

# ГЕНОТИПУВАННЯ ВНУТРІШНЬОВИДОВИХ ГІБРИДІВ *BRASSICA RAPA* НА ОСНОВІ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ $\beta$ -ТУБУЛІНУ (ТВР/сТВР)

А.М. РАБОКОНЬ<sup>1</sup>, Р.Я. БЛЮМ<sup>1</sup>, В.Г. САХАРОВА<sup>1</sup>, М.І. ЧОПЕЙ<sup>2</sup>,  
К.С. АФНАСЬЄВА<sup>2</sup>, Д.Б. РАХМЕТОВ<sup>3</sup>, Я.В. ПІРКО<sup>1</sup>, Я.Б. БЛЮМ<sup>1</sup>

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

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

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

E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net; blume.rostislav@gmail.com, jamal\_r@bigmir.net, aphon@ukr.net

Родина Хрестоцвітих (*Brassicaceae*) включає значну кількість економічно важливих сільськогосподарських культур, зокрема *Brassica rapa*, котра є зручним модельним об'єктом для молекулярно-генетичних досліджень олійних культур. *B. rapa* є високополіморфним видом, який включає в себе велику значну кількість генетично відмінних підвидів. З огляду на це внутрішньовидова (міжпідвидова) гібридизація *B. rapa* розглядається як перспективний селекційний підхід, спрямований на підвищення генетичного різноманіття. Раніше нами було показано, що один з таких гібридів, олійний тифон (*B. rapa* subsp. *oleifera* f. *biennis* × (subsp. *rapifera* × *pekinensis*)), завдяки підвищеній продуктивності може слугувати цінною олійною сировиною. Однак, отримання гібридів та їх подальша селекція вимагають залучення комплексу молекулярних маркерів. Наразі високу точність при ідентифікації (ДНК-баркодингу) таксономічних одиниць різного рівня у квіткових рослин показав метод оцінки поліморфізму довжини 1-го (ТВР) та 2-го (сТВР) інтронів  $\beta$ -тубуліну. Саме тому нами було здійснено оцінку продуктивності таких гібридних культур, як тифон, а також проведено ДНК-баркодинг та їх різних гібридних ліній тифону та їх батьківських підвидів *B. rapa* на основі поліморфізму довжини інтронів  $\beta$ -тубуліну у аналізованих генотипів. На основі даних молекулярно-генетичного аналізу, що включав оцінку варіації довжини обох інтронів генів  $\beta$ -тубуліну вдалося підтвердити походження цього гібриду від голландського тифону (*B. rapa* subsp. *rapifera* × *pekinensis*) та озимої суріпиці (*B. rapa* subsp. *oleifera*) з високою достовірністю. Наряду з цим за допомогою комбінованого аналізу ТВР та сТВР вперше вдалося диференціювати таксономічні групи var. *glabra* та var. *laxa* пекинської капусти (*B. rapa* subsp. *pekinensis*). Було відмічено варіацію кількості ампліфікованих ділянок інтронів  $\beta$ -тубуліну в різних генотипів, однак дані відмінності не були характерною рисою того чи іншого підвиду/гібриду. Це дозволяє стверджувати, що гібриди найімовірніше не відрізняються за плоїд-

ністю від батьківських генотипів. Також, було показано, що згадані гібридні лінії олійного тифону української селекції виказують значний рівень морфологічної варіації, незважаючи на їхнє спільне селекційне походження.

**Ключові слова:** *Brassicaceae*, *Brassica rapa*, ІЛР, генотипування, ДНК-баркодинг, гібридні олійні культури.

**Вступ.** Родина Хрестоцвітих (*Brassicaceae*) включає значну кількість економічно важливих видів, які вирощуються як олійні, харчові та кормові культури. Найбільш широкого розповсюдження набули рослини роду *Brassica*, зокрема *Brassica napus* (ріпак), *B. oleracea* (капуста городня), *B. rapa* subsp. *oleifera* (syn. *B. campestris*) (суріпиця), *B. nigra* (чорна гірчиця), *B. carinata* (абіссинська гірчиця) та *B. juncea* (гірчиця сарептська) (Downey, 1983; Warwick, 2011). В той же час певні види в межах цієї родини, такі як рижій посівний (*Camelina sativa*), абіссинська гірчиця, суріпиця, мають надзвичайно високий потенціал для використання як джерела олії для виробництва рідких біопалив, в тому числі і авіаційного біопалива (Chu et al, 2017; Tao et al, 2017).

Так види, як *B. rapa* мають не лише важливе економічне значення, а і є зручними модельними об'єктами для молекулярно-генетичних та біотехнологічних досліджень олійних культур. Близькість *B. rapa* до загальновідомої диплоїдної модельної рослини *Arabidopsis thaliana*, а також детально охарактеризована геномна організація цього виду (Zhang et al, 2018) роблять його зручним і для таких прикладних досліджень, як селекційно-генетичні, спрямовані на отримання внутрішньо- та міжвидових гібридів (Cheng et al, 2016). Варто зазначити, що *B. rapa* має АА геном Хрестоцвітих, який є одним з батьківських геномів ріпаку (ААСС) (Warwick, 2011; Zhang et al, 2018).

Раніше було показано, що *B. napus* та *B. rapa* можуть природньо утворювати гібриди (Warwick et al, 2003; Allainguillaume et al, 2006; Sohn et al, 2016).

*B. rapa* є високополіморфним видом, який включає в себе велику кількість важливих сільськогосподарських культур. Найбільш поширеними є турнепс (subsp. *rapa*; syn. subsp. *rapifera*), який формує листову розетку, суріпиця (subsp. *oleifera*, в ряді робіт позначається як *B. campestris*) і польова гірчиця (subsp. *dichotoma*), що використовуються для отримання олій; а також жовтий сарсон однорічний (subsp. *trilobularis*), що теж використовується для отримання олії; пекинська капуста (ssp. *pekinensis*), пак-чой (subsp. *chinensis*), листовий турнепс (subsp. *nipposinica*) (Warwick, 2011; Cheng et al, 2016)

При цьому гібридизація між різними підвидами в межах цього призводить до суттєвих геномних варіацій, зокрема спостерігається значна кількість одонуклеотидних замін та інделів, що охоплюють в тому числі і кодуєчі частини генів (Cheng et al, 2016). Оскільки внутрішньовидова (міжпідвидова) гібридизація *B. rapa* дозволяє отримувати високополіморфне потомство, такий підхід розглядається як перспективний для селекції даної культури та підвищення генетичного різноманіття гібридних ліній. Більше того, отримання внутрішньовидових гібридів Хрестоцвітих рідше призводить до стерильності потомства, ніж міжвидова гібридизація (Kaneko and Bang, 2014). На сьогодні існує ряд широко культивованих листових гібридів *B. rapa* кормового призначення (Robinson, 2006; de Ruiter et al, 2009). Зокрема такі як 'Pasja' (*B. rapa* subsp. *chinensis* × гібридний турнепс (subsp. *rapa*)) (Villalobos and Brummer, 2015); листовий гібрид Тифон, або 'Holland greens' (*B. rapa* subsp. *pekinensis* × *rapifera*) (Guillard and Allinson, 1988; Rakhmetov and Rakhmetova, 2015); 'Perko' (*B. rapa* subsp. *chinensis* × (4x) *oleifera*) (Dalkiewicz-Baranowska and Wilczyńska, 1981; Gotlin Čuljak et al, 2016), а також міжвидові гібриди 'Perko PVH' (*B. napus* var. *napus* × *B. rapa* subsp. *chinensis*) (Mikić et al, 2014); та 'T-Raptor' (*B. napus* × *rapa*) (Crowell et al, 2022). Раніше нами було показано, що один з таких гібридів, тифон (*B. rapa* subsp. *oleifera* f. *biennis* × (subsp. *rapifera* × *pekinensis*)) (Rakhme-

tov and Rakhmetova, 2015), завдяки підвищеній продуктивності може слугувати як цінною олійною сировиною для виробництва біопалив, так і кормовою культурою (Blume et al, 2019; Blume et al, 2020a,b).

Однак, отримання внутрішньовидових гібридів та їх подальша селекція вимагають залучення комплексу молекулярних маркерів, котрі дозволяють відслідкувати їх походження та підтвердити, власне, гібридний статус таких ліній. Особливо це важливо у випадку таких комплексних гібридів, як тифон, котрий є результатом схрещування декількох різних підвидів *B. rapa* (Rakhmetov and Rakhmetova, 2015). Наразі високу точність при ідентифікації (ДНК-баркодингу) таксономічних одиниць різного рівня у квіткових рослин продемонстрував метод оцінки поліморфізму довжини інтронів β-тубуліну (ТВП) (Braglia et al, 2022). Даний метод базується на тому факті, що через надзвичайно важливу функцію β-тубуліну в клітинах послідовності екзонів його генів є досить консервативними в усіх еукаріотичних організмів, на відміну від більш варіабельних інтронів (Bardini et al, 2004; Breviaro et al, 2013). Даний метод засвідчив ефективність свого застосування на різних родинях рослин (Rabokon, 2021; Braglia et al, 2022).

Зокрема, раніше нами було продемонстровано доцільність застосування даного підходу для розрізнення міжвидових гібридів між *Prunus dulcis* та *Prunus persica*, а також внутрішньовидових гібридів *P. persica* (Lykholat et al, 2022). Також, даний метод продемонстрував значну ефективність при диференціації видів роду *Linum* (Rabokon et al, 2018), представників родини Fabaceae (Braglia et al, 2020), ідентифікації природних міжвидових гібридів видів роду *Lemna* (Braglia et al, 2021), а також при ДНК-баркодингу диплоїдних та алополіплоїдних видів *Triticum* (Guadalupi, et al, 2022). Даний метод продемонстрував свою ефективність в тому числі і при аналізі представників родини Хрестоцвіти, зокрема при оцінці внутрішньовидового різноманіття *B. rapa* subsp. *pekinensis* (Blume et al, 2020a), при розрізненні видів *Camelina* та ідентифікації плідності окремих таксонів цього роду (Galasso et al, 2015), а також при оцінці генетичного різно-

маніття сортів *C. sativa* (Blume et al, 2020c) та аналізі популяційної структури *C. microcarpa* в Україні (Sakharova et al, 2023).

Саме тому, враховуючи усе згадане вище, у даній роботі нами було здійснено оцінку продуктивності таких гібридних культур, як тифон, а також проведено ДНК-баркодинг та їх різних гібридних ліній тифону та їх батьківських підвидів *B. rapa* на основі поліморфізму довжини інтронів  $\beta$ -тубуліну у аналізованих генотипів.

**Матеріали та методи.** Рослинний матеріал. Для досліджень було використано насіння генотипів *B. rapa*, що належать до різних підвидів, зокрема subsp. *pekinensis* var. *laxa*, subsp. *pekinensis* var. *glabra*, а також гібридних форм тифону (таблиця). Лінії тифону були представлені гібридами двох типів: перший – голландської селекції, котрий є результатом схрещування пекінської капусти (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) та турнепсу (*B. rapa* subsp. *rapifera*); а другий – отриманий у Національному ботанічному саду (НБС) ім. М.М. Гришка НАН України в результаті схрещування голландського тифону (*B. rapa* subsp. *pekinensis*  $\times$  *rapifera*) та озимої суріпиці (*B. rapa* subsp. *oleifera* f. *biennis*  $\equiv$  *B. cam-*

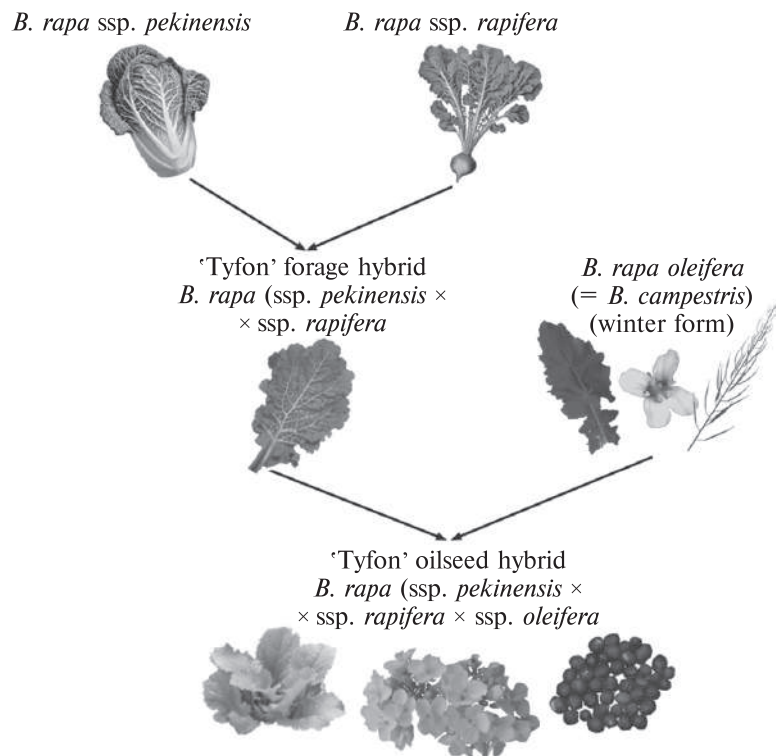
*pestris*) (Rakhmetov and Rakhmetova, 2015). Селекційна історія двох типів тифону наведена на рис. 1. Насіння аналізованих генотипів було отримано від Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (ІПК) («Гатерслебен», Німеччина), Crop Research Institute (CRI) (Прага, Чеська Республіка) та від НБС ім. М.М. Гришка. Назви та систематичне положення використаних у дослідженні генотипів наведені у таблиці.

**Польові дослідження.** Оцінка морфологічних показників різних генотипів тифону (*B. rapa* subsp. *oleifera*  $\times$  (*rapifera*  $\times$  *pekinensis*)) на дослідних ділянках НБС ім. М.М. Гришка НАН України протягом 2012–2014 рр. за умов, описаних нами у попередніх роботах (Blume et al, 2020b). Під час польових дослідів у фазі технічної стиглості фіксували наступні морфологічні характеристики аналізованих генотипів тифону: висота рослини, кількість стручків на основному та бічних пагонах, кількість насінин у стручках з основного та бічного пагонів, діаметр та довжина стручка (на основному стеблі), маса надземної частини рослин, вага тисячі насінин.

**Зразки *B. rapa*, використані у дослідженні, та їхнє походження**

Форма	Колекція	Назва зразка	Код зразка	Місце знаходження
subsp. <i>pekinensis</i> var. <i>glabra</i>	ІПК	Zwaans Cantoner	BRA 130	Нідерланди
subsp. <i>pekinensis</i> var. <i>glabra</i>	ІПК	Jaegerkohl	BRA 467	Швейцарія
subsp. <i>pekinensis</i> var. <i>glabra</i>	ІПК	Granat	BRA 1614	Нідерланди
subsp. <i>pekinensis</i> var. <i>laxa</i>	ІПК	–	BRA 1600	США
subsp. <i>pekinensis</i> var. <i>laxa</i>	ІПК	Santong	BRA 214	Німеччина
subsp. <i>pekinensis</i> var. <i>laxa</i>	ІПК	–	BRA 2324	Китай
subsp. <i>oleifera</i>	CRI	Ruvo	15O0400043	Німеччина
subsp. <i>oleifera</i>	ІПК	–	CR3386	Іспанія
subsp. <i>oleifera</i>	ІПК	–	CR2240	Ірак
subsp. <i>oleifera</i>	ІПК	–	CR3452	Куба
subsp. <i>oleifera</i>	ІПК	–	CR2303	Італія
subsp. <i>oleifera</i>	ІПК	Brokkoli rapa	CR1478	США
Tyfon <sup>1</sup>	ІПК	Tyfon ('Holland greens')	BRA 2532	Нідерланди
Tyfon <sup>2</sup>	НБС	Обрій	–	Україна
Tyfon <sup>2</sup>	НБС	Оракам	–	Україна
Tyfon <sup>2</sup>	НБС	ЕОТФВ	–	Україна
Tyfon <sup>2</sup>	НБС	ЕОТФВС	–	Україна
Tyfon <sup>2</sup>	НБС	Фітопал	–	Україна
subsp. <i>oleifera</i> f. <i>biennis</i>	НБС	Оріана	–	Україна
subsp. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i>	НБС	ЕОСЯФ-2	–	Україна

Примітка. Tyfon<sup>1</sup> – *B. rapa* subsp. *pekinensis*  $\times$  *rapifera*; Tyfon<sup>2</sup> – *B. rapa* subsp. *oleifera*  $\times$  (*rapifera*  $\times$  *pekinensis*).



**Рис. 1.** Селекційна історія отримання листового тифону голландської селекції (*B. rapa* subsp. *pekinensis* × *rapifera*) та олійного тифону української селекції (*B. rapa* subsp. *oleifera* × (*rapifera* × *pekinensis*))

Отримані дані статистично обробляли за допомогою програмного забезпечення OriginPro 2019b. Для виявлення статистично достовірних відмінностей проводили тест ANOVA, що включав тест Фішера та обрахунок найменших достовірних відмінностей (Fisher's least significant differences, LSDs) за  $p < 0,05$ . На основі проведеного тесту були ідентифіковані статистично відмінні групи даних, що вказували на достовірність відмінностей між аналізованими генотипами.

Генотипування зразків за допомогою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів  $\beta$ -тубуліну (ТВР-аналіз). Геномну ДНК виділяли з проростків насіння аналізованих зразків (по 10 рослин кожного генотипу) за допомогою методу ЦТАБ (цетил-триметиламонія бромід) (Sambrook and David, 2001). Якість отриманої ДНК та її концентрацію визначали за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі та за допомогою спектрофотометру NanoDrop™ Lite («Thermo Scientific», США). Одержані зразки ДНК зберігали за температури  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували по 50 нг ДНК для кожної з проб. Кожну ПЛР проводили щонайменше у двократній повторності (з використанням негативного контролю), що дозволяло підтвердити специфічність отриманих продуктів ампліфікації. ПЛР проводили в мікропробірках об'ємом 200 мкл за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш загальним об'ємом 10 мкл містила п'ятикратний ПЛР-буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль  $\text{MgCl}_2$ , 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мМ кожного дНТФ, 0,5 од. Тақ полімерази («Fermentas», Литва).

Аналіз поліморфізму довжини 1-го та 2-го інтронів  $\beta$ -тубуліну проводили відповідно до методики, описаної раніше (Bardini et al, 2004; Braglia et al, 2022). Для ПЛР використовували пари вироджених праймерів, що фланкують 1-й (ТВР-аналіз) та 2-й (сТВР-аналіз) інтрони  $\beta$ -тубуліну, а саме для ТВР-аналізу (5'→3') – F: AACTGGGCBAARGGNCAУТАУАС; R: АС-

CATRCAYTCRTCD GCRTTYTC (Breviario et al, 2007), а для сТВР-аналізу (5'→3') – F: GARAAYGCHGAYGARTGYATG; R: CRAAV-CCBACCATGAARAARTG (Braglia et al, 2010). Ампліфікацію проводили згідно з наступним протоколом: початкова денатурація (94 °C) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 94 °C – 30 с, відпал праймерів 55 °C – 40 с, елонгація 72 °C – 1,5 хв), завершальна елонгація 72 °C – 8 хв, 15 °C – утримання (Bardini et al, 2004). Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6%-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1× TBE-буфері (тривалість розділення фрагментів 2–3 год) (Sambrook and David, 2001) з подальшим фарбуванням нітратом срібла (Vebouza et al, 2006). Довжину відтворюваних і найбільш чітких фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер O'Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use («Fermentas», Литва).

Цифрові фотографії гелів аналізували з використанням програми Gel Analyzer (gelanalyzer.software.informer.com/1.0/). Наявність амплікону певного розміру оцінювали за бінарною ситемою: 1 – наявний, 0 – відсутній. Генетичні дистанції між аналізованими генотипами були визначені за допомогою програми Free Tree (Pavlicek et al, 1999) на основі розрахованих коефіцієнтів Нея та Лі (Nei, 1972; Nei and Li, 1979), котрі були обраховані на основі матриці наявності/відсутності ампліконів різної молекулярної ваги. Розраховані значення подібності були використані для здійснення кластерного аналізу та побудови філогенетичного дерева за допомогою методу UPGMA. Достовірність топології філогенетичного дерева оцінювали на основі бутстреп-аналізу, обсягом у 1000 ітерацій (Hillis and Bull, 1993). Візуалізацію отриманих філогенетичних дерев здійснювали з використанням програмного забезпечення MEGA11 (Tamura et al, 2021).

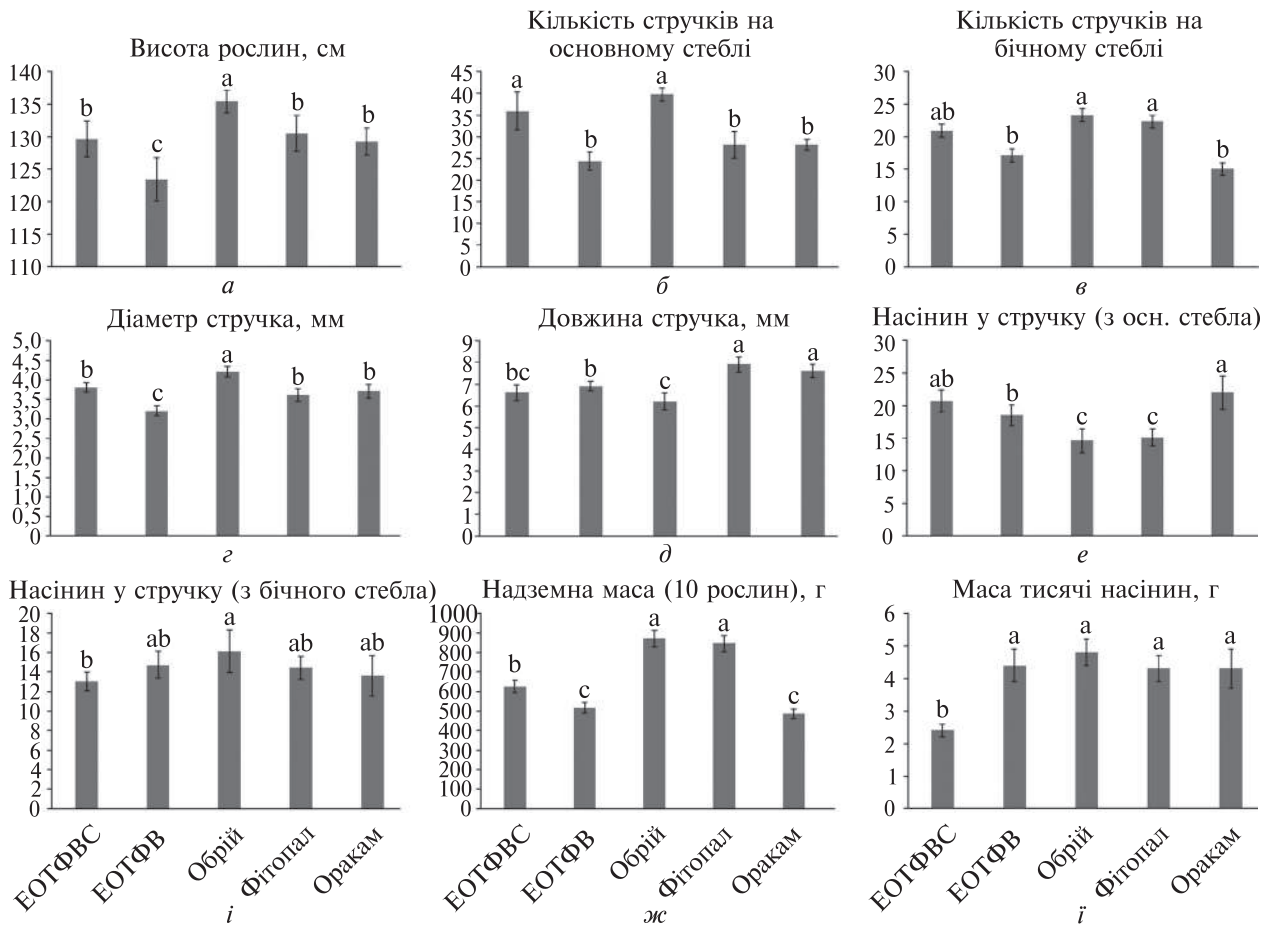
**Результати та обговорення.** Як вже зазначалось, гібридні лінії тифону української селекції є озимими олійними рослинами, на відміну від тифону голландської селекції, котрий є виключно кормовою культурою. Незважаючи на спільне селекційне походження олійного тифону, різні лінії суттєво різняться між собою за морфометричними показниками (рис. 2).

Висота рослин у фазу досягання становила 123,4–135,4 см (рис. 2, а). Найбільшою висотою характеризувалися рослини сорту Обрій, а найменшою – рослини лінії ЕОТФВС (135,4 та 123,4 см, відповідно). Висота інших генотипів достовірно не відрізнялась між собою (ЕОТФВ, Фітопал, Оракам).

Кількість стручків на основному та бічних стеблах достовірно відрізнялась у більшості генотипів – основні стебла мали більшу кількість стручків. На основному стеблі формувалося на 26–87,3% більше стручків, залежно від генотипу (рис. 2, б). Найбільшу кількість стручків на основному стеблі мали ЕОТФВС та сорт Обрій – 35,9 та 39,7 в середньому відповідно. Усі інші генотипи мали достовірно меншу кількість плодів на основних стеблах – 24,3–28,1. Кількість стручків на бічних пагонах (рис. 2, в) коливалася дещо в менших межах та, залежно від генотипу, становила 15–23,3 плоди на стебло. При цьому сорти Обрій та Фітопал (22,3–23,3) вирізнялися достовірно найбільшою кількістю стручків на бічних стеблах, порівняно з іншими генотипами такими, як ЕОТФВ та Оракам (15–17,1). ЕОТФВ мав проміжне значення цього показника та достовірно не відрізнявся від інших генотипів за кількістю стручків на бічних стеблах (20,9 плоди на бічний пагін).

Суттєвих відмінностей за розмірами стручків з основного та бічних стебел виявлено не було. На рис. 2, з та 2, д наведено відмінності в діаметрі та довжині стручків з основного стебла різних генотипів тифону. Діаметр стручків різних генотипів коливався в межах 3,2–4,2 мм. Сорт Обрій вирізнявся найбільш широкими стручками – 4,2 мм, в той час як генотипи ЕОТФВС, Фітопал та Оракам мали значно менші за діаметром стручки – в межах 3,6–3,8 мм, а ЕОТФВ вирізнявся найтоншими плодами – лише 3,2 мм. У той же час найбільшою довжиною стручків характеризувалися рослини сортів Фітопал та Оракам – 7,9 та 7,6 см відповідно. Генотипи ЕОТФВС та ЕОТФВ мали достовірно менші розміри плодів (6,6 та 6,9 см), а найкоротшими стручками вирізнявся сорт Обрій (6,2 см).

В той же час, за кількістю насінин в стручках є суттєва перевага на користь плодів з основного стебла. На рис. 2, е та 2, і наведено

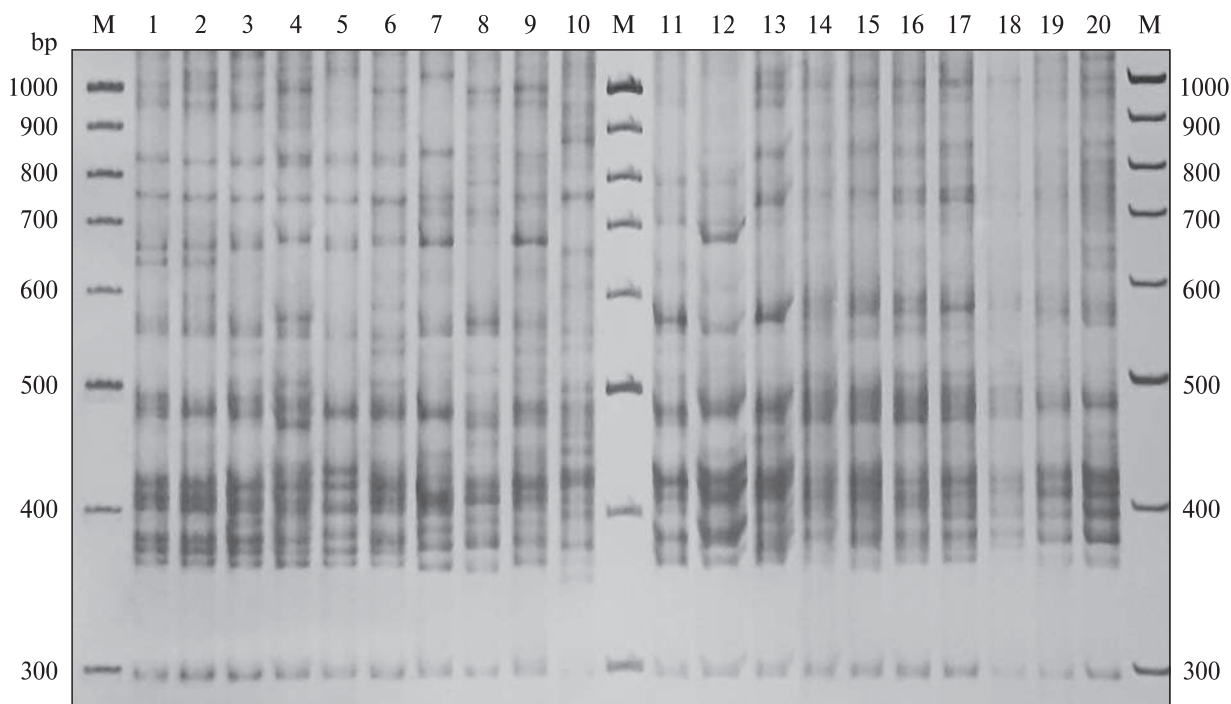


**Рис. 2.** Морфологічні відмінності аналізованих генотипів тифону (*B. rapa* subsp. *oleifera* × (*rapifera* × *pekinensis*)): висота рослини (а), кількість стручків на основному (б) та бічних пагонах (в), діаметр (г) та довжина (д) стручка на основному стеблі, кількість насінин у стручках з основного (е) та бічного пагонів (і), маса надземної частини рослин (ж), вага тисячі насінин (з). Латинські літери над планками стандартного відхилення позначають достовірність відмінностей значень між аналізованими генотипами за  $p < 0,05$

дані щодо кількості насіння в стручках з різних типів стебел. Найбільша кількість насіння в стручках основного пагону містилася у сорту Оракам (22), дещо менше у генотипів ЕОТФВС та ЕОТФВ (20,7 та 18,5), а найменша кількість насінин була виявлена у плодах сортів Обрій та Фітопал (14,6 та 15,1). Загалом, залежно від генотипу та стебла, на якому формується стручок, плід може містити від 13 до 22 насінин. Насіння залежно від форм та сортів рослин має забарвлення від світло-коричневого до сіро-чорного. Маса 1000 насінин у сортів ЕОТФВ, Обрій, Фітопал та Оракам достовірно не відрізнялась та варіювала в межах 4,3–4,8 г, а у селекційної лінії ЕОТФВС була значно мен-

шою та становила в середньому 2,4 г (рис. 2, ж). Варто також зазначити, що значну частку врожаю насіння складає насіння зі стручків бічних пагонів, в той час як насіння з основного стебла складає 19,5–21,5 % від загального врожаю. Загальний вихід насіння з рослини (дані за 2019–2021 рр. для сорту Оракам) складала 6,13–8,17 г, що значно переважає за продуктивністю озиму сурпицю (5,03 г, батьківський генотип, сорт Оріана), однак дещо поступається озимому ріпаку за виходом насіння (8,29 г в середньому на рослину) (Tsaruk, and Rakhmetov, 2022).

Врожайність надземної маси досліджуваних зразків варіювала значною мірою, залежно від

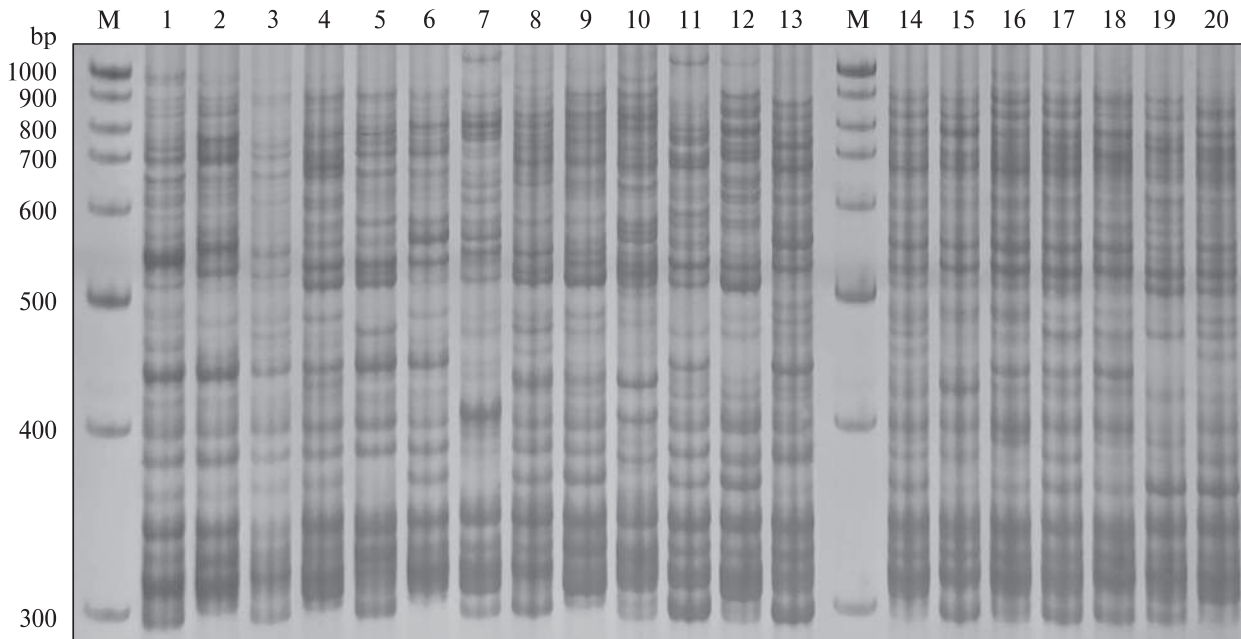


**Рис. 3.** Електрофореграма ампліфікованих ділянок 1-го інтрону  $\beta$ -тубуліну (ТВР) для різних підвидів та гібридів *B. rapa*: subsp. *pekinensis* var. *glabra* (номери 1–3); subsp. *pekinensis* var. *laxa* (4–6); subsp. *oleifera* (7–12); листовий тифон – subsp. *pekinensis*  $\times$  *rapifera* (13); олійний тифон – subsp. *oleifera*  $\times$  (*rapifera*  $\times$  *pekinensis*) (14–18); subsp. *oleifera* f. *biennis* (19); subsp. *oleifera* f. *annua* (20). Номерами позначено: 1 – BRA1614; 2 – BRA130; 3 – BRA467; 4 – BRA1600; 5 – BRA214; 6 – BRA2324; 7 – 15O0400043; 8 – CR3386; 9 – CR2240; 10 – CR3452; 11 – CR2303; 12 – CR1478; 13 – BRA2532; 14 – Обрій; 15 – Оракам; 16 – ЕОТФВ; 17 – ЕОТФВС; 18 – Фітопал; 19 – Оріана; 20 – ЕОСЯФ-2; М – ДНК-маркер

генотипу тифону (рис. 2, *г*). Найбільшу кількість надземної маси формували рослини сортів Обрій та Фітопал – 870 та 845 г на 10 рослин. Значно менший вихід біомаси показав ЕОТФВС (625 г), а селекційна лінія ЕОТФВ та сорт Оракам вирізнялися найменшою врожайністю надземної маси (515 та 485 г відповідно). У попередніх дослідженнях було виявлено, що загальний вихід надземної біомаси може становити 43,8–74 т/га, що еквівалентно 13,1–25,2 т/га сухої біомаси (Rakhmetov and Rakhmetova, 2015). Така висока продуктивність біомаси може пояснюватись тим, що один з батьківських генотипів олійного тифону (голландський тифон) є фуражним гібридом, отриманим з метою продукування великих обсягів біомаси (Rao and Horn, 1986; Wiedenhoef, 1993; Cassida et al, 1994).

Раніше нами було показано, що олійні гібриди тифону залежно від генотипу здатні фор-

мувати врожаї насіння на рівні 2394–4124 кг/га (Blume et al, 2020b) або 2600–4508 кг/га (Rakhmetov and Rakhmetova, 2015). При цьому було показано, що озима суріпиця, в тому числі і батьківський генотип тифону, здатні формувати аналогічні або вищі врожаї насіння в межах 3770–4630 кг/га (Blume et al, 2020b). Таким чином, найменш продуктивні генотипи тифону (ЕОТФВ, Оракам) поступаються озимій суріпиці за врожайністю. Однак, при цьому варто зазначити, що усі генотипи тифону характеризуються значно вищим вмістом олії у насінні (40,9–45,1 %), ніж суріпиця озима (35,3–38,1 %). Це дозволяє отримувати вихід олії з насіння тифону в межах 989–1860 кг/га, проти 1138–1389 кг/га. Таким чином, найбільш продуктивні генотипи олійного тифону (ЕОТФВС, Обрій, Фітопал) можуть забезпечити отримання значно більшої кількості олії на одиницю площі, ніж такі озимі



**Рис. 4.** Електрофореграма ампліфікованих ділянок 2-го інтрону  $\beta$ -тубуліну (сТВР) для різних підвидів та гібридів *B. rapa*: subsp. *pekinensis* var. *glabra* (номери 1–3); subsp. *pekinensis* var. *laxa* (4–6); subsp. *oleifera* (7–12); листовий тифон – subsp. *pekinensis*  $\times$  *rapifera* (13); олійний тифон – subsp. *oleifera*  $\times$  (*rapifera*  $\times$  *pekinensis*) (14–18); subsp. *oleifera* f. *biennis* (19); subsp. *oleifera* f. *annua* (20). Номерами позначено: 1 – BRA467; 2 – BRA130; 3 – BRA1614; 4 – BRA1600; 5 – BRA214; 6 – BRA2324; 7 – 15O0400043; 8 – CR3386; 9 – CR2240; 10 – CR3452; 11 – CR2303; 12 – CR1478; 13 – BRA2532; 14 – Обрій; 15 – Оракам; 16 – ЕОТФВ; 17 – ЕОТФВС; 18 – Фітопал; 19 – Оріана; 20 – ЕОСЯФ-2; М – ДНК-маркер

сорта суріпиці, що, зокрема, робить тифон привабливою олійною сировиною для виробництва біопалива (Rakmetov and Rakmetova, 2015, Blume et al, 2016, 2017, 2020b).

Результати аналізу жирнокислотного складу олії насіння тифону та його батьківських генотипів, проведеного нами раніше, свідчать про те, що профілі жирних кислот олійного тифону більш подібні до таких у озимій суріпиці, ніж до складу ліпідів насіння голландського тифону (Blume et al, 2019). Зокрема, олія насіння голландського тифону містить значно меншу кількість ерукової кислоти (34,1 % проти 39,95–42,28 % в українського тифону), а також більше поліненасиченої лінолевої кислоти (16,32 % проти 12,82–13,56 %). Таким чином, було показано, що олійний тифон, як і озима суріпиця, характеризується більш високим рівнем накопичення довголанцюгових жирних кислот, на відміну від голландського листового тифону, в якого баланс накопичення жирних кислот в ліпідах насіння дещо змі-

шений в бік поліненасичених жирних кислот (Blume et al, 2019). Також було показано, що жирнокислотний склад тифону та озимі суріпиці суттєво відрізняються від профілів ярої суріпиці, ліпіди насіння якої містять значно більшу кількість жирних кислот з середньою довжиною ланцюга (C18 і менше).

На наступному етапі нами було проведено ДНК-баркодинг зразків *B. rapa*, котрі належать до різних підвидів, шляхом оцінки поліморфізму довжини 1-го та 2-го інтронів  $\beta$ -тубуліну (рис. 3 та 4). При аналізі результатів амплікони з великою молекулярною масою не враховувались, оскільки є ризик того, що поява фрагментів більше 1000 п.о. може бути наслідком неспецифічної ампліфікації, через що такі амплікони часто не відтворюються при повторних експериментах (Rabokon et al, 2018).

Загалом було виявлено 44 амплікони 1-го інтрону  $\beta$ -тубуліну різної довжини. Значна частина аналізованих ампліконів була поліморфною. Варто зазначити, що єдиний амплікон,



спільний для усіх без винятку генотипів *B. rapa*, був за розміром менше 300 п.н. та не варіював за довжиною. Кількість ампліконів 1-го інтрону становила від 13 до 21 фрагменту у аналізованому діапазоні від 290 до 1000 п.н. у різних генотипів (рис. 3). Різні генотипи *B. rapa* subsp. *pekinensis* var. *glabra* та var. *laxa* мали в середньому  $15,5 \pm 0,7$  та  $15,3 \pm 2,9$  амплікони відповідно. Генотипи суріпиці (як озимої, так і ярої) характеризувались наявністю  $17,8 \pm 2,8$  ампліконів у середньому, генотип листового тифону мав 16 ампліконів, а олійний тифон –  $16,8 \pm 3,4$ .

При аналізі поліморфізму довжини 2-го інтрону  $\beta$ -тубуліну було виявлено 48 ампліконів різної довжини. Значна частина аналізованих ампліконів була поліморфною, однак абсолютно мономорфними були 4 амплікони, довжина яких не варіювала у всіх генотипів. Кількість ампліконів у кожного зі зразків варіювала в значно менших межах, ніж у випадку фрагментів 1-го інтрону, й становила 20–25 у заданому діапазоні (рис. 4). Варіація кількості ампліконів між підвидами була також значно меншою. Так, зразки *B. rapa* subsp. *pekinensis* var. *glabra* та var. *laxa* мали в середньому  $21 \pm 1$  та  $22 \pm 1$  амплікони відповідно. Генотипи суріпиці (як озимої так і ярої) характеризувались наявністю  $22,8 \pm 1,6$  ампліконів в середньому, генотип листового тифону мав 25 ампліконів, а олійний тифон так само, як і суріпиця, мав  $22,8 \pm 0,8$  амплікони.

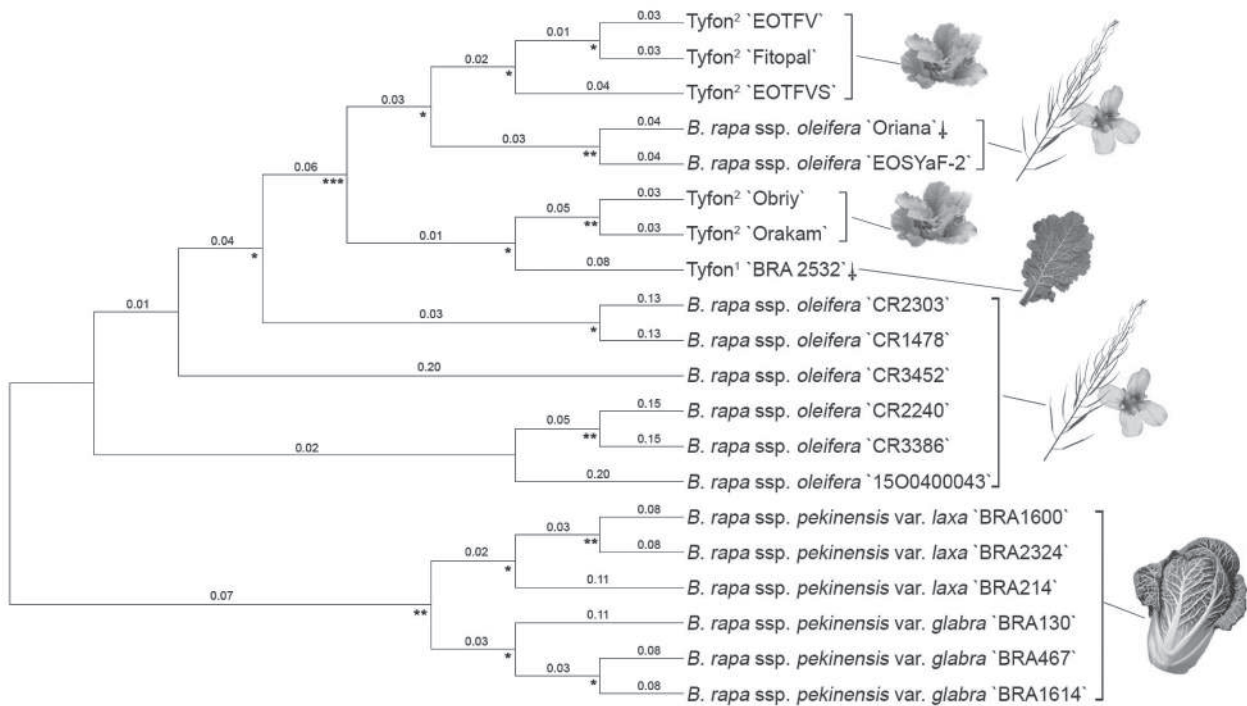
Таким чином можна стверджувати, що відмінності у кількості ампліконів між різними проаналізованими підвидами та гібридами не є достовірними. Даний факт свідчить на користь того, що найвірогідніше усі аналізовані зразки характеризуються однаковим рівнем плоідності та є диплоїдами. Раніше у деяких джерелах стверджувалося, що тифон, наряду з іншим гібридом 'Perko', є тетраплоїдом (Gowers, 2010). Варто зазначити, що тетраплоїдний 'Perko' був отриманий у результаті гібридизації диплоїдного пак-чоя (*B. rapa* subsp. *chinensis*) та тетраплоїдної суріпиці (*B. rapa* subsp. *oleifera*). У той же час у літературі немає жодної інформації щодо підвищеного рівня плоідності у батьківських генотипів голландського тифону. У випадку підвищеної плоідності мало би спосте-

рігатись суттєве збільшення ампліфікованих ділянок 1-го та 2-го інтронів  $\beta$ -тубуліну у голландського та українського тифону, як це було показано раніше на прикладі представників родів *Camelina* (Galasso et al, 2015) та *Lemna* (Braglia et al, 2021). Однак, достовірної варіабельності у кількості цільових ампліконів у гібридів відносно негібридних генотипів *B. rapa* виявлено не було.

Раніше нами було з'ясовано, що кількість ампліконів 1-го інтрону  $\beta$ -тубуліну (в більш широкому діапазоні, від 290 до 2000 п.н.) може варіювати в межах від 12 до 24 у різних генотипів *B. rapa* subsp. *pekinensis* (Blume et al, 2020a). Однак, найімовірніше дана варіація не пов'язана з відмінностями у плоідності, оскільки ці ж генотипи (1–6 у таблиці) не виказували суттєвих відмінностей у кількості ампліконів 2-го інтрону  $\beta$ -тубуліну. Описана різниця у профілях ампліконів 1-го та 2-го інтронів генів  $\beta$ -тубуліну підкреслює необхідність спільного аналізу варіації довжини обох інтронів, що є більш інформативним в контексті аналізу генетичного поліморфізму чи ДНК-баркодингу окремих таксонів.

На наступному етапі використовуючи отримані дані ТВР- та сТВР-аналізів нами було обраховано значення коефіцієнтів подібності Нея та Лі, на основі яких було реконструйовано філогенетичні зв'язки проаналізованих генотипів за допомогою методу UPGMA (рис. 5). Спільний аналіз поліморфізму довжини 1-го та 2-го інтронів  $\beta$ -тубуліну дозволив отримати доволі точну картину розподілу підвидів на окремі клади з високою достовірністю (більшість гілок мали високе значення бутстреп-підтримки).

Варто зазначити, що генотипи суріпиці представляли поліфілетичну групу та не віділялись в окрему кладу. Генотипи CR2303 (Італія) та CR1478 (США) сформували окрему кладу, яка мала помірну бутстреп-підтримку (>50 %), генотип CR3452 кубинського походження виокремився в незалежну гілку. Також, генотипи CR2240 (Ірак), CR3386 (Іспанія) та 1500400043 (Німеччина) сформували окрему гілку, однак з низькою достовірністю. Цікаво, що генотипи іракського та іспанського походження сформували окрему кладу,



**Рис. 5.** Філогенетичне дерево аналізованих генотипів *B. rapa*, побудоване методом UPGMA на основі коефіцієнтів подібності Нея та Лі, розрахунки яких базуються на даних про поліморфізм довжини 1-го та 2-го інтронів β-тубуліну. Дерево побудовано з бутстреп-підтримкою в 1000 ітерацій та вкорінене за виокремленою кладою генотипів *B. rapa* subsp. *pekinensis*. Цифри над гілками позначають відносну довжину гілок, зірочками позначено достовірність топології гілок: \*\*\* – значення бутстрепа >90 %; \*\* – >75 %; \* – >50 %. + – батьківські генотипи олійного тифону української селекції. Tyfon<sup>1</sup> – *B. rapa* subsp. *pekinensis* × *rapifera*; Tyfon<sup>2</sup> – *B. rapa* subsp. *oleifera* × (*rapifera* × *pekinensis*)

яка виокремлювалась з високою достовірністю (>75 %), що може свідчити про спільне селекційне походження цих двох сортів. Усі три згадані гілки суріпиці були базальними по відношенню до клади тифону обох типів.

У той же час озима та яра суріпиці українського походження (Оріана та ЕОСЯФ-2) були розташовані з високою достовірністю у сестринські гілки, котрі були включені в загальну кладу тифону. Тифон голландської та української селекції разом із зазначеними двома генотипами суріпиці сформували окрему від інших генотипів кладу, котра відділялась від основної групи з найвищою достовірністю (понад 90 % бутстреп-підтримки) (рис. 5). Таким чином, олійний тифон української селекції за результатами проведеного аналізу був розташований на філогенетичному дереві разом зі своїми батьківськими генотипами. Ці-

каво, що гілка українських генотипів суріпиці була розташована як базальна для трьох генотипів олійного тифону (ЕОТФВ, ЕОТФВС та Фітопал), в той час як два інших сорти (Обрій та Оракам) були виокремлені у спільну кладу з голландським листовим тифоном з високою бутстреп-підтримкою даної топології.

Слід зауважити, що генотипи *B. rapa* subsp. *pekinensis* утворили окрему кладу, формування якої статистично підтверджується як достовірне (значення бутстрепа понад 75). Водночас з цим спостерігався розподіл генотипів пекінської капусти за їх приналежністю до таксономічних груп *var. glabra* та *var. laxa* (рис. 5). Раніше, при аналізі поліморфізму довжини лише 1-го інтронів β-тубуліну систематичний розподіл на форми *var. glabra* та *var. laxa* не спостерігався, а різниця між популяціями або сортами була більш значимою (Blume et al,

2020a). У даному дослідженні завдяки одночасному аналізу варіації довжини обох інтронів генів  $\beta$ -тубуліну вдалося доволі точно диференціювати зазначені таксономічні одиниці в межах підвиду пекінської капусти.

Варіація кількості ампліконів інтронів  $\beta$ -тубуліну всередині різних таксономічних груп *B. rapa* залишається не до кінця зрозумілою, оскільки наразі кількість генів  $\beta$ -тубуліну для різних підвидів *B. rapa* достеменно невідома. Раніше було встановлено, що у інших Хрестоцвітних, таких, як *A. thaliana*, число генів різних ізотипів  $\beta$ -тубуліну становить 9, а у *C. sativa* – 20 (Galasso et al, 2015). Враховуючи, що *B. rapa* є диплоїдизованим мезогексаплоїдним видом (її геном зазнав триплікації на ранніх етапах еволюції) (Mandáková, et al, 2008; Zhang et al, 2018), слід було би очікувати, що кількість генів  $\beta$ -тубуліну буде більшою, ніж у видів, котрі не зазнали подібних еволюційних подій (як напр., *A. thaliana*). Найвірогідніше, що дупліковані гени тубулінів не еліминувались, оскільки у різних видів спостерігається тенденція до збереження дуплікованих генів тубулінів з їх подальшою субфункціоналізацією (Gavazzi et al, 2017).

Варіація числа ампліконів у різних підвидів (та, відповідно, генів  $\beta$ -тубуліну) може бути пов'язана з геномними перебудовами у різних підвидів. На сьогодні показано, що більшість представників різних груп сортів *B. rapa* мають чіткі відмінності не лише на генетичному, а й на геномному рівні. Генотипи *B. rapa*, що належать до різних підвидів/сортів, можуть містити тисячі різноманітних інделів, локалізованих по всьому геному, багато з яких можуть призводити до зсуву рамки зчитування в кодуєчих частинах генів (CDS) або до появи одонуклеотидних поліморфізмів в рамках кодуєчої частини генів чи до більш масштабних перебудов (Cheng et al, 2016). Відповідно, така варіація здатна суттєво впливати на набір певних родин генів, в тому числі й на різноманіття генів тубуліну. Також, велика роль в дивергенції підвидів *B. rapa* та значним фенотиповим варіаціям відводиться геномним перебудовам, пов'язаним з мобільними генетичними елементами, котрі можуть викликати більш масштабні транслокації, дуплікації чи делеції значних хромосомних регіонів (Park et al, 2019).

Також, раніше було охарактеризовано сімейство генів  $\alpha$ -тубуліну у *B. rapa* subsp. *pekinensis* (Zhang et al, 2016). Автори ідентифікували близько 12 генів  $\alpha$ -тубуліну, 5 з яких кодували повноцінні послідовності цього білка. Було показано, що  $\alpha$ -тубуліни задіяні у регуляції переходу *B. rapa* subsp. *pekinensis* до цвітіння, зокрема виказують підвищені рівні експресії під час викидання стрілки. Оскільки  $\alpha$ - та  $\beta$ -тубуліни є функціонально пов'язаними, слід очікувати, що  $\beta$ -тубуліни можуть бути також значною мірою задіяні у регуляцію цього процесу.

Також, наявність даних щодо екзон-інтронної організації генів  $\alpha$ -тубуліну *B. rapa* subsp. *pekinensis* дозволяє ефективно здійснювати генотипування шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну. Ефективність цього підходу також була показана нами раніше, в тому числі й на прикладі Хрестоцвітних, хоча й TBP/cTBP-підхід залишається більш інформативним та зручним методом генотипування (Rabokon et al, 2018; Blume et al, 2020c). Слід очікувати, що наявність даних про геноми підвидів *B. rapa* дає можливість ідентифікувати гени  $\beta$ -тубуліну в цих таксонах. Інформація про різноманіття та геномну організацію генів  $\beta$ -тубуліну може стати у нагоді при генотипуванні сортів різних підвидів *B. rapa*. Успішність такого поєднання геноміки та молекулярної генетики була показана нами у попередніх роботах на прикладі роду *Prunus* (Lykholat et al, 2022). Іншим підходом до TBP-генотипування може бути ідентифікація генів окремих ізотипів  $\beta$ -тубуліну з найбільш варіабельними некодуєчими ділянками, що було раніше продемонстровано на прикладі пшениці (Guadalupi et al, 2022). Комбінування підходів TBP- та SSR-генотипування також може бути успішно застосоване як для ДНК-баркодингу видів, так і для швидкої оцінки генетичного поліморфізму популяцій чи селекційних ліній (Sakharova et al, 2023). Загалом, розробка та удосконалення підходів швидкого та недорогого генотипування залишається затребуваним напрямком досліджень через важливість застосування таких методів при селекційній роботі та при оцінці генетичного поліморфізму популяцій диких видів, родичів культурних рослин.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

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

**Фінансування.** Дослідження виконано в рамках проєкту Відділення цільової рідготовки КНУ ім. Т. Шевченка при НАН України «Ідентифікація родини генів тубулінів *Brassica rapa* та характеристика їх геномної організації у різних підвидів» (2022–2023 рр., 0122U002425).

GENOTYPING OF INTERSPECIFIC *BRASSICA RAPA* HYBRIDS IMPLYING  $\beta$ -TUBULIN GENE INTRON LENGTH POLYMORPHISM (TBP/CTBP) ASSESSMENT

A.M. Rabokon, R.Y. Blume, V.G. Sakharova,  
M.I. Chopei, K.S. Afanasieva, A.I. Yemets,  
D.B. Rakhmetov, Y.V. Pirko, Y.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv,  
Baidy-Vyshnevetskoho str., 2a  
Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine,  
03022, Kyiv, Akademika Glushkova ave., 2  
M.M. Gryshko National Botanical Garden of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 01014, Kyiv,  
Tymiryazevska str., 1

E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net;  
blume.rostislav@gmail.com, jamal\_r@bigmir.net,  
aphon@ukr.net

The Crucifers family (Brassicaceae) includes a large number of economically important crops, particularly *Brassica rapa*, which is a widely-used model plant for molecular genetic studies of oilseeds. *B. rapa* is a highly polymorphic species that includes a large number of genetically distinct subspecies. Considering this fact, intraspecific hybridization of *B. rapa* subspecies is considered a promising breeding approach aimed on increasing genetic diversity of the crop. Previously, we have shown that one of such hybrids, oil tyfon (*B. rapa* subsp. *oleifera* f. *biennis* × (subsp. *rapifera* × *pekinensis*)), could be a valuable oil feedstock due to its increased productivity. However, obtaining hybrids and their subsequent breeding would require the involvement of diverse molecular marker systems. So far, the method of estimating the length polymorphism of the first (TBP) and second (cTBP) introns of  $\beta$ -tubulin has demonstrated its high accuracy and reliability in the identification (DNA-barcoding) of flowering plants taxonomic units at different levels. In the present study, we evaluated the productivity of such hybrid oilseed

crop as tyfon, as well as carried out DNA-barcoding of various hybrid lines of tyfon and its parental *B. rapa* subspecies using on  $\beta$ -tubulin intron length polymorphism assessment approach. Based on the data of the molecular genetic analysis, which included the assessment of length polymorphism of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> introns of  $\beta$ -tubulin genes, we were able to confirm the origin of oil tyfon hybrid from Dutch leaf tyfon (*B. rapa* subsp. *rapifera* × *pekinensis*) and winter turnip rape (*B. rapa* subsp. *oleifera*) with a high confidence. Along with that, it was possible to differentiate var. *glabra* and var. *laxa* accession of napa cabbage (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) for the first time using the combined TBP and cTBP analyses. A variation in the number of amplified regions of  $\beta$ -tubulin introns was noted in different genotypes, however these differences did not appear to be a specific feature a particular subspecies/hybrid. This suggests that *B. rapa* hybrids most likely do not differ in ploidy, compared to their parental genotypes. In addition, it was shown that the mentioned oil tyfon hybrid lines of Ukrainian breeding show a significant level of morphological variation, despite their common breeding pedigree.

REFERENCES

- Allainguillaume J, Alexander M, Bullock JM et al (2006) Fitness of hybrids between rapeseed (*Brassica napus*) and wild *Brassica rapa* in natural habitats. *Mol Ecol* 15(4):1175–1184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02856.x>
- Bardini M, Lee D, Donini P et al (2004) Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome* 47:281–291. <https://doi.org/10.1139/g03-132>
- Benbouza H, Jean-Marie J, Jean-Pierre B (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ* 10(2):77–81
- Blume RYa, Boychuk YuM, Yemets AI et al (2016) 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* 18:61–66 (in Ukrainian)
- Blume RYa, Lantukh GV, Yemets A et al (2017) Comparative analysis of productive potential and fatty acid composition of oil from seeds of spring and winter turnip rape as perspective source for production of diesel biofuel compounds. *Factors Exp Evol Organisms* 21:96–101 (in Ukrainian)
- Blume RYa, Lantukh GV, Levchuk IV et al (2019) Evaluation of perspective of use of a new hybrid oil culture of Tyfon in comparison with its parental species as raw material for biodiesel production.

- Factors Exp Evol Organisms 24:33–39. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1074> (in Ukrainian)
- Blume RYa, Rabokon AN, Pirko YaV (2020a)  $\beta$ -tubulin intron length polymorphism among forms var. *glabra* and var. *laxa* of napa cabbage. Factors Exp Evol Organisms 26:87–92. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1247> (in Ukrainian)
- Blume RY, Lantukh GV, Levchuk IV et al (2020b) Evaluation of potential biodiesel feedstocks: camelina, turnip rape, oil radish and tyfon. Open Agric J 14:299–320. <https://doi.org/10.2174/1874331502014010299>
- Blume RY, Rabokon AN, Postovitova AS et al (2020c) Evaluating diversity and breeding perspectives of Ukrainian spring camelina genotypes. Cytol Genet 54(5):420–436. <https://doi.org/10.3103/S0095452720050084>
- Braglia LB, Manca AM, Mastromauro FM, Breviario D (2010) cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. Diversity 2:572–585. <https://doi.org/10.3390/d2040572>
- Braglia L, Gavazzi F, Morello L et al (2020). On the applicability of the Tubulin-Based Polymorphism (TBP) genotyping method: a comprehensive guide illustrated through the application on diferent genetic resources in the legume family. Plant Methods 16:86. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00627-z>
- Braglia L, Lauria M, Appenroth KJ et al (2021) Duckweed species genotyping and interspecific hybrid discovery by tubulin-based polymorphism fingerprinting. Front Plant Sci 12:625670. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.625670>
- Braglia L, Gavazzi F, Giani S et al (2023) Tubulin-Based Polymorphism (TBP) in Plant Genotyping. In: Plant Genotyping. Methods in Molecular Biology, vol 2638 (Y Shavrukov, Ed.). New York, NY: Humana, 387–401. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2_28)
- Breviario D, Baird WV, Sangoi S et al (2007) High polymorphism and resolution in targeted finger-printing with combined  $\beta$ -tubulin introns. Mol Bre-ed 20:249–259. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9087-9>
- Breviario D, Giani S, Morello L (2013) Multiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications. Plant J 75:202–218. <https://doi.org/10.1111/tpj.12243>
- Cassida KA, Barton BA, Hough RL et al (1994) Feed intake and apparent digestibility of hay-supplemented brassica diets for lambs. J Anim Sci 72(6):1623–1629. <https://doi.org/10.2527/1994.7261623x>
- Cheng F, Wu J, Cai C et al (2016) Genome resequencing and comparative variome analysis in a *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* collection. Sci Data 3:160119. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.119>
- Chu PL, Vanderghem C, MacLean HL, Saville BA (2017) Financial analysis and risk assessment of hydroprocessed renewable jet fuel production from camelina, carinata and used cooking oil. Appl Energy 198:401–409. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.001>
- Crowell H, Gamble AV, Feng Y et al (2022) Impacts of winter grazing on soil health in southeastern cropping systems. Agrosyst Geosci Environ 5:e20240. <https://doi.org/10.1002/agg2.20240>
- Dalkiewicz-Baranowska H, Wilczyńska M (1981) Morphology and anatomy of vegetative Perko organs with reference to their fodder value. Acta Agrobotanica 34(1):69–88. <https://doi.org/10.5586/aa.1981.005>
- de Ruiter J, Wilson D, Maley S et al (2009) Management Practices for Forage Brassicas. Hamilton: Forage Brassica Development Group
- Downey RK (1983) The origin and description of the *Brassica* oilseed crops. In: High and low erucic acid rapeseed oils production, usage, chemistry, and toxicological evaluation (JKG Kramer, FD Sauer, WJ Pigden, Eds). Toronto: Academic Press, 1–20 p
- Galasso I, Manca A, Braglia L et al (2015) Genomic fingerprinting of *Camelina* species using cTBP as molecular marker. Am J Plant Sci 6:1184–1200. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.68122>
- Gavazzi F, Pigna G, Braglia L et al (2017) Evolutionary characterization and transcript profiling of  $\beta$ -tubulin genes in flax (*Linum usitatissimum* L.) during plant development. BMC Plant Biol 17:237. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1186-0>
- Gotlin Čuljak T, Pernar R, Juran I et al (2016) Impact of oilseed rape crop management systems on the spatial distribution of *Brassicoglyphus aeneus* (Fabricius 1775): Implications for integrated pest management. Crop Protection 89:129–138. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.017>
- Gowers S (2010) Swedes and Turnips. In: Root and Tuber Crops. Handbook of Plant Breeding, vol 7 (J Bradshaw, Ed.). New York, NY: Springer, 245–289. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92765-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92765-7_8)
- Guadalupi C, Braglia L, Gavazzi F et al (2022) A combinatorial Q-locus and tubulin-based polymorphism (TBP) approach helps in discriminating *Triticum* species. Genes 13:633. <https://doi.org/10.3390/genes13040633>
- Guillard K, Allinson DW (1988) Yield and nutrient content of summer- and fall-grown forage *Brassica* crops. Can. J Plant Sci 68(3):721–731. <https://doi.org/10.4141/cjps88-085>
- Hillis DM, Bull JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic Biol 42:182–192. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>

- Kaneko Y, Bang SW (2014) Interspecific and intergeneric hybridization and chromosomal engineering of Brassicaceae crops. *Breed Sci* 64:14–22. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.14>
- Mandáková T, Lysak MA (2008) Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in  $x = 7$  crucifer species (Brassicaceae). *Plant Cell* 20(10):2559–2570. <https://doi.org/10.1105/2Ftpc.108.062166>
- Mikić A, Mihailović V, Marjanović-Jeromela A, Terzić S (2014) Certain aspects of breeding forage Brassicas. In: Quantitative traits breeding for multifunctional grasslands and turf (D Sokolović, C Huyghe, J Radović, Eds.). Dordrecht: Springer, 163–166 p. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9044-4\\_24](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9044-4_24)
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106:283–292.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5269–5273. <https://doi.org/10.1073/2Fpnas.76.10.5269>
- Park HR, Kang T, Yi G et al (2019) Genome divergence in *Brassica rapa* subspecies revealed by whole genome analysis on a doubled-haploid line of turnip. *Plant Biotechnol Rep* 13:677–687. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00565-w>
- Pavlicek A, Hrdá S, Flegr J (1999) FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biol* 45:97–99.
- Rabokon AN, Pirko YaV, Demkovich AYe, Blume YaB (2018) Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of  $\beta$ -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol Genet* 52(1):3–15. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010115>
- Rabokon AM (2021) Intron length polymorphism of tubulin genes as an effective tool for genetic plant differentiation. *Proc Natl Acad Sci Ukraine* 10:30–35. <https://doi.org/10.15407/visn2021.10.030> (in Ukrainian)
- Rakhmetov DB, Rakhmetova SO (2015) Summary of introduction and breeding of tyfon (*Brassica rapa* L.  $\times$  *B. campestris* f. *biennis* DC.) in M.M. Griyshko National Botanical Garden of the NAS of Ukraine. *Plant Introduction* 4:18–30. (in Ukrainian)
- Rao SC, Horn FP (1986) Planting season and harvest date effects on dry matter production and nutritional value of *Brassica* spp. in the Southern Great Plains. *Agron J* 78:327–333. <https://doi.org/10.2134/agronj1986.00021962007800020023x>
- Robinson D (2006) Non-traditional forages for grazing: turnips and other brassicas. *Proceedings of the Heart of America Grazing Conference* 62–64 p
- Sakharova VG, Blume RYa, Rabokon AN et al (2023) Efficiency of genetic diversity assessment of little-pod false flax (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.) in Ukraine using SSR- and TBP-marker systems. *Rep Natl Acad Sci Ukraine* 4:93–102. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.093>
- Sambrook J, David WR (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 2. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sohn SI, Oh YJ, Lee KR et al (2016) Characteristics analysis of  $F_1$  hybrids between genetically modified *Brassica napus* and *B. rapa*. *PLOS ONE* 11(9): e0162103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162103>
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tao L, Milbrandt A, Zhang Y, Wang W-C (2017) Techno-economic and resource analysis of hydro-processed renewable jet fuel. *Biotechnol Biofuels* 10:261. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0945-3>
- Tsaruk IV, Rakhmetov, DB (2022) Peculiarities of the seed productivity formation of Tyfon (*Brassica campestris* var. *oleifera* f. *biennis* D.C.  $\times$  *B. rapa* L.) plants under the effect of cultivation technology. *Advanced Agritechnol* 10(1):265592. <https://doi.org/10.47414/na.10.1.2022.265592>
- Villalobos LA, Brummer JE (2015) Forage Brassicas stockpiled for fall grazing: yield and nutritive value. *Crop, Forage Turfgrass Management* 1:1–6. <https://doi.org/10.2134/cftm2015.0165>
- Warwick SI (2011) Brassicaceae in agriculture. In: *Genetics and genomics of the Brassicaceae*. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, vol 9 (R Schmidt, I Bancroft, Eds.). New York, NY: Springer 33–65. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7118-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7118-0_2)
- Warwick SI, Simard MJ, Légère A et al (2003) Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O. E. Schulz. *Theor Appl Genet* 107:528–539. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1278-0>
- Wiedenhoeft MH (1993) Management and environment effects on dry matter yields of three *Brassica* species. *Agron J* 85:549–553. <https://doi.org/10.2134/agronj1993.00021962008500030006x>
- Zhang YW, Jin D, Xu C et al (2016) Regulation of bolting and identification of the  $\alpha$ -tubulin gene family in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Genet Mol Res* 15(1):gmr.15017507. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017507>
- Zhang L, Cai X, Wu J et al (2018) Improved *Brassica rapa* reference genome by single-molecule sequencing and chromosome conformation capture technologies. *Horticult Res* 5:50. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0071-9>

Надійшла в редакцію 25.07.23  
Після доопрацювання 15.08.23  
Прийнята до друку 18.11.23