

АГРОНОМІЯ

УДК 57.085.2:57.082.13:634.71

Оцінювання міжсортового поліморфізму малини за використання SSR-PCR-аналізуДимань Н.О. , Карпук Л.М. 

Білоцерківський національний аграрний університет



Димань Н.О. E-mail: nathalie.dyman@gmail.com



Димань Н.О., Карпук Л.М. Оцінювання міжсортового поліморфізму малини за використання SSR-PCR-аналізу. «Агробіологія», 2026. № 1. С. 30–37.

Dyman N., Karpuk L. Assessment of inter-varietal polymorphism of raspberry using SSR-PCR analysis. «Agrobiology», 2026. no. 1, pp. 30–37.

Рукопис отримано: 06.03.2026 р.

Прийнято: 21.03.2026 р.

Затверджено до друку: 19.05.2026 р.

doi: 10.33245/2310-9270-2026-203-1-30-37

ISSN 2310-9270

Малина – провідна ягідна культура в Україні. Необхідність удосконалення її сортименту за низкою напрямів потребує застосування ДНК-маркерів як сучасного підходу в роботі з генетичними ресурсами. Вперше для вивчення генетичної структури 12 сортів малини, які культивуються в Україні, застосовано мікросателітні ДНК-маркери (SSR-PCR) й оцінено їх ефективність у з'ясуванні спорідненості сортів малини. Визначення генотипів проведено за 10 мікросателітними локусами (RiM017, RiM019, RhM003, RhM011, RhM043, Rub1a, Rub4a, Rub223a, Rub228a і Rub262b). Для аналізу поліморфізму мікросателітних локусів використано електрофоретичне розділення ПЛР-продуктів у 8 % денатурувальному поліакриламідному гелі (ПААГ) з подальшим фарбуванням нітратом срібла.

Виявлено високий рівень поліморфізму SSR-маркерів у малини. Середня кількість алелів на один мікросателітний локус становила 4,61. Значення показника ефективної кількості алелів знаходилися в діапазоні від 1,291 (RiM017) до 5,053 (Rub228a). Значення індексу Шеннона варіювали від 0,456 (Rub228a) до 1,77 (RhM043). Найвищий рівень фактичної гетерозиготності зафіксовано за локусом RiM019 (83,3 %), найнижчий – за локусом RhM011 (8,3 %). За частотами ідентифікованих алелів обчислено PIC, значення якого за дослідженими маркерами становило від 0,212 до 0,777. Розмах генетичних відстаней між дослідженими сортами коливався від 0,0093 до 2,0127, а індексів генетичної ідентичності – від 0,0056 до 0,9398.

Отримані результати свідчать про перспективність використання протестованих маркерів для оцінювання генетичного різноманіття вітчизняного генофонду малини, а також для розроблення методів ідентифікації й паспортизації її сортів.

Ключові слова: малина, *Rubus idaeus* L., поліморфізм, SSR-маркери, мікросателіти, ідентифікація сортів.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Малина (*Rubus idaeus* L. та *Rubus occidentalis* L.) – одна з найбільш економічно важливих ягідних культур у світі, однак її селекція стикається з низкою викликів, як-от обмежене генетичне різноманіття елітних сортів, поліплоїдія та складність класифікації через міжвидову гібридизацію та ін. У цьому контексті ДНК-маркери стали неза-

мінним інструментом для генетичного аналізу та вдосконалення культури [6, 8, 20].

Для аналізу генетичного різноманіття сортів та популяцій малини використовували різноманітні молекулярні маркери. Попри велику кількість публікацій про малину на основі морфологічного, RFLP, RAPD, AFLP, ISSR-аналізів, деякі аспекти генетичної, а також екологічної диференціації між популяціями

цього виду залишаються нез'ясованими. Нині спостерігається тенденція до застосування високовідтворюваних кодомінантних SSR- та SNP-маркерів [6, 9, 14].

Мікросателітні маркери (SSR – *Simple Sequence Repeats*) використовують як у фундаментальних дослідженнях для оцінювання генетичного поліморфізму, побудови генетичних карт для груп зчеплення, вивчення філогенетичних відносин, так і з прикладною метою – для перевірки родоводів, під час розроблення систем ідентифікації і паспортизації, пошуку маркерів, асоційованих з господарсько корисними ознаками, під час маркер-опосередкованого відбору бажаних генотипів на ранніх стадіях розвитку рослин. SSR-алелі успадковуються відповідно до законів Менделя і уможливають безпосереднє визначення гомозиготних та гетерозиготних генотипів, що вкрай важливо для аналізу гібридів, родин та селекційного матеріалу малини [8, 17, 18].

Перші дослідження SSR-поліморфізму в представників роду *Rubus* було проведено наприкінці 90-х років минулого століття. Мікросателітні ділянки виявляли методом блот-гібридизації за Саузерном, використовуючи як зонд дві синтетичні ДНК-проби з тандемно повторюваними послідовностями GACA та GATA [3].

Першу генетичну карту для червоної малини *R. idaeus* L. було розроблено у 2004 р. [10].

Численні групи дослідників створювали набори SSR-маркерів для різних видів малини: *Rubus occidentalis* [5], *R. hochstetterorum* [13], *R. coreanus* [4], *R. glaucus* [14]. Створені набори мікросателітних маркерів широко застосовували для вивчення генетичного різноманіття та генотипування селекційних сортів малини [4], малини звичайної [12] і малини західної [5].

Дослідження в різних країнах демонструють надзвичайну ефективність SSR у виявленні поліморфізму. Зокрема, у Польщі аналіз 22 сортів малини різного географічного походження за допомогою 10 пар SSR-праймерів показав середній рівень поліморфізму 97,8 %. На основі філогенетичних кластеризацій, побудованих за SSR-даними, дослідники змогли групувати сорти за географічним походженням, генеалогією схрещувань та особливостями господарсько-корисних ознак [18].

У Балтійському регіоні SSR-маркери підтвердили тісний зв'язок між родоводами сортів, однак виявили низький загальний рівень генетичного різноманіття місцевого селекційного матеріалу [12].

У Південній Америці за використання 36 SSR-праймерів на 39 зразках представників *Rubus* було доведено високий рівень поліморфізму SSR-локусів, який уможливлює надійне розрізнення навіть близькоспоріднених сортів [15].

SSR-маркери дають змогу уточнювати походження сортів з невідомим родоводом та вивчати еволюційні зв'язки. Вони чітко розмежовують види, наприклад, відокремлюючи червону малину від чорної. Крім того, ці маркери використовують для картування QTL (локусів кількісних ознак), що контролюють такі важливі характеристики як час дозрівання, колір плодів, стійкість до шкідників (наприклад, попелиць) та хвороб (кореневої гнилі) [18].

Одним із ключових напрямів застосування SSR-маркерів є створення молекулярно-генетичних паспортів. Це вкрай важливо для захисту прав інтелектуальної власності селекціонерів та верифікації справжності сортів; усунення дублювання в колекціях генетичних ресурсів, що уможливлює оптимізацію витрат на їх утримання; ідентифікації сортів на будь-якій стадії розвитку рослини, що неможливо зробити за морфологічними ознаками до початку плодоношення [7, 18].

SSR-маркери мають великі перспективи у селекції малини. Сучасні дослідження показують, що мікросателітні повтори, локалізовані в генах біосинтезу флавоноїдів і шляхів захисту рослин, можуть бути використані як функціональні маркери для маркер-асоційованого відбору за ознаками якості плодів та стійкості до біотичних стресів. Поєднання SSR-PCR з іншими методами (RAPD, ISSR, фенотиповими ознаками) формує комплексний підхід до оцінювання міжсортного поліморфізму та оптимізації селекційних програм у малини [8].

Метою роботи було дослідження генетичної структури сортів малини за SSR-PCR-маркерами й оцінювання ефективності використання цього типу маркерів для вивчення генетичного поліморфізму та спорідненості сортів малини, які культивуються в Україні.

Матеріал та методика дослідження. Об'єктом досліджень слугували 12 сортів малини: 6 сортів, які зареєстровано в державному реєстрі рослин, придатних для поширення в Україні (Благородна, Брусвяна, Космічна, Новокитаївська, Осіння, Промінь) [19], 5 сортів, які було виключено з державного реєстру (C1–C5) [1], і 1 сорт американської селекції – Херітейдж. Кожного сорту було придбано по 5 кущів і висаджено в умовах ТОВ «Еліта» смт Терезине (Київська обл.).

Екстракцію ДНК здійснювали зі свіжого рослинного матеріалу, використовували молоді листки малини. ДНК виділяли за використання СТАВ-буферу [16].

Ґрунтуючись на результатах аналізу нуклеотидних послідовностей мікросателітних локусів малини, депонованих у базі національного центру біотехнологічної інформації NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*), для проведення генетичної ідентифікації сортів нами було відібрано 10 SSR-локусів малини (RiM017, RiM019, RhM003, RhM011, RhM043, Rub1a, Rub4a, Rub223a, Rub228a і Rub262b) (табл. 1).

ПЛР проводили на ампліфікаторі «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems, США) у такому температурному режимі: 4 хв за температури 94 °С, 20 с за 52–58 °С (залежно від локусу), 20 с за 72 °С; 5 хв за 72 °С. Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. *Taq*-полімерази, 30–70 нг геномної ДНК, 2,0 мМ MgCl₂ та 0,3 мкМ праймерів.

Для аналізу поліморфізму мікросателітних локусів використовували електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації у 8 % поліакриламідному гелі (ПААГ) в денатурувальних умовах (7 М сечовина) за використання 0,5×ТВЕ-буферу. Після завершення

електрофорезу гелі фарбували нітратом срібла й фотографували. Молекулярний розмір алелів визначали за допомогою маркера молекулярних мас GeneRuler 50 bp та 20 bp (Fermentas, Литва) й за використання програмного пакету Quantity One® Version 4.6.3 (BioRad, США).

Генетичні параметри – середню (Na) та ефективну кількість алелів на локус (Ne), фактичну та очікувану гетерозиготність (Ho та He), індекс фіксації Райта (F) та індекс гетерогенності Шеннона (I) – обчислювали за використання комп'ютерної програми PopGen версії 1.31 [9].

Різноманітність алелів SSR-локусів визначали за допомогою індексу поліморфності локусу PIC (*Polymorphic Index Content*) за формулою:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

де P_{ij} – частота j алеля для маркера i ,
 n – загальна кількість алелів.

На підставі розрахунку індексів генетичної ідентичності між дослідженими сортами малини проводили кластерний аналіз і будували дендрограму генетичних взаємовідносин за поліморфізмом 10 SSR-праймерів.

Таблиця 1 – Характеристика використаних у роботі мікросателітних локусів малини

Локус	Повтор	Номер у Генбанку	Послідовність праймерів 5→3	Температура гібридації
RiM017	(TG) ₆	FJ194453	F...GAAACAGGTGGAAAGAAACCTG R...CATGTGCTTATGATGGTTTCG	58
RiM019	(AG) ₁₂	FJ194454	F...ATTCAAGAGCTTAACTGTGGGC R...CAATATGCCATCCACAGAGAAA	58
RhM003	(TG) ₁₀	FJ194445	F...CCATCTCCAATTCAGTTCTTCC R...AGCAGAATCGGTTCTTACAAGC	58
RhM011	(TC) ₁₈	FJ194446	F...AAAGACAAGGCGTCCACAAC R...GGTTATGCTTTGATTAGGCTGG	58
RhM043	(AC) ₆	FJ194451	F...GGACACGGTTCTAACTATGGCT R...ATTGTCGCTCCAACGAAGATT	58
Rub1a	(TG) ₁₆	AJ428838	F...CCTCTTCACCGATTTAGACCA R...TTTAGCCCCAGTCCAAAAGTT	56
Rub4a	(CT) ₁₄ (CA) ₁₆	FJ409626	F...AGCGAATTGCATCTCTCTCTC R...GCACTGAAAATCATGCATCTG	52
Rub223a	(AT) ₄ -(TA) ₈ -(AT) ₁₀	AJ428844	F...TCTCTTGCATGTTGAGATTCTATT R...TTAAGGCGTCGTGGATAAGG	56
Rub228a	(GA) ₄₁	FJ409628	F...TGGACAGCTTTGTGCAGAGT R...GCTTGCTTGTATCTCCATTGC	54
Rub262b	(AG) ₁₅	AJ428845	F...TGCATGAAGGCGATATAAAGG R...TCCGCAAGGGTTGTATCCTA	56

Результати дослідження та обговорення. За всіма дослідженими молекулярно-генетичними маркерами було виявлено поліморфізм, рівень якого значно варіював залежно від використаного SSR-повтору. Сумарно за використання 10 локусів у досліджених сортів виявлено 45 алелів, молекулярний розмір яких становив від 328 до 114 п. н. (табл. 2). Найбільшу кількість алелів (8) для цього типу маркерів було отримано у разі ампліфікації локусу RiM019 (рис. 1), найменшу (2) – за локусом RhM011 (рис. 2). Кількість алелів за іншими мікросателітними локусами малини була наступною: сім алелів було виявлено за електрофоретичного аналізу локусу Rub228a; по п'ять алелів – за локусами Rub223a і Rub262b; чотирма алелями характеризувалися локуси RhM003, Rub1a та Rub4a; 3 алелі зафіксовано за ампліфікації локусу RhM043. Середня кількість алелів на один мікросателітний локус становила $4,6 \pm 0,581$.

Лише два алеля (198 п. н. за локусом RiM017 і 352 п. н. за локусом RhM043) були мономорфними, а кількість поліморфних алелів була різною у дослідженій вибірці сортів: С4 – 15 алелів; Херітейдж – 14; С2, Брусвяна – 13; Благородна, Космічна і Осіння – 12; Новокітківська, С1 і С5 – 11, С3 – 10.

За окремими локусами було виявлено унікальні алелі, представлені в генотипах лише одного сорту, які дають змогу індивідуально дискримінувати досліджені сорти малини: за локусом RiM017 (Брусвяна – 180 п. н.); за локусом RiM019 (Осіння – 152 п. н., Херітейдж – 168 п. н., Брусвяна – 196 і 220 п.н., Космічна

– 222 п. н.); за локусом RhM043 (Херітейдж – 334 п. н.); за локусом Rub1a (Херітейдж – 294 п. н.); за локусом Rub223a (Херітейдж – 248 і 264 п. н.); за локусом Rub228a (С1 – 176 п. н.); за локусом Rub262b (С2 – 220 п. н.).

Спектр значень показника ефективної кількості алелів у досліджених сортів малини різнився залежно від аналізованого мікросателітного локусу. Значення показника знаходилися в діапазоні від 1,291 (RiM017) до 5,053 (Rub228a).

Значення індекса Шеннона I, який характеризує видову неординарність популяції, в наших дослідженнях варіювали від 0,456 до 1,77 та загалом були співставними з показниками Ne. Найменше значення зафіксовано за локусом RhM043, найбільше – за локусом Rub228a.

Одним із найважливіших показників внутрішньопопуляційного різноманіття є рівень гетерозиготності. Найвищий рівень фактичної гетерозиготності зафіксовано за локусом RiM019 (83,3 %), найнижчий – за локусом RhM011 (8,3 %).

Значення фактичної гетерозиготності за мікросателітними локусами Rub4a та Rub228a були близькими до значень очікуваної гетерозиготності. Локуси RhM011, Rub1a, Rub223a та Rub262b характеризувалися надлишком гомозигот. Розрахунок індексу фіксації Райта (F), що відображає інбридинг особини відносно популяції, показав наявність надлишку гетерозиготних генотипів у досліджених сортів за локусами RiM017 (F = -0,108), RiM019 (F = -0,106) та RhM003 (F = -0,135).

Таблиця 2 – Значення основних показників генетичного різноманіття досліджених сортів малини

Локус	Діапазон розмірів, п.н.	Na	Ne	Ho	He	F	I
RiM017	204–180	3	1,291	0,250	0,226	-0,108	0,456
RiM019	222–152	8	4,056	0,833	0,753	-0,106	1,671
RhM003	218–194	4	2,057	0,583	0,514	-0,135	0,983
RhM011	298–294	2	1,882	0,083	0,469	0,822	0,662
RhM043	354–334	3	1,291	0,250	0,226	-0,108	0,456
Rub1a	294–226	4	2,072	0,250	0,517	0,517	0,997
Rub4a	160–114	4	2,743	0,583	0,635	0,082	1,140
Rub223a	328–248	5	1,565	0,250	0,361	0,308	0,789
Rub228a	194–136	7	5,053	0,750	0,802	0,065	1,770
Rub262b	230–212	5	3,740	0,500	0,733	0,318	1,423
Mean (SE)	–	4,600 (0,581)	2,598 (0,410)	0,433 (0,079)	0,526 (0,067)	0,169 (0,101)	1,048 (0,150)



Рис. 1. Електрофоретичне розділення алелів мікросателітного локусу малини RiM019:
М – маркер молекулярних мас; 1–12 – досліджені сорти малини.

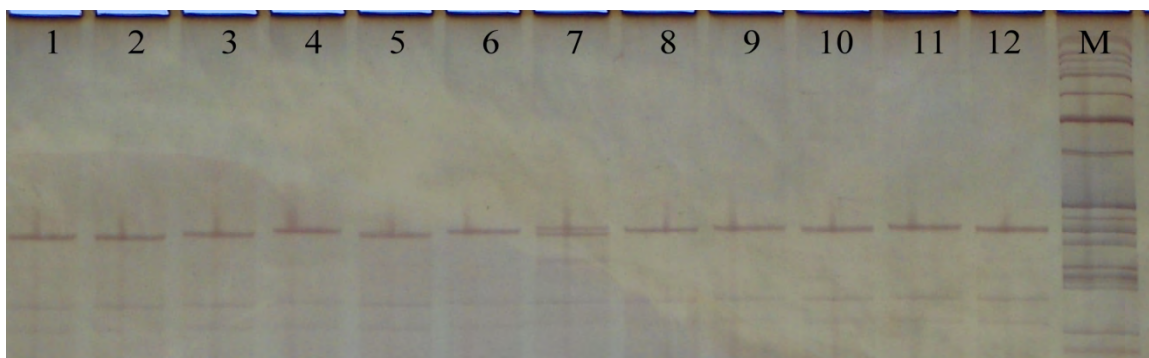


Рис. 2. Електрофоретичне розділення алелів мікросателітного локусу малини RhM011:
1–12 – досліджені сорти малини; М – маркер молекулярних мас.

Важливим генетичним показником, який характеризує різноманітність алелів і дає змогу оцінити ефективність застосування генетичних маркерів, особливо у випадку аналізу кодомінантних маркерів, є індекс поліморфності локусу PIC. За значеннями цього індексу маркери відносять до високо- ($PIC > 0,5$), помірно- ($0,25 < PIC < 0,5$) та низькоінформативних ($PIC < 0,25$). Використані у нашому дослідженні для аналізу генетичного поліморфізму сортів малини мікросателітні локуси характеризувалися різними значеннями PIC. Для більшості локусів були властиві значення PIC, що перевищували поріг 0,25. Зокрема, до високоінформативних мікросателітних повторів належали Rub228a, RiM019, Rub262b і Rub4a зі значеннями 0,777; 0,719; 0,687 і 0,567 відповідно; до помірноінформативних належали локуси Rub1a, RhM003, RhM011 і Rub223a зі значеннями 0,483; 0,476; 0,358 і 0,346 відповідно. Лише для двох локусів – RiM017 і RhM043 – значення PIC було нижчим за 0,25.

Аналіз генетичних взаємовідносин між дослідженими сортами малини за поліморфізмом 10 мікросателітних локусів проводили за індексами генетичної ідентичності та генетичних відстаней за Неєм (табл. 3). Розмах генетичних дистанцій між досліджени-

ми сортами становив від 0,0093 до 2,0127, а індексів генетичної ідентичності – від 0,0056 до 0,9398.

На підставі обчислення незважених індексів генетичної спорідненості між дослідженими сортами малини проведено кластерний аналіз і побудовано дендрограму генетичних взаємовідносин за використання незваженого парно-групового методу (UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averaging*) (рис. 3), що дає змогу наочно проілюструвати ступінь міжсорткової диференціації малини за дослідженими SSR-локусами. Із дендрограми видно, що сорт американської селекції Херітейдж розташований окремо від сортів української селекції. Всі інші проаналізовані сорти чітко розділяються на два окремих кластери.

Перший кластер включає більшість досліджених сортів та має складну будову. При цьому розташування окремих сортів у більшості випадків відповідає інформації про їх селекційне походження. Зокрема, найближчими між собою виявилися сорти Промінь і Новокітаївська та Космічна і С5. Аналогічну картину «близького» розташування спостерігаємо для сортів Благородна, Осіння, Брусвяна і С3. До другого кластеру входять три сорти малини: С1, С2 і С4.

Таблиця 3 – Генетичні взаємовідносини між дослідженими сортами малини, розраховані за поліморфізмом 10 SSR-локусів (вище діагоналі – індекси генетичної ідентичності, нижче – генетичні відстані)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	****	0.4213	0.9398	0.6367	0.4697	0.5717	0.6727	0.6176	0.6367	0.5186	0.6367	0.6063
2	0.8643	****	0.4677	0.2673	0.4830	0.3465	0.4077	0.2269	0.1336	0.3214	0.1336	0.3341
3	0.0621	0.7599	****	0.6875	0.4518	0.5303	0.6240	0.5760	0.6250	0.5345	0.6250	0.5938
4	0.4515	1.3195	0.3747	****	0.4841	0.7660	0.6240	0.6973	0.6562	0.6682	0.6562	0.7188
5	0.7557	0.7276	0.7944	0.7254	****	0.4869	0.7519	0.5949	0.2582	0.3450	0.2582	0.3873
6	0.5592	1.0600	0.6343	0.2665	0.7198	****	0.7191	0.6288	0.6187	0.7874	0.6187	0.8839
7	0.3965	0.8973	0.4715	0.4715	0.2851	0.3298	****	0.8072	0.5894	0.5930	0.5894	0.6934
8	0.4818	1.4834	0.5516	0.3606	0.5193	0.4639	0.2142	****	0.6063	0.5510	0.6063	0.5760
9	0.4515	2.0127	0.4700	0.4212	1.3540	0.4801	0.5287	0.5003	****	0.6013	0.0056	0.6562
10	0.6567	1.1350	0.6264	0.4032	1.0641	0.2390	0.5226	0.5961	0.5086	****	0.6013	0.8352
11	0.4515	2.0127	0.4700	0.4212	1.3540	0.4801	0.5287	0.5003	0.0093	0.5086	****	0.6562
12	0.5003	1.0964	0.5213	0.3302	0.9486	0.1234	0.3662	0.5516	0.4212	0.1801	0.4212	****

Примітка: 1 – Промінь, 2 – Херітейдж, 3 – Новокітаївська, 4 – Благородна, 5 – С2, 6 – С3, 7 – С4, 8 – С1, 9 – Космічна, 10 – Брусвяна, 11 – С5, 12 – Осіння.

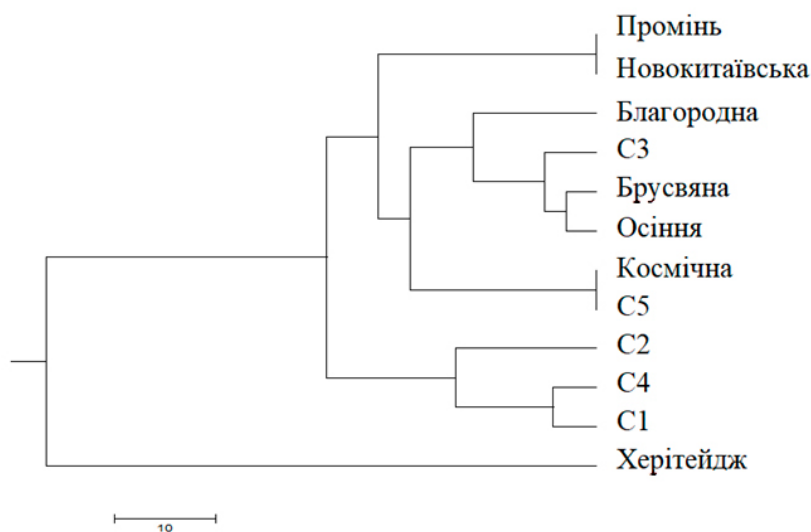


Рис. 3. Дендрограма спорідненості 12 сортів малини, побудована на основі аналізу поліморфізму 10 SSR-локусів.

Отже, нами вперше в Україні було проведено визначення генотипів мікросателітних локусів у сортів червоної малини (*Rubus idaeus L.*). Встановлено високий рівень поліморфізму мікросателітних локусів у проаналізованих сортів. Доведено можливість перевірки спорідненості зразків на основі аналізу розподілу мікросателітних алелів.

Отримані дані свідчать про перспективність застосування протестованих маркерів для оцінювання генетичного різноманіття вітчизняного генофонду малини, а також під час розроблення методів ідентифікації і паспортизації сортів, що може бути використано для захисту авторських прав селекціонерів.

REFERENCES

1. Agrarians together. Catalog of plant cultivars. Available at: <https://agrarii-razom.com.ua/culture-varieties-catalog/malyna>.
2. Bassil, N.V., Dossett, M., Hummer, K.E., Mockler, T., Filichkin, S., Peterson, M.E., Lee, J., Fernandez, G., Perkins-Veazie, P., Weber, C., Agunga, R., Rhodes, E., Scheerens, J.C., Yang, W., Lewers, K.S., Graham, J., Fernandez Fernandez, F., Yun, S., Finn, C.E. (2014). Genetic and developing genomic resources in black raspberry. *Acta Horticulturae*. Available at: http://www.actahort.org/books/1048/1048_.htm.
3. Bussemeyer, D.T., Pelikan, S., Kennedy, R.S., Rogstad, S.H. (1997). Genetic diversity of Philippine *Rubus moluccanus* L. (Rosaceae) populations examined with VNTR DNA probes. *J. Trop. Biol.* Vol. 14, pp. 867–884. DOI: 10.1017/S0266467400011044.
4. Castillo, N. R., Reed, B. M., Graham, J., Fernández-Fernández, F., Bassil, N. V. (2010). Microsatellite Markers for Raspberry and Blackberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 135(3), pp. 271–278. DOI: 10.21273/JASHS.135.3.271
5. Dossett, M., Bassil, N., Finn, C. (2012). SSR fingerprinting of black raspberry cultivars shows discrepancies in identification. *Acta Hort.* Vol. 946, pp. 49–53. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.946.4.
6. Dyman, N., Karpuk, L. (2023). The use of DNA markers in raspberry (*Rubus* L.) research: a review. *Agrobiology*. no. 2, pp. 67–77. DOI: 10.33245/2310-9270-2023-183-2-67-77
7. Fernández-Fernández, F., Antanaviciute, L., Govan, C.L., Sargent, D.J. (2011). Development of a multiplexed microsatellite set for fingerprinting red raspberry (*Rubus idaeus*) germplasm and its transferability to other *Rubus* species. *Journal of Berry Research*. Vol. 1(4), pp. 177–187.
8. Foster, T., Nahla, M., Bassil, V., Dossett M., Worthington, M., Graham, J. (2019). Genetic and genomic resources for *Rubus* breeding: a roadmap for the future. *Horticulture Research*. Vol. 6, 116 p. DOI: 10.1038/s41438-019-0199-2
9. Garrido, P., Morillo, E., Vásquez-Castillo, W. (2020). Genetic diversity of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) in Ecuador assessed by AFLP markers. *Plant Genetic Resources*. Vol. 18(4), pp. 243–250. DOI: 10.1017/S1479262120000283
10. Graham, J., Smith, K., MacKenzie, K., Jorgenson, L., Hackett, C., Powell, W. (2004). The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*. no. 109, pp. 740–749. DOI: 10.1007/s00122-004-1687-8
11. Jamali, S.H., Cockram, J., Hickey, L.T. (2019). Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. *Theor. App. Genet.* Vol. 132, pp. 1911–1929. DOI: 10.1007/s00122-019-03348-7.
12. Laciš, G., Kota-Dombrovska, I., Strautina S. (2017). Evaluation of red raspberry cultivars used for breeding and commercial growing in the Baltic region. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B*. Vol. 71, no. 3 (708), pp. 203–210. DOI: 10.1515/prolas-2017-0034
13. Lopes, M.S., Maciel, G.B., Mendonça, D., Gil, F.S., Da Câmara Machado, A. (2006). Isolation and characterization of simple sequence repeat loci in *Rubus hochstetterorum* and their use in other species from the Rosaceae family. *Molecular Ecology Notes*. Vol. 6, pp. 750–752. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01329.x.
14. López, A., Barrera, C., Marulanda, M. (2019). Evaluation of SSR and SNP markers in *R. glaucus* Benth progenitors' selection. *Rev. Bras. Frutic.* Vol. 41 (1), pp. 1–14. DOI: 10.1590/0100-29452019081.
15. Marulanda, M., López, A., Uribe M. (2012). Genetic Diversity and Transferability of *Rubus* Microsatellite Markers to South American *Rubus* Species, *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*. InTech. Available at: <http://www.intechopen.com/books/the-molecular-basis-of-plant-genetic-diversity/genetic-diversity-and-transferability-of-rubus-microsatellite-markers-to-south-american-rubus-specie>
16. Nunes, C.F., Ferreira, J.L., Nunes-Fernandes, M.C., de Souza Breves, S., Generoso, A.L., Fontes-Soares, B.D., Carvalho-Dias, M.S., Pasqual, M., Borem, A., de Almeida Cancado, G.M. (2011). An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural*. Vol. 41, pp. 1383–1389. DOI: 10.1590/S0103-84782011000800014
17. Ochieng, J.A., Oyoo, M.E., Gesimba, R.M., Korir, P.C., Ojwang, P.P.O., Owuoche, J.O. (2018). Genetic diversity of blackberry (*Rubus* subgenus *Rubus* Watson) in selected counties in Kenya using simple sequence repeats (SSRs) markers. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 17(39), pp. 1247–1264. DOI: 10.5897/AJB2018.16613
18. Simlat, M., Ptak, A., Kula, A., Orzeł, A. (2018). Assessment of genetic variability among raspberry accessions using molecular markers. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. Vol. 17(5), pp. 61–72. DOI: 10.24326/asphc.2018.5.6
19. State Register of Plant Cultivars Suitable for Distribution in Ukraine in 2019. 2024. Available at: <https://minagro.gov.ua/file-storage/reyestr-sortiv-roslin>.
20. Wight, H., Zhou, J., Li, M., Hannenhalli, S., Mount, S., Liu, Z. (2019). Draft genome assembly and annotation of red raspberry *Rubus idaeus*. *BioRxiv*. DOI: 10.1101/546135.

Assessment of intervarietal polymorphism of raspberry using SSR-PCR analysis

Dyman N., Karpuk L.

Raspberry (*Rubus idaeus* L.) is one of the leading berry crops in Ukraine. The necessity to improve its varietal composition in several directions requires the use of DNA markers as a modern approach to working with genetic resources. For the first time, microsatellite DNA markers (SSR-PCR) were applied to study the genetic structure of 12 raspberry cultivars cultivated in Ukraine and to evaluate their

effectiveness in determining the genetic relatedness among them.

Genotyping was carried out using 10 microsatellite loci: RiM017, RiM019, RhM003, RhM011, RhM043, Rub1a, Rub4a, Rub223a, Rub228a, and Rub262b. The analysis of microsatellite locus polymorphism was performed by electrophoretic separation of PCR products in an 8 % denaturing polyacrylamide gel (PAGE), followed by silver nitrate staining.

A high level of polymorphism of the SSR markers in raspberry was revealed. The average number of alleles per locus was 4.61. The effective number of alleles ranged from 1.291 (RiM017) to 5.053 (Rub228a). Shannon index values varied from 0.456 (Rub228a) to 1.770 (RhM043). The highest observed

heterozygosity was recorded for locus RiM019 (83.3 %), and the lowest for locus RhM011 (8.3 %). Based on the allele frequencies, the polymorphism information content (PIC) values were calculated and ranged from 0.212 to 0.777 across the studied markers. The genetic distances among the cultivars varied from 0.0093 to 2.0127, while genetic identity indices ranged from 0.0056 to 0.9398.

The obtained results demonstrate the potential of the tested SSR markers for assessing the genetic diversity of the national raspberry gene pool and for the identification and certification (passportization) of raspberry cultivars.

Key words: raspberry, *Rubus idaeus* L., polymorphism, SSR markers, microsatellites, cultivar identification.



Copyright: Димань Н.О., Карпук Л.М. © 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:

Димань Н.О.

Карпук Л.М.

<https://orcid.org/0000-0003-4087-2957>

<https://orcid.org/0000-0002-2303-7899>