

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ОБРАЗЦОВ МАЛИНЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ

Т. А. ГАШЕНКО, Л. В. ФРОЛОВА, Т. Н. БОЖИДАЙ

*РУП «Институт плодородства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: belhort@belsad.by*

АННОТАЦИЯ

Современный уровень развития селекции и внедрение новых технологий требует усиления контроля за качеством и подлинностью селекционных достижений. В этих условиях особую актуальность приобретает создание молекулярно-генетических паспортов сортов как хранилища оригинальной генетической информации, подтверждающего подлинность селекционного продукта.

В РУП «Институт плодородства» с 2019 г. начата работа по созданию базы молекулярно-генетических паспортов коллекционных образцов отечественных и зарубежных сортов малины летнего срока созревания, необходимых для контроля процесса включения новых образцов в коллекцию во избежание дублирования, а также установления внутривидовых связей и видовой родства генотипов с использованием SSR-анализа, что значительно расширяет возможности верификации сортов.

Для создания паспортов были использованы 8 микросателлитных SSR-маркеров. В результате показан высокий уровень полиморфизма 8 микросателлитных локусов у 47 сортов и гибридов малины различного географического происхождения и выявлен 101 аллель. В зависимости от локуса число аллелей варьировало от 7 до 19. Наиболее полиморфным оказался локус RhM043, а наименее – локус RhM001.

С использованием данных SSR-анализа составлены генетические паспорта 47 образцов малины летнего срока созревания (40 сортов, 7 гибридов), среди которых 9 – белорусской селекции, 24 – российской, 4 – украинской, 2 – казахской, 4 – румынской, 1 – польской и 3 – английской селекции. Среди оцененных генотипов 3 образца отличаются желтой окраской ягод. По результатам исследований построена дендрограмма, показывающая генетическое родство между генотипами малины летнего срока созревания.

Ключевые слова: малина, сорт, гибрид, SSR-маркеры, ДНК-паспорт, дендрограмма, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Огромное разнообразие сортов приводит к необходимости иметь четкую и удобную систему их классификации и идентификации. В настоящее время идентификация сортов производится главным образом по морфологическим признакам и биохимическому составу плодов. Однако использование данных показателей для сортовой идентификации недостаточно. На изменчивость морфологических признаков и биохимического состава плодов оказывают влияние условия окружающей среды. Эффективными методами идентификации сортов растений являются молекулярные методы, так как генетические различия между отдельными организмами наиболее полно представлены на уровне ДНК. Методы ДНК-идентификации находят широкое применение в установлении филогенетических связей между образцами, сортами и видами, анализе эволюционных связей, выяснении структуры популяций. Их можно использовать на любой стадии развития растения начиная с первого года жизни. Применение молекулярных методов особенно актуально в спорных случаях, когда отсутствует возможность различить образцы по морфологическим признакам до вступления растений в плодоношение.

В селекционно-генетических программах, направленных на создание нового поколения сортов малины, все шире используются достижения молекулярной генетики, биотехнологии и геномики.

ДНК-маркеры позволяют ускорить селекционный процесс, облегчается подбор родительских пар для скрещивания, поиск родительского материала в гибридных формах. Маркирование сортового материала позволит оценить значительное разнообразие дикорастущих и культурных форм растений и на их основании создать коллекцию геноплазмы для использования в селекции. Применение молекулярных подходов в изучении филогении уточнит спорные вопросы система-

тики. Установление родственных связей прояснит происхождение многих сортов с неизвестными родословными. Молекулярная идентификация и паспортизация сортов и ценных форм малины расширит возможности системы защиты авторских прав селекционеров [1].

Молекулярно-генетические методы анализа, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), за последние 20 лет стали одними из самых популярных и используются в настоящее время для изучения многих видов организмов. Они отличаются высокой эффективностью, производительностью, хорошей воспроизводимостью и относительной экономичностью. Позволяют выявлять молекулярные маркеры на морфофизиологические, в том числе хозяйственно ценные, признаки [2].

Для выявления полиморфизма микросателлитных локусов наиболее часто используют SSR- и ISSR-маркеры (SSR – simple sequence repeats – простые повторяющиеся последовательности; ISSR – inter simple sequence repeats – межмикросателлитные последовательности). В настоящее время праймеры для SSR-анализа разрабатывают на основе информации о фланкирующих микросателлитных повторах участках. Для этого проводят поиск повторов в известных последовательностях или в сиквенсах, полученных в экспериментальных исследованиях.

В дальнейшем многочисленные группы исследователей создавали наборы SSR-маркеров для разных видов малины: *R. hochstetterorum* [3], *R. occidentalis* [4], *R. coreanus* [5], *R. glaucus* [6, 7].

Созданные наборы SSR-маркеров широко применялись для изучения генетического разнообразия и генотипирования селекционных сортов малины [5, 8], малины обыкновенной [9–12] и малины западной [4, 13].

N. Castillo с коллегами [5] проанализировали 48 сортов малины с помощью 13 пар SSR-праймеров, одна из которых была разработана на основе последовательности из GenBank Национального центра биотехнологической информации США, а остальные – на базе геномных библиотек малины сорта Meeker. Обособленные группы были сформированы сортами, сходными по происхождению (созданными с участием *R. strigosus*, *R. idaeus* или межвидовых гибридов), а также сортами, имеющими общий признак – способность к плодоношению на побегах первого года (ремонтантность) [5].

С помощью SSR-маркеров проведено генотипирование российских сортов малины обыкновенной и сортов селекции сопредельных стран [10, 12], а также европейских сортов [11]. В этих исследованиях не было получено четкой кластеризации сортов, созданных в селекционных программах разных стран, и сортов, имеющих различное генетическое происхождение.

Другая область применения SSR-маркеров связана с изучением генетического разнообразия дикорастущих популяций разных видов малины: *R. idaeus* [14], *R. mollucanus* L. [15], *R. crataegifolius*, *R. fruticosus* L., *R. coreanus* Miq. [16]. Анализ разнообразия дикорастущих в Шотландии популяций *R. idaeus* [14] выявил высокий уровень генетического разнообразия: 10 пар SSR-праймеров генерировали 80 аллелей у изученных образцов 12 популяций. Примечательно, что только 18 из них были выявлены у культивируемых образцов малины обыкновенной, что указывает на необходимость расширения генетического разнообразия сортов, в том числе за счет привлечения в скрещивании образцов изученных дикорастущих популяций, и, следовательно, указывает на важность их *in situ* сохранения.

Обратная ситуация выявлена при исследовании полиморфизма дикорастущих популяций *R. occidentalis*, собранных в 27 штатах США и в двух канадских провинциях. Оказалось, что у дикорастущих популяций генетическое разнообразие было ниже, чем у культурных форм малины западной, поэтому, по мнению авторов, данные природные популяции для дальнейших селекционных работ не представляют большого интереса [13].

Для разработки ISSR-маркеров не требуется информации о геномных последовательностях у изучаемых объектов. Анализ образцов дикорастущей малины (*R. idaeus*) из 19 пунктов Черноморского побережья Турции, проведенный при помощи 15 ISSR-праймеров, показал перспективность всех апробированных в этой работе маркеров. Работа В. В. Соболева и коллег была направлена на генотипирование российских сортов малины (15 ремонтантных и 12-летнего срока созревания) и образцов пяти видов малины. Исследуемые образцы разделились по группам на ремонтантные сорта и сорта с летним типом плодоношения.

В Беларуси для изучения представителей рода *Rubus*, в том числе малины, крайне редко прибегали к использованию молекулярно-генетических методов и пользовались ограниченным набором других методов. В то же время при создании современных культурных сортов малины широко применялась межвидовая гибридизация с вовлечением геноплазмы таких видов, как *Rubus idaeus* L., *R. crataegifolius* Bunge, *R. odoratus* L., *R. occidentalis* L., *R. arcticus sfellarcticus* G. Larson. Кроме того, из-за использования в селекции метода свободного опыления и опыления смесью пыльцы родительские формы многих сортов неизвестны, что создает трудности при планировании дальнейшей селекции, составлении схем скрещиваний и т. д. Следовательно, проведение генетического анализа является актуальным как с научной точки зрения, так и с точки зрения практической селекции [2].

В РУП «Институт плодоводства» (Республика Беларусь) с 2019 г. начата работа по созданию базы молекулярно-генетических паспортов коллекционных образцов отечественных и зарубежных сортов с применением SSR-анализа [17]. В первую очередь были разработаны молекулярно-генетические паспорта 16 районированных сортов малины летней и ремонтантной, что положило начало формированию базы ДНК-паспортов данной культуры, позволяющей проводить поиск новых генотипов и исключать дублирующие образцы [18].

Таким образом, исследование и сохранение биологического и генетического разнообразия малины, включающие разработку методов сохранения, изучения, регистрации и ускорения выбора генетических ресурсов для использования в селекции, позволяющих получать новые, с комплексом ценных признаков, генотипы, является актуальным.

Цель работы – ДНК-маркирование геномов малины для создания генетических паспортов и оценки их полиморфизма.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований являлись 47 образцов (40 сортов, 7 гибридов) малины летнего срока созревания различного географического происхождения:

9 – белорусской селекции (сорта Аленушка, Двойная, Мядовая, Услада, гибриды 1-46-07, 03-07-08, 10-03-08, 10-30-12, 01-03-13);

24 – российской селекции (Алая россыпь, Антарес, Бальзам, Бархатная, Беглянка, Бригантина, Вольница, Клеопатра, Лавина, Любетовская, Маросейка, Метеор, Награда, Патриция, Пересвет, Сенатор, Свирель, Скромница, Спутница, Таруса, Турмалин, Улыбка, Шоша, Яркая);

4 – украинской селекции (Козачка, Саня, Персея, Феномен);

2 – казахской селекции (гибриды 4-17, 12-4);

4 – румынской селекции (Citria (Ситрия), Gustar (Густар), Rubin (Рубин), Ruvi (Руви));

1 – польской селекции (Laszka (Лашка));

3 – английской селекции (Malling Landmark (Моллинг лендмарк), Northen Giant (Нортен гигант), Octavia (Октавия)).

Среди объектов исследования 3 сорта малины отличаются плодами желтого цвета – Беглянка (Россия), Мядовая (Беларусь), Ситрия (Румыния).

Молекулярно-генетические паспорта сортов малины составляли с выполнением предварительной оптимизации ряда параметров. Препараты ДНК выделяли из листьев малины с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно рекомендованному протоколу. Для проверки концентрации ДНК в выделенных пробах использовали спектрофотометр Implen P330. ПЦР проводили на амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler BioRad.

Для оценки уровня полиморфизма генотипов малины был использован набор из 8 микросателлитных маркеров: № 108, RhM001, RhM003, RiM017, RhM011, RhM043, № 262, RhM021 [5, 19]. Маркеры были сгруппированы в наборы по 2–3 пары с учетом имеющихся сведений об их размерах. Названия маркеров приведены в табл. 1.

Реакционная смесь для проведения ПЦР с конечным объемом 10 мкл имела следующий состав: 5,0 мкл Quick-Load TAQ 2X Master Mix, 10 мкМ каждого праймера, ДНК-матрица (20 мкг/мкл) – 0,5 мкл, смесь доводили до объема 10,0 мкл milliQ водой.

Таблица 1. SSR-праймеры, использованные для ДНК-идентификации сортов малины (2019–2020 гг.)

Название праймера	Последовательность праймеров	Размер аллелей в п. н.
RiM017	F GAAACAGGTGGAAAGAAACCTG	185–205
	R CATGTGCTTATGATGGTTTCG	
RhM011	F AAAGACAAGGCGTCCACAAC	270–319
	R GGTTATGCTTTGATTAGGCTGG	
RhM043	F GGACACGGTTCTAACTATGGCT	344–380
	R ATTGTCGCTCCAACGAAGATT	
№ 108	F CCCTACACATCGATCGCTTAC	149–174
	R AACACTCCAAATGCCCAATC	
RhM003	F CCATCTCCAATTCAGTTCTTCC	191–216
	R AGCAGAATCGGTTCTTACAAGC	
RhM001	F GGTTCCGATAGTTAATCCTCCC	233–245
	R CCAACTGTTGTAAATGCAGGAA	
RhM021	F CAGTCCCTTATAGGATCCAACG	278–294
	R GAACTCCACCATCTCCTCGTAG	
№ 262	F TGCATGAAGGCGATATAAAGG	203–229
	R TCCGCAAGGGTTGTATCCTA	

Аmplификацию с праймерами осуществляли при следующих температурных условиях:

1 цикл: 95 °C – 3 мин;

35 циклов: 95 °C – 20 с; 55 °C – 20 с; 72 °C – 20 с;

1 цикл: 72 °C – 8 мин.

Для подтверждения наличия продуктов амплификации предварительно визуализировали в 1,5%-ном агарозном геле. Продукты амплификации разделяли на секвенаторе GenomeLab GeXP Beckman Coulter. В качестве внутреннего стандарта при отработке экспериментальных параметров ПЦП использовали GenomeLab DNA Size Standard Kit – 600 (Beckman Coulter).

Для анализа нуклеотидных последовательностей применяли программный пакет MEGA 6.0. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли при помощи Clustal W алгоритма.

Филогенетическое дерево было построено с помощью программы MEGA 6.0 методом Neighbour-Joining. Цифрами обозначены достоверности (в процентах) расхождения ветвей, выявленные с помощью бутстреп-анализа (1000 псевдореплик), который позволяет оценить статистическую надежность каждого из узлов построенного древа. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее пяти заменам на каждую 1000 нуклеотидов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день микросателлитные ДНК-маркеры являются наиболее распространенным типом ДНК-маркерных систем, используемых при работе с генетическими ресурсами растений – определении структуры коллекций и степени генетического сходства, а также идентификации и ДНК-паспортизации образцов.

Продукты амплификации отличаются по длине фрагментов с точностью до одного нуклеотида, поэтому для их разделения выбран наиболее точный метод электрофореза в секвенирующем акриламидном геле с помощью системы генетического анализа. Используемый метод SSR-маркеров позволяет проводить анализ любых органов растений на различных стадиях онтогенеза, основанный на определении длин фрагментов амплификации (длины аллеля) отдельного локуса для каждого сорта. Длина фрагментов соответствует длине аллелей исследуемых образцов.

Методом SSR-анализа определено разнообразие аллелей в 8 локусах у 47 сортов и гибридов малины. Для каждого используемого маркера определялась длина аллелей и количество полиморфных фрагментов для каждого сорта. Как видно из табл. 2, все рассматриваемые локусы оказались полиморфны. При этом количество аллелей, идентифицированных у образцов малины в каждом локусе, различается.

Наименее полиморфными оказались локусы RhM001 и RhM021, количество обнаруженных аллелей составило 7 и 8 соответственно. С помощью маркеров RiM017 и № 108 количество обнаруженных аллелей составило 9 и 11 соответственно. В локусах RhM011 и RhM003 выявили 14 и 15 аллелей соответственно. Максимальное количество аллелей было выявлено в локусах № 262 и RhM043 – 18 и 19 соответственно.

Количество выявляемых аллелей в локусе зависит от состава выборки исследуемых образцов и значительно увеличивается при большем разнообразии генотипов. В общей сложности среди 47 образцов малины анализ локусов микросателлитных последовательностей с помощью выбранных маркеров позволил выявить 101 аллель.

Таблица 2. Количество и длина SSR-аллелей в геноме малины

Праймер	Количество аллелей	Детектируемые SSR-аллели в геноме малины
RiM017	9	184, 186, 187, 192, 193, 194, 195, 196, 197
RhM011	14	285, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 301, 306, 308
RhM043	19	358, 359, 360, 361, 363, 364, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 381, 382
№ 108	11	152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162
RhM003	15	198, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 208, 211, 213, 216, 217, 218, 219, 220
RhM001	7	238, 239, 240, 241, 242, 243, 244
RhM021	8	274, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 287
№ 262	18	209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 233

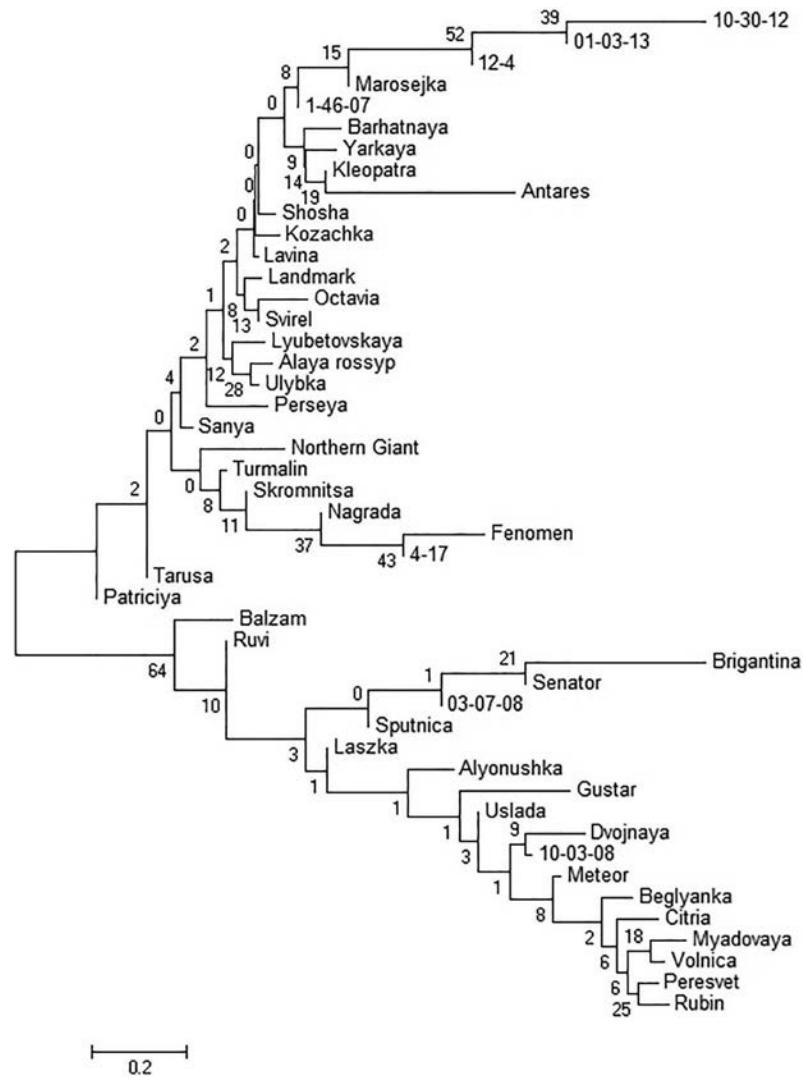
В результате выполнения фрагментного анализа продуктов амплификации на автоматическом генетическом анализаторе были получены четкие, воспроизводимые результаты. Каждый сорт содержит уникальный набор аллелей, позволяющий отличить его от других сортов. С помощью сформированного набора 8 пар SSR-маркеров были подготовлены паспорта 47 образцов малины летнего срока созревания, генетическая взаимосвязь которых отражена на дендрограмме (см. рисунок).

Исследуемые генотипы, согласно молекулярно-генетическому анализу, были сгруппированы в двух основных кластерах и, соответственно, анализ дендрограммы также был представлен в двух кластерах.

В первом, самом большом кластере (см. верхнюю часть рисунка), находятся 28 генотипов различного географического происхождения. Данный кластер представлен 5 субкластерами, в том числе 10 образцов в субкластере 1 А (от белорусского гибрида 10-30-12 до российского сорта Шоша), 5 – в субкластере 1 Б (от украинского сорта Козачка до российского сорта Свирель), 5 – в субкластере 1 В (от российского сорта Любетовская до украинского сорта Саня), 6 – в 1 Г (от образца из Великобритании Нортен гигант до казахского гибрида 4-17) и 2 образца в субкластере 1 Д (Таруса и Патриция). Таким образом, помещенные в этом кластере образцы в основном получены в Беларуси (3 шт.), России (16 шт.), Украине (4 шт.), Казахстане (2 шт.), Великобритании (3 шт.).

По индексу евклидова расстояния самые далекие генотипы кластера 1 – гибрид 10-30-12 (Беларусь) и 4-17 (Казахстан) находятся в различных субкластерах (1 А и 1 Г соответственно), их генетическое отличие объясняется различием происхождения. Основная часть образцов субкластера 1 А была создана в различных научно-исследовательских учреждениях России. Большинство зарубежных сортов сосредоточены в субкластерах 1 Б и 1 Г. В субкластере 1 В сгруппированы образцы из Украины, которые оказались генетически близки и объединены в один субкластер. Предпоследний крупный субкластер 1 Г состоял из генотипов, селекционированных в географически удаленных регионах (Великобритания, Россия, Казахстан, Украина). Нахождение этих образцов в одном субкластере связано с их генетическим сходством на основе вида *Rubus idaeus* L. Российские сорта штамбового типа Таруса и Патриция были сгруппированы в отдельный субкластер (1 Д), что, с генетической точки зрения, показывает их отличие от всех других образцов малины летнего срока созревания в коллекции.

Второй кластер дендрограммы (нижнюю часть рисунка) состоит из 4 субкластеров, в которых имеется 19 генотипов. Этот кластер, в основном, состоит из образцов, созданных в Беларуси,



Дендрограмма, показывающая генетическое родство между генотипами малины летнего срока созревания, с использованием SSR-маркеров

России и Румынии, а также тут представлены все желтоплодные сорта. Субкластер 2 А включает 2 образца (Бальзам и Руви), 2 Б – 5 (Бригантина, Сенатор, гибрид 03-07-08, Спутница, Лашка), 2 В – 5 (Аленушка, Густар, Услада, Двойная, гибрид 10-03-08), 2 Г – 7 сортов (Метеор, Беглянка, Ситрия, Мядовая, Вольница, Пересвет, Рубин).

Несмотря на то, что находящиеся в одном субкластере 2 А сорта Бальзам и Руви географически не близки, было установлено, что генетически они являются самыми близкими генотипами. В субкластере 2 Б все 5 образцов также созданы в разных местах (Россия, Беларусь, Польша), но по результатам молекулярных анализов данные генотипы близки. Образцы белорусской селекции находятся в одном субкластере 2 В с румынским сортом Густар. В последний субкластер 2 Г попали сорта с желтой окраской плодов (российский сорт Беглянка, белорусский – Мядовая, румынский – Ситрия), что свидетельствует об их схожести согласно молекулярно-генетическому анализу.

Полученная информация является наиболее точной для составления ДНК-паспортов, содержащих информацию о номере микросателлитного маркера и его аллельном состоянии у конкретного генотипа. В дальнейшем полученные результаты анализа данной выборки сортов можно будет использовать для маркерной селекции с последующими уточнениями по применению различных вариантов сочетаний маркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современный уровень развития селекции и внедрение новых технологий требует усиления контроля за качеством и подлинностью селекционных достижений. В этих условиях особую актуальность приобретает создание молекулярно-генетических паспортов сортов как хранилища оригинальной генетической информации, подтверждающего подлинность селекционного продукта.

В РУП «Институт плодоводства» с 2019 г. начата работа по созданию коллекции молекулярно-генетических паспортов образцов малины различного географического происхождения с использованием SSR-анализа, что значительно расширяет возможности их верификации. Для создания паспортов были использованы 8 микросателлитных SSR-маркеров.

В результате показан высокий уровень полиморфизма 8 микросателлитных локусов у 47 сортов и гибридов малины различного географического происхождения и выявлен 101 аллель. В зависимости от локуса число аллелей варьировало от 7 до 19. Наиболее полиморфным оказался локус RhM043, наименее – локус RhM001.

С использованием данных SSR-анализа составлены генетические паспорта 47 образцов (40 сортов, 7 гибридов) малины летнего срока созревания, среди которых 9 образцов белорусской селекции, 24 – российской, 4 – украинской, 2 – казахской, 4 – румынской, 1 – польской и 3 – английской селекции. Среди оцененных генотипов 3 образца отличаются желтой окраской ягод. Генетическая взаимосвязь всех изученных генотипов отобразена в дендрограмме.

Полученные данные об аллельных вариантах микросателлитных локусов сортов малины позволяют структурировать коллекционный материал, вести пополнение, поиск и осуществлять хранение информации для решения задач по идентификации генотипов, уточнения происхождения сортов, определения сортовой чистоты.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Шамшин, И. Н. Создание генетических паспортов сортов яблони на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов генома : методика / И. Н. Шамшин, А. М. Кудрявцев, Н. И. Савельев. – Мичуринск : Мичур. гос. аграр. ун-т, 2013. – 44 с.
2. Соболев, В. В. Использование метода полимеразной цепной реакции для генетического маркирования ремонтантной малины : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.00.23 / В. В. Соболев ; М. с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева. – М., 2004. – 17 с.
3. Isolation and characterization of simple sequence repeat loci in *R. hochstetterorum* and their use in other species from the *Rosaceae* family / M. Lopes [et al.] // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol. 6. – P. 750–752. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01329.x>
4. Dossett, M. SSR fingerprinting of black raspberry cultivars shows discrepancies in identification / M. Dossett, N. V. Bassil, C. E. Finn // *Acta Horticulturae*. – 2012. – Vol. 946. – P. 49–53. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.946.4>
5. Microsatellite markers for raspberry and blackberry / N. R. F. Castillo [et al.] // *J. of the Amer. Soc. for Horticultural Sci.* – 2010. – Vol. 135. – P. 271–278.
6. López, A. Evaluation of SSR and SNP markers in *Rubus glaucus* Benth progenitors' selection / A. López, C. Barrera, M. Marulanda // *Rev. Brasil. de Fruticultura*. – 2019. – Vol. 41 (1). – P. 1–14. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019081>
7. A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers / K. Lewers [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2008. – Vol. 8. – 69 p. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-69>
8. Анализ микросателлитных локусов как первый этап на пути к маркерной селекции малины и земляники / В. Г. Лебедев [и др.] // *Селекция и сорторазведение садовых культур*. – 2018. – Т. 5. – № 1. – С. 65–68.
9. Assessment of genetic diversity in Bulgarian raspberry germplasm collection by microsatellite markers (SSR) / I. Badjakov [et al.] // *Biotechnology a. Biotechnological Equipment*. – 2005. – Vol. 19. – № 1. – P. 43–47.
10. Investigation of genetic diversity in Russian collections of raspberry and blue honeysuckle / D. Lamoureux [et al.] // *Plant Genetic Resources*. – 2011. – Vol. 9, № 2. – P. 202–205. <https://doi.org/10.1017/S1479262111000323>
11. SSR fingerprinting of a German *Rubus* collection and pedigree based evaluation on trueness-to-type / G. Girichev [et al.] // *Genetic Resources a. Crop Evolution*. – 2015. – Vol. 64. – P. 89–103. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0345-0>
12. Laciš, G. Evaluation of red raspberry cultivars used for breeding and commercial growing in the Baltic region / G. Laciš, I. Kota-Dombrovska, S. Strautina // *Proc. of the Latv. Acad. of Sci. Sect. B Natural Exact and Appl. Sci.* – 2017. – Vol. 71. – № 3. – P. 203–210.
13. Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) evaluated by simple sequence repeat markers / M. Dossett [et al.] // *Genetic Resources a. Crop Evolution*. – 2012. – Vol. 59. – P. 1849–1865.
14. New insight into wild red raspberry populations using simple sequence repeat markers / J. Graham [et al.] // *J. of the Amer. Soc. for Horticultural Sci.* – 2009. – Vol. 134. – № 1. – P. 109–119.

15. Genetic diversity of Philippine *Rubus moluccanus* L. (*Rosaceae*) populations examined with VNTR DNA probes / D. T. Bussemeyer [et al.] // *J. of Tropical Biology*. – 1997. – Vol. 14. – P. 867–884. <https://doi.org/10.1017/S0266467400011044>
16. Genetic diversity and population structure of *Rubus* accessions using simple sequence repeat markers / K. J. Lee [et al.] // *Plant Breeding and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 4. – № 3. – P. 345–351. <https://doi.org/10.9787/PBB.2016.4.3.345>
17. Фролова, Л. В. Современные направления селекции малины / Л. В. Фролова, Т. А. Гашенко, О. А. Гашенко // Плодоводство : сб. науч. тр. / Ин-т плодоводства ; редкол.: А. А. Таранов (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 33. – С. 211–226.
18. Гашенко, Т. А. Молекулярно-генетическая паспортизация районированного сортимента малины в Беларуси / Т. А. Гашенко, Л. В. Фролова, З. А. Козловская // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сб. науч. ст. XXIV Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 23 марта, 14 мая 2021 г. / Гродн. гос. аграр. ун-т ; отв. за вып. О. В. Вергинская. – Гродно, 2021. – С. 65–66.
19. Graham, J. DNA Markers for Use in Raspberry Breeding / J. Graham, K. Smith // *Acta Horticulturae*. – 2002. – Vol. 585. – P. 51–56.

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF RASPBERRY SAMPLES USING SSR MARKERS

T. A. GASHENKO, L. V. FROLOVA, T. N. BOZHIDAI

Summary

The current level of breeding development and the introduction of new technologies require enhanced oversight over the quality and authenticity of breeding achievements. Against this background development of molecular and genetic passports of plant varieties as an original genetic information repository that proves the authenticity of a breeding product has become a high priority issue.

Since 2019 the RUE “Institute of Fruit Growing” has been working on development of a molecular and genetic passports database for collection samples of raspberry varieties of domestic and foreign breeding with summer fruiting period that are necessary to oversee the process of adding new samples to the collection to avoid duplication, as well as to establish intraspecific interactions and species relatedness of genotypes using SSR analysis, which significantly extends the capability of variety verification.

Eight microsatellite SSR markers were used to create the passports. As a result, a high level of polymorphism of 8 microsatellite loci was shown in 47 varieties and hybrids of raspberry of different geographical origin and 101 alleles were identified. Depending on the locus, the number of alleles varied from 7 to 19. The RhM043 locus was the most polymorphic, and the RhM001 locus was the least polymorphic.

Using the data of SSR analysis, genetic passports were compiled for 47 samples of summer-fruiting raspberry (40 varieties, 7 hybrids), among which 9 are of Belarusian selection, 24 are Russian, 4 are Ukrainian, 2 are Kazakh, 4 are Romanian, 1 are Polish and 3 are of English selection. Among the genotypes assessed, 3 samples are distinguished by the yellow color of the berries. Based on the results of the research, a dendrogram was made illustrating the genetic relationship between the genotypes of summer-fruiting raspberry.

Keywords: raspberry, variety, hybrid, SSR markers, DNA passport, dendrogram, Belarus.

Поступила в редакцию 06.03.2023