

## АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ СОРТІВ СУНИЦІ САДОВОЇ (*FRAGARIA ANANASSA* DUCH.) ЗА SSR-МАРКЕРАМИ

О. В. ДУБІН<sup>1</sup>, О. В. СУБІН<sup>1\*</sup>, М. Д. МЕЛЬНИЧУК<sup>1</sup>, А. Ф. ЛІХАНОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України

Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

<sup>2</sup>Інститут еволюційної екології НАН України

\*e-mail: subin.oleksandr@gmail.com

Розробка ефективних і надійних методів оцінки генетичного поліморфізму сортів, гібридів та вихідних форм з використанням молекулярних маркерів є важливим інструментом в селекційному процесі, сертифікації посадкового матеріалу та захисті авторських прав. У роботі проведено оцінку генетичного поліморфізму сортів суниці садової української та зарубіжної селекції на основі SSR-аналізу. Проаналізовано рівень інформативності 12 SSR-локусів з наукових джерел. Для подальшого аналізу сортів суниці садової відібрано 9 локусів які уможливили отримання чітких та відтворних алелів. Три мікросателітні локуси не використовували для подальшої роботи внаслідок наявності дифузних смуг та складнощів інтерпретування великої кількості алелів. Сумарно за використання обраних 9-ти локусів у досліджених сортах виявлено 69 алелів, молекулярний розмір яких становив 278–76 п.н. Найбільшу кількість алелів для цього типу маркерів було отримано за ампліфікації локусу *EMFvi136* (11 алелів), найменшу за локусами *EMFv029* (4 алелі). Встановлено, що найвищий рівень наявної гетерозиготності зафіксовано за локусом *EMFvi108* (43,2 %), найнижчий за локусом *UDF002* (10,1 %). Показано, що розмах генетичних дистанцій між дослідженими сортами коливається від 0,059 (між сортами *Голосіївська рання – Світ Енн*) до 0,65 (між сортами *Світ Енн* і *Зенга-Зенгана* та *Голосіївська рання* і *Ельсанта*), а індексів генетичної ідентичності від 0,521 до 0,942 між цими ж сортами. Проведено кластерний аналіз і побудовано дендрограму генетичної спорідненості за використання незваженого парно-групового методу. За отриманими даними SSR-аналізу досліджені сорти чітко розділяються на два окремих кластери. До першого входять сорти суниці української та американської селекції. За генетичними дистанціями найближчими виявилися пари сортів: *Голосіївська рання – Світ Енн* ( $d=0,059$ ), *Берегиня – Факел* ( $d=0,139$ ) та *Альбїон – Аліна* ( $d=0,208$ ). До другого кластеру входили сорти італійської, голландської та німецької селекції: *Клері – Альба* ( $d=0,245$ ) та *Ельсанта – Зенга-Зенгана* ( $d=0,263$ ). Результати аналізу 9 SSR-локусів суниці садової дозволили виявити поліморфізм за всіма дослідженими молекулярно-генетичними маркерами. При цьому, рівень поліморфізму варіював залежно від використаного SSR-повтору. На основі отриманих результатів запропоновано систему генетичної ідентифікації сортів суниці садової.

*Ключові слова:* Суниця садова, SSR-маркери, ДНК-фінгерпринтинг, мікросателіти,

**Вступ.** З розвитком ДНК-технологій новітнім етапом дослідження рослин є прямий аналіз геному і пов'язаний з цим пошук молекулярних маркерів, які дозволяють проводити диференціацію, ідентифікацію і моніторинг різних зразків та мають високу інформативність, технологічність, відтворюваність і великий потенціал (Хавкін, 2003). Точна, швидка, економічно ефективна та надійна ідентифікація сортів, гібридів, клонів, селекційного та посадкового матеріалу сільськогосподарських культур є важливим елементом в селекції і генетиці, а також при комерційних операціях і захисті авторських прав (K.Weising et al., 2005; В.И. Рисованная, 2013). Молекулярні маркери являються необхідним інструментом в аналізі генетичної варіабельності, значно покращуючи якість генетичного аналізу сільськогосподарських рослин (Varshney et al., 2005). Одним із сучасних методів генетичного

аналізу молекулярної ідентифікації, є метод мікросателітного маркування, в результаті якого можна отримати індивідуальну характеристику окремого генотипу - його ДНК-профіль.

SSR-маркери (Single Simple Repeats) - одні із найбільш інформативних ДНК-систем молекулярного маркування Загалом SSR-маркери характеризуються високим поліморфізмом, відтворюваністю та легкістю аналізу (Мухина и Дубина, 2011). Такі характеристики SSR-маркерів, як кодомінантність, розподілення по всьому геномі, простота маніпуляцій і значна алельна мінливість забезпечують доступність та високу інформативність їх використання (Ashkenazi et al., 2001; Honjo et al., 2011; Дубін та ін., 2016). В даний час SSR-маркери використовують для диференціації рослин як всередині виду так і для ідентифікації сортів, створення генетичних карт і маркерної селекції, а також при вивченні

генетичного різноманіття та паспортизації сортів культурних рослин (Супрун и др., 2013; R. K. Kalia et al., 2011).

Сорти суниці садової мають значну зовнішню схожість, що ускладнює їх ідентифікацію за фенотиповими ознаками. У зв'язку з цим, все більшого значення набуває розробка ефективних і надійних методів оцінки генетичного поліморфізму сортів з використанням молекулярних маркерів (Межнина и Урбанович, 2016). Для дослідження генетичної варіабельності суниці садової науковцями були запропоновані декілька варіантів RAPD-, AFLP-, ISSR-маркерів. Проте в кожній із цих систем ідентифікації із неспецифічними праймерами виникають певні проблеми із відтвореністю результатів (Arnau et al., 2002; Hancock et al., 1994; Межнина и Урбанович, 2016). На сьогодні найчастіше генетичний поліморфізм суниці досліджується за аналізу мікросателітних повторів (SSR) через високочутливу здатність до виявлення “тонкого” поліморфізму та відтвореність отриманих даних (Ashley et al. 2003; Brunings et al., 2010; Rugienius et al., 2015). Проте застосування SSR-маркерів в генотипуванні суниці садової може бути досить затрудненим. Оскільки суниця садова – це октаплоїд, тобто вона містить в собі 8 копій кожного гену, що може спричинити при інбридингу утворення декількох копій однакових

алелів в одному локусі культиварів (Dangl et al., 2007; Rugienius et al., 2015).

Мета роботи – оцінка генетичного поліморфізму сортів суниці садової української та зарубіжної селекції на основі SSR-аналізу.

**Матеріали та методи досліджень.** В якості вихідного матеріалу було використано 11 сортів суниці садової вітчизняної та зарубіжної селекції.

Виділення тотальної ДНК проводили з листових пластинок рослин масою 0,2-0,3 г СТАВ-методом. Концентрацію препаратів ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Робочі розчини проб ДНК розбавляли ТЕ-буфером до концентрації 10 пкг/ мкл та зберігали при 4°C. Грунтуючись на результатах проведеного аналізу вітчизняних та світових наукових джерел, в яких використовується метод SSR-аналізу для дослідження генетичного поліморфізму та ідентифікації сортів суниці садової, нами було обрано 12 мікросателітних локусів: UDF007, EMFv006, EMFv014, EMFv029, EMFvi099, UDF002, UDF003, EMFvi108, EMFv014, EFMvi136, FxaAGA21F11 та FxaHGA02P13 (таблиця 1). Підбір та визначення термодинамічних показників олігонуклеотидних праймерів проводили за використання програми GeneRunner (Hastings Software, США).

*Таблиця 1.*

*Нуклеотидні послідовності використаних у роботі мікросателітних локусів суниці садової*

*Table 1.*

*Nucleotide sequences of microsatellite loci of Fragaria ananassa Duch. which were used in the research*

№	Локус	Праймер	Послідовність 5→3	Tm*
1	UDF007	UDF007F UDF007R	TGAGTAAATGATGCAACCCAGA GCTTGAGTATGTATTGAGTGTATGTG	50
2	EMFv006	EMFv006F EMFv006R	CGCCGTTTGAGATTGCCCTGAA CAAATTGCCACCCCTAGAGAAAAG	55
3	EMFv014	EMFv014F EMFv014R	GCCGCTCTGGAAGGGAACCT TTTAATAATCTTGAACGGTGTAGG	50
4	EMFv029	EMFv029F EMFv029R	TACTATTGAAGAACTCCTACTGA TCTTTGATCTGCTCCACCTT	50
5	EMFvi099	EMFvi099F EMFvi099R	CGTTAACTGTAATAATCCCCTCG GAGCCAATCTCTGACCTCAACT	50
6	UDF002	UDF002F UDF002R	TATGGCCAGGATTGTTTGCT TAGGAGGAGGCGTTGAAATG	55
7	UDF003	UDF003F UDF003R	ATAAGTGGCCAACCAATCCA TTCAAAGTGTAGTGTGAAATCAC	55
8	EMFvi108	EMFvi108F EMFvi108R	GGACCCCAAAACATTGAATAAA GAAGAGGGGAGGAGCAATAAAT	55
9	EMFv104	EMFv104F EMFv104R	TGGAACATTCTTACATAGCCAAA CAGACGAGTCCTTCATGTG	50
10	EFMvi136	EFMvi136F EFMvi136R	GAGCCTGCTACGCTTTTCTATG CCTCTGATTCGATGATTTGCT	55
11	FxaAGA21F11	FxaAGA21F11F FxaAGA21F11R	CAATTCACAATGGCTGATGACGAT GCACTCAGACATATTTTGGGAGGG	55
12	FxaHGA02P13	FxaHGA02P13F FxaHGA02P13R	CCAGGCGCTTGGTCTTGTACTACT CCCATTTCCCCCAAATCTAACAAT	55

\* Tm – температура відпалу праймерів

\* Tm - melting temperatures of primers

Ампліфікація SSR-локусів суниці проводили на ампліфікаторі “GeneAmp 2400” (Applied Biosystems, США) у наступному температурному режимі: 4 хв за 94 °С; 34 цикли: 20 с за 94 °С, 20 с за 50 – 55 °С (залежно від локусу), 20 с за 72 °С; 5 хв за 72 °С. Реакційна суміш об’ємом 20 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (рН 8,8), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. Tag-полімерази, 50 нг ДНК, 2,0 мМ MgCl<sub>2</sub> та по 0,3 мкМ праймерів. Електрофоретичне розділення алелів проводили у 8% поліакриламідному гелі (ПААГ) за денатуруючих умов (7М сечовина) у 0,5×TBE-буфері. Після закінчення електрофорезу гелі фарбували нітратом срібла та фотографували цифровою фотокамерою. Молекулярний розмір алелів визначали за маркером GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва) та Ready Ladder 50 bp (Amresco, США) з використанням програмного пакету Quantity One® Version 4.6.3 (BioRad, США).

Математичну обробку результатів проводили за допомогою порівняльного аналізу частот трапляння окремих локусів у досліджуваних сортів суниці із застосуванням комп’ютерних програм PopGen 32 і GenAlex 6.4 (Yeh and Boyle, 1997; Peakall and Smouse, 2006; Tamura et al., 2007).

**Результати та їх обговорення.** Оцінювання можливості використання обраних мікросателітних локусів для молекулярної ідентифікації та визначення рівня генетичного поліморфізму проводили за аналізу сортів суниці різної світової селекції. Всього у роботі було досліджено 11 сортів суниці садової: 4 сорти української селекції (Берегиня, Голосіївська

рання, Факел і Аліна), 2 сорти італійської (Клері і Альба), 2 сорти американської селекції (Світ Енн і Альбїон) та по одному сорту голандської (Ельсанта), англійської (Флоренс) і німецької (Зенга-Зенгана) селекції.

На першому етапі роботи ефективність ампліфікації (наявність ПЛР-локусів та їх якість) визначали за умов електрофоретичного розділення в агарозі. Проведені дослідження дозволили визначити чинники, які найбільшою мірою впливали на ефективність ампліфікації SSR-алелів суниці садової: концентрація хлориду магнію, концентрація препарату ДНК, концентрація праймерів у реакційній суміші та кількість циклів ампліфікації.

Грунтуючись на результатах проведеного тестування для подальшого аналізу обраної вибірки сортів суниці було відібрано 9 локусів: UDF007, EMFv006, UDF002, EMFvi108, EMFv029, EMFv014, EFMvi136, FxaAGA21F11 та FxaHGA02P13, які уможлилювали отримання чітких та відтворних алелів за умов електрофоретичного аналізу у поліакриламідному гелі. Три мікросателітні локуси не використовували для подальшої роботи внаслідок наявності дифузних смуг (EMFv104) та складнощів інтерпретування великої кількості алелів (EMFvi099 і UDF003). Результати аналізу 9 SSR-локусів суниці садової дозволили виявити поліморфізм за всіма дослідженими молекулярно-генетичними маркерами. При цьому, рівень поліморфізму варіював залежно від використаного SSR-повтору. Сумарно за використання обраних 9-ти локусів у досліджених сортів виявлено 69 алелів, молекулярний розмір яких становив 278–76 п.н. (таблиця. 2).

**Таблиця 2.**  
Значення основних показників генетичного різноманіття досліджених сортів суниці

**Table 2.**  
Value for the main indices of genetic diversity of strawberry varieties

Локус	Діапазон розмірів, п.н.	N <sub>a</sub> *	H**	I***	P
UDF007	118-82	7	0,320	0,487	100
EMFv006	168-118	10	0,245	0,390	100
UDF002	136-108	8	0,101	0,178	62,5
EMFvi108	184-160	5	0,432	0,622	100
EMFv029	178-162	4	0,210	0,325	75
EMFv014	128-76	8	0,373	0,552	100
EFMvi136	178-120	11	0,379	0,558	100
FxaAGA21F11	136-96	7	0,334	0,507	100
FxaHGA02P13	278-198	9	0,225	0,357	88,89
Mean	278-76	7,6	0,291	0,442	92,75

\*N<sub>a</sub> – загальна кількість алелів; \*\*H – наявна гетерозиготність; \*\*\*I – індекс гетерогенності Шеннона.

\*N<sub>a</sub> – general amount of alleles; \*\*H – heterozygosity; \*\*\*I – The Shannon index

Найбільшу кількість алелів для цього типу маркерів було отримано за ампліфікації локусу EFMvi136 (11 алелів), найменшу за локусами EMFv029 (4 алелі). Кількість алелів за іншими мікросателітними локусами сортів суниці була наступною: 10 алелів виявлено за електрофоретичного аналізу локусу EMFv006; по 8 алелів за локусами UDF002 і EMFv014; по 7 – за локусами UDF007 і FxaAGA21F11; 5 алелів виявлено за локусом EMFvi108. Середня кількість алелів на один мікросателітний локус становила 7,6.

На підставі розрахунку алельних частот нами було визначено основні показники генетичної мінливості дослідженої вибірки сортів суниці. Найвищий рівень наявної гетерозиготності зафіксовано за локусом EMFvi108 (43,2 %), найнижчий за локусом UDF002 (10,1 %). Середній рівень гетерозиготності за всіма локусами становив 29,1 %.

Аналіз генетичної спорідненості досліджених сортів суниці садової за поліморфізмом 9 мікросателітних локусів проводили за розрахунку індексів генетичної ідентичності і генетичних відстаней за Неєм (таблиця 3). Встановлено, що розмах генетичних дистанцій між дослідженими сортами коливається від 0,059 (між сортами Голосіївська рання – Світ Енн) до 0,65 (між сортами Світ Енн і Зенга-Зенгана та Голосіївська рання і Ельсанта), а індексів генетичної ідентичності від 0,521 до 0,942 між цими ж сортами.

На підставі розрахунку незважених індексів генетичної спорідненості між дослідженими сортами суниці садової проведено кластерний аналіз і побудовано дендрограму генетичної спорідненості за використання незваженого парно-групового методу (UPGMA) (рис. 1.), що дозволяє наочно проілюструвати ступінь міжсортної диференціації суниці за дослідженими SSR-локусами.

**Таблиця 3.**  
*Генетичні дистанції між дослідженими сортами суниці, розраховані за поліморфізмом 9 SSR-локусів*

**Table 3.**  
*Genetic distances between strawberry varieties for polymorphism of 9 SSR-loci*

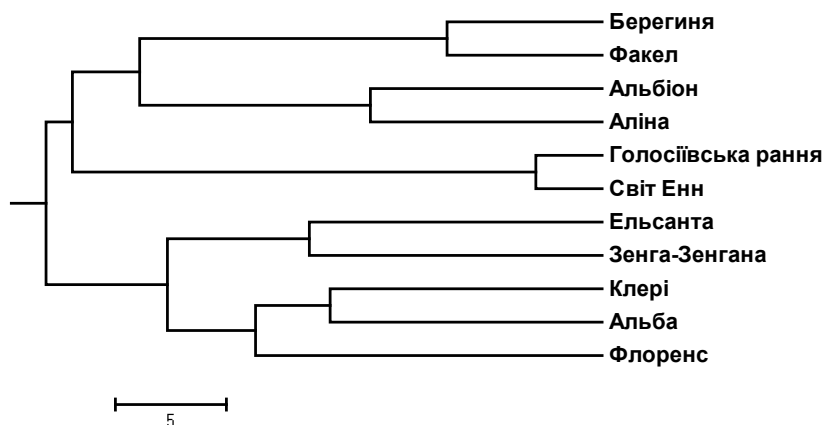
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	0.623	0.869	0.594	0.579	0.550	0.652	0.536	0.579	0.681	0.666
2	0.472	****	0.695	0.942	0.521	0.579	0.652	0.594	0.550	0.565	0.637
3	0.139	0.362	****	0.724	0.710	0.652	0.753	0.608	0.652	0.637	0.652
4	0.520	0.059	0.322	****	0.550	0.608	0.681	0.565	0.521	0.536	0.608
5	0.545	0.650	0.342	0.596	****	0.681	0.695	0.637	0.768	0.550	0.536
6	0.596	0.545	0.427	0.496	0.384	****	0.782	0.724	0.652	0.608	0.565
7	0.427	0.427	0.282	0.384	0.362	0.245	****	0.739	0.695	0.681	0.666
8	0.623	0.520	0.496	0.570	0.449	0.322	0.302	****	0.695	0.594	0.637
9	0.545	0.596	0.427	0.650	0.263	0.427	0.362	0.362	****	0.666	0.652
10	0.384	0.570	0.449	0.623	0.596	0.496	0.384	0.520	0.405	****	0.811
11	0.405	0.449	0.427	0.496	0.623	0.570	0.405	0.449	0.427	0.208	****

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

1 – Берегиня, 2 – Голосіївська рання, 3 – Факел, 4 – Світ Енн, 5 – Ельсанта, 6 – Клері, 7 – Альба, 8 – Флоренс, 9 – Зенга-Зенгана, 10 – Альбїон, 11 – Алїна

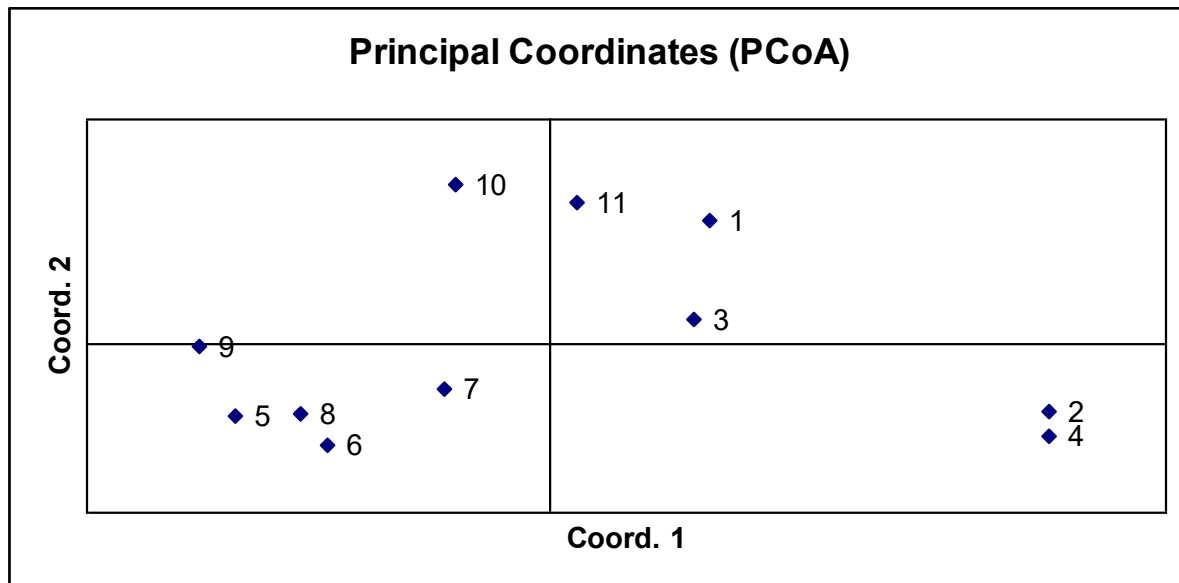
\*\*\*\* (above the diagonal – indexes of genetic identity, below the diagonal – genetic distances)

1. – Berehynia, 2. - Holosiivska rannia, 3. – Fakel, 4. – Sweet Ann, 5. – Elsanta, 6. – Clery, 7. – Alba, 8. – Florence, 9. – Senga Sengana, 10. – Albion, 11. – Alina.



**Рис. 1.** Дендрограма генетичної спорідненості досліджених сортів суниці, побудована за поліморфізмом 9 SSR-локусів

**Fig. 1.** Dendrogram of genetic affinity between strawberry varieties



**Рис. 2.** Проекція досліджених сортів на площині двох координат за результатами PCoA-аналізу матриці генетичних дистанцій за Неєм: 1 – Берегиня, 2 – Голосіївська рання, 3 – Факел, 4 – Світ Енн, 5 – Ельсанта, 6 – Клері, 7 – Альба, 8 – Флоренс, 9 – Зенга-Зенгана, 10 – Альбїон, 11 – Аліна

**Fig. 2.** Projection on the plane of two coordinates of PCoA-analysis of genetic distances matrix using the coefficient of Nei for strawberry varieties: 1. – Berehynia, 2. – Holosiivska rannia, 3. – Fakel, 4. – Sweet Ann, 5. – Elsanta, 6. – Clery, 7. – Alba, 8. – Florence, 9. – Senga Sengana, 10. – Albion, 11. – Alina.

На отриманій дендрограмі досліджені сорти чітко розділяються на два окремих кластери. До першого входять сорти суниці української та американської селекції. За генетичними дистанціями найближчими виявилися пари сортів: Голосіївська рання – Світ Енн ( $d=0,059$ ), Берегиня – Факел ( $d=0,139$ ) та Альбїон – Аліна ( $d=0,208$ ).

До другого кластеру входили сорти італійської, голландської та німецької селекції. При цьому, генетичні дистанції між ними характеризувалися більшими значеннями, ніж у випадку сортів першого кластеру. Найближчими виявилися пари сортів Клері – Альба ( $d=0,245$ ) та Ельсанта – Зенга-Зенгана ( $d=0,263$ ).

Результати проведеного кластерного аналізу повністю узгоджуються з результатами двохфакторного аналізу основних компонент (PCoA), виконаного за результатами поліморфізму 9 SSR-локусів суниці (рис. 2.).

**Висновки.** За поліморфізмом 9 поліалельних монолокусних мікросателітних маркерів оцінено генетичне різноманіття сортів суниці садової української та зарубіжної селекції. У досліджуваних сортів при ампліфікації мікросателітного локусу EFMvi136 виявлено 11 алелів, EMFv006 – 10, UDF002 і EMFv014 – по 8, та UDF007 і FxaAGA21F11 – по 7 алелів. Найвищий рівень гетерозиготності визначено за мікросателітним локусом EMFvi108 (43,2 %), в

якому виявлено 5 алелів, найнижчий – за локусом UDF002 (10,1 %).

При аналізі індексів генетичної спорідненості незваженими парно-груповим методом (UPGMA) з'ясовано, що досліджені сорти суниці садової української та американської селекції характеризується відносно високою генетичною ідентичністю і групуються в окремий кластер. До другого кластеру входять сорти італійської, голландської та німецької селекції з дещо більшими значеннями генетичних дистанцій.

Отримані дані можуть бути застосовані для розробки ДНК-паспортів та проведення генетичної ідентифікації досліджених сортів суниці садової.

#### Список літератури:

1. Arnau G., Lallemand J., Bourgoin M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification // Euphytica. – 2002. – Vol. 129, No. 1. – p. 69–79. doi: 10.1023/A:1021509206584
2. Ashkenazi V, Chani E, Lavi U, Levy D, Hillel J, Veilleux RE. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses // Genome / - 2001. – 44(1). – pp. 50–62. doi: 10.1139/gen-44-1-50
3. Ashley M.V., Wilk J.A., Styan S.M.N., Craft K.J., Jones K.L., Feldheim K.A., Lewers K.S., Ashman T.L. High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (*Rosaceae*) // Theor Appl Genet. – 2003. –

- Vol.107(7). - pp. 1201–1207. doi:10.1007/s00122-003-1370-5
4. Brunings, A.M., Moyer, C., Peres, N. Folta K. M. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties // *Euphytica*. – 2010. – Vol. 173, No. 1. - p. 63–75. doi:10.1007/s10681-009-0112-4
  5. Dangl G. S., Lee E. W., Sim S. T., Golino D. A.. A new system for strawberry cultivar identification developed at foundation plant services (FPS), University of California, Davis, using simple sequence repeat (SSR) primers // *NASS/ NASGA proceedings*. – 2007. - pp.118–121.
  6. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications / by Kurt Weising [et al.]. -- 2nd ed. - CRC Press, Taylor & Francis Group. - 472 p.
  7. Hancock J., Callow P., Shaw D.V. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry *Fragaria*×*ananassa* // *J Am Soc Hortic Sci*. – 1994. – Vol. 119, No 4. – P. 862–864.
  8. Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh R., Dhawan A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants // *Euphytica*. – 2011. – Vol. 177, No.3. – P. 309–334. doi: 10.1007/s10681-010-0286-9
  9. Masanori Honjo, Tsukasa Nunome, Sono Kataoka, Takayoshi Yano, Hiromichi Yamazaki, Megumi Hamano, Susumu Yui and Masami Morishita Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers // *Breeding Science*. – 2011. – 61. – pp. 420–425. doi:10.1270/jsbbs.61.420
  10. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol. 6. –pp.288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
  11. Rajeev K. Varshney, Andreas Graner and Mark E. Sorrells Genic microsatellite markers in plants: features and applications // *TRENDS in Biotechnology*. – 2005. - Vol.23, No.1. – pp. 48-55. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005
  12. Rytis Rugienius, Jūratė Bronė Šikšnianienė, Birutė Frercks, Gražina Stanienė, Inga Stepulaitienė, Perttu Haimi, Vidmantas Stanys Characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars and hybrid clones using SSR and AFLP markers // *Zemdirbyste-Agriculture*. – 2015. - vol. 102. - No. 2. - p. 177–184. doi 10.13080/z-a.2015.102.023
  13. Tamura K., Dudley J., Nei M. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // *Mol. Biol. Evol*. – 2007. – Vol. 24. – pp.1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
  14. Yeh F.C., Boyle T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // *Belgian J. Botany*. – 1997. – Vol. 129. – P. 157.
  15. Дубін О. В., Субін О. В., Мельничук М. Д., Ліханов А. Ф., Ключаваденко А. А. Молекулярно-генетична діагностика та ДНК паспортизація сортів суніці садової: науково-методичні рекомендації. – К.:ЦП “Компринт”, 2016. – 43 с.
  16. Межнина О.А., Урбанович О.Ю. Идентификация сортов земляники садовой (*Fragaria Ananassa*) с использованием SSR-маркеров// Молекулярная и прикладная генетика.- 2016. - Том 20. – с. 37-45
  17. Мухина Ж.М., Дубина Е. В. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях // *Научный журнал КубГАУ*. – 2011. - №66(02). – с. 1-11.
  18. Рисованная В. И. Использование молекулярно-генетических паспортов винограда в производстве. // *Магарач. Виноградарство и Виноделие*. – 2013. – №1. – С. 7–9
  19. Супрун И., Токмаков С., Степанов И., Балапанов И. Разработка мультиплексных наборов SSR-маркеров для использования в изучении генетического разнообразия в пределах родов *Malus*, *Prunus* и *Rugus* // *Научные труды ГНУ СКЗНИИСиб*. – 2013. – Т.1. – С. 30–38.
  20. Хавкин, Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур // *С.-х. биология*.- 2003.- №3.- С.26-41.

### References:

1. Arnau G., Lallemand J., Bourgoin M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification // *Euphytica*. – 2002. – Vol. 129, No. 1. - p. 69–79. doi: 10.1023/A:1021509206584
2. Ashkenazi V, Chani E, Lavi U, Levy D, Hillel J, Veilleux RE. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses // *Genome* / - 2001. – 44(1). – pp. 50–62. doi: 10.1139/gen-44-1-50
3. Ashley M.V., Wilk J.A., Styan S.M.N., Craft K.J., Jones K.L., Feldheim K.A., Lewers K.S., Ashman T.L. High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (*Rosaceae*) // *Theor Appl Genet*. – 2003. – Vol.107(7). - pp. 1201–1207. doi:10.1007/s00122-003-1370-5
4. Brunings, A.M., Moyer, C., Peres, N. Folta K. M. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties // *Euphytica*. – 2010. – Vol. 173, No. 1. - p. 63–75. doi:10.1007/s10681-009-0112-4
5. Dangl G. S., Lee E. W., Sim S. T., Golino D. A.. A new system for strawberry cultivar identification developed at foundation plant services (FPS), University of California, Davis, using simple sequence repeat (SSR) primers // *NASS/ NASGA proceedings*. – 2007. - pp.118–121.
6. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications / by Kurt Weising [et al.]. -- 2nd ed. - CRC Press, Taylor & Francis Group. - 472 p.
7. Dubin O. V., Subin O. V., Melnychuk M. D., Likhanov A. F., Kliuvadenko A. A. Molecular, genetic diagnosis and DNA-fingerprinting of strawberry varieties: scientific and methodological recommendations. – Kyiv: Komprint, 2016. – 43 p. (in Ukrainian)
8. Hancock J., Callow P., Shaw D.V. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry *Fragaria*×*ananassa* // *J Am Soc Hortic Sci*. – 1994. – Vol. 119, No 4. – P. 862–864.
9. Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh R., Dhawan A. K. Microsatellite markers: an overview of the



- recent progress in plants // *Euphytica*. – 2011. – Vol. 177, No.3. – P. 309–334. doi: 10.1007/s10681-010-0286-9
10. Khavkin E.E. Plant molecular breeding: DNA technologies of creating new crop varieties // *Agricultural biology*.- 2003.-No. 3.- pp. 26-41
  11. Masanori Honjo, Tsukasa Nunome, Sono Kataoka, Takayoshi Yano, Hiromichi Yamazaki, Megumi Hamano, Susumu Yui and Masami Morishita Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers // *Breeding Science*. – 2011. – 61. – pp. 420–425. doi:10.1270/jsbbs.61.420
  12. Mezhnina O. A., Urbanovich O.Yu. Identification of strawberry (*Fragaria Ananassa*) using SSR-markers // *Molecular and Applied Genetics*. – 2016. - Vol. 20. – pp. 37-45. (in Russian)
  13. Mukhina Zh. M., Dubina E. V. Molecular markers and how to use them in breeding and genetic researchers // *Scientific Journal of KubSAU*. - 2011. – No. 66(02). – pp. 1-11. (in Russian)
  14. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol. 6. –pp.288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
  15. Rajeev K. Varshney, Andreas Graner and Mark E. Sorrells Genic microsatellite markers in plants: features and applications // *TRENDS in Biotechnology*. – 2005. - Vol.23, No.1. – pp. 48-55. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005
  16. Rysovanaia V.I. Using of molecular and genetic passports of grape in manufacture // *Magarach. Viticulture and Wine-making*. - 2013. – No.1. – pp. 7–9. (in Russian)
  17. Rytis Rugienius, Jūratė Bronė Šikšnianienė, Birutė Frercks, Gražina Staniėnė, Inga Stepulaitienė, Perttu Haimi, Vidmantas Stanyš Characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars and hybrid clones using SSR and AFLP markers // *Zemdirbyste-Agriculture*. – 2015. - vol. 102. - No. 2. - p. 177–184. doi 10.13080/z-a.2015.102.023
  18. Suprun I., Tokmakov S., Stepanov I., Balapanov I. Design of multiplex SSR-markers for genetic diversity researches of genus *Malus*, *Prunus* and *Pyrus* // *Academic writings NCRRIH&V*. - 2013. – Vol.1. – pp. 30–38. (in Russian)
  19. Tamura K., Dudley J., Nei M. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // *Mol. Biol. Evol.* – 2007. – Vol. 24. – pp.1596–1599. doi:[10.1093/molbev/msm092](https://doi.org/10.1093/molbev/msm092)
  20. Yeh F.C., Boyle T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // *Belgian J. Botany*. – 1997. – Vol. 129. – P. 157.

## GENETIC POLYMORPHISM ANALYSIS OF STRAWBERRY (*FRAGARIA ANANASSA* DUCH.) USING SSR-MARKERS

**O. V. Dubin, O. V. Subin, M. D. Melnychuk, A. F. Likhanov**

*Elaboration of effective and reliable assessment methods for genetic polymorphism of varieties, hybrids and initial forms with using molecular markers is an important tool in selection process, planting material certification and copyright protection. Estimation of genetic polymorphism for strawberry varieties of Ukrainian and worldwide selection with SSR-analysis was carried out in the research. Awareness of 12 SSR-loci was analyzed from scientific sources. 9 loci which made it possible to obtain explicit and reproducible alleles were selected for further analysis of strawberry varieties. 3 microsatellite loci weren't used due to the presence of diffuse bands and problems with interpretation of alleles with large number. Totally 69 alleles were detected in strawberry varieties using 9 selected loci. Molecular size of alleles was 278-76 bp. The largest amount of alleles was obtained for amplification EFMvi136 locus (11 alleles). The smallest amount for EMFv029 locus (4 alleles). The highest level of heterozygosity was found for EMFvi108 locus (43.2 %). The lowest level for UDF002 locus (10.1 %). The range of genetic distances between varieties ranging from 0.059 (between Hološiivska rannia – Sweet Ann) to 0.65 (between Sweet Ann – Senga Sengana and Hološiivska rannia - Elsanta). Indices of genetic identity ranging from 0.521 to 0.942 between the same varieties. A cluster analysis was carried out and the dendrogram of genetic affinity was constructed by UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). According to the SSR analysis, the varieties are clearly divided into two separate clusters. The first cluster included varieties of Ukrainian and American origin. The closest pairs by genetic distances were Hološiivska rannia – Sweet Ann ( $d=0.059$ ), Berehynia – Fakel ( $d=0.139$ ), Albion – Alina ( $d=0.208$ ). The second cluster included varieties of Italian, Holland and German origin: Clery – Alba ( $d=0.245$ ) and Elsanta – Senga Sengana ( $d=0.263$ ). The results of 9-SSR analysis allowed a revealing polymorphism by all molecular-genetic markers. The level of polymorphism varied depending on SSR-marker. Genetic identification system of strawberry varieties was proposed based on input data*

*Key words: strawberry, SSR-markers, DNA-fingerprinting, microsatellites.*

*Отримано редколегією 02.06.2017*