syst. Evol.* 2015; 301 : 691-699. DOI: 10.1007/s00606-014-1107-8.
32. Wambulwa M.C., Meegahakumbura M.K., Chalo R., Kamunya S., Muchugi A., Xu J.C., Liu J., Li D.Z., Gao L.M. Nuclear microsatellites reveal the genetic architecture and breeding history of tea germplasm of East Africa, *Tree Genet. Genomes*. 2016; 12 : 11. DOI: 10.1007/s11295-015-0963-x.
33. Wani I.A., Ayoub A., Bhat N.A., Dar A.H., Gull A. Hazelnut. In: Nayik G.A., Gull A. (eds) *Antioxidants in Vegetables and Nuts – Properties and Health Benefits*. Springer, Singapore. 2020; 559-572. DOI: 10.1007/978-981-15-7470-2_29.
34. Zong J.W., Zhao T.T., Ma Q.H., Liang L.S., Wang G.X. Assessment of Genetic Diversity and Population Genetic Structure of *Corylus mandshurica* in China Using SSR Markers, *PLoS ONE*. 2015; 10(9) : e0137528. DOI: 10.1371/journal.pone.0137528.

**OPTIMIZATION OF THE DNA EXTRACTION METHOD
FOR HAZELNUT LEAVES AND SSR MARKERS EFFICIENCY
EVALUATION FOR CHARACTERIZING
THE GENETIC DIVERSITY OF *CORYLUS AVELLANA* L.**

Shkhalakhova R.M., Koninskaya N.G., Tutberidze Ts.V.

*Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre
of the Russian Academy of Sciences,
Russia, Sochi, e-mail: shkhalakhova1995@mail.ru*

Collections of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from the border subtropical growing regions can be an important source of tolerant germplasm for the breeding of highly resistant genotypes, which can be more adaptable to changing environmental conditions. However, the efficient use of these germplasms requires their genetic background. Therefore, efficient marker systems and high-quality DNA material are necessary for the characterization and identification of valuable accessions. In this study, we optimized the method of DNA extracting from hazelnut leaves

and evaluated the efficiency of SSR microsatellite markers for further genotyping. DNA was isolated by the classical CTAB method and its modifications, as well as by two commercial kits. The addition of 2 % PVP (m. w. 40,000) to the CTAB buffer showed the best DNA result for PCR analysis. As a result of the efficiency evaluation, four of the 26 SSR markers, such as A604 (Na = 2,65, He = 0,62, Ho = 0,57), A611 (Na = 2,80, He = 0,64, Ho = 0,86), B606 (Na = 2,80, He = 0,64, Ho = 0,57) showed the good applicability to assess the genetic diversity of *C. avellana*. The authors also noted the need to continue the search and development of more efficient SSR markers for the genetic diversity assessing and phylogenetic studies of hazelnuts. The obtained results are important for the conservation and competent management of hazelnut genetic resources in the Western Caucasus and can be used to optimize future research by identifying a minimum number of accessions on which to focus when improving breeding efficiency.

Key words: *Corylus avellana* L., SSR, DNA extraction, microsatellite analysis, DNA marker efficiency.