

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ И СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ
ПРИРОДНЫХ И КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ: МОБИЛИЗАЦИЯ, ИЗУЧЕНИЕ,
СОХРАНЕНИЕ, ЭКСПОНИРОВАНИЕ**

УДК 582.998.2:577.21

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО СХОДСТВА СОРТОВ ХРИЗАНТЕМЫ САДОВОЙ
КОЛЛЕКЦИИ НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА С ПРИМИНЕНИЕМ
SSR-АНАЛИЗА**

**Цюпка Валентина Анатольевна, Золотарева Альбина Геннадиевна,
Зыкова Вера Константиновна, Хайленко Елена Владимировна**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, 298648,
Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, спуск Никитский, 52
E-mail: valentina.brailko@yandex.ru

Проведено исследование генетического сходства сортов популярного цветочно-декоративного объекта – хризантемы садовой (*Chrysanthemum* × *morifolium* (Ramat.) Hemsl.) коллекции Никитского ботанического сада с применением микросателлитного анализа. Исключительная экономическая важность и большое количество сортов данной культуры делают проблематичным их идентификацию, что приводит к менее эффективному процессу селекции. В случае хризантем генотипы практически невозможно различить с помощью фенотипических методов из-за высокой вариабельности морфологических характеристик, даже если они принадлежат к одной группе. Учитывая существенные преимущества молекулярно-генетического анализа для решения вопроса оценки генетического сходства сортов, целью настоящего исследования было генотипирование и установление генетической близости культиваров хризантемы, а также проведение генетической паспортизации сортов, внесенных в реестр селекционных достижений Российской Федерации. В исследование включено 2 вида (*C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* и *C. chanetii* H. Lev.) и 23 сорта. Генетический анализ проведен по 6 SSR локусам. В изученной выборке выявлено 42 аллельных варианта. Высокий уровень сходства по аллельному составу был выявлен между парами сортов: 'Медея' и 'Puma White' (0,95), 'Элен' и 'Cascad' de Orleans' (0,89), 'Адмирал Алферьев' и 'Puma White' (0,88), 'Кира' и 'Медея' (0,88), 'Кира' и 'Puma White' (0,88), 'Адмирал Алферьев' и 'Золотой Паучок' (0,86), 'Адмирал Алферьев' и 'Орфей' (0,86), 'Адмирал Алферьев' и 'Кира' (0,86), 'Орфей' и 'Puma White' (0,86). Установлено, что изученные сорта мелкоцветковых хризантем генетически близки к видам *C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* и *C. chanetii*, входящим в число вероятных видов-предков хризантемы садовой. Наши результаты продемонстрировали высокую воспроизводимость и информативность подобранных SSR маркеров, которые могут использоваться для оценки генетического разнообразия и взаимосвязей между сортами *C. × morifolium*.

Ключевые слова: *Chrysanthemum* × *morifolium*; SSR; генетическое сходство; селекция; информативные локусы; генетическое разнообразие

Введение

Ботанические сады во всем мире, как в России, так и за рубежом, занимаются не только интродукцией и размножением ценных и редких видов растений, но и сохранением их генетического биоразнообразия для последующих поколений (Международная программа ботанических садов по охране растений, 2000). Проблема комплексного изучения генофонда растений, в особенности ценных садовых культур, с применением молекулярно-генетических методов обладает высоким уровнем актуальности в современной генетике (Feng et al., 2016; Luo et al., 2018; Olejnik et al., 2021). Ее решение позволяет повысить эффективность использования потенциала генотипов коллекционных фондов, имеет важное значение в фундаментальных вопросах, касающихся филогенетических аспектов, выяснения генетических взаимосвязей на уровне рода, а также ускорении селекционного процесса.

Наряду с этим, при изучении значительных объемов генетических ресурсов с использованием различных типов маркерных систем, появляется возможность получения новой достоверной научной информации об уровне полиморфизма использованных ДНК-маркеров (Супрун и др., 2019). Это в свою очередь позволяет устанавливать их эффективность для решения различного рода задач: оценки генетической структуры коллекций генофонда, естественных популяций с разным уровнем гетерогенности, паспортизации отдельных генотипов и при анализе родословных сортов. Полученные данные вносят вклад в развитие методической базы для выполнения дальнейших молекулярно-генетических исследований.

Выбор того или иного молекулярного маркера, вариабельность которого будет положена в основу работы, является одной из важных задач для исследователя. Скорость эволюционных изменений определенного сегмента ДНК определяет уровень филогенетического разрешения и может быть различной у разных организмов (Zhang et al., 2014). Поэтому каждая изучаемая группа растений, например, в рамках рода или вида, требует от молекулярных биологов индивидуального подхода, анализа различных участков ДНК и подбора необходимых молекулярно-генетических маркеров.

Хризантема (*Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl.) – одно из самых популярных декоративных растений в мире, имеет длительную историю культивирования, известна своим декоративным и лекарственным использованием (Zhang et al., 2010; Luo et al., 2018). Значительное разнообразие типов соцветий и цветков, их окраски и формы соответствует геномной сложности и аллогексаплоидному фону культивируемых хризантем во всем мире (Dowrick and El-Bayoumi, 1966; Luo et al., 2018). Хотя происхождение хризантемы садовой остается неопределенным, общепринятая гипотеза заключается в том, что садовые культивары произошли от естественной гибридизации между видами *C. sinense* Ledeb., *C. erubescens*, *C. ornatum* Hemsl., *C. japonese*, *C. makinoi*, *C. chonetii* H.Lev., *C. vestitum* (Hemsl.) Kitam., *C. indicum* L., *C. lavandulifolium* Makino и *C. zawadskii* Herbach. (Dai et al., 1998; Yang et al., 2006). Сортные хризантемы являются высоко гетерозиготными из-за их аутбридинга и самонесовместимости, и это во многом является замедляющим фактором селекционного процесса хризантемы (Luo et al., 2018).

Изучение классификации хризантем довольно популярная и актуальная тематика, работы проводятся в Китае, США, Украине и Японии (Garibaldi et al., 2009; Yu et al., 2009; Barakat et al., 2010; Zhang et al., 2013; Yuan et al., 2017). По сравнению с системами классификации морфологических признаков, молекулярные маркеры могут выявлять генетические различия на уровне ДНК между растениями без воздействия окружающей среды и эффективны даже для оценки генетического разнообразия зародышевой плазмы в селекционных программах (Luo et al., 2018). За последние годы были разработаны и применены для сортов хризантемы различные молекулярные маркеры, такие как RAPD (Martin et al., 2002; Sehrawat, 2003), AFLP (Klie et al., 2013), межмикросателлитные повторы последовательностей (ISSR) (Miao et al., 2007; Shao et al., 2010), амплифицированный полиморфизм, связанный с последовательностью (SRAP) (Fei et al., 2011) и микросателлитные маркеры (SSR) (Zhang et al., 2014; Yuan et al., 2017; Luo et al., 2018). При этом наибольшее распространение для оценки генетического сходства получили SSR-маркеры, учитывая кодоминирование аллелей и их произвольное распределение по всему геному с особым консорциумом в низкокопийных регионах (Song et al., 2016).

Коллекция хризантемы садовой Никитского ботанического сада (НБС-ННЦ), основанная в 1812 году первым директором Сада Христианом Стевенсом, интродуцировавшим первые 14 сортов, на сегодняшний день является одной из крупнейших и старейших на постсоветском пространстве. По данным официального

каталога, она насчитывает 388 крупно- и мелкоцветковых сортов и гибридных форм хризантемы, включая образцы зарубежной и отечественной селекции (Аннотированный каталог цветочно-декоративных растений коллекции Никитского ботанического сада, 2018). Значительный вклад в расширение и развитие коллекции внесли селекционеры НБС-ННЦ: Иван Забелин, Вера Бабкина, Алла Глазурина, Галина Феофилова, Татьяна Шолохова, Наталия Смыкова и Зоя Андриюшенкова. Коллекция НБС-ННЦ служит основой для селекционных исследований, направленных на создание новых устойчивых сортов, адаптированных к почвенно-климатическим условиям Южного берега Крыма, и способствует сохранению генетического разнообразия хризантем.

Учитывая указанные преимущества молекулярно-генетического анализа, целью настоящего исследования было генотипирование и установление генетической близости сортов хризантемы садовой коллекции НБС-ННЦ, а также проведение генетической паспортизации сортов, внесенных в реестр селекционных достижений Российской Федерации.

Объекты и методы исследования

Исследования выполнены на 23 мелкоцветковых сортах хризантемы садовой и двух видах рода *Chrysanthemum* (табл. 1), произрастающих в коллекционных насаждениях ФГБУН «НБС-ННЦ».

Таблица 1

Происхождение и характеристики соцветий 25 образцов сортов хризантем и родственных им диких видов

Table 1

Origin and characteristics of inflorescences of 25 samples of chrysanthemum cultivars and related wild species

№	Название сорта/ Cultivar name	Тип соцветия/ Inflorescence type	Окраска соцветия/ Inflorescence color	Происхождение/ Origin
1	'Адмирал Алферьев' / 'Admiral Alferyev'	полумахровое ромашковидное / semi-double daisy	желтая / yellow	КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь / Vemadsky CFU, Simferopol
2	'Золотой Паучок' / 'Zolotoy Pauchek'	простое ромашковидное / single daisy	желтая / yellow	НБС-ННЦ, Ялта / NBG- NSC, Yalta
3	'Орфей' / 'Orphey'	простое анемоновидное / single anemone	красная / red	НБС-ННЦ, Ялта / NBG- NSC, Yalta
4	'Кира' / 'Kira'	полумахровое анемоновидное / semi-double anemone	желтая / yellow	НБС-ННЦ, Ялта / NBG- NSC, Yalta
5	'Медя' / 'Medea'	полумахровое анемоновидное / semi-double anemone	розовая / pink	НБС-ННЦ, Ялта / NBG- NSC, Yalta
6	'Puma White'	полумахровое анемоновидное / semi-double anemone	белая / white	Нидерланды / Netherlands
7	'Славяночка' / 'Slavyanochka'	махровое / terry	розовая / pink	НБС-ННЦ, Ялта / NBG- NSC, Yalta

Продолжение таблицы 1

8	'Madras'	простое анемоновидное / single anemone	красная / red	Европа / Europe
9	'Discovery'	махровое / terry	зеленая / green	Нидерланды / Netherlands
10	'Манита' / 'Manita'	простое анемоновидное / single anemone	белая / white	НБС-ННЦ, Ялта / NBG-NSC, Yalta
11	<i>C. zawadzkii</i> subsp. <i>zawadzkii</i>	полумахровое ромашковидное / semi-double daisy	розовая / pink	Обширный европейско-азиатский ареал / Extensive European-Asian range
12	'Сухоцветик' / 'Sukhotsvetik'	полумахровое ромашковидное / semi-double daisy	красная / red	НБС-ННЦ, Ялта / NBG-NSC, Yalta
13	'Blooming Beauty Purple'	махровое / terry	красно-фиолетовая / red-purple	Нидерланды / Netherlands
14	'Элен' / 'Elen'	махровое / terry	белая / white	ФИЦ СНЦ РАН, Сочи / FRC SSC RAS, Sochi
15	'Star White'	ромашковидное махровое / daisy terry	белая / white	Европа / Europe
16	'Cascad' de Orleans'	простое ромашковидное / single daisy	красная / red	Европа / Europe
17	'Струя Лазури' / 'Struya Lazuri'	полумахровое ромашковидное / semi-double daisy	красно-фиолетовая / red-purple	НБС-ННЦ, Ялта / NBG-NSC, Yalta
18	'Нива Золотая' / 'Niva Zolotaya'	махровое / terry	желтая / yellow	НБС-ННЦ, Ялта / NBG-NSC, Yalta
19	<i>C. chanetii</i>	простое ромашковидное / single daisy	белая / white	Природный ареал: Восточная Азия / Natural habitat: East Asia
20	'Николина' / 'Nikolina'	полумахровое анемоновидное / semi-double anemone	оранжевая / orange	НБС-ННЦ, Ялта / NBG-NSC, Yalta
21	'Опал' / 'Opal'	махровое / terry	желтая / yellow	НБС-ННЦ, Ялта / NBG-NSC, Yalta
22	'Никитская Юбилейная' / 'Nikitskaya Yubileynaya'	ромашковидное махровое / daisy terry	оранжевая / orange	НБС-ННЦ, Ялта / NBG-NSC, Yalta
23	'Two Tone Pink'	полумахровое ромашковидное / semi-double daisy	красно-фиолетовая / red-purple	Нидерланды / Netherlands
24	'Patio mun Red'	махровое / terry	красная / red	Нидерланды / Netherlands
25	'Плюшевый Мишка' / 'Plyushevy Mishka'	махровое / terry	красная / red	НБС-ННЦ, Ялта / NBG-NSC, Yalta

ДНК выделяли из молодых неповрежденных листьев растений *ex situ* одним из классических способов с применением цетилтриметиламмоний бромида (2×ЦТАБ) (Супрун и др., 2019) с добавлением 2%-го поливинилпирролидона (ПВП). Для оптимизации метода выделения ДНК в лизирующий раствор добавляли ПВП и β-меркаптоэтанол (таким образом 2×СТАВ содержал 2% ПВП и 20% β-меркаптоэтанол).

Использовали дополнительные процедуры очищения хлороформом с изоамиловым спиртом (помимо стандартной для протокола 1 процедуры) и 1–2 дополнительных промывок 70% спиртом. Качество и количество полученной ДНК оценивали на нанофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия).

Амплификацию проводили в термоциклере C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур). Подбор систем маркеров осуществлялся на основе анализа ранее проведенных исследований по этому вопросу, выполненных в Китае, Корее и Польше (Zhang et al., 2013; Khaig et al., 2013; Wang et al., 2014; Luo et al., 2018; Olejnik et al., 2021). Скрининг эффективности SSR-маркеров был проведен на 2 линейках: использовали олигонуклеотидные праймеры – 7 пар серии *JH* (Zhang et al., 2014; Luo et al., 2018) и 9 пар серии *KNUCRY* (Khaig et al., 2013) (табл.2).

Таблица 2

SSR-маркеры, подобранные для генотипирования сортов хризантемы садовой

Table 2

SSR markers selected for genotyping of garden chrysanthemum cultivars

Название праймера/ Primer	Мотив/ Motif repeat	Сиквенс (5'-3') / Sequences (5'-3')		Tm (°C)
<i>JH09</i>	(CA) ₆ CG(CA) ₆	F	TTCGCCCTCTGCTGCTCTTGTA	55
		R	CCATTTTCTTGGCTTCTTGTGCT	
<i>JH11</i>	(AG) ₁₆	F	TATACTGCTGAATATCGTCCCTC	55
		R	AAGCGTTATCAAATATCCCCTCC	
<i>JH47</i>	(CA) ₉	F	CTTCTTATCTCCTAACATTCCCA	55
		R	ATGTGATATGGAGGAGCCTTT	
<i>JH30</i>	(CA) ₈	F	GGTGAGGTGCAGAACAAAGGATA	53
		R	ACCAGATTGGAATGAAACGAAA	
<i>JH52</i>	(CT) ₈	F	GTTTAACCCCTTACCTCAACGTC	58
		R	TTTATGAAACTTGAAAACACCCACT	
<i>JH72</i>	(GT) ₉	F	ATCAGAAAGTTGAGGCGTGTTGG	57
		R	AAAGAAAAGAAAAGAAAGGAAAGAGGG	
<i>JH89</i>	(AC) ₉	F	ACGCATTCAATTATCATCACTTTAGCG	58
		R	TGGAGGACGGACGGGTCTTTAT	
<i>KNUCRY-10</i>	(CA) ₂₄	F	GTGTCTTCATCCCACCACCA	60
		R	TGTGAGAGAGTGAGTGTAGTGTGAG	
<i>KNUCRY-16</i>	(AC) ₃ (AC) ₄	F	TGTTACCCATTACAGCTC	55
		R	CACATGTATGACTAGGTGAGGTGA	
<i>KNUCRY-35</i>	(CA) ₂₇ , (CA) ₁₆	F	CCTCGCACTACTTCCAAATGA	50
		R	GGAGATTGTTTGTTCGTATCCTT	
<i>KNUCRY-59</i>	(CA) ₅	F	CGGTCCTCTCAGCCTTATTG	57
		R	GGTGTGTGTGTGAAGGTGCT	
<i>KNUCRY-77</i>	(CACG) ₃ , (CA) ₂₈	F	CCCGTTATCATGTGTATGC	50
		R	CGTATTTAAAGGTTTTCCTTTTCG	
<i>KNUCRY-84</i>	(CA) ₁₅	F	CTAGGCTCCTTCAGCCCTCT	50
		R	TCTGGACTAGCCGTCAGTTG	
<i>KNUCRY-85</i>	(CA) ₄	F	GACCAACAAAACGGAATGCT	50
		R	GTTGTCGTCCGTTGGCTAGT	
<i>KNUCRY-98</i>	(AC) ₄	F	TCACATCACACATCACTGCAA	55
		R	TGTGTGTGAGGGACACATGA	
<i>KNUCRY-76</i>	(TTG) ₇	F	TTGAGGTTGTGGAAATGCAG	55
		R	CGCGTTAACTTTGGTGTTTTT	

Были подобраны следующие условия реакции: начальная денатурация – 95°C – 5 мин, с последующими 33 циклами: денатурация – 95°C – 30 с, отжиг – Tm°C (табл. 2) – 45 с, элонгация – 72°C – 1 мин, с итоговой элонгацией при 72°C в течение 10 мин. Амплификацию всех локусов проводили два раза после оптимизации программы ПЦР

и концентрации реагентов. Для постановки реакции брали одинаковую концентрацию образцов ДНК (25 нг/мкл). Амплификацию проводили с использованием реактивов производства Евроген (Россия) в объеме 25 мкл содержащем следующие компоненты: 2,5 мкл PCR буфера (10X), 1,5 мкл дезоксинуклеозидтрифосфатов (2 ммоль), 1 мкл раствора $MgCl_2$ (25 ммоль), 0,3 мкл прямого праймера (10 мкмоль), 0,4 мкл обратного праймера (10 мкмоль), 0,2 мкл полимеразы (5 единиц/мкл). Праймеры были произведены компанией «Синтол».

На первоначальном этапе амплифицированные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле с $1 \times TBE$ буфером при 60 В в течение 1,5 ч с использованием универсального источника питания PowerPac™ (Bio-Rad, Сингапур). Агарозный гель визуализировали с помощью системы геледокументации E-box (Vilber Lourmat, Франция). Таким образом, были отобраны локусы, дающие ожидаемый размер.

Для детекции длин микросателлитных локусов использовали автоматическую систему для электрофореза Tape Station 4200 (Agilent Technologies, Германия) с картриджами D1000 ScreenTape и наборами реагентов (Agilent Technologies, Германия), что позволяет получать оцифрованные генетические профили.

Полученные данные были использованы для подсчета числа аллелей и диапазона их размера, а также показателя величины информативности микросателлитного локуса (PIC – polymorphism information content) (Nagi et al., 2012). С использованием макроса для Excel GenAlEx6.41 были посчитаны значения показателей наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности. Расчет коэффициента генетического сходства Дайса (Dice coefficient) между образцами и кластерный анализ методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA) были проведены с использованием программы PAST 3.16 (Hammer et al., 2001).

Анализ генетической структуры коллекции проводили с помощью байесовской кластеризации в программе STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Расчет числа возможных популяций производилось с помощью 1000000 генераций Марковских Цепей Монте-Карло, с отбрасыванием первых 300000 генераций (burn-in), с учетом наличия генетического смешения (admixture) и скоррелированности частот встречаемости аллелей (correlated allele frequency). Последующий выбор оптимального количества кластеров осуществляли с помощью сервиса Structure Harvester (Earl and Holdt, 2012).

Результаты и их обсуждение

Учитывая накопление вторичных метаболитов в тканях растительных образцов, была проведена оптимизация метода выделения ДНК. Как для стандартного протокола, так и для его модификаций использовали навеску растительной ткани не более 100 мг.

Показан лучший качественный выход ДНК при использовании протокола СТАВ с добавлением 2% PVP и 20% 2-β-меркаптоэтанола с дополнительной процедурой очищения хлороформом с изоамиловым спиртом (помимо стандартной для протокола 1 процедуры) и 2 дополнительных промывок 70% спиртом (табл. 3). Такая модификация позволяет получать препараты ДНК, пригодные для проведения дальнейших работ по генотипированию сортов хризантемы.

С использованием оптимизированного протокола получено от 7,9 до 167,6 мкг ДНК из 100 мг тканей листа. Спектрофотометрическая оценка качества ДНК также позволяет обоснованно сделать вывод об оптимальной применимости СТАВ-протокола с модификациями для получения чистой высокомолекулярной ДНК для растительных объектов: $A_{260/230}$ 1,52–2,57, $A_{280/260}$ 1,90–2,25 (табл. 3).

Таблица 3

Показатели количественного и качественного выхода ДНК, выделенной разными способами из листьев некоторых сортов хризантемы

Table 3

Indicators of quantitative and qualitative yield of DNA isolated by different methods from leaves of some cultivars of chrysanthemum

№	Сорт / Cultivar	CTAB +2% PVP			CTAB +2% PVP+20% 2-β- mercaptoethanol with additional rinses		
		Концентрация (нг/мкл)/ concentration (ng/μl)*	A _{260/280}	A _{260/230}	Концентрация (нг/мкл)/ concentration (ng/μl)	A _{260/280}	A _{260/230}
1	'Адмирал Алферьев' / 'Admiral Alferyev'	81,85	1,68	0,65	153	1,92	2,34
2	'Золотой Паучок' / 'Zolotoy Pauchek'	8,00	1,73	0,28	79	1,94	2,57
3	'Орфей' / 'Orphey'	57,50	1,97	1,25	128	1,91	2,55
4	'Кира' / 'Kira'	22,00	1,95	1,38	91	1,94	2,18
5	'Медea' / 'Medea'	72,35	2,06	1,36	117	1,62	1,63
6	'Puma White'	72,85	2,05	1,16	66	1,97	2,63
7	'Славяночка' / 'Slavyanochka'	53,30	2,01	1,38	578	2,16	2,15
8	'Madras'	25,50	1,91	0,91	367	2,09	1,90
9	'Discovery'	2,65	1,43	0,14	1056	2,23	2,20
10	'Манита' / 'Manita'	112,55	1,78	0,87	1233	2,25	2,29
11	<i>C. zawadzki</i> subsp. <i>zawadzki</i>	152,15	2,06	1,98	399	2,11	1,95
12	'Сухоцветик' / 'Sukhotsvetik'	74,50	1,99	1,28	783	2,14	2,07
13	'Blooming Beauty Purple'	85,30	2,05	1,48	168	1,90	1,52
14	'Элен' / 'Elen'	956,50	1,92	1,76	1030	2,20	2,16
15	'Star White'	47,80	1,96	1,35	611	2,17	2,16
16	'Cascad' de Orleans'	346,05	1,96	1,92	1107	2,14	2,09
17	'Струя Лазури' / 'Struya Lazuri'	178,15	2,05	1,68	635	2,19	2,37
18	'Нива Золотая' / Niva Zolotaya'	73,70	1,94	1,48	707	2,22	2,37
19	<i>C. chanetii</i>	108,4	2,05	1,67	1676	2,19	2,34
20	'Николина' / 'Nikolina'	110,35	1,83	0,87	544	2,18	2,28
21	'Опал' / 'Opal'	47,10	2,01	1,23	999	2,19	2,18
22	'Никитская Юбилейная' / 'Nikitskaya Yubileynaya'	119,9	1,97	1,68	473	2,17	2,30
23	'Two Tone Pink'	50,3	1,82	0,97	999	2,20	2,28
24	'Patio mun Red'	118,5	1,84	1,15	448	2,19	2,45
25	'Плюшевый Мишка' / 'Plushevyy Mishka'	68,75	1,96	1,33	579	2,13	2,21

Примечание. *- элюция ДНК в 100 мкл безнуклеазной воды
Note *- DNA elution in 100 μl nuclease-free water

Показано, что среди ДНК-маркеров микросателлиты являются предпочтительным типом маркеров для изучения генетической структуры популяций, анализа родителей и оценки генетических ресурсов, а также исследований молекулярной филогении; они успешно используются для установления различий между сортами (Zhang et al., 2014; Luo et al., 2018). Их амплификация с последующим электрофорезом позволяет получить индивидуальный ДНК-профиль сорта (Супрун и др., 2019).

В результате скрининговых работ оценена дискриминационная способность маркерных систем *JH* и *KNUCRY*: были исключены низкополиморфные маркеры и не образующие ожидаемый размер ампликона; отобрано 6 маркеров: *JH09*, *JH11*, *JH72*, *JH89*, *JH30* и *KNUCRY-85* (табл. 4). По каждому из изученных микросателлитных локусов были получены четкие и воспроизводимые результаты фрагментного анализа.

Все использованные в работе праймеры выявляли полиморфизм исследуемых образцов по SSR-локусам. Всего для 25 образцов хризантемы было выявлено 42 аллельных варианта по 6 изученным SSR-локусам. Размер информативных аллелей варьировал в диапазоне 184–538 п.н. Число аллелей на локус у изученных генотипов варьировало от 4 (*KNUCRY-85*) до 12 (*JH30*). Среднее количество аллелей в локусе составило 7,00. Значения коэффициента информативности микросателлитных локусов варьировали от 0,58 для локуса *KNUCRY-85* до 0,81 для локуса *JH30* (табл. 4), среднее значение этого показателя составило 0,70. Уровень наблюдаемой гетерозиготности изучаемой выборки в среднем составил 0,68, ожидаемой гетерозиготности – 0,76. При анализе были выявлены образцы, несущие редкие (частота встречаемости не более 5%) для изученной выборки аллели.

Таблица 4

Данные о полиморфизме 6 SSR-локусов 25 образцов хризантемы, полученные в результате статистического анализа

Table 4

Data on polymorphism of 6 SSR loci of 25 chrysanthemum samples obtained as a result of statistical analysis

Локус / Locus	Число аллельных вариантов / Number of allelic variants	Диапазон размера фрагментов, п.н. / Fragment size range, bp	H_o^1	H_e^2	PIC^3	Число редких аллельных вариантов ⁴ / Number of rare allelic variants
<i>JH72</i>	8	202-538	0,64	0,82	0,79	1
<i>JH89</i>	6	286-496	0,76	0,80	0,77	0
<i>JH30</i>	12	184-564	0,86	0,94	0,81	3
<i>JH09</i>	7	282-510	0,56	0,66	0,62	1
<i>JH11</i>	5	356-446	0,64	0,68	0,63	1
<i>KNUCRY-85</i>	4	260-268	0,64	0,64	0,58	0
Всего / Total	42	-	4,10	4,55	4,20	6
Среднее значение / Average value	7,00 ± 0,72	-	0,68 ± 0,12	0,76 ± 0,03	0,70 ± 0,02	1,00 ± 2,45

Примечание. ¹ H_o – наблюдаемая гетерозиготность, ² H_e – ожидаемая гетерозиготность, ³ PIC – коэффициент информативности микросателлитного локуса, ⁴ редкий аллельный вариант – частота встречаемости аллеля не более 5%.

Note. ¹ H_o – observed heterozygosity, ² H_e – expected heterozygosity, ³ PIC – polymorphism Information Content, ⁴ rare allelic variant – the frequency of occurrence of the allele is no more than 5%.

Редкие аллельные варианты отмечены для сортов 'Кира', 'Discovery', 'Манита', 'Сухоцветик', 'Опал' и 'Никитская Юбилейная'. В целом, выбранный для анализа набор маркеров оказался достаточно информативным. Данные относительно их дискриминационной силы выше или сопоставимы с результатами исследований полиморфизма микросателлитных локусов в других мировых коллекциях хризантемы. Так, анализ полиморфизма 88 образцов хризантемы, включающих 52 китайских традиционных сорта хризантемы, 27 японских сортов хризантемы с помощью набора из 10 SSR-маркеров выявил 40 аллелей (в среднем 4 аллеля на локус), при среднем значении PIC = 0,79 (Luo et al., 2018). Н. Wang с соавторами (2013) выбрали 55 SSR-маркеров для анализа 32 сортов хризантемы. В исследовании значение генетического расстояния в среднем составило 0,972. Коллекция из 97 образцов хризантемы в Польше была изучена с использованием 14 SSR-маркеров (Olejnik et al., 2021). Это позволило выявить дуближи в коллекции и определить сорта с уникальным набором аллельных вариантов. Возможность определения полного сходства может оказать огромное влияние на защиту интеллектуальной собственности селекционера.

На основании полученных данных о частоте встречаемости аллелей и их размере была проведена оценка степени генетического родства изученных сортов. Для всех образцов были вычислены значения коэффициента попарного генетического сходства Дайса. Значения данного показателя варьировали от 0,43 ('Медея' и 'Cascad' de Orleans', 'Puma White' и 'Cascad' de Orleans') до 0,95 ('Медея' и 'Puma White'). Высокий уровень сходства по аллельному составу был также выявлен между 8 парами сортов *C. × morifolium*: 'Элен' и 'Cascad' de Orleans' (0,89), 'Адмирал Алферьев' и 'Puma White' (0,88), 'Кира' и 'Медея' (0,88), 'Кира' и 'Puma White' (0,88), 'Адмирал Алферьев' и 'Золотой Паучок' (0,86), 'Адмирал Алферьев' и 'Орфей' (0,86), 'Адмирал Алферьев' и 'Кира' (0,86), 'Орфей' и 'Puma White' (0,86).

Установлено, что изученные сорта мелкоцветковых хризантем генетически близки к видам *C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* и *C. chonetii*, входящим в число вероятных видов-предков хризантемы садовой. Коэффициент попарного генетического сходства Дайса варьировал у *C. chonetii* и сортов от 0,51 (*C. chonetii* и 'Медея', *C. chonetii* и 'Discovery') до 0,77 (*C. chonetii* и 'Николина') и у *C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* от 0,50 (*C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* и 'Cascad' de Orleans') до 0,84 (*C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* и 'Сухоцветик').

На основании коэффициента попарного генетического сходства Дайса был проведен также кластерный анализ методом UPGMA (рис. 1). Все образцы хризантем на дендрограмме были разделены на два основных кластера, отражающих филогенетические связи между видами рода *Chrysanthemum* и культурными сортами из генофондовой коллекции НБС-ННЦ.

В первый кластер входят дикорастущие виды: *C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* и *C. chonetii* (рис. 2), а также большинство (16 из 23) изученных сортов *C. × morifolium*. Такое распределение свидетельствует о происхождении множества гибридов и культурных сортов хризантем от некоторого количества диких видов, одними из которых являются исследованные видовые образцы.

Ко второму кластеру относятся сорта 'Орфей', 'Адмирал Алферьев', 'Кира', 'Медея', 'Puma White', 'Золотой Паучок', которые выделены в отдельный подкластер и образуют единый кластер с сортом 'Славяночка'. Учитывая, что род *Chrysanthemum* в ряде работ по молекулярной филогенетике, проведенных в центре видового разнообразия, был разделен на две основные клады, а вышеперечисленные дикие родичи соответствуют комплексу видов *C. zawadzkii* (Liu et al., 2012; Hao et al., 2022; Wang et al., 2023). Можно предположить, что в происхождении этих семи сортов, по

всей видимости, принимали участие непредставленные в выборке виды из клады *indicum*, такие как *C. indicum*, *C. lavandulifolium*, *C. nankingense* и др. (Wang et al., 2022). Однако более точные выводы могут быть сделаны только при проведении дальнейших исследований для более гетерогенных образцов хризантем.

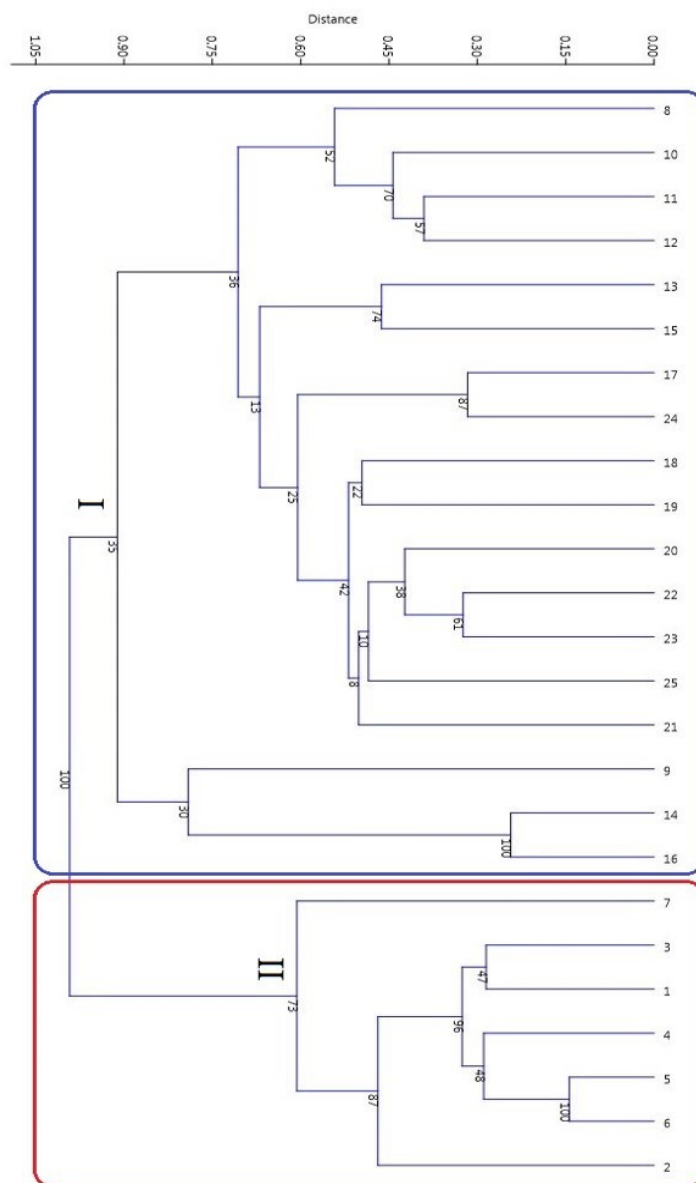


Рис. 1 Дендрограмма, построенная методом UPGMA на основе коэффициента генетического сходства Дайса, включающая 25 образцов хризантемы.

(Примечание: нумерация сортов соответствует данным в табл. 1)

Fig. 1 Dendrogram constructed by the UPGMA method based on the Dice coefficient of genetic similarity, including 25 chrysanthemum samples.

(Note: the numbering of cultivars corresponds to the data in Table 1)

С помощью байесовского алгоритма была определена генетическая структура изученной выборки в программе Structure 2.3.4. Оптимальное количество кластеров оценивалось с помощью метода *deltaK* и наибольшую поддержку получило число возможных кластеров $K = 6$. Каждый цветной сегмент представляет одну субпопуляцию, длина которой пропорциональна соответствующему значению для K . По результатам анализа, красный, розовый и голубой компонент распределились в выборке относительно равномерно (около 20–25% каждый) (рис. 3). Максимальное количество зеленого компонента (более 35%) определено у сортов селекции НБС-ННЦ 'Кира', 'Медея', 'Манита' и 'Опал'; у этих же сортов минимальные значения желтого и

синего компонента. Эти сорта были выведены селекционерами Галиной Феофиловой и Татьяной Шолоховой в период с 1990 по 2005 год. Вероятно, индивидуальный отбор перспективных форм среди сеянцев осуществлялся ими на основе посева гибридных семян, полученных от одних и тех же исходных родительских форм хризантем.



Рис. 2 Дикорастущие виды хризантем: А – *C. weyrichii* (Maxim.) Miyabe & T. Miyake [syn. *C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii*] (Интродукция НБС – ННЦ, 2018 г., Ставропольский ботанический сад им. В.В. Скрипчинского), Б – *C. chanetii* H.Lev. (Интродукция НБС – ННЦ, 2021 г., БСИ ДВО РАН)
 Fig. 2 Wild species of chrysanthemums: А – *C. weyrichii* (Maxim.) Miyabe & T. Miyake [syn. *C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii*] (Introduction by NBG-NSC, 2018, V.V. Skripchinsky Stavropol Botanical Garden), Б – *C. chanetii* H.Lev. (Introduction by NBG-NSC, 2021, BGSi FEB RAS)

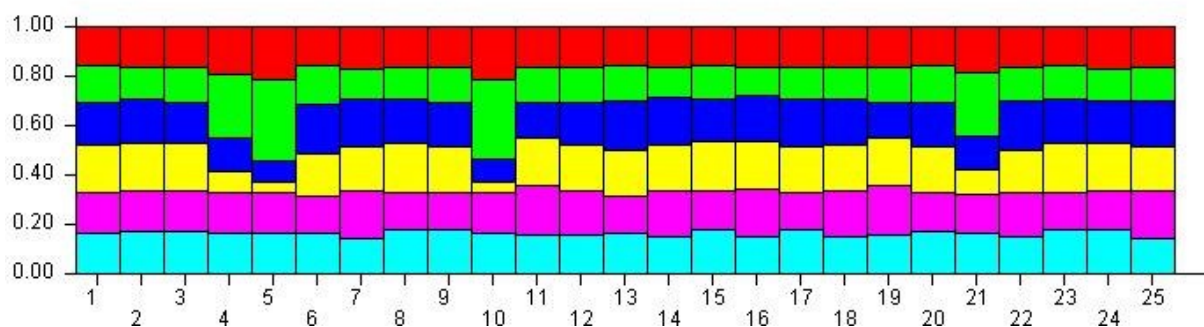


Рис. 3 Вероятность отнесения исследованных образцов хризантемы к различным группам по результатам анализа в программе STRUCTURE.

Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы, нумерация сортов соответствует данным в табл. 1

Fig. 3. Probability of classifying the studied chrysanthemum samples into different groups based on the results of analysis in the STRUCTURE program.

Vertical axis – proportion of allele frequencies of the corresponding cluster; horizontal axis – analyzed samples, numbering of cultivars corresponds to the data in Table 1

Дискриминационный потенциал использованной маркерной системы дал возможность для 4 использованных сортов, внесенных в Государственный реестр селекционных достижений определить индивидуальные аллельных сочетаний (табл. 5).

При анализе аллельного состава показано, что все образцы проявили гетерогенность (более одной аллели) аллельного состава по трем ('Сухоцветник') – пяти ('Никитская Юбилейная') локусам. Гетерогенность может быть следствием гетерозиготности отдельных растений.

Таблица 5

Аллельный состав микросателлитных локусов сортов хризантемы садовой, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений

Table 5

Allelic composition of microsatellite loci of garden chrysanthemum cultivars registered in the State Register of Breeding Achievements

Сорт / Cultivars	Локусы / Locus					
	ЖН 09	ЖН 11	ЖУ 30	ЖН 72	ЖН 89	KNUCRY-85
'Кира' / 'Kira' – 8557156*	282	358	184: 258	320:538	288: 390	264
'Сухоцветик' / 'Sukhotsvetik' – 8557160	282	360	244: 400	322: 530	286: 382: 496	264
'Николина' / 'Nikolina' – 8557158	300: 396	386	246: 392: 554	322: 502	288: 390: 496	268
'Никитская Юбилейная' / 'Nikitskaya Yubileynaya' – 8557157	300: 396	386: 446	242: 396: 560	320: 534	288: 494	264
Примечание. *- код в госреестре Note. code in the state register						

На основании проведенного микросателлитного анализа и капиллярного электрофореза полученных продуктов, составлены оцифрованные генетические профили изученных генотипов.

Выводы

Таким образом, выбранные маркерные системы позволили провести дифференциацию изученных представителей рода *Chrysanthemum* из генофондовой коллекции НБС-ННЦ по степени их генетического сходства, идентифицировать близкие мелкоцветковые сорта *C. × morifolium*. Это необходимо для ускорения и повышения эффективности селекционного процесса, а также для подбора родительских пар при гибридизации, так как это тесно связано с проблемой спорофитной самонесовместимости. Показано, что высокий уровень генетического сходства обусловлен происхождением сортов. В результате работы оптимизирован протокол экстракции ДНК из целевых объектов. Получены данные об аллелях по каждому микросателлитному локусу 25 образцов хризантемы. Проведена паспортизация сортов хризантемы, внесенных в Реестр селекционных достижений РФ. Изученные сорта являются коммерчески значимыми и потенциальными с точки зрения импортозамещения, их паспортизация необходима для оценки соответствия партий стандарту и контроля качества посадочного материала.

Благодарности

Работа выполнена в рамках темы Госзадания ФГБУН «НБС-ННЦ» FNNS-2025-0003 на базе Уникальной научной установки "ФИТОБИОГЕН".

Acknowledgements

The study was carried out within the framework of the FSFIS "NBS-NSC" FNNS-2025-0003 based on the Unique Scientific Installation "FITO BIOGEN".

Литература / References

Международная программа ботанических садов по охране растений / Под ред. Смирнова, Тихоновой. М., 2000. 57 с.

[International Botanic Gardens Plant Conservation Programme / Edited by Smirnov, Tikhonova. Moscow, 2000. 57 p.]

Супрун И.И., Токмаков С.В., Степанов И.В., Лободина Е.В. Методы молекулярного ДНК-маркирования в оценке генетического разнообразия косточковых культур // Научные Труды СКФНЦСВВ. 2019. Т. 23. С. 31–39. DOI 10.30679/2587-9847-2019-23-31-39

[Suprun I.I., Tokmakov S.V., Stepanov I.V., Lobodina E.V. Methods of molecular DNA marking in assessing the genetic diversity of stone fruit crops // Scientific Works of the SKFNCSVV. 2019. 23:31–39. DOI 10.30679/2587-9847-2019-23-31-39]

Улановская И.В., Смыкова Н.В., Андрюшенкова З.П. Аннотированный каталог цветочно-декоративных растений коллекции Никитского ботанического сада: в 5 т. / под ред. Ю.В. Плугатаря. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. Т 3. 232 с.

[Ulanovskaya I.V., Smykova N.V., Andryushenkova Z.P. Annotated catalog of ornamental plants from the collection of the Nikitsky Botanical Garden: in 5 volumes / edited by Yu.V. Plugatar. Simferopol: IT "ARIAL". 2018. 3:232]

Barakat M.N., Fattah R.S.A., Badr M., Eltorky M.G. In vitro mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving *Chrysanthemum morifolium* // African Journal Agriculture Research. 2010. № 5. P. 748–757. DOI: 10.5897/AJAR09.679.

Dai S.L., Chen J.Y., Li W.B. Application of RAPD analysis in the study on the origin of Chinese cultivated *Chrysanthemum* // Acta Botanica Sinica. 1998. Vol. 40. P. 1053–1059.

Dowrick G.J., El-Bayoumi A. The origin of new forms of the garden *Chrysanthemum* // Euphytica. 1966. № 15. P. 32–38.

Earl D.A., von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation genetics resources. 2012. Vol. 4. №. 2. P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.

Fei Z., Chen S., Chen F., Fang W., Yu C., Li F. SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*) // Molecular Breeding. 2011. Vol. 27. P. 11–23. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9409-1>

Feng S., He R., Lu J., Jiang M., Shen X., Jiang Y., Wang, H. Development of SSR markers and assessment of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* cultivars // Frontiers in Genetics. 2016. № 7. P. 1-13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00113>

Garibaldi A., Bertetti D., Gullino M.L. Susceptibility of chrysanthemum and Paris daisy varieties to several isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi* // Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 2009. Vol. 74. P. 651–657.

Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // Paleontologia Electronica. 2001. Vol. 4. №. 1. P. 1-9.

Khaing A.A., Moe K.T., Hong W.J., Park C.S., Yeon K.H., Park H.S., Park Y.J. Phylogenetic relationships of chrysanthemums in Korea based on novel SSR markers // Genetics and Molecular Research. 2013. Vol. 12. № 4. P. 5335–5347.

Klie M., Menz I., Linde M., Debener T. Lack of structure in the gene pool of the highly polyploid ornamental chrysanthemum // Molecular Breeding. 2013. Vol. 32. P. 339–348. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9874-4>

Luo Ch., Chen Do., Cheng X., Liu H., Li Y., Huang C. SSR Analysis of Genetic Relationship and Classification in Chrysanthemum Germplasm Collection // Horticultural Plant Journal. 2018. Vol. 4. № 2. P. 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.01.003>

Martin C., Uberhuaga E., Perez C. Application of RAPD markers in the characterisation of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation // *Euphytica*. 2002. Vol. 127. P. 247–253. <https://doi.org/10.1023/A:1020215016347>

Miao H.B., Chen F.D., Zhao H.B. Genetic relationship of 85 chrysanthemum [*Dendranthema* × *grandiflora* (Ramat.) Kitamura] cultivars revealed by ISSR analysis // *Acta Horticulture Sinica*. 2007. Vol. 34. P. 1243–1248.

Nagy S., Poczaí P., Cernák I., Gorji A.M., Hegedus G., Taller J. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies // *Biochemical Genetics*. 2012. Vol. 50. P. 670–672. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>

Olejnik A., Parkitna K., Kozak B., Florczak S., Matkowski J., Nowosad K. Assessment of the Genetic Diversity of *Chrysanthemum* Cultivars Using SSR Markers // *Agronomy*. 2021. Vol. 11. P. 2318 (1-9). <https://doi.org/10.3390/agronomy11112318>

Liu P.L., Wan Q., Guo Y.P., Yang J., Rao G.Y. Phylogeny of the genus *Chrysanthemum* L.: evidence from single-copy nuclear gene and chloroplast DNA sequences // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. N 11. P. 1–13. e48970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048970>

Wan X., Lei D., Zhu M., Zhang H., Liao J., Zhang J., Liu Y. Phylogeny, genetics and ecological adaptation of the *Chrysanthemum indicum* complex // *Medicinal Plant Biology*. 2023. Vol. 2. N 17. P. 1–10. <https://doi.org/10.48130/MPB-2023-0017>

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. Vol. 155. №. 2. P. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>

Sehrawat S.K. DNA fingerprinting of chrysanthemum cultivars using RAPDs // *Acta Horticulture*. 2003. Vol. 624. P. 479–485 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.624.66>.

Shao Q.S., Guo Q.S., Deng Y.M., Guo H.P. A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2010. Vol. 2010. P. 1160–1169. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.11.002>

Song X.Y., Zhang C.Z., Ying L.I., Feng S., Yang Q., Huang S. SSR analysis of genetic diversity among 192 diploid potato cultivars // *Horticulture Plant Journal*. 2016. Vol. 2. P. 163–171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hpj.2016.08.006>

Hao D.C., Song Y., Xiao P., Zhong Y., Wu P., Xu L. The genus *Chrysanthemum*: Phylogeny, biodiversity, phytometabolites, and chemodiversity // *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. P. 1–25 p. 202213, 973197. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.973197>

Yang W.J., Glover B.J., Rao G.Y., Yang J. Molecular evidence for multiple polyploidization and lineage recombination in the *Chrysanthemum indicum* polyploid complex (Asteraceae) // *New Phytology*. 2006. Vol. 171. P. 875–886 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01779.x>

Yu M., Yukawa T., Kondo K. Molecular phylogenetic analysis of members of *Chrysanthemum* and its related genera in the tribe Anthemideae, the Asteraceae in East Asia on the basis of the internal transcribed spacer (ITS) region and the external transcribed spacer (ETS) region of nrDNA // *Chromosome Botany*. 2009. Vol. 4. P. 25–36. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01760.x>

Yuan W.J., Ye S., Dong M.F., Han Y.J., Zhang W.R., Shang F.D. Association analysis of phenotypic traits with SSR and SCoT molecular markers in *Chrysanthemum morifolium* // *Acta Horticulturae Sinica*. 2017. Vol. 44. P. 364–372.

Zhang F., Chen S., Chen F., Fang W., Li F. A preliminary genetic linkage map of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers // *Science Horticulture*. 2010. Vol. 125. P. 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.028>

Zhang Y., Dai S., Hong Y., Song X. Application of genomic SSR locus polymorphisms on the identification and classification of chrysanthemum cultivars in China // PLoS One. 2014. Vol. 9. №. 8. P. e104856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104856>.

Zhang Y., Wang C., Ma H.Z., Dai S.L. Assessing the genetic diversity of chrysanthemum cultivars with microsatellites // Journal of the American Society for Horticultural Science. 2013. Vol. 138. P. 479–486. <https://doi.org/10.21273/JASHS.138.6.479>.

Wang H., Jiang J., Chen S., Qi X., Peng H., Li P., Song A., Guan Z., Fang W., Liao Y. Next-generation sequencing of the Chrysanthemum nankingense (Asteraceae) transcriptome permits large scale unigene assembly and SSR marker discovery // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. e62293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062293>.

Статья поступила в редакцию 01.06.2025 г.

Tsyupka V.A., Zolotareva A.G., Zykova V.K., Khailenko E.V. Assessment of genetic similarity of Chrysanthemum cultivars of the garden collection of the Nikitsky Botanical Gardens using SSR analysis // Plant Biology and Horticulture: theory, innovation. 2025. № 2 (175). P. 78 – 92.

A study of the genetic similarity of cultivars of a popular flower-ornamental object – garden chrysanthemum (*Chrysanthemum* × *morifolium* (Ramat.) Hemsl.) from the Nikitsky Botanical Gardens' collection was conducted using microsatellite analysis. The exceptional economic importance and large number of cultivars of this crop make their identification problematic, which leads to a less effective breeding process. In the case of chrysanthemums, genotypes are almost impossible to distinguish using phenotypic methods due to the high variability of morphological characteristics, even if they belong to the same group. Considering the significant advantages of molecular genetic analysis for solving the issue of assessing the genetic similarity of cultivars, the purpose of this study was genotyping and establishing the genetic proximity of chrysanthemum cultivars, as well as conducting genetic certification of cultivars included in the register of breeding achievements of the Russian Federation. The study included 2 species (*C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* and *C. chonetii* H.Lev.) and 23 cultivars. Genetic analysis was performed on 6 SSR loci. 42 allelic variants were identified in the studied sample. A high level of similarity in allelic composition was revealed between pairs of cultivars: 'Medea' and 'Puma White' (0.95), 'Elen' and 'Cascad' de Orleans' (0.89), 'Admiral Alferyev' and 'Puma White' (0.88), 'Kira' and 'Medea' (0.88), 'Kira' and 'Puma White' (0.88), 'Admiral Alferyev' and 'Golden Spider' (0.86), 'Admiral Alferyev' and 'Orpheus' (0.86), 'Admiral Alferyev' and 'Kira' (0.86), 'Orpheus' and 'Puma White' (0.86). It was established that the studied cultivars of small-flowered chrysanthemums are genetically close to the species *C. zawadzkii* subsp. *zawadzkii* and *C. chonetii*, which are among the probable ancestral species of garden chrysanthemum. Our results demonstrated high reproducibility and informativeness of the selected SSR markers, which can be used to assess the genetic diversity and relationships between *C. × morifolium* cultivars.

Key words: *Chrysanthemum* × *morifolium*; SSR; genetic similarity; breeding; informative loci; genetic diversity