

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.085>

УДК 575.2:577.29:633.85

В.Г. Сахарова, <https://orcid.org/0000-0002-7335-8252>

Р.Я. Блюм, <https://orcid.org/0000-0003-4936-1803>

А.М. Рабоконь, <https://orcid.org/0000-0002-6249-1824>

Я.В. Пірко, <https://orcid.org/0000-0003-1887-5406>

Я.Б. Блюм, <https://orcid.org/0000-0001-7078-7548>

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ

E-mail: vl_saharova@ukr.net, blume.rostislav@gmail.com

Ефективність оцінювання генетичної різноманітності рижю дрібноплідного (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.) в Україні за допомогою SSR- та TBP-маркерів

Представлено академіком НАН України Я.Б. Блюмом

Досліджено молекулярно-генетичне різноманіття рижю дрібноплідного (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.) українського походження за допомогою методів оцінювання поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну (*tubulin-based polymorphism* (TBP)) та аналізу мікросателітних послідовностей (*simple sequence repeats* (SSR)). На основі отриманих ДНК-профілів досліджених зразків встановлено міжгенотипові генетичні відмінності рижю дрібноплідного і порівняно ефективність застосованих методів. Зроблено висновок про вищу ефективність TBP-методу для аналізу гербарних зразків у разі лімітованості рослинного матеріалу та високого ступеня пошкоженості ДНК через тривале зберігання.

Ключові слова: молекулярно-генетичні маркери, TBP (*tubulin based polymorphism*), SSR (*simple sequence repeats*), рижій дрібноплідний (*Camelina microcarpa*), генетичне різноманіття.

Рижій дрібноплідний (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.) вважається диким предком рижю посівного (*Camelina sativa* (L.) Crantz) — перспективної олійної культури, що в останні роки розглядається як потенційна сировина для виробництва рідких біопалив [1]. До переваг рижю посівного відносять здатність рости в умовах напівпосушливого клімату, високу стійкість до шкідників та патогенів, а також невибагливість до кількості поживних речовин [2]. Водночас олія *C. sativa* характеризується високим вмістом незамінних жирних

Цитування: Сахарова В.Г., Блюм Р.Я., Рабоконь А.М., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Ефективність оцінювання генетичної різноманітності рижю дрібноплідного (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.) в Україні за допомогою SSR- та TBP-маркерів. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2023. № 4. С. 85—94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.085>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2023. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

кислот (до 40 % загального вмісту олії), завдяки чому її можна успішно використовувати як корисну харчову добавку у раціоні людей та як якісний корм для худоби [3].

Для дослідження генетичного поліморфізму рижію посівного раніше активно використовували різноманітні ДНК-маркери, наприклад ILP, SSR, AFLP, SNP тощо [3—6]. За результатами цих досліджень було виявлено низький рівень генетичного різноманіття рижію посівного, що може обумовлюватися факультативною самозапильністю даної рослини [5]. Саме тому значний інтерес становить аналіз генетичного поліморфізму рижію дрібноплідного, що може бути використано для підвищення генетичного різноманіття і покращення сільськогосподарських характеристик культурного рижію, адже *C. microcarpa* має подібні з *C. sativa* розміри геному та однакову плоідність [7, 8] і здатна вільно схрещуватися з рижієм посівним [9]. Вивчення популяційної структури рижію дрібноплідного також може бути корисним для розуміння процесу еволюції різних видів роду *Camelina* та процесу окультурення *C. sativa* [7].

Для дослідження генетичного різноманіття рижію дрібноплідного нами застосовано метод оцінювання поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну (tubulin-based polymorphism (ТВР)), оскільки його було вже успішно використано для визначення генетичних ресурсів рослин на широкому спектрі видів [10]. Даний метод базується на значній консервативності екзонів та варіабельності інтронів генів β -тубуліну, що дає можливість використовувати всього одну комбінацію вироджених праймерів для аналізу будь-якої рослинної ДНК і отримувати одночасно з цим специфічний багатосмуговий ДНК-профіль (“штрих-код”) будь-якого виду вищих рослин [10, 11]. Крім того, ТВР-метод було успішно застосовано для аналізу зразків з деградованою ДНК [12], при цьому отримано достатньо інформації для диференціації видів [11], а в деяких випадках і окремих їх генотипів [10], що є надзвичайно важливим у роботі з гербарними зразками, які зберігалися тривалий час [13].

Також для аналізу генетичного різноманіття рижію нами використано мікросателітні маркери (simple sequence repeats (SSR)), за допомогою яких зазвичай оцінюють внутрішньовидовий генетичний поліморфізм під час маркер-опосередкованої селекції рослин [5]. Так, саме за допомогою набору SSR-маркерів було складено першу генетичну карту *C. sativa* [14].

Враховуючи всі вищенаведені аспекти, головною метою нашого дослідження було порівняння ефективності оцінювання генетичного різноманіття *C. microcarpa* українського походження за допомогою таких різних маркерних систем, як ТВР- та SSR-маркери.

Матеріали та методи. Рослинний матеріал для дослідження було відібрано з гербарних зразків *C. microcarpa*, зібраних в Україні і депонованих у гербарії Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (міжнародний акронім KW, за *Index Herbariorum*, <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>). У дослідженні використано 24 зразки з різних областей України (роки збору з 1863 по 2018), повний список яких наведено в таблиці.

Геному ДНК виділяли за допомогою DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) за протоколом, модифікованим нами для гербарних зразків [13]. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за допомогою ампліфікатора “Thermal Cycler 2720” (“Applied Biosystems”, США), використовуючи специфічні праймери до мікросателітних послідовностей (SSR-аналізу), що мали високу варіабельність під час дослідження *C. sativa* [5], та вироджені праймери до першого інтрону генів β -тубуліну (ТВР-аналіз) [4, 11].

ПЛР здійснювали з використанням набору реагентів для ампліфікації ДНК з “гарячим стартом” PCR mix 2x HOT (“Neogene”, Україна) і за відпрацьованими раніше протоколами для ТВР-аналізу [11, 13] та SSR-аналізу [5]. Продукти ампліфікації розділяли за допо-

могою вертикального електрофорезу в 6 %-му поліакриламідному гелі за неденатуруючих умов. Фрагменти ДНК візуалізували шляхом фарбування нітратом срібла. Довжину відтворюваних і найбільш чітких фрагментів визначали за допомогою маркера довжини ДНК O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США) [11].

Результати та обговорення. На першому етапі дослідження нами для молекулярно-генетичного аналізу зразків рижію дрібноплідного було застосовано ТВР-метод. Отриману електрофореграму з розподілом ампліфікованих фрагментів наведено на рис. 1, а. Значення довжини ампліконів варіювали в діапазоні 350—1500 п. н. Незважаючи на велику

Перелік гербарних зразків, використаних у дослідженні

№ з/п	Код зразка	Місце походження	Рік збору
1	KW134672 (JRB 184)	3 км на схід від с. Куровичі, Золочівський р-н (Львівська обл.)	2017
2	KW134673 (JRB 186)	с. Переліски, Бродівський р-н (Львівська обл.)	2017
3	KW134674 (JRB 187)	с. Підгайчики, Золочівський р-н (Львівська обл.)	2017
4	KW134675 (JRB 189)	м. Кременець (Тернопільська обл.)	2017
5	KW134676 (JRB 191)	м. Тальне (Черкаська обл.)	2017
6	KW134677 (JRB 192)	6 км на південний захід від м. Жашків (Черкаська обл.)	2017
7	KW134678 (JRB 193)	Між с. Городок та с. Леухи (Вінницька обл.)	2017
8	KW134679 (JRB 194)	сmt Теплик (Вінницька обл.)	2017
9	KW134680 (JRB 196)	Між с. Шляхова та с. Джулинка (Вінницька обл.)	2017
10	KW134681 (JRB 197)	с. Станіславове, Благовіщенський р-н (Кіровоградська обл.)	2017
11	KW140071	Західна околиця с. Куликівське, Бердянський р-н (Запорізька обл.)	2013
12	KW133416	сmt Ков'яги (Харківська обл.)	2014
13	n/a 1	с. Бірки, Зміївський р-н (Харківська обл.)	1922
14	n/a 2	м. Харків (нинішній район Журавлівка)	1863
15	KW005506	м. Київ (залізниця біля Байкового кладовища)	1921
16	KW00102425	Сумська обл., Липоводолинський р-н	Після 2000
17	KW010536	м. Київ, вул. Межигірська	1991
18	KW00111922	с. Водяно-Лорине, запов. Єланецький степ (Миколаївська обл.)	2014
19	KW010538	м. Київ, вул. Межигірська	1991
20	KW009202	м. Київ, Байкове — Деміївка	1902
21	KW088500	Між с. Жабокруки та с. Герасимов (Івано-Франківська обл.)	2010
22	KW127292	Між с. Іваново (Свердлово) та с. Благодатне (Одеська обл.)	2005
23	KW127801	Біля с. Оржиця на р. Гнила Оржиця (Полтавська обл.)	2016
24	KW132616	Окол. с. Виноградне (Запорізька обл.)	2018

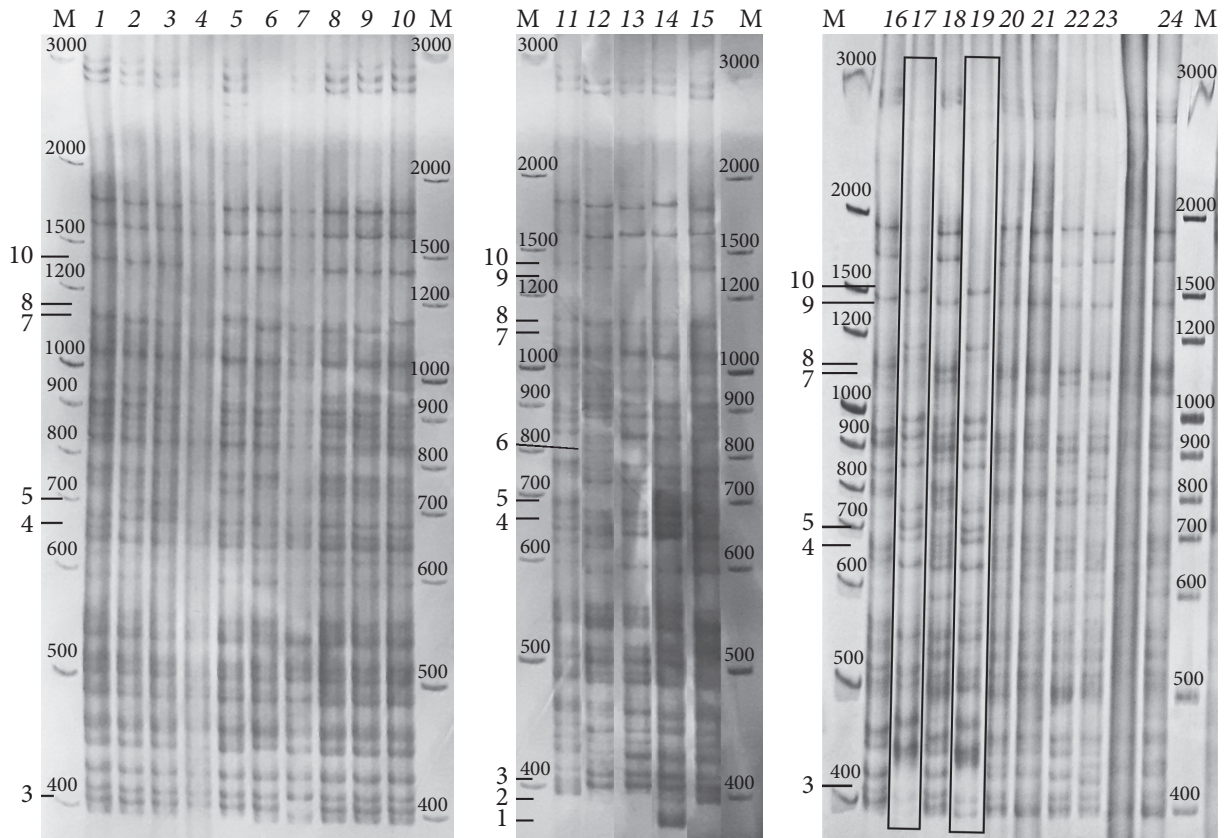
кількість ампліфікованих фрагментів інтронів генів β -тубуліну, характерних для кожного зразка, серед усіх досліджених зразків поліморфними виявилися лише 10 локусів, розмір ампліконів яких припадав на діапазони 300—500, 680—800 та 1100—1500 п. н. Зразки KW010536 (№ 17, див. таблицю) та KW010538 (№ 19), зібрані у м. Київ, хоча і мають спільні з іншими зразками амплікони, але характеризуються істотно відмінним ТВР-профілем (сім унікальних поліморфних смуг). Це дає підставу припустити, що зазначені зразки можуть належати до іншого виду, морфологічно подібного до *C. microcarpa*.

Ряд зразків мали амплікони, притаманні лише невеликій кількості аналізованих генотипів. Так, для зразків KW134673 (JRB 186, № 2) та KW134674 (JRB 187, № 3) з Львівської області і вже згаданих вище KW010536 (№ 17) та KW010538 (№ 19) характерною є наявність унікального фрагмента завдовжки 703 п. н. Також зразок n/a 2 (№ 14), зібраний біля м. Харків, має нетипові амплікони завдовжки 369 та 1315 п.н., які більше не виявлено у жодного з досліджених зразків. Більше того, унікальний фрагмент ДНК було зафіксовано для зразка KW140071 (№ 11) із Запорізької області — 696 п. н. Крім наявності специфічних смуг, спостерігається відсутність ампліконів (нуль-алелі) певної довжини. Так, наприклад, у зразка KW134678 (JRB 193, № 7) з Вінницької області та у двох зразків KW133416 (№ 12) та n/a 1 (№ 13) з Харківської області немає фрагмента завдовжки 393 п. н., який наявний у інших (21) зразків. На рис. 1, б проілюстровано плоди *C. microcarpa* на пізніх стадіях дозрівання, які спостерігалися в аналізованих гербарних зразків.

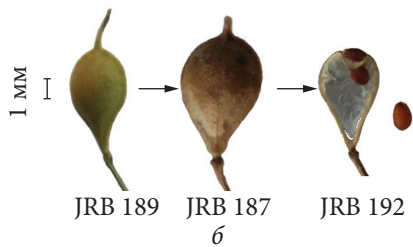
Спируючись на отримані ТВР-профілі, нами було обраховано значення коефіцієнта подібності Нея та Лі, що стало підґрунтям для побудови дендрограми (див. рис. 1, в). Встановлено, що зі 100 % значенням будстреп-підтримки окрему гілку формують два зразки, які, ймовірно, належать до іншого виду, — це згадані вище зразки KW10536 (№ 17) та KW10538 (№ 19). Для інших зразків встановлено дещо нижчі значення бутстреп-підтримки розподілу гілок на дендрограмі, однак розподіл основних великих клад був достовірним. Частина зразків не відрізнялися один від одного за молекулярно-генетичними профілями, через що під час реконструкції філогенії були виділені в окрему кладу, яка не мала диференціації на гілки нижчого порядку. Цей факт може свідчити про досить високу подібність генотипів у межах дослідженої популяції.

Дещо інші результати були отримані під час аналізу довжин ампліконів, визначених з використанням п'яти SSR-маркерів (Lib19, P6E4, P3C3, P4E6, P4C2). За маркером P6E4 найістотніше від усіх відрізнявся зразок KW132616 (№ 24) із Запорізької області, однак за іншими SSR-маркерами він не мав значних відмінностей. Варто також зазначити, що у переважній більшості випадків зразки однозначно не диференціювалися за їх географічним походженням, що, однак, може бути уточнено в подальшому під час аналізу більш широкої вибірки генотипів. Раніше повідомлялося, що в Україні можуть бути виділені дві окремі популяції рижію дрібноплідного: південна та північна [15].

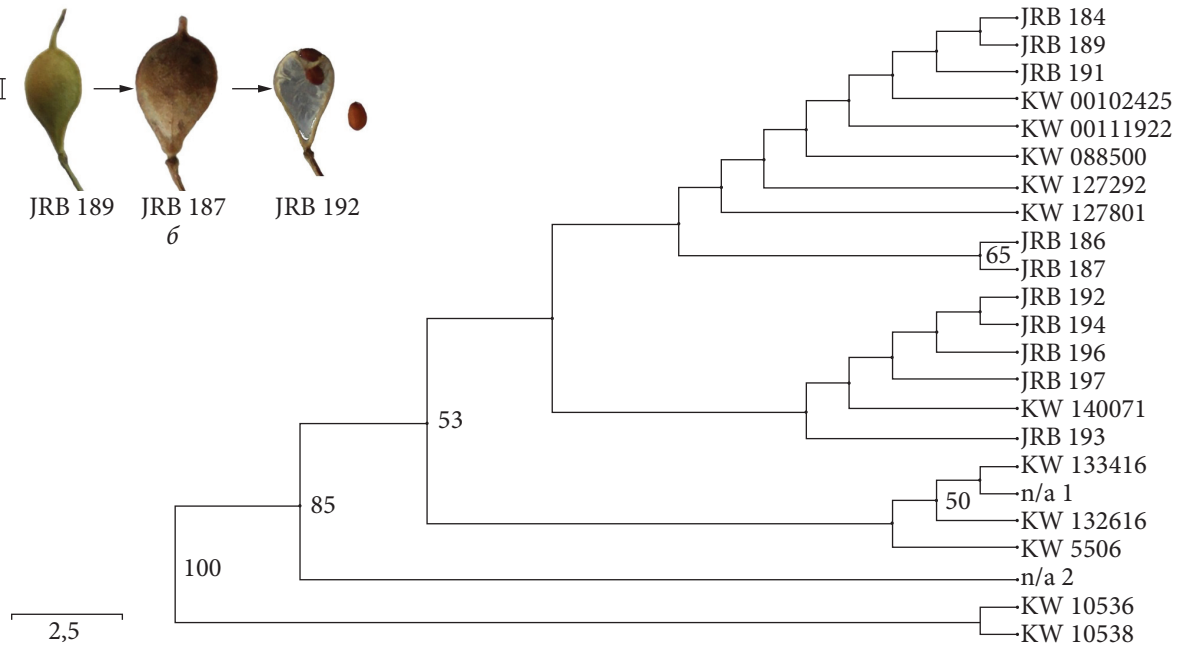
Найбільш чіткий розподіл зразків за географічною ознакою спостерігався у разі використання SSR-маркера до локусу P3C3 (рис. 2, а). Розмір ампліконів локусу P3C3 варіював у діапазоні 174—183 п. н. Як і у випадку ТВР-аналізу, зразки KW010536 (№ 17) та KW010538 (№ 19) відрізнялися від інших проаналізованих генотипів за локусом P3C3 і мали унікальні смуги завдовжки 179 п. н. Однак варто зазначити, що згідно з результатами аналізу за іншими SSR-локусами ці зразки не відрізнялися від інших представників *C. microcarpa*. На рис. 2, б для порівняння наведено зовнішній вигляд плодів *C. sativa* та *C. microcarpa* на пізніх стадіях дозрівання.



a



б



в

Рис. 1. Результати ТВР-аналізу: а — електрофоретичне розділення ампліфікованих фрагментів інтронів генів β -тубуліну зразків *C. microcarpa* (1—24, див. табл.), М — ДНК-маркер “100bp Plus Ladder”. Прямокутниками виділено два найбільш відмінних зразка, 1—10 (збоку) — поліморфні фрагменти; б — плоди *C. microcarpa* на різних стадіях зрілості (зліва направо: плід на середньопізній стадії дозрівання, повністю дозрілий плід з осипаним носиком, осипаний дозрілий плід (видно перетинку) та насінина); в — дендрограма, що показує генетичну подібність досліджених зразків, побудована на основі даних ТВР-аналізу

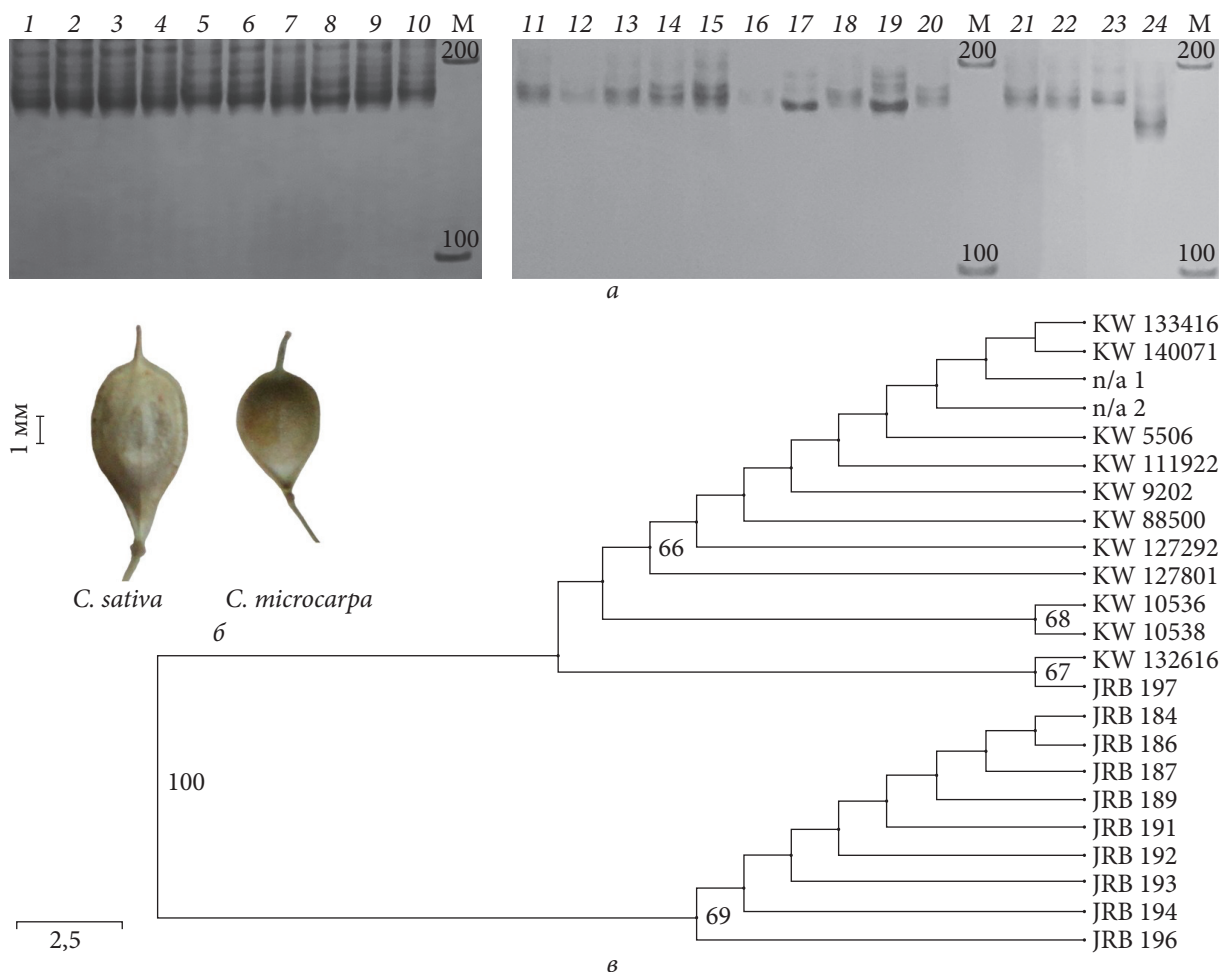


Рис. 2. Результати SSR-аналізу: *a* — електрофоретичне розділення ампліфікованих фрагментів SSR-локусу P3C3 зразків *C. microcarpa* (1—24, див. табл.), М — ДНК-маркер “100bp Plus Ladder”; *б* — плоди *C. sativa* (зібрано в околицях смт Бородянка, Київська обл., 1943) та *C. microcarpa* (зібрано с. Бірки, Харківська обл., 1922, — n/a 1 у роботі) на пізніх стадіях зрілості; *в* — дендрограма, що показує генетичну подібність досліджених зразків, побудована на основі даних SSR-аналізу за локусом P3C3

На підставі результатів SSR-аналізу за локусом P3C3 побудовано дендрограму генетичної подібності зразків *C. microcarpa* (див. рис. 2, *в*). Встановлено достовірний розподіл проаналізованих зразків на дві великі клади: одна складається зі зразків з Львівської, Тернопільської та Черкаської областей, в іншій представлені переважно зразки з Центральної та Південної України. Варто також зазначити, що зразки не групувалися (у клади нижчого порядку) відповідно до регіону їх походження, що спостерігалось у разі використання інших згаданих SSR-маркерів.

У результаті SSR-аналізу з використанням маркерів P3C3, P4C2, P4E6 в одну групу виділилися зразки з Львівської та Вінницької областей, які не мали унікальних фрагментів і не диференціювалися за допомогою ТВР-аналізу. Необхідно відзначити, що, наприклад, зразки KW134673 (JRB 186, № 2) та KW134678 (JRB 193, № 7) були відмінними за ТВР-профілем, однак при цьому мали однакові амплікони SSR-локусу P3C3.

Таким чином, у дослідженні було порівняно ефективність використання TBP- і SSR-маркерних систем для диференціації генотипів *C. microcarpa*, що походять з різних частин української популяції цього виду. Встановлено, що навіть гексаплоїдний рижій дикого типу виявляє низький рівень генетичного різноманіття, що ускладнює диференціацію різних його генотипів, так само як і у випадку культурного рижію [5, 16]. Варто зазначити, що цей факт пов'язаний саме з видовими особливостями *C. microcarpa*, оскільки раніше нами було показано на прикладі льону-довгунцю, що обидва методи (SSR та TBP) дають змогу виявляти внутрішньосортову генетичну гетерогенність [17]. Подібна більш низька генетична гетерогенність рижію пояснюється низкою факторів, зокрема складною історією поліплоїдії неогексаплоїдних видів *Camelina* [7], а також факультативною самозапильністю рижію [5, 9].

Варто зазначити, що найбільш репрезентативним було б використання комбінації TBP- та SSR-маркерних систем для аналізу генетичного різноманіття рижію дрібноплідного. Вважається, що SSR-маркери краще підходять для розрізнення рослин на рівні генотипів, оскільки базуються на гіперваріабельності мікросателітних локусів, а TBP-аналіз краще підходить для ДНК-баркодингу на рівні видів [12]. Однак не було настільки однозначно у випадку аналізу зразків *C. microcarpa*, оскільки частина SSR-локусів виявилися досить консервативними, тоді як за допомогою TBP-аналізу вдалося доволі ефективно розрізнити значну частину генотипів. Також істотною перевагою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів β -тубуліну є те, що він дає можливість охопити значну частину локусів у гексаплоїдному геномі рижію (яких понад 20) [4] у рамках однієї ПЛР, тоді як аналіз поліморфізму мікросателітних маркерів зазвичай спрямований на один локус [5] (у рижію культурного та дрібноплідного до трьох через їх гексаплоїдну природу).

Раніше було показано, що TBP-аналіз можна успішно проводити за наявності достатньо малих кількостей ДНК, до того ж цей метод виявився досить ефективним навіть у разі частково деградованої ДНК, що є проблемою під час застосування сиквенування для аналізу генетичного поліморфізму [12]. І хоча аналіз поліморфізму SSR-маркерів також є аналогічно не таким вибагливим до якості вихідної ДНК, однак TBP-аналіз забезпечує вищу інформативність аналізу (дає змогу охопити більше незчеплених локусів у геномі) у ході проведення лише однієї ПЛР. Даний факт є особливо важливим під час роботи з гербарними зразками через обмежені можливості неструктивного вилучення рослинного матеріалу, а також через неминучу деградацію геномної ДНК у рослинних зразках, що є особливо помітним для старих зразків з історичних колекцій [13]. Саме тому в умовах обмеженої кількості рослинного матеріалу, в якому через тривале або некоректне зберігання може бути значною мірою деградована ДНК, варто надавати перевагу TBP-методу, що дає змогу отримати більше інформації про генетичний поліморфізм з використанням меншої кількості ДНК та невідновлюваного рослинного матеріалу з гербарних зразків.

Дослідження проведені в рамках проекту для дослідницьких груп молодих вчених НАН України «Генетичне різноманіття та популяційно генетична структура рижію дрібноплідного в українській частині його центру походження» (2022—2023 рр.) (державний реєстраційний № 0122U002196).

Автори роботи висловлюють вдячність співробітникам Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України чл.-кор. НАН України С.Л. Мосякіну (директор Інституту) та канд. біол. наук Н.М. Шиян (куратор гербарію Інституту, KW) за практичні консультації та допомогу під час виконання досліджень.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Blume R.Y., Rakhmetov D.B., Blume Y.B. Evaluation of Ukrainian *Camelina sativa* germplasm productivity and analysis of its amenability for efficient biodiesel production. *Ind. Crops Prod.* 2022. **187B**. 115477. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115477>
2. Obour A.K., Sintim H.Y., Obeng E., Jeliakov (Zheljzkov) V.D. Oilseed camelina (*Camelina sativa* L. Crantz): production systems, prospects and challenges in the USA Great Plains. *Adv. Plants Agric. Res.* 2015. **2**, № 2. 00043. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00043>
3. Ghamkhar K., Croser J., Aryamanesh N., Campbell M., Kon'kova N., Francis C. Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an alternative oilseed: molecular and ecogeographic analyses. *Genome*. 2010. **53**. P. 558—567. <https://doi.org/10.1139/G10-034>
4. Galasso I., Manca A., Braglia L., Ponzoni E., Breviario D. Genomic fingerprinting of *Camelina* species using cTBP as molecular marker. *Am. J. Plant Sci.* 2015. **6**. P. 1184—1200. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.68122>
5. Manca A., Pecchia P., Mapelli S., Masella P., Galasso I. Evaluation of genetic diversity in a *Camelina sativa* (L.) Crantz collection using microsatellite markers and biochemical traits. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012. **60**. P. 1223—1226. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9913-8>
6. Luo Z., Brock J., Dyer J.M., Kutchan T., Schachtman D., Augustin M., Ge Y., Fahlgren N., Abdel-Haleem H. Genetic diversity and population structure of a *Camelina sativa* spring panel. *Front. Plant Sci.* 2019. **10**. 184. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00184>
7. Chaudhary R., Koh C.S., Kagale S., Tang L., Wu S.W., Lv Z., Mason A.S., Sharpe A.G., Diederichsen A., Parkin I.A.P. Assessing diversity in the *Camelina* genus provides insights into the genome structure of *Camelina sativa*. *G3: Genes, Genomes, Genet.* 2020. **10**, № 4. P. 1297—1308. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400957>
8. Brock J.R., Dönmez A.A., Beilstein M.A., Olsen K.M. Phylogenetics of *Camelina* Crantz. (Brassicaceae) and insights on the origin of gold-of-pleasure (*Camelina sativa*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. **127**. P. 834—842. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.031>
9. Martin S.L., Lujan-Toro B.E., Sauder C.A., James T., Ohadi S., Hall L.M. Hybridization rate and hybrid fitness for *Camelina microcarpa* Andr. ex DC (♀) and *Camelina sativa* (L.) Crantz (Brassicaceae) (♂). *Evol. Appl.* 2019. **12**. P. 443—455. <https://doi.org/10.1111/eva.12724>
10. Рабоконь А.М. Поліморфізм довжини інтронів генів тубуліну як ефективний інструмент генетичної диференціації рослин. *Вісн. НАН України*. 2021. № 10. С. 30—35. <https://doi.org/10.15407/vism2021.10.030>
11. Braglia L., Gavazzi F., Gianì S., Morello L., Breviario D. Tubulin-based polymorphism (TBP) in plant genotyping. *Plant genotyping*: Shavrukov Y. (eds.). New York, NY: Humana, 2023. P. 387—401. (Methods in Molecular Biology. Vol. 2638). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2_28
12. Bog M., Braglia L., Morello L., Noboa Melo K.I., Schubert I., Shchepin O.N., Sree K.S., Xu S., Lam E., Appenroth K.J. Strategies for intraspecific genotyping of duckweed: comparison of five orthogonal methods applied to the giant duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Plants*. 2022. **11**. 3033. <https://doi.org/10.3390/plants11223033>
13. Сахарова В.Г., Блюм Р.Я., Рабоконь А.М., Пірко Я.В., Мосякін С.Л., Блюм, Я.Б. Порівняння методів виділення ДНК із гербарних зразків рижю дрібноплідного (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.). *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2022. **30**. С. 30—36. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v30.1457>
14. Gehringer A., Friedt W., Lühs W., Snowdon R.J. Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). *Genome*. 2006. **49**. P. 1555—1563. <https://doi.org/10.1139/g06-117>
15. Brock J.R., Scott T., Lee A.Y., Mosyakin S.L., Olsen K.M. Interactions between genetics and environment shape *Camelina* seed oil composition. *BMC Plant Biol.* 2020. **20**. 423. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02641-8>
16. Blume R.Y., Rabokon' A.M., Postovoitova A.S., Demkovich A.Ye., Pirko Ya.V., Yemets A.I., Rakhmetov D.B., Blume Ya.B. Evaluating the diversity and breeding prospects of Ukrainian spring camelina genotypes. *Cytol. Genet.* 2020. **54**, № 5. P. 420—436. <https://doi.org/10.3103/S0095452720050084>
17. Rabokon A.N., Pirko Ya.V., Demkovich A.Ye., Blume Ya.B. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.* 2018. **52**. P. 1—10. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010115>

Надійшло до редакції 18.04.2023

REFERENCES

1. Blume, R. Y., Rakhmetov, D. B. & Blume, Y. B. (2022). Evaluation of Ukrainian *Camelina sativa* germplasm productivity and analysis of its amenability for efficient biodiesel production. *Ind. Crops Prod.*, 187B, 115477. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115477>
2. Obour, A.K., Sintim, H.Y., Obeng, E. & Jeliakov (Zheljazkov), D. V. (2015). Oilseed camelina (*Camelina sativa* L. Crantz): production systems, prospects and challenges in the USA Great Plains. *Adv. Plants Agric. Res.*, 2, No. 2, 00043. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00043>
3. Ghamkhar, K., Croser, J., Agyamanesh, N., Campbell, M., Kon'kova, N. & Francis, C. (2010). Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an alternative oilseed: molecular and ecogeographic analyses. *Genome*, 53, pp. 558-567. <https://doi.org/10.1139/G10-034>
4. Galasso, I., Manca, A., Braglia, L., Ponzoni, E. & Breviario, D. (2015). Genomic fingerprinting of *Camelina* species using cTBP as molecular marker. *Am. J. Plant Sci.*, 6, pp. 1184-1200. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.68122>
5. Manca, A., Pecchia, P., Mapelli, S., Masella, P. & Galasso, I. (2012). Evaluation of genetic diversity in a *Camelina sativa* (L.) Crantz collection using microsatellite markers and biochemical traits. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 60, pp. 1223-1226. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9913-8>
6. Luo, Z., Brock, J., Dyer, J. M., Kutchan, T., Schachtman, D., Augustin, M., Ge, Y., Fahlgren, N. & Abdel-Haleem, H. (2019). Genetic diversity and population structure of a *Camelina sativa* spring panel. *Front. Plant Sci.*, 10, 184. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00184>
7. Chaudhary, R., Koh, C. S., Kagale, S., Tang, L., Wu, S. W., Lv, Z., Mason, A. S., Sharpe, A. G., Diederichsen, A., & Parkin, I.A.P. (2020). Assessing diversity in the *Camelina* genus provides insights into the genome structure of *Camelina sativa*. *G3: Genes, Genomes, Genet.*, 10, No. 4, pp. 1297-1308. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400957>
8. Brock, J. R., Dönmez, A. A., Beilstein, M. A. & Olsen, K. M. (2018). Phylogenetics of *Camelina* Crantz. (Brassicaceae) and insights on the origin of gold-of-pleasure (*Camelina sativa*). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 127, pp. 834-842. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.031>
9. Martin, S. L., Lujan-Toro, B. E., Sauder, C. A., James, T., Ohadi, S. & Hall, L. M. (2019). Hybridization rate and hybrid fitness for *Camelina microcarpa* Andr. ex DC (♀) and *Camelina sativa* (L.) Crantz (Brassicaceae) (♂). *Evol. Appl.*, 12, pp. 443-455. <https://doi.org/10.1111/eva.12724>
10. Rabokon, A. M. (2021). Intron length polymorphism of tubulin genes as an effective tool for genetic plant differentiation. *Visn. Nac. Acad. Nauk Ukr.*, No. 10, pp. 30-35 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/visn2021.10.030>
11. Braglia, L., Gavazzi, F., Gianì, S., Morello, L., & Breviario, D. (2023). Tubulin-based polymorphism (TBP) in plant genotyping. In Shavrukov, Y. (Eds.). *Plant genotyping. Methods in Molecular Biology.* (Vol. 2638). (pp. 387-401). New York, NY: Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2_28
12. Bog, M., Braglia, L., Morello, L., Noboa Melo, K. I., Schubert, I., Shchepin, O. N., Sree, K. S., Xu, S., Lam, E. & Appenroth, K. J. (2022). Strategies for intraspecific genotyping of duckweed: comparison of five orthogonal methods applied to the giant duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Plants*, 11, 3033. <https://doi.org/10.3390/plants11223033>
13. Sakharova, V. H., Blume, R. Ya., Rabokon, A. N., Pirko, Ya. V., Mosyakin, S. L. & Blume, Ya. B. (2022). Comparison of methods of DNA extraction from herbarium specimens of little-pod false flax (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.). *Factors Exp. Evol. Organisms.*, 30, pp. 30-36 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.7124/FEEO.v30.1457>
14. Gehringer, A., Friedt, W., Lühs, W. & Snowdon, R. J. (2006). Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). *Genome*, 49, pp. 1555-1563. <https://doi.org/10.1139/g06-117>
15. Brock, J. R., Scott, T., Lee, A. Y., Mosyakin, S. L. & Olsen, K. M. (2020). Interactions between genetics and environment shape *Camelina* seed oil composition. *BMC Plant Biol.*, 20, 423. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02641-8>
16. Blume, R. Y., Rabokon, A. M., Postovoiyeva, A. S., Demkovich, A. Ye., Pirko, Ya. V., Yemets, A. I., Rakhmetov, D. B. & Blume, Ya. B. (2020). Evaluating the diversity and breeding prospects of Ukrainian spring camelina genotypes. *Cytol. Genet.*, 54, No. 5, pp. 420-436. <https://doi.org/10.3103/S0095452720050084>
17. Rabokon, A. N., Pirko, Ya. V., Demkovich, A. Ye. & Blume, Ya. B. (2018). Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.*, 52, pp. 1-10. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010115>

Received 18.04.2023

V. H. Sakharova, <https://orcid.org/0000-0002-7335-8252>

R. Ya. Blume, <https://orcid.org/0000-0003-4936-1803>

A.N. Rabokon, <https://orcid.org/0000-0002-6249-1824>

Ya. V. Pirko, <https://orcid.org/0000-0003-1887-5406>

Ya.B. Blume, <https://orcid.org/0000-0001-7078-7548>

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: vl_saharova@ukr.net, blume.rostislav@gmail.com

EFFICIENCY OF GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT OF LITTLE-POD FALSE FLAX
(*CAMELINA MICROCARPA* ANDRZ. EX DC.) IN UKRAINE USING SSR AND TBP MARKER SYSTEMS

The molecular genetic diversity of Ukrainian little-pod false flax (*Camelina microcarpa* Andrz. ex DC.) was assessed using two methods: tubulin-based polymorphism (TBP), which is based on length polymorphism of the first intron of β -tubulin genes, and microsatellite sequences (SSR — simple sequence repeats). The study was aimed to investigate the genetic diversity among the analyzed little-pod false flax accessions and determine the comparative effectiveness of the employed molecular methods. Furthermore, the suitability of prioritizing the TBP method for the analysis of herbarium specimens, considering the limited plant material and potential DNA damage caused by long-term storage, was demonstrated.

Keywords: molecular markers, TBP (Tubulin-Based Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), little-pod false flax (*Camelina microcarpa*), genetic diversity.