

## ОЦІНКА РІЗНОМАНІТНОСТІ І ПЕРСПЕКТИВ СЕЛЕКЦІЇ УКРАЇНСЬКИХ ГЕНОТИПІВ ЯРОГО РИЖІЮ

Р.Я. БЛЮМ<sup>1,2</sup>, А.М. РАБОКОНЬ<sup>1</sup>, А.С. ПОСТОВОЙТОВА<sup>1</sup>, А.Є. ДЕМКОВИЧ<sup>1</sup>, Я.В. ПІРКО<sup>1</sup>, А.І. ЄМЕЦЬ<sup>1</sup>, Д.Б. РАХМЕТОВ<sup>3</sup>, Я.Б. БЛЮМ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

<sup>2</sup> ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна, 03022, м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2

<sup>3</sup> Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Україна, 01014, м. Київ, вул. Тимірязєвська, 1

E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net; blume.rostislav@gmail.com

*Рижій посівний (Camelina sativa) є на сьогодні однією з найперспективніших олійних культур для використання як біопаливної сировини. Вважається, що цей вид походить зі східноєвропейського регіону, де він виник внаслідок поліплоїдизації або схрещування диких представників роду Camelina. Результатом даної події є низький рівень генетичного різноманіття рижію, що накладає обмеження на селекційне удосконалення цієї культури. Незважаючи на ряд досліджень з вивчення генетичного поліморфізму існуючих сортів рижію, оцінка генотипів українського походження майже не здійснювалася, хоча й даний регіон відноситься до центру походження C. sativa. Нами вперше проведено комплексну оцінку генетичного різноманіття сортів та сортів рижію української селекції, а також проаналізовано морфометричні, врожайні параметри та особливості жирнокислотного складу олії насіння. За результатами хроматографічного аналізу були виділено два генотипи рижію (ФЕОРЖЯФ-2 та ФЕОРЖЯФД), ліпиди насіння яких більшою мірою складаються з жирних довжиною менше С18. Також встановлено генетичні дистанції між вивченими генотипами за допомогою поліморфізму ISSR, SSR та ILP (актин та β-тубулін) маркерів. Отримані дані співставлено з показниками продуктивності та морфометричними параметрами, що дозволило виділити найбільш перспективні пари генотипів рижію для схрещування. Так, схрещування ФЕОРЖЯФ-2 та ФЕОРЖЯФД з сортами Міраж та Перемога в різних комбінаціях може теоретично забезпечити прояв гетерозису в першому поколінні. Подібний підхід для аналізу селекційних вибірок та генетичних ресурсів рижію посівного може стати потужним інструментом для вдосконалення даної олійної культури.*

**Ключові слова:** Brassicaceae, олійні культури, селекція, рижій посівний, *Camelina sativa*, жирні кислоти, авіаційне біопаливо, гетерозис, молекулярні маркери, маркер-асоційована селекція.

**Вступ.** На сьогодні рослини з родини Хрестоцвітних (Brassicaceae) є одними з найважливіших олійних культур в світі, перш за все такі види, як ріпак (*Brassica napus*), суріпиця (*B. rapa* ssp. *oleifera*, syn. *B. campestris*), гірчиця сарептська (*B. juncea*) та інші [1–3]. Однак останнім часом все більше і більше видів розглядаються як перспективні джерела високоякісної олії для виробництва дизельного та авіаційного біопалива. Як найбільш перспективні кандидати розглядаються гірчиця абіссинська (*B. carinata*) [4–6], а також два види, що раніше вважалися бур'янами – рижій посівний (*Camelina sativa*) [7, 8] та талабан польовий (*Thlaspi arvense*) [9, 10].

Рижій привернув увагу вчених, перш за все, завдяки його високий адаптаційній здатності до широкого спектру біотичних та абіотичних видів стресу [11]. Рижій добре пристосований для вирощування в умовах помірного клімату, що може бути пов'язане з його походженням зі Східної Європи. Дана рослина була на цій території широко розповсюдженою олійною культурою, доки на початку 20-го століття не була витіснила соняшником та соєю [12–15]. З поміж інших перспективних олійних культур, як *B. carinata*, рижій вигідно вирізняється своєю високою адаптаційною здатністю. Наприклад, насіння *C. sativa* здатне проростати +1 °С, а сходи здатні витримувати заморозки від –8 до –10 °С [13, 14, 16]. Більше того, рижій здатних рости на збіднених ґрунтах, а також має резистентність до таких грибкових патогенів, як *Leptosphaeria maculans* та *Alternaria brassicae* [15].

Рижій вважається однією із найперспективніших олійних культур для вирощування як біопаливної рослини в умовах Європи та Північної Америки. Перспективи використання різних представників Хрестоцвітних для виробни-

©Р.Я. БЛЮМ, А.М. РАБОКОНЬ,  
А.С. ПОСТОВОЙТОВА, А.Є. ДЕМКОВИЧ,  
Я.В. ПІРКО, А.І. ЄМЕЦЬ, Д.Б. РАХМЕТОВ,  
Я.Б. БЛЮМ, 2020

цтва біодизелю достатньо широко обговорювалася останнім часом [17–20], однак найбільш привабливою олійною культурою на сьогодні вважається власне рижій [21]. Саме на олії рижію було показано можливість отримання авіаційного біопалива [22, 23], а також саме ця культура була обрана Міжнародною Асоціацією По-вітряного Транспорту (IATA) як кандидат для виробництва біопалива для літаків [24].

Також рижій посівний має широкий потенціал як для селекційного, так і біотехнологічного удосконалення. *C. sativa* є одним з найближчих родичів *Arabidopsis thaliana*, який є добре вивченим модельним об'єктом. Через це рижій вважають надзвичайно привабливим об'єктом для генетичної інженерії [25] та редагування геному, що, однак, певною мірою лімітується гексаплоїдною структурою його геному [26]. На сьогодні для рижію вже розроблені методи ефективної трансформації та регенерації *in vitro* [25, 27], що суттєво спрощує роботу з ним.

Незважаючи на це, не менш актуальним залишається проблема удосконалення рижію методами класичної селекції [11]. Однак, реалізація даного підходу вимагає оцінки генетичного поліморфізму існуючих сортів рижію у світових колекціях. З цієї метою у 2006 р. за допомогою 157 AFLP-маркерів та трьох SSR-маркерів було вперше побудовано генетичну карту *C. sativa* [28]. Згодом іншими вченими було досліджено генетичне різноманіття рижію за допомогою ряду молекулярних мар-

керів, таких як RAPD, AFLPs, hTBP, SSR та SNP [29–35].

В деяких з цих робіт стверджується про обмежене генетичне різноманіття, а також про поліплоїдність рижію [28, 33, 36]. Сиквенування геному *C. sativa* остаточно підтвердило алогексаплоїдність цієї рослини [37], що може корелювати з обмеженістю генетичного різноманіття. Наразі обговорюється можливість участі 2–3 батьківських видів дикої рижію у формуванні поліплоїдного геному *C. sativa* [38, 39]. Таким чином, хоча кількість досліджених на сьогодні генотипів рижію є достатньо великою [39], вважається, що рівень генетичного різноманіття рижію низький. При цьому варто відзначити, що оцінка генетичних ресурсів *C. sativa* східноєвропейського походження майже не здійснювалася, хоча й даний регіон вважається центром походження цього виду.

В одному з нещодавніх досліджень вивчалися генетичні дистанції між сортами рижію польської та української селекції [40]. Розглянуті в ньому українські сорти відносилися більшою мірою до результатів ще радянської селекційної роботи й не відображають наявні сучасні генетичні ресурси *C. sativa* в Україні. За даними Державного реєстру сортів України (<https://agro.me.gov.ua/ua/file-storage/reyestr-sortiv-roslin-ukrayini>) станом на 2020 р. зареєстровано 9 сортів ярого рижію посівного (табл. 1), 8 сортозразків ще знаходяться на завершальних етапах селекційної роботи в Національному ботанічному саді ім. М.М. Гришка НАН України [41–44].

Таблиця 1. Сорти ярого рижію, зареєстровані в Україні.

Сорт	Рік реєстрації	Установа	Номер заявки
Степовий-1*	1996	Інститут олійних культур НААН України	92097001
Гірський	2000	Івано-Франківський інститут агропромислового виробництва НААН України	97097001
Міраж	2000	Інститут олійних культур НААН України	94097001
Клондайк	2004	Інститут землеробства НААН України	03097001
Престиж	2006	Інститут олійних культур НААН України	05097001
Славутич	2008	Інститут олійних культур НААН України	07097001
Зевс	2009	Інститут олійних культур НААН України	08097001
Перемога	2015	Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України	12097002
Євро-12	2015	Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України	12097001

Примітка. \* Даний сорт є національним стандартом.

В останніх наших роботах було показано можливість використання деяких з цих генотипів рижію як олійної сировини для виробництва високоякісного дизельного біопалива [45]. Раніше нами вже було розпочато оцінку генетичного різноманіття зразків рижію української селекції за допомогою ISSR-маркерів [46], однак отримані результати продемонстрували необхідність залучення нових молекулярних маркерів для поглиблення такого генетичного аналізу. В зв'язку з цим, метою даного дослідження було здійснити комплексну молекулярно-генетичну, біохімічну та морфометричну оцінку наявних генетичних ресурсів *C. sativa* української селекції для оцінки перспектив подальшого удосконалення сортів рижію посівного.

**Матеріали і методи.** *Рослинний матеріал.* Для даного дослідження були використані зразки ярого рижію (*C. sativa* f. *annua*) з колекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України, серед яких 4 сорти (Міраж, Клондайк, Перемога, Євро-12) та 8 сортозразків (ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ і ФЕОРЖЯФЧП).

*Хроматографічний аналіз жирнокислотного складу ліпідів насіння.* У пробірку об'ємом 10 мл додавали 60 мг зразку попередньо екстрагованої олії, отриманої з різних зразків рижію, 4 мл ізооктану та 200 мкл гідроксиду калію, розчиненого у метанолі (2М). Пробірку струшували до отримання прозорого розчину, тобто до повного проходження реакції переетерифікації. Для нейтралізації гідроксиду калію додавали 1 г калій сульфат моногідрату. Після осадження утворених солей верхній шар відбирали та переносили в нові пробірки об'ємом 4 мл. Отримані зразки містили приблизно 15 мг/мл метилових естерів жирних кислот, розчинених в ізооктані.

У подальшому метилові естери жирних кислот були розділені та ідентифіковані шляхом газової хроматографії з полум'яно-іонізаційним детектором (flame ionization detector, FID) за допомогою газового хроматографа GC-MS Agilent 7890B-7697 («Agilent», США), оснащеного капілярною колонкою Zebron ZB-FAME (Phenomenex Inc., США) (60 м × 0,25 мм × 0,20 мкм). Як газ-носій використовувався азот, для під-

тримання FID використовували водень. Температура випарника становила 250 °С, температура колонки – 185 °С. Об'єм ін'єкції становив 1 мкл, а загальна тривалість аналізу одного зразка складала 40 хв. Ідентифікацію розділених жирних кислот здійснювали шляхом порівняння з хроматограмою стандартного розчину жирних кислот (C10–C24, Supelco), отриманої за аналогічних умов. Отримані значення відсоткового розподілу площі піків на хроматограмі були перераховані відносно молекулярної маси кожної жирної кислоти. В результаті були отримані значення вмісту кожної окремої жирної кислоти в % мол.

*Виділення ДНК та умови полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).* Геномна ДНК була виділена з проростків насіння зразків (приблизно по 10 рослин для кожного генотипу) за допомогою методу ЦТАБ (цетил-триметиламонія бромід) [47]. Для аналізу за допомогою SSR-маркерів було виділено ДНК з 7 різних особин кожного генотипу, в той час як для усіх інших аналізів використовувалася геномна ДНК. Якість та кількість ДНК визначали за допомогою електрофорезу в 1,5%-вому агарозному гелі та за допомогою спектрофотометру «Eppendorf». Зразки ДНК зберігали за температури – 20 °С. Для ПЛР використовували 50 нг ДНК кожного із зразків. Кожну ПЛР проводили як мінімум у двократній повторності з використанням негативного контролю, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в мікропробірках на 200 мкл в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США). Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мм кожного дНТФ, 0,5 од. Тақ полімерази («Fermentas», Литва).

*Генотипування зразків за допомогою ISSR-маркерів.* Дослідження генетичного різноманіття згаданих вище зразків рижію ярого було відтворено з використанням ISSR-маркерів за методикою, описаною раніше [46]. Для цього за аналогією до попередньо опублікованого дослідження було використано 7 праймерів (табл. 2), частина з яких вперше були описані як створені на основі мікросателітних послі-

довностей *Triticum aestivum*, але здатних працювати на широкому спектрі видів, включаючи *Chlorella vulgaris* та *C. pyrenoidosa* [48].

Ампліфікацію ДНК з використанням ISSR-маркерів проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (95 °С) – 5 хв, 45 циклів ампліфікації (денатурація при 95 °С – 1 хв, відпал праймерів за оптимальної температури – 1 хв, елонгація при 72 °С – 2 хв), кінцева елонгація при 72 °С – 7 хв, утримання при 15 °С [46]. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5%-вому агарозному гелі з додаванням етидид броміду та в 1-кратному ТВЕ-буфері. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркери (O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use, «Fermentas», Литва). Візуалізацію фрагментів здійснювали в ультрафіолетовому світлі.

Генотипування зразків за допомогою SSR-маркерів. Вивчення поліморфізму алелів мікросателітних послідовностей було здійснено з використанням праймерів, специфічних до 7-ми різних SSR-локусів *C. sativa*, наведених у табл. 3 [31, 33]. Раніше було показано, що розмір ампліфікованих фрагментів даних локусів варіює від 60 до 320 п.н. [40]. Для усіх SSR-маркерів ампліфікацію проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (94 °С) – 5 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація при 94 °С – 30 с, відпал праймерів за оптимальної температури (залежно від праймеру) – 30 с, елонга-

ція при 72 °С – 30 с), кінцева елонгація при 72 °С – 30 хв [33].

Продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу в 6%-вому поліакриламідному гелі за неденатуруючих умов в 1-кратному ТВЕ-буфері [47]. Тривалість розділення ампліфікованих фрагментів – 1,5 год за напруги 350 В. Довжину цільових фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер O'Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder, ready-to-use («Fermentas», Литва). Візуалізацію фрагментів ДНК здійснювали шляхом фарбування нітратом срібла [49].

Генотипування зразків за допомогою методу поліморфізму довжини інтронів β-тубуліну (TBP-аналіз). TBP-аналіз проводили згідно методи-

Таблиця 2. Послідовності ISSR-праймерів, використаних в роботі

Назва праймера	5'→3' послідовність	Очікуваний діапазон розміру фрагментів
ISSR-3 *	(CT) <sub>8</sub> TG	350–2000 п.н.
ISSR-4 *	(CA) <sub>5</sub> GT	300–900 п.н.
ISSR-5 **	(AC) <sub>8</sub> TG	250–1400 п.н.
ISSR-16 *	(AG) <sub>7</sub> GT	150–700 п.н.
ISSR-18 *	(ACTG) <sub>5</sub>	350–2000 п.н.
ISSR-25 **	(AC) <sub>8</sub> CA	450–3000 п.н.
ISSR-62 **	(AG) <sub>26</sub>	250–1000 п.н.

Примітка. \* З попереднього дослідження на *C. sativa* [46], \*\* створені на основі мікросателітів *T. aestivum* [48].

Таблиця 3. Послідовності праймерів до SSR локусів *C. sativa*, використаних в роботі

Назва локусу	Мотив повтору	Пара праймерів 5'→3' послідовність
P3C3	(GA) <sub>31</sub>	F:TTGGCCATTGCTTGGGTGTA R:ACTGGATTCCTGTCCTTGGT
P3H4	(GA) <sub>13</sub>	F:CCAGACAAACACACGAAGCCGAAT R:CTGGGCGTAGGGTTTTAGTCCATT
P4B3	(TC) <sub>5</sub> (TG) <sub>3</sub> (TC) <sub>7</sub> (TA) <sub>2</sub> (TC) <sub>3</sub>	F:ATGGACGACGAGAGGTGTGA R:CGATCTGAGCAGGCTCCATT
P4C2	(CT) <sub>14</sub>	F:CGTCTCCCGTTGTTCCAAGT R:TCACAAATCACCAATTCCTCAAG
P4E6	(CT) <sub>19</sub>	F:GCTCTACTACCAAACCCAACA R:ATCCTCTCTCAAGGTATCTCTTTC
P6E4	CT(CTT) <sub>2</sub> (CT) <sub>21</sub>	F:CCGTGGAGGAAGATGATTGAGA R:CCTCTGCCACAACCTTCAG
LIB19	(AG) <sub>26</sub>	F:CGTCTCTCCAAAGGCAGAAG R:CAGCTCTCATCCTTGGTTTTG

ки [50]. Для цього були використані пари вироджених праймерів, що фланкують I-й (ТВР-аналіз) та II-й (сТВР-аналіз) інтрони  $\beta$ -тубуліну, а саме для ТВР-аналізу (5'→3') – F: AACTGGGCBAARGGNCAITAYAC; R: ACC-ATRCAYTCRTCD GCRTTYTC [51], а для сТВР-аналізу (5'→3') – F: GARAAYGCHGAY-GARTGYATG; R: CRAAVCCBACCATGAAR-AARTG [52].

Для ТВР- та сТВР-аналізу ампліфікацію ДНК проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (94 °С) – 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація при 94 °С – 30 с, відпал праймерів при 55 °С – 40 с, елонгація при 72 °С – 1,5 хв), кінцева елонгація при 72 °С – 8 хв, утримання при 15 °С [50]. Умови електрофоретичного розділення одержаних ампліконів були аналогічні до тих, які використовувалися в SSR-аналізі, окрім тривалості, що даному випадку становила 2–3 год. Довжину відтворюваних і найбільш чітких фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер O'Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use («Fermentas», Литва).

*Генотипування зразків за допомогою методу поліморфізму довжини інтронів актину.* Для оцінки поліморфізму інтронів генів актину були використані попередньо розроблені вироджені праймери, специфічні до II-го інтрону генів актину у рослин: ActIn\_F: 5'-TGGCA-TCAAYACNTTYTACAAYGA-3'; ActIn\_R: 5'-CC-MCCACTTDAGVACRATGTT-3' [53–55]. Ампліфікацію ДНК проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (95 °С) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація при 95 °С – 45 с, відпал праймерів при 59 °С – 45 с, елонгація при 72 °С – 1 хв), кінцева елонгація при 72 °С – 7 хв, утримання при 15 °С [53–55]. Умови електрофоретичного розділення одержаних ампліконів були аналогічні до тих, що використовувалися в ТВР/сТВР-аналізі, включаючи тривалість розділення та використаний маркер молекулярної маси.

*Статистична обробка даних.* Для отриманих даних хроматографічного аналізу жирнокислотного складу ліпідів насіння рижію було здійснено статистичний аналіз, тобто було обраховано *p*-критерій. Обрахунок коефіцієнтів відносно ваги метаболічних шляхів синтезу жирних кислот здійснювали відповідно до [56–57] з незна-

чними змінами, зокрема, з використанням двох нових коефіцієнтів, запропонованих за аналогією до існуючих – коефіцієнти OER та GER. Значення ER (elongation ratio), DR (desaturation ratio), ODR (oleic desaturation ratio), LDR (linoleic desaturation ratio), OER (oleic elongation ratio) та GER (gondoic elongation ratio) розраховували за такими формулами:

$$ER = \frac{\% C20:1 + \% C22:1}{\% C20:1 + \% C22:1 + \% C18:1 + \% C18:2 + \% C18:3}$$

$$DR = \frac{\% C18:2 + \% C18:3}{\% C20:1 + \% C22:1 + \% C18:1 + \% C18:2 + \% C18:3}$$

$$ODR = \frac{\% C18:2 + \% C18:3}{\% C18:1 + \% C18:2 + \% C18:3}$$

$$OER = \frac{\% C20:1 + \% C22:1}{\% C18:1 + \% C20:1 + \% C22:1}$$

$$LDR = \frac{\% C18:3}{\% C18:2 + \% C18:3}$$

$$GER = \frac{\% C22:1}{\% C20:1 + \% C22:1}$$

де %C18:1; %C18:2; %C18:3; %C20:1; %C22:1 – значення вмісту відповідної жирної кислоти у %мол.

На основі отриманих значень коефіцієнтів жирних кислот було проведено ієрархічний кластерний аналіз з використанням програмного забезпечення Origin 9.1. Кластеризація при побудові дендрограми здійснювалась за методом незваженого попарного середнього (UPGMA).

Для обрахунку та запису молекулярної маси ампліконів (стосується ISSR-, SSR-, ТВР/сТВР-маркерів, використаних у даному дослідженні) цифрові фотографії гелів були проаналізовані з використанням програмного забезпечення Gel Analyzer program (<http://www.gelanalyzer.com/>). Смужки ампліконів оцінювали за бінарною системою, де наявна смужка – 1, відсутня – 0. Генетичні дистанції між парами генотипів були визначені за допомогою програми Free Tree program [58], базуючись на матриці наявності/відсутності ампліфікованих смужок досліджених зразків за коефіцієнтами Нея та Лі (Nei and Li coefficient) [59], що розраховувалися за наступною формулою:

$$S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j),$$

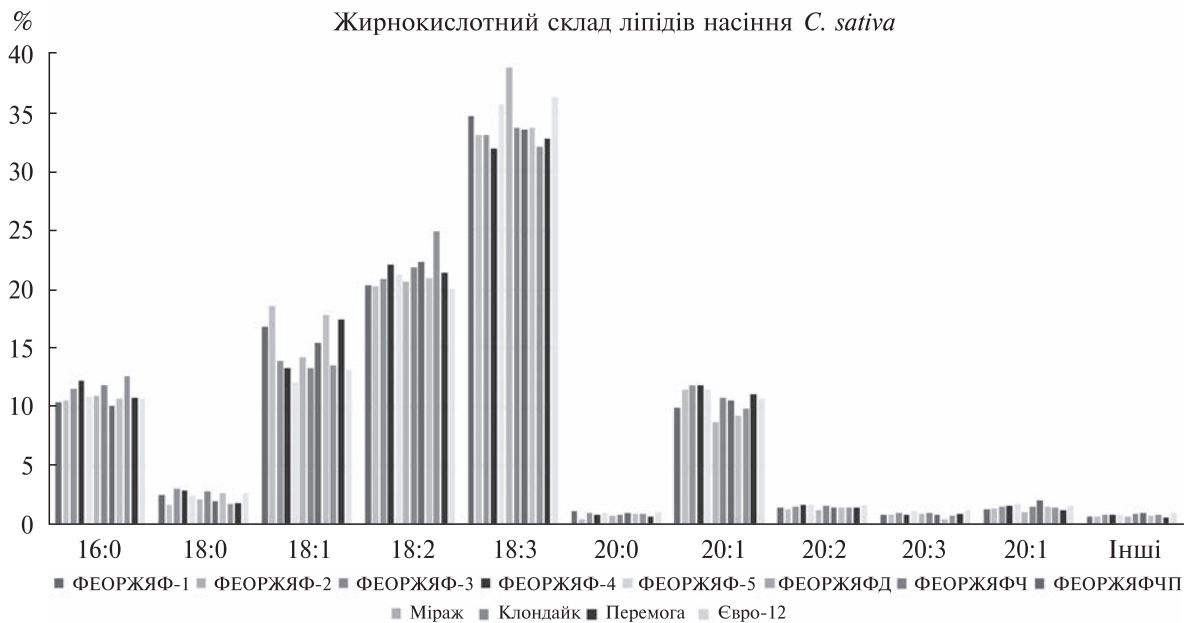


Рис. 1. Жирнокислотний склад олії різних генотипів ріжю, використаних у даному дослідженні (%),  $p < 0,05$

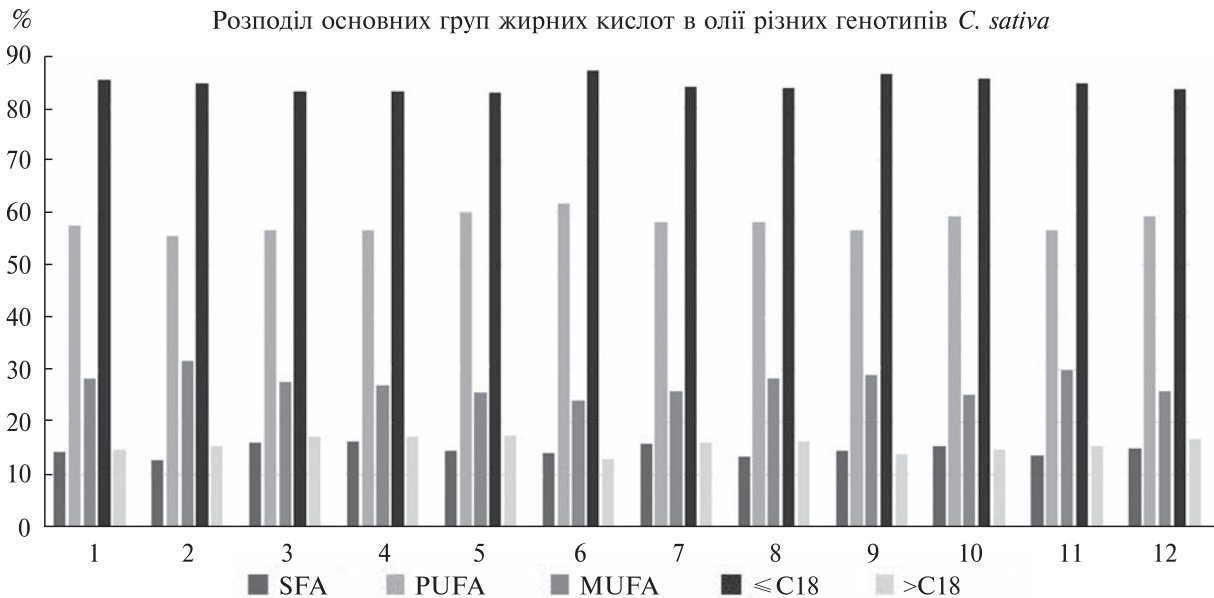
де:  $N_{ij}$  – кількість алелів, наявних в  $i$ -тому та  $j$ -тому генотипах;  $N_i$  – кількість алелів, наявних у  $i$ -го генотипу;  $N_j$  – кількість алелів, наявних у  $j$ -того генотипу;  $i, j = 1, 2, \dots$  [60].

Розраховані значення коефіцієнтів генетичної подібності були використані для здійснення кластерного аналізу та побудови дендрограми за методом UPGMA. Результати кластеризації оцінювали на основі 1000 бутстрепів за допомогою згаданої вище програми. Візуалізацію кінцевих дендрограм здійснювали за допомогою програми FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Теплова карта (діаграма), представлена в роботі, була обрахована як матриця попарних порівнянь (pairwise comparison matrix) на основі морфологічних параметрів згаданих вище генотипів ріжю посівного, опублікованих нами раніше [42]. Для обрахунку були використані дані за такими параметрами, як висота рослин у фазі цвітіння (см), кількість бічних пагонів на стеблі (шт.) у фазі цвітіння, діаметр стебла (мм) у фазі цвітіння, кількість листків на стеблі (шт.), довжина листка (см), ширина листка (см), кількість суцвіть на основному стеблі (шт.), довжина суцвіття (см), висота рослин у фазі досягання насіння (см), довжина головного кореня (см), кількість бічних пагонів (шт.),

кількість стручків на основному стеблі (шт.), кількість стручків на бічних пагонах (шт.), довжина плоду (мм), ширина плоду (мм), товщина плоду (мм), довжина насінини (мм), ширина насінини (мм), маса 1000 насінин (г). Теплова карта була візуалізована у двоколірному варіанті за допомогою он-лайн програмного забезпечення Heatmapper (<http://heatmapper.ca/pairwise/>) [61].

**Результати та обговорення.** Надзвичайно важливим фактором, який визначає цінність будь-якої олійної культури, є якість олії, котра залежить від особливостей її жирнокислотного складу. Саме тому нами було здійснено хроматографічний аналіз жирнокислотного складу ліпідів насіння досліджуваних зразків ріжю (рис. 1). Було встановлено, що вміст лінолевої (18 : 3) кислоти становив 31,95–38,89 % (найвищий вміст у сортозразка ФЕОРЖЯФД), лінолевої (18 : 2) кислоти від 20,04 до 24,89 % (у сорту Клондайк). Найвищий вміст олеїнової (18 : 1) кислоти був виявлений у сортозразка ФЕОРЖЯФ-2 (18,57 %), в той час як вміст ерукової (22 : 1) кислоти знаходився в межах 1,08–2,01 %. Отримані дані корелюють з результатами наших попередніх досліджень жирнокислотного складу олії насіння цих генотипів [43–45]. Загалом, олія насіння ріжю характе-



**Рис. 2.** Розподіл жирних кислот олії ріжю за групами: SFA – насичені жирні кислоти; PUFA – поліненасичені жирні кислоти; MUFA – мононенасичені жирні кислоти; ≤C18 – жирні кислоти з довжиною карбонового ланцюга 18 і менше; >C18 – жирні кислоти з довжиною карбонового ланцюга більше 18-ти (%;  $p < 0,05$ ); 1 – ФЕОРЖЯФ-1, 2 – ФЕОРЖЯФ-2, 3 – ФЕОРЖЯФ-3, 4 – ФЕОРЖЯФ-4, 5 – ФЕОРЖЯФ-5, 6 – ФЕОРЖЯФД, 7 – ФЕОРЖЯФЧ, 8 – ФЕОРЖЯФЧП, 9 – Міраж, 10 – Клондайк, 11 – Перемога, 12 – Євро-12

ризується високим вмістом поліненасичених жирних кислот та низьким рівнем ерукової кислоти, порівняно з іншими Хрестоцвітими [11, 16]. Досліджені нами генотипи також не є винятком.

Додатково нами було обраховано вміст основних груп жирних кислот (вміст насичених, поліненасичених і мононенасичених жирних кислот, а також жирних кислот з довжиною карбонового ланцюга ≤C18 або >C18) в олії досліджених сортів та сортів ріжю (рис. 2). В цілому вміст певних груп жирних кислот не сильно варіював від генотипу до генотипу. Вміст насичених жирних кислот був найнижчим у ФЕОРЖЯФ-2 – 12,85 %, в той час як найвищий – у ФЕОРЖЯФ-4 – 16,36 %. Вміст поліненасичених жирних кислот був найвищим у ФЕОРЖЯФД (61,58 %), а мононенасичених – у ФЕОРЖЯФ-2 (31,71 %). Найбільша кількість жирних кислот з коротким ланцюгом містилася у ФЕОРЖЯФД – 87,01 %. Зразки ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФЧ, ФЕОРЖЯФЧП, Міраж, Клондайк, Перемога, Євро-12 сильно між собою не

різнилися за даними показниками. В наших попередніх дослідженнях сортівзразок ФЕОРЖЯФД вже розглядався як найбільш перспективний генотип для використання як олійної сировини для виробництва біодизелю [43–45]. Сортівзразок ФЕОРЖЯФ-2 вирізняється в цілому серед інших генотипів своїм високим вмістом олеїнової (18 : 1) кислоти та мононенасичених кислот, а також найнижчою кількістю насичених кислот.

На наступному етапі досліджень нами було розраховано коефіцієнти жирних кислот для кожного з досліджених генотипів ріжю (табл. 3). Значення даних показників дозволяють оцінити так звану «відносну вагу певної ділянки метаболічного шляху» та приблизно визначити відносну активність ферментативного каскаду, який працює на конкретному етапі елонгації або десатурації. ER описує подовження ланцюга олеїнової кислоти (C18 : 1) до ейкозенової (C20 : 1) та ерукової кислот (C22 : 1), в той час як DR – десатурацію олеїнової кислоти до лінолевої (C18 : 2) та ліноленої (C18 : 3), ODR – від олеїнової до лінолевої, LDR – від

лінолевої до ліноленої. ER та DR розраховувалися відповідно до [57], ODR та LDR – згідно з [56]. Також нами запропоновані додаткові коефіцієнти, що більш детально описують процеси елонгації: OER відображає відносну вагу шляху елонгації від олеїнової (C18 : 1) кислоти до гондоїнової (20 : 1) та GER – елонгацію від гондоїнової до ерукової (22 : 1) кислоти. Узагальнюючи сказане вище, дані коефіцієнти вказують на співвідношення % мол. вмісту певних жирних кислот та вмісту кислот, які є продуктами їхньої конверсії шляхом десатурації або елонгації.

Таким чином, з табл. 4 можна побачити, що сортозразок ФЕОРЖЯФД, який вирізняється найвищим вмістом коротколанцюгових ( $\leq$ C18) жирних кислот, має найнижче значення коефіцієнту елонгації (ER) – 0,1174. В той самий час коефіцієнт десатурації (DR) є найвищим також для генотипу ФЕОРЖЯФД – 0,7128, оскільки в складі олії його насіння було виявлено найбільшу кількість поліненасичених жирних кислот у порівнянні з іншими генотипами.

У всіх сортозразків та сортів ріжю значення коефіцієнта GER є достатньо низьким і змінюється в межах 0,0953–0,1603, що корелює з незначним вмістом ерукової кислоти у цих генотипів (2 % і менше). За таким же принципом змінюються й інші коефіцієнти. Так, низьке значення LDR корелює з низьким вмістом ліноленої кислоти і т.п. Значення даних коефіцієнтів дозволяють оцінити не лише вміст якоїсь конкретної кислоти, але й загальні від-

мінності у функціонуванні метаболічних шляхів синтезу жирних кислот, що може у подальшому слугувати орієнтиром для створення ліній ріжю з підвищеним вмістом певних жирних кислот.

Для загальної оцінки відмінностей біохімічного складу ліпідів насіння *C. sativa* української селекції нами було побудовано дендрограму (рис. 3) на основі значень розрахованих коефіцієнтів жирних кислот (табл. 4), на якій можна виділити три основні групи. До групи С відносяться два генотипи – Клондайк та ФЕОРЖЯФЧП, – що вирізняються достатньо низькими значеннями LDR та GER. До групи А відноситься 5 генотипів – ФЕОРЖЯФ-1, Міраж, ФЕОРЖЯФ-2, Перемога та ФЕОРЖЯФД. В той самий час сорт Євро-12 та сортозразки ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФЧ відносяться до групи В. Таким чином, найбільш цікавою за особливостями жирнокислотного складу є група А, до якої входять такі перспективні сортозразки, як ФЕОРЖЯФ-2 та ФЕОРЖЯФД. Варто також відзначити, що за результатами наших попередніх досліджень усі представники даної групи відзначалися назвичайно високим вмістом ліпідів у насінні – у всіх представників групи А більше 42 %, окрім сорту Міраж [43–45].

За різними джерелами врожайність ярих форм ріжю посівного може сягати 2500 кг/га [21] або 3320 кг/га [14]. В той самий час в умовах Північної Польщі ярі сорти ріжю здатні продукувати майже до 2400 кг/га за сприятли-

Таблиця 4. Дані обрахунку коефіцієнтів відносної ваги метаболічних шляхів синтезу жирних кислот

Генотипи	ER	DR	ODR	LDR	OER	GER
ФЕОРЖЯФ-1	0,1342	0,6633	0,7661	0,6306	0,3986	0,1113
ФЕОРЖЯФ-2	0,1509	0,63	0,742	0,6203	0,4079	0,1027
ФЕОРЖЯФ-3	0,1636	0,6651	0,7952	0,6135	0,4886	0,1108
ФЕОРЖЯФ-4	0,1661	0,6697	0,8031	0,5908	0,5029	0,1163
ФЕОРЖЯФ-5	0,1602	0,6929	0,825	0,6268	0,5215	0,1296
ФЕОРЖЯФД	0,1174	0,7128	0,8076	0,6533	0,4088	0,1098
ФЕОРЖЯФЧ	0,1512	0,6851	0,8072	0,6066	0,4802	0,122
ФЕОРЖЯФЧП	0,1494	0,6668	0,784	0,6008	0,4485	0,1603
Міраж	0,1288	0,6575	0,7547	0,617	0,376	0,137
Клондайк	0,138	0,6964	0,8079	0,5636	0,4547	0,127
Перемога	0,1457	0,647	0,7573	0,6053	0,4127	0,0953
Євро-12	0,1503	0,689	0,8109	0,6444	0,4833	0,1282



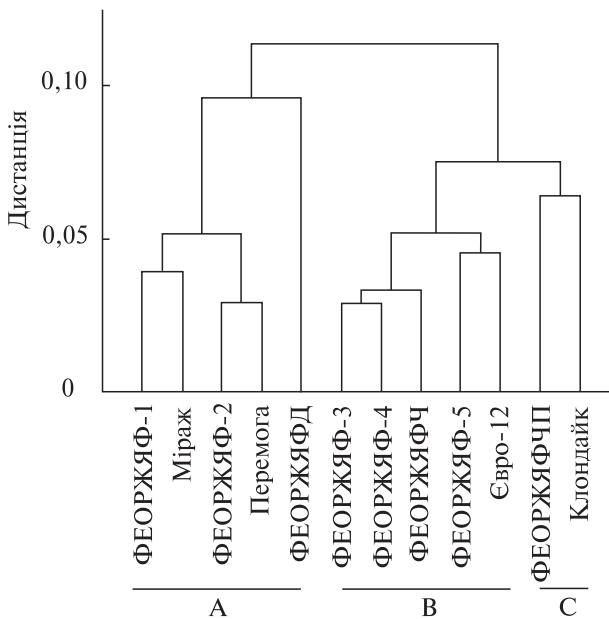


Рис. 3. Дендрограма, побудована на основі ієрархічного кластерного аналізу масиву значень коефіцієнтів жирних кислот різних генотипів рижію

вих умов, а озимі до 2800 кг/га (за даними на 2012 р., найбільш успішний рік вирощування) [40]. За нашими даними врожайність досліджених генотипів сягає 4111 кг/га у сорту Євро-12 [45], що дозволяє забезпечити вихід ліпідів до 1330 кг/га [41]. Раніше було встановлено, що насіння досліджених нами сортів вміст олії варіює в межах 36,04–43,89 % [41, 43–45], в той час як за різними даними олійність насіння рижію може сягати 49 % [11]. На сьогодні існують підходи, що дозволяють збільшити олійність на загальний вміст жирних кислот у насінні рижію. Так, за індукції надекспресії гену *WRI1* можна збільшити вміст олії у насінні рижію на 14 % у порівнянні з нетрансформованими рослинами [62].

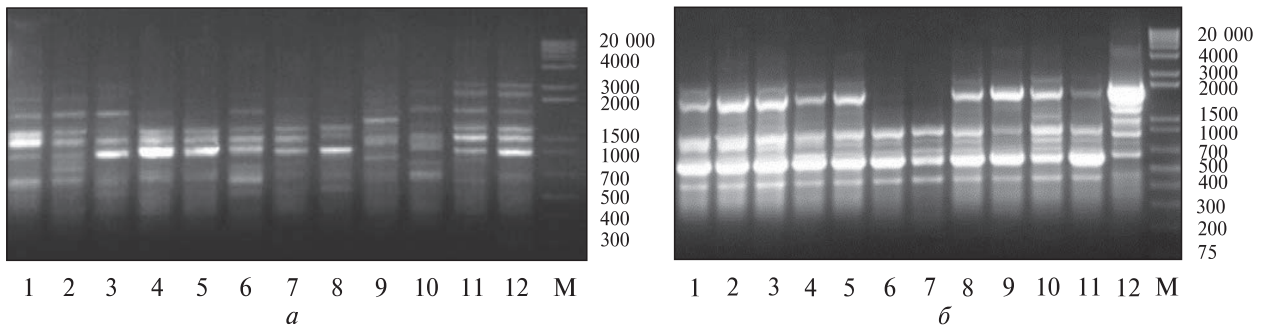
Для встановлення рівня поліморфізму та генетичних відмінностей між сортозразками та сортами *C. sativa* української селекції було проведено ДНК профілювання за 7 ISSR-праймерами (ISSR-3, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-16, ISSR-18, ISSR-25, ISSR-62), що раніше використовувалися нами для фінгерпринтингу рижію [46]. Електрофореграми з розділенням ампліконів, отриманих за допомогою маркерів ISSR-25 та ISSR-18, наведені на рис. 4. Всього

був детектований 81 локус, 68 з яких були поліморфними, а рівень поліморфізму становив 83,95 %.

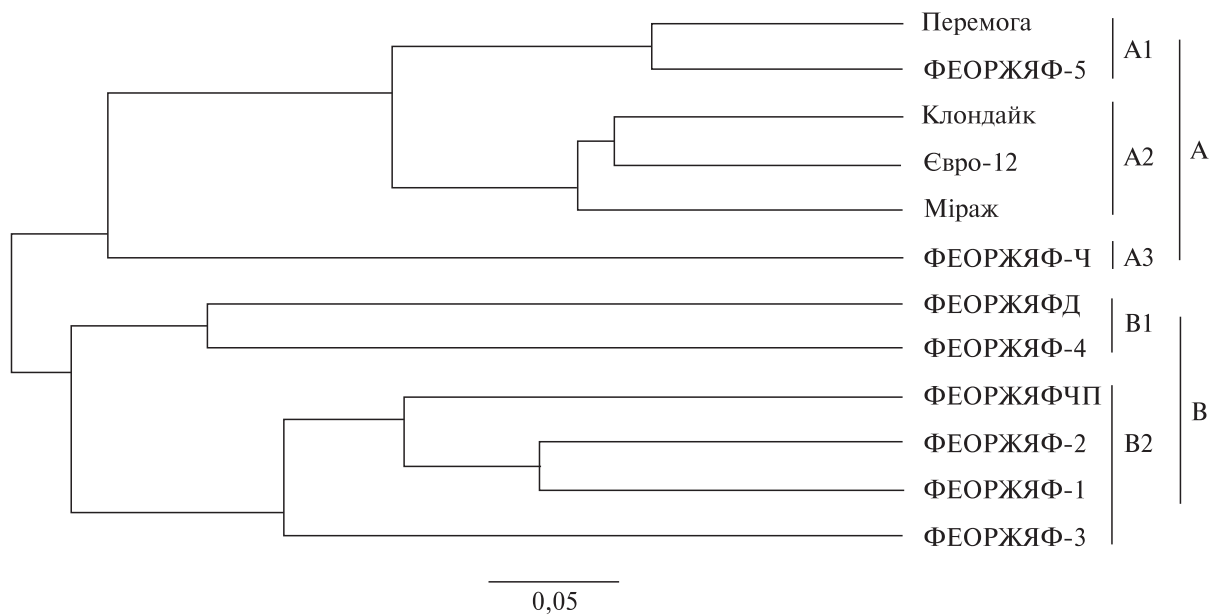
Отримані дані суттєво відрізняються від раніше отриманих результатів [46] в основному через те, що в ході даного дослідження було детектовано більше локусів за допомогою праймерів ISSR-3 (всього 9 локусів), ISSR-4 (11 локусів), ISSR-16 (10 локусів), ISSR-18 (12 локусів), що збільшило загальне число детектованих локусів. Також кількість детектованих поліморфних локусів виявилася більшою (83,95 %) у порівнянні з попередніми результатами (76,5 %), що в першу чергу викликано більшим рівнем поліморфізму за праймерами ISSR-3 (78 %) та ISSR-16 (90 %), ніж у попередніх дослідженнях на даних генотипах рижію [46]. Суттєвих відмінностей за праймерами ISSR-5, ISSR-25 та ISSR-62 не було виявлено як в кількості наявних локусів, так і у кількості поліморфних локусів, що варіювала в межах близько 77–93 %.

Подібні відмінності результатів молекулярно-генетичного профілювання за допомогою ISSR-маркерів швидше за все пов'язані з особливостями самого методу. ISSR-аналіз є одним із варіацій методу RAPD з частковою специфічністю до мікросателітних повторів [63]. Оскільки в ході ПЛП ISSR-праймери можуть умовно випадково обирати послідовності для ампліфікації, то кількість та довжина одержаних фрагментів може варіювати, хоча при цьому відтворюваність методу є набагато кращою, ніж у RAPD [63]. Це є також однією з причин, чому одні й ті самі ISSR-праймери можуть працювати на широкому спектрі видів рослин (від однодольних та дводольних до мікроводоростей) [46, 48]. В подальшому для уточнення одержаних результатів нами були використані й інші методи ДНК-профілювання, що базуються на оцінці поліморфізму як SSR-локусів, так і довжини інтронів різних генів білків цитоскелету (актину та  $\beta$ -тубуліну). Незважаючи на це, нами були обраховані коефіцієнти генетичних дистанцій на основі одержаних молекулярно-генетичних профілів за різними ISSR-маркерами та було побудовано дендрограму (рис. 5).

З рис. 5. чітко видно, що дендрограма підрозділяється на дві основні гілки, позначені як А та В. Усі сорти (Перемога, Клондайк, Євро-12, Міраж) відносяться до гілки А, як і сортозразок



**Рис. 4.** Електрофореграми ампліконів, отриманих для різних генотипів рижюю за допомогою ISSR маркерів: *a* – ISSR-25: 1 – Перемога, 2 – ФЕОРЖЯФ-5, 3 – ФЕОРЖЯФД, 4 – ФЕОРЖЯФЧП, 5 – ФЕОРЖЯФ-4, 6 – ФЕОРЖЯФ-2, 7 – ФЕОРЖЯФ-1, 8 – ФЕОРЖЯФ-3, 9 – ФЕОРЖЯФЧ, 10 – Клондайк, 11 – Міраж, 12 – Євро-12; *б* – ISSR-18: 1 – ФЕОРЖЯФ-1, 2 – ФЕОРЖЯФ-2, 3 – ФЕОРЖЯФ-3, 4 – ФЕОРЖЯФ-4, 5 – ФЕОРЖЯФ-5, 6 – ФЕОРЖЯФД, 7 – ФЕОРЖЯФЧ, 8 – ФЕОРЖЯФЧП, 9 – Перемога, 10 – Євро-12, 11 – Міраж, 12 – Клондайк. М – маркер молекулярної маси



**Рис. 5.** Дендрограма, побудована на основі даних поліморфізму ампліфікованих фрагментів, отриманих з використанням ISSR-маркерів локусів у різних генотипів рижюю

ФЕОРЖЯФ-5 (A1), в той час як ФЕОРЖЯФЧ (A3) вибивається з основної групи. Сортозразки ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3 та ФЕОРЖЯФЧП групуються у окрему субкладу B2. Подібний розподіл майже не корелює з дендрограмою, побудованою на основі коефіцієнтів жирних кислот (рис. 3). Винятками є ФЕОРЖЯФ-1 та ФЕОРЖЯФ-2, що потрапляють в спільну кладу. Побудоване дерево майже повністю співпадає з отриманими раніше да-

ними [46], що свідчить про відтворюваність результатів в межах даних генотипів, незважаючи на особливості методу ISSR-аналізу. На даний час немає опублікованих робіт, в яких застосовувались би ISSR-маркери для оцінки поліморфізму *C. sativa*. Хоча методи, що базуються на ампліфікації рандомних ділянок не мають зараз широкого використання, нещодавно було показано, що використання RAPD-праймерів разом з SSR-маркерами дозволяє диференцію-

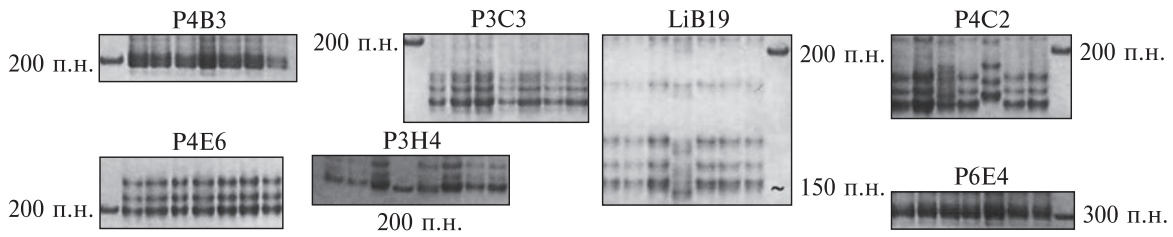


Рис. 6. Фрагменти електрофореграм з ампліфікованими SSR-локусами у різних рослин сорту Перемога

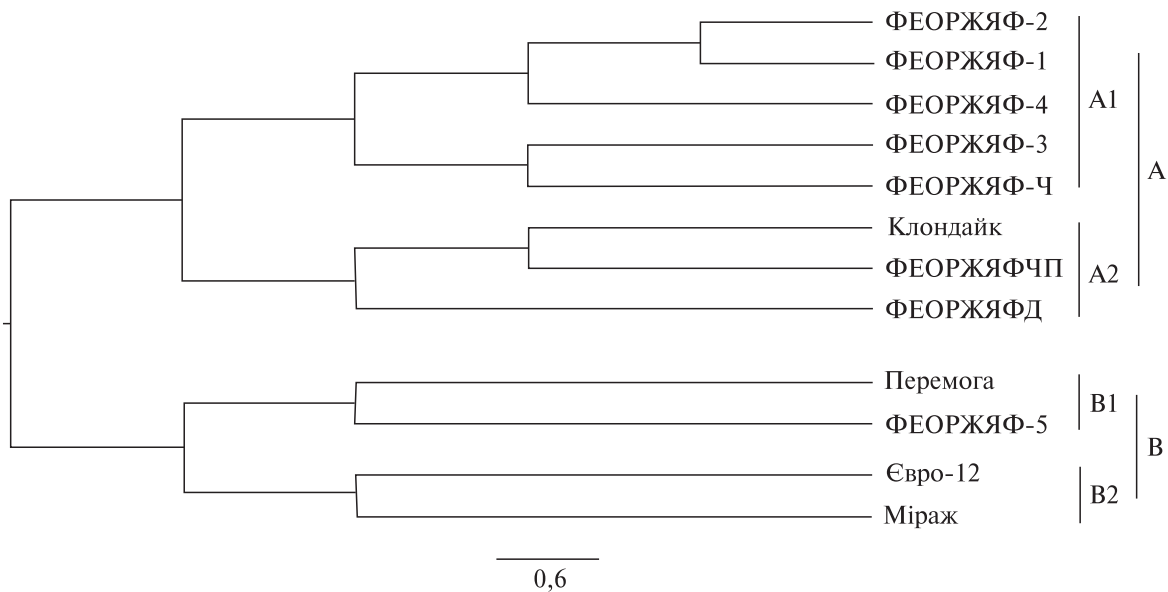


Рис. 7. Дендрограма, побудована на основі даних поліморфізму SSR-локусів у різних генотипів рижію

вати сорти польської та українсько-радянської селекції [40].

Додатково, за 7 парами SSR праймерів (локуси P3C3, P3H4, P4B3, P4C2, P4E6, P6E4, LiB19) аналізували по 7 екземплярів рослин кожного генотипу. Загальна кількість виявлених алелів варіювала від 1 (мономорфний локус P6E4) до 6 (локус P4C2). За локусами LiB19, P4B3 виявлено по 2 алеля. По три алельних варіанти виявлено за локусами P3H4, P4E6, P3C3. На Рис. 6 наведено електрофореграми з ампліфікованими SSR-локусами сорту Перемога.

Загалом досліджені нами сорти та сортозразки рижію характеризуються достатньо низьким рівнем гетерозиготності, зокрема, гетерозиготні рослини не були виявлені за локусами LiB19 та P6E4. Найбільше гетерозигот було виявлено за локусом P4E6, наприклад, у лінії ФЕОРЖЯФ-3 – 1 екземпляр, у сорту Євро-12 – 2. В

інших дослідженнях генетичного різноманіття рижію за допомогою даних SSR-маркерів також відзначався високий рівень гомозиготності у рослин даного виду [33]. На основі одержаних молекулярно-генетичних профілів за різними мікросателітними локусами було обчислено коефіцієнти генетичних дистанцій та було побудовано дендрограму (рис. 7). Чітко видно, що генотипи розподіляються на дві великі гілки (А та В).

Варто зазначити, що більшість сортозразків диференціюється окремо (у гілку А) від сортів Міраж, Перемога та Євро-12, що знаходяться разом у гілці В. Цікавим є те, що сама гілка В підрозділяється на субклади, які співпадають з подібними субкладами дендрограми, що базується на поліморфізмі ISSR-маркерів (рис. 5). Таким чином, субклада В1 у дереві за SSR-маркерами ідентична субкладі А1 дерева

за ISSR-маркерами і містить в собі сортозразок ФЕОРЖЯФ-5 та сорт Перемога. Те ж саме можна сказати і про сорти Міраж та Євро-12, які входять як до субклади В2 (SSR-дерево, рис. 7), так і до субклади А2 (ISSR-дерево, рис. 5).

Подібну ситуацію можна спостерігати й відносно сортозразків ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, які на обох дендрограмах відносяться до однієї субклади. Також в обох випадках сортозразки ФЕОРЖЯФ-1 та ФЕОРЖЯФ-2 виокремлюються разом в спільну гілку найнижчого порядку, що може бути свідченням їхньої високої генетичної подібності. Варто також зазначити, що в обох випадках сортозразок ФЕОРЖЯФД стабільно диференціюється в окрему підкладу від згаданих вище зразків і знаходиться «всередині» дендрограми, що може свідчити про його високу генетичну віддаленість від інших сортозразків, яка все ж є недостатньою для того, щоб ФЕОРЖЯФД випав з основних груп або перейшов у іншу кладу. Додатково даний факт може свідчити про те, що ФЕОРЖЯФД є більш генетично близьким до представників кладу В (рис. 7), ніж інші представники кладу А.

Як додатковий інструмент для оцінки генетичного поліморфізму вивчених сортозразків та сортів рижю нами були використані молекулярно-генетичні маркери, що дозволяють оцінити поліморфізм довжини інтронів (ILP, intron length polymorphism). Одними з таких є маркери, що базуються на поліморфізмі довжини 2-го інтрону актину. Раніше даний підхід був використаний на різних видах рослин, в тому числі на льоні (*Linum usitatissimum*) [53], а також на представниках родин Solanaceae [54] та Poaceae [55]. Нами ж даний підхід було використано для виявлення генетичного різноманіття у сортів та сортозразків рижю української селекції. Результати електрофоретичного розділення одержаних ампліконів 2-го інтрону актину у різних генотипів *C. sativa* наведені на рис. 8. Отримані фрагменти ДНК мали довжину в межах від 550 п.о. до приблизно 3000 п.о. Варто відзначити, що більшість з виявлених фрагментів не відрізняються у різних генотипів рижю. Однак в зоні 1000–1100 п.о. виявлено незначний їх поліморфізм. Дані фрагменти в усіх повторях мали досить низьку чіткість, але були відтворюваними, з чого можна зробити

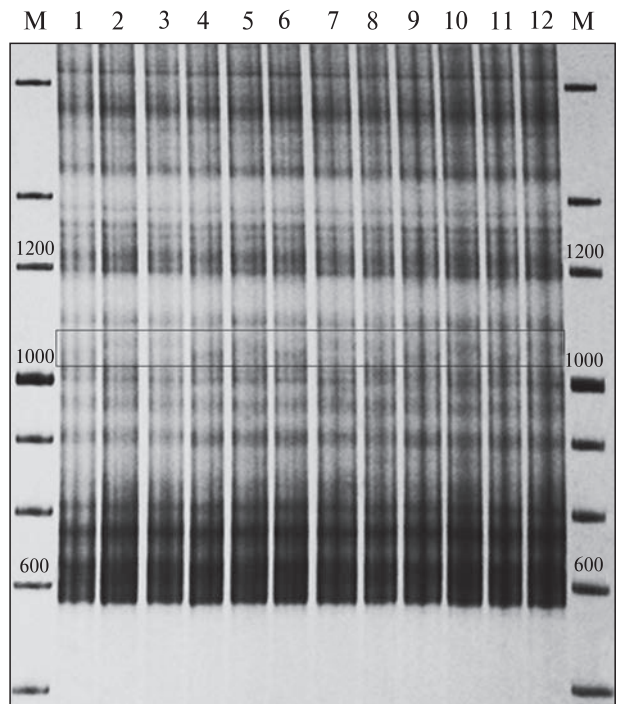
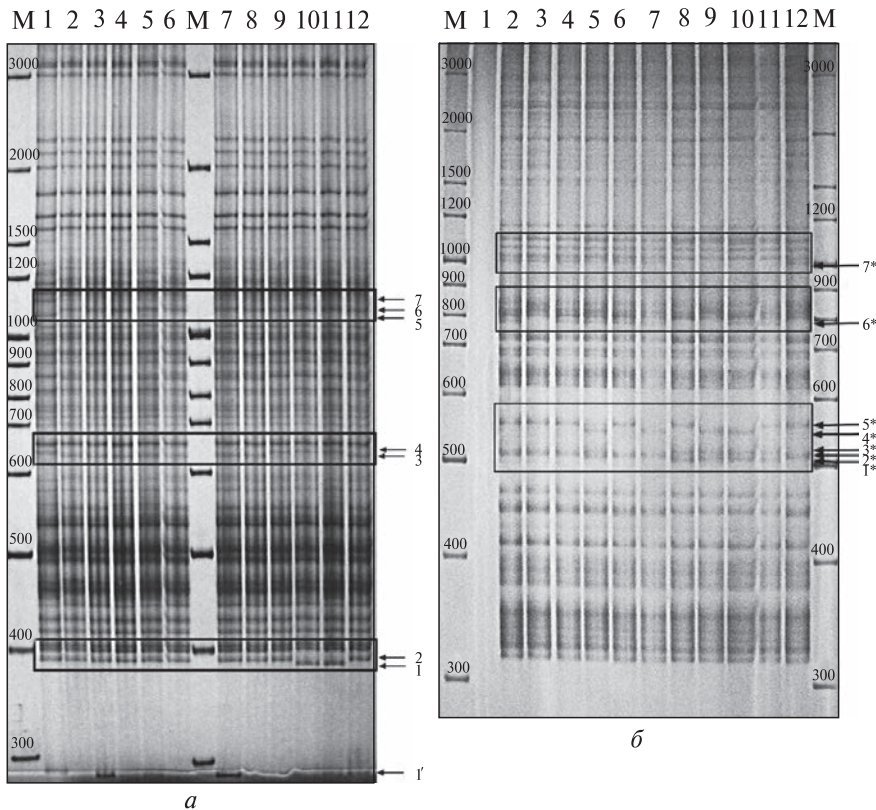


Рис. 8. Електрофореграми з ампліконами інтронів актину у різних генотипів рижю. На рисунку виділено діапазон молекулярної маси, в якому виявлено поліморфні фрагменти: 1 – Перемога, 2 – ФЕОРЖЯФ-5, 3 – ФЕОРЖЯФЧП, 4 – ФЕОРЖЯФД, 5 – ФЕОРЖЯФ-4, 6 – ФЕОРЖЯФ-2, 7 – Євро-12, 8 – ФЕОРЖЯФ-1, 9 – ФЕОРЖЯФ-3, 10 – ФЕОРЖЯФЧ, 11 – Клондайк, 12 – Міраж. М – маркер молекулярної маси

висновок, що ці амплікони не є неспецифічними продуктами ПЛР.

Хоча й дані ділянки є не зовсім чіткими для оцінки їхньої довжини, все ж можна побачити, що вони є подібними за розміром для генотипів ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФД, Перемога та Клондайк, для яких даний амплікон має довжину близько 1000 п.о. Також наявністю подібного розміру фрагментів характеризуються сортозразки ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-Ч, ФЕОРЖЯФЧП, Євро-12 та Міраж. Через досить низький рівень виявленого поліморфізму дані цих молекулярно-генетичних профілів не були використані в подальшому для побудови дендрограми. Цілком можливо, що метод поліморфізму довжини інтронів актину може бути більш дієвим для виявлення поліморфізму або



**Рис. 9.** Електрофореграма з ампліконами I-го (а) та II-го (б) інтронів гена  $\beta$ -тубуліну у різних генотипів *C. sativa*. Стрілками вказано на найбільш поліморфні фрагменти; 1 – Міраж, 2 – ФЕОРЖЯФ-2, 3 – ФЕОРЖЯФ-3, 4 – Євро-12, 5 – ФЕОРЖЯФ-4, 6 – Перемога; 7 – Клондайк, 8 – ФЕОРЖ-ЯФЧ, 9 – ФЕОРЖЯФ-1, 10 – ФЕОРЖЯФ-5, 11 – ФЕОРЖЯФЧП, 12 – ФЕОРЖЯФД. М – маркер молекулярної ваги

серед більш високих таксономічних одиниць (на рівні різних видів, родів), або для оцінки географічно віддалених популяцій, або для вивчення міжвидових гібридів й встановлення їх батьківських форм [53–55].

Також нами було проведено ТВР-аналіз для встановлення рівня поліморфізму довжини 1-го інтрону  $\beta$ -тубуліну у досліджених генотипів *C. sativa*. З отриманої електрофореграми (рис. 9, а) видно, що довжина усіх ампліконів знаходиться в діапазоні від 295 до 3200 п.н. У всіх досліджених зразків рижію спостерігається утворення великої кількості продуктів ампліфікації (близько 50), що обумовлюється алогексаплоїдною структурою геному даної рослини, а також великою кількістю ізотипів  $\beta$ -тубуліну у *C. sativa* (близько 20) [32].

Більша частина смуг на електрофореграмі є мономорфною (рис. 9, а). Всього виділяється 7 чітких поліморфних смуг, розташованих в таких діапазонах: 295–300 п.н. (смуга 1'), 350–400 п.н. (смуги 1, 2), 600–700 п.н. (смуги 3, 4) та 1000–1100 п.н. (смуги 5–7). Проте існує

вірогідність, що смуга 1' (295 п.н.) може утворюватись як неспецифічний продукт ампліфікації, оскільки у деяких зразків вона є чіткою, а в інших або майже непомітна, або відсутня. У зразків ФЕОРЖЯФ-5 і ФЕОРЖЯФЧ характерні амплікони довжиною 370 п.н., в той час як у інших зразків утворюються амплікони з іншою вагою – 375 п.н. У 4 з 12 досліджених сортозразків спостерігається смуга 660 п.н. (Міраж, ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФЧП), у решти восьми – 650 п.н. Смуга 1085 п.н. є характерною лише для сорту Міраж. Крім того, молекулярний профіль сорту Міраж в більшості повторів має ще один амлікон, не характерний для інших генотипів, з приблизною довжиною 1150 п.н.

Таким чином, за допомогою оцінки поліморфізму довжини першого інтрону генів  $\beta$ -тубуліну вдалося диференціювати різні зразки сортів та сортозразків *C. sativa*. Однак, більшість ампліконів є подібною для генетичних профілів усіх сортів та сортозразків, окрім згаданих раніше діапазонів молекулярної маси.

Проте приблизно половина зразків має дуже схожий чи навіть той самий генетичний профіль, що узгоджується з даними, котрі вказують на низький рівень генетичного різноманіття серед сортів ріжю [28, 33]. В нашому ж випадку до цього ще додається те, що більшість досліджених нами генотипів *C. sativa* мають спільне селекційне походження.

Саме тому для уточнення та доповнення отриманої інформації з метою більш чіткої диференціації зразків нами додатково було здійснено сТВР-аналіз, тобто досліджено поліморфізм довжини другого інтрону генів  $\beta$ -тубуліну. Результати електрофоретичного розділення ампліфікованих фрагментів II-го інтрону  $\beta$ -тубуліну також вказують на наявність великої кількості фрагментів, більшість з яких теж виявилися мономорфними для всіх зразків (рис. 9, б).

Фрагменти ДНК були виявлені в діапазоні приблизно від 350 п.н. до 2990 п.н., проте чіткі та відтворювані фрагменти знаходилися лише в межах від 350 п.н. до 1190 п.н., тому лише вони враховувалися при подальшому аналізі. Всього було детектовано також 7 поліморфних фрагментів з приблизною молекулярною масою 515 п.н. (смуга 1\*), 520 п.н. (смуга 2\*), 525 п.н. (смуга 3\*), 550 п.н. (смуга 4\*), 570 п.н. (смуга 5\*), 795 п.н. (смуга 6\*) та 1015 п.н. (смуга 7\*). Досліджені генотипи також достатньо сильно різняться за наявністю/відсутністю певних ампліконів. Так, смуга 4\* наявна лише у ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3 та сорт Перемога, в той час як для усіх інших генотипів характерною є смуга 5\*. Скоріше за все ж, смуги 4\* та 5\* відносяться до однієї й тієї ділянки, що має різну довжину в різних генотипів. Що стосується смуг 1\*, 2\* та 3\*, то у генотипів ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-5, Міраж та Євро-12 наявні по дві смуги з цього діапазону, що може свідчити про вищий рівень гетерозиготності у цих ліній. Скоріше за все, ці смуги також є продуктами ампліфікації гомологічних ділянок, що різняться за довжиною. Те ж саме стосується і подвоєної смуги 7\* у ФЕОРЖЯФ-4. Варто відмітити, що такі нюанси вдалося виявити лише завдяки сТВР-аналізу, в той час як за результатами аналізу поліморфізму довжини першого інтрону майже усі профілі досліджених генотипів мали рівну кількість смуг.

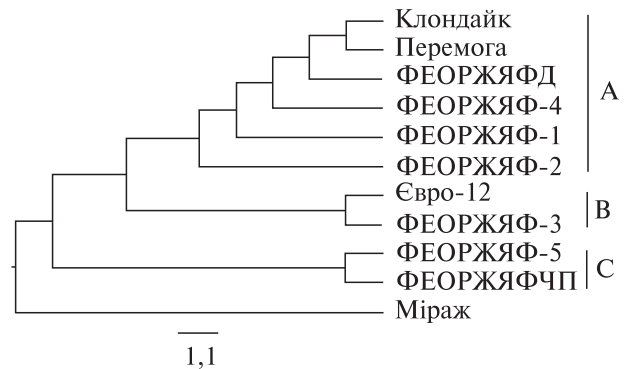


Рис. 10. Дендрограма, побудована на основі даних поліморфізму довжини інтронів  $\beta$ -тубуліну (за I-м (ТВР) та II-м (сТВР) інтронами) у різних генотипів ріжю

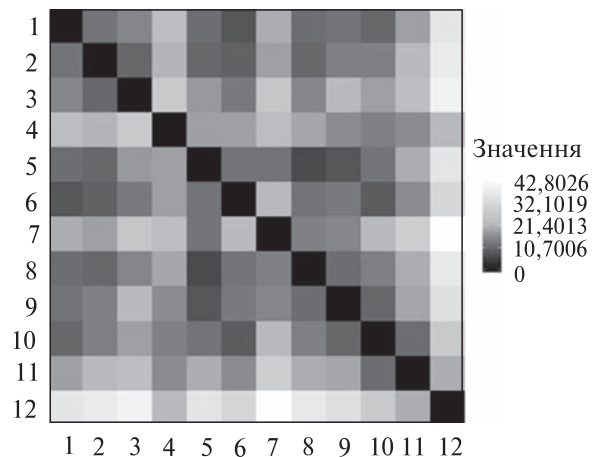


Рис. 11. Теплова карта попарного порівняння, що відображає міру відмінності між генотипами (де чорний колір — повністю ідентичні, а білий — найбільш відмінні) за морфологічними параметрами рослин: 1 — ФЕОРЖЯФ-1, 2 — ФЕОРЖЯФ-2, 3 — ФЕОРЖЯФ-3, 4 — ФЕОРЖЯФ-4, 5 — ФЕОРЖЯФ-5, 6 — ФЕОРЖЯФД, 7 — ФЕОРЖЯФЧ, 8 — ФЕОРЖЯФЧП, 9 — Міраж, 10 — Клондайк, 11 — Перемога, 12 — Євро-12

Спираючись на отримані молекулярно-генетичні профілі зразків досліджених генотипів ріжю, був розрахований коефіцієнт подібності Нея та Лі. За результатами ТВР-аналізу значення коефіцієнта варіюють від 0 (між зразками ФЕОРЖЯФ-5—Міраж та ФЕОРЖЯФ—ЧП—Міраж) до 1 (у більшості зразків). Генетична дистанція Нея мала значення від 0 до 1,242. Значення коефіцієнта подібності Нея та Лі,

розрахованих на основі профілів сТВР-аналізу, варіює від 0 до 1, а генетичної дистанції Нея – від 0 до 1,099. На основі обрахованих коефіцієнтів Нея та Лі було побудовано дендрограму (рис. 10), що показує розподіл досліджених зразків рижію за їх генетичними ТВР/сТВР профілями.

На побудованій дендрограмі можна виділити три основні гілки (А, В, С). Варто також відзначити, що сорт Міраж (Інститут олійних культур НААН України) вибивається з усіх груп, що вказує на його генетичну віддаленість від генотипів селекції НБС ім. М.М. Гришка та сорту Клондайк (Інститут землеробства НААН України). До групи С відносяться сортозразки ФЕОРЖЯФ-5 та ФЕОРЖЯФЧП, в той час як до групи В відносяться сортозразок ФЕОРЖЯЖ-3 та сорт Євро-12. Варто згадати, що за результатами попередніх аналізів ці зразки не групувалися подібним чином в жодному з випадків (рис. 5 та 7), окрім дендрограми за коефіцієнтами жирних кислот (рис. 3), у якій ФЕОРЖЯЖ-3 та Євро-12 відносилися до групи В, хоча й знаходилися у різних гілках. Як і у випадку з SSR- та ISSR-маркерами, сортозразки ФЕОРЖЯЖ-1, ФЕОРЖЯЖ-2 та ФЕОРЖЯЖ-4 відносилися до групи А (рис. 10). Цікаво, що сорти Клондайк та Перемога знаходяться в одній гілці найнижчого порядку, що часто відслідковувалося на дендрограмі за ISSR-маркерами, де ці генотипи були однієї і тій самій групі. Також підтверджується і генетична близькість сортозразків ФЕОРЖЯФД та ФЕОРЖЯФ-4, які на рис. 10 знаходяться в суміжних гілках, так само як і у випадку ISSR-дерев, де ці генотипи розташовані в одній гілці. Також, сортозразки ФЕОРЖЯФД та ФЕОРЖЯФ-4 за SSR-маркерами були достатньо близькими й обидва відносилися до групи А, хоча й до різних її підгруп (рис. 7).

Для порівняння досліджених генотипів рижію за морфометричними показниками були використані дані наших попередніх досліджень [42]. Побудована теплова карта відображає рівень відмінності генотипів за морфологією (рис. 11). Найменший рівень подібності з іншими зразками продемонстрував сорт Євро-12, який суттєво відрізнявся своєю високою врожайністю [45], збільшеним розміром як плодів, насіння, так і в цілому більшим розміром самих

рослин у порівнянні з іншими генотипами [42]. Меншою мірою, але так само суттєво відрізнявся й сорт Перемога. Найбільш подібними між собою виявилися пари генотипів ФЕОРЖЯФД-ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФЧП-ФЕОРЖЯФ-5, Міраж-ФЕОРЖЯФ-5, Клондайк-ФЕОРЖЯФД. Усі інші генотипи мають помірний рівень відмінностей між собою.

Чітких співпадінь у розподілі зразків немає, якщо порівнювати з результатами молекулярно-генетичного аналізу за різними маркерами, однак є і певні подібності. Так, сортозразки ФЕОРЖЯФЧП-ФЕОРЖЯФ-5 відносяться до однієї гілки на ТВР-дендрограмі (рис. 10), але в інших випадках належать до абсолютно різних груп (рис. 5 та 7). Міраж та ФЕОРЖЯФ-5 відносяться до спільної групи у випадку ISSR- та SSR-аналізу, хоча потрапляють до різних субклад всередині даних груп. Також, у випадку пари Клондайк та ФЕОРЖЯФД є співпадіння з дендрограмами на рис. 7 та 10, де дані генотипи відносяться до спільної гілки в межах однієї групи. В інших випадках подібна кореляція не спостерігається.

Якщо повернутися до аналізу відмінностей за жирнокислотним складом (рис. 3) та до аналізу генетичного поліморфізму (рис. 5, 7, 10), то можна побачити, що картини суттєво відрізняються. Відомо, що у випадку, коли генетичні дистанції встановлюються на основі аналізу поліморфізму некодуючих ділянок геному, то отримані результати можуть суттєво відрізнятися від встановленої подібності генотипів за морфологічними чи біохімічними ознаками [64]. Саме через це кореляція між морфологією, жирнокислотним складом та поліморфізмом молекулярно-генетичних маркерів є недостатньо чіткою.

Теоретично, для отримання генотипів рижію з підвищеним вмістом певних жирних кислот було б доцільним підбирати пари для схрещування з ліній, в яких бажана ознака мала б найбільш виражений прояв. Однак в той же час відібрані лінії (або сорти) мали б бути якомога більш генетично віддаленими один від одного. Можливість отримання гетерозисних ліній була показана для різних видів Хрестоцвітих: ріпаку (*B. napus*) [65, 66], гірчиці сарептської (*B. juncea*) [67], капусти білокачанної (*B. oleracea* var. *capitata*) [68], китайської листової капусти,

або бокчой (*B. rapa* ssp. *chinensis*) [69], а також ріжю посівного [70]. Більше того, вдале застосування молекулярних маркерів для виявлення генетичних дистанцій між сортами, підтвердження їхньої гомозиготності та підбір батьківських генотипів для отримання гетерозисних ліній рослин у першому поколінні було успішно показано на прикладі гірчиці сарептської з використанням RAPD-маркерів [71] та на прикладі пекінської капусти (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) з використанням SSR-маркерів та сиквенування [72].

Поліплоїдність геному *C. sativa* забезпечує більший рівень різноманіття аельних варіантів певних генів, що може полегшити отримання гібридів з високим рівнем гетерозиготності й відповідно може забезпечити появу нових фенотипових варіантів з вираженим ефектом гетерозису [37]. Також, ріжій посівний є більшою мірою самоzapильною рослиною, що призводить до природного утворення інбредних ліній з високим рівнем гомозиготності [33, 70]. Так само і в нашому дослідженні було встановлено за допомогою SSR-маркерів, що кількість гомозиготних рослин в межах сорту чи сортозразку переважала над гетерозиготами.

В контексті даного дослідження можна говорити про підбір генотипів ріжю, що характеризуються цікавими особливостями жирнокислотного складу (як генотипи ФЕОРЖЯФ-2 та ФЕОРЖЯФД), а також демонструють достатньо високий рівень врожайності та олійності насіння. Все це в першу чергу стосується генотипів групи А (рис. 3), до якої входять ФЕОРЖЯФ-1, Міраж, ФЕОРЖЯФ-2, Перемога та ФЕОРЖЯФД. Як згадувалося раніше, ці сортозразки та сорти, окрім ФЕОРЖЯФ-1, мають врожайність вище середньої та високий вміст ліпідів у насінні (більше 42 %) [43, 45], що забезпечує вихід олії з одиниці площі на рівні більше 1200 кг/Га, в той час як дане значення варіює в межах від 1058 (ФЕОРЖЯФ-1) до 1330 кг/Га (Євро-12) у вивчених генотипів [41]. Також такі морфометричні показники даних генотипів, як врожайність, є близькими до середніх значень по вибірці, що додатково може сприяти гетерозису, оскільки раніше було показано, що дане явище більш яскраво виявляється при схрещуванні рослин ріжю з середніми показниками кількісних ознак [70]. З огляду

на це можна стверджувати, що пари для схрещування Перемога-ФЕОРЖЯФ-2, Перемога-ФЕОРЖЯФД, а також Міраж-ФЕОРЖЯФ-2, Міраж-ФЕОРЖЯФД є найбільш перспективними з точки зору вірогідності прояву ефекту гетерозису, оскільки у більшості випадків дані пари розташовуються достатньо віддалено на дендрограмах, побудованих на основі поліморфізму молекулярно-генетичних маркерів (рис. 5, 7, 10). Більше того, за результатами аналізу поліморфізму довжини інтронів β-тубуліну сорт Міраж взагалі випадає з основної групи, що вказує на його віддаленість.

Також, потенційно цікавою може бути комбінація ФЕОРЖЯФ-2-ФЕОРЖЯФД в зв'язку з особливостями жирнокислотного складу. Дана пара генотипів не є настільки генетично віддаленою, як попередні, оскільки рослини групуються в більшості випадків в одну кладу, однак в межах неї розташовуються в достатньо віддалених гілках. Те саме може стосуватися пари Міраж-Перемога, оскільки вони групуються в одну групу у всіх випадках, окрім рис. 10. Пари Перемога-ФЕОРЖЯФ-1 та Міраж-ФЕОРЖЯФ-1 можна вважати недостатньо перспективними через низькі показники продуктивності лінії ФЕОРЖЯФ-1. Комбінація генотипів ФЕОРЖЯФ-1-ФЕОРЖЯФ-2 є найменш виграшною, оскільки дані сортозразки в усіх випадках показують найвищий рівень генетичної подібності серед усіх зразків.

Існує можливість створення й інших комбінацій з найбільш генетично віддалених зразків ріжю, але, з огляду на їхні продуктивні параметри та якість олії, отримані гібриди можуть бути менш перспективними для використання в якості олійної сировини у виробництві біопалива. Це підтверджується тим, що, хоча й усі вивчені генотипи походять з одного географічного регіону, все ж вони виявляють доволі значну генетичну відмінність між собою. Звісно, найбільш виграшними були б комбінації для схрещування ріжю з географічно віддалених популяцій, але теоретичного ефекту гетерозису можна було б досягти й в масштабах вибірки з вивчених генотипів, що, однак, потребує практичної перевірки.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить результатів жодних досліджень, про-



ведених на тваринах чи людях будь-ким із авторів.

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Робота виконана за підтримки проекту «Комплексна оцінка продуктивних характеристик ріжю як енергетичної сировини для виробництва компонентів дизельного біопалива у порівнянні з іншими олійними хрестоцвітими культурами» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України з розроблення наукових засад раціонального використання природно-ресурсного потенціалу та сталого розвитку (2015–19 рр.) та проекту «Оцінка технічних характеристик і відбір високоолійних рослин та мікрородоростей для отримання біодизелю» цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (2018–22 рр.).

#### EVALUATING DIVERSITY AND BREEDING PERSPECTIVES OF UKRAINIAN SPRING CAMELINA GENOTYPES

R.Y. Blume, A.N. Rabokon, A.S. Postovitova,  
A.Y. Demkovich, Y.V. Pirko, A.I. Yemets,  
D.B. Rakhmetov, Y.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osyovskoho Str., 2a  
Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv, Akademika Hlushkova Ave., 2  
MM Gryshko National Botanical Garden of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 01014, Kyiv, Tymiriazevska Str., 1  
E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net, blume.rostislav@gmail.com

Camelina or false flax (*Camelina sativa*) is considered as one of the most perspective oilseed crops for oil-based biofuel production. It is known that the center of origin of false flax is located in Eastern Europe, where this species arised via polyploidisation or crossing between wild relatives from *Camelina* genus. As a result of such evolutionary event camelina possesses by low level of genetic diversity, what sets restrictions on breeding improvement of this crop. Despite number of investigations, focused on evaluation of camelina varieties genetic polymorphism, the diversity of Uk-

rainian cultivars has not been assessed yet, although this region is a part of camelina center of origin. Here we firstly report about complex evaluation of genetic similarity of Ukrainian camelina breeding lines and cultivars, as well as analysis of morphometric and yield parameters as well as fatty acid composition of their seed oil. According to the results of chromatographic analysis, two camelina genotypes represented particular interest (FEORZhYaF-2 and FEORZhYaFD) due to high content of fatty acids with short carbon chain (less than C18) in seed lipids. Additionally, genetic distances between investigated accessions were identified using ISSR, SSR and ILP (actin and  $\beta$ -tubulin) markers. Obtained data were compared with crop productivity and morphometric parameters to determine the most desirable genotype pairs for further cross breeding. Thus, different crossing combinations of breeding lines FEORZhYaF-2 and FEORZhYaFD with varieties Mirazh and Peremoha might theoretically result in heterosis exhibition in first generation. Described approach for assessment of camelina germplasm collections during breeding process could be considered as powerful tool for significant increasing of this oilseed improvement efficiency of improvement.

#### ОЦЕНКА РАЗНООБРАЗИЯ И ПЕРСПЕКТИВ СЕЛЕКЦИИ УКРАИНСКИХ ГЕНОТИПОВ ЯРОГО РЫЖИКА

Р.Я. Блюм, А.Н. Рабок, А.С. Постовойтова,  
А.Е. Демкович, Я.В. Пирко, А.И. Емец,  
Д.Б. Рахметов, Я.Б. Блюм

На сегодня рыжик посевной (*Camelina sativa*) представляет собой одну из наиболее перспективных масличных культур для использования в качестве биотопливного сырья. Считается, что это вид происходит из восточноевропейского региона, в котором он возник в результате полиплоидизации или скрещивания диких представителей *Camelina*. Результатом данного события является низкий уровень генетического разнообразия рыжика, что налагает определенные ограничения на селекционное усовершенствование данной культуры. Несмотря на ряд исследований по изучению генетического полиморфизма существующих сортов рыжика, оценка генотипов украинского происхождения почти не проводилась, хотя данный регион относится к центру происхождения *C. sativa*. Нами впервые проведена комплексная оценка генетического разнообразия сортообразцов и сортов рыжика украинской селекции, а также проанализированы морфометрические, показатели урожайности и особенности жирнокислотного состава масла семян. По результатам хроматографического анализа были выделены два генотипа (ФЕОРЖЯФ-2 и ФЕОРЖЯФД), липиды се-

мян которых в большей мере состояли из жирных кислот с длиной цепи короче C18. Также были установлены генетические дистанции между исследованными генотипами с помощью изучения полиморфизма ISSR, SSR и ILP (актин и β-тубулин) маркеров. Полученные данные были сопоставлены с показателями продуктивности и морфометрическими параметрами, что позволило определить наиболее перспективные пары генотипов рыжика посевного для дальнейшего скрещивания. Таким образом, скрещивание ФЕОРЖЯФ-2 и ФЕОРЖЯФД с сортами Мираж и Пэрэмога в различных комбинациях теоретически могло бы позволить получить проявление гетерозиса в первом поколении. Подобный подход для анализа селекционных выборок и генетических ресурсов рыжика может стать мощным инструментом для усовершенствования данной масличной культуры.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Downey, R.K., The origin and description of the *Brassica* oilseed crops, In *High and low erucic acid rapeseed oils: Production, usage, chemistry, and toxicological evaluation*, Kramer, J.K.G., Sauer, F.D., and Pigden, W.J., Eds., Toronto: Academic Press, 1983, pp. 1–20.
- Carlson, A.S., Plant oils as feedstock alternatives to petroleum – A short survey of potential oil crop platforms, *Biochimie*, 2009, vol. 91, pp. 665–70. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.021>
- Warwick, S.I., Brassicaceae in agriculture, In: *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*, Schmidt, R., and Bancroft, I., Eds, New York: Springer Science+Business Media, 2011, pp. 33–65.
- Warwick, S.I., Gugel, R., McDonald, T., and Falk, K.C., Genetic variation and agronomic potential of Ethiopian mustard (*Brassica carinata*) in western Canada, *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 2006, vol. 53, pp. 297–312. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-6108-y>.
- Marillia, E.F., Francis, T., Falk, K.C., Smith, M., and Taylor, D.C., Palliser's promise: *Brassica carinata*, An emerging western Canadian crop for delivery of new bio-industrial oil feedstocks, *Biocatalysis Agricult. Biotechnol.*, 2014, vol. 3, no. 1, pp. 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.012>.
- Gesch, R.W., Isbell, T.A., Oblath, E.A., Allen, B.L., Archer, D.W., Brown, J., Hatfield, J.L., Jabro, J.D., Kiniry, J.R., Long, D.S., and Vigil, M.F., Comparison of several *Brassica* species in the north central U.S. for potential jet fuel feedstock, *Industr. Crop Prod.*, 2015, vol. 75, pp. 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.084>.
- Moser, B.R., Camelina (*Camelina sativa* L.) oil as a biofuels feedstock: Golden opportunity or false hope? *Lipid Technol.*, 2010, vol. 22, no. 12, pp. 270–3. <https://doi.org/10.1002/lite.201000068>.
- Berti, M., Gesch, R., Eynck, C., Anderson, J., and Cermak, S, Camelina uses, genetics, genomics, production, and management, *Industr. Crop Prod.*, 2016, vol. 94, pp. 690–710. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.034>.
- Moser, B.R., Knothe, G., Vaughn, S.F., and Isbell, T.A., Production and evaluation of biodiesel from field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) oil, *Energy Fuels*, 2009, vol. 23, pp. 4149–55. <https://doi.org/10.1021/ef900337g>.
- McGinn, M., Phippen, W.B., Chopra, R., Bansal, S., Jarvis, B.A., Phippen, M.E., Dorn, K.M., Esfahanian, M., Nazareus, T.J., Cahoon, E.B., Durrett, T.P., Marks, M.D., and Sedbrook, J.C., Molecular tools enabling pennycress (*Thlaspi arvense*) as a model plant and oilseed cash cover crop, *Plant Biotechnol. J.*, 2019, vol. 17, no. 4, pp. 776–88. <https://doi.org/10.1111/pbi.13014>.
- Vollmann, J., Eynck, C., *Camelina* as a sustainable oilseed crop: Contributions of plant breeding and genetic engineering, *Biotechnol. J.*, 2015, vol. 10, pp. 525–35. <https://doi.org/10.1002/biot.201400200>.
- Zubr, J., Oil-seed crop: *Camelina sativa*, *Industr. Crop Prod.*, 1997, vol. 6, pp. 113–9. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(96\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(96)00203-8).
- Frohlich, A., Rice, B., Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production, *Industr. Crop Prod*, 2005, vol. 21, pp. 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.12.004>.
- Gugel, R.K., Falk, K.C., Agronomic and seed quality evaluation of *Camelina sativa* in western Canada, *Can. J. Plant Sci.*, 2006, vol. 86, pp. 1047–58. <https://doi.org/10.4141/P04-081>.
- The Biology of *Camelina sativa* (L.) Crantz (Camelina). *A Companion Document to Directive 94-08 (Dir94-08), Assessment Criteria for Determining Environmental Safety of Plant with Novel Traits*. CFIA, Plant Bio-Safety Office, Ottawa, ON, Canada, 2012. URL: <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/camelsate.shtml> (accessed 4 Apr. 2013).
- Obour, K.A., Sintim, Y.H., Obeng, E., and Jeliakov, D.V., Oilseed camelina (*Camelina sativa* L. Crantz): Production systems, prospects and challenges in the USA Great Plains, *Adv. Plants Agric. Res.*, 2015, vol. 2, no. 2, 00043. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00043>.
- Wittkop, B, Snowdon, R.J., and Friedt, W., Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe, *Euphytica*, 2009, vol. 170, pp. 131–40. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9940-5>.
- Singh, S.P., Singh, D., Biodiesel production through

- the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renew. Sust. Energy Rev.*, 2010, vol. 14, pp. 200–16. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.017>.
19. Atabani, A.E., Silitonga, A.S., Ong, H.C., Mahlia, T.M.I., Masjuki, H.H., Badruddin, I.A., and Fayaz, H., Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production, *Renew. Sustain. Ener. Rev.*, 2013, vol. 18, pp. 211–45. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.01>.
  20. Ratanapariyanuch, K., Clancy, J., Emami, S., Cutler, J., and Reaney, M.J.T., Physical, chemical, and lubricant properties of *Brassicaceae* oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2013, vol. 115, pp. 1005–12. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200422>.
  21. Iskandarov, U., Kim, H.J., and Cahoon, E.B., Camelina: An emerging oilseed platform for advanced biofuels and bio-based materials, In *Plants and BioEnergy*, McCann, M.C., Buckeridge, M.S., and Cerpita N.C., Eds. New York: Springer, 2014, pp. 131–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9329-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9329-7_8).
  22. Li, X., and Mupondwa, E., Life cycle assessment of camelina oil derived biodiesel and jet fuel in the Canadian Prairies, *Sci. Total Environ.*, 2014, vol. 481, pp. 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.003>.
  23. Natelson, R.H., Wang, W.C., Roberts, W.L., and Zering, K.D., Technoeconomic analysis of jet fuel production from hydrolysis, decarboxylation, and reforming of camelina oil, *Biomass Bioenergy*, 2015, vol. 75, pp. 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.001>.
  24. IATA 2015 Report on Alternative Fuels (10th Edition), 2016, Montreal-Geneva: International Air Transport Association, ISBN 978-92-9252-870-6, 50 p.
  25. Faure, J.D., Tepfer, M., Camelina, a Swiss knife for plant lipid biotechnology. *OCL*, 2016, vol. 23, no. 5, D503. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016023>.
  26. Weeks, D.P., Gene editing in polyploid crops: wheat, camelina, canola, potato, cotton, peanut, sugar cane, and citrus. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2017, vol. 149, pp. 65–80. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.05.002>.
  27. Yemets, A.I., Boychuk, Yu.N., Shysha, E.N., Rakhmetov, D.B., and Blume, Ya.B., Establishment of *in vitro* culture, plant regeneration, and genetic transformation of *Camelina sativa*. *Cytol. Genetics*, 2013, vol. 47, no. 3, pp. 138–44. <https://doi.org/10.3103/S0095452713030031>.
  28. Gehringer, A., Friedt, W., Lühs, W., and Snowdon, R.J., Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*), *Genome*, 2006, vol. 49, pp. 1555–63. <https://doi.org/10.1139/g06-117>.
  29. Vollmann, J., Gausgruber, H., Stift, G., Dryzhyruk, V., and Lelley, T., Genetic diversity in *Camelina* germplasm as revealed by seed quality characteristics and RAPD polymorphism, *Plant Breed.*, 2005, vol. 124, pp. 446–53. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01134.x>.
  30. Ghamkhar, K., Croser, J., Aryamanesh, N., Campbell, M., Kon'kova, N., and Francis, C., Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an alternative oilseed: molecular and ecogeographic analyses, *Genome*, 2010, vol. 53, no. 7, pp. 558–67. <https://doi.org/10.1139/G10-034>.
  31. Manca, A., Galasso, I., Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Minerva Biotec.*, 2010, vol. 22, pp. 43–5.
  32. Galasso, I., Manca, A., Braglia, L., Martinelli, T., Morello, L., and Breviario, D., 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.*, 2011, vol. 28, pp. 635–45. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9515-0>.
  33. Manca, A., Pecchia, P., Mapelli, S., Masella, P., and Galasso, I., Evaluation of genetic diversity in a *Camelina sativa* (L.) Crantz collection using microsatellite markers and biochemical traits, *Genetic Resour. Crop Evol.*, 2012, vol. 60, pp. 1223–6. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9913-8>.
  34. Singh, R., Bollina, V., Higgins, E.E., Clarke, W.E., Eynck, C., Sidebottom, C. Gugel R., Snowdon, R., and Parkin, I.A.P., Single-nucleotide polymorphism identification and genotyping in *Camelina sativa*, *Mol. Breed.*, 2015, vol. 35, no. 1, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0224-6>.
  35. Luo, Z., Brock, J., Dyer, J.M., Kutchan, T., Schachtman, D., Augustin, M., Ge, Y., Fahlgren, N., and Abdel-Haleem, H., Genetic diversity and population structure of a *Camelina sativa* spring panel, *Front Plant Sci.*, 2019, vol. 10, 184. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00184>.
  36. Hutcheon, C., Ditt, R.F., Beilstein, M., Comai, L., Schroeder, J., Goldstein, E., Shewmaker, C.K., Nguyen, T., De Rocher, J., and Kiser, J. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes, *BMC Plant Biol.*, 2010, vol. 10, pp. 233. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-233>.
  37. Kagale, S., Koh, C., Nixon, J., Bollina, V., Clarke, W.E., Tuteja, R., Spillane, C., Robinson, S.J., Links, M.G., Clarke, C., Higgins, E.E., Huebert, T., Sharpe, A.G., and Parkin, I.A., The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure, *Nature Commun.*, 2014, vol. 5, 3706. <https://doi.org/10.1038/ncomms4706>.

38. Mandáková, T., Pouch, M., Brock, J.R., Al-Shehbaz, I.A., and Lysak, M.A., Origin and evolution of diploid and allopolyploid *Camelina* genomes were accompanied by chromosome shattering, *Plant Cell*, 2019, vol. 31, no. 11, pp. 2596–612. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00366>.
39. Chaudhary, R., Koh, C.S., Kagale, S., Tang, L., Wu, S.W., Lv, Z., Mason, A.S., Sharpe, A.G., Diederichsen, A., and Parkin, I.A.P., Assessing diversity in the *Camelina* genus provides insights into the genome structure of *Camelina sativa*, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 1297–308. doi:10.1534/g3.119.400957
40. Kurasiak-Popowska, D., Tomkowiak, A., Czlopinska, M., Bocianowski, J., Weigt, D., and Nawracala, J., Analysis of yield and genetic similarity of Polish and Ukrainian *Camelina sativa* genotypes, *Industr. Crop Prod.*, 2018, vol. 123, pp. 667–75. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.001>.
41. Rakhmetov, D.B., Blume, Ya.B., Yemets, A.I., Boichuk, Yu.M., Andrushchenko, O.L., Vergun, O.M., and Rakhmetova, S.O., *Camelina sativa* (L.) Crantz – valuable oil plant. *Plant Introduction*, 2014, vol. 2, no. 62, pp. 50–8 (in Ukrainian).
42. Rakhmetov, D.B., Rahmetova, S.O., Boychuk, Yu.N., Blume, Ya.B., and Yemets, A.I., Physiological and morphological characteristics of new forms and varieties of spring false flax (*Camelina sativa*). *The Bulletin of Ukrain Soc of Geneticists and Breeders*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 65–77 (in Ukrainian).
43. Blume, R.Ya., Boychuk, Yu.M., Yemets, A.I., Rakhmetova, S.O., Blume, Ya.B., and Rakhmetov, D.B., Comparative analysis of fatty acid composition for oils from seeds of tyfon, oil radish and camelina breeding forms and varieties as perspective source for biodiesel production. *Factors Exp Evol Organisms*, vol. 18, pp. 61–6 (in Ukrainian).
44. Blume, R., Rakhmetov, D., Comparative analysis of oil fatty acid composition of Ukrainian spring *Camelina sativa* breeding forms and varieties as a perspective biodiesel source, *Cruciferae Newsllett.*, 2017, vol. 36, pp. 13–7.
45. Blume, R.Y., Lantukh, G.V., Levchuk, I.V., Rakhmetov, D.B., and Blume, Ya.B., Evaluation of potential biodiesel feedstocks from industrial Cruciferae: camelina, turnip rape, oil radish and tyfon, *The Open Agr. J.*, 2020, vol. 14 (in press);
46. Bayer, G.Ya., Boichuk, Yu.M., Pirko, Ya.V., Korhvoy, V.I., Rakhmetov, D.B., Yemets, A.I., and Blume, Ya.B., Analysis of breeding false flax (*Camelina sativa* (L.) Crantz) material with ISSR markers. *Factors Exp Evol Organisms*, 2014, vol. 14, pp. 146–50 (in Ukrainian).
47. Sambrook, J., David, W.R., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. vol. 2, 2001, Cold Spring Harbor, 763 p.
48. Shen, S. Genetic diversity analysis with ISSR PCR on green algae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*, *Chin. J. Ocean. Limn.*, 2008, vol. 26, no. 4, pp. 380–4. <https://doi.org/10.1007/s00343-008-0380-1>.
49. Benbouza, H., Jacquemin, J.-M., Baudoin, J.-P., and Mergeai, G., Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2006, vol. 10, pp. 77–81. <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=1128>.
50. Bardini, M., Lee, D., Donini, P., Mariani, A., Gianni, S., Toschi, M., Lowe, C., and Breviario, D., Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species, *Genome*, 2004, vol. 47, pp. 281–91. <https://doi.org/10.1139/g03-132>.
51. Breviario, D., Baird, W.V., Sangoi, S., Hilu, K., Blumetti, P., and Giani, S., High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined  $\beta$ -tubulin introns, *Mol. Breed.*, 2007, vol. 20, pp. 249–59. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9087-9>.
52. Braglia, L.B., Manca, A.M., Mastromauro, F.M., and Breviario, D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs, *Diversity*, 2010, vol. 2, pp. 572–85. <https://doi.org/10.3390/d2040572>.
53. Postovoitova, A.S., Yotka, O.Yu., Pirko, Ya.V., and Blume, Ya.B., Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci, *Cytol. Genet.*, 2018, vol. 52, no. 6, pp. 448–60. <https://doi.org/10.3103/S0095452718060099>.
54. Postovoitova, A.S., Pirko, Ya.V., and Blume, Ya.B., Polymorphism of actin gene introns as an instrument for genotyping of the representatives from Solanaceae family. *Biol Systems: Theor. Innov.*, 2018, no. 287, pp. 71–9 (in Ukrainian). <http://dx.doi.org/10.31548/biologiya2018.287.071>.
55. Postovoitova, A.S., Pirko, Ya.V., and Blume, Ya.B., Intron length polymorphism of actin genes as the efficient tool for an genetic profiling of selected cereals from the grass (*Poaceae* L.) Family. *Dopov. Nac. Akad. Nauk. Ukr.*, 2019, vol. 2, pp. 78–83 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/dopovidi-2019.02.078>.
56. Pleines, S., Friedt, W., Breeding for improved C 18-fatty acid composition in rapeseed (*Brassica napus* L.), *Fett/Lipid*, 1988, vol. 90, pp. 167–71. <https://doi.org/10.1002/lipi.19880900502>.

57. Velasco, L., Goffman, F.D., and Becker, H.C., Variability for the fatty acid composition of the seed oil in a germplasm collection of the genus *Brassica*, *Genet. Resour. Crop Evol.*, 1998, vol. 45, pp. 371–82. <https://doi.org/10.1023/A:1008628624867>.
58. Pavlicek, A., Hrdá, S., and Flegr, J., 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.*, 1999, vol. 45, pp. 97–99.
59. Nei, M., Li, W.H., Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, pp. 5269–73. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269.
60. Hongtrakul, V., Huestis, G.M., and Knapp, S.J., Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines, *Theor. Appl. Genet.*, 1997, vol. 95, pp. 400–7. <https://doi.org/10.1007/s001220050576>.
61. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A., and Wishart, D.S., Heatmapper: web-enabled heat mapping for all, *Nucleic Acids Res.*, 2016, vol. 44(W1), pp. W147–W153. doi: 10.1093/nar/gkw419.
62. An, D., Suh, M.C., Overexpression of Arabidopsis *WRI1* enhanced seed mass and storage oil content in *Camelina sativa*, *Plant Biotechnol. Rept.*, 2015, vol. 9, pp. 137–48. <https://doi.org/10.1007/s11816-015-0351-x>.
63. Khlestkina, E.K., Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ. J. Genet. Appl. Res.*, 2014, vol. 4, no. 3, pp. 236–44. <https://doi.org/10.1134/S2079059714030022>.
64. van Tienderen, P.H., de Haan, A.A., van der Linden, C.G., and Vosman, B., Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits, *Trends Ecol. Evol.*, 2002, vol. 17, no. 12, pp. 577–82. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02624-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02624-1).
65. Grant, I., Beversdorf, W.D., Heterosis and combining ability estimates in spring-planted oilseed rape (*Brassica napus* L.), *Can. J. Genet. Cytol.*, 1985, vol. 27, no. 4, pp. 472–8. <https://doi.org/10.1139/g85-069>.
66. Wolko, J., Dobrzycka, A., Bocianowski, J., and Bartkowiak-Broda, I., Estimation of heterosis for yield-related traits for single cross and three-way cross hybrids of oilseed rape (*Brassica napus* L.), *Euphytica*, 2019, vol. 215, pp. 156. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2482-6>.
67. Gupta, P., Chaudhary, H.B., and Lal, S.K., Heterosis and combining ability analysis for yield and its components in Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern & Coss), *Front. Agricult. China*, 2010, vol. 4, pp. 299–307. <https://doi.org/10.1007/s11703-010-1016-8>.
68. Kibar, B., Karaağaz, O., and Kar, H., Heterosis for yield contributing head traits in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), *Cien. Inv. Agr.*, 2015, vol. 42, no. 2, pp. 205–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202015000200007>.
69. Xie, F., Zha, J., Tang, H., Xu, Y., Liu, X., and Wan, Z., Combining ability and heterosis analysis for mineral elements by using cytoplasmic male-sterile systems in non-heading Chinese cabbage (*Brassica rapa*), *Crop Pasture Sci.*, 2018, vol. 69, no. 3, pp. 296–302.
70. Zelt, N.H., Schoen, D.J., Testing for heterosis in traits associated with seed yield in *Camelina sativa*, *Can. J. Plant Sci.*, 2016, vol. 96, no. 4, pp. 525–9. <https://doi.org/10.1139/CJPS-2015-0254>.
71. Jain, A., Bhatia, S., Banga, S.S., Prakash, S., and Lakshmikumaran, M., Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis, *Theor. Appl. Genet.*, 1994, vol. 88, pp. 116–22. <https://doi.org/10.1007/BF00222403>.
72. Kawamura, K., Kawanabe, T., Shimizu, M., Nagano, A.J., Saeki, N., Okazaki, K., Kaji, M., Dennis, E.S., Osabe, K., and Fujimoto, R., Genetic distance of inbred lines of Chinese cabbage and its relationship to heterosis, *Plant Gene*, 2016, vol. 5, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.10.003>.

Надійшла в редакцію 10.02.20  
Після доопрацювання 24.03.20  
Прийнята до друку 18.09.20