

УДК 581.52:577.2

## ВНУТРІШНЬОВИДОВА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ОМЕЛИ БІЛОЇ (*VISCUM ALBUM L.*) ЗА ДОПОМОГОЮ ОЦІНКИ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ $\beta$ -ТУБУЛІНУ ТА SSR-АНАЛІЗУ

Ю.О. БІЛОНОЖКО \*, А.М. РАБОКОНЬ, А.С. ПОСТОВОЙТОВА, Л.О. КАЛАФАТ,  
С.М. ПРИВАЛІХІН, А.Є. ДЕМКОВИЧ, Я.Б. БЛЮМ, Я.В. ПІРКО

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2а  
E-mail: tkacheva\_ua@ukr.net

На підставі аналізу поліморфізму довжини першого інтрону генів  $\beta$ -тубуліну (ТВР-аналіз) показано різницю між двома підвидами омели білої (*Viscum album ssp. austriacum* (Wiesb.) та *V. album ssp. album L.*). Також продемонстрована можливість використання ТВР-аналізу для визначення статі рослин омели. За допомогою проведеного SSR-аналізу вдалось виділити окремі генотипи омели білої. При оцінці ефективності використання двох типів ДНК-маркерів показано, що ТВР-аналіз доцільно використовувати для диференціювання різних підвидів омели білої, а SSR-аналіз – для дослідження генотипової мінливості в межах окремого підвиду.

**Ключові слова:** омела біла, підвиди, ДНК-маркери, ТВР-аналіз, SSR-маркери.

Омела біла (*Viscum album L.*) належить до роду *Viscum*, який об'єднує близько 60 видів (Barney et al., 1998), що паразитують на різноманітних видах деревних рослин. Серед останніх нараховують до 500 видів дерев (омела оселяється як на голонасінних, так і на покритонасінних рослинах) (Kartoolinejad et al., 2007; Ahmed et al., 2015; Bilgili et al., 2020). До цього переліку належить значна кількість як декоративних, так і економічно важливих порід дерев. Вважається, що *V. album* спричиняє уповільнення росту, передчасну дефоліацію, зменшення площі фотосинтезуючих тканин, зміни у водному та вуглецевому балансі дерев-живителів, що в

свою чергу призводить до зниження стійкості деревних рослин до інших ушкоджуючих факторів (Barbu, 2012; Sanguesa-Barreda et al., 2016). Встановлено тісний взаємозв'язок між зараженням та смертністю дерев, а отже *V. album* є важливим біотичним фактором, що знижує життєздатність рослин, на яких вона паразитує (Tsopeles et al., 2004; Raftoyannis et al., 2015).

За останні 25–30 років *V. album* набула значного, а місцями – масового поширення переважно завдяки птахам, які переносять насіння. Існує думка, що масове розмноження різних видів омели також пов'язано зі змінами клімату, які призвели, з одного боку, до суттєвого ослаблення деревних рослин, з іншого – до створення комфортніших умов для паразитичних рослин роду омела (Galkin et al., 2017). Широко розповсюджена омела біла і на території України (Krasylenko et al., 2020).

На сьогодні таксономія виду *V. album* є дещо неузгодженою. Так, омелу білу, яка проявляє чітку спеціалізацію до певного виду рослини-живителя, виділяють в окремі раси (Zuber et al., 2009), підвиди (Schaller et al., 1998) або навіть види (Mejnartowicz, 2006). Найбільш широко визнають три підвиди омели білої: *V. album ssp. abietis* (Wiesb.) Abromeit – зустрічається на ялиці (*Abies spp.*); *V. album ssp. austriacum* (Wiesb.) Vollmann – селиться переважно на соснах (*Pinus spp.*) та *V. album ssp. album L.* (синонім *V. album subsp. meridianum* (Danser) Long), яка росте на різноманітних листяних породах дерев (Bohling et al., 2002). Однак основні докази, що підтвер-

© Ю.О. БІЛОНОЖКО, А.М. РАБОКОНЬ,  
А.С. ПОСТОВОЙТОВА, Л.О. КАЛАФАТ,  
С.М. ПРИВАЛІХІН, А.Є. ДЕМКОВИЧ, Я.Б. БЛЮМ,  
Я.В. ПІРКО, 2021

джують відмінність цих трьох підвидів *V. album*, базуються на результатах біохімічних досліджень. Так показано, що омела з різних рослин відрізняється за складом віскотоксину (Schaller et al., 1998). За результатами ж генетичних досліджень цих трьох підвидів за допомогою 21 ізоцимного локусу була показана настільки чітка різниця між ними, що автором було запропоновано існуючі підвиди розділити на окремі види: *V. album* L., *V. abietis* Beck та *V. laxum* Boiss. et Reut (Mejnartowicz, 2006). Крім того, деякі вчені виділяють підвид, який зустрічається на різних видах хвойних – *V. album* ssp. *creticum* N. Bohling (Bohling et al., 2002; Kolodziejek et al., 2013). Азіатський підвид *V. album* (*V. album* subsp. *coloratum* Kom.) за результатами багатьох досліджень було виокремлено як самостійний вид, який так само має декілька підвидів (Kim et al., 2013; Wei et al., 2019).

Отже, зважаючи на те, що питання систематичного положення підвидів омели білої, яка зростає на різних рослинах-живителях, не є загальноприйнятим, а також на недостатню інформацію щодо генетичної диференціації цього виду, доцільним є дослідження *V. album*, що зростає на різних видах рослин, із застосуванням молекулярно-генетичних маркерів. Досить широко для цього використовуються SSR-маркери (Kalia et al., 2011; Vieira et al., 2016). Вони є монолокусними, кодомінантними, відтворюваними маркерами та дозволяють за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) оцінити рівень поліморфізму, обумовленого різною кількістю повторів в мікросателітному локусі. На цей час вони залишаються ефективним інструментом для генотипування і дослідження потоків генетичної інформації, диференціації геномів різних видів рослин (Kalia et al., 2011; Vieira et al., 2016; Kim et al., 2017).

Наразі однією з відносно нових та надійно працюючих у різних видів рослин систем молекулярно-генетичних маркерів вважається маркерна система, що базується на визначенні поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну (ТВР, Tubulin Based Polymorphism) (Bardini et al., 2004). Цей метод є достатньо стабільним та специфічним, що обумовлює можливість його використання в генетичному аналізі рослин (Rabokon et al., 2015), в тому числі і омели білої, як вже було показано раніше (Bilonozhko et al.,

2019). Саме тому метою роботи було виявлення молекулярно-генетичних відмінностей між омелою білою, що зростає на різних видах древних рослин.

**Матеріали та методи.** Для дослідження було залучено *V. album* по 10 дерев клена сріблястого (*Acer saccharinum* L.) та сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.), зібраних у Подільському районі м. Києва. Також були зібрані жіночі та чоловічі рослини *V. album* з 19 дерев тополі чорної (*Populus nigra* L.) (Подільський район, м. Київ) для аналізу генетичних особливостей статевого диморфізму. Під час збору зелені листові пластинки омели відразу запаковували в окремі пакети, а в подальшому заморозували та зберігали при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Геномну ДНК екстрагували з листових пластинок за допомогою ЦТАБ-методу (Green et al., 2012). Якість і кількість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі і спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» з визначенням концентрації та ступеня забруднення ДНК. Зразки ДНК зберігали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора ThermalCycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 2,5 мкл 10  $\times$  ПЛР-буферу з сульфатом амонію, 2,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мМ кожного дНТФ, 0,5 од. Таq-полімерази («Thermo Scientific», США). Послідовності праймерів були взяті з літературних джерел та наведені нижче у табл. 1.

Ампліфікацію у випадку ТВР-аналізу здійснювали згідно (Breviaro et al., 2007), а у випадку SSR-аналізу – згідно (Kim et al., 2017). Кожну ПЛР проводили як мінімум двічі з використанням негативного контролю (без ДНК). Продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу в 6%-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1  $\times$  ТВЕ-буфері. Візуалізацію фрагментів ДНК здійснювали шляхом фарбування гелів нітратом срібла. Після електрофорезу гель фотографували у видимому світлі та аналізували отримані зображення в програмі GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і чітких фрагментів ДНК визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100 п.н. Plus і O'Gene Ruler™ 50 DNA Ladder, ready-to-use; «Thermo Scientific», США).

Коефіцієнт подібності Нея та Лі (Nei et al., 1979) між генотипами визначали за допомогою програми FreeTree (Pavlicek et al., 1993) на підставі наявності/відсутності ампліфікованих фрагментів у проаналізованих зразках. Значення подібності були використані для кластерного аналізу, який проводили за допомогою UPGMA з використанням тієї ж програми. Для оцінки достовірності побудованих дерев було проведено бутстреп (bootstrap) аналіз (Hillis et al., 1993) для 1000 повторностей. Отримані дендрограми візуалізували за допомогою програми FigTree v1.4.2.

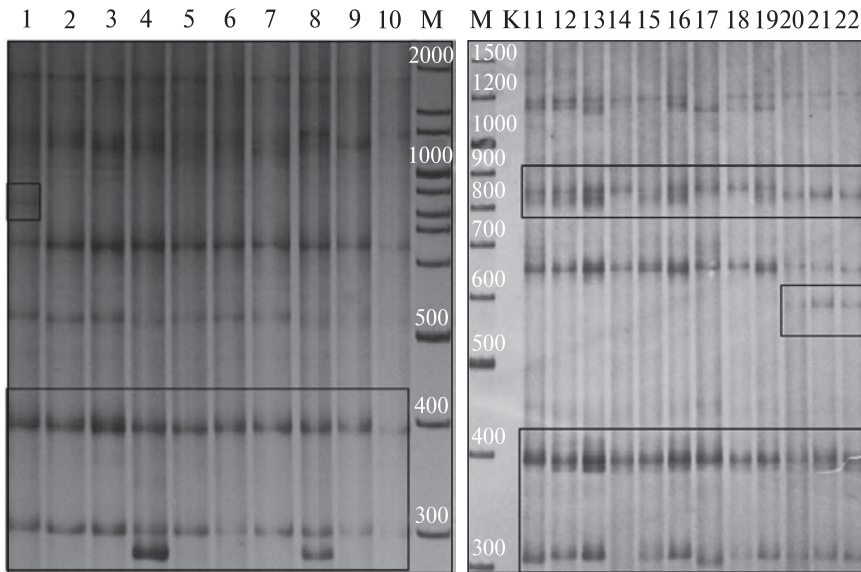
**Результати дослідження.** В останні роки було опубліковано значну кількість робіт щодо використання ТВР методу як інструменту для диференціації сортів, видів та популяцій рослин (Galasso et al., 2011; Braglia et al., 2014; Rabokon et al., 2019; Rabokon et al., 2018). Однак даних щодо можливостей використання даного підходу для диференціації різних підвидів рослин між собою до сьогодні представлено не було. Раніше за допомогою ТВР-аналізу вже було проаналізовано відмінності у генетичних профілях омели білої, зібраної з різних порід листяних дерев (Bilonozhko et al., 2019). На сьогодні існують дані аналізу ITS послідовностей та некодуєчої хлоропластної ДНК, в яких продемонстровані відмінності між рослинами омели білої з різ-

них дерев-господарів (Zuber et al., 2000; Zuber, 2004). З огляду на все вищесказане необхідно було оцінити можливість диференціації омели білої, яка зростає на хвойних та листяних деревах (з *P. sylvestris* та *A. saccharinum*), на підвиди шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну.

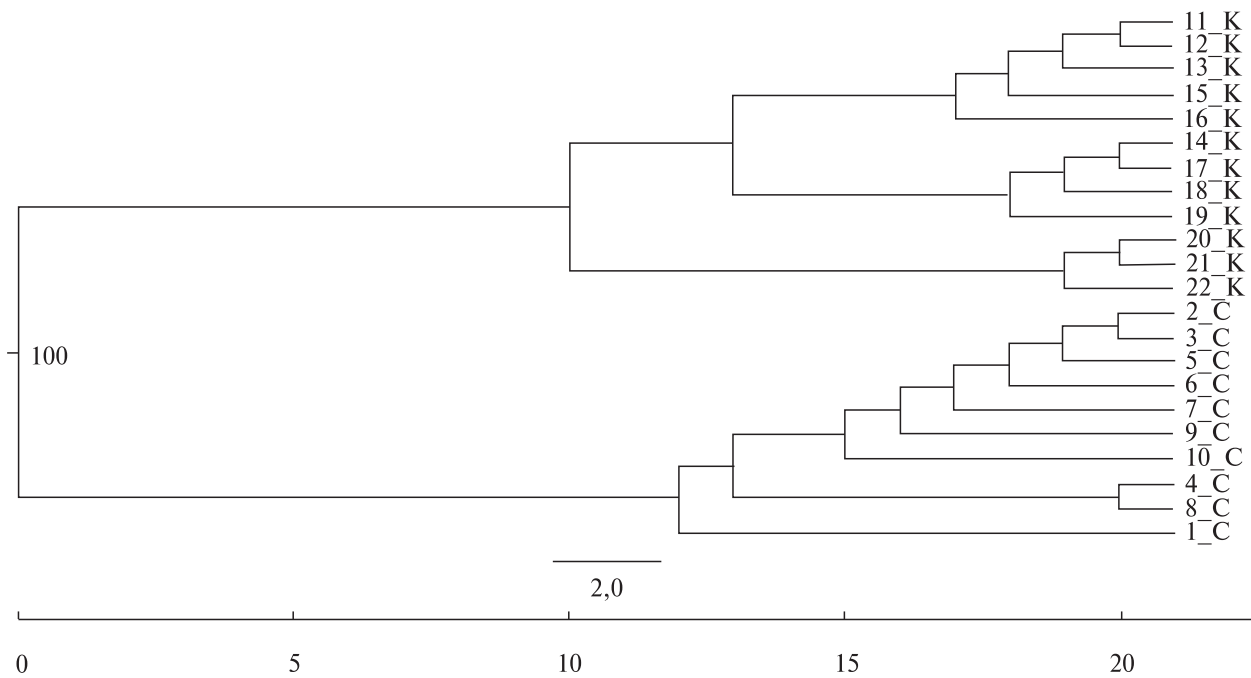
Було проаналізовано зразки омели, яка зростає на *P. sylvestris*. Результати електрофоретичного аналізу дозволили виявити наявність фрагментів ДНК розміром від 280 п.н. до 2000 п.н. (рис. 1). Однак в зоні від 1000 п.н. до 2000 п.н. фрагменти є нечіткими, а отже не виключено, що ці амплікони – неспецифічні продукти ПЛР, тому для подальшого аналізу використовували лише фрагменти в діапазоні від 280 п.н. до 900 п.н. Загалом для всіх зразків було виявлено 11 ампліконів, приблизно по 5 на кожен зразок. З'ясувалося, що зразки омели з клену та з сосни відрізняються за молекулярними профілями, хоча і мають 2 спільних мономорфних фрагменти розміром приблизно 386 п.н. та 650 п.н. Для групи зразків омели, що зростає на сосні, характерні амплікони довжиною приблизно 280 п.н., 302 п.н., 386 п.н., 545 п.н., 650 п.н. та 817 п.н. При цьому амплікон довжиною 817 п.н. наявний лише у 1 зразка, 280 п.н. – у двох, а інші амплікони є мономорфними для цієї групи зразків.

#### Характеристика використаних праймерів

Метод	Праймери (5'– 3')		Т, °С	Джерело
	F	R		
ТВР	AACTGGGCBAARGGNCAUTAYAC	ACCATRCAYTCTRTCDGCRTTYTC	55	(Breviario et al., 2007)
SSR Vi-13	ATCSTATCCAACCAAATCTCG	TATTTGGGTTTTCTCCATAACG	58	(Kim et al., 2017)
SSR Vi-22	CCAATTTTCTGGATACTTTCA	TTCTAGGTATTCCCCTGTGATG	57	(Kim et al., 2017)
SSR Vi-32	CTTGAAAGACGACCAAGAAGAC	GATCATAGTCCCGAAATCACC	58	(Kim et al., 2017)
SSR Vi-60	GTTGAATTCCGACATCCAGTAT	CCACATCGTGAAGGACTAATTT	58	(Kim et al., 2017)
SSR Vi-71	CGCACTTTTAGCTTACCTGAGT	CATCGTCTTCSTTTTGATCTTC	58	(Kim et al., 2017)
SSR Vi-77	GACGAGCAGATGACGTGG	CATTATCTGACTGGTTCGGAAG	58	(Kim et al., 2017)
SSR Vi-88	GGCTCAGGGACTTCTTGTATT	AAGAACGTTTTCTTCCGCAT	58	(Kim et al., 2017)



**Рис. 1.** Молекулярні ТВР-профілі *V. album*, отримані під час ампліфікації першого інтрону генів β-тубуліну. 1–10 – зразки омели з *P. sylvestris*, 11–22 – зразки омели з *A. saccharinum*. М – ДНК-маркер



**Рис. 2.** Дендрограма генетичної схожості зразків *V. album*, побудована на основі результатів ТВР-аналізу (К – *A. saccharinum*, С – *P. sylvestris*)

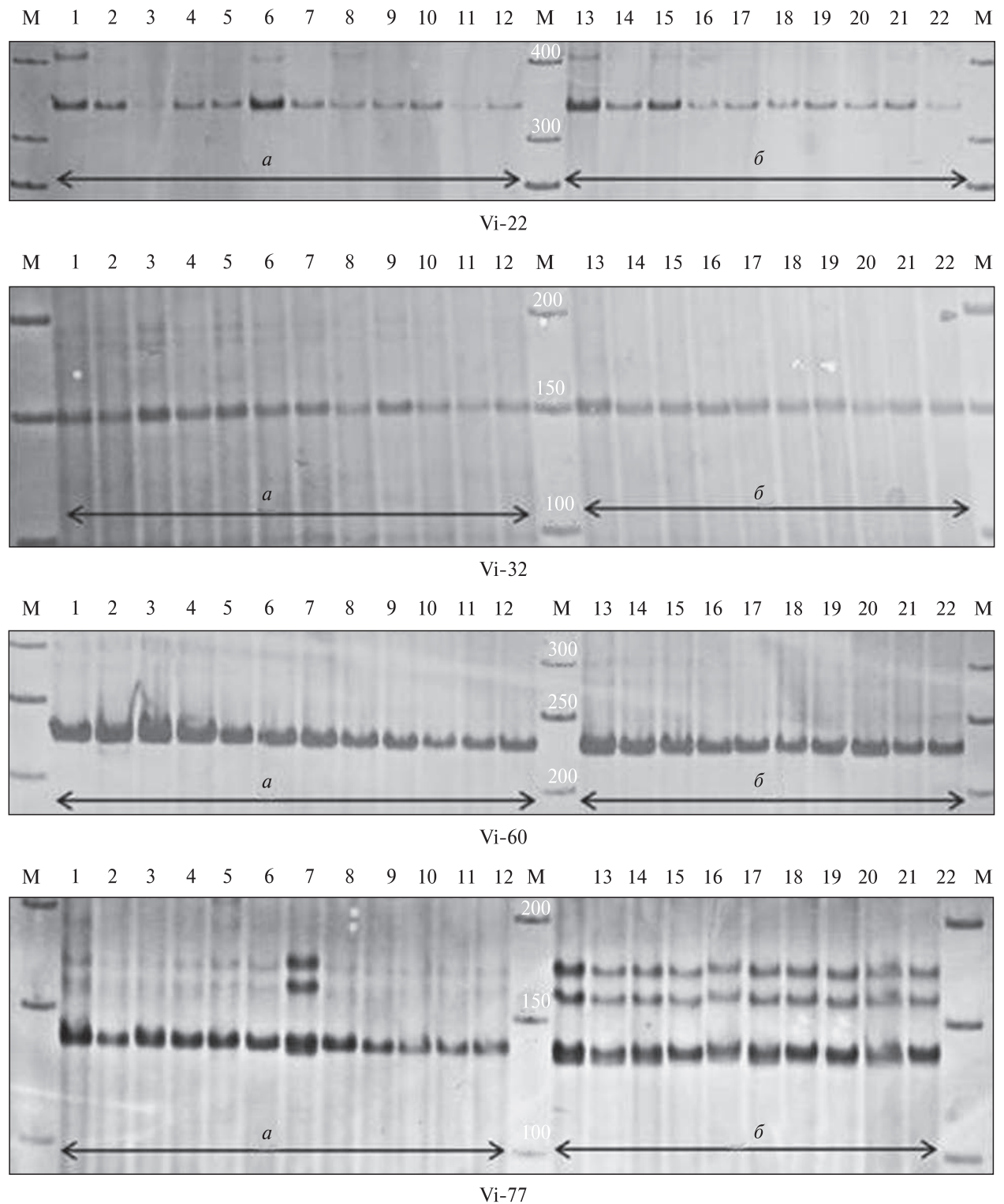
У зразків омели з клену детектуються фрагменти ДНК з приблизними розмірами 310 п.н., 316 п.н., 386 п.н., 580 п.н., 650 п.н., 825 п.н. та 850 п.н. Слід зазначити, що фрагмент 580 п.н. наявний лише у трьох зразків, які відносяться до чоловічих рослин. Можливо саме він може

бути унікальним фрагментом, характерним для чоловічих рослин омели білої.

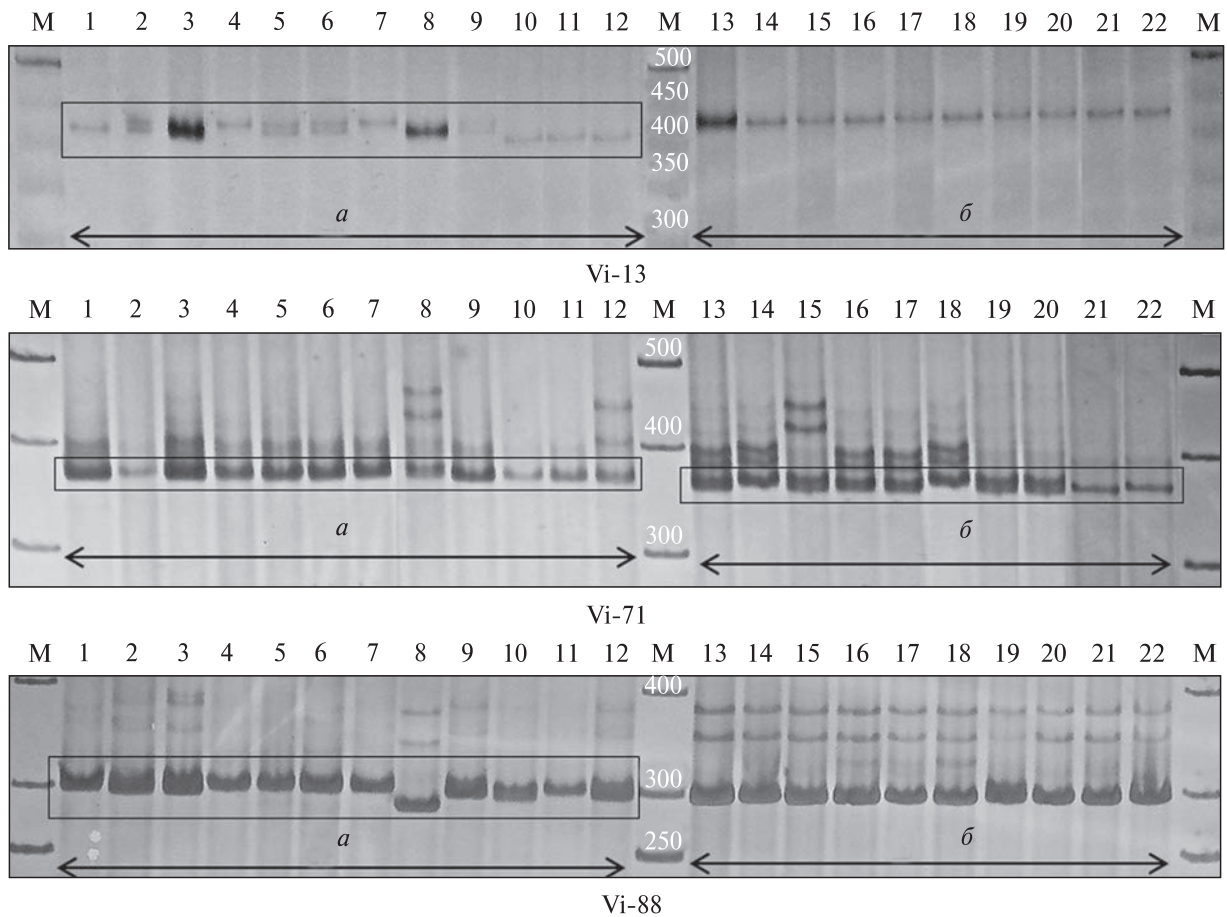
Дані фінгерпринтингу за першим інтроном гена β-тубуліну були використані для кластерного аналізу за допомогою UPGMA (рис. 2). З отриманої дендрограми видно, що всі до-



■ **Внутрішньовидова диференціація омели білої (*Viscum album L.*) за допомогою оцінки поліморфізму** ■



**Рис. 3.** SSR-профілі локусів *Vi-22*, *Vi-32*, *Vi-60* та *Vi-77* у *V. album*. 1–22 – номери зразків омели з *A. saccharinum* (*a*) та *P. sylvestris* (*б*), М – ДНК-маркер «50 п.н. Ladder»



**Рис. 4.** SSR-профілі локусів *Vi-13*, *Vi-71* та *Vi-88* у *V. album*. 1–22 – номери зразків омели з *A. saccharinum* (а) та *P. sylvestris* (б), М – ДНК – маркер «50 п.н. Ladder». Прямокутником виділена зона поліморфних фрагментів ДНК

сліджувані зразки зі 100%-ним значенням бутстреп-підтримки розділяються на дві групи. Одна з них сформована зразками омели, яка зростає на сосні, а друга – омели, яка зростає на клені. Це узгоджується з даними щодо доказів існування генетичних відмінностей між рослинами омели білої, що мають різних господарів, за даними аналізу ITS послідовностей та некодуєчої хлоропластної ДНК (Zuber et al., 2000; Zuber, 2004). Відмінності ТВР-профілів зразків омели з сосни та клену можуть вказувати на їх приналежність до двох різних підвидів: *V. album* ssp. *austriacum* (Wiesb.) та *V. album* ssp. *album* L., однак такий висновок потребує перевірки за допомогою інших типів молекулярно-генетичних маркерів.

На сьогодні одним з таких методів є SSR-аналіз, який широко використовується для генетичної диференціації рослин. Раніше при молекулярно-генетичному аналізі *V. coloratum* було розроблено SSR-маркери для 19 локусів, які за твердженням авторів підходять і для аналізу *V. album* (Kim et al., 2017). Зважаючи на це для досліджуваних зразків омели білої були відібрані 7 мікросателітних локусів, які характеризувалися найбільшим рівнем поліморфності. В результаті SSR-аналізу *V. album* встановлено, що за SSR-локусами *Vi-22*, *Vi-32*, *Vi-60* та *Vi-77* всі досліджені зразки *V. album*, як з сосни, так і з клену, мають однаковий молекулярно-генетичний профіль (рис. 3). При аналізі досліджуваних рослин з використанням SSR-маркери *Vi-22*

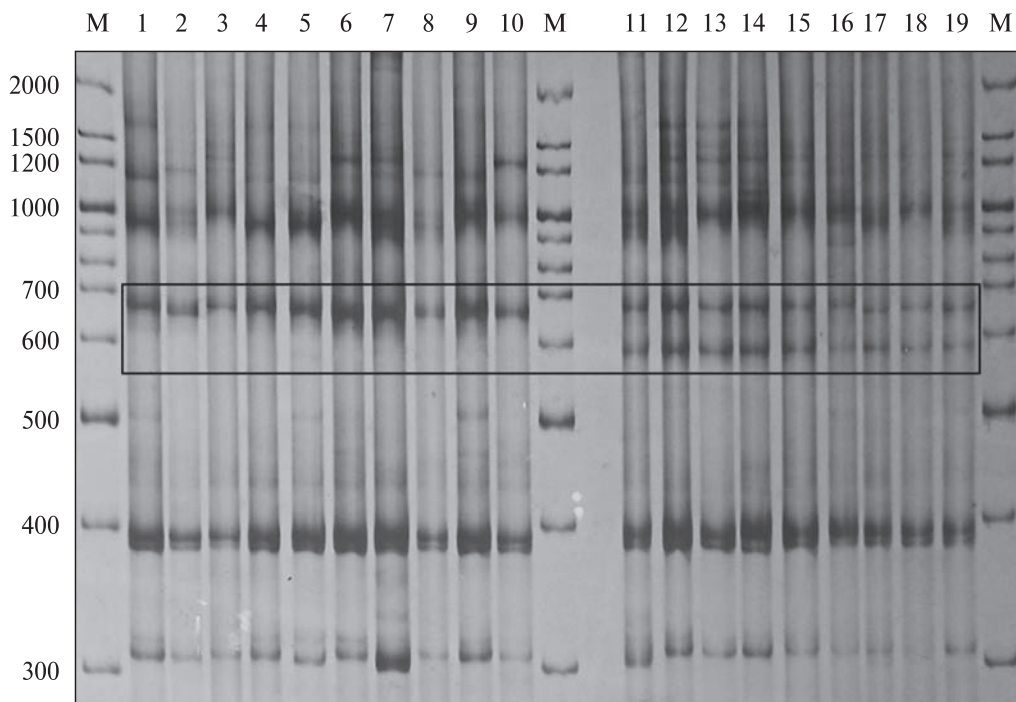


Рис. 5. ТВР-профілі *V. album* з *P. nigra*, отримані під час ПЛР з праймерами до першого інтрону генів  $\beta$ -тубуліну. 1–10 – номери зразків жіночих особин омели, 11–19 – номери зразків чоловічих особин омели, М – ДНК-маркер «100 п.н. Ladder»

всі зразки омели містили однакові фрагменти ДНК довжиною 340 п.н., при використанні SSR-маркеру *Vi-32* – фрагмент ДНК довжиною 151 п.н., *Vi-60* – фрагмент довжиною 233 п.н. та при дослідженні локусу *Vi-77* детектувався фрагмент ДНК довжиною 141 п.н. Таким чином, проаналізовані зразки омели з клену та сосни виявилися генетично-мономорфними за цими SSR-маркерами, оскільки містили однакові алелі мікросателітного локусу.

За умов використання трьох інших SSR-маркерів (*Vi-13*, *Vi-71*, *Vi-88*) вдалося виділити окремі генотипи в межах кожної вибірки *V. album* (рис. 4). Так, у результаті дослідження SSR-локусу *Vi-13* вибірка омели з сосни виявилася мономорфною, всі проаналізовані зразки містили однакові фрагменти довжиною 455 п.н. Однак у вибірці омели з клену зафіксована поява 4 різних алелей довжиною 410 п.н., 428 п.н., 441 п.н. та 455 п.н. У зразках 2, 5 та 6 зафіксовано одразу два алелі (428 п.н. та 441 п.н.) одночасно, що свідчить про гетерозиготність рослин омели білої за локусом *Vi-13*. Зразки

10, 11 та 12 містили фрагмент ДНК розміром 410 п.н., зразки 1, 8 та 9 – 428 п.н., а зразки 4 та 7 – 455 п.н.

В результаті SSR-аналізу за локусом *Vi-71* встановлено, що більшість зразків *V. album*, які зростають на клені, та два зразки омели (під номерами 14 і 18), що зростають на сосні, містили фрагмент ДНК розміром 365 п.н., тоді як всі інші – 360 п.н. Як видно з рис. 4 результати SSR-аналізу *V. album* за локусом *Vi-88* свідчать про наявність у всіх проаналізованих зразків, що зростали на сосні, амплікону розміром 298 п.н., а у клена – наявність трьох фрагментів: 289 п.н., 295 п.н., 298 п.н.

Таким чином, результати ампліфікації ДНК досліджуваних зразків *V. album* показали, що з семи вивчених SSR-локусів чотири виявилися мономорфними. За локусом *Vi-71* детектуються два генотипи, а за *Vi-88* – як мінімум три в групі *V. album* з клену. Найбільш поліморфним був SSR-локус *Vi-13*, за яким вдалося виявити найбільшу кількість генотипів омели. Однак здебільшого вибірка зразків *V. album*, що

зростає на клені, виявилася більш генетично гетерогенною як за результатами SSR-, так і TBP-аналізу.

Крім того, слід зазначити, що за локусом *Vi-13* три зразки омели з клену, які відносяться до чоловічих рослин *V. album*, відрізняються від всіх інших. Ці результати співпадають з даними, отриманими під час TBP-аналізу. Очевидно, що варто було б перевірити, чи дійсно чоловічі та жіночі рослини омели білої відрізняються за молекулярно-генетичним профілем, адже визначити стать у молодих рослин, які ще не вступили в генеративну фазу, а, отже, не мають плодів на жіночих особинах, дуже складно. Крім того, *V. album* не має статевих хромосом. У роботі Schink та Mechelke було описані два білки, присутні лише у чоловічих рослин, тому їх було запропоновано розглядати як маркери, що визначають стать (Schink et al., 1989). Наявність цих протеїнів не залежить від географічного розташування та виду рослини-живителя, і їх можна використовувати для визначення статі омели на будь-якій стадії розвитку. Однак білкові маркери мають свої обмеження та складності аналізу, тому питання розпізнавання жіночих та чоловічих рослин за допомогою ДНК-маркерів в цілому є досить актуальним, особливо для рослин у яких цінні господарські або фітосанітарні особливості залежать від статі (Pannell, 2017). Найпопулярніші маркери, що використовуються з цією метою, – це RAPD, SCAR, AFLP, RFLP та SSR (Milewicz et al., 2013; Zhou et al., 2018).

У зв'язку з цим було проведено TBP-аналіз жіночих та чоловічих особин *V. album*, що зростають на *Populus nigra*. В цьому випадку інша рослина-живитель була залучена до аналізу для виключення ймовірності того, що поява додаткового амплікону у чоловічих особин може бути характерним лише для омели з клену. З рис. 5 видно, що під час електрофоретичного розділення отриманих в ході ПЛР ампліконів фрагменти ДНК рееструються в тому самому діапазоні, що і зразки *V. album* з інших дерев-живителів – від 280 п.н. до 2000 п.н., однак чіткі фрагменти є лише від 280 п.н. до 900 п.н. У всіх чоловічих особин (зразки 11–19) детектується фрагмент розміром 580 п.н., відсутній у всіх жіночих (зразки 1–10) рослин *V. album*. При цьому під час аналізу SSR-локусу *Vi-13*

з використанням більшої вибірки зразків *V. album* не вдалося диференціювати чоловічі та жіночі особини (дані не наведено). Таким чином, TBP-метод може бути використаний для визначення статі у *V. album*.

Отже, за допомогою аналізу поліморфізму довжини першого інтрону генів β-тубуліну вдалося установити різницю між омелою, яка росте на сосні та клені, що може свідчити про приналежність рослин до двох різних підвидів омели білої (*V. album* spp. *austriacum* (Wiesb.) та *V. album* ssp. *album* L.). Також продемонстрована ефективність застосування TBP-методу для диференціації чоловічих та жіночих особин *V. album*. В цілому за результатами проведеного SSR-аналізу зразки омели білої, що зростають на сосні та клені, не відрізняються один від одного, проте вдалося виокремити певні генотипи омели в межах кожної групи. До того ж, в цьому дослідженні вдалося підібрати найбільш чутливі SSR-локуси для молекулярно-генетичного аналізу *V. album*, а саме: *Vi-13*, *Vi-71* та *Vi-88*.

**Дотримання етичних стандартів.** Жодна тварина/людина не використовувалася в експериментах, які є основою цього дослідження.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Робота виконана в рамках відомчої тематики НАН України «Популяційна біологія і генетика *Viscum album* L. в Україні» (2018–22 рр.), номер держреєстрації 0118U00-4067.

#### INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION OF WHITE MISTLETOE (*VISCUM ALBUM* L.) USING INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF β-TUBULIN GENES AND SSR-ANALYSIS

Yu. O. Bilonozhko, A. M. Rabokon, A. S. Postovaitova, L. O. Kalafat, S. N. Privalikhin, A. E. Demkovych, Ya. B. Blume, Ya. V. Pirko

Institute of Food Biotechnology and Genomics, of NAS of Ukraine, Osypovskoho str., 2A, Kyiv, 04123, Ukraine

E-mail: tkacheva\_ua@ukr.net

Based on the analysis of the polymorphism of the length of the first intron of the β-tubulin genes, the difference between two subspecies of mistletoe (*V. album* spp. *austriacum* (Wiesb.) and *V. album* ssp. *album* L.) was



shown. The possibility of using the TBP analysis to determine the sex of mistletoe plants is also shown. It was possible to isolate individual genotypes of white mistletoe based on the results of the SSR analysis. When assessing the effectiveness of using two types of DNA markers, it was shown that TBP analysis is advisable to differentiate between different subspecies of mistletoe, and SSR analysis is used to study genotypic variability within a particular subspecies.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ahmed Z, Dutt HC. (2015) Restriction of *Viscum album* to few phorophytes in a habitat with diverse type of tree species. *Austin. J. Plant. Biol.* **1**(2):101–5.
- Barbu CO. (2012) Impact of white mistletoe (*Viscum album* ssp. *abietis*) infection on needles and crown morphology of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Not. Bot. Horti. Agrobi.* **40**(2):152–8. doi:10.15835/nbha4027906.
- Bardini M, Lee D, Donini P et al. (2004) Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome* **47**:281–91. doi: 10.1139/g03-132.
- Barney CW, Hawksworth FG, Geils BW et al. (1998) Host of *Viscum album*. *Eur. J. Forest. Pathol.* **28**:187–208. doi: 10.1111/j.1439-0329.1998.tb01249.x.
- Bilgili E, Kadir Coskuner A, Baysal I. (2020) The distribution of pine mistletoe (*Viscum album* ssp. *austriacum*) in Scots pine (*Pinus sylvestris*) forests: from stand to tree level. *Scand. J. Forest Res.* **35**(1–2):20–8. doi: 10.1080/02827581.2020.1729402.
- Bilonozhko YuO, Ponomarenko LO, Rabokon AM et al. (2019) Distribution of mistletoe (*Viscum album* L.), which parasitizes different woody plants species, in Kyiv and its genetic characteristics. *Factors Experim. Evol. Organisms.* **25**:106–10 (in Ukrainian). doi: 10.7124/FEEO.v25.1148.
- Bohling N, Greuter W, Raus T et al. (2002) Notes on the Cretan mistletoe, *Viscum album* subsp. *creticum* subsp. *nova* (Loranthaceae/Viscaceae). *Israel. J. Plant Sci.* **50**:77–84. doi: 10.1560/RRJ4-HU15-8BFM-WAUK.
- Braglia L, Gavazzi F, Giovannini A et al. (2014) TBP-assisted species and hybrid identification in the genus *Passiflora*. *Mol. Breed.* **33**(1):209–19. doi:10.1007/s11032-013-9945-6.
- Breviario D, Baird WV, Sangoi S et al. (2007) High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined  $\beta$ -tubulin introns. *Mol. Breed.* **20**(3):249–59. doi:10.1007/s11032-007-9087-9.
- Galasso I, Manca A, Braglia L et al. (2011) h-TBP: an approach based on intron-length polymorphism for the rapid isolation and characterization of the multiple members of the  $\beta$ -tubulin gene family in *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Mol. Breed.* **28**:635–45. doi:10.1007/s11032-010-9515-0.
- Galkin SI, Dragan NV, Doyko NM et al. (2017) Mistletoe in the relations system of “host-parasite”. *Plant Introduction.* **3**:71–8 (in Ukrainian). doi: 10.5281/zenodo.2325002.
- Green MR, Sambrook J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4<sup>th</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 1890
- Hillis DM, Bull JJ. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biol.* **42**:182–92.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S et al. (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica.* **177**(3):309–34. doi:10.1007/s10681-010-0286-9.
- Kartoolinejad D, Hosseini SM, Mirnia SK et al. (2007) The relationship among infection intensity of *Viscum album* with some ecological parameters of host trees. *Int. J. Environ. Res.* **1**(2):143–9.
- Kim BY, Park HS, Kim S et al. (2017) Development of microsatellite markers for *Viscum coloratum* (Santalaceae) and their application to wild populations. *Appl. Plant Sci.* **5**(1). doi: 10.3732/apps.1600102.
- Kim ChS, Kim SY, Sun BY et al. (2013) A review of the taxonomic and ecological characteristics of Korean mistletoe types (*Viscum*, *Korthalsella*, *Loranthus* and *Taxillus*). *Korean. J. Pl. Taxon.* **43**(2):81–9. doi: 10.11110/kjpt.2013.43.2.81.
- Kolodziejek J, Patykowski J, Kolodziejek R. (2013) Distribution, frequency and host patterns of European mistletoe (*Viscum album* subsp. *album*) in the major city of Lodz. *Biologia.* **68**(1):55–64. doi: 10.2478/s11756-012-0128-4.
- Krasnylenko Y, Sosnovsky Y, Atamas N et al. (2020) The European mistletoe (*Viscum album* L.): distribution, host range, biotic interactions, and management worldwide with special emphasis on Ukraine. *Botany.* **98**(9). doi: 10.1139/cjb-2020-0037.
- Mejnartowicz L. (2006) Relationship and genetic diversity of mistletoe (*Viscum album* L.) subspecies. *Acta Soc. Bot. Polon.* **75**(1):39–49. doi: 10.5586/asbp.2006.007.
- Milewicz M, Sawicki J. (2013) Sex-linked markers in dioecious plants. *Plant Omics.* **6**(2):144–9.
- Nei M, Li WH. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:5269–73.
- Pannell JR (2017) Plant sex determination. *Curr. Biol.* **27**(5):191–7. doi: 10.1016/j.cub.2017.01.052.
- Pavlicek A, Hrda S, Flegr J. (1999) FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife

- analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biol.* **45**:97–9.
- Rabokon AN, Pirko YaV, Demkovych AYe et al. (2018) Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of  $\beta$ -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.* **52**(1):3–15. doi: 10.3103/S0095452718010115.
- Rabokon AN, Pirko Ya, Demkovych A et al. (2015) Intron length polymorphism of beta-tubulin genes as an effective instrument for plant genotyping. *Mol. Appl. Genet.* (Minsk). **19**:35–44. (in Russian). doi: 10.7124/FEEO.v22.945.
- Rabokon A, Demkovich A, Sozinov A et al. (2019) Intron length polymorphism of  $\beta$ -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. *Cell Biol. Int.* **43**(9):1031–9. doi: 10.1002/cbin.10886.
- Raftoyannis Y, Radoglou K, Bredemeier M. (2015) Effects of mistletoe infestation on the decline and mortality of *Abies cephalonica* in Greece. *Ann. For. Res.* **58**(1):55–65. doi: 10.15287/afr.2015.347.
- Sanguesa-Barreda G, Linares JC, Camarero JJ. (2013) Drought and mistletoe reduce growth and water-use efficiency of Scots pine. *Forest Ecol. Managem.* **296**:64–73. doi: 10.1016/j.foreco.2013.01.028.
- Schaller G, Urech K, Grazi G et al. (1998) Viscotoxin composition of the three european subspecies of *Viscum album*. *Planta Med.* **64**:677–8.
- Schink M, Mechelke F. (1989) Sex-correlated differences in the protein pattern of *Viscum album* L. revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *Naturwissenschaften.* **76**:29–30.
- Tsopelas P, Angelopoulos A, Economou A et al. (2004) Mistletoe (*Viscum album*) in the fir forest of Mount Parnis, Greece. *Forest Ecol. Managem.* **202**:59–65. doi: 10.1016/j.foreco.2004.06.032.
- Vieira ML, Santini L, Diniz AL et al. (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* **9**(3):312–28. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
- Wei X, Guo H, Che P et al. (2019) The complete chloroplast genome sequence of *Viscum coloratum* (Viscaceae), a semiparasitic medicinal plant. *Mitochondr. DNA.* **4**(2):2904–5. doi: 10.1080/23802359.2019.1660923.
- Zhou W, Wang Y, Zhang G et al. (2018) Molecular sex identification in dioecious *Hippophae rhamnoides* L. via RAPD and SCAR markers. *Molecules.* **23**(5):1048. doi: 10.3390/molecules23051048.
- Zuber D. (2004) Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora.* **199**:181–203.
- Zuber D, Widmer A. (2000) Genetic evidence for host specificity in the hemi-parasitic *Viscum album* L. (Viscaceae). *Mol. Ecol.* **9**:1069–73.
- Zuber D, Widmer A. (2009) Phylogeography and host race differentiation in the European mistletoe (*Viscum album* L.). *Mol. Ecol.* **18**:1946–62. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04168.x.

Надійшла в редакцію 07.08.20  
Після доопрацювання 08.09.20  
Прийнята до друку 18.01.21