

## Оцінювання генетичного різноманіття сортів малини за використання RAPD-PCR маркерів

 Н. О. Димань,  Л. М. Карпук\*

Білоцерківський національний аграрний університет, пл. Соборна, 8/1, м. Біла Церква, Київська обл., 09100, Україна, \*e-mail: [lesya\\_karpuk@ukr.net](mailto:lesya_karpuk@ukr.net)

**Мета.** Оцінити ефективність використання RAPD-PCR-маркерів для дослідження генетичного поліморфізму 12 сортів малини, які культивуються в Україні. **Методи.** Виділення ДНК із молодих листків малини за використання СТАВ-буферу. Для добору інформативних RAPD-PCR-маркерів для аналізу геному малини було протестовано 28 праймерів. **Результати.** Доведено високу інформативність методу мультилокусного ДНК-профілювання RAPD-PCR для генетичної ідентифікації сортів малини за використання 7 RAPD-праймерів. З'ясовано, що досліджені сорти малини характеризуються високим рівнем генетичної мінливості за маркерами RAPD-PCR: середня кількість алелів на локус ( $N_a$ ) становила 1,895, середнє значення ефективного числа алелів на локус ( $N_e$ ) – 1,434, середнє значення індексу гетерогенності Шеннона – 0,419, середнє значення очікуваної гетерозиготності – 0,270. Середні значення генетичних дистанцій та індексу генетичної спорідненості між сортами малини становили 0,488 і 0,696 відповідно. **Висновки.** Досліджені RAPD-маркери можуть бути корисними не тільки для характеристики генетичної структури, розрізнення сортів малини та підбору їх найперспективніших варіантів для схрещування, а й для вирішення юридичних питань на кшталт оцінювання порушень прав селекціонерів.

**Ключові слова:** *Rubus*; малина; RAPD-PCR-маркери; поліморфізм; селекція.

### Вступ

Малина (*Rubus idaeus* L.: *Rosaceae*) є важливою комерційною ягідною культурою, яка поширена в усіх помірних регіонах світу. Завдяки багатому біохімічному складу і корисним властивостям малину широко застосовують у переробній промисловості і кондитерському виробництві. Плоди малини й інші органи рослини (листя, суцвіття, коріння) – джерело цінних речовин, необхідних для здоров'я людини [1]. Виробництво малини в Європі за останні 50 років зросло майже вчетверо.

Багато з найважливіших сучасних комерційних сортів червоної малини походять від гібридів або селекції з дикої природи. Для практичної селекції малини необхідні надійні методи ідентифікації сортів та оцінювання генетичного різноманіття / спорідненості генотипів цієї культури.

Зазвичай ідентифікацію сортів, а також їхню реєстрацію проводять на основі морфологічних характеристик за методикою, запропонованою UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants). Однак морфологічні ознаки не завжди змінюються дискретно, і на їх фенотиповий прояв можуть істотно впливати умови зовнішнього середовища. Використання в генетичній ідентифікації рослин фенотипових маркерів обмежено через їх невелику кількість і неможливість визначення сортової належності рослин на ранніх стадіях розвитку. Крім того, прояв фенотипової ознаки найчастіше визначається епістатичним та плейотропним ефектом взаємодії генів.

Розвиток молекулярної біології уможливив ідентифікацію видів і сортів рослин за допомогою інших засобів, крім морфологічних характеристик. Це сприяло кращому розумінню генетичної архітектури культурних рослин і використанню генетичного різноманіття селекціонерами. Стало можливим встановлювати взаємозв'язки між видами і

сортами й здійснювати більш точну таксономічну класифікацію. Молекулярні методи геномної ідентифікації та паспортизації сортів сільськогосподарських рослин не залежать від умов вирощування та репродукції рослинного матеріалу [2].

Генетичний поліморфізм різних видів рослин і тварин вже тривалий час успішно досліджують за допомогою методів ДНК-фінгерпринту з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Зокрема, генетичне різноманіття малини вивчали, досліджуючи поліморфізми довжин рестрикційних фрагментів (RFLPs) [3], довжин ампліфікованих фрагментів (AFLPs) [4], міжмікросателітних послідовностей (ISSR) [5], простих повторюваних послідовностей (мікросателітів) (SSR) [6], випадково ампліфікованих ділянок ДНК (RAPD) [2, 7].

Серед перших ПЛР-маркерів, застосованих для малини, були RAPD-маркери. У генетиці рослин їх поліморфізм активно використовують, починаючи з 90-х років минулого століття, передусім для вивчення генетичного різноманіття мало вивчених таксономічних груп. Для деяких видів рослин з його допомогою побудовано генетичні карти. Метод швидкий і простий для виконання, універсальний для різних видів і родів живих організмів, має порівняно низьку собівартість [8].

RAPD-маркери було використано для визначення генотипів та уточнення родоводів селекційних сортів малини звичайної [9], малини західної [7], дикорослих популяцій *R. idaeus* [10]. Корейські дослідники RAPD-аналіз застосували для уточнення походження місцевого сорту ожини КСВ (*Korean Cultivated Bramble* – ожина, культивована в Кореї) [11]. Литовські вчені за допомогою маркерів RAPD-PCR дослідили генетичну структуру 19 популяцій *R. idaeus* із різних агрокліматичних зон країни. Всього було проаналізовано 315 зразків малини й підтверджено, що екологічні чинники мають значний вплив на генетичне різноманіття досліджених популяцій [12].

Незважаючи на значний прогрес молекулярно-генетичних досліджень ягідних культур, і, зокрема, малини у світі, в Україні ця культура за допомогою ДНК-маркерів не досліджувалася.

**Мета досліджень** – оцінити ефективність використання RAPD-маркерів для дослідження генетичного поліморфізму та спорідненості сортів малини, які культивуються в Україні.

### Матеріали та методика досліджень

Було досліджено 12 сортів малини: 6 сортів, які зареєстровано в Державному реєстрі рослин, придатних для поширення в Україні ('Благородна', 'Брусвяна', 'Космічна', 'Новокитаївська', 'Осінь', 'Промінь') [13], 5 сортів, які було виключено з державного реєстру (С1, С2, С3, С4, С5) [14], і один сорт американської селекції, який садівники часто обирають завдяки високій врожайності, привабливому зовнішньому вигляду, смачним ароматним ягодам ('Херітейдж'). Кожного сорту було придбано по п'ять кущів і висаджено в умовах ТОВ «Еліта» (сmt Терезине, Київська обл.).

Для виділення ДНК використовували молоді листки малини. Їх збирали окремо з кожного сорту, поміщали в рідкий азот й витримували до екстракції ДНК. ДНК виділяли за використання СТАВ-буферу [15]. Після цього вимірювали концентрацію ДНК і зберігали препарат за температури  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

З метою підбору інформативних RAPD-маркерів для аналізу геному малини нами було проведено тестування 28 праймерів, 18 з яких відповідали номенклатурі компанії Operon Technology (США), а 10 інших (серія RAP) мали довільні нуклеотидні послідовності розміром 10–16 п. н. (табл. 1).

RAPD-аналіз генетичного поліморфізму сортів малини проводили за використання ампліфікатора «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems, США). Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила: 1×ПЛР-буфер (67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01 % Tween-20), 0,2 мМ dNTP, 1 од. Tag-полімерази, 20 нг геномної ДНК, 2,0 мМ  $\text{MgCl}_2$  та 0,3 мкМ відповідного праймера.

## Нуклеотидні послідовності використаних RAPD-праймерів

Праймер	Послідовність, 5→3	Праймер	Послідовність, 5→3
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPH-07	CTGCATCGTG
OPA-07	GAAACGGGTG	OPT-17	CCAACGTCGT
OPA-09	GGGTAACGCC	OPB-03	CATCCCCCTG
OPA-10	GTGATCGCAG	OPB-11	GTAGACCCGT
OPA-11	CAATCGCCGT	RAP-02	GCCAGCTGTACG
OPA-12	TCGGCGATAG	RAP-09	GCAAGTTCAGCCTGG
OPA-17	GACCGCTTGT	RAP-10	CCGAATTCGC
OPA-18	AGGTGACCGT	RAP-11	GGACCCCGCC
OPAD-07	CCCTACTGGT	RAP-12	CGATTTGTCC
OPAD-10	AAGAGGCCAG	RAP-13	CTACATCAACCGCGT
OPAA-12	GGACCTCTTG	RAP-14	GCATGGATAATAAACG
OPAA-16	GGAACCCACA	RAP-15	GTGTCCGGGAG
OPZ-04	AGGCTGTGCT	RAP-17	ATCCAGTCGGC
OPZ-15	CAGGGCTTTC	RAP-24	CAGTAGGTAGAGCAT

Умови ампліфікації були такими: 4 хв за 94 °С; 38 циклів: 45 с за 94 °С, 45 с за 36 °С, 2 хв за 72 °С; 5 хв за 72 °С.

Для електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації використовували 2 %-ий агарозний гель завдовжки 15–20 см. Отримані спектри ампліфікації візуалізували в УФ-світлі за довжини хвилі 270 нм. Молекулярну масу ПЛР-продуктів визначали, використовуючи маркер GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва) за використання програмного пакету Quantity One (BioRad, США).

Статистичну обробку RAPD-спектрів проводили за допомогою порівняльного аналізу частот RAPD-локусів у досліджуваних сортів малини із застосуванням комп'ютерних програм PopGen 32 і GenAlex 6.4. Для аналізу обирали чіткі та відтворювані в повторних експериментах фрагменти. За кожним праймером було складено бінарні матриці, в яких наявність смуги певного молекулярного розміру в спектрах сортів позначали як 1, відсутність – 0. Для позначення RAPD-локусу використовували назву праймера, за використання якого його отримано, і розмір локусу в парах нуклеотидів. При цьому кожену смугу (бенд) на електрофореграмі розглядали як окремий генетичний локус. За використання частот локусів було визначено основні показники генетичної мінливості досліджених сортів малини: середньої ( $N_a$ ) та ефективної кількості алелів на локус ( $N_e$ ), очікуваної гетерозиготності ( $H_e$ ) та індексу гетерогенності Шеннона ( $I$ ).

### Результати досліджень

Скринінг 28 праймерів дав змогу відібрати для подальшої роботи 7 праймерів: OPA-07, OPAD-10, RAP-02, RAP-10, RAP-11, RAP-15 та RAP-24. Зазначені праймери уможливили отримання спектрів ампліфікації з чіткими та відтворюваними бендами. У результаті досліджень виявили чинники, які найбільшою мірою впливали на якість спектрів: концентрація хлориду магнію, концентрація препарату ДНК, концентрація праймера у реакційній суміші та кількість циклів ампліфікації.

Сумарно за використання 7 праймерів було отримано 110 продуктів ампліфікації, 92 з яких (82,49 %) були поліморфними у досліджених сортів малини (табл. 2). Приклади отриманих спектрів ампліфікації RAPD-PCR з ДНК 12 досліджуваних сортів малини наведено на рисунках 1–4.

## Загальна характеристика RAPD-спектрів з ДНК малини

Праймер	Загальна кількість локусів	Кількість поліморфних локусів	Рівень поліморфізму, %
RAP-11	14	11	78,57
OPA-07	19	16	84,21
OPAD-10	17	15	88,24
RAP-24	18	15	83,33
RAP-02	15	13	86,67
RAP-15	20	17	85,00
RAP-10	7	5	71,43
$\Sigma$	110	92	82,49

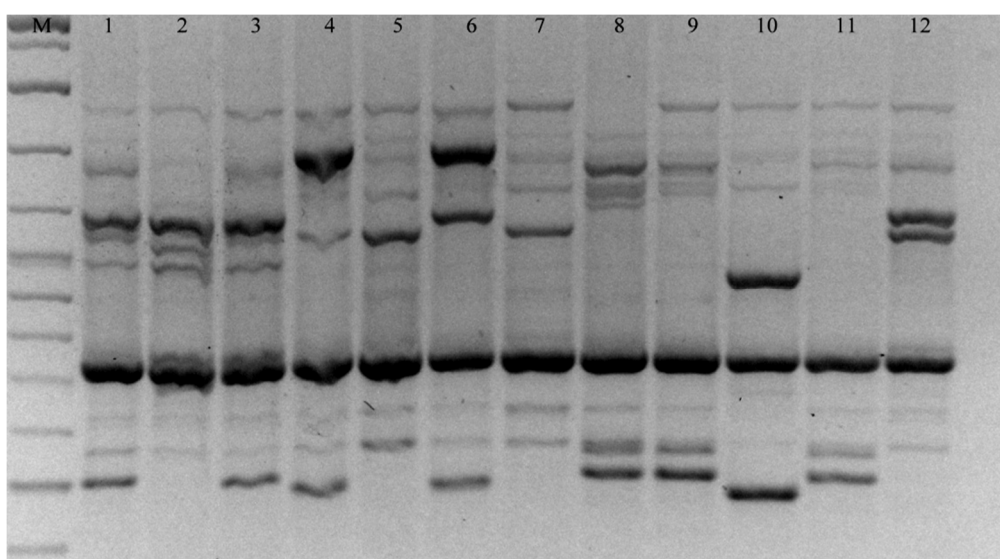


Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації RAPD-PCR з праймером RAP-11: М – маркер молекулярних мас GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва), 1–12 – досліджені сорти малини

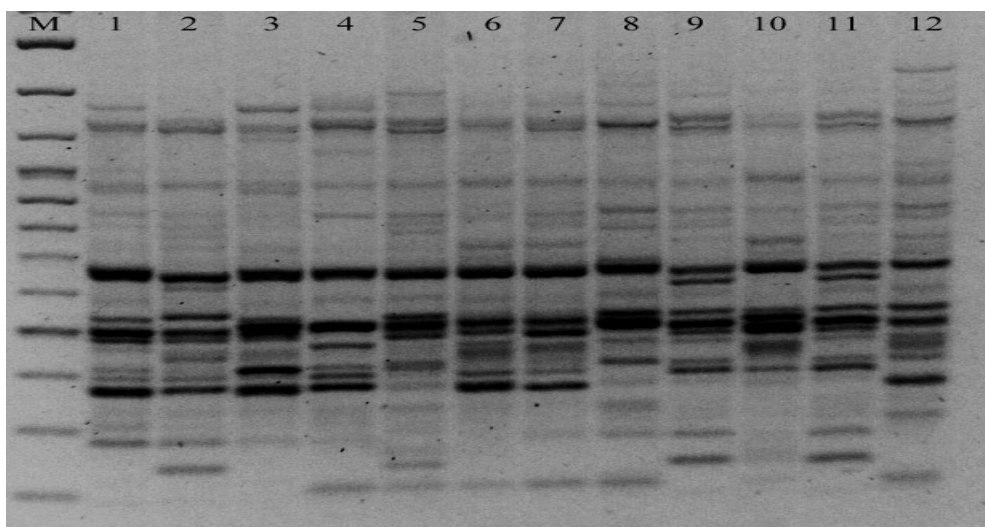
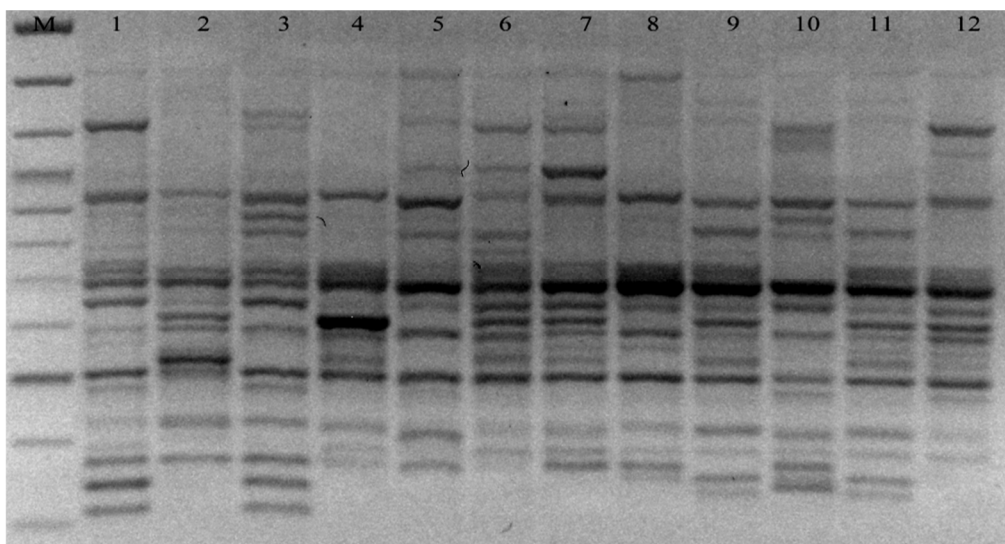
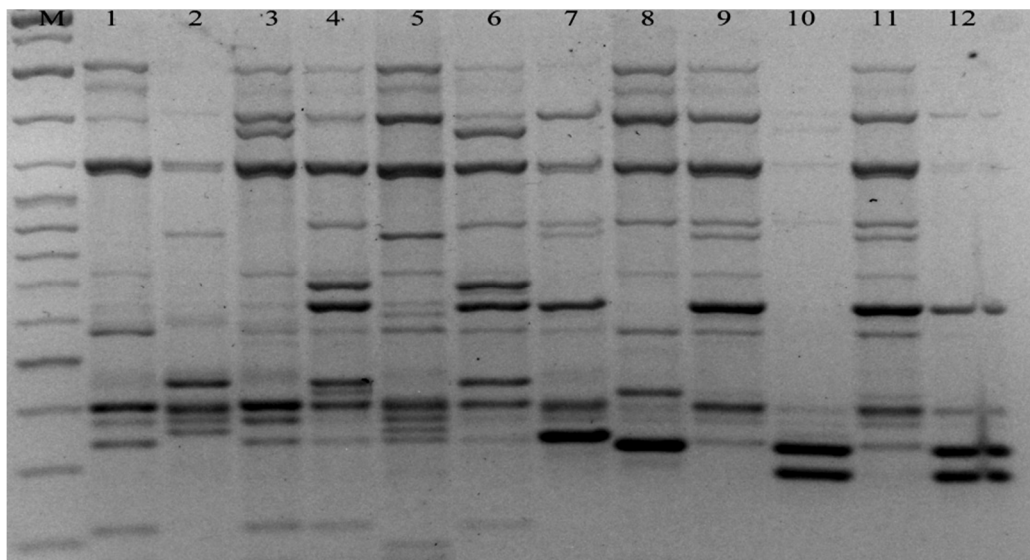


Рис. 2. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації RAPD-PCR з праймером OPAD-10: М – маркер молекулярних мас GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва), 1–12 – досліджені сорти малини

## РОСЛИННИЦТВО



**Рис. 3. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації RAPD-PCR з праймером RAP-24: М – маркер молекулярних мас GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва), 1–12 – досліджені сорти малини**



**Рис. 4. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації RAPD-PCR з праймером OPA-07: М – маркер молекулярних мас GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва), 1–12 – досліджені сорти малини**

Загальна кількість отриманих ДНК-локусів варіювала залежно від використаного праймера у діапазоні від 20 (RAP-15) до 7 (RAP-10). За винятком праймера RAP-10, який показав найменшу кількість поліморфних локусів – 5, спектри з іншими олігонуклеотидами характеризувалися наявністю більш як 10 поліморфних локусів. Максимальну кількість таких ампліконів (17) отримано з праймером RAP-15, мінімальну (11) – з праймером RAP-11. Усі обрані для аналізу генетичного поліморфізму сорти малини праймери показали високий рівень поліморфізму. Для більшості застосованих праймерів цей показник перевищував 80 %.

Наступним етапом роботи було оцінювання ефективності цього методу мультилокусного ДНК-фінгерпринту для визначення рівня генетичного поліморфізму сортів малини, визначення генетичних дистанцій і філогенетичного аналізу. Показники генетичного поліморфізму досліджених сортів представлено в таблиці 3.

Ураховуючи домінантний тип успадкування переважної більшості RAPD-локусів, середня кількість алелів на локус ( $N_a$ ) відображає інформативність окремого праймера за

генетичної диференціації досліджених генотипів. У нашому випадку значення  $N_a$  перевищувало 1,7 для всіх використаних праймерів (середнє значення – 1,895) та варіювало від 1,714 (RAP-10) до 1,950 (RAP-15).

Таблиця 3

## Значення основних показників генетичної мінливості

Праймер	$N_a$	$N_e$	I	$H_e$
RAP-11	1,786±0,114	1,265±0,061	0,307±0,056	0,186±0,038
OPA-07	1,842±0,086	1,334±0,062	0,355±0,049	0,222±0,035
OPAD-10	1,882±0,081	1,501±0,086	0,442±0,059	0,294±0,044
RAP-24	1,833±0,090	1,413±0,074	0,401±0,053	0,259±0,038
RAP-02	1,867±0,091	1,438±0,075	0,429±0,054	0,277±0,038
RAP-15	1,950±0,050	1,499±0,070	0,463±0,044	0,303±0,034
RAP-10	1,714±0,184	1,424±0,170	0,352±0,117	0,237±0,086
Σср	1,895±0,030	1,434±0,030	0,419±0,020	0,270±0,015

Мірою генетичного різноманіття популяції або виду є ефективне число алелів на локус ( $N_e$ ), оскільки це функція від частки поліморфних локусів, кількості алелів на локус і рівномірності розподілу частот алелів. Спектр ефективного числа алелів у досліджених сортів малини знаходився у межах від 1,265 (RAP-11) до 1,501 (OPAD-10). Середнє значення  $N_e$  для використаних у роботі семи RAPD-праймерів становило 1,434.

Оцінювання рівня генетичного поліморфізму досліджених сортів проводили також за показниками очікуваної гетерозиготності ( $H_e$ ) та індексу гетерогенності Шеннона (I). Значення індексу Шеннона варіювало від 0,307 (RAP-11) до 0,463 (RAP-15). Середнє значення I для всіх праймерів становило 0,419.

Гетерозиготність популяції є важливим показником рівня її генетичної мінливості. Вона визначається як відношення кількості локусів, що знаходяться у гетерозиготному стані у всіх особин даної популяції, до загальної кількості досліджених локусів у цих особин. Середнє значення очікуваної гетерозиготності, обчислене за поліморфізмом RAPD-спектрів у досліджених сортів малини, становило 0,270. Найвищий рівень  $H_e$  спостерігали за використання праймера RAP-15 (0,303), найнижчий (0,186) – праймера RAP-11.

Оцінювання генетичних взаємовідносин між дослідженими сортами малини за поліморфізмом 7 RAPD-праймерів проводили за допомогою індексів генетичної ідентичності та генетичних відстаней за  $N_{eem}$  (табл. 4).

Середні значення генетичних дистанцій та індексу генетичної спорідненості між сортами малини становило 0,488 і 0,696 відповідно. Розмах генетичних дистанцій між дослідженими сортами малини становив від 0,012 (між сортами 'Космічна' і С5) до 0,719 (між сортами 'Херітейдж' і 'Осінь'), а індексів генетичної спорідненості – 0,987 і 0,487 між цими ж сортами відповідно.

На підставі розрахунку індексів генетичної ідентичності між дослідженими сортами малини проведено кластерний аналіз та побудовано дендрограму генетичних взаємовідносин за використання незваженого парно-групового методу (UPGMA) за поліморфізмом 7 RAPD-праймерів (рис. 5).

Отримана дендрограма складалася з двох основних кластерів. До першого входили чотири сорти: 'Промінь', 'Новокитаївська', 'Осінь' і 'Брусвяна', з яких 'Промінь' і 'Новокитаївська' були значно ближчими між собою ( $D = 0,122$ ). Інші вісім сортів малини на отриманій дендрограмі належать до другого кластера, в межах якого чітко виділяються два підкластери (I і II). I підкластер сформовано сортами 'Херітейдж', С2, С1 і С4, II підкластер – сортами 'Благородна', С3, 'Космічна' і С5, з яких найближчими були сорти 'Космічна' і С5 ( $D = 0,012$ ).

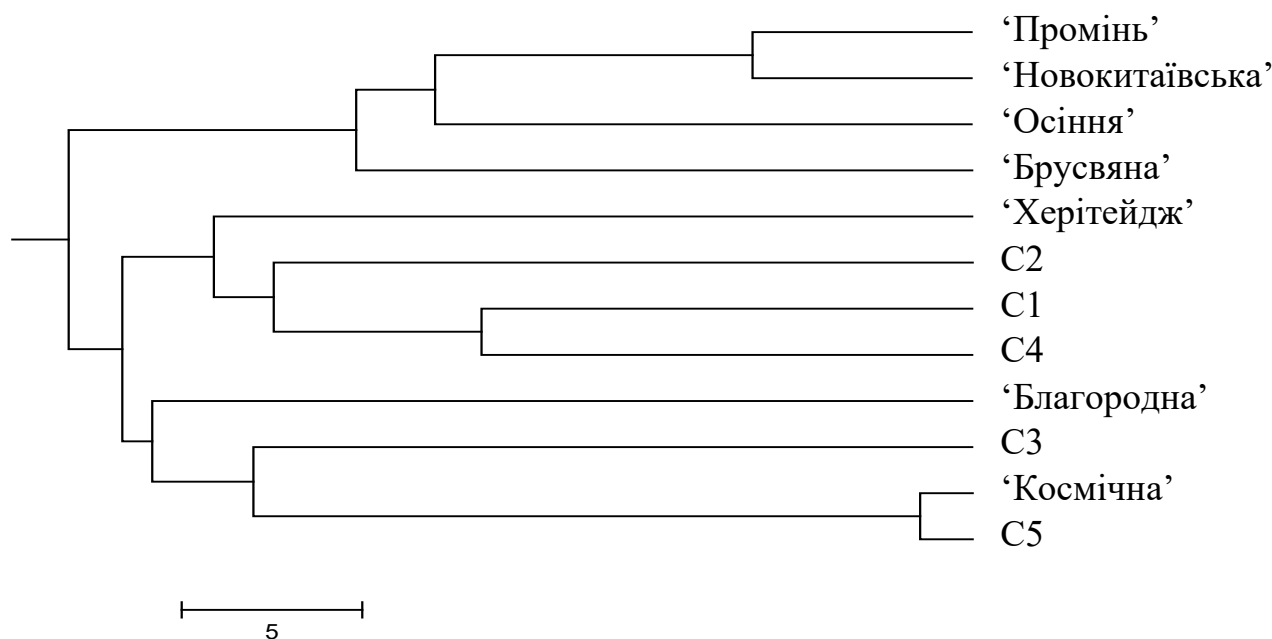
Таблиця 4

**Генетичні взаємовідносини між дослідженими сортами малини,  
обчислені за поліморфізмом RAPD-маркерів**

(вище діагоналі – індекси генетичної ідентичності, нижче – генетичні відстані)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	****	0,628	0,884	0,551	0,551	0,512	0,576	0,666	0,602	0,653	0,615	0,653
2	0,464	****	0,538	0,538	0,615	0,551	0,666	0,500	0,641	0,538	0,653	0,487
3	0,122	0,619	****	0,564	0,641	0,551	0,589	0,628	0,512	0,717	0,525	0,666
4	0,595	0,619	0,572	****	0,538	0,807	0,693	0,628	0,512	0,564	0,500	0,692
5	0,595	0,485	0,444	0,619	****	0,576	0,717	0,628	0,641	0,666	0,653	0,589
6	0,667	0,595	0,595	0,213	0,550	****	0,782	0,538	0,551	0,679	0,538	0,653
7	0,550	0,405	0,528	0,367	0,331	0,245	****	0,576	0,641	0,692	0,628	0,641
8	0,405	0,693	0,464	0,464	0,464	0,619	0,550	****	0,653	0,628	0,641	0,730
9	0,506	0,444	0,667	0,667	0,444	0,595	0,444	0,424	****	0,589	0,987	0,538
10	0,424	0,619	0,331	0,572	0,405	0,386	0,367	0,464	0,528	****	0,576	0,641
11	0,485	0,424	0,643	0,693	0,424	0,619	0,464	0,444	0,012	0,550	****	0,525
12	0,424	0,719	0,405	0,367	0,528	0,424	0,444	0,313	0,619	0,444	0,643	****

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



**Рис. 5. Дендрограма генетичних взаємовідносин  
між дослідженими сортами малини, побудована за поліморфізмом  
спектрів ампліфікації RAPD-PCR**

Вивчення генетичної дивергенції за індексами генетичної спорідненості може бути допоміжним для підбору батьківських форм, придатних для отримання гібридів з більшим гетерозисним ефектом і з більшою сегрегацією під час рекомбінації [16]. У нашому випадку, наприклад, найбільш перспективним варіантом може бути схрещування сортів ‘Херітейдж’ та ‘Осілля’, зважаючи на їх більш ніж 70 %-ву відмітність.

## Висновки

Підтверджено високу інформативність методу мультилокусного ДНК-профілювання RAPD-PCR для генетичної ідентифікації сортів малини.

Сорти малини, які культивуються в Україні, характеризуються високим рівнем генетичної мінливості за маркерами RAPD-PCR. Зокрема, середня кількість алелів на локус (Na) для досліджених 12 сортів становила 1,895, середнє значення ефективного числа алелів на локус (Ne) для використаних у роботі семи RAPD-праймерів – 1,434, середнє значення індексу гетерогенності Шеннона – 0,419, середнє значення очікуваної гетерозиготності – 0,270. Середні значення генетичних дистанцій та індексу генетичної спорідненості між сортами малини становили 0,488 і 0,696 відповідно.

Досліджені RAPD-маркери можуть бути корисними не тільки для характеристики генетичної структури, розрізнення сортів малини та підбору їх найперспективніших варіантів для схрещування, а й для вирішення юридичних питань на кшталт оцінювання порушень прав селекціонерів.

## Використана література

1. Wang Y., Liang J., Luan G. et al. Quantitative analysis of nine phenolic compounds and their antioxidant activities from thirty-seven varieties of raspberry grown in the Qinghai-Tibet Plateau region. *Molecules*. 2019. Vol. 24, Iss. 21. Article 3932. doi: 10.3390/molecules24213932
2. Graham J., McNicol R. J. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995. Vol. 90. P. 1128–1132. doi: 10.1007/BF00222932
3. Keane B., Smith M. K., Rogstad S. H. Genetic variation in red raspberries (*Rubus idaeus* L., *Rosaceae*) from sites differing in organic pollutants compared with synthetic repeat DNA probes. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998. Vol. 17. P. 2027–2034. doi: 10.1002/etc.5620171019
4. Ercisli S., Badjakov I., Kondakova V. et al. AFLP-based genetic relationships in wild and cultivated raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2008. Vol. 22, Iss. 4. P. 907–910. doi: 10.1080/13102818.2008.10817576
5. Cekic C., Calis O., Ozturk E. S. Genetic diversity of wild raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.) in North Anatolia based on ISSR markers. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2018. Vol. 16, Iss. 5. P. 6835–6843. doi: 10.15666/aeer/1605\_68356843
6. Castillo N. R. F., Bassil N. V., Wada S., Reed B. M. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2010. Vol. 46, Iss. 3. P. 246–256. doi: 10.1007/s11627-009-9265-z
7. Weber C. A., Pattison J., Samuelian S. Marker assisted selection for resistance to root rot in red raspberry caused by *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. *Acta Horticulturae*. 2008. Vol. 777. P. 311–316. doi: 10.17660/Acta Hort.2008.777.46
8. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18. P. 6531–6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531
9. Graham J., Woodhead M., Smith K. et al. New insight into wild red raspberry populations using simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2009. Vol. 134, Iss. 1. P. 109–119. doi: 10.21273/JASHS.134.1.109
10. Simlat M., Ptak A., Kula A., Orzel A. Assessment of genetic variability among raspberry accessions using molecular markers. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 2018. Vol. 17, Iss. 5. P. 61–72. doi: 10.24326/asphc.2018.5.6
11. Eu G., Chung B., Bhandopadhyay R. et al. Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2008. Vol. 11, Iss. 1. P. 39–44.



12. Patamsytė J., Kleizaitė V., Čėsniėnė T. et al. The genetic structure of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) populations in Lithuania. *Central European Journal of Biology*. 2010. Vol. 5, Iss. 4. P. 496–506. doi: 10.2478/s11535-010-0034-0
13. Державний реєстр сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 2024 році. URL: <https://minagro.gov.ua/file-storage/reyestr-sortiv-roslin>
14. Аграрії разом. Каталог сортів рослин. URL: <https://agrarii-razom.com.ua/culture-varieties-catalog/malyna>
15. Abdel-Latif A., Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*. 2017. Vol. 13, Iss. 1. Article 1. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4
16. Morales R. G. F., Resende J. T. V., Faria M. V. et al. Genetic similarity among strawberry cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Scientia Agricola*. 2011. Vol. 68, Iss. 6. P. 665–670. doi: 10.1590/S0103-90162011000600010

## References

1. Wang, Y., Liang, J., Luan, G., Zhang, S., Zhang, S., Zhuoma, Y., Xie, J., & Zhou, W. (2019). Quantitative analysis of nine phenolic compounds and their antioxidant activities from thirty-seven varieties of raspberry grown in the Qinghai-Tibet Plateau region. *Molecules*, 24(21), Article 3932. doi: 10.3390/molecules24213932
2. Graham, J., & McNicol, R. J. (1995). An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 1128–1132. doi: 10.1007/BF00222932
3. Keane, B., Smith, M. K., & Rogstad, S. H. (1998). Genetic variation in red raspberries (*Rubus idaeus* L., *Rosaceae*) from sites differing in organic pollutants compared with synthetic repeat DNA probes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 2027–2034. doi: 10.1002/etc.5620171019
4. Ercisli, S., Badjakov, I., Kondakova, V., Atanassov, A., & Todorovska, E. (2008). AFLP-based genetic relationships in wild and cultivated raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22(4), 907–910. doi: 10.1080/13102818.2008.10817576
5. Cekic, C., Calis, O., & Ozturk, E. S. (2018). Genetic diversity of wild raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.) in North Anatolia based on ISSR markers. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(5), 6835–6843. doi: 10.15666/aeer/1605\_68356843
6. Castillo, N. R. F., Bassil, N. V., Wada, S., & Reed, B. M. (2010). Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 46(3), 246–256. doi: 10.1007/s11627-009-9265-z
7. Weber, C. A., Pattison, J., & Samuelian, S. (2008). Marker assisted selection for resistance to root rot in red raspberry caused by *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. *Acta Horticulturae*, 777, 311–316. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.777.46
8. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531–6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531
9. Graham, J., Woodhead, M., Smith, K., Russell, J., Marshall, B., Ramsay, G., & Squire, G. (2009). New insight into wild red raspberry populations using simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1), 109–119. doi: 10.21273/JASHS.134.1.109
10. Simlat, M., Ptak, A., Kula, A., & Orzel, A. (2018). Assessment of genetic variability among raspberry accessions using molecular markers. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 17(5), 61–72. doi: 10.24326/asphc.2018.5.6
11. Eu, G., Chung, B., Bhandopadhyay, R., Yoo, N.-H., Choi, D., & Yun, S. (2008). Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 11(1), 39–44.

12. Patamsytė, J., Kleizaitė, V., Čėsniėnė, T., Rančelis, V., & Žvingila, D. (2010). The genetic structure of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) populations in Lithuania. *Central European Journal of Biology*, 5(4), 496–506. doi: 10.2478/s11535-010-0034-0
13. Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine. (2024). *State register of plant varieties suitable for distribution in Ukraine in 2024*. Retrieved from <https://minagro.gov.ua/file-storage/reyestr-sortiv-roslin>
14. Agrarii Razom. (n. d.). *Catalog of plant varieties*. Retrieved from <https://agrarii-razom.com.ua/culture-varieties-catalog/malyna>
15. Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), Article 1. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4
16. Morales, R. G. F., Resende, J. T. V., Faria, M. V., Andrade, M. C., Resende, L. V., Delatorre, C. A., & Silva, P. R. (2011). Genetic similarity among strawberry cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Scientia Agricola*, 68(6), 665–670. doi: 10.1590/S0103-90162011000600010

UDC 57.085.2:57.082.13:634.71

**Dyman, N. O., & Karpuk, L. M.\*** (2024). Assessment of genetic diversity of raspberry cultivars using RAPD markers. *Scientific Papers of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet*, 32, 74–83. [In Ukrainian]

*Bila Tserkva National Agrarian University, 8/1 Soborna Square, Bila Tserkva, Kyiv region, 09100, Ukraine, \*e-mail: lesya\_karpuk@ukr.net*

**Purpose.** To evaluate the efficiency of RAPD markers for assessing genetic polymorphism of 12 raspberry varieties cultivated in Ukraine. **Methods.** Young raspberry leaves were used for DNA extraction. DNA was extracted using CTAB buffer. In order to select informative RAPD-PCR markers for raspberry genome analysis, we tested 28 primers. **Results.** High informativeness of RAPD-PCR method for genetic identification of raspberry cultivars was confirmed by using 7 RAPD primers. The studied raspberry cultivars had a high level of genetic variability by RAPD-PCR markers: the average number of alleles per locus ( $N_a$ ) was 1.895, the average value of the effective number of alleles per locus ( $N_e$ ) was 1.434, the average value of the Shannon heterogeneity index was 0.419, the average value of the expected heterozygosity was 0.270. The average values of genetic distances and genetic similarity index between raspberry cultivars were 0.488 and 0.696, respectively. **Conclusions.** The studied RAPD markers can be useful not only for characterizing the genetic structure, distinguishing raspberry cultivars and selecting their most promising variants for crossing, but also for solving legal issues such as assessing violations of breeders' rights.

**Keywords:** *Rubus*; raspberry; RAPD-PCR markers; polymorphism; plant breeding.

*Надійшла / Received 05.11.2024*

*Погоджено до друку / Accepted 26.11.2024*