

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол №_____засідання кафедри

від “___” _____2022 р.

**ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ СУРПИЦІ (*BRASSICA
RAPA SSP. OLEIFERA*) ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ SSR-МАРКЕРІВ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студентки спеціальності 091 «Біологія»

ОП «Біологія (високі технології)»

Тищенко Євгенії Олександрівни

Науковий керівник від кафедри:

доцент к.б.н. **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана у відділі популяційної генетики

Інституту харчової біотехнології та генетики НАН України

під керівництвом к.б.н. **А. М. Рабокоть**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022

АНОТАЦІЯ

Тищенко Є.О. Вивчення генетичної мінливості суріпиці (*Brassica rapa ssp. oleifera*) із використанням SSR-маркерів – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі проведено аналіз генетичної мінливості різних сортів суріпиці за допомогою п'яти ДНК-маркерів. Встановлено, що тільки один з п'яти маркерів виявився актуальним для дослідження *Brassica rapa ssp. oleifera*. Отримані результати можуть бути використані для подальшого вивчення генетичної мінливості суріпиці та інших споріднених видів, селекції рослин у сільськогосподарській промисловості.

Ключові слова: суріпиця; генетична мінливість; SSR-маркери; ДНК-аналіз; *Brassica rapa*.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	7
1.1. Значення та історія виду <i>Brassica rapa</i>	7
1.2. Вплив кліматичних факторів на розвиток та культивування виду <i>Brassica rapa</i>	8
1.2.1. Вплив високих температур на вид <i>Brassica rapa</i>	8
1.2.2. Вплив Низьких температур на вид <i>Brassica rapa</i>	9
1.3. Потенційні способи використання та перспективи застосування рослини <i>Brassica rapa</i>	11
1.3.1. Застосування ріпаку у медицині	12
1.3.2. Антимікробні та антиоксидантні властивості <i>Brassica rapa</i>	14
1.3.3. Вплив тибетської ріпи на толерантність до гіпоксії	14
1.4. Мікросателіти та маркери SSR	16
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи	18
2.1. Рослинний матеріал	18
2.2. Виділення та визначення концентрації ДНК.....	19
2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)	21
2.4. Електрофорез та візуалізація продуктів ампліфікації	22
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їхнє обговорення	25
ВИСНОВКИ	31
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	32

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
п.н.	пара нуклеотидів
ПААГ	поліакриламідний гель
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
SSR	(simple sequence repeat) – прості послідовності, що повторюються
UTR	(untranslated region) – нетрансльовані області
RNA-seq	(RNA sequencing) – секвенування ДНК
MAS	(Marker assisted selection) – селекція з використанням маркерів
QTL	(Quantitative trait locus) – кількісний локус ознак
RAPD	(Random amplified polymorphic DNA) – довільно-ампліфікована поліморфна ДНК
RFLP	(Restriction fragment length polymorphism) – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів
SNP	(Single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидний поліморфізм

ВСТУП

Рослина *Brassica rapa* належить до родини *Brassicaceae* (*Cruciferae*), має широке генетичне різноманіття [1]. Найвідоміші представники *Brassica rapa* – польова капуста та ріпа, але вид включає багато олійних, листових та кормових культур. Механізми стійкості рослин до низьких температур складні та відбуваються на генетичному рівні. Таким чином суріпиця озима (*Brassica rapa ssp. oleifera f. biennis*) – одна з небагатьох представників виду *Brassica rapa*, яка здатна виживати в умовах низьких температур взимку. Пошкодження рослини від охолодження та замерзання є одним із найпоширеніших екологічних факторів, з яким стикаються фермери, що суттєво обмежує тип культур для культивування. Більшість сортів виду *B. rapa* – гібриди, про які відсутня інформація щодо їх молекулярно-генетичного аналізу, це суттєво ускладнює процедуру селекції [2]. Вивчення генетичної мінливості цього виду, дасть змогу більш детально відстежити гени, які відповідають за морозостійкість рослини, що у свою чергу сприяє створенню більш ефективних методів культивування.

Мікросателіти або прості повторювачі послідовностей (SSR) широко використовуються при маркерній селекції (MAS), аналізі генетичного різноманіття, аналізі популяцій та ін.. SSR-маркери – це короткі, повторювані в тандемі, мотиви нуклеотидів (1–10 п.н.), що часто зустрічаються у геномі по всьому організму, особливо у еукаріотів [3, 4, 5]. Вони успадковуються у домінантному порядку [6] і можуть бути проаналізовані за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що полегшує скрінінг великої кількості осіб. Перш за все, мікросателіти є набагато простішими у використанні, аніж інші типи молекулярних маркерів, та є одним з найновіших методів виявлення необхідних генів та кількісних локусних ознак (QTL). Наприклад, RFLP –

спільні домінуючі маркери, але вони також набагато складніші у практичному застосуванні; RAPD не успадковуються у домінантному порядку та мають низьку відтворюваність. Тому молекулярні маркери вважаються корисними інструментами для селекції рослин та генетичних досліджень.

Метою та завданням цього дослідження є: (1) провести молекулярно-генетичний аналіз суріпиці, суріпиці озимої та суріпиці ярої за допомогою SSR-маркерів; (2) дослідити їх корисність як генетичних маркерів у вивченні *Brassica rapa ssp. oleifera*.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Значення та історія виду *Brassica rapa*

Brassica rapa була першим видом *Brassica*, які почали активно вирощувати фермери [7]. У часи Стародавнього Риму бульби ріпи використовували, як корм для тварин або їжу [8]. Через великий вміст глюкозинолатів та ерукової кислоти, рапсову олію можна було використовувати лише як мастило та для освітлення [9]. У 1977-му році був виведений перший сорт з низьким вмістом ерукової кислоти і глюкозинолатів. Пізніше, олія була визнана FDA та зареєстрована під назвою «рапс» [10].

Вид *Brassica rapa* має широкий спектр морфотипів (включаючи: коренеплоди, листові та олійні культури), що сильно ускладнює класифікацію *Brassica rapa* за походженням та різноманітністю лише на основі морфології [7; 11]. Розведення та селекція у різних частинах світу призвели до появи фенотипно різноманітних сортів. У Європі олійні культури *Brassica rapa* з'явилися приблизно з 14 століття, завдяки росту спросу на олію у більш холодних районах [8]. Однак, більшість регіонів Китаю здатні вирощувати лише овочеві види *Brassica rapa* «Baicai», але виробництво насіння для олії можливе лише у прохолодних регіонах [9]. Таким чином, лише методом молекулярно-генетичного аналізу можна виявити генетичні зв'язки між різними морфологічними типами *Brassica rapa*, з різних частин світу. Завдяки своєму походженню від алотетраплоїдних видів *Brassica napus* та *Brassica juncea* [12; 13; 14; 15]. Шляхом міжвидової інтрогресії та рекомбінації можливо переносити алелі від *Brassica rapa* до *Brassica napus*, що робить вид *Brassica rapa* дуже сприятливим до генетичного вдосконалення *Brassica napus* та *Brassica juncea* [16; 17; 18]. Тому завдяки характеристикам, зазначеним вище,

необхідно вивчати генетичну різноманітність виду *Brassica rapa* та споріднених видів, для їх генетичного вдосконалення у майбутньому.

SSR-маркери зручні у використанні для демонстрації і дослідження біогеографії та агро-еволюційних зв'язків видів *Brassica*, включаючи типи олійних культур *B. rapa* [19], *B. nigra* [20], *B. napus* [17; 21] та *B. juncea* [22]. Загалом, вид *Brassica rapa* (включаючи дикі типи рослини) бере свій початок у південно-західній Азії та Європі, що підтверджено генетичним різноманіттям SSR [23; 24]. Також, треба зазначити, що завдяки торговим шляхам у Південній, Східній та Центральній Азії сільськогосподарські різноманітності *Brassica rapa* адаптувались до нового клімату. Утворивши ряд морфотипів, забарвлень насіння та часу цвітіння [25].

1.2. Вплив кліматичних факторів на розвиток та культивування виду *Brassica rapa*

Brassica rapa (ріпа), що належить до роду *Brassica* (*Cruciferae*) — дворічна, перехресна, мезополіплоїдна трав'яниста рослина. Ріпа проживає в Європі, Росії, Центральній Азії та на Близькому Сході, і зараз вона широко культивується як рослинне та олійне джерело в усьому світі [1]. За порівняльною морфологією виділяють дві раси ріпи, а саме: західну (олійні форми) і східну (овочеві форми) [1].

1.2.1. Вплив високих температур на вид *Brassica rapa*

Вид *Brassica rapa* широко поширена та культивується у Європі, країнах Азії, північної та південної Америки [26]. Має велику морфологічну різноманітність (олійні культури, листові овочі та коренеплоди) [27; 28]. *B. rapa* та *B. oleracea* це предки олійної алотетраплоїдної рослини *B. napus* [29; 30]. У 2001-му році [31] дослідили

терmostійкість *Brassica napus* під час репродуктивної фази. За результатами цього дослідження вміст олії в насінні зменшився, а вміст білку збільшився. Також збільшення білку може бути пов'язано з поливом лише два рази на день, що у свою чергу могло імітувати посуху. У 2006-му році [32] стебло комерційних сортів озимого ріпаку піддали майже летальним температурам під час стадії цвітіння, що призвело до зменшення врожаю насіння на 15% та 45% [33], співвідношення олія/білок теж зменшувалось. Потрібно зазначити, що інформація про рівень вологи та частоту поливу не приведена, тому отримані результати цілком можуть бути комбінацією декількох факторів (посуха, стрес, високі температури).

Якщо рослина зазнала теплового стресу під час стадії цвітіння, ймовірно, матиме прямий вплив на розвиток насіння, а згодом і на врожай [33]. Різні змінні, які пов'язані з розмноженням (якість пилку, кількість квіток, бутонів та насіння) можуть бути використані для ідентифікації генотипів толерантності до високих температур, наприклад, у *B. napus* [34; 35], *Arachis hypogaea* L. [36], *Linum usitatissimum* L. [37] та *Lycopersicon esculentum* [38].

Висока температура (з повною елімінацією можливої посухи) під час стадії раннього цвітіння зменшила кількість насіння більш ніж на 50% у трьох сортів *Brassica* в порівнянні з впливом на стадії стручків [35]. Тому можна припустити, що вплив високої температури на ранніх стадіях розмноження має вирішальне значення у зниженні розвитку зрілого насіння в стручках [33]. Таким чином, скринінг на стійкість до високих температур є найважливішим фактором для успішного культивування рослини брасіка.

1.2.2. Вплив Низьких температур на вид *Brassica rapa*

Пошкодження рослини від охолодження та замерзання є одним із найпоширеніших екологічних факторів, з яким стикаються фермери, що суттєво обмежує тип культур для культивування. Холодостійкість є основною стратегією для виживання озимих культур таких, як *Brassica rapa*. Вплив низьких температур ініціює експресію та активність цукрів і амінокислот у рослинах, це є необхідним для синтезу функціональних білків, які є попередниками метаболітів, які відповідають за резистентність до холоду рослини [39]. ДНК Solexa/Illumina (RNA-seq) використовується для ідентифікації генів холодостійкості у різних видів рослин. Аналіз на холодостійкість плодів кабачків, за допомогою RNA-seq, було знайдено декілька генів, які могли б відповідати за стійкість плода до охолодження.

Один з таких кандидатів є AP2/білок, що містить домен ERF. Секвенування RNA-seq виявило 132 гени AP2/ERF озимого ріпаку, підданим низькотемпературному стресу з секвенуванням транскриптомів [40]. Ці гени беруть участь у багатьох молекулярних процесах, і як показав функціональний аналіз генної онтології, можуть підвищити толерантність рослини до низьких температур [41]. На сьогоднішній час, озимий ріпак - єдина олійна культура, яка здатна стабільно зимувати у субтропічному мусонному кліматі (північ Китаю), при цьому врожайність та вміст олії у *Brassica rapa* більше, ніж у інших олійних культур у цьому регіоні [41]. Незважаючи на те, що нам відомо про фізіологічні механізми та протеоміку виду *Brassica rapa*, безпосередньо сам механізм холодостійкості озимого ріпаку залишається невідомим [42; 43]. Надземна частина рослини в'яне протягом зими, тоді як коріння легко переносить зимівлю [44]. Стрес порушує окислювально-відновний та енергетичний баланс рослини [45]. За впливу низьких температур відбувається накопичення активних форм кисню (наприклад, перекис водню, синглетний кисень, гідроксильні радикали та супероксидні аніони) цей процес призводить до окисного пошкодження рослини [45]. Під впливом

стресу, рослини почали утворювати макромолекули, які діють як осмотичні регулятори, підтримують осмотичний баланс клітин і рідин [46; 47].

1.3. Потенційні способи використання та перспективи застосування рослини *Brassica rapa*

Світовий попит на джерела енергії стрімко зростає. За базовим сценарієм міжнародного енергетичного агентства «World Energy Outlook», у період з 2000 по 2030 рік світове споживання енергії збільшується на 18%. Альтернативою викопному паливу - є використання відтворювальних джерел енергії, або біопалива, виготовленого з біомаси [48]. Впровадження біопалива у автомобільну індустрію може знизити рівень забруднення у мікросередовищі (наприклад, міські центри та ін.). Найбільший потенціал, у заміні нафтового або дизельного палива, мають соняшникова, соєва, сафлорова, арахісова, кукурудзяна та рапсова олії. На сьогоднішній день, в Північній та Південній Америці, Європі та Південній Африці комерціалізується понад 30 мільярдів літрів біопалива в рік [48].

Використання рослинної олії, як альтернативного палива забезпечило б сільське господарство відновлюваним джерелом енергії, вирощеним у тому ж районі [49]. Наземний транспорт значною мірою залежить від нафти 80% якої - імпортується. Загалом, Європа імпортує 50% своєї енергії. У 2003 році Європейський парламент та Рада запровадили директиву 2003/30/ЕС, яка спрямована на більш активне використання біопалива у транспорті. Одним з можливих альтернативних варіантів палива є біодизель. На відміну від США, де для виробництва біодизеля використовують сою, у ЄС переважно використовують ріпак та насіння соняшнику. Хоча олії та натуральні жири є основою біологічної сировини для технічного або хімічного застосування. Лише невелика

частка (за різними оцінками від 15% до 25%) загального обсягу виробництва рослинної олії у світі використовується в промислових (не харчових/технічних) секторах [50]. Загальне споживання альтернативних джерел енергії у ЄС 2020 становило 22,6%, порівняно з 9,6% у 2004 році на початку запровадження Директиви.

Ріпак є однією з основних олійних культур в Естонії [51]. Успіх у культивуванні ріпаку (ярого та озимого) залежить від захисту і профілактики рослини, оскільки ярий ріпак приваблює багато видів комах, як шкідливих, так і корисних [52]. Також, кліматичні умови Естонії не є сприятливими для виживання озимого ріпаку [53]. Цей фактор робить вирощування озимого ріпаку економічно не вигідним. Незважаючи на труднощі у культивуванні зазначені вище, врожайність насіння і вміст олії у озимого ріпаку однаковий, а деякі роки навіть вище, ніж у ярого ріпаку [51]. Озимий ріпак менш сприятливий до хвороб і шкідників, в порівнянні з ярим ріпаком, що є великою економічною та екологічною перевагою. Завданням селекції озимого ріпаку є розвиток стійкості до низьких температур та високий, стабільний вихід олії [54].

1.3.1. Застосування ріпаку у медицині

Незважаючи на великі кроки у сфері медицини за останні десятиріччя, хвороби все одно залишаються невід'ємною частиною нашого повсякденного життя. Людство використовувало рослини у медичних і профілактичних цілях з незапам'ятних часів і досі залишається одним з основних джерел для відкриття ліків. *Brassica rapa* також відома як ріпа або польова капуста, є однією з найстаріших культивованих рослин у світі. Окрім вживання у їжу та здобування олії, ріпу з давніх часів використовують у традиційній медицині. Терапевтичні властивості *Brassica rapa* були добре задокументовані протягом часу, наприклад, для

лікування захворювань печінки та нирок [55]. Основними складовими рослин цього виду є: глюкозинолати, ізотіоціанати, флавоноїди, індоли, сполуки сірки, феноли, карбогідрат і леткі речовини (зазвичай терпени, складні ефіри, альдегіди та кетони) [56]. Завдяки продуктам розпаду глюкозинолатів (ізотіоціанатів, тіоціанатів, нітрилів, епітіонітрилів і оксазолідинів) [57]. Вважається, що за регуляцію ферментів, клітинний цикл, та за органолептичні характеристики відповідають фенольні сполуки та органічні кислоти [58]. Фармакологічне дослідження виду *Brassica rapa* виявило протимікробну [58], антиоксидантну [58], протипухлинну [58], протизапальну [59], кардіопротекторну, гіполіпідемію [60], гепатопротектор [61], протидіабетичний [62], нейропротекторні [63] та знеболюючі [64] властивості разом із полегшенням ожиріння та метаболічного синдрому.

Глюкозинолати та ізотіоціанати - характерні складові ріпи, які мають біологічну активність, зокрема хіміопротекторний ефект проти деяких видів раку. Незважаючи на позитивну дію глюкозинолатів та ізотіоціанатів, похідні цих хімічних речовин є шкідливими для людей та тварин [65]. Глюкозинолати нестабільні і легко перетворюються на продукти розпаду ізотіоціанати після контакту з мирозиназами [56]. Також, рівень гіркоти корелює з рівнем глюкозинолатів, які синхронно зростають з дорослішанням рослини [56].

Фенольні речовини (у більшості - флавоноїди) відіграють основну роль у стійкості і захисті рослини від хвороб, ультрафіолетових променів та пігментації. У високій кількості флавоноїди містяться в епідермісі листя і плодів [66; 67]. Взагалі, вміст фенольних сполук відрізняється у різних частинах рослини, наприклад, зелена ріпа містить 51,71 мкмоль/г фенольних сполук у порівнянні з 38,99 мкмоль/г у висушеній воді з верхівки ріпи [69]. Флавоноїди присутні у зелені ріпи у вигляді похідних

кверцетину, кемпферолу та ізорамнетину, але їх не було виявлено у коренях рослини [56].

1.3.2. Антимікробні та антиоксидантні властивості *Brassica rapa*

На сьогоднішній день, підвищення резистентності мікроорганізмів до антибіотиків загрожує здоров'ю населення та підвищує захворюваність та смертність. Цей фактор створює необхідність у використанні натуральних продуктів для розробки протимікробних засобів. Харчові антиоксиданти підвищують природну стійкість організму до реакцій окислення. У традиційній арабській медицині представники виду *Brassica rapa* застосовуються для лікування хронічних гастритів, запорів, холециститів, холецистолітазу та при захворюваннях печінки [69]. Корені ріпи мають антибактеріальну дію, і використовуються для лікування застуди у народній та традиційній медицині. Їстівні частини ріпи вживають як сирі, варені та/або ферментовані. Найвищу антимікробну активність спостерігали метанольні екстракти на видах *Micrococcus*, тоді як цвіль була стійка до цього екстракту [70]. Метанольні екстракти мали активну антимікробну дію на види *Micrococcus*, тоді як цвіль стійка до екстракту. *Brassica rapa L.* має біологічний ефект гепатопротекції та антигепатотоксичності [71]. Екстракт етанолу з коренів ріпи має протидіабетичну дію [72]. Ця біологічна активність пов'язана з антиоксидантним потенціалом, наприклад, поглинання вільних радикалів, нітритів та інгібування перекісного окислення ліпідів [73].

1.3.3. Вплив тибетської ріпи на толерантність до гіпоксії

Тибетську ріпу (*Brassica rapa L.*) у традиційній тибетській медицині описують, як лікувальну рослину при гіпоксії, інтоксикації, втомі. Загалом,

експериментально доведено, що споживання Тибетської ріпи сприяє підвищенню толерантності до гіпоксії (у здорових людей), це ймовірно пов'язано з здатністю *Brassica rapa L.* покращувати поглинання і доставку кисню [74].

Для підтримки життєдіяльності аеробних організмів їм необхідний кисень [74]. Існує ряд стресових реакцій, які відбуваються у результаті впливу гіпоксичного середовища на організм людини. Наприклад, прискорене дихання, прискорене серцебиття та високий кров'яний тиск, які будуть розвиватися, щоб доставити необхідну кількість кисню до тканин по всьому тілу (від органів до клітин і геному) [75]. За визначенням, гіпоксія настає, коли метаболічна потреба в кисні перевищує надходження [74].

На сьогоднішній день, понад 140 мільйонів людей живе на висоті 2500 метрів і вище [75]. Також, приблизно 40 мільйонів людей щорічно піднімаються та перебувають на висоті 2500 метрів та вище у туристичних, дослідницьких, навчальних або військових цілях [76]. Таким чином, понад 180 мільйонів людей щороку знаходяться у зоні ризику розвитку високогірної гіпоксії, та подальших супутніх захворювань. Покращення розуміння адаптації до умов високогір'я, безпосередньо пов'язане з розвитком кращих рішень для боротьби з високогірним стресом та хворобою. Функціональні складові рослини *Brassica rapa L.*, полісахарид, тритерпеноїд, поліфенол та флавоноїди, демонструють ефективну дію проти втоми, гіпоксії та окислення [77].

Традиційна китайська медицина та західна медицина є однаково ефективними у полегшенні симптомів та лікуванні наслідків спричинених гіпоксією. кожен з підходів має свої негативні та позитивні сторони. Наприклад, дексаметазон і ацетазоламід мають потужний ефект, але у деяких випадках можлива поява сильних побочних ефектів [78; 79]. У традиційній китайській медицині зазвичай використовують женьшень,

родіола рожева та соссюрея інволюкратна, які вважаються кращими для лікування кореню проблеми, але висока ціна та невелика кількість є обмеженнями для їх широкого застосування [80]. Доведено, що при вживанні тибетської ріпи здоровою людиною протягом 7 днів, толерантність до гіпоксії зростає, це пов'язано з здатністю рослини покращувати поглинання та доставку кисню до тканин, сприяти проти-окислюваній здатності та покращити показник середньої концентрації корпускулярного гемоглобіну [81].

1.4. Мікросателіти та маркери SSR

Протягом останніх двадцяти років SSR-маркери активно застосовують для генотипування рослин. Відкриті у 1980-х роках, ці маркери зобов'язані своїй популярності завдяки ряду характеристик, таких як: інформативність, кодомінантність, легка відтворюваність, здатні передаватись спорідненим видам [82]. У вивчені диких видів рослин SSR маркери допомагають виявити:

- Різноманітність та генетичну відстань між видами
- Оцінки генетичного кросинговеру
- Опису еволюціонування та генетичних зв'язків між дикими рослинами [83; 84]

У фермерстві та культивуванні приборканих рослин, SSR-маркери використовують для:

- Конструкції генетичних дерев
- Визначення спорідненості між видами
- Селекції рослин
- Визначення ДНК для подальшого фінгерпринтінгу [85; 86]

Отже, SSR-маркери дуже важливі у створенні генетичних карт, досліджень структури популяції і еволюційних процесів.

Мікросателіти – прості повтори послідовностей, складаються з 1 до 10 нуклеотидів, відносяться до тандемних повторювачів [87]. Ці короткі елементи повторюються та неточно відтворюються під час синтезу ДНК, таким чином з'являються нові алелі з різною кількістю повторюваних одиниць. Тандемні повторювачі залишаються цікавими вченим завдяки своїй нестабільності, зі швидкістю мутацій від 10^3 до 10^6 у одному поколінні клітин [87]. Але SSR-маркери рідше зустрічаються у кодуючих ділянках, бо часті мутації можуть порушити експресію генів [88]. До фенотипових змін можуть призвести:

- Розширення або скорочення SSR в ділянках кодуючих білок, можуть призвести до посилення або втрати функції гена, через фреймшифт мутацію або розширення токсичної мРНК [89].
- Варіації SSR маркерів в 5'-UTR можуть впливати на транскрипцію та трансляцію, регулюючи експресію генів.
- Варіації 3'-UTR призводять до синтезу розширеної мРНК, що в свою чергу може викликати порушення сплайсингу та інших функцій клітини [89].

Історично вважалось, що тандемні повтори не призводять до фенотипових змін, бо вони є нестабільною частиною ДНК [87]. Інтерес до вивчення функцій мікросателітів дозволив нам зрозуміти яку роль вони відіграють у процесах транскрипції, організації хроматину, розмір геному, трансляції та клітинному циклі [90].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал

В дослідженнях використовували рослинний матеріал з колекції Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України:

1. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Kasper)
2. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Горянка)
3. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Горлиця-2)
4. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Горлиця-1)
5. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Вікторія)
6. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Білоруська (технічна))
7. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Білоруська)
8. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (3102)
9. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (1996/3)
10. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (1996/2)
11. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (1996/1)
12. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Nepal-2)
13. Суріпиця – *Brassica rapa ssp. oleifera* (syn. = *B. campestris*) (Nepal-1)
14. Суріпиця озима – *Brassica rapa ssp. oleifera f. biennis* (syn. = *B. campestris f. biennis*) (с. Оріана-1)
15. Суріпиця озима – *Brassica rapa ssp. oleifera f. biennis* (syn. = *B. campestris f. biennis*) (Глевахівська (FEOSOFG1))
16. Суріпиця озима – *Brassica rapa ssp. oleifera f. biennis* (syn. = *B. campestris f. biennis*) (Ультрарання (FEOSOFU))

17. Суріпиця озима – *Brassica rapa ssp. oleifera f. biennis* (syn. = *B. campestris f. biennis*) (Дніпропетровська (FEOSOFDn))
18. Суріпиця озима – *Brassica rapa ssp. oleifera f. biennis* (syn. = *B. campestris f. biennis*) (с. Оріана)
19. Суріпиця озима – *Brassica rapa ssp. oleifera f. biennis* (syn. = *B. campestris f. biennis*) (Волинська (FEOSOFVol))
20. Суріпиця яра – *Brassica rapa ssp. oleifera f. annua* (syn. = *B. campestris f. annua*) (F2 (FEOSJF-4))
21. Суріпиця яра – *Brassica rapa ssp. oleifera f. annua* (syn. = *B. campestris f. annua*) (F3-2008 (FEOSJF-3))
22. Суріпиця яра – *Brassica rapa ssp. oleifera f. annua* (syn. = *B. campestris f. annua*) (F2-2010 (FEOSJF-2))
23. Суріпиця яра – *Brassica rapa ssp. oleifera f. annua* (syn. = *B. campestris f. annua*) (F1 (FEOSJF-1))
24. Суріпиця яра – *Brassica rapa ssp. oleifera f. annua* (syn. = *B. campestris f. annua*) (Піонер-ЮТ (Pioner-YuT))
25. Суріпиця яра – *Brassica rapa ssp. oleifera f. annua* (syn. = *B. campestris f. annua*) (F3-2008 (FEOSJF-3))

2.2. Виділення та визначення концентрації рослинної ДНК

Виділення ДНК з 250 - 300 мкг насіння досліджуваних рослин проводили за допомогою модифікованого ЦТАБ методу [91; 92]. Спочатку, рослинний матеріал (насіння) розтирали з рідким азотом та спеціальним пестиком до стану пудри у пластиковій пробірці об'ємом 1,5 мл. До перетертої пудри додавали 350 мкл 2 х ЦТАБ (2%-й ЦТАБ; 1,4 М NaCl; 100 мМ Tris-HCl, рН 8,0; 20 мМ EDTA), перемішували та інкубували у термостаті (65°C) годину. Протягом цієї години, суміш перемішували кожні 10 хвилин. Після інкубування, лізат центрифугували протягом 10

хвилин при 10000 об./хвилина. Потім, знімали супернатант та переносили до нових пробірок, додавали рівний об'єм суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (у співвідношенні 24:1, за об'ємом) та перемішували до утворення суспензії. Другий раз центрифугували при 10000 об./хвилина, 10 хвилин. Після, знімали водну фазу, переносили до нових пробірок та додавали 0,2 об'єму 5 x ЦТАБ (5%-й ЦТАБ, 350 мМ EDTA). Перемішували, та знову інкубували у термостаті (65°C) протягом 10 хвилин. Додавали рівний об'єм хлороформу, ретельно перемішували, та центрифугували третій раз при 10000 об./хвилина, 10 хвилин. Знімали верхню фазу і переносили у нові пробірки. Додавали 3 x об'єми буферу для перципітації (1%-й ЦТАБ; 50 мМ Tris-HCl, рН 8,0; 10 мМ EDTA). Суміш залишали на ніч при кімнатній температурі. На наступний день, центрифугували ще раз протягом 10 хвилин, 16000 об./хвилина, 4°C. Супернатант видаляли, до осаду додавали 300 мкл 1,2 М NaCl, 300 мкл хлороформу, та перемішували до утворення суспензії. Центрифугували при 16000 об./хвилина, 4°C, 10 хвилин. переносили верхню фазу у нові пробірки, додавали 0,6 об'єму ізопропанолу (попередньо охолодженого). Центрифугували 10 хвилин, 16000 об./хвилина, 4°C. Знов знімали супернатант, додавали 250 мкл 70%-го етилового спирту до осаду. Центрифугували 10 хвилин, 16000 об./хвилина, 4°C. Видаляли спирт піпеткою, від залишків спирту позбавлялись за допомогою термостату (65°C). До осаду додавали 30 мкл дистильованої води.

Зразки ДНК зберігали у морозильній камері при температурі -20°C. Якість виділення, кількість та ступінь забруднення ДНК перевіряли за допомогою двох методів.

1. Спектрофотометрично на спектрофотометрі «Eppendorf», додавши бідистильовану воду.
2. Електрофорезу у 1,5%-у агарозному гелі.

2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили у пробірках об'ємом 200 мкл в ампліфікаторі Thermal Cycler SimpliAmp (Applied Biosystems, США). Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2.5 ммоль MgCl₂, 1 мкл форвардного та 1 мкл реверсного праймера, 0.1 мкл дНТФ, 0.05 мкл Taq полімерази («Thermo Fisher», США), і 1 мкл рослинної ДНК.

Послідовності праймерів взяли з літературних джерел [93], які наведені у таблиці нижче.

Таблиця 2.1.

Опис використаних праймерів

№	Генетичний маркер	Послідовність праймеру (5'-3')	T, °C	Посилання
1	CB10578	F: TGTCCACTCACTCTCTTTGTT R: AGGCTAAGTTGAAGTGCAAG	58.0	[94]
2	BoCCA1 (F/1R1)	F: TGCCTTGAGGCTTTACGGTAGAG R: CTGAGCAGTTGTCTTCCTGCAGA	60.0	[95]
3	BrgMS5339	F: CTACCTGAAGATGACCCAGACG R: GCATACAAACCTCGTCCTAAGC	60.0	[96]
4	BrgMS609	F: ATGGCTGTGAACTTGTGATGTG R: CGGATGTTGGAAAGATGAGATT	59.0	[96]
5	BrgMS653	F: AGGAAGGAAATTGTGATTGCTC R: TGTA AAAAGAGGTGTGGATTTGC	57.0	[96]
6	BoCCA1 (F/2R1)	F: TGCCTTGAGGCTTTACGGTAGAG R: CAGTTCCGGTCTTTCTAGGATAAGGG	62.0	[95]

Ампліфікацію проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (95°C) – 5 хв, 37 циклів ампліфікації (денатурація при 95°C – 30 секунд, гібридизація праймерів приведених у таблиці 2.1., елонгація при 72°C – 1 хв), кінцева елонгація при 72°C – 5 хв, та утримання при 4°C. Кожну ПЛР проводили з використанням негативного контролю.

2.4. Електрофорез та візуалізація продуктів ампліфікації

Розділення та візуалізацію фрагментів ампліфікації проводили за допомогою двох методів:

1. Вертикального денатуруючого електрофорезу в 6%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) на пластинах розміром 200 x 200 x 1 мм., для виготовлення 40мл. якого використали: 2,32 г акриламиду та 0,08 г бісакриламиду (тобто 8 мл 30% акриламиду), 4 мл 10 x TBE (0,89 М Tris base, 0,89 М H₃BO₃, 20 мМ EDTA, рН 8,0), 28 мл дистильованої H₂O, 400 мкл 10%-го персульфату амонію та 20 мкл TEMED [97]. Перед нанесенням на гель до реакційної суміші додавали 10x буфер для нанесення (0,1% ксилен-ціанол, 0,1% бромфеноловий синій, 0,5% лаурилсульфат натрію, 0,1 М EDTA рН 8,0, 50% гліцерин). До 10 мкл реакційної суміші додавали 2 мкл буфера, тобто 0,2% (w/v). У лунки гелю наносили по 1–3 мкл реакційної суміші. Електрофорез проводили за постійної напруги 350 В протягом 2-3 год в 1xTBE (89 мМ Tris base, 89 мМ H₃BO₃, 2 мМ EDTA, рН 8,0) буфері в залежності від молекулярної маси фрагментів, що аналізувалися.

Візуалізацію фрагментів проводили шляхом фарбування нітратом срібла [98]. Гель з приладу переносили в кювету, додавали 250 мл розчину 10%-вого етанолу та 0,5%-вої оцтової кислоти (10-12°C), накривали склом та інкубували похитуючи протягом 3 хв.

Зливали перший розчин та проводили експозицію в 250 мл розчину азотнокислого срібла (0,15% AgNO_3 , 0,08% формалін), інкубували на денному світлі похитуючи протягом 3-5 хв. Зливали другий розчин, швидко 1-2 рази рясно промивали бідистильованою водою та додавали 250 мл відновлюючого розчину (1,5% NaOH , 0,08% формалін (перед кожним використанням додавали 1 мл/л формаліну (40%)), інкубували на денному світлі похитуючи до розвитку фарбування (приблизно 3-7 хв, проте швидкість забарвлення напряму залежить від температури третього розчину). Зливали третій розчин та обробляли гелеву пластину 5% льодяною оцтовою кислотою до зупинки фарбування (приблизно 1 хв). На заключному етапі гелеву пластину промивали бідистильованою водою протягом 2 хв.

2. Електрофорезу у 1,5%-му агарозному гелі [99]. Для приготування гелю, відповідну масу суміші (100 мл) агароза/буфер (TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)) помістили у колбу Эрленмейера. Суміш плавили за допомогою мікрохвильової печі, переміщуючи кожні 30 секунд. Після повного розчинення, суміш охолоджували протягом 30 секунд під проточною холодною водою, додавали 10 мкл бромід етидію (EtBr), ще раз перемішували, заливали у форму, і чекали поки гель повністю затвердіє.

Перед нанесенням, 8 мкл ДНК фарбували 1 мкл метиленового синього. У лунки гелю наносили 9 мкл суміші. Електрофорез проводили за постійної напруги 160 В протягом 30 хвилин в 1xTBE (89 mM Tris base, 89 mM H_3BO_3 , 2 mM EDTA, pH 8,0) буфері.

Візуалізацію фрагментів проводили помістивши гель на спеціальну ультрафіолетову лампу.

Забарвлені гелюві пластини фотографували цифровою відеокамерою. Аналіз зображень проводили з використанням програмного пакету GelAnalyzer (<http://www.gelalyzer.com/>).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

В цій роботі було досліджено генетичну мінливість 25 рослин, які належать до різних сортів суріпиці (*Brassica rapa ssp. oleifera*). Найбільша увага приділялась зразкам 14–19. У зв'язку з тим, що суріпиця буває озима та яра, у дослідженні використовувалися генні SSR-маркери, асоційовані зі стійкістю до низьких температур, з метою диференціації групи озими/ярі.

Першим було застосовано маркер СВ10578, очікуваний розмір фрагменту дорівнює 232 п.н. [93]. Як можна побачити на рисунку 3.1. усі фрагменти знаходяться у межах від 150 п. н. до 250 п. н.

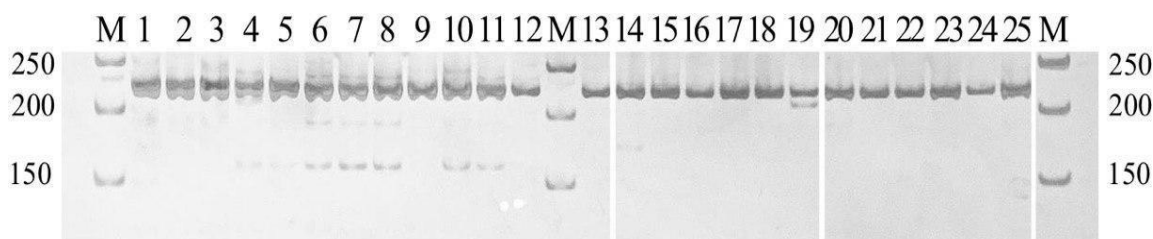


Рис. 3.1. Електрофореграма SSR-маркери СВ10578. М – маркер; 1–13 – Суріпиця; 14–19 – Суріпиця озима; 20–25 – Суріпиця яра.

В результаті проведеного аналізу продемонстровано утворення шести різних варіацій генів (алелей): 178 п. н., 205 п. н., 212 п. н., 213 п. н., 215 п. н., 216 п. н. Гени розміром 215 п.н., 216 п.н., і комбінації 178 п.н. з 215 п.н. характерні для зразків суріпиці. В свою чергу для зразків суріпиці озимої та ярої характерні бенди розміром 212 п.н..

На наступному етапі було проведено аналіз SSR-маркери ВоССА1 (F/1R1), очікуваний розмір фрагментів від 750 п.н. до 1000 п.н. [93]. На рисунку 3.2. зображена отримана в ході дослідження електрофореграма. Виявлені фрагменти знаходяться у діапазоні від 700 п. н. до 1000 п.н.

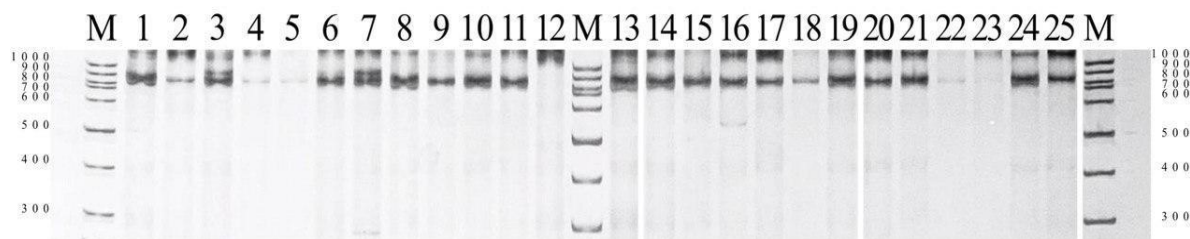


Рис. 3.2. Електрофореграма SSR-маркеру BoCCA1 (F/1R1). М – маркер; 1–13 – Суріпиця; 14–19 – Суріпиця озима; 20–25 – Суріпиця яра.

В результаті проведеного аналізу було виявлено одинадцять різних варіацій генів (алелей): 769 п. н., 781 п. н., 798 п. н., 810 п. н., 828 п. н., 850 п. н., 861 п. н., 876 п. н., 897 п. н., 902 п. н., та 908 п. н.. У зразках 12 та 23 характерна наявність нуль-алеля, тобто досліджуваний ген відсутній. у зразках суріпиці (1–13) найчастіше зустрічаються гени розміром 900 п. н., а загалом розміри фрагментів у зразках залишаються у межах від 848 п. н. до 916 п. н.. Тоді як у зразках суріпиці озимої (14–19) та суріпиці ярої (20–25) розміри генів менше 835 п. н. і більше 770 п. н..

Третім досліджуваним SSR-маркером був BrgMS653, очікуваний розмір фрагменту – 243 п.н. [93]. На рисунку 3.3. показані фрагменти розміром від 250 до 500 п.н..

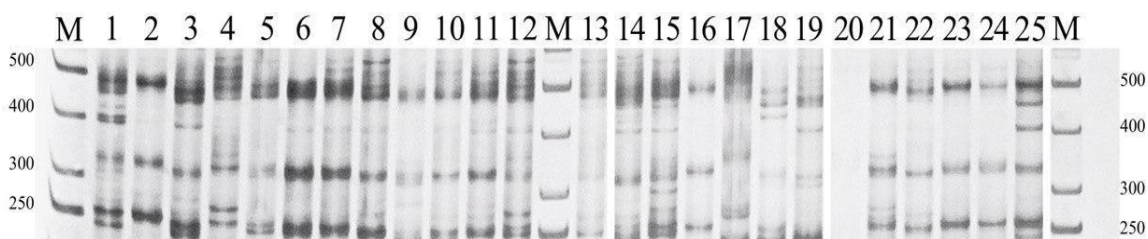


Рис. 3.3. Електрофореграма SSR-маркеру BrgMS653. М – маркер; 1–13 – Суріпиця; 14–19 – Суріпиця озима; 20–25 – Суріпиця яра.

В результаті проведеного аналізу було виявлено, що у зразку суріпиці ярої (20) ген відсутній, або нуль-алель. Також було виявлено 11 різних варіацій алелів: 212 п. н., 216 п. н., 217 п. н., 237 п. н., 243 п. н., 244

п. н., 246 п. н., 247 п. н., 251 п. н., 258 п. н. та 262 п. н.. Найпоширеніша комбінація розміру генів це 212 п. н. і 243 п. н., яка зустрічається у зразках суріпиці (1, 3, 4, 6, 7, 8). Загалом, маркер BrgMS653, не є ефективним для дослідження представників *Brassica rapa ssp. oleifera*, оскільки, при візуалізації продуктів ПЛР, можна побачити, що утворилось багато неспецифічних фрагментів, які ускладнюють диференціацію цільових алелів.

Четвертим було досліджено SSR-маркер BrgMS5339, очікуваний розмір фрагменту – 328 п.н. [93]. На рисунку 3.4. показані фрагменти розміром від 250 до 500 п.н..

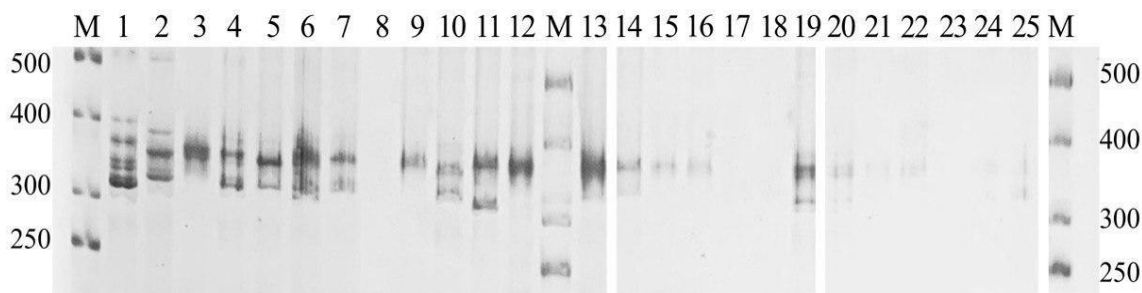


Рис. 3.4. Електрофореграма SSR-маркеру BrgMS5339. М – маркер; 1–13 – Суріпиця; 14–19 – Суріпиця озима; 20–25 – Суріпиця яра.

В результаті проведеного аналізу було виявлено 12 варіацій генів: 310 п.н., 317 п.н., 322 п.н., 331 п.н., 333 п.н., 346 п.н., 353 п.н., 357 п.н., 360 п.н., 367 п.н., 370 п.н. та 372 п.н.. Розміри генів зразків суріпиці (1–13) залишаються у межах від 310 п.н. до 372 п.н., та мають лише один зразок з нуль-алелем (8). Тоді, як більша частина зразків (18, 21, 22, 23, 24, 25) суріпиці озимої та суріпиці ярої мають нуль-алелів, а вдалі зразки залишаються у межах 357 п.н. – 372 п.н..

П'ятим досліджуваним SSR-маркером був BrgMS609, очікуваний розмір фрагменту – 328 п.н. [93]. На рисунку 3.5. показані фрагменти

розміром від 200 до 500 п.н.. Треба зазначити, що ця візуалізація продуктів ПЛР була проведена на 1,5%-му агарозному гелі.

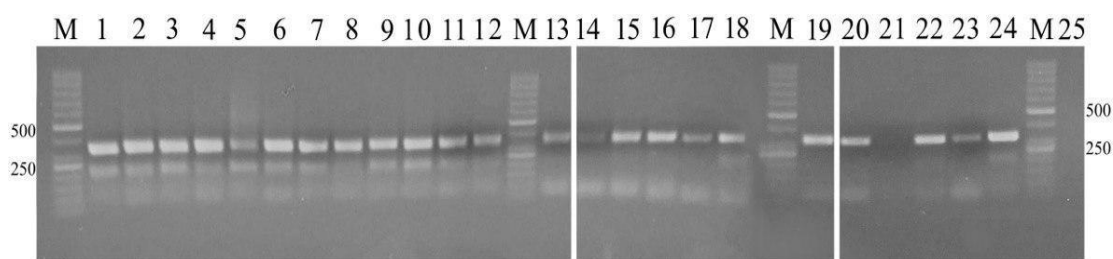


Рис. 3.5. Електрофореграма SSR-маркеру BrgMS5339. М – маркер; 1–13 – Суріпиця; 14–19 – Суріпиця озима; 20–25 – Суріпиця яра.

В результаті проведеного аналізу було виявлено тринадцять різних варіацій генів, а в двох зразках (21, 25) наявні нуль-алелі. Спільні алелі присутні у зразках , але потрібно зазначити, що гени зразків суріпиці озимої та суріпиці ярої доволі близькі один до одного за розміром, та у своїй більшості менші, ніж зразки 1–13.

Загалом, досліджено генетичну мінливість різних сортів *Brassica rapa ssp. oleifera*. Наведені нижче (табл. 3.1.) результати згруповані за типами SSR-маркерів [93].

Таблиця 3.1.

Розмір фрагментів продуктів ампліфікації

№ зразка	CB10578	BoCCA1 (F/1R1)	BrgMS653	BrgMS5339	BrgMS609
1	216	876	212, 243	310, 331	241, 362
2	215	798	246	317, 353	248, 383
3	215	861	212, 243	360	254, 400
4	216	850	212, 243	310, 357	400
5	216	861	244	310, 346	248, 400

6	178, 215	902	212, 243	310, 360	251, 388
7	178, 215	908	212, 243	322, 360	371
8	178, 215	908	212, 243	–	371
9	215	876	237	372	371
10	178, 215	897	244	333, 367	361
11	216	876	217, 247	317, 367	361
12	215	–	217, 247	370	371
13	213	861	251	370	367
14	213	850	244	370	352
15	212	828	262	370	352
16	212	810	262	370	352
17	212	810	244	370	334
18	212	798	244	–	334
19	205, 212	810	217, 247	370	324
20	212	769	–	360	293
21	212	781	258	–	–
22	212	769	258	–	293
23	212	–	258	–	293
24	212	781	258	–	293
25	212	781	216, 258	–	–
Кількість алелей	6	11	11	12	13

Отже, з п'яти досліджених ДНК-маркерів, тільки один (CB10578) виявився придатним для вивчення генетичної мінливості сортів *Brassica rapa ssp. oleifera*. Згодом, чотири інших ДНК-маркери (BoCCA1 (F/1R1);

BrgMS653; BrgMS5339; BrgMS609) використаних у дослідженні продемонстрували великий рівень утворення неспецифічних фрагментів після візуалізації продуктів ампліфікації. Це може бути пов'язано зі складнощами підбору умов проходження полімеразної ланцюгової реакції.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі проаналізовано 25 рослин виду *Brassica rapa ssp. oleifera* на молекулярно-генетичному рівні за допомогою SSR-маркерів. Отримані результати можуть бути використані як для генотипування сортів, гібридів та споріднених видів суріпиці, так і для цілеспрямованого застосування в молекулярній селекції, що дозволяє сформулювати наступні висновки.

1. Проведено молекулярно-генетичний аналіз *Brassica rapa ssp. oleifera* за допомогою п'яти SSR-маркерів.
2. Встановлено, що тільки один з п'яти обраних ДНК-маркерів можуть бути використані для дослідження мінливості суріпиці.
3. Отримані результати можуть бути корисними при селекційній роботі (наприклад, під час вибору відповідного сорту рослини для посіву у специфічних кліматичних умовах) та для вивчення генетичної мінливості споріднених видів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Li C. W. et al. The origin, evolution, taxonomy and hybridization of chinese cabbage //Chinese cabbage. Proceedings of the first international symposium. – AVRDC, 1981. – С. 3-10.
2. Nishi S. et al. Differentiation of Brassica crops in Asia and the breeding of 'Hakuran', a newly synthesized leafy vegetable //Brassica crops and wild allies.[I]. – 1980. – С. 133-150.
3. Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes //Nucleic acids research. – 1984. – Т. 12. – №. 10. – С. 4127-4138.
4. Dib C. et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites //Nature. – 1996. – Т. 380. – №. 6570. – С. 152-154.
5. Dietrich W. F. et al. Correction: A comprehensive genetic map of the mouse genome //Nature. – 1996. – Т. 381. – №. 6578. – С. 172-172.
6. Morgante M., Olivieri A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics //The plant journal. – 1993. – Т. 3. – №. 1. – С. 175-182.
7. Gómez-Campo C. (ed.). Biology of Brassica coenospecies. – Elsevier, 1999.
8. Reiner H., Holzner W., Ebermann R. The development of turnip-type and oilseed-type Brassica rapa crops from the wild-type in Europe—An overview of botanical, historical and linguistic facts //Rapeseed Today Tomorrow. – 1995. – Т. 4. – С. 1066-1069.
9. Shahidi F. Vol. 2: Edible oil and fat products: edible oils. – Hoboken: Wiley-Interscience, 2005.
10. Fereidoon Shahidi (ed.). Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition, and processing technology. – Springer Science & Business Media, 1990.

11. Prakash S. et al. Brassica and its close allies: cytogenetics and evolution //Plant Breeding Reviews vol. – 2009. – T. 31.
12. Ge X. H., Wang J., Li Z. Y. Different genome-specific chromosome stabilities in synthetic Brassica allohexaploids revealed by wide crosses with *Orychophragmus* //Annals of botany. – 2009. – T. 104. – №. 1. – C. 19-31.
13. Tian E. et al. Synthesis of a Brassica trigeneric allohexaploid (*B. carinata* × *B. rapa*) de novo and its stability in subsequent generations //Theoretical and Applied Genetics. – 2010. – T. 121. – №. 8. – C. 1431-1440.
14. Chen S. et al. Trigeneric bridges for Brassica improvement //Critical Reviews in Plant Sciences. – 2011. – T. 30. – №. 6. – C. 524-547.
15. Geng X. X. et al. Doubled haploids of novel trigeneric Brassica derived from various interspecific crosses //Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2013. – T. 113. – №. 3. – C. 501-511.
16. Qian W. et al. Introgression of genomic components from Chinese Brassica rapa contributes to widening the genetic diversity in rapeseed (*B. napus* L.), with emphasis on the evolution of Chinese rapeseed //Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – T. 113. – №. 1. – C. 49-54.
17. Chen S. et al. Allelic diversity in a novel gene pool of canola-quality Brassica napus enriched with alleles from *B. rapa* and *B. carinata* //Crop and Pasture Science. – 2010. – T. 61. – №. 6. – C. 483-492.
18. Mei J. Q. et al. Effectively widening the gene pool of oilseed rape (*Brassica napus* L.) by using Chinese *B. rapa* in a ‘virtual allopolyploid’ approach //Plant Breeding. – 2011. – T. 130. – №. 3. – C. 333-337.
19. Chen S. et al. Global genetic diversity in oilseed Brassica rapa //Crop and Pasture Science. – 2013. – T. 64. – №. 10. – C. 993-1007.

20. Pradhan A, Nelson MN, Plummer JA, Cowling WA, Yan G. 2011. Characterization of *Brassica nigra* collections using simple sequence repeat markers reveals distinct groups associated with geographical location, and frequent mislabelling of species identity. *Genome*. 54:50–63.
21. Chen S. et al. Allelic diversity in a novel gene pool of canola-quality *Brassica napus* enriched with alleles from *B. rapa* and *B. carinata* // *Crop and Pasture Science*. – 2010. – T. 61. – №. 6. – C. 483-492.
22. Chen S. et al. Evidence from genome-wide simple sequence repeat markers for a polyphyletic origin and secondary centers of genetic diversity of *Brassica juncea* in China and India // *Journal of heredity*. – 2013. – T. 104. – №. 3. – C. 416-427.
23. Song K., Osborn T. C., Williams P. H. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) // *Theoretical and applied genetics*. – 1990. – T. 79. – №. 4. – C. 497-506.
24. McGrath J. M., Quiros C. F. Genetic diversity at isozyme and RFLP loci in *Brassica campestris* as related to crop type and geographical origin // *Theoretical and applied genetics*. – 1992. – T. 83. – №. 6. – C. 783-790.
25. Guo Y. et al. Center of origin and centers of diversity in an ancient crop, *Brassica rapa* (turnip rape) // *Journal of Heredity*. – 2014. – T. 105. – №. 4. – C. 555-565.
26. Dixon G. R. *Vegetable brassicas and related crucifers*. – CABI, 2007. – №. 14.
27. Quijada P. et al. *Brassica rapa* // *Oilseeds*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. – C. 211-263.
28. Ignatov A. N., Artemyeva A. M., Hida K. Origin and expansion of cultivated *Brassica rapa* in Eurasia: linguistic facts // *V International Symposium on Brassicas and XVI International Crucifer Genetics Workshop, Brassica 2008* 867. – 2008. – C. 81-88.

29. U, N., 1935: Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jap. J. Bot.* 7, 389–452.
30. Prakash, S., and K. Hinata, 1980: Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review. *Opera Bot.* 55, 1–57.
31. Aksouh N. M. et al. Response of canola to different heat stresses // *Australian Journal of Agricultural Research*. – 2001. – T. 52. – №. 8. – C. 817-824.
32. Tsukaguchi T., Egawa Y. Higher stability in leaf water status in heat-tolerant cultivars of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Bull Fac Agric Niigata Univ.* – 2006. – T. 58. – C. 79-84.
33. Chen S. et al. Quantitative Trait Loci for Heat Stress Tolerance in *Brassica rapa* L. Are Distributed across the Genome and Occur in Diverse Genetic Groups, Flowering Phenologies and Morphotypes // *Genes*. – 2022. – T. 13. – №. 2. – C. 296.
34. Morrison M. J. Heat stress during reproduction in summer rape // *Canadian Journal of Botany*. – 1993. – T. 71. – №. 2. – C. 303-308.
35. Angadi S. V. et al. Response of three Brassica species to high temperature stress during reproductive growth // *Canadian Journal of Plant Science*. – 2000. – T. 80. – №. 4. – C. 693-701.
36. Wheeler T. R. et al. Temperature variability and the yield of annual crops // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. – 2000. – T. 82. – №. 1-3. – C. 159-167.
37. Cross R. H. et al. Heat-stress effects on reproduction and seed set in *Linum usitatissimum* L. (flax) // *Plant, Cell & Environment*. – 2003. – T. 26. – №. 7. – C. 1013-1020.
38. Sato S., Peet M. M., Thomas J. F. Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon*

- esculentum Mill. exposed to moderately elevated temperatures //Journal of Experimental Botany. – 2002. – T. 53. – №. 371. – C. 1187-1195.
39. Cook D. et al. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – T. 101. – №. 42. – C. 15243-15248.
40. Du C. et al. Dynamic transcriptome analysis reveals AP2/ERF transcription factors responsible for cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.) //Molecular Genetics and Genomics. – 2016. – T. 291. – №. 3. – C. 1053-1067.
41. Sun W. C. et al. Growth and development characteristics of winter rapeseed northern-extended from the cold and arid regions in China //Acta Agron. Sin. – 2010. – T. 36. – C. 2124-2134.
42. Chen Q. et al. Differentially expressed proteins in response to low temperature in *Brassica campestris* 'Long-you No. 7' seedlings //Zhongguo Shengtai Nongye Xuebao/Chinese Journal of Eco-Agriculture. – 2017. – T. 25. – №. 3. – C. 381-390.
43. Zeng X. et al. Identification of cold stress responsive microRNAs in two winter turnip rape (*Brassica rapa* L.) by high throughput sequencing //BMC plant biology. – 2018. – T. 18. – №. 1. – C. 1-13.
44. Liu Z. G. et al. Effects of low nocturnal temperature on photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of winter rapeseed //Russian Journal of Plant Physiology. – 2016. – T. 63. – №. 4. – C. 451-460.
45. Knight M. R., Knight H. Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants //New Phytologist. – 2012. – T. 195. – №. 4. – C. 737-751.
46. Elsheery N. I., Cao K. F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress //Acta Physiologiae Plantarum. – 2008. – T. 30. – №. 6. – C. 769-777.

47. Garg N., Chandel S. Role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on growth, cadmium uptake, osmolyte, and phytochelatin synthesis in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. under NaCl and Cd stresses // *Journal of plant growth regulation*. – 2012. – T. 31. – №. 3. – C. 292-308.
48. McCormick K., Kåberger T. Exploring a pioneering bioenergy system: The case of Enköping in Sweden // *Journal of Cleaner production*. – 2005. – T. 13. – №. 10-11. – C. 1003-1014.
49. Cardone M. et al. Brassica carinata as an alternative oil crop for the production of biodiesel in Italy: engine performance and regulated and unregulated exhaust emissions // *Environmental science & technology*. – 2002. – T. 36. – №. 21. – C. 4656-4662.
50. Licata M. et al. Agricultural feedstocks of two Brassica oilseed crops and energy cogeneration with pure vegetable oil for a sustainable short agro-energy chain in Sicily (Italy) // *Industrial Crops and Products*. – 2018. – T. 117. – C. 140-148.
51. Saari S., Moilanen A. International Evaluation of Research and Doctoral Training at the University of Helsinki 2005-2010: RC-Specific Evaluation of SSA-Science of Sustainable Agriculture. – 2012.
52. Winfield A. L. Field pests of oilseed rape // *Oilseed rape*/edited by DH Scarisbrick and RW Daniels. – 1986.
53. Crowley J. G. The potential of new crop introductions. – Teagasc, 1998.
54. Narits, L., and K. Annamaa. "Perspectives of winter turnip rape (*Brassica rapa* L. var. *oleifera* subvar. *biennis*) for biofuel in Estonia." *Agronomijas Vestis* 11 (2008): 257-262.
55. Gairola S., Sharma J., Bedi Y. S. A cross-cultural analysis of Jammu, Kashmir and Ladakh (India) medicinal plant use // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2014. – T. 155. – №. 2. – C. 925-986.
56. Paul, Swastika, et al. "Phytochemical and health-beneficial progress of turnip (*Brassica rapa*)." *Journal of food science* 84.1 (2019): 19-30.

57. Jones G., Sanders O. G., Grimm C. Aromatic compounds in three varieties of turnip greens harvested at three maturity levels //Journal of food quality. – 2007. – T. 30. – №. 2. – C. 218-227.
58. Hong E., Kim G. H. Anticancer and antimicrobial activities of β -phenylethyl isothiocyanate in Brassica rapa L //Food science and technology research. – 2008. – T. 14. – №. 4. – C. 377-377.
59. Pierre P. S. et al. Differences in volatile profiles of turnip plants subjected to single and dual herbivory above-and belowground //Journal of chemical ecology. – 2011. – T. 37. – №. 4. – C. 368-377.
60. Arora S. et al. Inhibition of DNA oxidative damage and antimutagenic activity by dichloromethane extract of Brassica rapa var. rapa L. seeds //Industrial Crops and Products. – 2015. – T. 74. – C. 585-591.
61. Han Z. Z. et al. Reference data of the main physiological parameters in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies //Laboratory Animal Research. – 2010. – T. 26. – №. 2. – C. 153-164.
62. Mohajeri D. et al. Preventive effects of turnip (Brassica rapa L.) on renal ischemia-reperfusion injury in rats //Life Sci J. – 2013. – T. 10. – №. 1. – C. 1165-1170.
63. Mohajeri D. et al. Preventive effects of turnip (Brassica rapa L.) on renal ischemia-reperfusion injury in rats //Life Sci J. – 2013. – T. 10. – №. 1. – C. 1165-1170.
64. Hosseini S. E., Zahiri S., Aqababa H. Effect of alcoholic extract of Brassica rapa root on formalin test pain in adult male rats //The Horizon of Medical Sciences. – 2013. – T. 19. – №. 3. – C. 161-166.
65. Real V. et al. Glucosinolates in crop plants //Hortic Rev. – 2010. – T. 55. – C. 99.
66. Crozier A., Clifford M. N., Ashihara H. (ed.). Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. – John Wiley & Sons, 2008.

67. Pereira D. M. et al. Phenolics: From chemistry to biology // *Molecules*. – 2009. – T. 14. – №. 6. – C. 2202-2211.
68. Francisco M. et al. Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassica rapa* // *Journal of Chromatography A*. – 2009. – T. 1216. – №. 38. – C. 6611-6619.
69. Pithford P. Healing with whole foods: Asian traditions and modern nutrition // Berkeley: North Atlantic Books. – 2002.
70. Ahmadvand S., Sariri R. Antimicrobial activity of crude extracts of turnip (*Brassica rapa*) // *Journal of Pure and Applied Microbiology*. – 2008. – T. 2. – №. 1. – C. 193-196.
71. Rafatullah S. et al. Preliminary phytochemical and hepatoprotective studies on turnip *Brassica rapa* L // *International Journal of Pharmacology*. – 2006. – T. 2. – №. 6. – C. 670-673.
72. Daryoush M. et al. Protective effect of turnip root (*Brassica rapa*. L) ethanolic extract on early hepatic injury in alloxanized diabetic rats // *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. – 2011. – T. 5. – №. 7. – C. 748-756.
73. Jung P. R. et al. Antioxidant potential of ethanol extract of *Brassica rapa* L. root // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2012. – T. 6. – №. 9. – C. 1581-1584.
74. Beltagy A. M. Investigation of new antimicrobial and antioxidant activities of *Brassica rapa* L // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – T. 6. – №. 6. – C. 84-88.
75. Bärtsch P., Swenson E. R. Acute high-altitude illnesses // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – T. 368. – №. 24. – C. 2294-2302.
76. Huang L. High altitude medicine in China in the 21st century: opportunities and challenges // *Military Medical Research*. – 2014. – T. 1. – №. 1. – C. 1-4.

- 77.Xie Y. et al. Composition analysis and anti-hypoxia activity of polysaccharide from *Brassica rapa* L //International Journal of Biological Macromolecules. – 2010. – T. 47. – №. 4. – C. 528-533.
- 78.Johnson T. S. et al. Prevention of acute mountain sickness by dexamethasone //New England Journal of Medicine. – 1984. – T. 310. – №. 11. – C. 683-686.
- 79.Ritchie N. D., Baggott A. V., Andrew Todd W. T. Acetazolamide for the prevention of acute mountain sickness—a systematic review and meta-analysis //Journal of travel medicine. – 2012. – T. 19. – №. 5. – C. 298-307.
- 80.Kong H. et al. Anti-hypoxic effect of ginsenoside Rb1 on neonatal rat cardiomyocytes is mediated through the specific activation of glucose transporter-4 ex vivo //Acta Pharmacologica Sinica. – 2009. – T. 30. – №. 4. – C. 396-403.
- 81.Chu B. et al. Effects of Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.) on promoting hypoxia-tolerance in healthy humans //Journal of ethnopharmacology. – 2017. – T. 195. – C. 246-254.
- 82.Mason A. S. Challenges of genotyping polyploid species //Plant Genotyping. – 2015. – C. 161-168.
- 83.Jonah P. M. et al. Review: The importance of molecular markers in plant breeding programmes //Global Journal of Science Frontier Research. – 2011. – T. 11. – №. 5. – C. 4-12.
- 84.Kalia R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants //Euphytica. – 2011. – T. 177. – №. 3. – C. 309-334.
- 85.Garcia FAA, Kido AE, Meza NA, Souza BHM, Pinto RL, Pastina MM, Leite SC, Silva GJA da, Ulian CE, Figueira A et al. (2006) Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theor Appl Genet* 112:298-314.

- 86.Souza L. M. et al. QTL mapping of growth-related traits in a full-sib family of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) evaluated in a sub-tropical climate //PLOS One. – 2013. – Т. 8. – №. 4. – С. e61238.
- 87.Jansen A., Gemayel R., Verstrepen K. J. Unstable microsatellite repeats facilitate rapid evolution of coding and regulatory sequences //Repetitive DNA. – 2012. – Т. 7. – С. 108-125.
- 88.Zhang L. et al. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana* //Bioinformatics. – 2004. – Т. 20. – №. 7. – С. 1081-1086.
- 89.Nalavade P. et al. Development of a Powered Disc Harrow for on-farm Crop Residue Management //Int. Agric. Eng. J. – 2013. – Т. 22. – С. 49-60.
- 90.Gao L. et al. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches //Molecular Breeding. – 2003. – Т. 12. – №. 3. – С. 245-261.
- 91.Xin Z., Chen J. A high throughput DNA extraction method with high yield and quality //Plant methods. – 2012. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-7.
- 92.Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues //Plant molecular biology. – 1985. – Т. 5. – №. 2. – С. 69-76.
- 93.Амосова А. В. и др. Геномные маркеры, ассоциированные с устойчивостью к низким температурам у *Brassica rapa* L //Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – №. 4. – С. 603-615.
- 94.Piquemal J. et al. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers //Theoretical and Applied Genetics. – 2005. – Т. 111. – №. 8. – С. 1514-1523.
- 95.Song H. et al. Allelic variation in *Brassica oleracea* CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (*BoCCA1*) is associated with freezing

- tolerance //Horticulture, Environment, and Biotechnology. – 2018. – T. 59. – №. 3. – C. 423-434.
- 96.Xu J. et al. Construction of an integrated genetic linkage map for the A genome of Brassica napus using SSR markers derived from sequenced BACs in B. rapa //BMC genomics. – 2010. – T. 11. – №. 1. – C. 1-15.
- 97.Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: A laboratory manual, edn Cold Spring Harbour. – 2001.
- 98.Benbouza H. et al. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels //Biotechnologie, agronomie, société et environnement. – 2006. – T. 10. – №. 2.
- 99.Lee P. Y. et al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments //JoVE (Journal of Visualized Experiments). – 2012. – №. 62. – C. e3923.