

favorable. 2012, 2009 and 2013 were arid years, and 2013, with the lowest yield of 2.66 t/ha, was the most unfavorable for barley.

Variance analysis showed no significant differences in the average yield between varieties, but post hoc comparison revealed such differences. Pairwise comparison of yields demonstrated that the yield capacity of varieties Kangoo (3.77 t/ha) and Vakula (3.79 t/ha) was considerably lower than that of Alegro (4.89 t/ha) and Parnas (4.90 t/ha).

There were significant differences in 1000-grain weight both between varieties and between years. We identified varieties with the largest grains (Alegro [49.7 g], Etyket [49.8 g]) and with the smallest ones (Sebastian, Pasadena). In 2014, all the varieties had significantly higher 1000-grain weights than in other years, and in 2010 – significantly lower.

There was a weak significant positive correlation ( $r = 0.273$ ) between the yield capacity and 1000-grain weight. A moderate linear relationship is only specific for Alegro ( $r = 0.773$ ) and Modern ( $r = 0.662$ ). This is attributed to the fact that Alegro has very large grain, which could not but affect the yield level, and Modern is characterized by low productive tilling capacity, therefore, the yield is formed to a large extent due to 1000-grain weight.

**Conclusions.** Thus, it was established that the yield capacity and 1000-grain weight largely depended on cultivation conditions. At the same time, there is a weak correlation between the studied parameters, and it depends on varietal features. Most varieties do not have significant correlations, indicating that generally 1000-grain weight is not a determinant of yield for a given barley cultivation zone. This is confirmed by a weak positive regression between the studied parameters ( $b = 0.273$ ,  $p = 0.0002$  with significance level  $p < 0.05$ ).

*Keywords:* spring barley, yield capacity, 1000-grain weight, correlation, regression

УДК 633.853.494:575:632.52.577.1

## **ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ОРИГІНАЛЬНОЇ СТЕРИЛЬНОЇ ФОРМИ РІПАКУ ОЗИМОГО ЗА ДОПОМОГОЮ ISSR-МАРКЕРІВ**

Глухова Н. А., Акініна Г. Є., Шарипіна Я. Ю., Лютенко В. С.  
Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН, Україна

У статті висвітлено результати вивчення оригінальної стерильної форми ріпака озимого селекції Інститута рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. Проведено ПЛР-аналіз за ISSR маркерами. Доведено генетичну відмінність стерильності оригінальної форми від стерильності *Ogura* та *Polima*.

**Ключові слова:** ріпак озимий, стерильна форма, праймер, ISSR-маркер, генетична відстань, індекс Шенона, бутстреп-аналіз

**Вступ.** ISSR-маркери є універсальними маркерними системами, що можуть бути використані для оцінки різноманіття різних видів рослин. Це робить їх дуже привабливими для диференціації генетичних колекцій та паспортизації зразків. При збільшенні виробництва гібридів потрібен контроль генетичного різноманіття вихідного матеріалу для ефективного підбору батьківських пар, тестування однорідних комерційних партій насіння та ідентифікації селекційного матеріалу з метою захисту авторських прав селекціонерів.

**Аналіз літературних джерел, постановка проблеми.** Селекція ріпаку на гетерозис порівняно з соняшником і кукурудзою є достатньо новим напрямом, який останнього часу набуває актуальності. В зв'язку з цим постає проблема створення вихідного матеріалу з

новими ознаками та властивостями. Від ступеня різноманітності такого матеріалу, його генетичного вивчення залежить успіх селекційної роботи. У цьому сенсі можуть застосовуватись молекулярні маркери як для ідентифікації та реєстрації генетичних ресурсів рослин, створення каталогів формул і баз даних, виявлення помилок у визначенні зразків колекції, пошуку дублетних зразків при формуванні стрижневих колекцій, так і для контролю стабільності форм при створенні колекцій *in vitro* [1].

На даний час у світі створено сім типів стерильності ріпаку *Ogura*, *Polima*, *MSL*, *Nap*, *Tour*, *Nig*, *Lyr* [2], що різняться за способами свого створення [3–18]. Але найбільшого розповсюдження набули *Ogura* та *Polima* [17].

Співробітниками Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (м. Харків, Україна) та Інституту фізіології та генетики рослин (м. Київ, Україна) в результаті хімічного мутагенезу було створено оригінальну стерильну форму [19].

Перед нами стала задача довести генетичну відмінність стерильності оригінальної форми від широко розповсюджених типів стерильності.

**Мета і задачі досліджень.** Виявити генетичну відмінність потомств оригінальної стерильної форми ріпаку озимого селекції IP ім. В. Я. Юр'єва від зразків, створених на основі типів стерильності *Ogura* та *Polima* методом мікросателітного аналізу.

**Матеріал і методика.** Дослідження проводили протягом 2014–2016 років в Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. Проведено ПЛР-аналіз за ISSR-маркерами. Було досліджено сім зразків: Inga, тип стерильності *Ogura*, отриманий з INRA, Франція; *Polima*, отриманий з ВІР, Росія; MON, стерильна форма, отримана з гібриду *Aliaska* Канада; Бекр (1) Д 2, Бекр (1) Д 21, Бекр (1) Д 16/2 – потомства оригінальної стерильної форми; зразок Д 8, ідентифікований у посіві ріпаку за вільного переzapилення селекційного матеріалу.

Оцінку поліморфізму та класифікацію зразків ріпаку за ISSR-локусами здійснювали за допомогою п'яти праймерів, розроблених в University of British Columbia (UBC) [20] (табл. 1). Використовували динуклеотидні праймери, які за літературними даними виявляли найбільший поліморфізм.

Таблиця 1

**Характеристика праймерів для визначення ISSR-локусів**

Праймер	Послідовність праймера	Температура відпалу (Т <sub>a</sub> ), °С
UBC 810	(GA) <sub>8</sub> T	54
UBC 834	(AG) <sub>8</sub> YT	54
UBC 847	(CA) <sub>8</sub> RC	52
UBC 842	(AG) <sub>8</sub> YG	57
UBC 857	(AC) <sub>8</sub> YG	55

ДНК виділяли із сегментів листя кожного зразка ріпаку СТАВ-методом [21].

Поліморфізм ISSR-локусів вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Ампліфікацію ДНК проводили в пробірках з ліофілізованим набором реактивів для ПЛР (GenePak PCR core, «Ізоген», Росія) в ампліфікаторі «Терцик» (Росія). Кінцевий об'єм реакційної суміші склав 20 мкл і містив 20 нг ДНК та 1 мкМ кожного праймера.

Ампліфікацію ISSR-локусів здійснювали за такою програмою: початкова денатурація – 4 хв при 94 °С, наступні 40 циклів з такими параметрами: денатурація – 30 с при 94 °С, гібридизація праймера – 45 с при T<sub>m</sub> °С (табл. 1), елонгація – 45 с при 72 °С, кінцева елонгація – 45 с при 72 °С. Розділення продуктів ампліфікації проводили в 1,5 % агарозному гелі з бромистим етидієм та 5 мМ натрій-боратному буфері з низькою іонною силою при 100 В протягом 3,5 години.

Електрофорез продуктів ампліфікації, отриманих з використанням ISSR маркерів проводили в горизонтальному приладі Hoefer SuperSub100 (США). Використовували мар-

кери молекулярної ваги 1 Kb («СибЭнзим», Росія). Отримані гелі документували за допомогою фотосистеми Nikon D50.

Визначення кількості і розмірів продуктів ампліфікації проводили за допомогою демо-версії програми Totallab100 [22].

Частоти алелів локусів, що були ідентифіковані в зразках ріпаку за допомогою ISSR-маркерів, розраховували в програмі Excel за формулами (1, 2):

$$q_a = \sqrt{N_{aa}/N} \quad (1)$$

$$p_A = 1 - q_a \quad (2),$$

де  $p_A$  – частота домінантного алеля, продукт ампліфікації присутній;  $q_a$  – частота алеля, продукт ампліфікації відсутній;  $N_{aa}$  – кількість генотипів  $aa$ ;  $N$  – загальний обсяг вибірки.

Дані профілів ампліфікації, отримані з використанням ISSR-маркерів, також оцінювали з використанням техніки фінгерпринтинга за допомогою інформативних параметрів, таких як індекс інформативності праймера (PIC).

Значення кожного з праймерів оцінювали за формулою (PIC) (3):

$$PIC = 1 - (p_A^2 + q_a^2) - 2 * p_A^2 * q_a^2 \quad (3),$$

де \* - знак множення;  $p_A$  – частота домінантного алеля, продукт ампліфікації присутній;  $q_a$  – частота алеля, продукт ампліфікації відсутній.

За класифікацією Botsteinetal [23] до високоінформативних праймерів віднесено ті, у яких  $PIC \geq 0,5$ , до середнінформативних – які мають значення PIC у інтервалі від 0,50 до 0,25, до низькоінформативних  $PIC \leq 0,25$ .

Для визначення різноманіття морфологічних ознак у зразках ріпаку використовували абсолютне та нормоване значення індексу Шеннона, які розраховували в програмі Excel за формулами (4, 5, 6):

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \ln p_i) \quad (4),$$

де  $S$  – кількість категорій (проявів ознаки, алелів локусу);  $p_i$  – частота прояву ознаки.

$$H_{norm} = \frac{H'}{H_{max}} \quad (5),$$

де  $H'$  – індекс Шеннона розрахунковий;  $H_{max}$  – максимальний індекс Шеннона.

$$H_{max} = - \sum_{i=1}^S \frac{1}{S} \ln \frac{1}{S} = \ln S \quad (6),$$

де  $S$  - кількість усіх категорій (проявів ознаки, алелів локусу) локусу в загальній вибірці вивчених зразків ріпаку.

Поліморфізм ISSR-маркерів у зразках ріпаку оцінювали за допомогою індексу генетичного різноманіття  $Ne_i$  ( $H_e$ ) (або теоретичною гетерозиготністю) [24], який розраховували за формулою (7):

$$H_e = 1 - \sum p_i^2 \quad (7),$$

де  $p_i$  - частота алеля в окремій популяції.

Індекс різноманіття  $Nei$  для ISSR-маркерів розраховували в програмі Excel за допомогою майстра формул.

Для порівняння рівня різноманіття морфологічних ознак з поліморфізмом ДНК-маркерів, для ISSR-маркерів також визначали індекс Шеннона. Найчастіше індекс Шеннона використовується для оцінювання поліморфізму морфологічних ознак рослин. Однак встановлено кореляцію індексу Шеннона з показниками генетичного різноманіття [25, 26].

Для оцінювання дивергенції між зразками за ISSR-маркерами у програмі PHYLIP [27] розраховували генетичні відстані  $Nei$  та  $Li$  за формулою (8):

$$D_{ij} = 1 - S_{ij} = \frac{2a}{2a+b+c} \quad (8),$$

де  $a$  – кількість спільних градацій ознаки у двох об'єктів, що (тип 1,1);  $b$  – кількість однієї градації, що є характерною лише для першого об'єкта (тип 1,0);  $c$  – кількість однієї градації, що є характерною лише для другого об'єкта (тип 0,1).

На основі матриць відстаней між окремими зразками будували дендрограми методом найближчих сусідів [28] у програмі PHYLIP. Статистичну значущість утворення кластерів у дендрограмах здійснювали за допомогою бутстреп-аналізу шляхом створення 100 випадкових вибірок. Статистично значущими вважали вузли дендрограм, бутстреп-значення в яких були вищими за 70 %.

**Обговорення результатів.** У результаті ампліфікації в досліджених зразках ріпаку за допомогою п'яти ISSR праймерів було ідентифіковано 49 фрагментів ДНК, 31 з яких були поліморфними. Кількість продуктів ампліфікації варіювала від п'яти до 14 фрагментів, у середньому 9,8 на один використаний праймер.

Максимальну кількість локусів ідентифіковано з використанням праймерів UBC810 і UBC 834, вона становила 14. Мінімальну кількість продуктів ампліфікації було ідентифіковано з використанням праймерів UBC 857 (п'ять локусів) та UBC 842 (сім локусів) (табл. 2).

Таблиця 2

Праймер	5' – 3' – послідовність	Різнманіття ISSR – локусів у зразках ріпаку		Полімор- фізм, %	Розмір локусів, пн
		Кількість локусів,шт			
		загальна кількість, шт	Поліморфні, шт		
UBC810	(GA) <sub>8</sub> T	14	7	50,0	1144-384
UBC834	(AG) <sub>8</sub> YT	14	9	64,3	1125-331
UBC842	(GAG)AYG	7	4	57,1	1127-389
UBC847	(CA) <sub>8</sub> RC	9	7	77,8	1576-380
UBC857	(AC) <sub>8</sub> YG	5	4	80,0	791-386
<b>Всього</b>		<b>49</b>	<b>31</b>	<b>63,3</b>	<b>1576-331</b>

Y = pYrimidine (C, T); R = puRine (A, G).

Рівень поліморфізму за різними маркерами варіював від 50,0 до 80 %, а за комплексом п'яти маркерів (UBC810, UBC834, UBC842, UBC847, UBC857) показник поліморфізму склав 63,3 %. Розміри виявлених локусів, які було розраховано відносно маркера молекулярної ваги 1 kb, варіювали від 331 до 1576 пн (табл. 2). Подібний діапазон розмірів продуктів ампліфікації з використанням цих UBC праймерів описано для інших культур [29,30].

Для локусів, отриманих ампліфікацією з праймерами UBC810, UBC834, UBC842, UBC847, UBC857 було розраховано алельні частоти. Локуси, ідентифіковані для даної ви-

бірки з частотою 0,07, є характерними лише для одного генотипу і дозволяють однозначно його ідентифікувати.

Ампліфікацією п'яти ISSR праймерів було виділено 12 алельних варіантів (UBC810 (587 п.н.), UBC834 (988, 774, 709 п.н), UBC842 (1127, 475 п.н.), UBC847 (1349, 969, 496 п.н.), UBC857 (791, 520, 446 п.н.). Так, характерними для зразків були:

MON:UBC834 (774, 709 п.н.), UBC847 (969 п.н.), UBC857 (520, 446 п.н.);

Inra(Ogura):UBC810 (587 п.н.), UBC847 (496 п.н.);

Бекр (1)Д2: UBC834 (988 п.н.);

Бекр (1)Д2: UBC842 (475 п.н.);

Бекр (1)Д16/2: UBC847 (1349 п.н.);

Д8: UBC842 (1127 п.н.), UBC857 (791 п.н.).

Зразок Polima не мав жодного з маркерних локусів. Отримані дані дозволяють стверджувати, що серед розглянутої вибірки зразків дуплетні генотипи відсутні.

Рівень різноманіття ISSR-маркерів у зразках ріпаку було оцінено за трьома критеріями: індексом різноманіття Nei (Ne) та абсолютним і нормованим значеннями індексу Шеннона (H' та H'norm) (табл 3). Розрахований коефіцієнт кореляції між індексом Nei, абсолютним та нормованим значеннями індексу Шеннона для ISSR-маркерів склав 0,99.

За абсолютним та нормованим значеннями індексу Шеннона найбільш поліморфним ISSR маркером виявився UBC 810 (H' = 0,495, H'norm = 0,715) (табл. 3). Саме для цього маркера ідентифіковано найбільшу кількість ДНК-фрагментів. Найменший рівень поліморфізму показав ISSR маркер UBC 857 (H' = 0,364, H'norm = 0,525).

Таблиця 3

**Індекси генетичного різноманіття, розраховані за поліморфізмом  
ISSR-локусів у ріпаку**

Локус	Ne	PIC	Індекс Шеннона:	
			H'	Hnorm
1	2	3	4	5
810.1	0,369	0,301	0,556	0,802
810.2	0,262	0,227	0,431	0,622
810.3	0,470	0,360	0,663	0,957
810.4	0,262	0,227	0,431	0,622
810.5	0,498	0,374	0,691	0,997
810.6	0,000	0,000	-	-
810.7	0,262	0,227	0,431	0,622
810.8	0,000	0,000	-	-
810.9	0,137	0,128	0,264	0,381
810.10	0,000	0,000	-	-
810.11	0,000	0,000	-	-
810.12	0,000	0,000	-	-
810.13	0,000	0,000	-	-
810.14	0,000	0,000	-	-
<b>Середнє за UBC 810</b>	<b>0,161</b>	<b>0,132</b>	<b>0,495</b>	<b>0,715</b>
834.1	0,000	0,000	-	-
834.2	0,137	0,128	0,264	0,381
834.3	0,470	0,360	0,663	0,957
834.4	0,452	0,350	0,645	0,930
834.5	0,137	0,128	0,264	0,381
834.6	0,262	0,227	0,431	0,622
834.7	0,137	0,128	0,264	0,381
834.8	0,000	0,000	-	-
834.9	0,262	0,227	0,431	0,622

1	2	4	5	6
834.10	0,000	0,000	-	-
834.11	0,452	0,350	0,645	0,930
834.12	0,369	0,301	0,556	0,802
834.13	0,000	0,000	-	-
834.14	0,000	0,000	-	-
<b>Середнє за UBC 834</b>	<b>0,191</b>	<b>0,157</b>	<b>0,463</b>	<b>0,667</b>
842.1	0,137	0,128	0,264	0,381
842.2	0,369	0,301	0,556	0,802
842.3	0,000	0,000	-	-
842.4	0,498	0,374	0,691	0,997
842.5	0,137	0,128	0,264	0,381
842.6	0,000	0,000	-	-
842.7	0,000	0,000	-	-
<b>Середнє за UBC 842</b>	<b>0,163</b>	<b>0,133</b>	<b>0,444</b>	<b>0,640</b>
847.1	0,000	0,000	-	-
847.2	0,137	0,128	0,264	0,381
847.3	0,452	0,350	0,645	0,930
847.4	0,262	0,227	0,431	0,622
847.5	0,137	0,128	0,264	0,381
847.6	0,000	0,000	-	-
847.7	0,262	0,227	0,431	0,622
847.8	0,137	0,128	0,264	0,381
847.9	0,452	0,350	0,645	0,930
<b>Середнє за UBC 847</b>	<b>0,204</b>	<b>0,171</b>	<b>0,421</b>	<b>0,607</b>
857.1	0,137	0,128	0,264	0,381
857.2	0,000	0,000	-	-
857.3	0,137	0,128	0,264	0,381
857.4	0,137	0,128	0,264	0,381
857.5	0,470	0,360	0,663	0,957
<b>Середнє за UBC 857</b>	<b>0,176</b>	<b>0,149</b>	<b>0,364</b>	<b>0,525</b>
<b>Середнє за п'ятьма праймерами</b>	<b>0,180</b>	<b>0,148</b>	<b>0,445</b>	<b>0,642</b>

Примітка: Індекс Шеннона макс. =  $H_{max} = \ln 2 = 0,693$

Для ріпаку не визначено специфічності прояву ISSR-маркерів з динуклеотидними якорями та однонуклеотидними якорями. Загальний рівень мінливості ISSR-маркерів у досліджених зразках ріпаку склав  $H' = 0,445$ , а за  $H'_{norm} = 0,642$ .

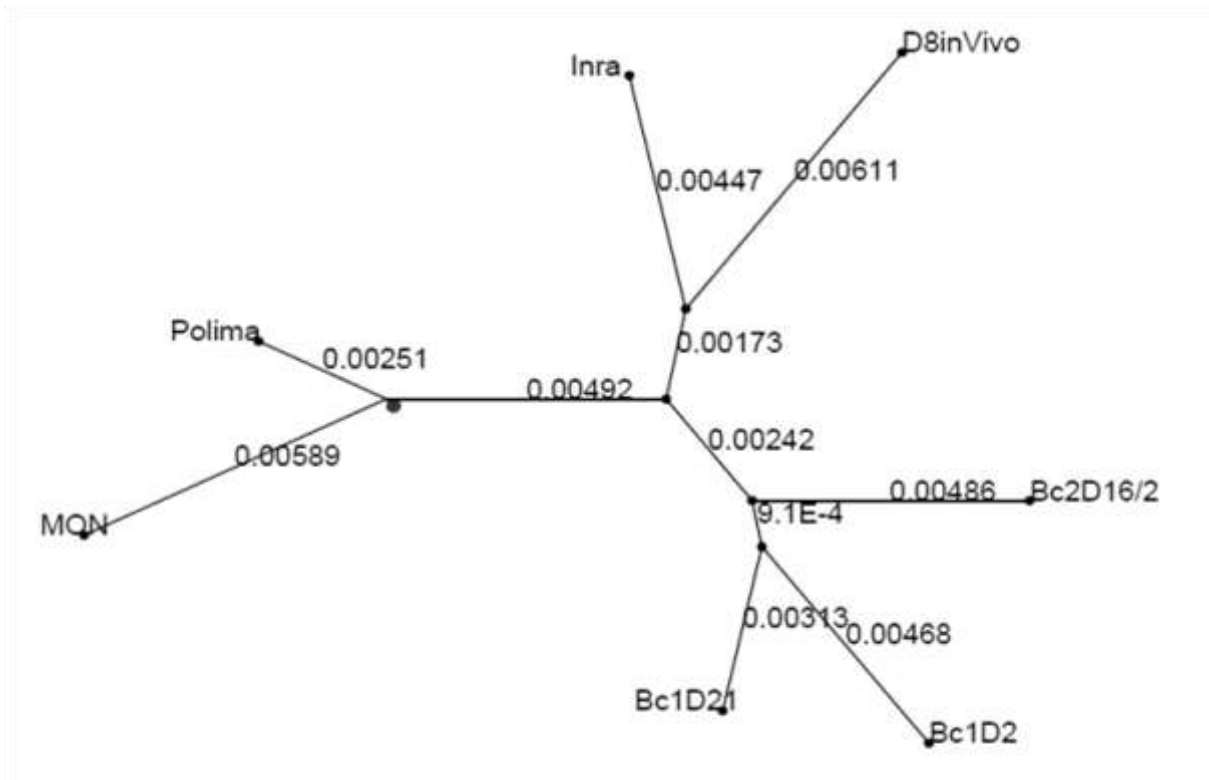
Для визначення дивергенції між зразками ріпаку розраховували генетичні відстані  $Nei$  та  $Li$ , на основі яких створювали дендрограму методом приєднання найближчого сусіда (рис. 1). Значення генетичних відстаней вказано на гілках дендрограми.

В отриманій дендрограмі виділено три протилежних кластери зразків ріпаку. До першого кластеру ввійшли зразки Бекр (1) Д 21, Бекр (1) Д 2, Бекр (2) Д 16/2, до другого – зразки Polima і MON, до третього – Inra і Д8 (in vivo) (рис. 1).

Зразки Бекр (1) Д 21, Бекр (1) Д2, Бекр (2) Д16/2, створені в Інституті рослинництва, мають одне коріння – походять зі стерильної рослини, ідентифікованої у 2009 році (результат обробки мутагеном ДАБ в концентрації 0,1 %).

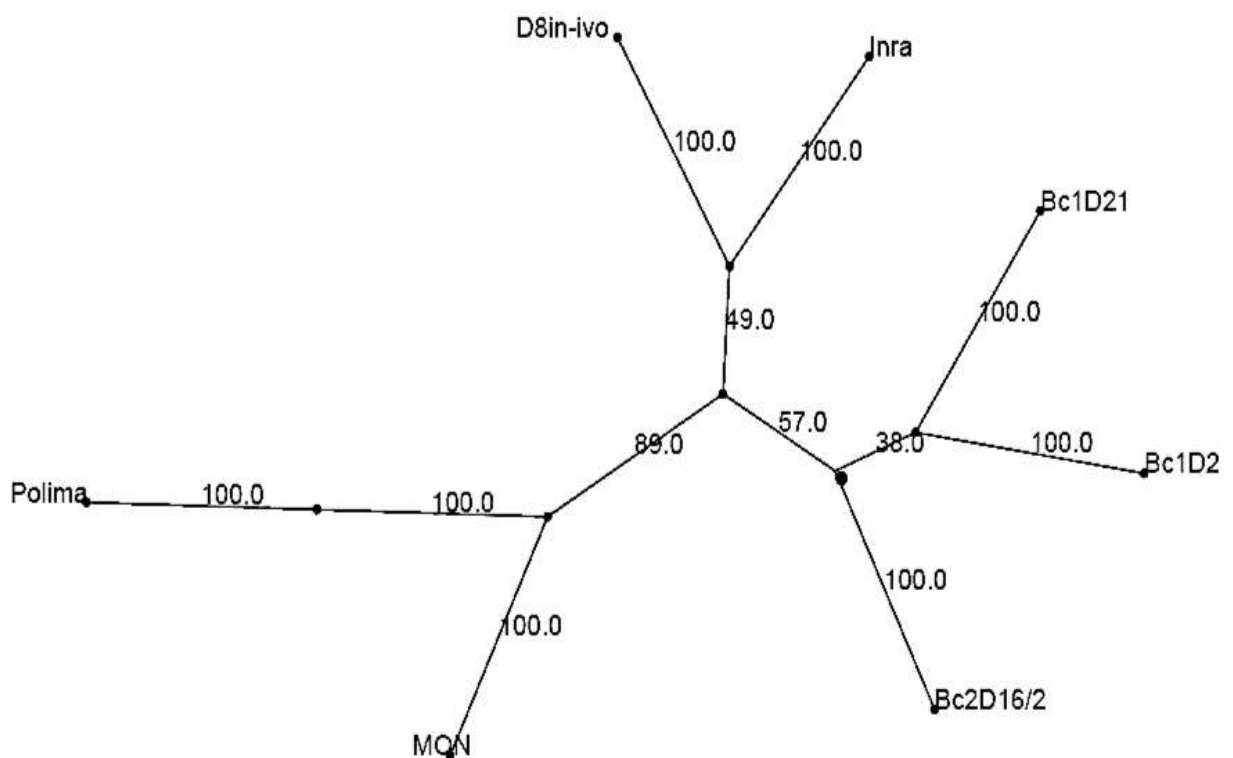
Зразок Д8 походить з однієї зі стерильних рослин, отриманої у 2012 році, з М5 (блок безерукових форм), де було виділено чотири стерильні форми, які відрізнялися формою, розміром квіток та пелюсток, ступенем розвиненості та формою пиляків і не мали відомих аналогів.

Той факт, що зразок Д8 опинився у одному кластері зі зразком, отриманим з Inra, говорить про їх генетичну схожість. Вивчення даного зразка продовжується.



**Рис. 1.** Дивергенція зразків ріпаку за поліморфізмом ISSR-локусів

В узгодженій дендрограмі (рис. 2), отриманій у результаті бутстреп-аналізу, збереглися особливості групування, наведені у вихідній дендрограмі. Бутстреп-значення варіювали в різних вузлах бутстреп-дендрограми від 38 до 100 %.



**Рис. 2.** Узгоджена дендрограма, що відображає дивергенцію зразків ріпаку за поліморфізмом ISSR-локусів

**Висновки.** За ISSR-маркерами виявлено високий діапазон внутрішньовидової мінливості в досліджених зразках ріпаку.

Виявлено спільні закономірності групування зразків ріпаку при їх класифікації, яку було виконано за допомогою приєднання найближчих сусідів (NJ) кластерним аналізом.

Дослідженнями доведено, що потомства оригінальної стерильної форми мають одне коріння і мають значну генетичну відмінність від зразків зі стерильністю *Ogura* та *Polima*.

### Список використаних джерел

1. Сатина Т. Г., Анискина Ю. В. Паспортизация сортов рапса с использованием микросателлитного анализа. Материалы VI международной конференции молодых ученых и специалистов. ВНИИМК. 2011. С. 266-269.
2. Banga S. S., Banga S. K. Hybrid cultivar development (ed. vol.). Co-publication: Springer Verlag-Berlin, Narosa Publishing House, New Delhi-London, 1998. P. 401-430.
3. Hiroshi Yamagishi, Shripad R. Bhat Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops. Breed Science. 2014. № 64(1). P. 38–47.
4. Ogura H. Studies on the new male-sterility in japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University. Kagoshima, Japan, Feb. 1968. Vol. VI, № 2. P. 39-78.
5. Thompson K. F. Cytoplasmic Male-sterility in oil-seed rape. Heredity. 1972. № 29. P. 253–257. DOI:10.1038/sj.hdy.6800815.
6. Stiewe G. et al. Establishing Cytoplasmic male sterility in brassica napus by mitochondrial recombination with *B. tournefortii*. Plant Breeding. 1994. № 113. P. 294-304. DOI: 0.1111/pbr.12412.
7. Janeja H. S. et al. Alloplasmic male sterile *Brassica napus* with *Enarthrocarpus lyratus* cytoplasm: introgression and molecular mapping of an *E. lyratus* chromosome segment carrying a fertility restoring gene. Genome. 2003. №46(5). P. 792-797.
8. Gundimeda H. R., Prakash Shyam, Shivanna K. R. Intergeneric hybrids between *Enarthrocarpus lyratus*, a wild species, and crop brassicas. Theoretic and Applied Genetics. 1992. №83. P. 655-662. DOI:10.1007/BF00226912.
9. Zhegong Fan, Stefansson B. R. Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male-sterility systems in rape (*Brassica napus* L.). Canadian Journal of Plant Science. 1986. № 66. P. 221-227.
10. Bartkowiak-Broda I. CMS POLIMA CO1995 A11: F<sub>1</sub> Hybrid technology, URL: <http://gcirc.org/fileadmin/documents/Proceedings/IRC1995Cambridgevol1/CO1995A11.pdf>
11. Frauen Martin, Paulmann Werner Breeding of hybrid varieties of winter oilseed rape based on the MSL-system. The Rejional Institute online publishing, URL: <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/258.htm>.
12. Biology of Brassica Coenospecies. Editor C. Gómez-Campo. Co-publication: Elsevier Science. 1999. 478 p.
13. KWS Suisse SA - OGURA Hybridsystem, URL: [www.kws-swiss.ch/.../OGURA\\_Hybridsystem](http://www.kws-swiss.ch/.../OGURA_Hybridsystem)
14. Chittaranjan Kole (Ed.) Genome mapping and molecular breeding in plants: oilseeds. Co-publication: Springer Verlag-Berlin. 2007. P. 64.
15. Zhao H. X. et al. Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by a multiplex PCR assay. Theoretical and Applied Genetics. 2010. № 121 (4). P. 643–650.
16. Grelon M. et al. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile Brassica cybrids. Molecular and General Genetics. 1994. № 243. P. 540–547. DOI:10.1007/BF00284202.
17. Brown G. G. Unique aspects of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in *Brassica napus*. The Journal Heredity. 1999. № 90 (3). P. 351-356. DOI:10.1093/jhered/esv127.



18. Gurjeet S., Banga S. S. Identification of new sterility maintainers for Polima CMS system in *Brassica napus* L. Proceedings of 9th International Rapeseed Congress. Cambridge. 1995. Vol 1. A13. P. 32-34.
19. Патент № А 2016 13671 Спосіб створення стерильних форм / Глухова Н. А., Моргун В. В., Богуславский Р. Л. Заявник Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН, заявлено 30.12.2016.
20. Праймери University of British Columbia. [http://download.bion.com.cn/upload/month\\_0812/20081213\\_3e0a387c764331d0978dRPKoJqSzhDvl.attach.pdf](http://download.bion.com.cn/upload/month_0812/20081213_3e0a387c764331d0978dRPKoJqSzhDvl.attach.pdf).
21. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E. et al. Current protocol sin molecular biology. New York: John Wiley and Sons, 1987. P. 431–433.
22. Totallab 100. Режим доступу: <http://www.totallab.com..>
23. Botstein D. Construction of a genetic linkage map inman using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 1980. Vol. 32. P. 314–331.
24. Nei M., Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1979. Vol. 74. P. 5267–5273.
25. Zhang Xian, Zhang Ying-jun, Yan Rong Genetic variation of whiteclover (*Trifolium repens* L.) collections from Chinadetected by morphological traits, RAPD and SSR. African Journal of Biotechnology. 2010. Vol. 9, № 21. P. 3032–3041.
26. Акинина Г. Е., Дугарь Ю. Н., В.Н. Попов Статистический анализ генетических данных с использованием компьютерных программ ARLEQUIN, PHILYP, CLANN, STRUCTURE. Методические указания. Харьков: Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева. 2014. 100 с.]
27. PHYLIP. Available from: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
28. Schneider A., Cannarozzi G. M. Support patterns from different out group sprovideastrong phylogenetic signal. Molecular Biology and Evolution. 2009. Vol. 26, № 6. P. 1259–1272.
29. Акинина Г. Е., Попов В. Н. Дивергенция сортов нута селекции разных стран мира по морфологическим признакам и молекулярным маркерам. Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. К. : Логос. 2011. Т. 10. С. 168–172.
30. Дугарь Ю. Н. ISSR–аналіз українських сортів клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. 2012. Вип. 2 (26). С. 98–103.

### References

1. Satina TG, Aniskina UV. Certification of rape varieties using microsatellite analysis. Materials VI International Conference of Young Scientists and Specialists. VSRIOC. 2011. P. 266-269.
2. Banga SS, Banga SK. Hybrid cultivar development. Springer Verlag-Berlin, Narosa Publishing House, New Delhi-London, 1998. P. 401-430.
3. Hiroshi Yamagishi, Shripad R. Bhat Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops. Breed Science. 2014;64(1): 38–47.
4. Ogura H. Studies on the new male-sterility in japanese radish,with special reference to the utilization of this sterility towards thepractical raising of hybrid seeds. Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University. Kagoshima, Japan, Feb. 1968; VI(2): 39-78.
5. Thompson KF. Cytoplasmic male-sterility in oil-seed rape. Heredity. 1972; 29: 253–257. DOI:10.1038/sj.hdy.6800815.
6. Stiewe G et al. Establishing cytoplasmic male sterility in brassica napus by mitochondrial recombination with *B. tournefortii*. Plant Breeding. 1994; 113: 294–304. DOI: 10.1111/pbr.12412.
7. Janeja HS et al. Alloplasmic male sterile *Brassica napus* with *Enarthrocarpus lyratus* cytoplasm: introgression and molecular mapping of an *E. lyratus* chromosome segment carrying a fertility restoring gene. Genome. 2003; 46(5): 792-797.

8. Gundimeda HR, Prakash Shyam, Shivanna KR. Intergeneric hybrids between *Enarthrocarpus lyratus*, a wild species, and crop brassicas. *Theoretic and Applied Genetics*. 1992; 83: 655-662. DOI: 10.1007/BF00226912.
9. Zhegong Fan, Stefansson BR. Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male-sterility systems in rape (*Brassica napus* L.). *Canadian Journal of Plant Science*. 1986; 66: 221-227.
10. Bartkowiak-Broda I. CMS POLIMA CO1995 A11: F<sub>1</sub> Hybrid technology. Available from: <http://gcirc.org/fileadmin/documents/Proceedings/IRC1995Cambridgevol1/CO1995A11.pdf>.
11. Frauen Martin, Paulmann Werner. Breeding of hybrid varieties of winter oilseed rape based on the MSL-system. The Rejional Institute online publishing. Available from: <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/258.htm>.
12. Biology of Brassica Coenospecies. In: C Gómez-Campo, editor. Elsevier Science. 1999. 478 p.
13. KWS Suisse SA - OGURA Hybridsystem. Available from: [www.kws-swiss.ch/.../OGURA\\_Hybridsystem](http://www.kws-swiss.ch/.../OGURA_Hybridsystem)
14. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants: Oilseeds. In: Chittaranjan Kole, editor. Springer Verlag-Berlin. 2007. P. 64.
15. Zhao HX et al. Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by a multiplex PCR assay. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010; 121(4): 643–650.
16. Grelon M et al. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile Brassica cybrids. *Molecular and General Genetics*. 1994; 243: 540-547. DOI:10.1007/BF00284202.
17. Brown GG. Unique aspects of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in *Brassica napus*. *The Journal Heredity*. 1999; 90(3): 351-356. DOI:10.1093/jhered/esv127.
18. Gurjeet S, Banga SS. Indetification of new sterility maintainers for Polima CMS system in *Brassica napus* L.: Proceedings of 9th International Rapeseed Congress. Cambridge, 1995. Vol 1. A13. P. 32-34.
19. Patent № A 2016 13671 UA Way to create sterile forms / Gluhova NA, Morgun VV, Boguslavski RL. Applicant Plant Production Institute nd a VYa Yuryev of NAAS, Ukraine, appl. 30.12.2016.
20. Primers University of British Columbia. Available from: [http://download.bioon.com.cn/upload/month\\_0812/20081213\\_3e0a387c764331d0978dRPKoJqSzhDvl.attach.pdf](http://download.bioon.com.cn/upload/month_0812/20081213_3e0a387c764331d0978dRPKoJqSzhDvl.attach.pdf).
21. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. Current protocol sin molecular biology. New York: John Wiley and Sons, 1987. P. 431–433.
22. Totallab 100. Available from: <http://www.totallab.com>.
23. Botstein D. Construction of a genetic linkage map inman using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*1980; 32: 314-331.
24. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979. Vol. 74. P. 5267–5273.
25. Zhang Xian, Zhang Yingjun, Yan Rong. Genetic variation of whiteclover (*Trifolium repens* L.) collections from Chinadetected by morphological traits, RAPD and SSR. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(21): 3032–3041.
26. Akinina GE, Dugar UN, Popov VN. Statistical analysis of genetic data using computer programs ARLEQUIN, PHILYP, CLANN, STRUCTURE. Methodical instructions. Kharkiv: Plant Research. 2014. 100 p.]
27. PHYLIP. Available from: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
28. Schneider A, Cannarozzi GM. Support patterns from different out group sprovideastrong phylogenetic signal. *Molecular Biology and Evolution*. 2009; 26(6): 1259–1272.
29. Akinina GE, Popov VN. Divergence of varieties of chickpeas of selection of different countries of the world on morphological features and molecular markers. In: Factors of experimental evolution of organisms. Kyiv: Logos, 2011. Vol. 10. P. 168–172.
30. Dugar UN. ISSR-analysis of Ukrainian varieties of clover meadow (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Kharkiv National Agrarian University. Ser. Biology*. 2012; 2(26): 98–103.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ОРИГИНАЛЬНОЙ СТЕРИЛЬНОЙ ФОРМЫ РАПСА ОЗИМОГО С ПОМОЩЬЮ ISSR-МАРКЕРОВ

Глухова Н. А., Акинина Г. Е., Шарыпина Я. Ю., Лютенко В. С.  
Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН, Украина

**Цель и задачи исследования.** Определить генетические различия потомства оригинальной стерильной формы рапса озимого селекции ИР им. В. Я. Юрьева методом микросателитного анализа от образцов, созданных на основе типов стерильности *Ogura* и *Polima*.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на протяжении 2014–2016 годов в Институте растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН. Проведен ПЦР-анализ с использованием ISSR-маркеров в горизонтальном приборе Hoefler Super Sub 100 (США). Были изучены семь образцов, полученных на основе стерильности *Ogura*, *Polima* и оригинальной стерильной формы. Использовали маркеры молекулярной массы 1 Kb («СибЭнзим», Россия). Полученные гели документировали при помощи фотосистемы Nikon D50. Определение количества и размеров продуктов амплификации проводили при помощи демо-версии программы Totallab 100. Частоты аллелей локусов рассчитывали в программе Excel. Данные профилей амплификации оценивали с использованием техники фингерпринтинга при помощи информативных параметров, таких как индекс информативности праймера (PIC). Использовали классификацию Botsteinetal, индексы Шеннона. Полиморфизм ISSR-маркеров оценивали при помощи индекса генетического разнообразия Nei ( $H_e$ ). Для оценки дивергенции между образцами по ISSR-маркерам применяли программу PHYLIP. Дендрограммы строили методом присоединения ближайшего соседа.

**Обсуждение результатов.** В результате амплификации в исследуемых образцах при помощи пяти ISSR праймеров были идентифицированы 49 фрагментов ДНК, 31 из которых были полиморфными. Количество продуктов амплификации варьировало от пяти до 14 фрагментов, в среднем 9,8 на один используемый праймер. Максимальное количество локусов идентифицировано с использованием праймеров UBC810 и UBC 834.

Амплификацией пяти ISSR праймеров были выделены 12 аллельных вариантов (UBC810 (587 п.н.), UBC834 (988, 774, 709 п.н.), UBC842 (1127, 475 п.н.), UBC847 (1349, 969, 496 п.н.), UBC857 (791, 520, 446 п.н.). Образец *Polima* не имел ни одного из маркерных локусов. Полученные результаты позволили утверждать, что среди рассмотренной выборки образцов дуплетные генотипы отсутствуют.

По абсолютным и нормированным значениям индекса Шеннона наиболее полиморфным ISSR- маркером был UBC 810 ( $H' = 0,495$ ,  $H'_{norm} = 0,715$ ). Наименьший уровень полиморфизма показал ISSR маркер UBC 857 ( $H' = 0,364$ ,  $H'_{norm} = 0,525$ ). Общий уровень изменчивости ISSR-маркеров составил  $H' = 0,445$ , а за  $H'_{norm} = 0,642$ .

В полученной дендрограмме выделены три противоположных кластера образцов рапса. В первый кластер вошли образцы Бекр (1) Д 21, Бекр (1) Д 2, Бекр (2) Д 16/2 (потомства оригинальной стерильной формы), во второй – образцы *Polima* и MON (потомства со стерильностью *Polima*), в третий – Inga и Д8 (in vivo) (потомства со стерильностью *Ogura*).

**Выводы.** Обнаружен по ISSR-маркерам высокий диапазон внутривидовой изменчивости в исследуемых образцах рапса. Определены общие закономерности группирования образцов рапса при их классификации, полученной при помощи присоединения ближайшего соседа (NJ) кластерным анализом. Исследованиями доказано, что потомства оригинальной стерильной формы имеют один корень, а также весомые генетические отличия от образцов со стерильностью *Ogura* и *Polima*.

**Ключевые слова:** рапс озимый, стерильная форма, праймер, ISSR-маркер, генетическое-расстояние, индекс Шенона, бутстреп-анализ

## **ISSR MARKER-ASSISTED DETERMINATION OF THE GENETIC POLYMORPHISM OF AN ORIGINAL STERILE FORM OF WINTER RAPE**

Hlukhova NA, Akinina HYe, Sharypina YaYu, Liutenko VS  
Plant Production Institute and a VYa Yuryev of NAAS, Ukraine

**The aim and tasks of the study.** To identify the genetic differences in descendants of an original sterile form of winter rape bred at the Plant Production Institute and a VYa Yuryev and based on the *Ogura*- and *Polima*-type male sterility using microsatellite analysis.

**Materials and methods.** The study was conducted under laboratory conditions in the Plant Production Institute and a VYa Yuryev of NAAS in 2014-2016. PCR with ISSR markers was carried out in a horizontal Hoefer HE 100 SuperSub unit (USA). Seven accessions based on *Ogura*- and *Polima*-type male sterility and the original sterile form were investigated. Molecular weight markers 1 Kb ("SibEnzim", Russia) were used. Gels were documented using a Nikon D50 camera. Amplicon numbers and sizes were determined using a demo version of Totalab100. Frequencies of locus alleles were calculated in Excel. Amplification profiles were evaluated by fingerprinting using informative parameters, such as the index of primer informativeness (IPI). The Botstein's classification and Shannon's indices were used. Polymorphism of ISSR markers was assessed using the Nei index of genetic diversity (*He*). To evaluate the divergence between accessions by ISSR markers, the PHYLIP program was used. Dendrograms were constructed by the nearest neighbor algorithm.

**Results and discussion.** Amplification with five ISSR primers identified 49 DNA fragments, 31 of which were polymorphic, in the accessions under investigation. The amplicon number varied from 5 to 14 fragments, on average 9.8 per primer. The maximum number of loci was identified using primers UBC810 and UBC 834.

Amplification with five ISSR primers found 12 allelic variants (UBC810 [587 bp], UBC834 [988, 774, 709 bp], UBC842 [1127, 475 bp], UBC847 [1349, 969, 496 bp] and UBC857 [791, 520, 446 bp]). The Polima accession had no marker loci. The results proved that there were no identical genotypes in the test sample.

The absolute and normalized values of the Shannon index showed that UBC 810 was the most polymorphic ISSR marker was ( $H' = 0.495$ ,  $H'_{norm} = 0.715$ ). The ISSR marker UBC 857 had the lowest level of polymorphism ( $H' = 0.364$ ,  $H'_{norm} = 0.525$ ). The total level of variability in ISSR markers was  $H' = 0.445$  and  $H'_{norm} = 0.642$ .

The dendrogram distinguished three opposite clusters of rape accessions. Cluster 1 included Bekr (1) D 21, Bekr (1) D 2, Bekr (2) D 16/2 (descendants of the original sterile form); cluster 2 - Polima and MON accessions (descendants with *Polima* sterility); cluster 3 - Inra and D8 (in vivo) (descendants with *Ogura* sterility).

**Conclusions.** A high range of intraspecies variability among the rape accessions under investigation was detected by ISSR markers. We established the general patterns of grouping rape accessions, using classification, which was formulated by cluster analysis using the nearest neighbor (NJ) algorithm. The study proved that descendants of the original sterile form had one root and showed that there were significant genetic differences from accessions with the *Ogura*- and *Polima*-type male sterility.

**Key words:** winter rape, sterile form, primer, ISSR marker, genetic distances, Shannon's indices, bootstrap analysis