

УДК 633.853.494:574.472

DOI <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2023.130.14>

ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ РІПАКУ (*BRASSICA NAPUS L.*) ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СУЧАСНИХ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ

Костенко А.В. – науковий співробітник лабораторії молекулярно-генетичного аналізу,

Український інститут експертизи сортів рослин

Піскова О.В. – старший науковий співробітник лабораторії молекулярно-генетичного аналізу,

Український інститут експертизи сортів рослин

Шляхтун І.С. – науковий співробітник лабораторії молекулярно-генетичного аналізу,

Український інститут експертизи сортів рослин

Гурська В.М. – науковий співробітник лабораторії молекулярно-генетичного аналізу,

Український інститут експертизи сортів рослин

Присяжнюк Л.М. – к.с.-г.н., старший дослідник, заступник директора з наукової роботи,

Український інститут експертизи сортів рослин

В статті наведені результати досліджень біологічного різноманіття ріпаку озимого за SSR маркерами. Сучасні методи ДНК аналізу, зокрема ПЛР аналіз, дозволяють визначити внутрішньовидову мінливість, що робить можливим класифікацію сортів, ліній і форм у залежності від їхніх генетичних взаємовідносин. На сьогоднішній день актуальним є вивчення генетичного різноманіття сучасних гібридів ріпаку озимого на основі технології генотипування із використанням SSR аналізу. Метою роботи є вивчення генетичного різноманіття сучасних генотипів ріпаку озимого за SSR маркерами.

На основі аналізу ДНК визначені відмінні та подібні гібриди ріпаку озимого, оцінені генетичні дистанції між ними. Встановлено, що за 8 SSR маркерами у досліджуваних гібридів ідентифіковано від 3 (маркер Na12-E02) до 8 алелів (маркер Na10-B07). Найбільшою частотою характеризувався алель розміром 130 п.н., який виявлено за маркером Na12-E02. В результаті аналізу ідентифіковано унікальні для досліджуваних гібридів алелі: 148, 130, 220 та 108 п.н., які виявлено за маркерами Na10-B07, Ra3-H09, Na12-A02 та Na12-E02 відповідно. На основі розподілу частот отриманих алелів за досліджуваними SSR маркерами, встановлено, що найбільш поліморфним виявився маркер Na10-B11, значення PIC становить 0,77. Найменше значення PIC отримано для маркера F1TO-136 – 0,53. За результатами кластерного аналізу досліджуваних гібридів ріпаку озимого отримано 5 кластерів. Найбільш подібними виявились гібриди із значенням генетичних дистанцій 2,45. Високий ступінь подібності продемонстрували також гібриди, значення генетичних дистанцій між якими становить 2,65. Два із дванадцяти гібридів не увійшли в жоден із сформованих кластерів. Гібриди, значення генетичних дистанцій між якими становило 5,74 виявились найбільш відмінними.

Таким чином, високі значення PIC, який в середньому становив 0,67 свідчать про те, що ідентифіковані алелі рівномірно представлені серед досліджуваних гібридів. За результатами кластеризації на основі 8 SSR маркерів отримано розподіл гібридів відповідно до їх генетичної близькості, що показує можливість застосування маркерної системи для встановлення їх відмінності та визначення найбільш подібних гібридів.

Ключові слова: ріпак озимий, генетичне різноманіття, ДНК маркери, кластерний аналіз, генетичні дистанції

Kostenko A.V., Piskova O.V., Shliakhtun I.S., Hurska V.M., Prysiazhniuk L.M.
The biological diversity estimation of rapeseed based on current analytical methods

The article is presented results of study of winter rapeseed biological diversity by SSR markers. The current DNA analysis methods, particularly, PCR analysis, allow to reveal intraspecies diversity, which make possible to classify varieties, lines and breeding forms depending on their relationships. Now the study genetic diversity current winter rapeseed hybrids based on genotyping technology with SSR analysis is relevant. The purpose of this study is investigation of genetic diversity current winter rapeseeds hybrids by SSR markers.

The distinct and similar winter rapeseeds hybrids were identified by DNA analysis and genetic distances between them were estimated. It was determined that from three (by Na12-E02 marker) to eight (by Na10-B07 marker) alleles were identified in studied eight SSR markers. The allele of size 130 bp, which was identified Na12-E02 marker, was characterized with the highest frequency. As result of analysis the unique allele were revealed: 148, 130, 220 and 108 bp, which were determined by Na10-B07, Ra3-H09, Na12-A02 and Na12-E02 markers respectively. Based on obtained alleles distribution by studied SSR markers, it was found that Na10-B11 marker was turned to be the most polymorphic, PIC value was 0.77. The lowest PIC was obtained for FITO-136 marker – 0.53. As result of cluster analysis of studied winter rapeseed hybrids five clusters were formed. The most similar hybrids were hybrids with genetic distances 2.45. The rapeseed hybrids with genetic distances between them 2.65 demonstrated the high rate of similarity. Two from twelve studies hybrids were not included in any formed cluster. The hybrids which were characterized by genetic distances 5.74, were the most distinct.

Therefore, the high values of PIC, which was an average 0.67, evidenced that identified alleles are equally represented among studied hybrids. As result of cluster analysis based on eight SSR markers the hybrids distribution was obtained according to their genetic similarity. That indicates the ability of used marker set to determine the hybrid distinctness and identify the most similar hybrids.

Key words: winter rapeseed, genetic diversity, DNA markers, cluster analysis, genetic distances

Постановка проблеми. Генетичне різноманіття є основою для еволюційних змін та виступає критичним чинником для адаптації видів до зміни клімату, факторів навколишнього середовища та біотичних взаємодій [1, с. 1]. На сьогоднішній день технології виявлення молекулярних або ДНК маркерів стають важливим стандартом селекції рослин і отримують все більш широке застосування в усьому світі. Їх використання дозволяє точно і швидко виявляти генетичну різноманітність популяцій, підвидів, видів, і навіть диференціювати більш високі таксономічні ранги – роди та родини, а також робить можливим створення генетичних формул сортів (генетичних профілів), та ефективно, з точки зору витрат, визначати господарсько-цінні ознаки ще на початковому етапі селекції на рівні ДНК [2, с. 16]. Такі ознаки якості, як надійність, інформативність, достовірність, відтворюваність визначають значну перевагу ДНК маркерів над іншими методами дослідження із застосуванням морфологічних та біохімічних маркерів. Також однією з переваг молекулярного методу аналізу є незалежність від факторів зовнішнього середовища [3, с. 287]. Вдосконалення молекулярних маркерів акцентовано на швидкість, простоту та універсальність в використанні, а також на економічність.

Ріпак (*Brassica napus* L.) є однією із провідних технічних високоврожайних олійних та кормових культур, перспективних для експорту на міжнародні ринки. Селекційні програми озимого ріпаку спрямовані на створення високоврожайних, крупнонасінних сортів та гібридів різних типів за вмістом і складом олії, широкою пластичністю до метеорологічних й агроекологічних чинників [4, с. 17; 5, с. 588].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. За даними вчених [6, с. 1420] використання двох комбінацій AFLP (Amplified fragment length polymorphism) праймерів дозволило ідентифікувати 83 сорти ріпаку. Факторіальний та дисперсійний аналіз показав диференціацію сортів за типом розвитку, селекційними компаніями та походженням. Також була доведена ефективність застосування AFLP маркерів

для виявлення нетипових рослин серед інбредних ліній ріпаку. При чому отримані дані були співставні із результатами польових випробувань. На сьогодні розроблено мультиплексну ПЛП (полімеразну ланцюгову реакцію) на основі SSR (Simple Sequence Repeats) маркерів, яка виявилась ефективною для визначення відмінності та однорідності сортів ріпаку. Факторіальний аналіз отриманих даних дозволив згрупувати досліджувані сорти відповідно до їх типу розвитку та напряму використання. Поліморфізм спостерігався всередині сортів та в межах локуса SSR. Не зважаючи на те, що між SSR маркерами та морфологічними ознаками не виявлено кореляційних зв'язків, застосування SSR вважається ефективним для оцінки поліморфізму сортів ріпаку [7, с. 1098; 8, с. 3].

Методи аналізу ДНК ріпаку дозволяють оцінити генетичну різноманітність, класифікувати вихідний селекційний матеріал застосовуючи скринінг великої кількості зразків, маркувати гени господарсько-цінних ознак, нові гени, інтрегресовані із диких споріднених видів, а також тестувати генетичну однорідність інбредних ліній і рівень гібридності партії насіння F1 [9, с. 2]. Зважаючи на фенотипову мінливість сортів, яка напряму залежить від факторів навколишнього середовища та агротехнічних заходів, оцінки сортів за морфологічними ознаками часто буває недостатньо для того, щоб ідентифікувати селекційний матеріал та отримані сорти. Досягнення молекулярно-генетичного аналізу дозволяють вивчати генетичну мінливість на рівні ДНК, що значно підвищує точність оцінки генетичного різноманіття та ідентифікації сортів [10, с. 103].

Постановка завдання. На даний час недостатньо досліджено генетичне різноманіття сучасних сортів ріпаку, які вирощуються в Україні за мікросателітними локусами, що у світовій практиці широко використовуються як доповнення до традиційних методів оцінки сортів. Таким чином, метою роботи є вивчення генетичного різноманіття сучасних генотипів ріпаку озимого за SSR маркерами.

Виклад основного матеріалу. Матеріалом для дослідження були 12 гібридів ріпаку озимого, які внесені в Державний реєстр сортів придатних до поширення в Україні. Для аналізу гібридів та батьківських компонентів ріпаку озимого ДНК виділяли із п'ятиденних проростків. Застосовували СТАВ-метод, який включає наступні етапи: 1) лізис клітин; 2) осадження білків; 3) осадження ДНК з розчину спиртом; 4) розчинення осадку в буферному розчині. В якості лізуючого агенту виступає СТАВ, який при певній концентрації солі (NaCl) утворює нерозчинний комплекс з нуклеїновими кислотами, осадження білків здійснюється за допомогою хлороформу, осадження ДНК – ізопропілового спирту [11, с. 135; 12, с. 116].

Для проведення ПЛП аналіз ріпаку озимого застосовували 8 SSR маркерів [13, с. 2]. Послідовності та характеристики праймерів наведені в таблиці 1.

ПЛП проводили на ампліфікаторі SureCycle G8800A (Agilent, США). Реакційна суміш в об'ємі 20 мкл містила: 100 нг сумарної рослинної ДНК, 1×буфер (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,01% Triton X-100; 25 mM MgCl₂); 200 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ), 0,2 мкМ кожного з праймерів та 1 одиницю Taq-полімерази. Параметри ампліфікації для досліджених маркерів ріпаку становили: початкова денатурація – 94°C – 5 хв., 35 циклів: денатурація – 94°C – 45 с, 53°C (49°C для FITO-063) – 45 с, 72°C – 1 хв., заключна елонгація – 72°C – 10 хв.

Продукти реакції ампліфікації візуалізували методом електрофорезу в 2% агарозному гелі у 0,5×ТБЕ (трис-боратний буферний розчин) за загальноприйнятою методикою з бромистим етидієм. Електрофорез проводили протягом 1,5 год. за

Таблиця 1

Характеристика SSR маркерів для оцінки поліморфізму ріпаку озимого

SSR	Нуклеотидні послідовності праймерів 5'→3'	Мотив	Очікуваний розмір алелів, п.н.
FITO-063	*F – GTTCAGTTCCCAGATTCCTAA **R – TTTCTCTTCCTTCTCTCTTC	(CCG)15	267–700
FITO-136	F – CCTCCTCCTCAGACTTACACT R – TCACATCCACCATAACCTTT	(CTC)12	130–133
Na10-B07	F – GCCTTAGATTAGATGGTCGCC R – ACTTCAGCTCCGATTTGCC	(CT)29	174–213
Na10-B11	F – TTТААСААСААССGTCACGC R – CTCCTCCTCCATCAATCTGC	(CT)29	104–161
Na12-E02	F – TTGAAGTAGTTGGAGTAATTGGA R – CAGCAGCCACAACCTTACG	(TTG)13	59–97
Na14-H12	F – CACATTGGCACGTATCCATC R – GGCTGATCGAACACAAATAAG	(AC)16	156–188
Na12-A02	F – AGCCTTGTTGCTTTTCAACG R – AGTGAATCGATGATCTCGCC	(CT)16	161–202
Ra3-H09	F – GTGGTAACGACGGTCCATTC R – ACCACGACGAAGACTCATCC	(TGG)3	119–129

напруженості електричного поля 5 В/см [11, с. 144]. Розмір отриманих фрагментів визначали відносно маркера молекулярної маси з використанням комп'ютерної програми TotalLab T1120 (trial version). PIC (polymorphism information content) розраховували за частотами отриманих алелів за кожним маркером [14, с. 115]. Розмір отриманих фрагментів визначали відносно маркера молекулярної маси з використанням комп'ютерної програми TotalLab T1120 (trial version). Генетичні дистанції за Неєм та Лі між досліджуваними лініями ріпаку озимого та групування у кластери за SSR маркерами проводили за допомогою методу незваженого попарного середнього (Unweighted pair group average) з використанням комп'ютерної програми STATISTICA 12.0 (Trial version) [15, с. 8].

В результаті ПЛП аналізу отримано амплікони очікуваних розмірів відповідно до досліджуваних SSR маркерів. Визначено, що внутрішньолінійний поліморфізм характерний для всіх маркерів, окрім FITO-063, за яким ідентифіковано одну алель на локус, за маркерами Na12-A02, FITO-136 та Na10-B07 у досліджуваних сортів ріпаку виявлено до 3 алелів на один локус, за маркерами Ra3-H09, Na10-B11, Na12-E02 та Na14-H12 – до 2 алелів. За маркером Na10-B07 ідентифіковано найбільшу кількість алелів – 8 алелів, найменшу кількість алелів виявлено за маркером Na12-E02 – 3 алеля. В середньому на один локус припадає 5 алелів. Відповідно до отриманих даних, найбільшу частоту мав алель розміром 130 п.н., який виявлено за маркером Na12-E02. Його ідентифіковано у всіх досліджуваних гібридів ріпаку озимого. Алелі, розміром 115 та 140 п.н., виявлені за маркерами Ra3-H09 та FITO-136 відповідно також характеризувались високою частотою – 0,50. Унікальними для досліджуваних гібридів виявились алелі розмірами 148, 130, 220 та 108 п.н., які ідентифіковані за маркерами Na10-B07, Ra3-H09, Na12-A02 та Na12-E02 відповідно (табл. 2).

Таблиця 2
Кількість, розмір та частота алелів, ідентифікованих за SSR маркерами

SSR	Розміри алелів, п.н.	Кількість алелів, шт.	Частоти алелів
FITO-063	254; 264; 270; 282	4	0,17–0,33
FITO-136	140; 165; 175; 186	4	0,13–0,50
Na10-B07	116; 124; 134; 138; 145; 148; 155; 163	8	0,04–0,33
Na10-B11	148; 157; 204; 208; 220	5	0,08–0,38
Na12-E02	97; 108; 130	3	0,04–0,58
Na14-H12	210; 217; 233; 244; 249	5	0,17–0,38
Na12-A02	157; 164; 174; 194; 208; 220	6	0,04–0,29
Ra3-H09	105; 111; 115; 123; 130	5	0,04–0,50

РІС є одним з критеріїв, що характеризує ступінь ідентифікованої мінливості у популяції та відповідно спроможність маркера визначати різницю між генотипами. В результаті розрахунку індекса поліморфності локусу (РІС) для кожного маркера, найбільш поліморфним виявився маркер Na10-B11, РІС становить 0,77. Найменше значення РІС отримано для маркера FITO-136 – 0,53. Високі значення РІС тож були отримані для маркерів Na14-H12, FITO-063, та Na12-A02 (0,76, 0,74 та 0,73 відповідно). Для інших SSR маркерів РІС становить від 0,60 до 0,65.

На основі розрахованих генетичних дистанцій за матрицею наявності/відсутності алелів у гібридів ріпаку озимого в результаті кластеризації отримано 5 кластерів (рис. 1).

Відповідно до отриманого розподілу, найбільш подібними виявились гібриди 11 та 12, що сформували один кластер та значення генетичних дистанцій між якими

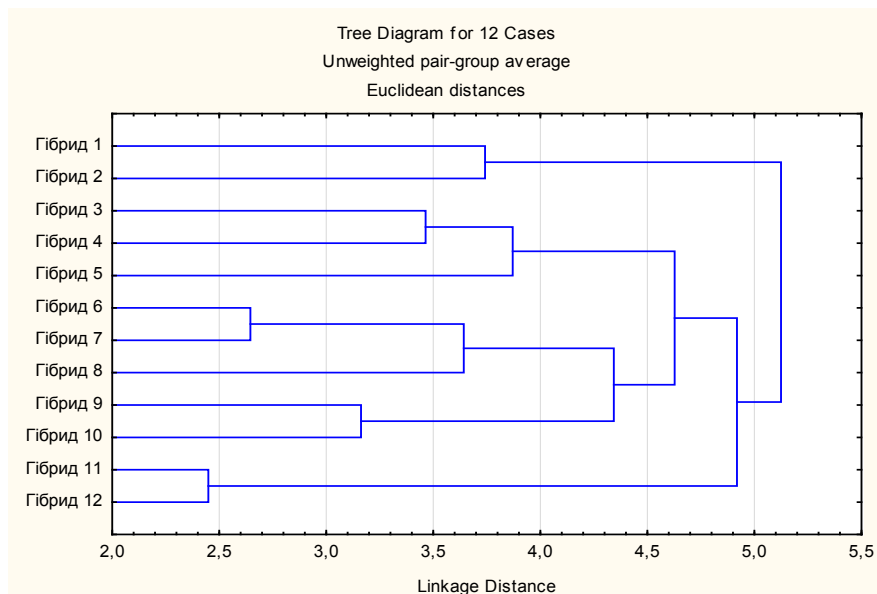


Рис. 1. Кластерний аналіз гібридів ріпаку озимого на основі SSR маркерів

становило 2,45. Достатньо подібними за досліджуваними маркерами виявились гібриди 6 та 7, значення генетичних дистанцій між якими становило 2,65. Гібриди ріпаку, значення генетичних дистанцій між якими становило 3,16 увійшли в один кластер (гібриди 9 та 10) (табл. 3).

Таблиця 3

**Генетичні дистанції між гібридами ріпаку озимого,
розраховані на основі ідентифікованих алелів за SSR маркерами**

	Гібрид 2	Гібрид 3	Гібрид 4	Гібрид 5	Гібрид 6	Гібрид 7	Гібрид 8	Гібрид 9	Гібрид 10	Гібрид 11	Гібрид 12
Гібрид 1	3,74	4,90	5,29	5,29	4,69	4,80	4,80	4,69	5,29	4,90	4,90
Гібрид 2		4,24	5,10	5,10	5,29	5,39	5,74	5,83	5,48	5,29	5,48
Гібрид 3			3,46	4,00	4,00	4,58	5,39	5,10	5,29	5,29	5,29
Гібрид 4				3,74	4,47	5,00	4,58	4,90	4,90	5,10	4,90
Гібрид 5					4,24	4,36	4,36	4,24	4,00	5,10	5,10
Гібрид 6						2,65	4,12	4,00	4,90	4,47	4,47
Гібрид 7							3,16	3,87	4,58	5,00	5,00
Гібрид 8								4,12	4,58	5,00	5,00
Гібрид 9									3,16	4,69	4,69
Гібрид 10										4,69	4,90
Гібрид 11											2,45

Однак гібриди 7 та 8, значення генетичних дистанцій між якими становило також 3,16, знаходяться в різних кластерах. Слід зауважити, що гібрид 8 не увійшов у жоден із сформованих кластерів, а знаходиться в прилеглому кластері, який утворюють гібриди 6 та 7. В прилеглому до кластеру, сформованого гібридами 3 та 4 знаходиться гібрид 5 із значеннями генетичних дистанцій 4,00 та 3,74 відповідно. Найбільш подібним гібрид виявився до гібриду 4 із значенням генетичних дистанцій між ними 3,74.

Найбільш відмінними виявились гібриди 2 та 8, значення генетичних дистанцій між ними становило 5,74. Слід зазначити, що достатньо відмінними виявились також гібриди 2 та 9 із значеннями генетичних дистанцій 5,83.

Висновки і пропозиції. Високі значення індексу поліморфності локусу, який в середньому становив 0,67 вказують на те, що ідентифіковані алелі рівномірно представлені у даній вибірці гібридів ріпаку озимого. Отримані унікальні алелі, які характерні тільки для певних гібридів дають змогу використовувати їх як маркерні для ідентифікації досліджуваних гібридів. Отже, визначено, що досліджувані гібриди ріпаку мають відмінності, визначені за 8 SSR маркерами, що свідчить про можливість застосування маркерної системи для встановлення їх відмінності та визначення найбільш подібних гібридів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Hoban S., Bruford M., Jackson J. D. U. та ін. Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biological Conservation*. 2020. Vol. 248. P. 108654. doi: 10.1016/j.biocon.2020.108654
2. Сліщук Г. І., Кожухова Н. Е., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетичний аналіз регіонів мітохондріону, асоційованих з цитоплазматичною чоловічою стерильністю, у кукурудзи. *Цитология и генетика*. 2011. № 3. С. 15–19.
3. Hossain F., Muthusamy V., Pandey N. et al. Marker-assisted introgression of opaque2 allele for rapid conversion of elite hybrids into quality protein maize. *Journal of genetics*. 2018. № 1. P. 287–298. doi: 10.1007/s12041-018-0914-z.
4. Ситнік І.Д., Кляченко О.Л. *Brassica napus* L. в культурі *in vitro*. *Аграрна наука і освіта*. 2002. № 3–4. С. 15–18.
5. Liu S., Raman H., Xiang Y. et al. De novo design of future rapeseed crops: Challenges and opportunities. *The Crop Journal*. 2022. Vol. 10. № 3. P. 587–596. doi: 10.1016/j.cj.2022.05.003
6. Lombard V., Baril C. P., Dubreuil P. et al. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: consequences for varietal registration. *Crop Sci*. 2000. Vol. 40. P. 1417–1425. doi: 10.2135/cropsci2000.4051417x.
7. Tommasini L., Batley J., Arnold G. M. et al. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor Appl Genet*. 2003. Vol. 106. P. 1091–1101. doi: 10.1007/s00122-002-1125-8
8. Zhu J., Zhang J., Jiang M. et al. Development of genome-wide SSR markers in rapeseed by next generation sequencing. *Gene*. 2021. Vol. 798. P. 145798. doi: 10.1016/j.gene.2021.145798
9. Chen R., Shimono A., Aono M. et al. Genetic diversity and population structure of feral rapeseed (*Brassica napus* L.) in Japan. *PLoS One*. 2020. Vol. 15. № 1. P. e0227990. doi: 10.1371/journal.pone.0227990
10. Geng J., Javed N., McVetty P. B. E. et al. An integrated genetic map for *Brassica napus* derived from double haploid and recombinant inbred populations. *Hereditary Genetics*. 2012. Vol. 1. № 1. P. 103.
11. Методика проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні. Методи визначення показників якості продукції рослинництва / під ред. Ткачик С. О. 2020. 158 с.
12. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol*. 2019. Vol. 36. № 2. P. 116–117. doi: 10.4103/JOC.JOC_110_18.
13. Li L., Wanapu C., Huang X. et al. Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of *Brassica napus* hybrids. *Journal of Agricultural Science*. 2011. Vol. 101. № 3. doi: 10.5539/jas.v3n3p101
14. Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н., Чеботарь С. В. Генетический полиморфизм растений, детектируемый ПЦР с произвольными праймерами. *Цитология и генетика*. 1994. Т. 28. № 6. С. 113–129.
15. Мельник А. В. Використання кластерного аналізу за підбору сортів і гібридів ріпаку ярого для вирощування в лівобережному Лісостепу України. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2013. № 4. С. 6–11.