

АГРОНОМІЯ

УДК 575.113.2:577.2:633.57

Молекулярно-генетична характеристика сортів малини за ISSR-PCR- маркерамиДимань Н.О. , Карпук Л.М. 

Білоцерківський національний аграрний університет

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

Димань Н.О., Карпук Л.М. Молекулярно-генетична характеристика сортів малини за ISSR-PCR- маркерами. «Агробіологія», 2025. № 2. С. 29–37.

Dyman N., Karpuk L. Molecular-genetic characteristics of raspberry varieties based on ISSR-PCR markers. «Agrobiology», 2025. no. 2, pp. 29–37.

Рукопис отримано: 08.09.2025 р.

Прийнято: 23.09.2025 р.

Затверджено до друку: 27.11.2025 р.

doi: 10.33245/2310-9270-2025-199-2-29-37

Вперше для 12 сортів малини, які культивують в Україні, проведено аналіз генетичної структури за маркерами ISSR-PCR й оцінено ефективність використання цього типу маркерів для вивчення генетичного поліморфізму та спорідненості сортів малини. Екстракцію ДНК здійснювали із свіжого рослинного матеріалу, використовували молоді листки малини. ДНК виділяли за використання СТАВ-буферу.

З метою підбору інформативних ISSR-маркерів для аналізу геному малини проведено тестування 31 праймера – 21 з динуклеотидною короною послідовністю та 10 з тринуклеотидною. За результатами скринінгу праймерів для подальшого молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму сортів малини було обрано 4 динуклеотидні ISSR-праймери з послідовностями (AG)₈YG, (AG)₉C, (AG)₉C і (AC)₈C та 3 тринуклеотидні праймери: (ACC)₆G, (GTG)₆A і (GAG)₆G. Виявлено високий рівень поліморфізму ISSR-маркерів у малини. Середня кількість алелів на локус для досліджених 12 сортів становила 1,795, середнє значення ефективного числа алелів на локус – 1,44, середнє значення індексу гетерогенності Шеннона – 0,398, середнє значення очікуваної гетерозиготності – 0,262. Розмах генетичних дистанцій між дослідженими сортами коливався від 0,109 до 0,606, а індексів генетичної спорідненості – від 0,896 до 0,545.

Зроблено висновок про високу інформативність методу мультилокусного ДНК-профілювання ISSR-PCR для генетичної ідентифікації сортів малини. Досліджені ISSR-маркери можуть бути корисними для характеристики генетичної структури, розрізнення сортів малини та підбору їх найперспективніших варіантів для схрещування.

Ключові слова: малина, *Rubus idaeus* L., поліморфізм, ISSR-PCR-маркери, генетична диференціація.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Рід *Rubus* налічує понад 500 високоваріабельних і гетерогенних видів, що належать до 12 підродів і поширені на всіх континентах за винятком пустельних регіонів. Найбільше комерційне значення серед них має підрід *Ideobatus*, відомий як малина (*raspberries*), що включає приблизно 200 видів із суттєвою морфологічною та генетичною диференціацією [6]. Червона малина

(*Rubus idaeus* L., 2n=2x=14) – листопадний багаторічний кущ із родини *Rosaceae*, відомий завдяки високій гетерозиготності та різноманіттю рівнів плоїдності [10]. Це важлива ягідна культура, яка поєднує високу антиоксидантну активність зі значним вмістом біологічно активних речовин. Плоди містять широкий спектр корисних фітосполук (антоціани, катехіни, саліцилова та аскорбінова кислоти, рибофлавін, кверцетин та ін.),

які обумовлюють їх високу харчову та функціональну цінність [5]. Крім того, екстракти малини демонструють протипухлинний потенціал, зокрема відносно клітин шлунка та товстого кишківника [13].

Дослідження генетичного різноманіття малини має вагоме значення як для збереження природних ресурсів та оцінювання спорідненості популяцій, так і для селекційних програм, зокрема під час добору батьківських форм для гібридизації [9]. Це також важливо для захисту прав селекціонерів рослин з метою зменшення кількості неправильно маркованих рослин на ринку або незаконного розмноження [18]. Сучасна система захисту сортів рослин базується здебільшого на їх морфологічному описі, однак морфологічні ознаки, хоч і залишаються корисним інструментом, обмежені через низький рівень поліморфізму та залежність від умов середовища. З огляду на це, дедалі ширшого застосування у програмах селекції та схемах сертифікації рослинного матеріалу набувають молекулярні маркери, які уможливають ідентифікацію кожного генотипу на будь-якій стадії розвитку, незалежно від факторів навколишнього середовища, які можуть впливати на фенотип. Рівень подібності між отриманими молекулярними профілями може слугувати основою для визначення генетичних відносин між досліджуваними зразками [11, 14].

Оскільки малина розмножується вегетативно, молекулярна характеристика генотипів може бути надійним орієнтиром для сертифікації та контролю її розмноження і розповсюдження.

Для ідентифікації сортів успішно використовують різні види ДНК-маркерів, кожен з яких має свої переваги й обмеження. У дослідженнях роду *Rubus* застосовували алозими [6], поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (RFLP) [19], випадково ампліфіковані поліморфні ДНК (RAPD) [10, 20], поліморфізм ампліфікованих фрагментів (AFLP) [10], мінісателіти [13], мікросателіти [18] та ISSR-маркери [4, 7].

ISSR-маркери (*Inter Simple Sequence Repeat*) було запропоновано Zietkiewicz et al. [21] і з успіхом застосовано для багатьох плодових культур (каштан, полуниця, картопля, шовковиця та ін.) [7]. Вони базуються на ампліфікації ділянок між мікросателітами, що рівномірно поширені по всьому геному. ISSR-маркери характеризуються високою відтворюваністю та здатністю виявляти вищий рівень поліморфізму порівняно з RAPD завдяки більш жорстким умовам ампліфіка-

ції та довшим праймерам [16]. Вони також є економічнішими й простішими у використанні, ніж AFLP, і не потребують попереднього знання нуклеотидних послідовностей, як у випадку SSR [17].

Ефективність ISSR-маркерів у вивченні різноманіття диких і культурних форм малини підтверджено рядом досліджень. Зокрема, Sekic and Erdem [4] проаналізували 19 диких генотипів з Чорноморського регіону Туреччини та виявили високу варіабельність профілів ампліфікації. Отримані дендрограми дали змогу розділити зразки на дві основні групи, що підтвердило придатність ISSR для класифікації генотипів. Подібні дослідження з оцінювання генетичного різноманіття дикої малини за використання 12 ISSR-маркерів було проведено в західних регіонах Каспійського моря й доведено високий їх поліморфізм (на рівні 77 % – від 33 до 100 %) [9].

Завдяки простоті, низькій вартості та високій відтворюваності ISSR-маркери стали потужним інструментом для геномного картування, філогенетичних досліджень та селекції [22].

Отже, застосування ISSR-маркерів відкриває нові можливості у вивченні генетичної структури малини, визначенні ступеня спорідненості сортів і ліній та сприяє формуванню ефективних селекційних стратегій для створення конкурентоспроможних сортів.

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

Матеріал і методи дослідження. Об'єктом досліджень слугували 12 сортів малини: 6 сортів, які зареєстровано в державному реєстрі рослин, придатних для поширення в Україні (Благородна, Брусвяна, Космічна, Новокітаївська, Осіння, Промінь) [2], 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 із свіжого рослинного матеріалу, використовували молоді листки малини. ДНК виділяли за використання СТАВ-буферу [3].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за використання термоциклера «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems, США). Реакційна суміш для ПЛР (10 мкл) містила 1×ПЛР-буфер

(67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 17 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % Tween-20), 0,2 mM dNTP, 1 од. Taq-полімерази, 20 нг геномної ДНК, 2,0 mM MgCl_2 та 0,4 мкМ відповідного праймера.

Умови ампліфікації були наступними: початкова денатурація – 4 хв за 94 °C; 32 цикли: денатурація – 30 с за 94 °C, випалювання – 30 с за 52 °C (для динуклеотидних праймерів) та 58 °C (для тринуклеотидних), елонгація – 2 хв за 72 °C; кінцева елонгація – 5 хв за 72 °C.

Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР проводили в 2 % агарозному гелі з буфером TBE (108 г Трис, 55 г борної кислоти, 20 мл EDTA) за наявності бромистого етидію за напруги 110 В. Отримані спектри ампліфікації візуалізували в УФ-світлі за довжини хвилі 270 нм. Молекулярну масу ПЛР-про-

дуктів визначали, використовуючи маркер GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва).

Кожну смугу (бенд) на електрофореграмі розглядали як окремих генетичний локус. Поліморфними вважали фрагменти ДНК, які були наявними у спектрах не всіх сортів. Отримані ISSR-патерни було переведено у бінарний вигляд (наявність фрагмента приймали за 1, відсутність – за 0) і використано для визначення рівня генетичного поліморфізму 12 сортів малини, встановлення генетичних дистанцій та кластерного аналізу.

З метою підбору інформативних ISSR-маркерів для аналізу геному малини було проведено тестування 31 праймера – 21 з динуклеотидною короною послідовністю та 10 з тринуклеотидною (табл. 1).

Таблиця 1 – Ефективність ампліфікації ISSR-праймерів з ДНК малини

Праймер	Мотив	Ефективність ампліфікації**
$(\text{AG})_8\text{YG}^*$	$(\text{AG})_n/(\text{GA})_n$	4
$(\text{AG})_7\text{YT}$		3
$(\text{AG})_8\text{G}$		4
$(\text{AG})_8\text{T}$		3
$(\text{AG})_9\text{C}$		4
$(\text{GA})_8\text{C}$		3
$(\text{GA})_8\text{T}$		3
$(\text{AC})_9\text{C}$	$(\text{AC})_n/(\text{CA})_n$	3
$(\text{AC})_8\text{G}$		3
$(\text{AC})_8\text{C}$		4
$(\text{AC})_9\text{G}$		2
$(\text{AC})_9\text{T}$		3
$(\text{AC})_8\text{YG}$		3
$(\text{AC})_8\text{YA}$		1
$(\text{CA})_8\text{A}$		3
$(\text{CA})_7\text{RC}$		3
$(\text{CA})_8\text{GT}$		2
$(\text{TC})_8\text{C}$	$(\text{TC})_n/(\text{CT})_n$	2
$(\text{TC})_8\text{G}$		2
$(\text{CT})_8\text{G}$		3
$(\text{CT})_9\text{G}$		3
$(\text{CTC})_6\text{A}$	$(\text{CTC})_6$	2
$(\text{CTC})_6\text{C}$		2
$(\text{AGC})_6\text{G}$	$(\text{AGC})_6$	3
$(\text{AGC})_6\text{C}$		4
$(\text{ACC})_6\text{G}$	$(\text{ACC})_6/(\text{CCA})_6$	4
$(\text{CCA})_6\text{G}$		3
$(\text{GCT})_6\text{A}$	$(\text{GCT})_6/(\text{TCG})_6$	2
$(\text{TCG})_6\text{G}$		2
$(\text{GTG})_6\text{A}$	$(\text{GTG})_6$	4
$(\text{GAG})_6\text{G}$	$(\text{GAG})_6$	4

Примітки: * Y = C або G; R = A або G;

** 1 – відсутність реакції ампліфікації, 2 – дифузні спектри без чітких ПЛР-бендів,

3 – недостатня кількість локусів для аналізу, 4 – чіткі ДНК-патерни.

Генетичні параметри, такі як середня (N_a) та ефективна кількість алелів на локус (N_e), очікувана гетерозиготність (H_e), індекс гетерогенності Шеннона (H'), обчислювали за використання комп'ютерної програми PopGen версії 1.31 [11].

Генетичні дистанції для пар сортозразків обчислювали як коефіцієнти ідентичності – відношення кількості спільних локусів до загальної кількості локусів у двох порівнюваних зразків. Матрицю ідентичності було використано як вхідні дані для кластерного аналізу, який проводили незваженим парно-груповим методом з арифметичним усередненням (UPGMA).

Результати досліджень та обговорення. З метою підвищення специфічності випалювання олігонуклеотидних праймерів та отримання чітких продуктів ампліфікації до 3'-кінця кожного праймера було додано 1–2 селективні нуклеотиди. Частина використаних праймерів у якірній ділянці мали вирожені нуклеотиди, наприклад, (GA)8YT або (CA)7RC (де Y = C або G; R = A або G). Такий підхід дав змогу проводити аналіз ефективності ампліфікації окремих повторів, а також покращувати ISSR-спектри завдяки введенню селективних ділянок різної довжини. Початкове тестування проводили за однотипних умов ампліфікації, які різнилися лише за температурою випалювання праймерів: 52 °C – для динуклеотидних та 58 °C – для тринуклеотидних.

Отримані спектри за якістю ампліфікації умовно можна розділити на 4 групи: 1 – продукти ампліфікації відсутні; 2 – дифузні спектри без чітких ПЛР-бендів, 3 – чіткі амплікони, але невелика їх кількість, 4 – чіткі ДНК-патерни з достатньою для подальшого аналізу кількістю ПЛР-локусів. Проведений скринінг дав змогу зробити певні узагальнення для спрямованого підбору ISSR-праймерів для ампліфікації ДНК малини.

Ефективність ампліфікації міжмікросателітних послідовностей малини залежала як від типу використаного мотиву, так і селективної ділянки. Наприклад, у випадку всіх праймерів з динуклеотидними мотивами (AG) $_n$ /(GA) $_n$, незалежно від якірної ділянки, отримано чіткі ДНК-патерни. У разі тестування праймерів з мотивами (AC) $_n$ /(CA) $_n$ отримано ISSR-спектри з усіма описаними вище типами спектрів.

Ефективність ампліфікації в цьому випадку залежала від нуклеотидного складу якірної ділянки. З-поміж ISSR-праймерів з тринуклеотидною короною послідовністю задовільних спектрів не отримано для праймерів (CTC) $_6$ та (GCT) $_6$ /(TCG) $_6$.

За результатами скринінгу 31 праймера для подальшого молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму сортів малини було обрано 4 динуклеотидні ISSR-праймери з послідовностями (AG) $_8$ YG, (AG) $_9$ C, (AG) $_9$ C і (AC) $_8$ C та 3 тринуклеотидні праймери: (ACC) $_6$ G, (GTG) $_6$ A і (GAG) $_6$ G. Приклади отриманих спектрів ампліфікації ISSR-PCR з ДНК 12 сортів малини наведено на рисунку 1 (а, б, в).

Всього за використання чотирьох ди- та тринуклеотидних ISSR-праймерів отримано 77 продуктів ампліфікації (ПЛР-локусів), 64 з яких виявилися поліморфними у досліджених сортах малини (табл. 2). Загальна кількість ПЛР-локусів та кількість поліморфних локусів варіювали залежно від використаного праймера. Найвищі значення цих показників за аналізу ДНК 12 сортів малини було отримано для праймерів (AG) $_9$ C і (GTG) $_6$ A – 13 і 12 відповідно. Найменші значення спостерігали за використання праймерів (AG) $_8$ YG і (GAG) $_6$ G – 9 і 6 відповідно. Середній рівень поліморфізму, обчислений за аналізу семи ISSR-праймерів, становив 81,78 % та був співставним із середнім рівнем поліморфізму RAPD-праймерів, який дослідили раніше [8].

Таблиця 2 – Загальна характеристика ISSR-спектрів з ДНК малини

Праймер	Загальна кількість локусів	Кількість поліморфних локусів	Рівень поліморфізму, %
(AG) $_9$ C	13	12	92,30
(AG) $_8$ YG	9	6	66,67
(AG) $_8$ G	11	9	81,81
(AC) $_8$ C	11	10	90,90
(GTG) $_6$ A	13	12	92,31
(GAG) $_6$ G	9	6	66,67
(AGC) $_6$ C	11	9	81,82
Σ	77	64	81,78

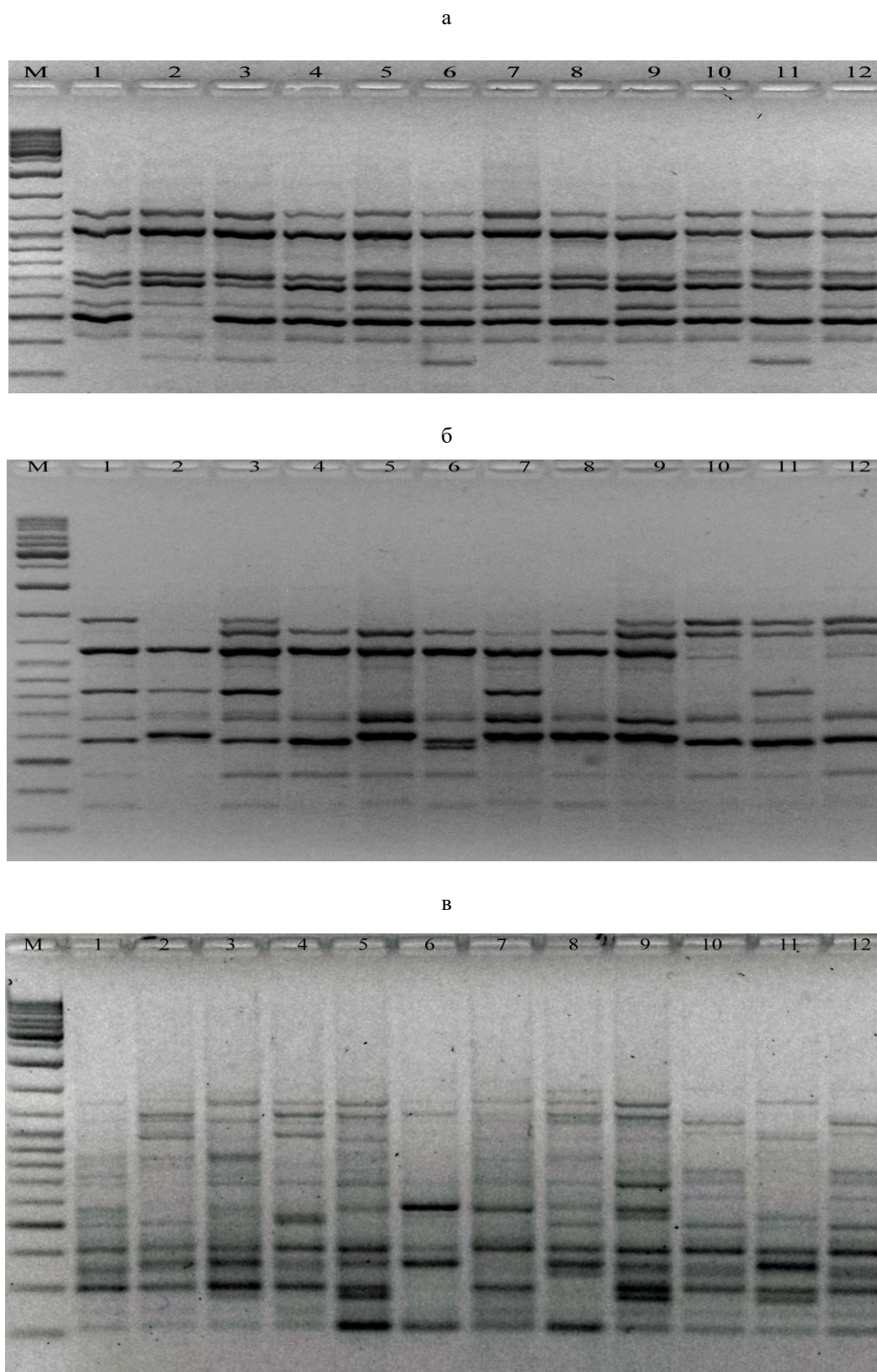


Рис. 1. Електрофореграми розділення продуктів ампліфікації ISSR-PCR з праймерами $(GAG)_6G$ (а), $(ACC)_6G$ (б) та $(AG)_8YG$ (в) для 12 сортів малини: М – молекулярний маркер GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва), 1–12 – досліджені сорти малини.

Молекулярний розмір отриманих ПЛР-продуктів знаходився у діапазоні 235–1940 п. н. залежно від нуклеотидної послідовності використаного праймера. У досліджених сортів малини переважали амплікони з середнім розміром 500–1500 п. н., їх частка становила 76,92 %. Найменшу частку становили високомолекулярні продукти ампліфікації – 3,85 %. Амплікони з розміром < 500 п. н. становили 19,23 %.

За частотою розподілу ампліконів у ISSR-спектрах досліджених сортів отримано наступні результати. Частка ампліконів, представлених з низькою частотою ($\geq 0,2$), становила 32,05 %, середньою ($\geq 0,5$) – 29,49 %, високою ($\geq 0,9$) – 38,46 %; 18 ампліконів (23,08 %) були наявні у спектрах всіх сортів.

У таблиці 3 наведено основні показники генетичної мінливості досліджених сортів.

Обраховані середні значення показників генетичної мінливості дослідженої вибірки сортів малини становили: середня кількість алелів на праймер – 1,795, ефективна

кількість алелів – 1,44, очікувана гетерозиготність та індекс гетерогенності Шеннона – 0,262 і 0,398 відповідно. Ці значення були нижчими, ніж отримані за використання маркерів RAPD-PCR [8].

Найбільша середня кількість алелів була характерна для праймера (AG)₉C і становила 1,966. Ефективна кількість алелів була найвищою за використання праймера (AC)₈C – 1,515. Найвищий рівень очікуваної гетерозиготності (He) виявлено за праймером (AG)₉C (0,331), найнижчий – за праймером (AG)₈YG (0,217). Значення індексу I варіювали від 0,332 до 0,503.

Аналіз генетичних взаємовідносин між дослідженими сортами малини проводили за розрахунку індексів генетичної ідентичності і генетичних відстаней за Неем (табл. 4). Середнє значення генетичних дистанцій та індексу генетичної спорідненості між сортами за даними ISSR-аналізу становило 0,385 і 0,683 відповідно.

Таблиця 3 – Значення основних показників генетичної мінливості досліджених сортів малини за поліморфізмом ISSR-маркерів

Праймер	Na	Ne	I	He
(AG) ₉ C	1,966	1,543	0,503	0,331
(AG) ₈ YG	1,667	1,361	0,332	0,217
(AG) ₈ G	1,818	1,431	0,378	0,250
(AC) ₈ C	1,909	1,515	0,460	0,305
(GTG) ₆ A	1,786	1,355	0,362	0,229
(GAG) ₆ G	1,556	1,413	0,338	0,233
(AGC) ₆ C	1,727	1,448	0,379	0,255
Σ	1,795±0,050	1,440±0,040	0,398±0,028	0,262±0,021

Таблиця 4 – Генетичні взаємовідносини між дослідженими сортами малини, розраховані за поліморфізмом ISSR-маркерів (вище діагоналі – індекси генетичної ідентичності, нижче – генетичні відстані)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	****	0,740	0,805	0,740	0,584	0,636	0,662	0,610	0,714	0,701	0,740	0,701
2	0,300	****	0,727	0,662	0,688	0,636	0,766	0,636	0,558	0,623	0,584	0,675
3	0,216	0,318	****	0,727	0,675	0,701	0,727	0,675	0,649	0,740	0,597	0,792
4	0,300	0,412	0,318	****	0,662	0,818	0,714	0,688	0,792	0,623	0,792	0,701
5	0,537	0,373	0,392	0,412	****	0,688	0,740	0,766	0,636	0,701	0,636	0,571
6	0,452	0,452	0,354	0,200	0,373	****	0,740	0,688	0,714	0,623	0,740	0,701
7	0,412	0,266	0,318	0,336	0,300	0,300	****	0,688	0,636	0,675	0,636	0,701
8	0,493	0,452	0,392	0,373	0,266	0,373	0,373	****	0,636	0,545	0,610	0,675
9	0,336	0,582	0,431	0,232	0,452	0,336	0,452	0,452	****	0,701	0,896	0,571
10	0,354	0,472	0,300	0,472	0,354	0,472	0,392	0,606	0,354	****	0,701	0,662
11	0,300	0,537	0,515	0,232	0,452	0,300	0,452	0,493	0,109	0,354	****	0,571
12	0,354	0,392	0,232	0,354	0,559	0,354	0,354	0,392	0,559	0,412	0,559	****

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

Розмах генетичних дистанцій між дослідженими сортами коливався від 0,109 (між сортами Космічна і С5) до 0,606 (між сортами С1 і Брусвяна), а індексів генетичної спорідненості – 0,896 і 0,545 між цими самими сортами відповідно.

На підставі розрахунку індексів генетичної ідентичності між дослідженими сортами малини проведено кластерний аналіз та побудовано дендрограму генетичних взаємовідносин за поліморфізмом 7 ISSR-праймерів (рис. 2).

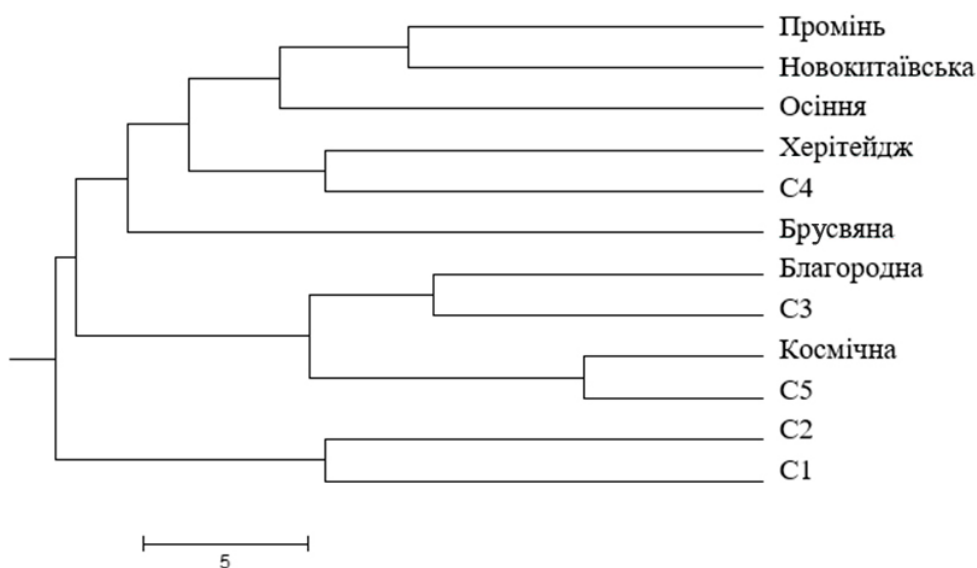


Рис. 2. Дендрограма генетичних взаємовідносин між дослідженими сортами малини, побудована за поліморфізмом спектрів ампліфікації ISSR-PCR.

Як видно із дендрограми, генотипи за ступенем генетичної спорідненості об'єднуються в 2 кластери. До першого кластера входять шість сортів: Промінь, Новокітаївська, Осіння, Херітейдж, С4 і Брусвяна, з яких Промінь і Новокітаївська – значно ближчі між собою ($D=0,216$). Другий кластер сформували 2 підкластери: I – сорти Благородна, С3, Космічна та С5, II – С1 і С2. Найвищий рівень генетичної спорідненості виявлено між сортами Космічна та С5 ($D=0,109$), що збігається з даними, отриманими раніше за маркерами RAPD-PCR [8].

Сорти С1 і С2 не утворюють тісних груп зчеплення з іншими сортами, їх можна рекомендувати як батьківські форми під час складання схем схрещування з іншими сортами.

Висновки. Вперше для 12 сортів малини, які культивують в Україні, проведено аналіз генетичної структури за маркерами ISSR-PCR і виявлено високий рівень їх поліморфізму. Середня кількість алелів на локус (N_a) для досліджених 12 сортів становила 1,795, середнє значення ефективного числа алелів на локус (N_e) – 1,44,

середнє значення індексу гетерогенності Шеннона – 0,398, середнє значення очікуваної гетерозиготності – 0,262. Це підтверджує високу інформативність методу мультилокусного ДНК-профілювання ISSR-PCR для генетичної ідентифікації сортів малини.

Розмах генетичних дистанцій між дослідженими сортами коливався від 0,109 (між сортами Космічна і С5) до 0,606 (між сортами С1 і Брусвяна), а індексів генетичної спорідненості – від 0,896 до 0,545 між цими самими сортами відповідно.

REFERENCES

1. Agrarians together. Catalog of plant cultivars. Available at: <https://agrarii-razom.com.ua/culture-varieties-catalog/malyna>
2. State Register of Plant Cultivars Suitable for Distribution in Ukraine in 2019. 2024. Available at: <https://minagro.gov.ua/file-storage/reystro-sativ-roslin>
3. Abdel-Latif, A., Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods. no. 13 (1). DOI: 10.1186/s13007-016-0152-4.
4. Cekic, C., Calis, O., Ozturk, E.S. (2018). Genetic diversity of wild raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.) in North Anatolia based on ISSR markers.

- Appl. Ecol. Environ. Res. no. 16 (5), pp. 6835–6843. DOI: 10.15666/aecer/1605_68356843.
5. Cosme, F., Pinto, T., Aires, A., Morais, M.C., Bacelar, E., Anjos, R., Ferreira-Cardoso, J., Oliveira, I., Vilela, A., Gonçalves, B. (2022). Red Fruits Composition and Their Health Benefits – A Review. *Foods*. Vol. 11(5), 644 p. DOI: 10.3390/foods11050644
 6. Cousineau, J.C., Donnelly, D.J. (1992). Use of isoenzyme analysis to characterize raspberry cultivars and detect cultivar mislabeling. *HortScience*. Vol. 27, pp. 1023–1025.
 7. Debnath, S.C. (2008). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers and Pedigree Information to Assess Genetic Diversity and Relatedness Within Raspberry Genotypes. *International Journal of Fruit Science*. Vol. 7(4), pp. 1–17. DOI: 10.1080/15538360802003159
 8. Dyman, N.O., Karpuk, L.M. (2025). Assessment of genetic diversity of raspberry cultivars using RAPD markers. *Scientific Papers of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet*. Vol. 31, pp. 38–46. DOI: 10.47414/np.32.2024.325369
 9. Fatemi, M., Estaji, A., Ghanbari, A., Torabi Giglou, M., Jamali, M. (2025). Evaluation of genetic diversity of wild raspberry genotypes in the western areas of the Caspian Sea by ISSR molecular markers. *Journal of Genetic Resources*. Vol. 11(1), pp. 98–104. DOI: 10.22080/jgr.2025.28406.1420
 10. Graham, J., McNicol, R.J. (1995). An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 90, pp. 1128–1132.
 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. Kollmann, J., Steinger, T., Roy, B.A. (2000). Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. *Amer. J. Bot.* Vol. 87, pp. 1592–1598.
 13. Kula, M., Majdan, M., Głod, D., Krauze Baranowska, M. (2016). Phenolic composition of fruits from different cultivars of red and black raspberries grown in Poland. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 52, pp. 74–82. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.08.003
 14. Noli, E., Teriaca, M.S., Sanguineti, M.C., Conti, S. (2008). Utilization of SSR and AFLP markers for the assessment of distinctness in durum wheat. *Mol. Breed.* Vol. 22, pp. 301–313. DOI: 10.1007/s11032-008-9176-4.
 15. Nybom, H. (1995). Evaluation of interspecific crossing experiments in facultatively apomictic blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*) using DNA fingerprinting. *Hereditas*. Vol. 122, pp. 57–65.
 16. Qian, W., Ge, S., Hong, D.Y. (2001). Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulate* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 102, pp. 440–449.
 17. Reddy, P.M., Sarla, N., Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. Vol. 128, pp. 9–17.
 18. Šiško, M., Ivančič, A., Šušek, A. (2021). Determination of Raspberry Cultivar Authenticity Based on Multiplexed Microsatellite Fingerprinting. *International journal of fruit science*. Vol. 21 (1), pp.1018–1029. DOI:10.1080/15538362.2021.1975011
 19. Waugh, R., van de Ven, W.T.G., Phillips, M.S., Powell, W. (1990). Chloroplast DNA diversity in the genus *Rubus* (Rosaceae) revealed by Southern hybridization. *Plant Syst. Evol.* Vol. 172, pp. 65–75.
 20. Weber, C.A. (2003). Genetic diversity in black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) detected by RAPD markers. *HortScience*. Vol. 38, pp. 269–272.
 21. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Damian, L. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. Vol. 20(2), pp. 176–183.
 22. Zinodini, A., Farshadfar, M., Safari, H., Moradi, F., Shirvani, H. (2013). Study of genetic relationships of some mint species using ISSR markers. *Crop Biotechnology*. Vol. 5, pp. 11–21. DOI: <https://doi.org/10.1001/1.22520783.1392.3.5.2.7>.

Molecular-genetic characteristics of raspberry varieties based on ISSR-PCR markers

Dyman N., Karpuk L.

For the first time 12 raspberry varieties cultivated in Ukraine were analyzed for their genetic structure using ISSR-PCR markers, and the effectiveness of using this type of marker for studying genetic polymorphism and the relatedness of raspberry varieties was evaluated. DNA extraction was performed from fresh plant material using young raspberry leaves. DNA was extracted using a CTAV buffer.

In order to select informative ISSR markers for raspberry genome analysis, 31 primers were tested – 21 with a dinucleotide core sequence and 10 with a trinucleotide sequence. Based on the results of primer screening, four dinucleotide ISSR primers, (AG)₈YG, (AG)₉C, (AC)₈C, and (AG)₉C, and three trinucleotide primers, (ACC)₆G, (GTG)₆A, and (GAG)₆G, were selected for further molecular-genetic analysis of varietal polymorphism.

A high level of polymorphism of ISSR markers was identified in raspberries. The average number of alleles per locus was 1.795, the average effective number of alleles per locus was 1.44, the average Shannon diversity index was 0.398, and the average

expected heterozygosity was 0.262. The range of genetic distances between the studied varieties ranged from 0.109 to 0.606, and genetic relatedness indices ranged from 0.896 to 0.545.

It was concluded that the ISSR-PCR multilocus DNA profiling method is highly informative for the genetic identification of raspberry varieties.

The ISSR markers studied may be useful for characterizing the genetic structure, distinguishing between raspberry varieties, and selecting the most promising options for crossing.

Key words: raspberry, *Rubus idaeus* L., polymorphism, ISSR-PCR markers, genetic differentiation.



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>