

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Комплексная агробиологическая оценка и анализ генетических взаимосвязей перспективных сортов ореха грецкого Никитского ботанического сада

Ю.В. Плугатарь¹, И.И. Супрун²✉, С.Ю. Хохлов¹, И.В. Степанов², Е.А. Аль-Накиб²

¹ Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр Российской академии наук, Ялта, Республика Крым, Россия

² Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

✉ supruni@mail.ru

Аннотация. Орех грецкий – важная садовая культура, которая по объему производства занимает второе место среди всех орехоплодных. Несмотря на значительную потребность на внутреннем рынке, промышленное производство плодов ореха грецкого в России в настоящее время развито недостаточно. При этом существует необходимость обновления сортимента новыми высокопродуктивными сортами, адаптированными к местным агроклиматическим условиям и обладающими высоким качеством плодов, конкурентоспособными на мировом уровне. Важным вопросом для успешной реализации селекционных программ является комплексное изучение генофонда. В связи с этим в рамках исследования была поставлена задача оценки по комплексу признаков перспективных сортов из коллекции генофонда ореха грецкого Никитского ботанического сада и анализа генетических взаимосвязей на основе микросателлитного генотипирования. По результатам выполненной фенотипической оценки изучаемая выборка, включающая 31 сорт, была разделена на несколько групп по основным хозяйственно-биологическим характеристикам, таким как морозо- и засухоустойчивость, срок начала вегетации, сроки созревания, тип цветения, масса плода, толщина эндокарпа. Выделены сорта с хозяйственно ценными признаками, которые можно рекомендовать как перспективные в качестве исходных родительских форм в селекционной работе на устойчивость к абиотическим стресс-факторам, а также сорта с повышенной урожайностью и обладающие крупным размером плодов. На основании анализа восьми SSR-маркеров (WGA001, WGA376, WGA069, WGA276, WGA009, WGA202, WGA089 и WGA054) оценен уровень генетического разнообразия и определены генетические взаимосвязи в изученной выборке сортов. Выявлено наличие от шести (WGA089) до одиннадцати (WGA276) аллелей на локус. Суммарно по восьми использованным ДНК-маркерам было идентифицировано 70 аллелей при среднем значении 8.75. Анализ данных SSR-генотипирования в программе Structure 2.3.4 установил наличие двух основных групп генотипов. С учетом того, что все изученные сорта представляют собой отборы из местных семенных популяций в разных районах Крымского полуострова, выявленный уровень полиморфизма может опосредованно отражать уровень генетического разнообразия местного генофонда ореха грецкого. При этом наличие двух генетически обособленных групп, вероятно, свидетельствует о существовании двух независимо сформировавшихся пулов автохтонного генофонда вида *Juglans regia* L. на Крымском полуострове.

Ключевые слова: орех грецкий; SSR-маркеры; перспективные сорта; коллекция; генетическое разнообразие; фенотипическая оценка.

Для цитирования: Плугатарь Ю.В., Супрун И.И., Хохлов С.Ю., Степанов И.В., Аль-Накиб Е.А. Комплексная агробиологическая оценка и анализ генетических взаимосвязей перспективных сортов ореха грецкого Никитского ботанического сада. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):454-462. DOI 10.18699/VJGB-23-55

Comprehensive agrobiological assessment and analysis of genetic relationships of promising walnut varieties of the Nikitsky Botanical Gardens

Yu.V. Plugatar¹, I.I. Suprun²✉, S.Yu. Khokhlov¹, I.V. Stepanov², E.A. Al-Nakib²

¹ The Order of the Red Banner of Labour Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Yalta, Republic of Crimea, Russia

² North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making, the Functional Scientific Center of "Breeding and Nursery", Krasnodar, Russia

✉ supruni@mail.ru

Abstract. Walnut is an important horticultural crop, the production of which ranks second among all nut crops. Despite the significant demand in the domestic market in Russia, the industrial production of walnut fruits in Russia is currently underdeveloped. At the same time, there is a need to update the assortment with new highly productive

varieties adapted to local agro-climatic conditions and having high quality nuts that are competitive at the world level. An important issue for the successful implementation of breeding programs is a comprehensive study of the gene pool. In this regard, within the framework of the study, the task was to evaluate promising varieties from the collection of the walnut gene pool of the Nikitsky Botanical Gardens and analyze genetic relationships based on microsatellite genotyping. On the basis of the performed phenotypic assessment, the study sample, which included 31 varieties, was divided into several groups according to the main phenotypic traits, such as frost and drought resistance, the start of the growing season, the ripening period, the weight and type of flowering, the weight of the fruit, and the thickness of the endocarp. Varieties with economically valuable traits that can be recommended as promising as initial parental forms in breeding work for resistance to abiotic stress factors have been identified, as well as varieties with increased productivity and large fruit sizes. Based on the analysis of eight SSR markers (WGA001, WGA376, WGA069, WGA276, WGA009, WGA202, WGA089 and WGA054), an analysis of the level of genetic diversity was performed and genetic relationships were established in the studied sample of varieties. Six (for WGA089) to eleven (for WGA276) alleles per locus have been identified. A total of 70 alleles were identified for the eight DNA markers used, with an average value of 8.75. Analysis of SSR genotyping data using Bayesian analysis established the presence of two main groups of genotypes. Taking into account the fact that all the studied varieties are selections from local seed populations in different regions of the Crimean Peninsula, the revealed level of polymorphism may indirectly reflect the level of genetic diversity of the local walnut populations. Furthermore, the presence of two genetically distant groups indicates the presence of two independently formed pools of the autochthonous gene pool of the species *Juglans regia* L. on the Crimean Peninsula.

Key words: walnut; SSR markers; perspective cultivars; collection; genetic diversity; phenotypic evaluation.

For citation: Plugatar Yu.V., Suprun I.I., Khokhlov S.Yu., Stepanov I.V., Al-Nakib E.A. Comprehensive agrobiological assessment and analysis of genetic relationships of promising walnut varieties of the Nikitsky Botanical Gardens. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):454-462. DOI 10.18699/VJGB-23-55

Введение

Орех грецкий – одна из важнейших орехоплодных культур, которая по объему производства уступает только миндалю. Мировые лидеры по производству ореха грецкого – Китай, Иран, США и Турция (Vahdati et al., 2019). Товарное производство плодов ореха грецкого в России в настоящее время не развито, однако имеются положительные тенденции по закладке промышленных садов. При этом существует необходимость обновления сортимента новыми высокопродуктивными сортами, адаптированными к местным агроклиматическим условиям и обладающими высоким качеством плодов.

Очевидно, что комплексное изучение генофонда ореха грецкого важно для повышения эффективности использования генетических ресурсов в решении селекционных задач по созданию сортов нового поколения, а также для сохранения и пополнения коллекций. При этом оценка уровня генетического разнообразия, выяснение степени генетического сходства, а также ДНК-паспортизация образцов коллекций занимают важное место. Одним из наиболее востребованных методов оценки генетического разнообразия ореха грецкого является анализ микросателлитных локусов генома (Vahdati et al., 2019). SSR-маркеры, широко применяемые в настоящее время для анализа полиморфизма ореха грецкого, разрабатывались как непосредственно для этого вида (Dangl et al., 2005; Torcu et al., 2015; Ikhsana et al., 2016), так и для вида *Juglans nigra* L. (Woeste et al., 2002). В дальнейшем эти маркеры были эффективны для изучения межвидового разнообразия *J. regia* благодаря высокому уровню кросс-воспроизводимости в пределах рода *Juglans*. Стоит выделить SSR-маркеры, маркируемые как WGA, которые применяются особенно часто (Bernard et al., 2018b). С помощью SSR-маркеров для грецкого ореха выполнен значительный объем работ, направленных на анализ генетической структуры коллекций генофонда, включая сорта, перспек-

тивные селекционные формы, а также отборы из местных популяций, представляющие интерес для селекции.

К наиболее масштабным исследованиям генетического разнообразия коллекций генетических ресурсов можно отнести работу, выполненную коллективом авторов из научного центра INRA, в которой с использованием 13 SSR-маркеров осуществили генотипирование 217 образцов ореха грецкого и 36 образцов других видов рода *Juglans* из коллекции INRA. По данным SSR-генотипирования было установлено наличие двух основных групп наибольшего генетического сходства, которые по большей части соответствовали эколого-географическому происхождению сортов. Полученные данные позволили сформировать базовую коллекцию (core-collection) из пятидесяти образцов, отображающую генетический полиморфизм всей выборки (Bernard et al., 2018a). Примечательно, что сравнительный анализ эффективности 13 SSR-маркеров в вышеупомянутой работе (Bernard et al., 2018a) и 364275 SNP-маркеров – данных, полученных с применением SNP-чипа “Axiom™ *J. regia* 700K SNP genotyping array”, показал близкий уровень информативности двух типов ДНК-маркеров при оценке генетической структуры коллекций (Bernard et al., 2018a, 2020a). Сопоставимое по масштабу исследование выборки из 189 сортов и селекционных форм, репрезентативно представляющей генколлекции из 25 регионов в 14 странах мира, позволило установить наличие двух главных групп, включивших образцы из Европы и Северной Африки и из Греции и Ближнего Востока (Ebrahimi et al., 2016). Наряду с упомянутыми масштабными исследованиями, выполнен широкий перечень работ с применением микросателлитов на коллекциях генофонда, а также местных популяциях в разных регионах мира: Европе (Pollegioni et al., 2011; Ebrahimi et al., 2017b; Vischi et al., 2017; Cseke et al., 2022), Восточной Азии (Gunn et al., 2010; Wang et al., 2015; Zhou et al., 2021), Средней и Южной Азии (Pollegioni et al., 2014; Roor et al., 2017; Shah

et al., 2018; Gaisberger et al., 2020; Magige et al., 2022), Ближневосточном регионе (Ebrahimi et al., 2011; Shamlu et al., 2018; Orhan et al., 2020; Davoodi et al., 2021; Guney et al., 2021), Северной Америке (Dangl et al., 2005; Aradhya et al., 2010; Ebrahimi et al., 2017a).

В дополнение к молекулярно-генетическому анализу полиморфизма на основе SSR-маркеров, нередко выполняется также комплексная оценка фенотипической изменчивости выборок образцов (Ebrahimi et al., 2011) или оценка по отдельным группам признаков, к примеру по характеристикам плодов (Chen et al., 2014). Это позволяет как сравнивать эффективность применения разных подходов для определения групп наибольшего генетического сходства (Pop et al., 2013), так и выделять селекционно ценные образцы на первом этапе и в дальнейшем оценивать гетерогенность отобранных групп образцов на основе данных микросателлитного анализа (Karimi et al., 2014; Davoodi et al., 2021).

Несмотря на проводимую селекционную работу по грецкому ореху на юге России (Луговской, Мурзинова, 2010; Хохлов, Баскакова, 2015; Супрун и др., 2016; Луговской, Балапанов, 2018) и наличие результатов изучения коллекций сортов с применением молекулярно-генетических методов (Balapanov et al., 2019), все же отметим ограниченность исследований, направленных на анализ уровня генетического разнообразия и выявление генетической структуры генофонда на Юге России, включая Крым и Северный Кавказ. Никитский ботанический сад (НБС-ННЦ) является одной из ведущих научных организаций в Российской Федерации, выполняющих селекционную работу по ореху грецкому. Коллекция генетических ресурсов ореха грецкого Никитского ботанического сада представлена 76 образцами. Основу составляют сорта селекции НБС-ННЦ (86 %). Среди интродуцированных генотипов 10 % от общего объема коллекции приходится на сорта из Молдавии и по 3 % – на образцы из Украины, Европы, США и Таджикистана (Хохлов, Баскакова, 2015). Очевидно, что комплексная фенотипическая оценка, выделение групп наиболее ценных генотипов, характеризующихся наличием одновременно нескольких селекционно ценных признаков, а также анализ генетических взаимосвязей ценных сортов и форм позволят повысить эффективность селекционного использования генофонда в целях создания новых адаптивных сортов с повышенным потенциалом продуктивности и высоким качеством плодов.

В представленной работе нами была поставлена задача провести оценку перспективных сортов ореха грецкого из коллекции генофонда НБС-ННЦ по хозяйственно ценным признакам, выделить группы сортов, обладающие комплексом важных характеристик, и выполнить анализ их генетических взаимосвязей с использованием микросателлитных ДНК-маркеров.

Материалы и методы

Фенотипическую оценку проводили в коллекционных насаждениях лаборатории степного садоводства (ЛСС) НБС-ННЦ в 2014–2022 гг. В качестве объекта наблюдений был выбран 31 образец ореха грецкого селекции Никитского ботанического сада (Хохлов, 2012). Территория ЛСС расположена в 25 км к северу от г. Симферополя, в селе

Новый Сад (45°08'50" N, 33°59'55" E), Республика Крым, Россия. В системе агроклиматического районирования полуострова она относится к центральному равнинно-степному району, характеризующемуся засушливым климатом с умеренно жарким вегетационным периодом и мягкой, неустойчивой зимой (Антюфеев и др., 2002). Также в работе по генотипированию был использован сорт Чандлер селекции США. Рельеф местности, на которой находится коллекционный сад, равнинный слабоволнистый; почва участка – чернозем южный карбонатный малогумусный тяжелосуглинистый на красно-бурых плиоценовых глинах. Средняя годовая температура воздуха составляет +10.5 °С, средняя температура января не превышает –1.0 °С, а июля – +21.9 °С. Растения ореха посажены по схеме 12×12 м, в качестве уплотнителя используется персик. Междурядья содержатся под черным паром. Возраст деревьев 30 лет.

Степень морозостойкости сортов определяли по методике, разработанной в Никитском саду (Рихтер, Ядров, 1985), и по методу Лапина и Рябовой (1982). Засухоустойчивость растений ореха оценивали в соответствии с методическими рекомендациями (Еремеев, Лишук, 1974; Кушниренко и др., 1975; Ильницкий, 2005).

Для экстракции ДНК применяли модифицированный СТАВ-метод (Rogers, Bendich, 1985). Генотипирование сортов ореха грецкого проводилось с использованием восьми SSR-маркеров: WGA001, WGA376, WGA069, WGA276, WGA009, WGA202, WGA089, WGA054 (Woeste et al., 2002; Dangl et al., 2005). ПЦР проходила при следующих условиях: концентрация реактивов ПЦР смеси: буфер 1X, dNTP – 0.24 mM, Taq 1U, SSR-праймеры (прямой и обратный) – по 0.16 мкМ каждого, ДНК – 40–50 нг. Параметры ПЦР: 3 мин начальная денатурация при 94 °С; затем 35 циклов: 20 с денатурация при 94 °С, 30 с отжиг праймеров при 58 °С, 40 с элонгация при 72 °С; заключительная элонгация 10 мин при 72 °С. Анализ размеров продуктов реакции проводили на автоматическом генетическом анализаторе Нанофор 05.

Обработку данных осуществляли в программе Gene Marker V3.0.1. В макросе Microsoft Excel GenAlEx 6.503 рассчитывались следующие генетические параметры: Na – число аллелей, Na (ср.) – среднее число аллелей, Ne – эффективное число аллелей, I – индекс разнообразия Шеннона, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации (Peakall, Smouse, 2012). График PCoA с коэффициентом генетического сходства Dice построен в программе Past 2.17 (Hammer et al., 2001) на основе бинарной матрицы. Кластерный анализ выполнен в программе Structure 2.3.4. Оптимальное значение кластеров для проведения анализа было установлено в онлайн-программе Structure Harvester (Evanno et al., 2005).

Результаты исследований

Фенотипическая оценка

На основании выполненной комплексной фенотипической оценки изучаемые сорта по основным хозяйственно-биологическим характеристикам были объединены в несколько групп.

По степени морозоустойчивости: *высокоморозостойкие* сорта, у которых без повреждений сохранялось 60–100 % генеративных и вегетативных почек – ‘Аркад’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’, ‘Скабери’, ‘Южнобережный’, ‘Поздноцветущий’; *среднеморозостойкие* (от 40 до 60 %) – ‘Боспор’, ‘Альминский’, ‘Конкурсный’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Долинный’, ‘Золотополянский’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Жемчужный’, ‘Соколиный’, ‘Новиков’, ‘Булганак’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Партизанский’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Комсомолец’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Коллективный’; *низкоморозостойкие* (менее 40 %) – ‘Бубенчик’, ‘Кача’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’.

По степени засухоустойчивости: *с высокой устойчивостью* – ‘Аркад’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Жемчужный’; *с устойчивостью выше средней* – ‘Альминский’, ‘Боспор’, ‘Конкурсный’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Золотополянский’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Южнобережный’, ‘Новиков’, ‘Булганак’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Коллективный’, ‘Партизанский’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Скабери’, ‘Бомба Чкаловская’; *с устойчивостью ниже средней* – ‘Бубенчик’, ‘Кача’.

По сроку созревания: *ранний* – ‘Аркад’, ‘Булганак’, ‘Долинный’, ‘Комсомолец’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Жемчужный’, ‘Орионид’, ‘Южнобережный’; *средний* – ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Золотополянский’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Дзержинский’, ‘Боспор’, ‘Бубенчик’, ‘Коллективный’, ‘Кача’, ‘Партизанский’, ‘Подлесный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Скабери’, ‘Коллективный’; *поздний* – ‘Конкурсный’, ‘Малосадовый’.

По типу цветения: *протогения* (сначала зацветают мужские соцветия) – ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Булганак’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Скабери’; *протандрия* (сначала распускаются женские цветки) – ‘Бубенчик’, ‘Коллективный’, ‘Кача’, ‘Партизанский’, ‘Конкурсный’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’; *гомогамия* (одновременное цветение мужских соцветий и женских цветков) – ‘Золотополянский’, ‘Аркад’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Жемчужный’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Южнобережный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’.

По массе плода: *крупноплодные* (более 12 г, относятся к разновидности *J. regia* L. var. *macrocarpa* DC. или *J. regia* f. *taxima*) – ‘Бомба Чкаловская’, ‘Булганак’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Скабери’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Аркад’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’; *среднеплодные* (от 6 до 12 г) – ‘Альминский’, ‘Золотополянский’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Южнобережный’, ‘Коллективный’, ‘Кача’, ‘Новиков’, ‘Партизанский’, ‘Конкурсный’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’,

‘Жемчужный’; *мелкоплодные* (менее 6 г) – ‘Бубенчик’. У всех сортов, за исключением ‘Бомба Чкаловская’, форма плода овально-округлая или яйцевидная.

По толщине эндокарпа: *тонкоскорлупые* (от 1 до 1.5 мм, относятся к разновидности *J. regia* L. var. *tenera* DC.) – ‘Золотополянский’, ‘Южнобережный’; *стандартноскорлупые* (от 1.5 до 2 мм, *J. regia* f. *semidura* DC.) – ‘Бомба Чкаловская’, ‘Булганак’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Скабери’, ‘Партизанский’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Аркад’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’, ‘Бубенчик’, ‘Коллективный’, ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Жемчужный’; *твердоскорлупые* (более 2 мм, относятся к разновидности *J. regia* L. var. *dura* DC.) – ‘Кача’, ‘Партизанский’, ‘Конкурсный’, ‘Дзержинский’.

По сроку начала вегетации: *ранний* – ‘Долинный’, ‘Комсомолец’, ‘Аркад’, ‘Жемчужный’, ‘Бельбекский Ранний’; *средний* – ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Булганак’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Скабери’, ‘Бубенчик’, ‘Коллективный’, ‘Кача’, ‘Партизанский’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Золотополянский’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Бурлюк’, ‘Соколиный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’, ‘Южнобережный’, ‘Крымский Скороплодный’; *поздний* – ‘Поздноцветущий’, ‘Конкурсный’.

Результаты многолетнего изучения генофонда ореха грецкого позволяют выделить сорта с хозяйственно ценными признаками, которые можно рекомендовать в качестве исходных родительских форм в селекционной работе: на устойчивость к неблагоприятным зимне-весенним условиям – ‘Аркад’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’, ‘Скабери’, ‘Южнобережный’, ‘Поздноцветущий’; на повышенную и высокую засухоустойчивость – ‘Аркад’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Жемчужный’. Для внедрения в производство рекомендуются сорта с комплексной устойчивостью к неблагоприятным климатическим условиям – ‘Бурлюк’, ‘Боспор’, ‘Аркад’, ‘Альминский’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Орионид’, ‘Конкурсный’, а также характеризующиеся высокой урожайностью и крупноплодностью – ‘Булганак’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Скабери’, ‘Партизанский’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Аркад’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’.

Анализ генетического разнообразия

В целях установления генетических взаимосвязей внутри изученной выборки сортов, анализа уровня генетического разнообразия и определения групп наибольшего генетического родства был выполнен анализ полиморфизма микросателлитных локусов.

В результате получены ДНК-профили, специфичные для всех изученных сортов. Выявлено от шести (WGA089) до одиннадцати (WGA276) аллелей на локус. Суммарно по восьми использованным ДНК-маркерам было идентифицировано 70 аллелей при среднем значении 8.75. Анализ уровня генетического полиморфизма включал показатели, представленные в табл. 1.

Таблица 1. Уровень полиморфизма SSR-маркеров

Локус	Na	Ne	I	Ho	He
WGA001	9.000	4.854	1.781	0.710	0.794
WGA376	9.000	5.071	1.829	0.677	0.803
WGA069	10.000	6.160	2.022	0.677	0.838
WGA276	11.000	6.450	2.060	0.645	0.845
WGA009	9.000	4.215	1.750	0.419	0.763
WGA202	9.000	3.269	1.487	0.484	0.694
WGA089	6.000	2.873	1.337	0.484	0.652
WGA054	7.000	4.107	1.579	0.581	0.757
Среднее	8.750	4.625	1.731	0.585	0.768

Примечание. Na – число выявленных аллелей; Ne – число эффективных аллелей; I – индекс разнообразия; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность.

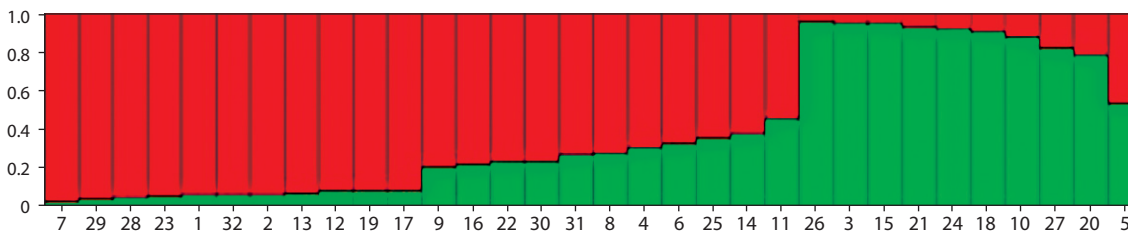


Рис. 1. График, построенный в программе Structure по данным генотипирования восемью SSR-маркерами 32 сортов ореха грецкого.

Названия сортов: 1 – ‘Альминский’, 2 – ‘Новиков’, 3 – ‘Булганак’, 4 – ‘Бубенчик’, 5 – ‘Аркад’, 6 – ‘Гурзуфский’, 7 – ‘Сладкоядерный’, 8 – ‘Золотополянский’, 9 – ‘Крымский Скороплодный’, 10 – ‘Долинный’, 11 – ‘Коллективный’, 12 – ‘Жемчужный’, 13 – ‘Конкурсный’, 14 – ‘Кача’, 15 – ‘Партизанский’, 16 – ‘Памяти Пасенкова’, 17 – ‘Поздноцветущий’, 18 – ‘Пионер Крыма’, 19 – ‘Держинский’, 20 – ‘Соколиный’, 21 – ‘Бельбекский’, 22 – ‘Боспор’, 23 – ‘Комсомолец’, 24 – ‘Бельбекский Ранний’, 25 – ‘Бомба Чкаловская’, 26 – ‘Малосадовый’, 27 – ‘Подлесный’, 28 – ‘Скабери’, 29 – ‘Южнобережный’, 30 – ‘Бурлюк’, 31 – ‘Орионид’, 32 – ‘Чандлер’.

Значение показателя Ne варьировало от 2.873 (WGA089) до 6.450 (WGA276). При этом в группе маркеров с одинаковым числом аллелей (9 аллелей на локус), WGA001, WGA376, WGA009 и WGA202, данный показатель варьировал от 3.269 (WGA202) до 5.071 (WGA376), что может быть обусловлено изменением частот встречаемости аллелей. Наименьшее (1.337) и наибольшее (2.060) значение индекса разнообразия I было определено у наименее полиморфного маркера WGA089 и наиболее полиморфного маркера WGA276 соответственно. При этом максимальное значение величины наблюдаемой гетерозиготности было выявлено по маркеру WGA001, а ожидаемой гетерозиготности – по маркеру WGA276.

На основе данных генотипирования 32 сортов ореха грецкого по восьми SSR-маркерам был проведен анализ в программе Structure 2.3.4. Количество проанализированных кластеров было в пределах от 2 до 7. Исходя из результатов анализа в онлайн-программе Structure Harvester рассчитано оптимальное значение кластеров, равное 2. Результаты, полученные при значении K = 2, представлены на рис. 1.

По преобладанию первого или второго кластеров изученные крымские сорта можно условно разделить на две группы. Первая группа (доминирует кластер 1): ‘Бул-

ганак’, ‘Аркад’, ‘Долинный’, ‘Партизанский’, ‘Пионер Крыма’, ‘Соколиный’, ‘Бельбекский’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’. Вторая группа (преобладает кластер 2): ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Бубенчик’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Золотополянский’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Коллективный’, ‘Жемчужный’, ‘Конкурсный’, ‘Кача’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Поздноцветущий’, ‘Держинский’, ‘Боспор’, ‘Комсомолец’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Скабери’, ‘Южнобережный’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’. Сорт ‘Чандлер’ был отнесен ко второй группе сортов. Стоит отметить, что часть сортов из второй группы обладает значительным вкладом первого кластера (от 0.185 до 0.481), в то же время у двух сортов из первой группы выявлен существенный вклад второго кластера (0.215 и 0.448).

Для детальной оценки генетического родства исследуемых генотипов ореха грецкого был осуществлен анализ методом главных координат (PCoA) в программе PAST 2.17 (рис. 2).

Распределение сортов на графике PCoA в значительной степени отражает группировку сортов, полученную в программе Structure. Сорта первой группы сосредоточены в нижней части графика. В свою очередь сорта второй группы находятся в средней и верхней части графика.

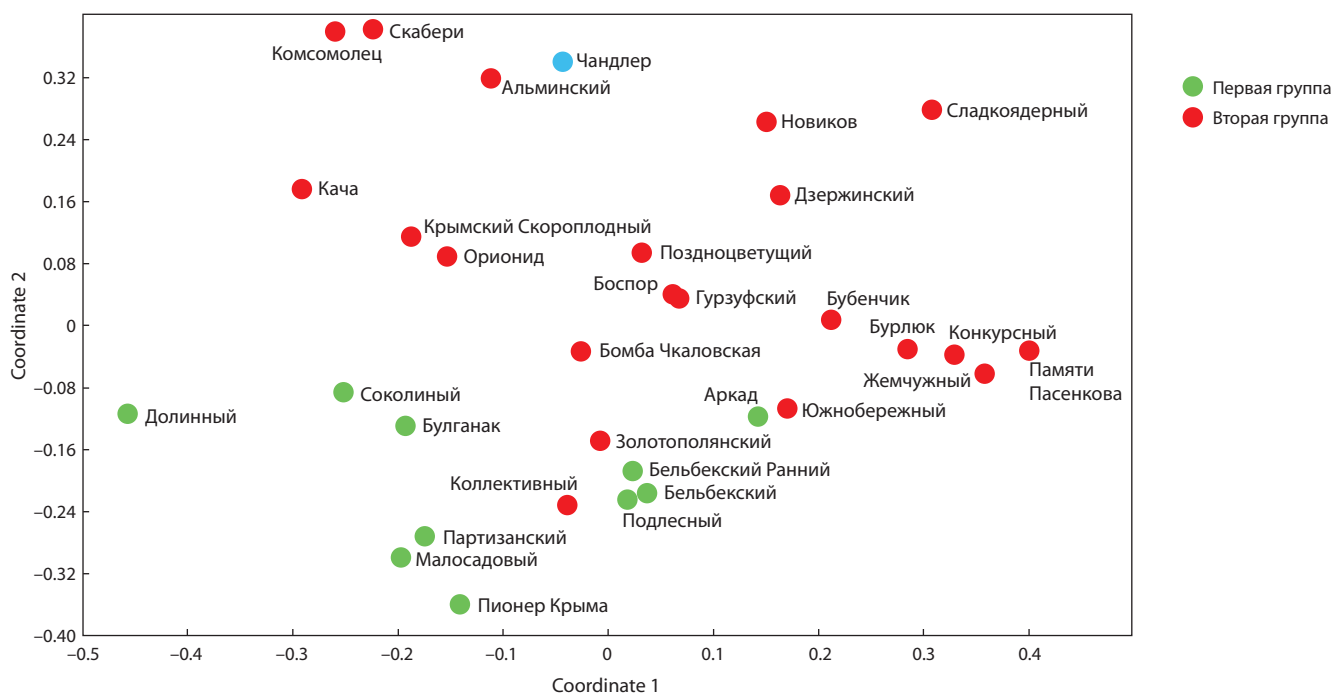


Рис. 2. Оценка генетического родства сортов ореха грецкого методом главных координат по данным SSR-генотипирования.

В расположении сортов первой группы можно выделить подгруппы: 1) сорта ‘Бельбекский Ранний’, ‘Бельбекский’ и ‘Подлесный’; 2) ‘Партизанский’, ‘Малосадовый’, ‘Пионер Крыма’; 3) ‘Соколиный’, ‘Булганак’. Два сорта из первой группы не были отнесены ни к одной из подгрупп: ‘Аркад’ занимает промежуточное положение между сортами первой и второй группы, сорт ‘Долинный’ равноудален от других сортов, включенных в первую группу.

Сорта второй группы распределены на графике менее упорядоченно и не формируют четких структур, однако надо отметить, что ‘Коллективный’, ‘Золотополянский’, ‘Бомба Чкаловская’ и ‘Южнобережный’ занимают промежуточное положение между сортами первой и второй групп. Сорт ‘Чандлер’ на графике главных координат пространственно близок сорту ‘Альминский’.

Обсуждение

Использованные нами SSR-маркеры ранее широко применялись для решения различных задач в генетике и селекции ореха грецкого, включая ДНК-паспортизацию и анализ генетического разнообразия коллекций сортов, селекционно-перспективных форм и межвидовых гибридов (Woeste et al., 2002; Pollegioni et al., 2009; Ebrahimi et al., 2016; Vahdati et al., 2019), изучение признаков коллекций (Ebrahimi et al., 2017a), выяснение вопросов формирования генофонда в пределах ареалов его естественного произрастания, а также путей распространения в процессе доместикиции (Pollegioni et al., 2014, 2015, 2017).

Сравнение средних значений показателей, характеризующих полиморфизм, выявленный по результатам нашей работы и в исследованиях, проведенных на коллекциях сортов ореха грецкого из других регионов мира, позволяет сопоставить уровень генетической гетерогенности генофонда. Так, анализ коллекции из 35 сортов китайской

селекции с использованием десяти SSR-маркеров выявил средние значения N_a и N_e 9.4 и 4.67 соответственно, а значения ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности – 0.77 и 0.62 (Chen et al., 2014). М. Aradhya с коллегами (Aradhya et al., 2010) при анализе генетического полиморфизма коллекции, насчитывающей 236 сортов, из различных регионов ореховодства с применением 15 микросателлитных маркеров получили средний показатель количества выявленных аллелей на locus, равный 11; при этом средние значения показателей H_e и H_o составили 0.699 и 0.536 соответственно. Отметим, что в этой работе маркеры WGA001, WGA202, WGA009 и WGA069 показали более высокий полиморфизм (12, 19, 11 и 13 аллелей на locus соответственно), тогда как маркер WGA089 оказался одним из наименее полиморфных (8 аллелей) (Aradhya et al., 2010). Нами были получены сходные результаты по уровню аллельного полиморфизма маркеров (см. табл. 1).

Анализируя выборку из 189 сортов, представляющих генофонд 14 стран, А. Ebrahimi с коллегами выявили в среднем 11.5 аллеля на locus, при этом средние показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности были равны 0.62 и 0.73 (Ebrahimi et al., 2016). В данной работе маркеры WGA001, WGA202 и WGA276, так же как и в нашем исследовании, вошли в группу более полиморфных, а маркер WGA068 проявил более низкий уровень полиморфизма. Турецкие ученые, выполнившие генотипирование 30 элитных селекционных форм (кандидаты в сорта) с применением 21 SSR-маркера, идентифицировали в среднем 6.15 аллеля на locus; наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность составили 0.64 и 0.62 (Bozhuyuk et al., 2020).

Рассматривая работы, направленные на изучение генетического разнообразия природных популяций и пер-

Таблица 2. Сравнение групп сортов ореха грецкого по генетическим характеристикам

Группа	Na	Ne	I	Ho	He	F
Первая	4.125	2.581	1.082	0.588	0.579	-0.009
Вторая	8.375	5.063	1.783	0.583	0.786	0.258

спективных для селекции форм, из них отобранных, можно также говорить о сопоставимом уровне полиморфизма. К примеру, при выполнении оценки полиморфизма и генетических взаимосвязей в выборке из 39 образцов ореха грецкого, отобранных в природных популяциях на северо-востоке Ирана, среднее число аллелей на локус составило 7.9, а число эффективных аллелей – 3.91 (Shamlu et al., 2018). Ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность были равны 0.74 и 0.93 соответственно. При этом индекс разнообразия был ниже выявленного нами показателя – 1.34 (Shamlu et al., 2018).

В исследованиях, посвященных анализу структуры природных популяций, выяснению путей распространения генофонда и формированию его локальных пулов, рассматриваемые показатели количества аллелей варьировали. Так, при изучении генетического разнообразия местных популяций в итальянских Восточных Альпах (Vischi et al., 2017) среднее число аллелей на локус составило 4.7 при выборке 13 маркеров (WGA класс) и 2.7 в выборке из семи EST-SSR-маркеров, что является низким показателем, особенно учитывая объем выборки – около 200 образцов. Возможно, это объясняется изолированностью изученной популяции, отобранной в гористой местности, а также на равнинном участке, который ею ограничен (Vischi et al., 2017). При анализе выборки из 86 генотипов, отобранных в пяти географических локациях природных популяций ореха грецкого на Юго-Западе Тибета, показатель Na был равен 9.92, однако значение Ne составило 3.95, что может быть результатом неравномерного распределения частот встречаемости аллелей (Wang et al., 2015). В исследовании, направленном на изучение путей формирования и распространения генофонда ореха грецкого от центров его происхождения на территории Евразии, в результате SSR-генотипирования выборки объемом около 2000 генотипов с использованием 14 SSR-маркеров выявлено в среднем 14.21 аллеля на локус (Pollegioni et al., 2017).

В целом, рассматривая работы, посвященные генетическому полиморфизму генофонда ореха грецкого как культурных форм (сорта, гибриды, селекционные отборы из местных популяций), так и местных популяций, включая природные в регионах, относящихся к центрам происхождения вида *J. regia* L., можно сделать вывод о высоком уровне полиморфизма изученной нами выборки сортов. Учитывая тот факт, что все рассмотренные сорта являются отборами из местных семенных популяций в разных районах Крымского полуострова, данный уровень полиморфизма может опосредованно отражать уровень генетического разнообразия местного генофонда ореха грецкого. Это в определенной степени подтверждается результатами, полученными нами в ходе кластерного анализа. На основе наших данных можно сделать предва-

рительный вывод о том, что автохтонный генофонд ореха грецкого, возможно, происходит от двух гипотетических популяций. Разделение изучаемой выборки сортов на две группы по результатам байесовского анализа согласуется с высоким уровнем полиморфизма, так как наличие двух генетически обособленных групп может способствовать более высокому уровню генетической гетерогенности, включая аллельный полиморфизм ДНК-маркеров.

В работе были сопоставлены выявленные в ходе кластеризации группы по ряду популяционно-генетических параметров (табл. 2).

Значение среднего количества аллелей на локус во второй группе в два раза выше этого показателя в первой группе. Такие показатели генетического разнообразия, как эффективное число аллелей и индекс разнообразия Шеннона, тоже отражают больший аллельный полиморфизм микросателлитных маркеров во второй группе сортов. Наблюдаемая гетерозиготность в группах имеет сходное значение – 0.583 и 0.588, в свою очередь ожидаемая гетерозиготность выше во второй группе. Индекс фиксации имеет низкое положительное значение во второй группе, у сортов первой группы параметр стремится к нулевому значению.

На генетическом уровне различия между группами, кроме специфического аллельного состава SSR-локусов, характерного для каждой выборки сортов, выражены в степени аллельного разнообразия. Вторая группа сортов значительно превосходит первую по значению ряда генетических параметров, отражающих степень аллельного разнообразия. Можно предположить, что первая группа сортов представлена наиболее обособленной частью автохтонного генофонда Крымского полуострова. В свою очередь на генетическое разнообразие второй группы оказал влияние генетический вклад интродуцированной генплазмы, привнесенной в регион извне. Дополнительным подтверждением данного предположения является отнесение сорта ‘Чандлер’ селекции США ко второй группе. Значение индекса фиксации у первой группы сортов характерно для популяций, находящихся в состоянии панмиксии и отсутствия генетических барьеров, увеличивающих количество наблюдаемых гомозигот. Данные, полученные в программе Structure 2.3.4, свидетельствуют о генетической связи между группами, выраженной в наличии образцов с сопоставимым вкладом двух кластеров. Поскольку изученные сорта представляют собой формы, отобранные в популяции ореха грецкого, существующей в границах Крымского полуострова, можно предположить, что высокие значения наблюдаемой гетерозиготности отражают значительные размеры генофонда ореха грецкого, способствующие панмиксии. В целом для первой группы сортов ореха грецкого характерны высокая урожайность и крупные плоды (более 12 г).

Заключение

На основании комплексной фенотипической оценки образцов из коллекции генофонда ореха грецкого Никитского ботанического сада выделены группы сортов, обладающие комплексом хозяйственно ценных признаков. При выполнении микросателлитного генотипирования был установлен высокий уровень генетического разнообразия и наличие двух генетически отличных групп сортов. Одна из групп включает преимущественно крупноплодные сорта с повышенным потенциалом продуктивности, что актуализирует использование данных сортов в качестве селекционного материала. Их генетическая удаленность от остального генофонда может способствовать повышению эффекта гетерозиса при гибридизации.

Список литературы / References

- Антуфеев В.В., Вазов В.И., Рябов В.А. Справочник по климату Степного отделения Никитского ботанического сада. Ялта, 2002.
- [Antufeev V.V., Vazhov V.I., Ryabov V.A. Reference Book on the Climate of the Steppe Department of the Nikitsky Botanical Garden. Yalta, 2022. (in Russian)]
- Еремеев Г.Н., Лищук А.И. Методические указания по отбору засухоустойчивых сортов и подвоев плодовых растений. Ялта, 1974.
- [Eremeev G.N., Lishchuk A.I. Guidelines for Selecting Drought-resistant Cultivars and Stocks of Fruit Plants. Yalta, 1974. (in Russian)]
- Ильницкий О.А. Основы фитомониторинга (мониторинг физиологических процессов в растениях). Херсон, 2005.
- [Il'nikskiy O.A. Fundamentals of Phytomonitoring (Monitoring of Physiological Processes in Plants). Kherson, 2015. (in Russian)]
- Кушниренко М.Д., Курчатова Г.П., Крюкова Е.В. Методы оценки засухоустойчивости плодовых растений. Кишинев, 1975.
- [Kushnirenko M.D., Kurchatova G.P., Kryukova E.V. Methods for Assessing the Drought Resistance of Fruit Plants. Chisinau, 1975. (in Russian)]
- Лалин П.И., Рябова Н.В. Некоторые проблемы практики интродукции древесных растений в ботанических садах. В: Исследование древесных растений при интродукции. М.: Наука, 1982;5-29.
- [Lapin N.I., Ryabova N.V. Some issues in the practice of woody plant introduction in botanical gardens. In: Study of Woody Plants During Introduction. Moscow: Nauka Publ., 1982;5-29. (in Russian)]
- Луговской А.П., Балапанов И.М. Перспективные сорта ореха грецкого для зоны Северного Кавказа и их биологическая характеристика. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2018; 51(3):98-110. DOI 10.30679/2219-5335-2018-3-51-98-110.
- [Lugovskoy A.P., Balapanov I.M. Prospective persian walnut cultivars for North Caucasus zone and their biological characteristics. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of the South of Russia*. 2018;51(3):98-110. DOI 10.30679/2219-5335-2018-3-51-98-110. (in Russian)]
- Луговской А.П., Мурзинова Д.Г. Совершенствование системы возделывания ореха грецкого на Северном Кавказе. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2010;6(5):15-23.
- [Lugovskoi A.P., Murzinova D.G. Improving the sistem of walnut groving in Northern Caucasus. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of the South of Russia*. 2010; 6(5):15-23. (in Russian)]
- Рихтер А.А., Ядров А.А. Грецкий орех. М., 1985.
- [Rihter A.A., Yadrov A.A. Walnut. Moscow, 1985. (in Russian)]
- Супрун И.И., Луговский А.П., Балапанов И.М. Интродукция новых форм и пополнение генофонда ореха грецкого как основа улучшения сортимента культуры на Юге России. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2016;39(3):26-41.
- [Suprun I.I., Lugovskoy A.P., Balapanov I.M. Introduction of new forms and updating the walnut gene pool as the basis of improvement of crop's assortment in the South of Russia. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of the South of Russia*. 2016;39(3):26-41. (in Russian)]
- Хохлов С.Ю. Сортовое разнообразие ореха грецкого в Крыму и перспективы его использования в селекции. *Бюл. Гос. Никитского ботан. сада*. 2012;105:57-61.
- [Khokhlov S.Yu. Study of varietals diversity of walnuts in the Crimea and the perspective of its use in selection. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2012;105:57-61. (in Russian)]
- Хохлов С.Ю., Баскакова В.Л. Коллекция ореха грецкого. *Науч. записки природного заповедника «Мыс Мартьян»*. 2015;6:235-238.
- [Khokhlov S.Yu., Baskakova V.L. Collection of circassian walnut. *Nauchnye Zapiski Prirodnogo Zapovednika "Mys Mart'yan" = Proceedings of the Cape Martyan Nature Reserve*. 2015;6:235-238. (in Russian)]
- Aradhya M., Woeste K., Velasco D. Genetic diversity, structure and differentiation in cultivated walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Hortic*. 2010;861:127-132. DOI 10.17660/ActaHortic.2010.861.16.
- Balapanov I., Suprun I., Stepanov I., Tokmakov S., Lugovskoy A. Comparative analysis Crimean, Moldavian and Kuban Persian walnut collections genetic variability by SSR-markers. *Sci. Hortic*. 2019; 253:322-326. DOI 10.1016/j.scienta.2019.04.014.
- Bernard A., Barreneche T., Lheureux F., Dirlwanger E. Analysis of genetic diversity and structure in a worldwide walnut (*Juglans regia* L.) germplasm using SSR markers. *PLoS One*. 2018a;13(11): 0208021. DOI 10.1371/journal.pone.0208021.
- Bernard A., Lheureux F., Dirlwanger E. Walnut: past and future of genetic improvement. *Tree Genet. Genomes*. 2018b;14:1. DOI 10.1007/s11295-017-1214-0.
- Bernard A., Barreneche T., Donkpegan A., Lheureux F., Dirlwanger E. Comparison of structure analyses and core collections for the management of walnut genetic resources. *Tree Genet. Genomes*. 2020a; 16:76. DOI 10.1007/s11295-020-01469-5.
- Bernard A., Marrano A., Donkpegan A., Brown P.J., Leslie C.A., Neale D.B., Lheureux F., Dirlwanger E. Association and linkage mapping to unravel genetic architecture of phenological traits and lateral bearing in Persian walnut (*Juglans regia* L.). *BMC Genomics*. 2020b;21(1):20. DOI 10.21203/rs.2.18573/v1.
- Bozhuyuk M.R., Ercisli S., Orhan E., Koc A. Determination of the genetic diversity of walnut (*Juglans regia* L.) cultivar candidates from northeastern Turkey using SSR markers. *Mitt. Klosterneubg*. 2020; 70(4):269-277.
- Chen L.N., Ma Q.G., Chen Y.K., Wang B.Q., Pei D. Identification of major walnut cultivars grown in China based on nut phenotypes and SSR markers. *Sci. Hortic*. 2014;168:240-248. DOI 10.1016/j.scienta.2014.02.004.
- Cseke K., Bujdosó G., Báder M., Mertl T., Benke A., Kámpel J.D. Genetic identification of hybrid walnuts (*Juglans × intermedia* Carr.) in Hungary, the hidden potential for future breeding. *Sustainability*. 2022;14(8):4782. DOI 10.3390/su14084782.
- Dangl G.S., Woeste K., Aradhya M.K., Koehmstedt A., Simon C., Potter D., Leslie C.A., McGranahan G. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivars identification of walnut. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 2005;130(3):348-354. DOI 10.21273/JASHS.130.3.348.
- Davoodi F., Rezaei M., Heidari P., Hokmabadi H., Lawson S. Identification and DNA fingerprinting of some superior Persian walnut genotypes in Iran. *Erwerbs-Obstbau*. 2021;63:393-402. DOI 10.1007/s10341-021-00597-z.
- Ebrahimi A., Fatahi R., Zamani Z. Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers. *Sci. Hortic*. 2011;130(1):146-151. DOI 10.1016/j.scienta.2011.06.028.
- Ebrahimi A., Zarei A., Lawson S., Woeste K.E., Smulders M.J.M. Genetic diversity and genetic structure of Persian walnut (*Juglans regia*) accessions from 14 European, African, and Asian countries using SSR markers. *Tree Genet. Genomes*. 2016;12:114. DOI 10.1007/s11295-016-1075-y.
- Ebrahimi A., Zarei A., Fardadonbeh M.Z., Lawson S. Evaluation of genetic variability among "Early Mature" *Juglans regia* using mic-

- rosatellite markers and morphological traits. *PeerJ*. 2017a;5:e3834. DOI 10.7717/peerj.3834.
- Ebrahimi A., Zarei A.K., McKennan J.R., Bujdoso G., Woeste K.E. Genetic diversity of Persian walnut (*Juglans regia*) in the cold-temperate zone of the United States and Europe. *Sci. Hortic.* 2017b;220:36-41. DOI 10.1016/j.scienta.2017.03.030
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Gaisberger H., Legay S., Loo A.C.J., Azimov R., Aaliev S., Bobokolov F., Mukhsimov N., Kettle C., Vinceti B. Diversity under threat: connecting genetic diversity and threat mapping to set conservation priorities for *Juglans regia* L. populations in Central Asia. *Front. Ecol. Evol.* 2020;8:171. DOI 10.3389/fevo.2020.00171.
- Guney M., Kafkas S., Keles H., Zarifikhosroshahi M., Gundesli M.A., Ercisli S., Necas T., Bujdoso G. Genetic diversity among some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by SSR markers. *Sustainability*. 2021;13(12):6830. DOI 10.3390/su13126830.
- Gunn B.F., Aradhya M., Salick J.M., Miller A.J., Yongping Y., Lin L., Xian H. Genetic variation in walnuts (*Juglans regia* and *J. sigillata*; Juglandaceae): species distinctions, human impacts, and the conservation of agrobiodiversity in Yunnan, China. *Am. J. Bot.* 2010; 97(4):660-671. DOI 10.3732/ajb.0900114.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4(1):1-9.
- Ikhsana A.S., Topc H., Sütyemez M., Kafkas S. Novel 307 polymorphic SSR markers from BAC-end sequences in walnut (*Juglans regia* L.): effects of motif types and repeat lengths on polymorphism and genetic diversity. *Sci. Hortic.* 2016;213:1-4. DOI 10.1016/j.scienta.2016.10.006.
- Karimi R., Ershadi A., Ehtesham Nia A., Sharifani M., Rasouli M., Ebrahimi A., Vahdati K. Morphological and molecular evaluation of Persian walnut populations in Northern and Western regions of Iran. *J. Nuts.* 2014;5(2):21-31. DOI 10.22034/JON.2014.515686.
- Magige E.A., Fan P.-Z., Wambulwa M.C., Milne R., Wu Z.-Y., Luo Y.-H., Khan R., Wu H.-Y., Qi H.-L., Zhu G.-F., Maity D., Khan I., Gao L.-M., Liu J. Genetic diversity and structure of Persian walnut (*Juglans regia* L.) in Pakistan: implications for conservation. *Plants*. 2022;11(13):1652. DOI 10.3390/plants11131652.
- Orhan E., Eydurán S.P., Poljuha D., Akin M., Weber T., Ercisli S. Genetic diversity detection of seed-propagated walnut (*Juglans regia* L.) germplasm from Eastern Anatolia using SSR markers. *Folia Hort.* 2020;32(1):1-10. DOI 10.2478/fhort-2020-0004.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pollegioni P., Woeste K., Major A., Scarascia G., Malvolti M. Characterization of *Juglans nigra* (L.), *Juglans regia* (L.) and *Juglans × intermedia* (Carr.) by SSR markers: a case study in Italy. *Silvae Genet.* 2009;58(1):68-78. DOI 10.1515/sg-2009-0009.
- Pollegioni P., Woeste K., Olimpieri I., Marandola D., Cannata F., Malvolti M.E. Long-term human impacts on genetic structure of Italian walnut inferred by SSR marker. *Tree Genet. Genomes*. 2011;7:707-723. DOI 10.1007/s11295-011-0368-4.
- Pollegioni P., Woeste K.E., Chiocchini F., Olimpieri I., Tortolano V., Clark J., Hemery G.E., Mapelli S., Malvolti M.E. Landscape genetics of Persian walnut (*Juglans regia* L.) across its Asian range. *Tree Genet. Genomes*. 2014;10:1027-1043. DOI 10.1007/s11295-014-0740-2.
- Pollegioni P., Woeste K.E., Chiocchini F., Del Lungo S., Olimpieri I., Tortolano V., Clark J., Hemery G.E., Mapelli S., Malvolti M.E. Ancient humans influenced the current spatial genetic structure of common walnut populations in Asia. *PLoS One*. 2015;10(9):e0135980. DOI 10.1371/journal.pone.0135980.
- Pollegioni P., Woeste K., Chiocchini F., Del Lungo S., Ciolfi M., Olimpieri I., Tortolano V., Clark J., Hemery G.E., Mapelli S., Malvolti M. Rethinking the history of common walnut (*Juglans regia* L.) in Europe: its origins and human interactions. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172541. DOI 10.1371/journal.pone.0172541.
- Pop I.F., Vicol A.C., Botu M., Raica P.A., Vahdati K., Pamfil D. Relationships of walnut cultivars in a germplasm collection: comparative analysis of phenotypic and molecular data. *Sci. Hortic.* 2013;153:124-135. DOI 10.1016/j.scienta.2013.02.013.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant. Mol. Biol.* 1985;5:69-76. DOI 10.1007/BF00020088.
- Roor D.W., Konrad H., Mamadjanov D., Geburek T. Population differentiation in common walnut (*Juglans regia* L.) across major parts of its native range – insights from molecular and morphometric data. *J. Hered.* 2017;108(4):391-404. DOI 10.1093/jhered/esw122.
- Shah U.N., Mir J.I., Ahmed N., Fazili K.M. Assessment of germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes through microsatellite markers. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 2018;17(4):339-350. DOI 10.1016/j.jssas.2016.07.005.
- Shamlu F., Rezaei M., Lawson S., Ebrahimi A., Biabani A., Khan-Ahmadi A. Genetic diversity of superior Persian walnut genotypes in Azadshahr, Iran. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2018;24(5):939-949. DOI 10.1007/s12298-018-0573-9.
- Topcu H., Ikhsana A.S., Sütyemez M., Güneya N.M., Kafkas S. Development of 185 polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from walnut (*Juglans regia* L.). *Sci. Hortic.* 2015;194:160-167. DOI 10.1016/j.scienta.2015.08.014.
- Vahdati K., Arab M.M., Sarikhani S., Sadat-Hosseini M., Leslie C.A., Brown P.J. Advances in Persian walnut (*Juglans regia* L.) breeding strategies. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (Eds.) *Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops*. Cham: Springer, 2019;401-472. DOI 10.1007/978-3-030-23112-5_11.
- Vischi M., Chiabà C., Raranciuc S., Poggetti L., Messina R., Ermarcora P., Cipriani G., Paffetti D., Vettori C., Testolin R. Genetic diversity of walnut (*Juglans regia* L.) in the Eastern Italian Alps. *Forests*. 2017;8(3):81. DOI 10.3390/f8030081.
- Wang H., Pan G., Ma Q., Zhang J., Pei D. The genetic diversity and introgression of *Juglans regia* and *Juglans sigillata* in Tibet as revealed by SSR markers. *Tree Genet. Genomes*. 2015;11:804. DOI 10.1007/s11295-014-0804-3.
- Woeste K., Burns R., Rhodes O., Michler C. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. *J. Hered.* 2002;93:58-60. DOI 10.1093/jhered/93.1.58.
- Zhou H., Zhao P., Woeste K., Zhang S. Gene flow among wild and cultivated common walnut (*Juglans regia*) trees in the Qinling Mountains revealed by microsatellite markers. *J. For. Res.* 2021;32(5):2189-2201. DOI 10.1007/s11676-020-01254-z.

ORCID ID

I.I. Suprun orcid.org/0000-0003-0355-8395
I.V. Stepanov orcid.org/0000-0002-6251-300X

Благодарности. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-16-20061, <https://rscf.ru/en/project/22-16-20061/>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.12.2022. После доработки 19.04.2023. Принята к публикации 20.04.2023.