

RAPD-АНАЛІЗ У СИСТЕМІ КОМПЛЕКСНОГО ЕКОЛОГО-АНАЛІТИЧНОГО МОНІТОРИНГУ ПОПУЛЯЦІЙ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ ТРАВ'ЯНИХ ФІТОЦЕНОЗІВ СУМСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Кирильчук Катерина Сергіївна

кандидат біологічних наук, доцент
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна
ORCID: 0000-0001-9968-4833
ekaterinakir2017@gmail.com

Бакуменко Ольга Миколаївна

кандидат сільськогосподарських наук, доцент
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна
ORCID: 0000-0003-1625-7401
lady.bakumenko88@gmail.com

Верещагін Ігор Володимирович

кандидат сільськогосподарських наук, доцент
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна
ORCID: 0000-0002-6589-5138
ihor_vereschahin1986@ukr.net

Стаття присвячена дослідженню популяцій конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) природних трав'яних фітоценозів в умовах м. Суми та Сумської області (природний заповідник «Михайлівська цілина») з використанням методів молекулярної біології, зокрема ПЛР-діагностики з участю олігонуклеотидних RAPD-праймерів, з метою встановлення генетичного різноманіття виду на рівні популяцій. Вивчення генетичної структури популяцій виду є складовою комплексного популяційного аналізу, який, у тому числі, включає дослідження вікової та онтогенетичної, статеві, розмірної та вітальності структур, репродукції та ростових процесів, що дозволяє розкрити механізми стійкості виду у тих чи інших умовах зростання, оцінити перспективи його існування та зробити висновок щодо генетичного різноманіття його популяцій.

З агрономічної точки зору конюшина лучна – надзвичайно цінна польова культура, оскільки використовується як корм для худоби, а її здатність фіксувати атмосферний азот у ґрунті забезпечує траву-супутники цим елементом живлення. З цієї причини конюшина лучна є гарним попередником для зернових культур. У межах природних фітоценозів частка конюшини лучної може складати до 20% травостою, що разом з іншими видами трав формує високопродуктивні луки. Дослідження природних угруповань конюшини лучної на молекулярному (геномному) рівні дозволяє максимально точно оцінити ступінь біорізноманіття виду, селекційний потенціал сортів як джерела цільових генів для добору зокрема та генетичної плазми загалом. Молекулярний аналіз також дозволить оцінити втрати генетичних ресурсів конюшини лучної внаслідок агресивних бойових дій.

Об'єктом дослідження були зразки конюшини лучної, зібрані у різних локаціях трав'яних фітоценозів м. Суми та природного заповідника «Михайлівська цілина». Генетичний матеріал (ДНК) виділяли з використанням сіль-ферментної екстракції з подальшим очищенням та висадженням нуклеїнової кислоти. Ампліфікацію ДНК здійснювали з використанням RAPD-праймерів Ver_1 AATCGGGCTG та Ver_2 GTTGCGATCC з подальшою візуалізацією продуктів реакції в агарозному гелі у присутності бромистого етидію. Характер ампліконів свідчить про задовільну якість препаратів нуклеїнових кислот. Ампліфікація фрагментів виявила високий ступінь поліморфізму по обох маркерах (17 поліморфних локусів з 18), а дослідження спорідненості зразків конюшини лучної з використанням кластерного аналізу встановило тісну спорідненість між зразками, що росли у межах міста Суми у суміжних локаціях, а також природного заповідника «Михайлівська цілина».

Ключові слова: *Trifolium pratense* L., RAPD-аналіз, природні трав'яні фітоценози, популяції, генетичне різноманіття, праймер.

DOI <https://doi.org/10.32782/agrobio.2024.2.5>

Конюшина лучна (*Trifolium pratense* L.) є однією з найважливіших багаторічних кормових видів рослин Європи. Він є складовою як природних угруповань, так і вирощується у складі штучних агрофітоценозів. Завдяки своїй здатності до фіксації атмосферного азоту, *T. pratense* дає багатий на білок корм, а при вирощуванні у складі травосумішок забезпечує додатковий азот для трав-супутників. Через свої властивості *T. pratense* також

є добрим попередником для зернових культур (Amdahl, 2016). Відзначається господарська ефективність злаково-бобових сумішок, які забезпечують високу якість кормів для худоби, а також перешкоджають вимиванню азоту з ґрунту та підвищують стійкість до посухи (Collins et al., 2012).

Конюшина лучна (*T. pratense*) – трав'яниста багаторічна рослина. Вид включає два підвиди: *T. pratense*

ssp. *praecox* і *T. pratense* ssp. *serotinum*. Від *T. pratense* слід відрізнити інший вид – конюшину посівну (*Trifolium sativum* (Shreb.) Crome), яка характеризується відсутністю опушення, а також прямими і порожнистими стеблами, порівняно з *T. pratense*, рослини якого опушені й мають висхідні та щільні стебла. Зазвичай, *T. sativum* зустрічається на сіяних луках (Dluhošová et al., 2017; Drebot et al., 2018).

T. pratense має стрижневу кореневу систему із значною кількістю вторинних коренів. Надземні пагони виду прямостоячі або висхідні. Для виду характерний моноподільний тип відновлення, коли центральний пагін залишається вкороченим протягом всього життєвого циклу і зберігається у вигляді прикореневої розетки листків, навколо якої розташовуються бічні генеративні та вегетативні пагони. Кількість пагонів, що формують рослину, значною мірою варіює залежно від умов зростання від 1 до 10 і навіть до 18. Пагони *T. pratense* озимого типу, цвітіння яких спостерігається на другий рік життя. Листки трійчасто-складні, цілокраї, нижні листки мають довгий черешок, а верхні – короткий. Як листки, так і стебла мають опушення. Листки мають прилистки, які зрослися з листовими черешками (Ištvánek et al., (2017)). Взимку рослина має декілька зелених листків на головній розетці і невелику кількість листків на бічних пагонах розеткового типу. Навесні наступного року ці листки відмирають (Naydenova & Vasileva, 2019).

T. pratense у природних умовах є полікарпічною рослиною, тривалість життя якої складає до 20 років із вираженими перервами у цвітінні. Суцвіття – голівка із двома невеликими сидячими листками в її основі. Закладаються пізно восени. Цвітіння одного суцвіття триває 2–3 тижні, а однієї рослини – від 40 до 50 днів. Плід – одно- або двонасінний біб. Всі генеративні пагони восени засихають. Для виду характерне повторне цвітіння при відростанні отави за рахунок розеток третього порядку. Зрізання генеративних пагонів стимулює ріст головної розетки й розгортання бічних розеток, що обумовлює високу стійкість конюшини лучної на сінокошах (Petković et al., 2017). Однак за старіння рослин, кількість генеративних пагонів знижується, головний пагін засихає і розвиваються лише бічні розетки, які вже менш потужні. Для *T. pratense* характерним є наявність твердого насіння до 55–67%, що обумовлює можливість формування відом ґрунтового банку насіння. Насіння зберігає життєздатність протягом 20 років. Запилення перехресне. У ньому беруть участь бджоли, джмелі, а також кропив'янка, метелик-білан капустяний, перлівниця, павине око. *T. pratense* у лісостеповій зоні розмножується виключно насінням, а в умовах Півночі відмічається і вегетативне розмноження за допомогою кореневих паростків (Polevoy et al., 2021; Zanutto et al., 2022, Osterman et al., 2021).

У формуванні короткозаплавних лучних фітоценозів *T. pratense* відіграє вагомe значення і періодично домінує разом із злаками, іншими видами бобових і різно трав'я. Причому частка *T. pratense* у травостой за роками може змінюватися від незначної її кількості до вираженого домінування – так звані «конюшинові» роки, що дає

підстави вважати її типовим ценоциклофлюктуентом. У складі лучного травостою частка виду нерідко складає 10–20 % (Polevoy et al., 2021).

T. pratense відрізняється гнучкою еколого-ценотичною стратегією. Так, у вологих умовах вид проявляє властивості патієнта і має більшу масу вегетативних органів, а у посушливих – віолента і має більшу масу генеративних органів. Вид стійкий до низьких температур і весняних температурних коливань. Погано витримує погіршення аерації ґрунту, що пов'язано з заболочуванням, ущільненням ґрунту, задернінням, а також утворенням мохового покриву. Негативно реагує на засолення і надлишок вологи, а також тривале затоплення талими водами (більше 10–15 днів) (Zanutto et al., 2021). *T. pratense* – це сінокісна рослина, яка добре відростає після скошування. Найбільша частка фітомаси припадає на стебла, ознаки яких у першу чергу змінюються за зміни екологічних умов. По відношенню до випасання вид є помірно стійким (Tucak et al., 2009; Polevoy et al., 2021).

За поживністю сіно з *T. pratense* поступається лише сіну з люцерни. Вміст білків у ньому у півтора рази вище за злакове. У зеленій масі багато каротину і вітаміну С, а вміст сирого протеїну складає 16,0–21,9% (іноді до 25%). Урожайність сіна досягає 40–50 ц з 1 га. Відмінний медонос (Verwimp et al., 2018).

Центрами походження *T. pratense* є південь Європи, Близький Схід, Північна Африка та Центральна Азія. Пізніше він був завезений до більшості регіонів світу з помірним кліматом в якості кормової культури. Фермери високо оцінили конюшину лучну, коли помітили, що у сівозміні вона набагато ефективніша за пар через підвищення врожайності та більшої доступності поживних речовин на полях (Osterman et al., 2022). Відтак аграрії почали збирати насіння *T. pratense* для використання у сівозміні або для покращення пасовищ. Це призвело до створення численних місцевих сортів, найкраще пристосованих до конкретних умов вирощування. Багато з цих сортів збереглися як натуралізовані популяції, які стали джерелом вихідного матеріалу для сучасних селекційних програм (Trněný et al., 2022).

Комплексний популяційний аналіз передбачає всебічне вивчення біології виду на популяційному рівні і передбачає дослідження росту, репродукції, онтогенетичної або вікової, віталітетної, статеві та розмірної структур популяцій (Zlobin et al., 2022). Популяційні дослідження проводилися у межах різних типів рослинних угруповань, а отримані результати дозволили зробити низку важливих висновків щодо порогів стійкості виду залежно від умов зростання і врахувати це під час організації режиму користування і збереження тих чи інших фітоценозів (Zlobin et al., 2022; Zlobin et al., 2021; Kovalenko et al., 2019; Skliar et al., 2019; Bondarieva et al., 2019; Bondarieva & Kyrylchuk, 2023; Kyrylchuk, 2007; Kyrylchuk, 2017; Kyrylchuk, K.S. & Bashtovyi, 2018; Kyrylchuk, 2021; Tykhonova et al., 2021; Zubtsova, 2023; Yaroshenko & Skliar, 2023). Комплексному популяційному аналізу бобових, у тому числі популяцій *T. pratense* також присвячено низку робіт (Kyrylchuk, 2007; Kyrylchuk, 2017;

Kyrylchuk, K.S. & Bashtovyi, 2018; Kyrylchuk, 2021). Однак в останні роки у популяційному аналізі трав'яних фітоценозів активно застосовуються молекулярні методи досліджень, які дозволяють оцінити генетичну різноманітність особин популяцій виду на рівні конкретних локусів ДНК (Collins et al., 2012; Duhar, 2013; Duhar & Popov, 2013; Jones et al., 2020). Тому дослідження генетичного різноманіття популяцій *T. pratense* у складі природних трав'яних фітоценозів Сумської області та м. Суми з використанням олігонуклеотидних ДНК-маркерів як доповнення до результатів комплексного популяційного аналізу даними вивчення генетичної структури популяцій виду, а також у перспективі – пошук генетичних донорів створення вихідного матеріалу для селекції даної культури, є актуальним і з наукової, і з практичної точок зору.

рення вихідного матеріалу для селекції даної культури, є актуальним і з наукової, і з практичної точок зору.

Матеріали і методи досліджень. В якості об'єкта досліджень використовували рослинні зразки *T. pratense*, відібраних з різних локацій міста Суми та Сумської області (рис. 1–2). Тут і далі вони позначені відповідними цифрами для зручності опису: 1 – ділянка перед природним заповідником «Михайлівська цілина», 2 – природний заповідник «Михайлівська цілина», 3 – природний заповідник «Михайлівська цілина», 4 – природний заповідник «Михайлівська цілина» (нова територія), 5 – природний заповідник «Михайлівська цілина» центральний офіс, 6 – озеро Чеха, 7 – вулиця Харківська, 8 – мікрорайон Баранівка.



Рис. 1. Локації заповідника «Михайлівська цілина», в яких здійснювали відбір зразків *T. pratense*



Рис. 2. Локації міста Суми, в яких здійснювали відбір зразків *T. pratense*

Виділення геномної ДНК з рослинного матеріалу проводили за протоколом, запропонованим групою науковців (Kim et al., 1997) з незначними модифікаціями. Рослинний матеріал переносили до пробірок Eppendorf об'ємом 1,5 мл., додавали 700 μ л лізуючого буфера (2% SDS, 0,1мМ TrisHCl EDTA та 0,5 М NaCl, рН 8,1) і подрібнювали матеріал склянкою паличкою. Пробірки з сумішшю інкубували у твердотілому термостаті при t 65°C протягом 30 хв. З метою кращого виходу ДНК у розчин пробірки періодично струшували вручну. Після інкубації пробірки центрифугували 10 хв. зі швидкістю 12000 об/хв. По завершенні центрифугування відбирали 300–400 μ л надосадової рідини (супернатанту) і переносили до чистих пробірок. З метою депротейнізації препарату ДНК використовували розчин протеїнази К (20 мкг/мл), додаючи по 5 μ л у кожен пробірку, а також 250 μ л розчину NaCl 6М для висадження SDS. Отриману суміш перемішували, а потім центрифугували протягом 15 хв. зі швидкістю 12000 об/хв. Очищений супернатант переносили у чисті пробірки. Осадження ДНК проводили додаванням охолодженого етилового спирту (96% при -20°C) з подальшим центрифугуванням протягом 15 хв. зі швидкістю 12000 об/хв. Відмивання отриманого осаду ДНК проводили з використанням етанолу (70%) та центрифугуванням протягом 5 хв. зі швидкістю 12000 об/хв. Після видалення спирту препарат ДНК висушували у термостаті при t 65°C протягом 3 хв. і розчиняли у 100 μ л TE-буфера (TrisHCl EDTA), рН 8,0.

Ампліфікація ДНК проводилася з використанням термоциклера Bio-Rad T100 (США) та готової реакційної суміші (ArtTaq ДНК-полімераза, 10-кратний буфер та 50 мМ MgCl₂). Кінцевий об'єм реакційної суміші склав 20 мкл. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (далі – ПЛР) використовували олігонуклеотидні RAPD-праймери з довільною послідовністю, що зчеплені з ознакою насінневої продуктивності: Ver_1 AATCGGGCTG та Ver_2 GTTGCGATCC (розробник – Eurofins Genomics). ПЛР проводили у такому режимі: початкова денатурація тривала 12 хв. при температурі 95 °C, наступні 30 відбувалися циклів у наступному режимі: денатурація 95 °C – 30 с, відпал праймерів при 32 °C – 1 хв., елонгація при 72 °C – 30 с.

Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 2% агарозному гелі в присутності бромистого етидію. В якості електродного буфера використовували 1,0% ТБЕ-буфер. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили за допомогою транслюмінатора Bio-Rad UV Uviev Mini з подальшим фотографуванням гелю. В якості маркера молекулярної ваги використовували rUC19 DNA / Kzo9I. Маркер являє собою плазмиду, гідролізовану ферментом з утворенням 15 фрагментів та включає від 955 до 8 пар нуклеотидів.

Статистичну обробку даних з побудовою дендрограм проводили з використанням програми «STATISTICA 8.0».

Результати. Перед проведенням ампліфікації ДНК зразків конюшини лучної було здійснено оцінку якості препаратів нуклеїнових кислот, отриманих за зазначе-

ним вище протоколом (рис. 3). Отримані смужки ДНК (бенди) виявилися різної товщини та інтенсивності, але сліди нуклеїнових кислот виявлені в усіх підготованих препаратах. Загалом, якість отриманих препаратів ДНК задовільна.

Генетична структура популяції конюшини лучної природних лучних угруповань зазначеного вище регіону дослідження була проаналізована за допомогою RAPD-праймерів (фрагментів ДНК, підібраних у вигляді випадкових послідовностей нуклеотидів). У результаті отримували ряд продуктів ампліфікації (ампліконів), компліментарно відповідних тій чи іншій послідовності молекули ДНК. Один амплікон спектра розглядався як один локус ДНК. Поліморфізм кожного локусу оцінювали за наявністю чи відсутністю фрагмента певної довжини у спектрі.

При використанні двох декамерних олігонуклеотидних праймерів спостерігалось від одного до трьох ампліконів; в деяких випадках продуктів ампліфікації не виявлено взагалі. Варто зазначити, що всі ампліфіковані фрагменти розподілено цілком рівномірно і вони мають довжину ~ 341 н.п (табл. 1).

З 9 виявлених ампліконів з використанням праймера Ver_1 всі виявилися поліморфними; поліморфізм за праймером Ver_2 виявився на рівні 88,9%. Це дуже високий показник, який може залежати від нуклеотидної будови праймерів, а також генних модифікацій в угрупованнях досліджуваних рослин, оскільки конюшина лучна є перехреснозапильною рослиною-ентомофілом. Також варто зазначити, що відібраний матеріал неможливо віднести до селекційного.

З метою всебічної оцінки генетичної різноманітності досліджуваних популяцій конюшини лучної нами проведено кластерний аналіз за принципом «найближчого сусіда». Було отримано матрицю генетичних відстаней між зразками і побудовано відповідну дендрограму (рис. 5).

Розрахунками виявлено два кластери, що демонструють розподіл зразків. Найбільш тісною спорідненістю відзначаються зразки 6 та 7, тобто зразки, зібрані в районі озера Чеха та вул. Харківської. Такий ступінь спорідненості цілком закономірний, оскільки дані локації розташовані дуже близько одна до одної. Зразки 1 та 4 не виявляють жодної спорідненості по кожному з праймерів. Це рослини, зібрані у локації перед Михайлівською цілиною та новою територією заповідника відповідно. Подібна особливість гіпотетично може свідчити про наявність алелів культурної конюшини у генотипі рослин зазначених локацій, які могли з'явитися внаслідок перехресного запилення або навіть механічного потрапляння. Найбільш тісна подібність простежується між зразками 2, 3, 5 та 8. Перші три зразки були зібрані на території заповідника, тому їх спорідненість цілком логічна. Виключення складає лише зразок 8, відібраний на території м. Суми у мікрорайоні Баранівки (дачний масив). Найбільш ймовірно, що зразок являє собою дикий різновид конюшини лучної, який не зазнав запилення культурними сортами.

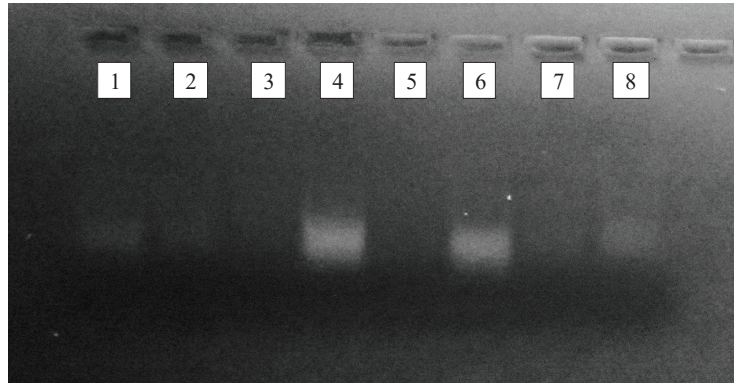


Рис. 3. Стан препаратів ДНК, отриманих зі зразків *Trifolium pratense* L.

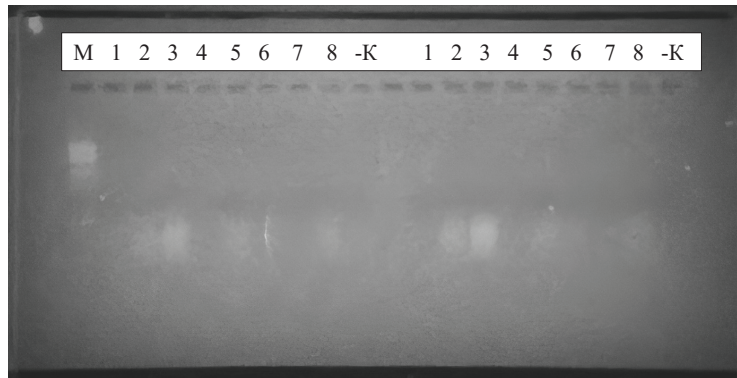


Рис. 4. RAPD-спектри досліджуваних зразків *Trifolium pratense* L., отримані з використанням праймерів Ver_1 та Ver_2: М – маркер молекулярної маси 1000 пар нуклеотидів, -К – негативний контроль, 1 – 8 зразки *Trifolium pratense* L., відібрані з різних локацій м. Суми та Сумської області

Таблиця 1

Рівень генетичного поліморфізму зразків конюшини лучної м. Суми та Сумської області

Праймер	Кількість смуг продуктів ампліфікації (ампліконів), шт								Кількість поліморфних ампліконів, шт	Ступінь поліморфізму, %
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Ver_1	0	2	3	0	2	0	0	2	9	100,0
Ver_2	0	3	3	0	1	0	0	2	8	88,9

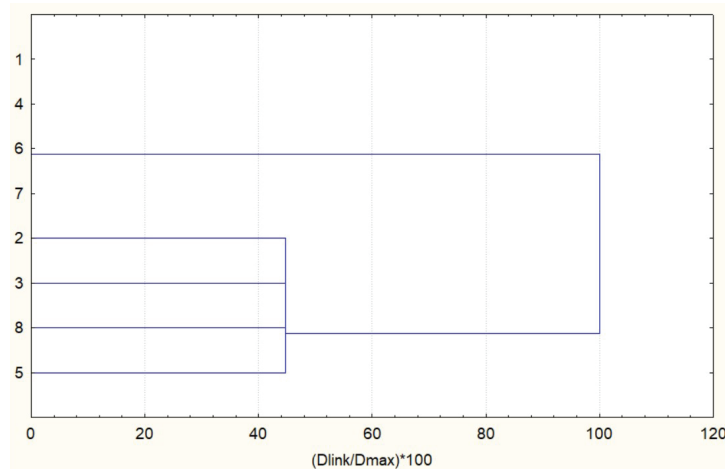


Рис. 5. Дендрограма спорідненості зразків конюшини лучної, зібраної на території м. Суми та Сумської області (природний заповідник «Михайлівська цілина»)

Таким чином, найбільшим ступенем спорідненості між собою відзначаються зразки конюшини лучної, зібрані в м. Суми, а також зразки з території природного заповідника Михайлівська цілина.

Обговорення. Дослідження генетичної різноманітності конюшини лучної, як селекційних сортів, так і популяцій природних угруповань, відбувається, в основному, з використанням або поліморфних фрагментів (RAPD), або мікросателітних повторів (ISSR), але не обмежується ними.

Наприклад, Řepková & Nedělník (Řepková & Nedělník, 2014) в огляді досліджень про генетичне різноманіття конюшини лучної відзначають метод оцінки вмісту ядерної ДНК і про її міжвидову варіативність. Мікроскопічне дослідження каріотипу виявляє відмінності у довжині прометази різних видів і демонструє величини від 5,1 до 7,4 мкм. Також автори відзначають використання маркерів типу AFLP, RAPD та ISSR для оцінки мінливості зародкової плазми та ідентифікації селекційних сортів, при цьому випадково підібрані поліморфні фрагменти ДНК (RAPD) найкраще підходять для вивчення біорізноманіття виду.

У дослідженнях Charlotte Jones (Jones et al., 2020) також використовувалися праймери RAPD для досліджень зародкової плазми конюшини лучної різного еколого-географічного походження, зокрема Азії, Об'єднаного королівства та Іспанії. Було встановлено, що ступінь спорідненості європейських зразків більш тісний між собою, ніж з азійськими популяціями.

De Vega зі співавторами провели кластеризацію 40868 генів конюшини лучної після секвенування синтетичної популяції з 86 генотипів (De Vega et al., 2015). Метою роботи було визначення граничного числа маркерів для селекційних досліджень. Ампліфікація генетичного матеріалу з використанням маркерів SSR для встановлення одноступінцевого поліморфізму SNP популяції дозволила встановити різні частоти алелів для видів норвезької конюшини.

У вивченні генетичного різноманіття селекційних сортів конюшини лучної української селекції активно

використовується домінантна система маркерів RAPD, про що зазначають Ю. Дугарь та В. Попов (Duhar, 2013; Duhar & Popov, 2013). Автори відзначають високу результативність маркерних систем та їх ефективність для селекційної роботи. За результатами досліджень 15 сортів конюшини виявлено 134 локуси, з яких 96 – поліморфні, а загальний ступінь поліморфізму складає 71,6%. Довжина фрагментів ДНК в електрофореграмі складає від 2024 до 141 нп.

Petrauskas зі співробітниками збрали зародкову плазму конюшини з природних фітоценозів – всього було досліджено 12 фенотипових ознак, зокрема загальна висота рослин, а також вміст сирогої клітковини та білку. За результатами компонентного аналізу ознак було визначено три групи конюшини лучної, а саме «сорт», «дикі форми» та «межеумки». Такий підхід, за словами авторів, дозволяє визначити потрібні для селекції генотипи (Petrauskas et al., 2023).

Дослідниками з КНР було здійснено повногеномне секвенування (прочитання послідовності нуклеотидів у молекулі ДНК) 10 зразків конюшини лучної, відібраних з природних фітоценозів (Chao et al., 2018). Метою роботи був пошук нових, унікальних генів та кластеризація геномів для потенційного їх використання у молекулярно-генетичних дослідженнях та селекції.

Висновки. За результатами молекулярної діагностики 8 зразків конюшини лучної, відібраної із фітоценозів м. Суми та Сумської області з використанням декамерних RAPD-праймерів, було виявлено 18 локусів, 17 з яких полімерні. Таким чином, обидва праймери відзначаються практично однаковим ступенем поліморфізму. За ступенем генетичної спорідненості виявлено два великі кластери: перший – зразки з фітоценозів м. Суми та другий – зразки з території природного заповідника «Михайлівська цілина» з Михайлівської цілини. Отже, застосування ПЛР-діагностики з використанням RAPD-праймерів для оцінки генетичних ресурсів з їх подальшим використанням у молекулярній біології та селекційних програмах є достатньо ефективним.

Бібліографічні посилання:

1. Amdahl, H. (2016). Improving the seed yield potential of tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.). Norwegian University of Life Sciences, 2016 (79), 100.
2. Chao, Y., Yuan, J., Li, S., Jia, S., Han, L. & Xu, L. (2018). Analysis of transcripts and splice isoforms in red clover (*Trifolium pratense* L.) by single-molecule long-read sequencing. BMC Plant Biology, 18 (300), 1–12. doi: 10.1186/s12870-018-1534-8
3. Bondarieva, L.M., Kyrylchuk, K.S., Skliar, V.H., Tikhonova, O.M., Zhatova, H.O. & Bashtovyi, M.G. (2019). Population dynamics of the typical meadow species in the conditions of pasture digression in flooded meadows. Ukrainian Journal of Ecology, 9 (1), 204–211.
4. Bondarieva, L. M., & Kyrylchuk, K. S. (2023). Структура популяції лучних рослин на затоплених луках лісостепової зони за умов випасання та синкосіння [Structure of meadow plant populations in flood meadows of the forest-step zone under grazing and mowing conditions]. Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Agronomy and Biology, 51(1), 3–13 (in Ukrainian). doi: 10.32782/agrobio.2023.1.1
5. Collins, R. P., Helgadóttir, Á., Frankow-Lindberg, B. E., Skøt, L., Jones, C. & Skøt, K. P. (2012). Temporal changes in population genetic diversity and structure in red and white clover grown in three contrasting environments in northern Europe. Annals of Botany, 110, 1341–1350. doi: 10.1093/aob/mcs058
6. De Vega, J. J., Sarah Ayling, Matthew Hegarty, Dave Kudrna, Jose L. Goicoechea, Åshild Ergon, Odd A. Rognli, Charlotte Jones, Martin Swain, Rene Geurts, Chunting Lang, Klaus F. X. Mayer, Stephan Rössner, Steven Yates, Kathleen J. Webb, Iain S. Donnison, Giles E. D. Oldroyd, Rod A. Wing, Mario Caccamo, Wayne Powell, Michael T. Abberton & Leif Skøt. (2015). Red clover (*Trifolium pratense* L.) draft genome provides a platform for trait improvement. Scientific Reports, 5(17394), 1–2. doi: 10.1038/srep17394

7. Dluhošová, J., Ištváněk, J., Nedělník, J., & Řepková, J. (2017). Red Clover (*Trifolium pratense*) and Zigzag Clover (*T. medium*) – A Picture of Genomic Similarities and Differences. *Frontiers in Plant Science*, 9(724), 1–14. doi: 10.3389/fpls.2018.00724
8. Drebot, O. V., Kudryk, A. P., Pitsil, A. O. & Lukianenko, O. P. (2018). Pidvyshchennia bioriznomanittia roslynnykh formatsii pid chas zemleustroiu ahrolandschaftu [Increasing the biodiversity of plant formations during land management of the agrolandscape]. *Naukovi visnyk NLTU Ukrainy*, 28(3), 18–21, (in Ukrainian).
9. Duhar, Iu. M. (2013). Henetychni vzaiemovidnosyny ukrainskykh sortiv koniushyny luchnoi za DNK-markeramy [Genetic relationships of Ukrainian meadow clover varieties according to DNA markers]. *Biologichni systemy*, 5(4), 479–483 (in Ukrainian).
10. Duhar, Iu. M. & Popov, V. N. (2013). Genetic structure and diversity of Ukrainian red clover cultivars revealed by microsatellite markers. *Open Journal of Genetics*, 3, 235–242. doi: 10.4236/ojgen.2013.34026
11. Ištváněk, J., Dluhošová, J., Dluhoš, P., Pátková, L., Nedělník, J., & Řepková, J. (2017). Gene Classification and Mining of Molecular Markers Useful in Red Clover (*Trifolium pratense*) Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–16. doi: 10.3389/fpls.2017.00367
12. Jones, C., De Vega, J., Lloyd, D., Hegarty, M., Ayling, S., Powell, W. & Skøt, L. (2020). Population structure and genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) germplasm. *Scientific Reports*, 10 (8364), 1 – 12. doi: 10.1038/s41598-020-64989-z
13. Kim C.S., Lee C.H., Shin J.S., Chung Y.S., Hyung N.I. (1997). A simple and rapid method for isolation of high-quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*. 25 (5), 1085–1086.
14. Kovalenko, I., Skliar, Iu., Klymenko, H. & Kovalenko, N. (2019). Vitality Structure of the Populations of Vegetative Motile Plants of Forest Ecosystems of the North-East of Ukraine. *The Open Agriculture Journal*, 13, 125–132. doi: 10.2174/1874331501913010125.
15. Kyrylchuk, K., Skliar, V., Tykhonova, O. & Kobzhev, O. (2021). Vitality dynamics of populations of some legume species in floodplain meadows of the Psel river basin under grazing and haymaking (Ukraine). *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, LXV(1), 406–414.
16. Kyrylchuk, K.S. & Bashtovyi, M.H. (2018). Kompleksnyi analiz populatsii *Trifolium pratense* L. na zaplavnykh lukakh lisostepovoi zony Ukrainy [Comprehensive analysis of *Trifolium pratense* L. populations in floodplain meadows of the forest-steppe zone of Ukraine]. *Naukovi visnyk Skhidnoevropeiskoho natsionalnoho universytetu imeni Lesi Ukrainky*, 4 (377), 5–15. doi: 10.29038/2617-4723-2018-377-5-15
17. Kyrylchuk K.S. (2017). Vitalitetna struktura populatsii *Trifolium pratense* L. ta *Trifolium repens* L. na zaplavnykh lukakh v umovakh hospodarskoho korystuvannia [Vitality structure of *Trifolium pratense* L. and *Trifolium repens* L. populations on floodplain meadows under conditions of economic use]. *Visnyk SNAU: Seriya «Ahronomiia i biolohiia»*, 2 (33), 12–16 (in Ukrainian).
18. Kyrylchuk K.S. (2007). Vikova ta vitalitetna struktury populatsii bobovykh na zaplavnykh lukakh r. Psel (Lisostepova zona) v umovakh hospodarskoho korystuvannia [Age and vitality structures of legume populations on the floodplain meadows of the Psel River (Forest-Steppe zone) under conditions of economic use]. *Ukrainskyi botanichnyi zhurnal*, 64(3), 418–425 (in Ukrainian).
19. Naydenova, G. & Vasileva, V. (2019). Comparative evaluation of diploid and tetraploid red clover genotypes in a flat area of Northern Bulgaria. *Journal of Central European Agriculture*, 20 (3), 919 – 927. DOI: /10.5513/JCEA01/20.3.2231
20. Osterman, J., Hammenhag, C., Ortiz, R. & Geleta, M. (2021). Insights Into the Genetic Diversity of Nordic Red Clover (*Trifolium pratense*) Revealed by SeqSNP-Based Genic Markers. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1 – 18. doi: 10.3389/fpls.2021.748750
21. Osterman, J., Hammenhag, C., Ortiz, R. & Geleta, M. (2022). Discovering candidate SNPs for resilience breeding of red clover. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1 – 17. doi: 10.3389/fpls.2022.997860
22. Petkovic, B., Przulj, N., Radic, V. & Miroslavljevic, M. (2017). Comparative study of seed yield and seed quality of advanced lines and commercial varieties of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Legume Research*, 40(6), 1066–1071. doi: 10.18805/LR-360
23. Petrauskas, G., Norkevičienė, E. & Baistruk-Hlodan, L. (2023). Genetic Differentiation of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Cultivars and Their Wild Relatives. *Agriculture*, 13 (1008), 1 – 13. doi: 10.3390/agriculture13051008
24. Petrauskas, G., Stukonis, V. & Norkevičienė, E. (2020). Defining a Phenotypic Variability and Productivity in Wild Type Red Clover Germplasm. *Journal of Agricultural Science*, 12 (9), 52–61. doi: 10.5539/jas.v12n9p52
25. Polevoy, A. M., Bozhko, L. E. & Barsukova, E. A. (2021). The influence of weather conditions on the formation of meadow clover productivity on the right bank of the Forest-Steppe of Ukraine. *Bulletin of Poltava State Agrarian Academy*, 2, 38–45. doi: 10.31210/visnyk2021.02.04
26. Řepková, J. & Nedělník, J. (2014). Modern Methods for Genetic Improvement of *Trifolium pratense*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50 (2), 92–99.
27. Skliar, V., Kovalenko, I., Skliar, Iu. & Sherstiuk, M. (2019). Vitality structure and its dynamics in the process of natural reforestation of *Quercus robur* L. *AgroLife Journal*, 8(1), 233–241. Access mode: <https://agrolifejournal.usamv.ro/index.php/agrolife/article/view/441>
28. Tucak, M., Čupić, T., Popović, S., Stjepanović, M., Gantner, R. & Meglič, V. (2009). Agronomic Evaluation and Utilization of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Germplasm. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37 (2), 206–210.
29. Trněný, O., Vlk, D., Macková, E., Matoušková, M., Řepková, J., Nedělník, J., Hofbauer, J., Vejražka, K., Jakešová, H., Jansa, J., Piálek, L. & Knotová, D. (2019). Allelic Variants for Candidate Nitrogen Fixation Genes Revealed

by Sequencing in Red Clover (*Trifolium pratense* L.). International Journal of Molecular Science, 20 (5470), 1 – 26. doi: 10.3390/ijms20215470

30. Tykhonova O., Skliar V., Sherstiuk M., Kyrylchuk K., Butenko A., Bashtovyi M. (2021). Analysis of *Setaria glauca* (L.) P. Beauv. Population's Vital Parametres in grain Agrophytocoenoses. Environmental Research, Engineering and Management, 2021, 77(1), 33–46. doi: 10.5755/j01.erem.77.1.25489

31. Zannotto, S. (2022). A study of freezing tolerance in red clover (*Trifolium pratense* L.). Norwegian University of Life Sciences, Faculty of Biosciences, Department of Plant Science, 160.

32. Zannotto, S., Amdahl, H. & Ergon, Å. (). Red clover adaptation to a Nordic climate. Vleugels Exploiting genetic diversity of forages to fulfil their economic and environmental roles. Proceedings of the 34th Meeting of the EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section in cooperation with the EUCARPIA Festulolium Working Group Freising 6–8 September, 2021, 33 – 36. doi: 10.5507/vup.21.24459677.08

33. Zannotto, S., Palmé, A., Helgadóttir, Á., Daugstad, K., Isolanti, M., Öhlund, L., Marum, P., Ahlin, M., Merja, M., Odd, V., Rognli, A. & Ergon, Å. (2021). Trait characterization of genetic resources reveals useful variation for the improvement of cultivated Nordic red clover. Journal of Agronomy and Crop Science, 3, 492–503. doi: 10.1111/jac.12487

34. Verwimp, C., Ruttink, T., Muylle, H., Glabeke, S. V., Cnops, G., Quataert, P., Olivier, H. & Roldán-Ruiz, I. (2018). Temporal changes in genetic diversity and forage yield of perennial ryegrass in monoculture and in combination with red clover in swards. Plos One, 8, 1–25. doi: 10.1371/journal.pone.0206571

35. Yan, Z., Sang, L., Ma, Y., He, Y., Sun, J., Ma, L., Li, S., Miao, F., Zhang, Z., Huang, J., Wang, Z. & Yang, G. (2022). A de novo assembled high-quality chromosome-scale *Trifolium pratense* genome and fine-scale phylogenetic analysis. BMC Plant Biology, 22(332), 1 – 12. doi: 10.1186/s12870-022-03707-5

36. Yaroshenko, N., & Skliar, V. (2023). Otsinka ontogenetichnoi ta vitalitetnoi struktur populatsii *Asarum europaeum* L. u Gettinhenskomu Lisi, Nyzhnia Saksoniia, Nimechchyna [Ontogenetic and vitality structure evaluation of *Asarum europaeum* L. in Göttinger Wald, Low Saxony, Germany]. Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Agronomy and Biology, 49(3), 76–81 (in Ukrainian). doi: 10.32845/agrobio.2022.3.10

37. Zlobin, Yu. A., Skliar, V. G. & Klymenko, G. O. (2022). Biologiya ta ekologiya fitopopulatsii [Biology and ecology of phytopopulations] Sumy: Universytetska knyga, 512 (in Ukrainian).

38. Zlobin, Y., Kovalenko I., Klymenko H., Kyrylchuk K., Bondarieva L., Tykhonova, O., & Zubtsova, I. (2021). Vitality Analysis Algorithm in the Study of Plant Individuals and Populations. The Open Agriculture Journal, 15(1), 119–129. doi: 10.2174/1874331502115010119

39. Zubtsova, I. V. (2023). Vitalitetna struktura populatsiy *Centaurium erythraea* Rafn. v umovakh rehional'noho landshaftnoho parku «Seyms'kyi» [Vitality structure population of *Centaurium erythraea* Rafn. in conditions of regional landscape park «Seimskyi». Scientific Issue Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University]. Series: Biology, 82(4), 6–13 (in Ukrainian). doi: 10.25128/2078-2357.22.4.1

Kyrylchuk K.S., PhD (Biological Sciences), Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Bakumenko O.M., PhD (Agricultural Sciences), Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Vereshchahin I. V., PhD (Agricultural Sciences), Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

RAPD-analysis in the system of complex ecological and analytical monitoring of red clover populations of meadow grass phytocoenosis of the Sumy region

The article is devoted to the study of populations of red clover (*Trifolium pratense* L.) in natural herbaceous phytocoenoses in Sumy city and Sumy region (Nature Reserve Mykhailivska Tsilyna) using molecular biological methods, in particular PCR diagnostics with the participation of oligonucleotide RAPD primers, in order to establish the genetic diversity of the species at the population level. The study of the genetic structure of species populations is a component of a comprehensive population analysis, which, among other things, includes the study of age and ontogenetic, sexual, size and vitality structures, reproduction and growth processes, which allows us to reveal the mechanisms of species resistance in certain growth conditions, assess the prospects for its existence and draw conclusions about the genetic diversity of its populations.

From an agronomic point of view, red clover is an extremely valuable field crop, as it is used as fodder for livestock, and its ability to fix atmospheric nitrogen in the soil provides companion grasses with this nutrient. For this reason, meadow clover is a good precursor for cereals. Within natural phytocoenoses, the share of meadow clover can be up to 20% of the grass stand, which, together with other grass species, forms highly productive meadows. The study of natural communities of red clover at the molecular (genomic) level allows us to assess the degree of biodiversity of the species, the breeding potential of varieties as a source of target genes for selection in particular and genetic plasma in general. Molecular analysis will also make it possible to estimate the loss of genetic resources of the red clover as a result of aggressive military operations.

The object of the study was red clover samples collected in different locations of herbaceous phytocoenoses in Sumy and the Nature Reserve Mykhailivska Tsilyna. Genetic material (DNA) was extracted using salt-enzyme extraction, followed by purification and nucleic acid precipitation. DNA amplification was performed using RAPD primers Ver_1 AATCGGGCTG and Ver_2 GTTGCGATCC followed by visualization of reaction products in an agarose gel in the presence of ethidium bromide. The nature of the amplicons indicates the satisfactory quality of the nucleic acid preparations. Amplification of fragments revealed a high degree of polymorphism at both markers (17 polymorphic loci out of 18), and the study of the affinity of red clover samples using cluster analysis established a close relationship between samples growing within the city of Sumy in adjacent locations, as well as the Nature Reserve Mykhailivska Tsilyna.

Key words: *Trifolium pratense* L., RAPD analysis, natural herbaceous phytocoenoses, populations, genetic diversity, primer.