

ВИКОРИСТАННЯ RAPD-АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ СОРТІВ ЛЬОНУ УКРАЇНСЬКОЇ ТА ЗАРУБІЖНОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Верещагін Ігор Володимирович

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

Кандиба Наталія Миколаївна

кандидат сільськогосподарських наук, доцент
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна
ORCID: 0000-0001-6548-3670
kandybanataliya@protonmail.com

Собран Іван Васильович

кандидат сільськогосподарських наук, доцент
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна
ORCID: 0000-0002-5553-657X
ivan_sobran@outlook.com

Оничко Тетяна Олександрівна

старший викладач
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна
ORCID: 0000-0003-0411-1157
onychko@gmail.com

Льон є однією з найдавніших та найважливіших прядивних культур у світі. Вперше виявлений на півдні Іспанії, він розпочав свій селекційний рух, який триває і сьогодні. У наші часи селекція льону досягла значних результатів у підвищенні вмісту волокна у стеблах рослин, насінневої продуктивності, якісного складу олії, стійкості до основних хвороб та шкідників, таких як фузаріоз та антракноз.

Льон відзначається високоякісною волокнистою та насінневою продукцією, що використовується для виготовлення різноманітних тканин та олії харчового та технічного напрямку. Лляна тканина характеризується високою міцністю та гіпоалергенністю, а олія містить у своєму складі незамінні поліненасичені кислоти.

Сьогодні генетичні колекції льону, що зберігаються та використовуються науково-дослідними і навчальними установами, складають десятки тисяч екземплярів. Така кількість зразків, теоретично, дозволяє отримати різноманітний вихідний матеріал для успішної селекції, але разом з тим спостерігається і тенденція до генетичного збіднення виду через інтенсивний селекційний вплив. Ведення селекційного процесу з культурою льону завжди спирається на оцінку морфологічних показників величезної маси рослинного матеріалу з його щорічною польовою оцінкою. Така практика значно уповільнює створення нових сортів.

Натомість, використання у селекційному процесі з культурою льону інструментів, здатних працювати зі спадковою основою організму напряму, значно прискорює процес створення нового матеріалу, робить його більш точним через ідентифікацію та добір цільових генів.

Мета даної статті полягає в ідентифікації зразків льону Національної колекції з використанням випадково підібраних декамерних RAPD-праймерів (random amplified of polymorphic DNA). У роботі використовували зразки льону різного еколого-географічного походження. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили з використанням двох декамерних праймерів Ver_1 AATCGGGCTG та Ver_2 GTTGCGATCC.

У результаті досліджень було виявлено 55 локусів (25 та 30 відповідно до кожного праймера), що свідчать про результативність ампліфікації. Ступінь поліморфізму отриманих локусів склав від 57 до 78%. Також було встановлено, що генетично більш спорідненими зразками льону є українські; європейські зразки закономірно мають більш тісні генетичні зразки.

Ключові слова: льон, зразок, ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, праймер, локус, кластер.

DOI <https://doi.org/10.32782/agrobio.2023.2.3>

Вступ. Тисячолітня історія людства є історією пристосування до мінливих умов навколишнього середовища. Момент, коли людина почала зберігати та розмножувати

насіння дикорослих рослин, відкрив нову епоху людської історії – період народної селекції, керованої несвідомим добром. Культивація рослин була спрямована на задо-

волення різноманітних потреб, зокрема в харчуванні та одязі. Господарські рослини повсякчас поліпшувалися за комплексом ознак, призвело до формування сортів-кряжів, або найкращих місцевих сортів (Lohinov et al., 2014; Kryvosheieva, 2017). Льон справедливо вважається однією з найдревніших прядивних культур. У басейні Середземного моря та на Близькому Сході з лляного волокна виготовляли перший тканий одяг, а насіння вживали в їжу (Kryvosheieva & Lohinov, 2008).

Льон (*Linum usitatissimum* L.), з ботанічної точки зору, є однорічною трав'янистою рослиною з коротким вегетаційним періодом (понад 120 діб), невисоким коефіцієнтом розмноження, невеликими квітками, в яких, на момент розкриття пелюсток вже відбулося запилення. Кількість господарських ознак льону також невелика. З біологічної та агрономічної точки зору льон вивчено достатньо добре, однак його походження та генетичні механізми контролю ознак потребує вивчення (Yotka et al., 2017; Kryvosheieva, 2017)

Стародавні сорти та місцеві форми, отримані в результаті природного та штучного добору, без перебільшення, вважаються "золотим фондом" колекцій, оскільки вони найкраще пристосовані до локальних умов вирощування, зокрема за тривалістю періоду вегетації, або стійкістю до тих чи інших патогенів. Вивчення цих форм льону дозволяє отримати не лише уявлення про їх основні властивості та ознаки, а й встановити філогенетичні зв'язки, що надзвичайно важливо для географічних досліджень (Dorota et al., 2020; Didora et al., 2008).

Сучасні сорти льону є джерелом високоякісного волокна, яке придатне для виробництва різноманітних тканин – як мішковини, брезенту, тарних тканин, так і найтоншого батисту та серветок; вміст волокна у стеблах складає більше 30%, а врожайність – понад 2,0 т/га. Насіння льону також слугує для виробництва унікальних харчових продуктів, зокрема високоякісної олії, багаті на поліненасичені жирні кислоти (Bayrak et al., 2010; Heller et al., 2010).

Вживання лляної олії позитивно впливає на людський організм. Ізомери жирних кислот бажані для вживання жінками у пренатальний період та під час лактації, для хворих з дисфункцією підшлункової залози (діабет I та II типу), при шкірних висипаннях та простатиті, а також для при серцево-судинних захворюваннях. Жирні кислоти показані під час занять спортом та інших фізичних навантажень (Heller & Wielgusz, 2011).

Головна проблема у селекції льону полягає у звуженні генетичного різноманіття культури і збіднінні її генетичного потенціалу. Тривала селекційна робота призвела до посилення небажаних кореляційних зв'язків між скоростиглістю, продуктивністю та якістю. Вище вказане звужує можливості гібридизації та добору як класичних методів селекції з чим і пов'язується проблема "виходу на плато" основних господарських ознак, критичне зниження їх варіабельності. Важливою проблемою залишається і довготривалість створення нових сортів (Soto-Cerda, et al., 2013; Guo et al., 2020; Ahmed et al., 2019).

У той же час дослідниками відзначається недостатня вивченість генетичних колекцій льону і практично повна

відсутність наукової взаємодії між їх утримувачами, з чого постає проблема об'єктивної та різнобічної оцінки генетичної різноманітності сучасного генофонду льону, дублювання зразків у колекціях, а також ефективного використання у подальшій селекційній роботі (Hoque et al., 2020; Nđžková et al., 2019).

Весь цей комплекс проблем вимагає використання у селекційному процесі з льоном докорінно нових методів досліджень, які б могли працювати з генетичною основою організму напряму. Такими методами являються біотехнологічні методи, зокрема застосування молекулярних маркерів, пов'язаних з відповідними генами або групою генів і здійснювати добір за парюю "маркер – ген" (Wu et al., 2015; Amarnath et al., 2021; You et al., 2016).

Новітня селекційна технологія дістала назву "генетичне маркування" і особливо актуальне для видів культурних рослин, що мають слабкі міжсортівні відмінності, куди належить і льон. Ця технологія передбачає застосування специфічних, як правило, олігонуклеотидних фрагментів ДНК (маркерів). Застосування ДНК-маркерів, тісно зчеплених з тією чи іншою ознакою (або маркер-асоційована селекція, MAS) набагато підвищує ефективність селекційних програм. Їх можливості надзвичайно широкі: вони дозволяють диференціювати як цілі таксономічні одиниці, так і окремі організми.

Тому виникає потреба в активному впровадженні молекулярних методів у селекційну практику, зокрема добору за молекулярними маркерами, що пов'язані з тією чи іншою господарською ознакою (Fadel et al., 2022; Chandrawati et al., 2017; Doaa et al., 2022).

На сьогодні в молекулярно-генетичних дослідженнях використовуються такі довільні ДНК-маркерні системи, як: RAPD, AFLP, SSR, ISSR, IRAP, REMAP тощо.

З використанням молекулярних методів у сучасних сортів льону виявлено зменшення частоти рідкісних та унікальних алелей мікросателітних локусів та збільшення частки фіксованих рецесивних RAPD (random amplified of polymorphic DNA) локусів, тобто звуження спектру генетичної мінливості (Doaa et al., 2022; Cullis, 2005).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, випадково ампліфікована поліморфна ДНК) як молекулярно-маркерна система передбачає проведення ПЛР з використанням довільних, коротких праймерів (близько 10 нуклеотидів), які комплементарно зв'язуються з ДНК та забезпечують ампліфікацію ділянки геному, розташованої між ними. Поліморфізм, характерний для специфічних сайтів зв'язування RAPD-маркерів, виявляється шляхом розділення за допомогою електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелі, та підтверджується присутністю або відсутністю специфічних фрагментів. Тому, якщо в ділянці геному, яка комплементарна до RAPD-маркеру, відбулася мутація, то ПЛР продукт утворюватися не буде, і, як наслідок, зміниться кількість та розподіл ампліконів у гелі. Окрім того, RAPD є надзвичайно чутливим методом, і кінцевий результат залежить від багатьох факторів, таких як концентрація геномної ДНК, довжина та температура відпалу праймерів, тип ДНК-поліме-

рази, концентрація ПЛР-буферу та хлориду магнію тощо (El Sayed et al., 2021; Xie et al., 2018).

Опубліковано значну кількість даних щодо дослідження генетичної різноманітності на міжвидовому та внутрішньовидовому рівнях у різних видів рослин з використанням RAPD-методу. Серед сільськогосподарських культур, які широко вирощуються в Україні, RAPD-маркери розроблені для гороху, пшениці, кукурудзи, ячменю, картоплі, а також льону (Uradhyau et al., 2019; Doaa et al., 2022).

Матеріали і методи досліджень. В якості об'єкта досліджень використовували тінкові проростки 9 зразків льону колекції Інституту луб'яних культур НААН України (м. Глухів, Сумська область) різного еколого-географічного походження, зокрема Глазур, Чарівний, Зоря 87//Hermes/Electra, ЛКС-8, Есмань, Блакитний УНЕМЗ, 2397 (країна походження – Україна; довгунець), Agatha (країна походження – Нідерланди; межеумок), Lirina (країна походження – Німеччина; олійний).

Виділення геномної ДНК з рослинного матеріалу проводили за наступним протоколом. Насіння льону пророщували на фільтрувальному папері у термостаті, а проростки потім 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 скляною 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 мг/мл), додаючи по 5 μ л у кожну 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 ТЕ-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 тем-

пературі 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 трансільюмінатора Bio-Rad UV Uviev Mini з подальшим фотографуванням гелю. В якості маркера молекулярної ваги використовували рUC19 DNA / Kzo9I. Маркер являє собою плазмідну, гідролізовану ферментом з утворенням 15 фрагментів та включає від 955 до 8 пар нуклеотидів.

Статистичну обробку даних з побудовою дендрограм проводили з використанням програми демо-версії "PHYLIP-3.69".

Результати. Кількість ампліконів, що позначають окремі локуси, у результаті реакції та їх довжина для всіх зразків льону колекції Інституту луб'яних культур НААН виявилася без різких коливань, що може свідчити в цілому про результативність ампліфікації. Спільна для всіх зразків ознака – переважна кількість отриманих фрагментів розташована в області від ~141 н.п. (пар нуклеотидів) (рис. 1а та 1б).

Розподіл виявлених локусів генів ознаки насінневої продуктивності за RAPD-праймерами у сортів льону наступний. Три порівняно короткі фрагменти в зоні ~141 н.п. та 105 н.п., що відповідають чотирьом локусам. У сортів Чарівний та Есмань виявлено на один локус менше (табл. 1). Найбільшою довжиною фрагментів ДНК відзначається сорт Agatha – тут виявлено два локуси довжиною 341 н.п. Для зразка Lirina зафіксовано лише два коротких фрагменти довжиною 141 н.п.; інших фрагментів не зафіксовано. У гібриду Зоря 87//Hermes/Electra виявлено 4 фрагменти довжиною від 258 до 141 н.п. У зразків ЛКС 8 та 2397 один локус розташований в зоні ~141 н.п., інший – в ~105 н.п. У зразка Блакитний УНЕМЗ виявлено три короткі фрагменти довжиною 258 – 141 н.п. (табл. 1).

Отже, праймер Ver_1 з нуклеотидною послідовністю AATCGGGCTG є спільним для багатьох зразків і ця спільність має певні особливості. Зразки ЛКС 8 та 2397 є повністю ідентичними. Сорт Lirina є сортом олійного напрямку з підвищеною насінневою продуктивністю, але розташування локусів у нього таке ж, як у сортів Чарівний, Есмань та гібрида Зоря 87//Hermes/Electra. Цей факт може пояснюватися тим, що вказані зразки відзначаються підвищеною насінневою продуктивністю, а даний маркер якраз і зчеплений з цією ознакою. Селекція сорту Agatha йшла в напрямку підвищення якості волокна і саме цим може пояснюватися його відмінність від загального масиву (табл. 1).

Розподіл виявлених локусів зразків льону по праймеру Ver_2 має як спільні, так і відмінні результати (табл. 2). У сортів Глазур, Чарівний та Agatha виявлено однакове число фрагментів такої ж довжини, як і в попереднього праймера. У сорту Lirina виявлено лише один фрагмент і це найменша кількість виявлених локусів

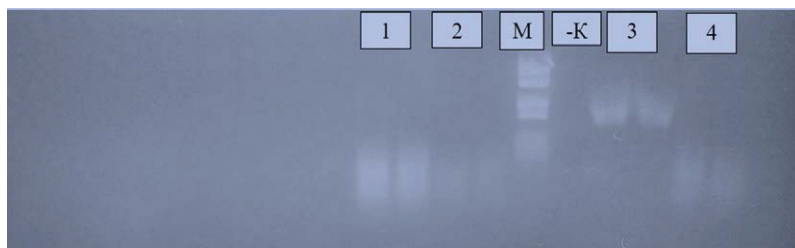


Рис. 1а) RAPD- спектри зразків льону колекції Інституту луб'яних культур НААН: 1 – Глазур, 2 – Чарівний, 3 – Agatha, 4 – Lirina, M – маркер молекулярної ваги, -K – негативний контроль. Одному зразку відповідають дві смужки праймерів

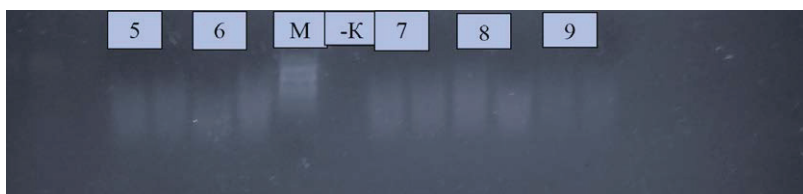


Рис. 1б) RAPD- спектри зразків льону колекції Інституту луб'яних культур НААН: 5 – Зоря 87//Hermes/Electra, 6 – Есмань, 7 – ЛКС 8, 8 – Блакитний УНЕМЗ, 9 – 2397, M – маркер молекулярної ваги, -K – негативний контроль. Одному зразку відповідають дві смужки праймерів

Таблиця 1

RAPD-спектр зразків льону колекції Інституту луб'яних культур НААН при використанні праймера Ver_1

Назва зони (кількість нуклеотидних пар, н.п.)	Глазур	Чарівний	Agatha	Lirina	Зоря 87//Hermes/ Electra	Есмань	ЛКС 8	Блакитний УНЕМЗ	2397
955	0	0	0	0	0	0	0	0	0
585	0	0	0	0	0	0	0	0	0
341	0	0	2	0	0	0	0	0	0
258	0	0	0	0	2	0	0	2	0
141	3	2	0	2	2	2	1	1	1
105	1	1	0	0	0	1	1	0	1
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0

серед досліджуваного матеріалу. Розподіл локусів решти зразків однаковий; всі вони мають довжину від ~258 до ~141 н.п. (рис. 1 б).

Таким чином, встановлена спільність більшості зразків льону по праймеру Ver_2. Виключення складає лише сорт Agatha, але причина цього була описана вище. Загалом, помітно достатньо високий ступінь спорідненості досліджуваних зразків між собою за ознакою насінневої продуктивності по праймерах Ver_1 та Ver_2 (табл. 2).

Число фрагментів ДНК зразків льону, котрі було виявлено в результаті реакції, загалом складає 55 шт., по праймеру Ver_1 виявлено 25 ампліконів, а по Ver_2 – 30, однак найбільший ступінь поліморфізму демонструє праймер Ver_1 (68%). Кількість поліморфних ампліконів по обох праймерах однакова (табл. 3). У середньому,

генетичний поліморфізм ознаки насінневої продуктивності доволі високий – 62,5%.

Загальновідомо, що льон є типовою самозапильною рослиною з достатньо консервативною спадковістю. Виявлений ступінь генетичного поліморфізму може пояснюватися тим, що більшість досліджуваних зразків має гібридне походження і є результатом цілеспрямованої селекції на підвищення насінневої продуктивності.

З метою встановлення ступеня генетичної спорідненості між досліджуваними зразками було проведено кластерний аналіз за принципом “найближчого сусіда” і отримано матрицю генетичних відстаней.

Достовірно найтіснішу спорідненість встановлено у зразків Глазур, Есмань, ЛКС-8 та гібриду Зоря 87//Hermes/Electra. До них виявляються спорідненими Чарівний, Блакитний УНЕМЗ, 2397, які хоч і відрізняються за

RAPD-спектр зразків льону колекції Інституту луб'яних культур НААН при використанні праймера Ver_2

Назва зони (кількість нуклеотидних пар)	Глазур	Чарівний	Agatha	Lirina	Зоря 87/Hermes/ Electra	Есмань	ЛКС 8	Блакитний УНЕМЗ	2397
955	0	0	0	0	0	0	0	0	0
585	0	0	0	0	0	0	0	0	0
341	0	0	2	0	0	0	0	0	0
258	0	0	0	0	2	2	2	2	2
141	3	2	0	1	2	2	2	2	2
105	1	1	0	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0

будовою праймера, однак окремого кластера не формують. Генетична дистанція між зазначеними зразками дорівнює 1. Сорти Lirina та Agatha формують окремий кластер, генетична відстань якого складає також одиницю (рис. 2).

Сорт Agatha, судячи з результативності за обома праймерами, володіє певною унікальністю за ознакою насінневої продуктивності. Являючись сортом волокнистого напрямку (з підвищеною якістю волокна), він також може виступати і як перспективний у селекції на підвищення насінневої продуктивності.

Обговорення. RAPD-ідентифікація генотипів льону за спектром господарських ознак є достатньо розповсюдженим методом молекулярної селекції, і багатьма авторами отримано значні результати. Так, аналізуючи 5 сортів льону з Румунії, з врахуванням таких ознак продуктивності, як кількість продуктивних гілок, кількість коробочок та маса насіння з рослини за трьома парами праймерів, виявили високий поліморфізм OPB-05 та OPB-11 з послідовністю нуклеотидів TGCGCCCTTC та GTAGACCCGT відповідно (El-Nasr et al., 2014). Відзначається переважання цитозин-гуанінових нуклеотидів у будові праймерів. Ступінь поліморфізму складає від 62,5 до 72,7%, що навіть переважає отримані нами результати.

Група вчених, займаючись проблематикою філогенезу льону, генотипували 12 зразків, що представляють 7 видів льону дикого та культурного і виявили 527 локусів з інформативними 29 RAPD-праймерами (Yong-Bi Fu et al., 2002). Дослідження генетичних зв'язків між зразками встановило близьку спорідненість між видами *L. usitatissimum* і *L. angustifolium*. Таким чином, вико-

ристання RAPD-праймерів є інформативним і достатньо точним для встановлення філогенетичних зв'язків. Пізніше було проведено генотипування 54 зразків північноамериканського льону за допомогою системи RAPD-праймерів і виявлено 84 поліморфні локуси, при цьому ступінь поліморфізму складала від 36,9 до 59,2% (Yong-Bi Fu et al., 2003). Також було встановлено тісну генетичну спорідненість канадських сортів між собою, у той час як американські сорти цим не відзначалися.

Вивчаючи проблему зародкової плазми льону, група фахівців дослідили 9 зразків американського, 9 зразків європейського льону та три зразки не встановленого походження з використанням ПЛР-ампліфікації та 51 праймера, і встановили закономірну спорідненість американських сортів між собою, а також аналогічну спорідненість європейських зразків (Pendleton et al., 2008). Три неозначених зразки виявилися генетично спорідненими з європейськими колекціями. Автори роблять висновок про великі перспективи використання молекулярних методів для ідентифікації зразків льону.

З метою дослідження генетичної варіабельності зародкової плазми насіння льону, було використано 12 зразків індійського походження та 16 декамерних RAPD-праймерів (Nagabhushanam et al., 2021). У результаті досліджень було встановлено надзвичайно високий рівень генетичного поліморфізму – від 75 до 100% і виявлено доволі тісну спорідненість між зразками.

Проведено дослідження 40 сортів (генотипів) із залученням 120 декамерних RAPD-праймерів, з метою встановлення генетичних зв'язків та подальших перспектив селекції на насінневу продуктивність та якісний склад олії (Ijaz et al., 2013). Найбільш інформативними виявився

Рівень генетичного поліморфізму зразків льону колекції Інституту луб'яних культур НААН за ознакою насінневої продуктивності

Праймер	Послідовність нуклеотидів 5'-3'	Кількість ампліконів, шт.	Кількість поліморфних ампліконів, шт.	Поліморфізм, %
Ver_1	AATCGGGCTG	25	17	68
Ver_2	GTTGCGATCC	30	17	57

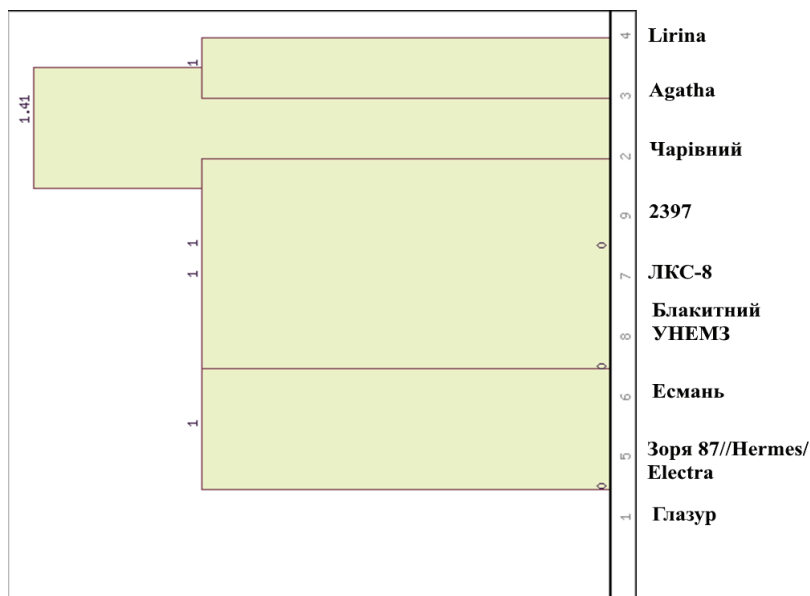


Рис. 2. Дендрограма спорідненості зразків льону

праймер I-17 з нуклетидною послідовністю GGTGGTGATG. Ступінь поліморфізму ампліфікованих фрагментів склав 13%. Автори відзначають великий ступінь несхожості (генетичної віддаленості) між зразками.

Висновки. Застосування ПЛР-реакції з використанням двох олігонуклеотидних (декамерних) RAPD-праймерів для ідентифікації зразків льону Національної колекції виявило 55 локусів (34 полімерних). Ступінь

поліморфізму достатньо високий і складає від 57 до 68%, при цьому найвищу мінливість виявлено по праймеру з нуклеотидною послідовністю AATCGGGCTG. Достовірно найтіснішу генетичну спорідненість встановлено у зразків Глазур, Есмань, ЛКС-8 та гібриду Зоря 87//Hermes/Electra. Зразки Чарівний, Блакитний УНЕМЗ, 2397 також виявляються достатньо близькими до них.

Бібліографічні посилання:

- Ahmed, M. Z.S. Masoud, I. M. & Zedan, S. Z.A. (2019). Molecular Characterization and Genetic Relationships of Cultivated Flax (*Linum usitatissimum* L.) Genotypes Using ISSR Markers. Middle East Journal of Agriculture Research, 8(3), 898–908.
- Amarnath, K., Babu, K. J. & Kumar, M. V. S. (2021). Selection of optimal Flax Fiber Reinforced Components for Experimental Investigation by using TOPSIS method. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 1057, 1–8. doi: 10.1088/1757-899X/1057/1/012055
- Bayrak, A., Kiralan, M., Ipek, A., Arslan, N., Cosge, B., & Khawar, K.M. (2010). Fatty Acid Compositions of Linseed (*Linum Usitatissimum* L.) Genotypes of Different Origin Cultivated in Turkey. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 24(2), 1836–1842. doi: 10.2478/V10133-010-0034-2
- Chandrawati, D., Singh, N., Kumar, R., Kumar, S., Ranade, S. A., & Yadav, H. K. (2017). Agro-Morphological Traits and Microsatellite Markers Based Genetic Diversity in Indian Genotypes of Linseed (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Agriculture Science Technology, 19, 707–718.
- Cullis, C. A. (2005). Mechanisms and Control of Rapid Genomic Changes in Flax. Annals of Botany, 95, 201–206. doi:10.1093/aob/mci013
- Didora, V. H., Malynovskyi, A. S., Derecha, O. A., Rybak, M. F., Derebon, I. Iu., & Viuntsov, S. M. (2008). Lonarstvo [Flax growing]. Zhytomyr: Vyd-vo DVNZ Zhytomyrskiy natsionalnyi ahroekolohichnyi universytet, 488 (in Ukrainian).
- Doaa, M. I., AL-Sadek, A., Maysa, S., Marwa, G. M. & Morsi, A. A. N. (2022). Genetic Diversity Assessment of some Flax Genotypes Using Morphological and Molecular Markers. Direct Research Journal of Agriculture and Food Science, 10, 289–299. doi: 10.26765/DRJAFS16499643
- Dorota, H. M., Voloshchuk, O. P. & Shuvar, A. M. (2020). Otsinka selektsiinoho materialu Ionu za osnovnymy hospodarsko tsinnymy pokaznykamy v umovakh zakhidnoho rehionu [Evaluation of flax breeding material according to the main economic indicators in the conditions of the western region]. Peredhirne ta hirske zemlerobstvo i tvarynnytstvo, 68(2), 67–80. (in Ukrainian). doi: 10.32636/01308521.2020-(68)-2-5
- El-Nasr, A., Hassanein, M.S., Ottai, M.E.S. & Al-Kordy, M.A. (2014). Genetic Diversity Among Five Romanian Linseed Varieties Under Egyptian Conditions. Middle East Journal of Applied Sciences, 4(1), 114–121.
- El Sayed, A. A., Ezzat, S. M., Mostafa, S. H., Zedan, S. Z., Abdel-Sattar, E., & El Tanbouly, N. (2021). Inter Simple Sequence Repeat Analysis of Genetic Diversity and Relationship in Four Egyptian Flaxseed Genotypes. Pharmacognosy Research, 10(2), 166–172. doi: 10.4103/pr.pr_126_17
- Fadel, A. A., Abdulhamed, Z. A. & Yousif, S. A. (2022). RAPD Technique to Determine the Genetic Divergence of Barley Genotypes. Earth and Environmental Science, 1060, 1–12. doi: 10.1088/1755-1315/1060/1/012123

12. Fu, Y.-Bi., Peterson, G., Diederichsen, A. & Richards, K.W. (2002). RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 253–259.
13. Fu, Y.-Bi., Rowland, G. G., Duguid, S. D. & Richards, K. W. (2003). RAPD analysis of 54 North American flax cultivars. *Crop Science*, 43, 1510–1515. doi: 10.2135/cropsci2003.1510
14. Guo, D., Jiang, H., Yan, W., Yang, L., Ye, J., Wang, Y., Yan, Q., Chen, J., Gao, Y., Duan, L., Liu H. & Xie, L. (2020). Resequencing 200 Flax Cultivated Accessions Identifies Candidate Genes Related to Seed Size and Weight and Reveals Signatures of Artificial Selection. *Frontiers in Plant Science*, 11(10), 1–15. doi: 10.3389/fpls.2019.01682.
15. Heller, K., Andruszewska, A. & Wielgusz, K. (2010). The Cultivation of Linseed by Ecological Methods. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 55(3), 112–116.
16. Heller, K. & Wielgusz, K. (2011). Yields of Linseed Cultivar Bukoz in Organic and Conventional Farming. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 56(3), 138–142.
17. Hoque, A., Fiedler, J. D. & Rahman M. (2020). Genetic diversity analysis of a flax (*Linum usitatissimum* L.) global collection. *BMC Collection*, 21(557), 1–13. doi: 10.1186/s12864-020-06922-2
18. Ijaz, A., Shahbaz, A., Ullah, I., Ali, S., Shaheen, T., ur-Rehman, M., & Ijaz, U., S. (2013). Molecular Characterization of Linseed Germplasm Using RAPD DNA Fingerprinting Markers. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 13(9), 1266–1274. doi: 10.5829/idosi.ajeaes.2013.13.09.11038
19. Kryvosheieva, L.M. (2017). Vykhidnyi material lonu-dovhuntsia v selektsii na yakist volokna [The source material of long flax in selection for fiber quality]. *Lubiani ta tekhnichni kultury*, 5, 114–119 (in Ukrainian).
20. Kryvosheieva, L.M. & Lohinov, M.I. (2008). Henetychni resursy roslyn lonu instytutu lubianykh kultur UAAN [Genetic resources of flax plants of the Institute of Bast Crops of the Ukrainian Academy of Sciences]. *Fakty eksperymentalnoi evoliutsii orhanizmv*, 5, 68–72 (in Ukrainian).
21. Lohinov, M.I., Rosnovskiy, M.H. & Lohinov, A.M. (2014). Selektiia lonu-dovhuntsia: istorychni aspekty rozvytku. [Breeding of long-growing flax: historical aspects of development]. *Fakty eksperymentalnoi evoliutsii orhanizmv*, 14, 236–240 (in Ukrainian).
22. Nagabhushanam, B., Mir, M. I., Nagaraju, M. Sujatha, E., Devi, B. R. & Kumar, B. K. (2021). Genetic diversity analysis of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) accessions using RAPD Markers. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 33(7), 589–599. doi: 10.9755/ejfa.2021.v33.i7.2736
23. Nôžková, J., Remeselníková, K. & Bjelková, M. (2014). Characterization and evaluation of flax seeds (*Linum usitatissimum* L.) on selected genotypes. *Journal of Central European Agriculture*, 15(1), 193–207. doi: 10.5513/JCEA01/15.1.1434
24. Pendleton, R. L., Kitchen, S. C., Mudge, J. & McArthur, F. D. (2008). Origin Of the Flax Cultivar 'Appar' And Its Position Within the *Linum Perenne* Complex. *International Journal of Plant Sciences*, 169(3), 445–453. doi: 10.1086/526464
25. Soto-Cerda, B.J., Diederichsen, Axel., Ragupathy, R. & Cloutier, S. (2013). Genetic characterization of a core collection of flax (*Linum usitatissimum* L.) suitable for association mapping studies and evidence of divergent selection between fiber and linseed types. *BioMedCentral Plant Biology*, 13(78), 1–15.
26. Upadhyay, S., Mehta, N. & Tiwari, A. K. (2019). Assessment of Variability among Flax Type Linseed Genotypes (*Linum usitatissimum* L.) of Chhattisgarh Plains. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(6), 2633–2637. doi: 10.20546/ijcmas.2019.806.316
27. Wu, G., Yu, Y., Yuan, H., Wu, J., Liu, Y., Chen, S., Cheng, L., Kang, Q., Huang, W., Xie, D., Yao, Y., Song, X., Zhang, L., Guang, F. & Heller, K. (2015). Advances in Molecular Techniques Used Flax Research in China. *Molecular Biology: Open Access*, 4(4), 1–4. doi: 10.4172/2168-9547.1000146
28. Xie, D., Dai, Z., Yan, Z., Tang, Q., Sun, J., Yang, X., Song, X., Lu, Y., Zhao, D., Zhang, L., & Su, J. (2018). Genomic variations and association study of agronomic traits in flax. *BMC Genomics*, 19(512), 1–12. doi: 10.1186/s12864-018-4899-z
29. Yotka, O. Yu., Chuchvaha, V. I. & Kryvosheieva, L. M. (2017). Oznakova kolektsiia lonu za stiikistiu do fuzariozu ta antraknozu – dzherelo vykhidnogo materialu dlia selektsii [A characteristic collection of flax for resistance to fusarium and anthracnose – a source of raw material for selection]. *Henetychni resursy roslyn*, 20, 73–84 (in Ukrainian).
30. You, F. M., Duguid, S. D., Lam, I., Cloutier, S., Rashid, K. Y. & Booker, H. M. (2016). Pedigrees and genetic base of flax cultivars registered in Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, 96(5), 837–852. doi: 10.1139/cjps-2015-0337

Vereshchahin I. V., Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Kandyba N. M., Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Sobran I. V., Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Onychko T. O., Senior Lecturer, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Use of RAPD analysis for the study of genetic polymorphism of flax varieties of Ukrainian and foreign selection

Flax is one of the oldest and most important spinning crops in the world. First discovered in the south of Spain, he began his selection movement, which continues today. Nowadays, flax breeding has achieved significant results in increasing fiber in plant stems, seed productivity, quality oil composition, resistance to major diseases and pests such as fusarium and anthracnose.

Flax is distinguished by its high-quality fibrous and seed products, which are used for the production of various fabrics and oil for food and technical purposes. Linen fabric is characterized by high strength and hypoallergenicity, and the oil contains essential polyunsaturated acids.

Today, genetic collections of flax stored and used by research and educational institutions amount to tens of thousands of specimens. Such a number of samples, in theory, allows obtaining a variety of raw material for successful selection, but at the same time, there is a tendency to genetic impoverishment of the species due to intensive selection influence. Conducting the selection process with flax culture is always based on the evaluation of morphological indicators of a huge mass of plant material with its annual field evaluation. This practice significantly slows down the creation of new varieties.

Instead, the use in the selection process with flax culture of tools capable of working with the genetic basis of the organism directly significantly accelerates the process of creating new material, makes it more accurate through the identification and selection of target genes.

The purpose of this article is to identify flax samples of the National Collection using randomly selected decameric RAPD primers (random amplified of polymorphic DNA). Flax samples of different ecological and geographical origin were used in the work. Polymerase chain reaction was performed using two decamer primers Ver_1 AATCGGGCTG and Ver_2 GTTGCGATCC.

As a result of the research, 55 loci (25 and 30, respectively, for each primer) were found, indicating the effectiveness of the amplification. The degree of polymorphism of the obtained loci was from 57 to 78%. It was also established that Ukrainian flax samples are genetically more closely related; European samples naturally have tighter genetic patterns.

Key words: flax, sample, DNA, polymerase chain reaction, primer, locus, cluster.