


УДК 577.11:577.21:633.853.494

## Визначення поліморфізму ріпаку озимого (*Brassica napus* L.) на основі SSR маркерів та морфологічних ознак

Піскова О.В. , Костенко А.В. , Шляхтун І.С. ,

Діхтяр І.О. , Ільченко Я.В. , Присяжнюк Л.М. 

Український інститут експертизи сортів рослин

 Присяжнюк Л.М. E-mail: prysiazhniuk\_l@ukr.net



Піскова О.В., Костенко А.В., Шляхтун І.С., Діхтяр І.О., Ільченко Я.В., Присяжнюк Л.М. Визначення поліморфізму ріпаку озимого (*Brassica napus* L.) на основі SSR маркерів та морфологічних ознак. «Агробіологія», 2023. № 1. С. 32–41.

Piskova O., Kostenko A., Shliakhtun I., Dikhtiar I., Ichenko Y., Prysiazhniuk L. Determination of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) polymorphism based on SSR markers and morphological characters «Agrobiology», 2023. no. 1, pp. 32–41.

Рукопис отримано: 27.03.2023 р.

Прийнято: 10.04.2023 р.

Затверджено до друку: 25.05.2023 р.

doi: 10.33245/2310-9270-2023-179-1-32-41

У статті наведено результати досліджень з оцінки генетичного різноманіття ріпаку озимого за допомогою молекулярно-генетичного аналізу з використанням SSR маркерів та визначення поліморфізму гібридів за морфологічними ознаками.

Метою досліджень було визначення поліморфізму генотипів ріпаку озимого за SSR маркерами та морфологічними маркерними ознаками.

Досліджували 12 гібридів ріпаку озимого, які проходили кваліфікаційну експертизу на ВОС в 2021–2022 рр. та 24 батьківських компоненти до цих гібридів. Дослідження з оцінки генотипів ріпаку озимого за 8 SSR маркерами проводили в 2021 році. Визначено, що більшість гібридів та їх батьківських компонентів за досліджуваними SSR маркерами характеризуються алелями однакового розміру та є гомозиготами за цими маркерами. Водночас, встановлено наявність у батьківських компонентів лише по одному алелю, які ідентифіковані у гібрида. Таке розподілення алелів надає можливість визначити ступінь гібридності гібридів та провести їх ідентифікацію. Встановлено, що найбільш поліморфним виявився маркер Na12-A02, PIC становить 0,77. Найменше значення PIC отримано для маркера Na12-E02 – 0,47. У середньому для досліджуваних маркерів PIC склав 0,66, що вказує на рівномірність розподілу ідентифікованих алелів за SSR маркерами у цій вибірці генотипів ріпаку озимого.

У результаті кластеризації виділено п'ять кластерів, які сформовані із гібридів ріпаку озимого за 8 SSR маркерами. Найбільш близькими виявились гібриди із значеннями генетичних дистанцій 2,45. Тимчасом найбільш віддаленими є гібриди зі значенням генетичних дистанцій 5,83 та 5,74. В результаті кластеризації за кодами прояву морфологічних ознак досліджувані гібриди ріпаку озимого розподілились на 3 кластери. Визначено, що найбільш подібними виявились гібриди із значеннями генетичних дистанцій 3,46. Тимчасом найбільш відмінними є гібриди із значеннями генетичних дистанцій між ними 5,29–9,38. Отже, враховуючи різну диференціацію досліджуваних генотипів за ідентифікованими алелями за SSR маркерами та кодами прояву морфологічних ознак, SSR маркери можуть застосовуватись як додатковий інструмент визначення відмінності генотипів.

**Ключові слова:** генетичні дистанції, ріпак озимий, частота алелів, PIC, генетичне різноманіття, SSR маркери.

**Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.** Ріпак посідає третє місце серед олійних культур, його валове виробництво становить близько 35 млн т, а виробництво олії сягає 9,8 % світових обсягів. На сьогодні ріпак вирощують більш як у 30 країнах, це

одна з найпоширеніших культур у світі його посіви займають понад 30 млн га, або 10,5 % всіх площ олійних культур. В Україні в останні роки спостерігається тенденція до стрімкого збільшення посівних площ під ріпаковою культурою. За планування виробництва ріпаку, зо-

крема високих його врожаїв, виникає потреба у виведенні високопродуктивних сортів [1]. Селекційні програми ефективно використовують генетичну дивергенцію в зародковій плазмі після оцінки генетичного різноманіття [2]. На сучасному етапі розвитку селекції визначають генетичний поліморфізм вихідних матеріалів, це створює передумови щодо здійснення добору батьківських комбінацій для виведення сортів із високими показниками врожайності та покращення показників якості [3]. Знання про генетичне різноманіття зародкової плазми допомагає підібрати сприятливу комбінацію генів та створити унікальний генотип завдяки збільшенню частки сприятливого генетичного матеріалу, за яким відрізняються батьківські компоненти [4].

Сучасні сорти ріпаку досить складно диференціювати, оскільки генетична база їх батьківських компонентів достатньо вузька. Наразі, за застосування традиційних методів аналізування відмінності сортів, таких як морфологічний опис, ізоферментний аналіз, складно виявити високий рівень поліморфізму, зокрема, враховуючи, що на ступінь прояву фенотипових ознак можуть також чинити вплив умови навколишнього середовища [5, 6]. Станом на 20.03.2023 р. в Державному реєстрі сортів рослин, придатних до поширення в Україні знаходиться 349 гібридів та сортів ріпаку озимого, кожен рік з метою набуття майнових прав інтелектуальної власності та майнового права на поширення випробовують близько 145 гібридів, а також 330 батьківських компонентів (ліній). Отже, актуальним є залучення ефективних методів оцінки поліморфізму сортів ріпаку озимого. В останні роки методи молекулярно-генетичного аналізу, які засновані на поліморфізмі ДНК, використовують для характеристики сортів та селекційного матеріалу багатьох сільськогосподарських культур, зокрема ріпаку [7, 8]. Із початку 2000-х років низкою країн, які є членами Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин (International Union for the Protection of New Varieties of Plants – UPOV) започатковано застосування додаткових методів оцінки сортів з використанням біохімічних та молекулярних методів. Як важливий інструмент для визначення поліморфізму використовують достатньо широкий спектр ДНК маркерів. Головними особливостями, які вирізняють SSR (Simple Sequence Repeats) маркери від інших типів є кододомінантний прояв успадкування, високий рівень поліморфізму та широке розповсюдження по геному [9]. Застосування SSR маркерів для оцінки полі-

морфізму генотипів ріпаку є достатньо поширеним [10–13].

**Метою дослідження** було визначення поліморфізму генотипів ріпаку озимого за SSR маркерами та морфологічними маркерними ознаками.

**Матеріал і методи дослідження.** Матеріалом для дослідження слугували 12 гібридів ріпаку озимого, які проходили кваліфікаційну експертизу на ВОС в 2021–2022 рр. та 24 батьківських компоненти до цих гібридів. Дослідження з оцінки генотипів ріпаку озимого за SSR маркерами проводили в 2021 році на базі лабораторії молекулярно-генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин (УІЕСР). Морфологічний опис генотипів ріпаку озимого проводили протягом 2021–2022 рр. в межах кваліфікаційної експертизи на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС) відповідно до методики проведення експертизи сортів ріпаку на ВОС. Ступені прояву морфологічних ознак позначали цифровими значеннями від 1 до 9 [14].

Для проведення ПЛР аналізу генотипів ріпаку озимого застосовували 8 SSR маркерів [13, 15]. ДНК генотипів виділяли із п'ятидобових проростків, застосовуючи СТАВ-метод [16]. Послідовності та характеристики праймерів наведено в таблиці 1.

ПЛР проводили на ампліфікаторі SureCycle G8800A (Agilent, США). Реакційна суміш містила: 100 нг сумарної рослинної ДНК, 1×буфер (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,01 % Triton X-100; 25 mM MgCl<sub>2</sub>); 200 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ), 0,2 мкМ кожного з праймерів та 1 одиницю Taq-полімерази. Об'єм реакційної суміші 20 мкл. Параметри ампліфікації: початкова денатурація – 94 °C – 5 хв, 35 циклів: денатурація – 94 °C – 45 с, гібридизація праймерів – 53 °C (49 °C для F1TO-063) – 45 с, 72 °C – 1 хв, заключна елонгація – 72 °C – 10 хв.

Продукти реакції ампліфікації візуалізували з використанням методу електрофорезу в 2 % агарозному гелі у 0,5×ТБЕ (трис-боратний буферний розчин) з бромистим етидієм. Електрофорез проводили протягом 1,5 год за напруженості електричного поля 5 В/см [17]. Розмір отриманих фрагментів визначали відносно маркера молекулярної маси за допомогою комп'ютерної програми TotalLab T1120 (trial version). З метою визначення спроможності маркерної системи диференціювати сорти ріпаку розраховували PIC (polymorphism information content) за частотами отриманих алелів [18].

Таблиця 1 – Характеристика SSR маркерів для оцінки поліморфізму ріпаку озимого

SSR	Нуклеотидні послідовності праймерів 5'→3'	Мотив	Очікуваний розмір алелів, п.н.
FITO-063	*F - GTTCAGTTCCTCAGATTCCTAA **R - TTTCCTCTTCCTTCTCTCTC	(CCG)15	267–700
FITO-136	F - CCTCCTCCTCAGACTTACACT R - TCACATCCACCATAACSTTT	(CTC)12	130-133
Na10-B07	F - GCCTTAGATTAGATGGTCGCC R - ACTTCAGCTCCGATTTGCC	(CT)29	174-213
Na10-B11	F - TTTAACAACAACCGTCACGC R - CTCCTCCTCCATCAATCTGC	(CT)29	104-161
Na12-E02	F - TTGAAGTAGTTGGAGTAATTGGA R - CAGCAGCCACAACCTTACG	(TTG)13	59-97
Na14-H12	F - CACATTGGCAGTATCCATC R - GGCTGATCGAACACAAATAAG	(AC)16	156-188
Na12-A02	F - AGCCTTGTTGCTTTTCAACG R - AGTGAATCGATGATCTCGCC	(CT)16	161-202
Ra3-H09	F - GTGGTAACGACGGTCCATTC R - ACCACGACGAAGACTCATCC	(TGG)3	119-129

\*F – прямиий праймер; \*\*R – зворотний праймер.

Генетичні дистанції за Неєм та Лі між досліджуваними генотипами ріпаку озимого та групування у кластери за SSR маркерами проводили за допомогою методу незваженого попарного середнього (Unweighted pair group average), групування за морфологічними ознаками – одиничних зв'язків (Single Linkage) з використанням комп'ютерної програми STATISTICA 12.0 (Trial version) [19].

**Результати дослідження та обговорення.** За результатами ПЛР аналізу за SSR маркерами гібридів та їх батьківських компонентів ріпаку озимого ідентифіковані алелі очікуваних розмірів (табл. 2).

Визначено, що внутрішньолінійний поліморфізм характерний для всіх маркерів, окрім FITO-063, за яким ідентифіковано один алель на локус. За маркерами Na12-A02, FITO-136 та Na10-B07 у досліджуваних генотипів ріпаку виявлено до 3 алелів на один локус, за маркерами Ra3-H09, Na10-B11, Na12-E02 та Na14-H12 – до 2 алелів. За маркером Na10-B07 визначено найбільшу кількість алелів – 8, найменшу кількість алелів ідентифіковано за маркером Na12-E02 – 3 алеля. В середньому на один локус припадає 5 алелів.

За результатами досліджень встановлено, що найбільша частота характерна для алеля розміром 130 п.н., який виявлено за маркером Na12-E02. Його ідентифіковано у всіх досліджуваних генотипів ріпаку озимого. Алелі,

розміром 115 та 140 п.н., виявлені за маркерами Ra3-H09 і FITO-136 також характеризувались високою частотою – 0,53 та 0,47 відповідно. Алелі розмірами 220 та 108 п.н., які ідентифіковані за маркерами Na12-A02 і Na12-E02 мали найменшу частоту – 0,03 та зустрічались лише у одного із батьківських компонентів досліджуваних гібридів.

Визначено, що більшість гібридів та їх батьківських компонентів за досліджуваними SSR маркерами характеризуються алелями однакового розміру та є гомозиготами за цими маркерами. Зокрема, алелі, які ідентифіковано у гібрида, наявні також у обох його батьківських компонентів.

Однак, для деяких батьківських компонентів та гібридів визначено, що у батьківських компонентів наявні лише по одному алелю, які ідентифіковані у гібрида. Зокрема, за маркером Na12-A02 у батьківського компонента 17 ідентифіковано 2 алеля розмірами 194 та 164 п.н., у батьківського компонента 18 – 194 та 157 п.н. У гібрида 16, складовими якого є батьківські компоненти 17 та 18, виявлено алелі розмірами 194, 164 і 157 п.н. (рис. 1).

За маркером Na10-B11 у гібрида 13 виявлено два алеля розмірами 208 та 157 п.н., тимчасом у його батьківських компонентів ідентифіковано по одному алелю 208 п.н. (батьківський компонент 14) та 157 п.н. (батьківський компонент 15) (рис. 2).

Таблиця 2 – Кількість, розмір та частота алелів, ідентифікованих за SSR маркерами

SSR	Розміри алелів, п.н.	Кількість алелів, шт.	Частота алелів	PIC
FITO-063	254-282	4	0,17-0,33	0,74
Na10-B07	116-163	8	0,04-0,33	0,63
Ra3-H09	105-130	5	0,04-0,53	0,62
Na12-A02	157-220	6	0,03-0,28	0,77
Na12-E02	97-130	3	0,03-0,69	0,47
Na14-H12	210-249	5	0,10-0,43	0,72
FITO-136	165-175	4	0,11-0,47	0,57
Na10-B11	148-220	5	0,08-0,44	0,72

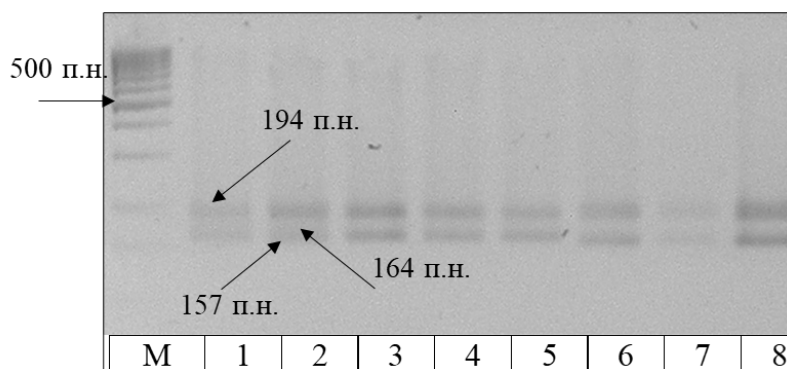


Рис.1. Електрофореграма продуктів ПЛР гібрида 16 та батьківських компонентів 17 і 18 ріпаку озимого за маркером Na12-A02: 1–2 – гібрид 16; 3–5 – батьківський компонент 17; 6–8 – батьківський компонент 18; М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O’GeneRuler (Thermo Scientific).

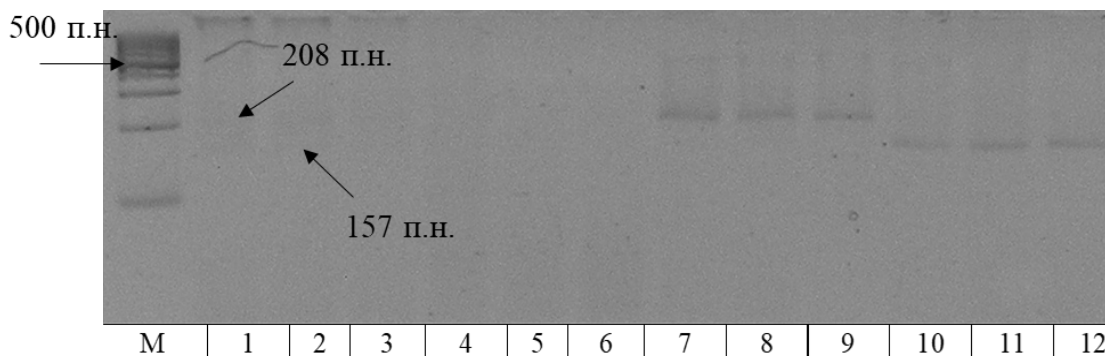


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР гібрида 13 та батьківських компонентів 14 і 15 ріпаку озимого за маркером Na10-B11: 1–2 – гібрид 13; 3–5 – батьківський компонент 14; 6–8 – батьківський компонент 15; М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O’GeneRuler (Thermo Scientific).



Алелі з розмірами 204 та 148 п.н. ідентифіковані у гібрида 22, у його батьківських компонентів (23 та 24) виявлено по одному алелю зазначеного розміру. У гібридів 37, 40 та 43 виявлено по 2 алеля з розмірами 220 і 157 п.н., їх батьківські компоненти (38 і 39, 41 і 42, 44 і 45 відповідно) характеризуються наявністю одного алеля 220 або 157 п.н. (рис. 3).

Отже, визначений поліморфізм батьківських компонентів гібридів ріпаку озимого за SSR маркерами дає змогу визначити ступінь гібридності гібридів та провести їх ідентифікацію відповідно до отриманих алелів.

На основі отриманих частот алелів розраховували PIC для кожного маркера. Визначено, що найбільш поліморфним виявився маркер Na12-A02, PIC становить 0,77. Найменше значення PIC отримано для маркера Na12-E02 – 0,47. Високі значення PIC також були отримані для маркерів Na14-H12, F1T0-063 та Na10-B11 (0,72; 0,74 та 0,72 відповідно). Для інших SSR маркерів PIC становить від 0,57 до 0,63.

Колектив авторів [13] досліджували 25 гібридів ріпаку озимого за 11 SSR маркерами. Відповідно до отриманих результатів, найбільш поліморфним виявився маркер Na12-A02, за яким було ідентифіковано найбільшу кількість поліморфних алелів. Водночас, маркер F1T0-063 характеризувався мінімальною кількістю алелів у досліджуваних генотипів [13]. У дослідженнях [20], які використовували 39 SSR маркерів для аналізу генотипів роду *Brassica* L., показано, що отримані значення PIC варіювали в широкому діапазоні – від 0,17 (за маркером Ni4-D09) до 0,75 (за маркером Ra2-E07). За маркерами Na12-A02 та Na12-E02 PIC становили 0,50 і 0,52 відповідно. За даними [21], що вивчали 22 сорти та

55 селекційних ліній ріпаку за 56 SSR маркерами, визначено, що середнє значення PIC становило 0,51. Високі значення були відмічені для маркера Ra3-H09 – 0,85, тимчасом маркер Na12-E02 продемонстрував низький PIC 0,37. Отже, в наших дослідженнях, високі значення PIC, який в середньому становив 0,66, вказують на рівномірність розподілу ідентифікованих алелів за SSR маркерами у цій вибірці генотипів ріпаку озимого.

Для встановлення відмінності гібридів ріпаку озимого проводили кластерний аналіз за матрицею наявності/відсутності ідентифікованих алелів. Групування у кластери досліджених генотипів проводили за допомогою методу незваженого попарного середнього, в якому критерієм для встановлення ступеня близькості є середнє значення показників генетичної близькості між членами кластеру та кандидатом на включення до кластеру. Результати кластеризації представлено у вигляді філогенетичного дерева на рисунку 4.

У результаті кластеризації виділено п'ять кластерів, які сформовані із гібридів ріпаку озимого за 8 SSR маркерами. Відповідно до ступеня генетичної близькості досліджувані гібриди розподілились на дві групи кластерів. Найбільш близькими виявились гібриди з номерами 46 та 49. Значення генетичних дистанцій між ними становить 2,45. Високий ступінь подібності за дослідженими SSR маркерами показали гібриди 28 та 31. Генетичні дистанції між ними становлять 2,65. Найвіддаленішими гібридами, які увійшли в один кластер, виявились гібриди 1 та 4 з генетичними дистанціями 3,74. Загалом, значення генетичних дистанцій між досліджуваними гібридами варіювало від 2,45 до 5,83.

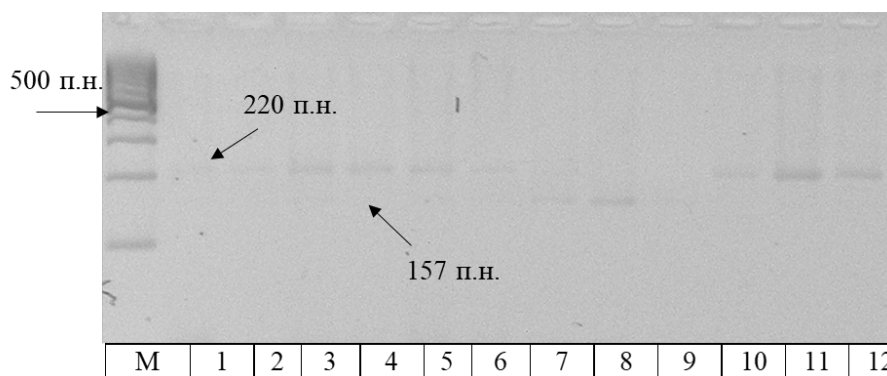


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР гібрида 37 та батьківських компонентів 38 і 39 ріпаку озимого за маркером Na10-B11: 1–2 – гібрид 37; 3–5 – батьківський компонент 38; 6–8 – батьківський компонент 39; М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O'GeneRuler (Thermo Scientific).



маркерами гібрид 4 виявився найбільш відмінним, тимчасом за кодами прояву морфологічних ознак він найбільш подібний до гібрида 13 та знаходиться з цим гібридом в одному кластері. Гібриди 43 та 16 за SSR маркерами хоча й не увійшли в один кластер, однак значення генетичних дистанцій між ними становить 4,00, тимчасом за кодами прояву морфологічних ознак ці гібриди є найбільш відмінними. Водночас, гібриди, які утворили один кластер за кодами прояву морфологічних ознак (28, 34 та 37) за SSR маркерами також є достатньо близькими із значеннями генетичних дистанцій 4,00–4,12. Гібрид 16, який за ідентифікованими алелями за SSR маркерами не належить до жодного із сформованих кластерів, а знаходиться в прилеглому до гібридів 10 та 13 кластері, за кодами прояву морфологічних однак не увійшов в жоден кластер.

Можливість застосування SSR маркерів розглянуто в роботі [22]. Автори використовували 15 SSR маркерів для визначення поліморфізму 10 сортів ріпаку. За результатами роботи показано, що отриманий рівень поліморфізму дозволяє застосовувати SSR маркери як допо-

міжний метод для встановлення відмінності та однорідності сортів, крім того дає можливість за даними аналізу підбирати сорти для включення в робочу колекцію загальновідомих сортів для оцінки в польових умовах. В роботі [7] показано можливість використання SSR маркерів із розрахунком генетичних дистанцій під час проведення тесту на ВОО та охарактеризовано декілька підходів для їх застосування.

За результатами досліджень гібридів ріпаку озимого, які представлені в роботі, за двома маркерними системами відмічено як подібний так і відмінний розподіл гібридів на кластери. Такий розподіл свідчить про можливість застосування маркерної системи з 8 SSR маркерів для встановлення їх відмінності та визначення найбільш подібних гібридів. Визначення ступеня гібридності, встановлення генетичної формули гібрида чи лінії за SSR маркерами може бути доцільним для використання як додаткового методу з метою визначення відмінності та ідентифікації гібридів та їх батьківських компонентів в процесі експертизи на відмінність, однорідність та стабільність, а також для підбору сортів робочої колекції загальновідомих сортів.

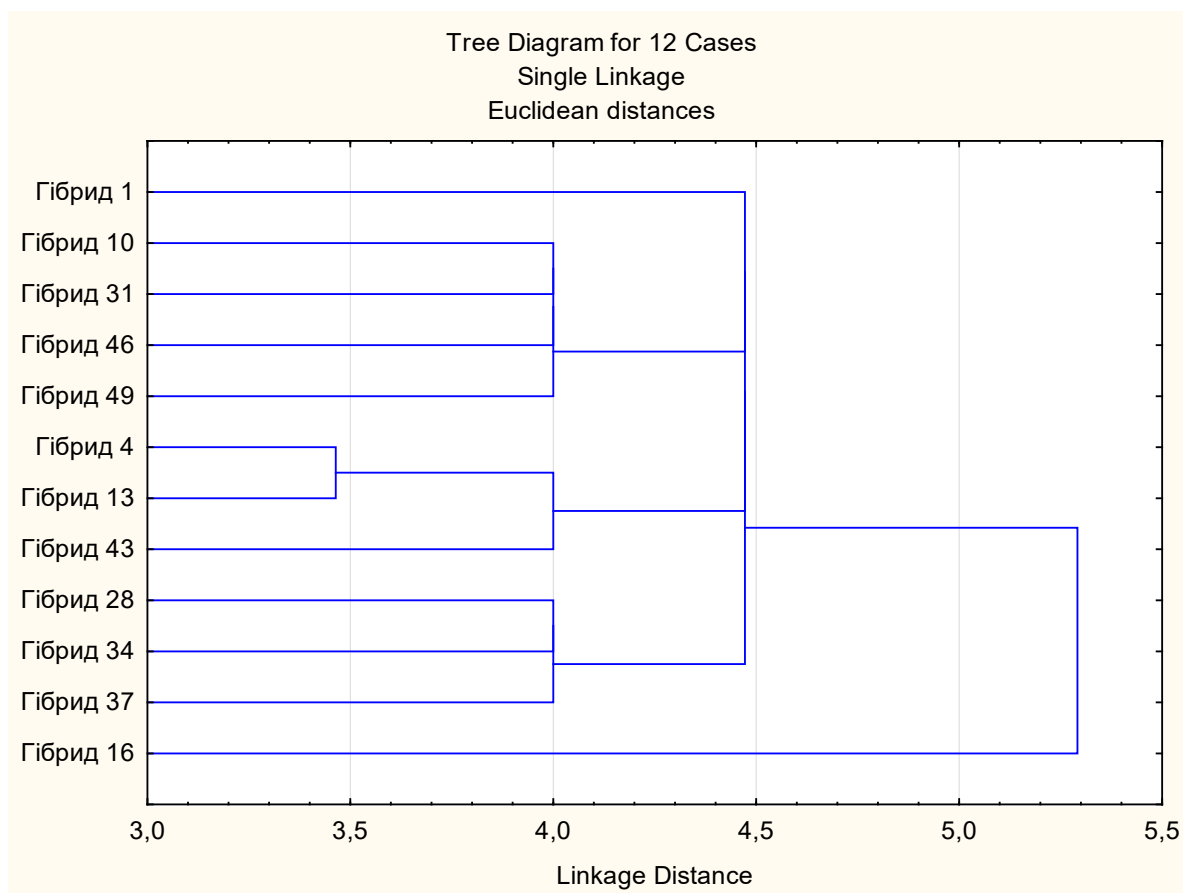


Рис. 5. Кластерний аналіз гібридів ріпаку озимого на основі кодів прояву морфологічних ознак.

**Висновки.** Визначено, що використання системи, яка складається з 8 SSR маркерів є ефективним для диференціації 12 гібридів і їх батьківських компонентів ріпаку озимого та дозволяє визначити найбільш відмінні й подібні генотипи. Встановлений поліморфізм гібридів та їх батьківських компонентів дозволяє отримати генетичні профілі досліджуваних гібридів ріпаку озимого, які можуть бути застосовані для визначення типовості гібридів, їх ідентифікації, визначення відмінності ліній та гібридів. Встановлено, що значення генетичних дистанцій отримані за SSR маркерами для гібридів та їх батьківських компонентів відрізняються від відповідного розподілу за кодами прояву морфологічних ознак. Отже, враховуючи різну диференціацію досліджуваних генотипів за ідентифікованими алелями за SSR маркерами та кодами прояву морфологічних ознак, SSR маркери можна застосовувати як додатковий інструмент визначення відмінності генотипів, якщо неможливо визначити чітку відмінність за морфологічними ознаками.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Влашук А.М., Дробіт О.С., Кляуз М.А. Удосконалення технології вирощування ріпаку озимого. Наукові здобутки селекціонерів ННЦ «Інститут землеробства НААН» – на благо майбутнього, присвячена 120-річчю від дня народження вченого, аграрія, селекціонера Данила Лихваря: матеріали тез міжнародної наукової Інтернет-конференції. Вінниця, 2022. С. 55–59.
2. Genetic divergence in *Brassica napus* L. germplasm as determined by quantitative attributes / M. Pyas et al. Pak. J. Bot. 2018. Vol. 50, No 3. P. 1039-1045.
3. Studies on genetic divergence of rapeseed genotypes using SSR markers / H. Qamar et al. Pak. J. Bot. 2020. Vol. 52, No 1. P. 197–204. DOI: 10.30848/PJB2020-1(23)
4. Genetic relationships among chickpea (*Cicer arietinum*) elite lines based on RAPD and agronomic markers / R. Talebi et al. Int. J. Agri. Bio. 2008. No 10. P. 301–305.
5. Genetic diversity and DNA fingerprinting in broccoli carrying multiple clubroot resistance genes based on SSR markers / Q. Xie et al. Applied Sciences. 2022. Vol. 12, No 9. P. 47–54. DOI: 10.3390/app12094754
6. Molecular characterization and genetic diversity analysis in Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern & Coss.) varieties using SSR markers / K.H. Singh et al. Plos one. 2022. Vol. 17, No 8. e0272914. 2016. Vol. 12. DOI: 10.1371/journal.pone.0272914
7. Jamali S.H., Cockram J., Hickey L.T. Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. Theoretical and Applied Genetics. 2019. Vol. 132. P. 1911–1929. DOI: 10.1007/s00122-019-03348-7
8. Genetic diversity analysis of Indian mustard (*Brassica* spp.) germplasm lines using SSR molecular markers / R. Baghel et al. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2020. Vol. 9, No 12. P. 137–143.
9. De novo design of future rapeseed crops: Challenges and opportunities / S. Liu et al. The Crop Journal. 2022. Vol. 10, No 3. P. 587-596. DOI: 10.1016/j.cj.2022.05.003
10. Neupane S., Regmi R. Evaluation of genetic diversity among Nepalese rapeseed germplasm accessions using SSR markers. Journal of Genetics, Genomics & Plant Breeding. 2020. Vol. 4, No 4. P. 171–179.
11. Genetic mapping and genomic prediction of sclerotinia stem rot resistance to rapeseed/canola (*Brassica napus* L.) at seedling stage / J. Roy et al. Theoretical and Applied Genetics. 2022. Vol. 135, No 6. P. 2167–2184. DOI: 10.1007/s00122-022-04104-0
12. Development of genome-wide SSR markers in rapeseed by next generation sequencing / J. Zhu et al. Gene. 2021. Vol. 798. P. 145–179. DOI: 10.1016/j.gene.2021.145798
13. Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of *Brassica napus* hybrids / L. Li et al. Journal of Agricultural Science. 2011. Vol. 101, No 3. DOI: 10.5539/jas.v3n3p101
14. Методика проведення експертизи сортів рослин групи олійних на відмінність, однорідність і стабільність. URL: [https://sops.gov.ua/uploads/page/Meth\\_DUS/Method\\_oil2020.pdf](https://sops.gov.ua/uploads/page/Meth_DUS/Method_oil2020.pdf)
15. Klyachenko O.L., Prsyazhniuk L.M., Shofolova N.V., Piskova O.V. Polymorphism in spring and winter rapeseed varieties (*Brassica napus* L.) identified by SSR markers. Plant Varieties Studying and Protection. 2018. Vol. 14, No 4. P. 366–374. DOI: 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151898
16. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. J Cytol. 2019. Vol. 36, No 2. P. 116–117. DOI: 10.4103/JOC.JOC\_110\_18
17. Методика проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні. Методи визначення показників якості продукції рослинництва / за ред. С.О. Ткачик. 2020. 158 с.
18. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е. ДНК-технології в реєстрації й охороні прав на сорти рослин. Plant varieties studying and protection. 2005. № 1. С. 66–74. DOI: 10.21498/2518-1017.1.2005.66849
19. Мельник А.В. Використання кластерного аналізу за підбору сортів і гібридів ріпаку ярого для вирощування в лівобережному Лісостепу України. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2013. № 4. С. 6–11.
20. Turi N.A., Farhatullah R.M., Shinwari Z.K. Genetic diversity in the locally collected *Brassica* species of Pakistan based on microsatellite markers. Pakistan Journal of Botany. 2012. Vol. 44, No 3. P. 1029–1035.
21. Channa S.A., Tian H., Wu H.Q., Hu S.W. Analysis of genetic diversity among Rapeseed cultivars and breeding lines by SRAP and SSR molecular markers. Pak. J. Bot. 2016. Vol. 48, No 6. P. 2409–2422.



22. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties / L. Tommasini et al. Theoretical and Applied Genetics. 2003. Vol. 106. P. 1091–1101. DOI: 10.1007/s00122-002-1125-8

### REFERENCES

1. Vlashchuk, A.M., Drobit, O.S., Kliuz, M.A. (2022). Udoskonalennia tekhnolohii vyroshchuvannia ripaku ozymoho [Improvement of winter rapeseed cultivation technology]. Naukovi zdobutky selektsioneriv NNTs «Instytut zemlerobstva NAAN» – na blaho maibutnoho, prysviachena 120-richchiu vid dnia narodzhennia vchenoho, ahra-riia, selektsionera Danyla Lykhvaria [Scientific achievements of breeders of the NSC "Institute of Agriculture of the National Academy of Sciences" - for the future, dedicated to the 120th anniversary of the birth of the scientist, agriculturist, breeder Danylo Lykhvar. In Proceedings of the International Scientific Internet Conference]. pp. 55-59.

2. Ilyas, M., Shabbir, G., Rabbani, M.A., Malik, S.I., Cheema N.M., Ansar, M., Jan, S.A. (2018). Genetic divergence in *Brassica napus* L. germplasm as determined by quantitative attributes. Pak. J. Bot. Vol. 50, no. 3, pp. 1039-1045.

3. Qamar, H., Shabbir, G., Ilyas, M., Arshad, A., Imran, S., Malik, T., Mustafa, H.S.B. (2020). Studies on genetic divergence of rapeseed genotypes using SSR markers. Pak. J. Bot. Vol. 52, no. 1, pp. 197-204. DOI: 10.30848/PJB2020-1(23)

4. Talebi, R., Fayaz, F., Mardi, M., Pirsyedi, S.M., Naji, A.M. (2008). Genetic relationships among chickpea (*Cicer arietinum*) elite lines based on RAPD and agronomic markers. Int. J. Agri. Bio. no. 10, pp. 301-305.

5. Xie, Q., Zhao, Y., Liu, Y., Han, F., Liu, W., Li, Z. (2022). Genetic diversity and DNA fingerprinting in broccoli carrying multiple clubroot resistance genes based on SSR markers. Applied Sciences. Vol. 12, no. 9, pp. 47–54. DOI: 10.3390/app12094754

6. Singh, K.H., Singh, L., Parmar, N., Kumar, S., Nanjundan, J., Singh, G., Thakur, A.K. (2022). Molecular characterization and genetic diversity analysis in Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern & Coss.) varieties using SSR markers. Plos one. Vol. 17, no. 8, e0272914. DOI: 10.1371/journal.pone.0272914

7. Jamali, S.H., Cockram, J., Hickey, L.T. (2019). Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. Theoretical and Applied Genetics. Vol. 132, pp. 1911-1929. DOI: 10.1007/s00122-019-03348-7

8. Baghel, R., Sharma, A.K., Tiwari, S., Tripathi, M.K., Tripathi, N. (2020). Genetic diversity analysis of Indian mustard (*Brassica* spp.) germplasm lines using SSR molecular markers. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. Vol. 9, no. 12, pp. 137-143.

9. Liu, S., Raman, H., Xiang, Y., Zhao, C., Huang, J., Zhang, Y. (2022). De novo design of future rapeseed crops: Challenges and opportunities. The Crop Journal. Vol. 10, no. 3, pp. 587-596. DOI: 10.1016/j.cj.2022.05.003

10. Neupane, S., Regmi, R. (2020). Evaluation of genetic diversity among Nepalese rapeseed germplasm accessions using SSR markers. Journal of Genetics, Genomics & Plant Breeding. Vol. 4, no. 4, pp. 171-179.

11. Roy, J., del Río Mendoza, L.E., Bandillo, N., McClean, P.E., Rahman, M. (2022). Genetic mapping and genomic prediction of sclerotinia stem rot resistance to rapeseed/canola (*Brassica napus* L.) at seedling stage. Theoretical and Applied Genetics. Vol. 135, no. 6, pp. 2167-2184. DOI: 10.1007/s00122-022-04104-0

12. Zhu, J., Zhang, J., Jiang, M., Wang, W., Jiang, J., Li, Y., Zhou, X. (2021). Development of genome-wide SSR markers in rapeseed by next generation sequencing. Gene. Vol. 798, pp.145–798. DOI: 10.1016/j.gene.2021.145798

13. Li, L., Wanapu, C., Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y., Huang, G. (2011). Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of *Brassica napus* hybrids. Journal of Agricultural Science. Vol. 101, no. 3. DOI: 10.5539/jas.v3n3p101

14. Metodyka provedennia ekspertyzy sortiv roslyn hrupy oliinykh na vidminnist, odnoridnist i stabilnist [Methodology of examination of plant varieties of the oleaginous group for distinction, homogeneity and stability]. Available at: [https://sops.gov.ua/uploads/page/Meth\\_DUS/Method\\_oil2020.pdf](https://sops.gov.ua/uploads/page/Meth_DUS/Method_oil2020.pdf).

15. Klyachenko, O.L., Prysiazhniuk, L.M., Shofolova, N.V., Piskova, O.V. (2018). Polymorphism in spring and winter rapeseed varieties (*Brassica napus* L.) identified by SSR markers. Plant Varieties Studying and Protection. Vol. 14, no. (4), pp. 366-374. DOI: 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151898

16. Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. J Cytol. Vol. 36, no. 2, pp. 116-117. DOI: 10.4103/JOC.JOC\_110\_18.

17. Tkachyk, S.O. (2020). Metodyka provedennia kvalifikatsiinoi ekspertyzy sortiv roslyn na prydatnist do poshyrennia v Ukraini. Metody vyznachennia pokaznykiv yakosti produktsii roslynnytstva [The method of conducting a qualification examination of plant varieties for suitability for distribution in Ukraine. Methods of determining plant production quality indicators]. 158 p.

18. Syvolap, Ju.M., Kozhuhova, N.E. (2005). DNK-tehnologii' v rejestracii' j ohoroni prav na sorty roslyn [DNA technologies in registration and protection of rights to plant varieties]. Plant varieties studying and protection. no. 1, pp. 66–74. DOI: 10.21498/2518-1017.1.2005.66849

19. Melnyk, A.V. (2013). Vykorystannia klaster-noho analizu za pidboru sortiv i hibrydiv ripaku yaro-ho dlia vyroshchuvannia v livoberezhnomu Lisostepu Ukrainy [The use of cluster analysis for the selection of varieties and hybrids of spring rape for cultivation in the left-bank forest-steppe of Ukraine]. Visnyk Poltavskoi derzhavnoi ahrarynoi akademii [Bulletin of the Poltava State Agrarian Academy]. no. 4, pp. 6-11.

20. Turi, N.A., Farhatullah, R.M., Shinwari, Z.K. (2012). Genetic diversity in the locally collected *Brassica* species of Pakistan based on microsatellite markers. Pakistan Journal of Botany. Vol. 44, no. 3, pp. 1029-1035.

21. Channa, S.A., Tian, H., Wu, H.Q., Hu, S.W. (2016). Analysis of genetic diversity among Rapeseed cultivars and breeding lines by SRAP and SSR molecular markers. Pak. J. Bot. Vol. 48, no. 6, pp. 2409-2422.

22. Tommasini, L., Batley, J., Arnold, G., Cooke, R., Donini, P., Lee, D., Edwards, K. (2003). The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. Theoretical and Applied Genetics. Vol. 106, pp. 1091-1101. DOI: 10.1007/s00122-002-1125-8

#### **Determination of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) polymorphism based on SSR markers and morphological characters**

**Piskova O., Kostenko A., Shliakhtun I., Dikhtiar I., Ilchenko Y., Prisyazhniuk L.**

The study presents the results of the genetic diversity estimation of winter rapeseed by molecular genetic analysis and the determination of polymorphism with morphological traits.

The study aims to determine winter rapeseed hybrids polymorphism by SSR markers and the marker morphological characteristics.

Twelve winter rapeseed hybrids which were examined within DUS testing and their 24 hereditary components were studied in 2021–2022. The study of rapeseed genotypes genetic diversity was carried out in 2021. It was determined that the majority of studied

hybrids and their hereditary components by studied SSR markers are characterized with alleles of the same sizes and are homozygotic by these markers. Besides, it was found that the presence of only one allele was identified in hereditary components which was found in hybrids. This distribution allows to check the hybrid formula and to identify them. It was determined that the most polymorphic marker was Na12-A02, PIC is 0.77. The lowest value of PIC was obtained for Na12-E02 marker (0.47). On the average, for studied markers PIC is 0.66 which indicates the evenness of identified alleles distribution by SSR markers among studied winter rapeseed genotypes.

As results of cluster analysis, we obtained five clusters of the studied hybrids by 8 SSR markers. The hybrids with genetic distances of 2.45 were the most similar hybrids. It was found that the hybrids with genetic distances of 5.83 and 5.74 were the most distinct. Three clusters were obtained as results of the cluster analysis based on morphological traits. It was determined that the most similar hybrids were the ones with genetic distances of 3.46. It was found that the most distinct hybrids had the genetic distances of 5.299.38. Thus, taking into account the various distribution of the studied genotypes by the SSR markers and morphological characteristics, SSR markers can be used as additional tool for the distinctness determination.

**Key words:** genetic distances, winter rapeseed, allele frequencies, PIC, genetic diversity, SSR markers.



Copyright: Піскова О.В. та ін. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:

Піскова О.В.

Костенко А.В.

Шляхтун І.С.

Діхтяр І.О.

Ільченко Я.В.

Присяжнюк Л.М.

<https://orcid.org/0000-0003-3650-2101>

<https://orcid.org/0000-0003-0515-4730>

<https://orcid.org/0000-0003-4338-8474>

<https://orcid.org/0000-0001-7736-6121>

<https://orcid.org/0000-0002-9135-3842>

<https://orcid.org/0000-0003-4388-0485>