

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ХУРМЫ КАВКАЗСКОЙ (*DIOSPYROS LOTUS* L.) НА ОСНОВЕ SSR И ISSR ДНК-МАРКЕРОВ

Шхалахова Р.М., Конинская Н.Г., Маляровская В.И.,
Цатурян Г.А., Шуркина Е.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр
Российской академии наук»,
г. Сочи, Россия, e-mail: lab-bfbr@vniisubtrop.ru

Впервые исследованы растения *Diospyros lotus* L. произрастающие в семи географически удалённых ценопопуляциях на территории Западного Кавказа. Для выявления генетической структуры *D. lotus* использованы SSR- и ISSR-маркеры. Всего апробировано 19 микросателлитных (SSR) и 10 (ISSR) маркеров. Установлено, что из 19 SSR-маркеров только три (ssrdk14, ssrdk26, ssrdk30) выявили явный полиморфизм в популяциях хурмы кавказской. Из 10 ISSR маркеров пять (ISSR815, ISSR880, ISSR13, ISSR814.1, ISSR15) показали высокую эффективность. Анализ структуры популяций показал три генетических кластера, из которых популяции из пос. Шхафит и г. Гагры образовали два отдельных кластера, а все остальные популяции – смешанный кластер. Установлен низкий уровень генетического разнообразия с незначительным количеством генетических примесей. Это позволяет предположить, что *D. lotus* была интродуцирована на Западный Кавказ из единого источника зародышевой плазмы. Полученные результаты являются важной основой для реализации природоохранных мер.

Ключевые слова: *Diospyros lotus*, хурма кавказская, микросателлиты, ISSR-маркер, полиморфизм, генотипирование, генетическое разнообразие.

Род хурмы *Diospyros* L. (*Ebenaceae*) насчитывает более 400 вечнозелёных и лиственных пород деревьев, распространённых по всему миру [36]. К Роду *Diospyros* L. относится дикий вид, хурма кавказская (*Diospyros lotus* L.), произрастающая на Кавказе, Балканах, Китае и Японии [1, 17]. Этот вид хурмы используется как подвой для хурмы восточной (*Diospyros kaki* L. f) [1, 28]. Другой дикий вид хурмы виргинская (*D. virginiana* L.) произрастает в США и часто используется в скрещивании с *D. kaki* в селекционных программах, направленных на холодоустойчивость [2–5, 15, 16, 34, 37].

Одним из способов мобилизации новых доноров хозяйственно-ценных признаков в селекции хурмы является отбор перспективных форм

из природных ценопопуляций вида. Приграничные районы произрастания диких видов хурмы могут быть источником генетического разнообразия, используемого для повышения адаптивности, например, зимостойкости культуры. В связи с этим необходимо расширить исследования по изучению генетического потенциала хурмы кавказской в природных ценопопуляциях для поиска ценных форм.

За рубежом активно ведутся исследования генетического разнообразия диких видов и сортов хурмы с помощью молекулярно-биологических методов. Многими авторами разработаны молекулярные маркеры для эффективной характеристики зародышевой плазмы на основе RAPD [26], SSR [16, 20, 23, 24, 31.], ITS [38], SRAP [18, 14], IRAP [9], SCoT [35] хлоропластных и митохондриальных маркеров [13]. Среди различных типов маркеров кодоминантные ядерные микросателлитные маркеры (SSR) имеют желаемые преимущества для оценки генетических особенностей видов и уровня популяции, такие как локус-специфичность, высокая воспроизводимость, высокий полиморфизм и техническая простота [19, 33]. Однако, как известно из литературы, генетическое разнообразие может быть недооценено из-за гомоплазии [7, 30]. Поэтому комбинация нескольких типов маркеров может быть более полезна для лучшего понимания филогенетических отношений у растений. ISSR – еще один эффективный тип маркеров, который является мультилокусным, воспроизводимым и высокополиморфным для исследований генетического разнообразия [27]. ISSR-маркеры присутствуют в основном в некодирующих областях хромосом [6]. При этом для ISSR-маркеров наблюдается высокая воспроизводимость и специфичность [32, 21]. Хотя ISSR являются доминантными молекулярными маркерами, некоторые информативные последовательности могут быть получены с использованием специфических праймеров ISSR, с якорями закрепления для локусов SSR. Таким образом, SSR и ISSR маркеры могут быть использованы для оценки генетического разнообразия ценопопуляций *Diospyros lotus*, произрастающих на Западном Кавказе.

Цель исследований: оценить генетическую структуру хурмы кавказской (*D. lotus*), произрастающую в различных ценопопуляциях на территории Западного Кавказа, с использованием SSR- и ISSR-маркеров.

Объекты и методика исследований

Исследования выполнены на базе лаборатории молекулярной и клеточной селекции отдела биотехнологии (ФГБУН ФИЦ СИЦ РАН, г. Сочи). Объектом исследования является дикий вид хурма кавказская (*Diospyros lotus* L.) (57 образцов), произрастающая в 7 географически отдалённых ценопопуляциях Западного Кавказа (от пос. Шхафит Лазаревского района до пос. Гулрыпш в Республике Абхазия).

Таблица 1

**SSR-маркеры, включенные
в генетический анализ гермоплазмы хурмы *D. lotus***

SSR-маркер	Сиквенс праймера 5'-3'	Повтор	Отжиг Т, С	Размер ампликона, bp
SSR dk01	F:CGGCATGAAGGAATAAGGAA R: GCTCACATTCCAACCAATCA	(AG)19	60	155–184
SSR dk02	F: TTAATTTGGACACAAGTTCT R: TCTCTTCAAGTCTTCTATCCT	(GA)17	50	196–224
SSR dk03	F:GGCTCTCGGTCAAATAGTAG R: GGAGGTTAGAAATCCAGCTA	(AG)16	59	158–198
SSR dk04	F: CATTTGAAAGCAGTCGTCCA R: GCGCCAAATCATTGCTATCT	(GA)17	60	336–365
SSR dk06	F: CGGCATGAAGGAATAAGGAA R: GCTCACATTCCAACCAATCA	(AG)19	60	158–187
SSR dk09	F: ATGCCTCAAGCCTGTCATTT R: GACATCCCTGTCATTTGAGGA	(AG)13	59	137–190
SSR dk10	F: CGACACTGATGGTTGATAAG R: CAGCTTCACCTCCTAGAGAC	(GA)15	59	193–224
SSR dk14	F: GTGAAGGAACCCCATAGAA R: CCATCATCAGGTAGGAGAGA	(AG)16	55	155–178
SSR dk15	F: AGAGAACAGAGAGGGAATAG R: TTGGGATTAGTTGATTGTAG	(GA)9	59	235–254
SSR dk16	F: ACTACAACGGCGGTGAGAAC R: GTCCTTCACTTCCC GCATT	(GA)12	59	134–173
SSR dk17	F: GGTGTTGGGATATTAATGCT R: CTGCAGATTATAGGCACAAA	(GA)19	59	138–168
SSR dk25	F: GGGGTAATATGAATTGAATC R: CTCAGAGAGGAGAAGAAATAG	(CT)15	50	229–283
SSR dk26	F: GGGAAATTAAGAGGGAAGAA R: AGGAACTGGATCAGCATAAA	(GA)15	55	152–202
SSR dk28	F: CGAGCAAGTAGATGTTTATT R: TCATGATGATTAAAGAGGAC	(GA)16	50	176–199
SSR dk29	F: ATCATGAGATCAGAGCCGTC R: CACGTAAACGTTACGGAACA	(CCTT)8	57	115–150
SSR dk30	F: TGGTGATCGTGGTAGTGGTT R: GGCCTAATCTCTGTCCATCC	(TG)9 (AG)17	59	137–275
SSR dk32	F: TAGAGCGGGAAAGATCGAGA R: TACTTGGCGAGCAGTTAGCA	(GA)8	58	147–201
SSR dk36	F: GGGAAGAACAAAGAGAAGCTG R: ACGAAGTTGTAATCCTGAGC	(GA)16	54	226–259
SSR dk37	F: CAAAATGAAGCCATAAGAC R: GTGAAAGTGTGGTTGGATTT	(CT)10	59	154–211

Молодые листья каждого образца собирали в пробирки по 2 мл и сушили, используя силикагель, хранили при 4 °С до выделения ДНК. Высушенный листовый материал измельчали и извлекали ДНК по протоколу СТАВ [10]. Качество ДНК проверяли с помощью агарозного геля электрофорезом и спектрофотометрически, все образцы разбавляли до 20 нг/мкл и хранили при – 20 °С. 19 пар SSR-праймеров, ранее разработанных для *Diospyros L.* [23, 31] (табл. 1) и 10 ISSR-праймеров, разработанных для других видов растений [22, 29] (табл. 2) были протестированы в наших исследованиях.

Таблица 2

**ISSR-маркеры,
включенные в генетический анализ гермоплазмы
хурмы *D. lotus***

ISSR	Сиквенс праймера 5'-3'	Отжиг T, °C
ISSR 810	GAGAGAGAGAGAGAT	53
ISSR 813	CTCTCTCTCTCTCTT	53
ISSR 815	CTCTCTCTCTCTCTG	53
ISSR 851	TATTATTATTATTAT	53
ISSR 873	CTTCACTTCACTTCA	53
ISSR 880	GGAGAGGAGAGGAGA	53
ISSR 13	ACACACACACACACC	53
ISSR 14	TGTGTGTGTGTGTGG	53
ISSR 15	TCTCTCTCTCTCTCC	53
ISSR 814.1	CTCTCTCTCTCTCTTG	53

Для SSR-анализа ПЦР проводили в объеме 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл 2 × HS-TaqPCR буфера (Биолабмикс, Россия, biolabmix.ru), 0,2 мкл каждого праймера (10 мкМ), 1 мкл ДНК (20 нг/мкл) и воду для ПЦР. Применялся двухшаговый протокол амплификации: первичная денатурация 5 мин при 95 °С, отжиг 40 циклов 15 сек при 50–60 °С и финальная элонгация при 72 °С в течение 7 мин. Фрагментный анализ SSR-ампиконов проводили на системе QIAxcel Advanced (Qiagen, Montgomery County, MD, USA) с набором High Resolution в соответствии с инструкциями производителя.

Для ISSR-амплификации ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, состоящей из 10 мкл реакционного буфера 2 × HS-TaqPCR, (Biolabmix,

Россия), 0,3 мкл праймера (10 мкМ), 1 мкл ДНК (20 нг/мкл) и вода для ПЦР. Амплификация проводилась на приборе MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) по следующей программе: первичная денатурация 5 мин при 95 °С, отжиг 40 циклов по 20 сек при 53 °С с элонгацией при 72 °С в течение 1 мин 45 сек и финальной элонгацией при 72 °С в течение 7 мин. Разделение ISSR-фрагментов выполнено в 2%-ном агарозном геле в течение 2,5 час при напряжении 90 V в 1 × трис-ацетатном буфере. Данные записывались как бинарная матрица 1/0 по наличию и отсутствию амплифицированных фрагментов, соответственно.

Параметры генетического разнообразия были рассчитаны для каждого локуса SSR и ISSR с использованием программы GeneAlex ver. 6.5: среднее количество аллелей по локусу (N_a), эффективное количество аллелей (N_e), наблюдаемая гетерозиготность (H_o), информационный индекс Шеннона (I) и для каждого ISSR-разнообразия (h). Кроме того, были рассчитаны генетические параметры отдельно для каждого генетического кластера. Функция «Matches» в GeneAlex ver. 6.5 [7, 30] использовалась для идентификации генотипов с идентичными аллельными паттернами в данных SSR и ISSR. Затем метод кластеризации на основе байесовской модели был применён в программе STRUCTURE ver. 2.3.4. [25]. Программа Structure Harvester [11] использовалась для обнаружения наиболее вероятного значения K на основе метода ΔK Эванно [12]. Для анализа генетических дистанций коллекции был проведён анализ главных координат (PCoA) на основе в GeneAlex ver. 6.5 и кластеризация в программе DARWIN 6.0 [8].

Результаты исследований. Для образцов *D. lotus* только три из 19 маркеров SSR выявили явный полиморфизм (ssrdk14, ssrdk26, ssrdk30). Среднее количество различных аллелей $N_a = 2,2$ на локус было идентифицировано в восьми полиморфных локусах, в диапазоне от $N_a = 1$ для ssrdk01, 03, 06, 09, 10 до $N_a = 5$ для ssrdk14 (табл. 3). Наибольшее количество эффективных аллелей было рассчитано для ssrdk14 с $N_e = 2,4$. Средняя наблюдаемая гетерозиготность составляла $H_o = 0,2$, при этом наибольшее значение для ssrdk14 ($H_o = 0,8$).

Параметры генетического разнообразия и полиморфизма ISSR-маркеров для *D. lotus*: среднее разнообразие было $h = 0,1$, с самым низким значением для ISSR15 ($h = 0,0$) и самым высоким значением для ISSR13. ($h = 0,2$) (табл. 4).

Байесовский алгоритм является общепринятым методом оценки генетической структуры и примесей в коллекциях гермоплазмы. В результате совместного анализа данных SSR и ISSR установлено наиболее вероятное значение генетических кластеров – 3 (рис. 1). При этом образцы из горных районов Шхафита и образцы из Гагры образовали отдельные генетические кластеры.

Таблица 3

**Параметры генетического
разнообразия и полиморфизма SSR-маркеров**

SSR	N	N_a	N_e	I	H_o
ssrdk14	31	5,0	2,4	1,0	0,8
ssrdk26	30	3,0	1,8	0,7	0,6
ssrdk30	28	3,0	1,3	0,5	0,1
Среднее ±стандартная ошибка	31,1 ±0,5	3,6 ±0,5	1,8 ±0,2	0,7 ±0,1	0,5 ±0,1

Примечание: N – число анализируемых особей;
 N_a – число различных аллелей;
 N_e – число эффективных аллелей ($=1/(\sum p_i^2)$);
 I – информационный индекс Шеннона;
 H_o – наблюдаемая гетерозиготность

Таблица 4

**Параметры генетического
разнообразия и полиморфизма ISSR-маркеров**

ISSR	Кол-во бэндов	Средняя частота бэнда	N	N_a	N_e	h
ISSR815	16	0,4	32,0	0,9	1,1	0,1
ISSR880	16	0,5	32,0	1,3	1,1	0,1
ISSR13	8	0,4	32,0	1,6	1,2	0,2
ISSR814.1	17	0,3	32,0	0,8	1,1	0,1
ISSR15	15	0,9	32,0	0,9	1,0	0,0
Среднее ±стандартная ошибка	14,4 ±3,0	0,5 ±0,1	32,0 ±0,0	1,1 ±0,1	1,1 ±0,0	0,1 ±0,0

Примечание: N – число анализируемых особей;
 N_a – число различных аллелей;
 N_e – число эффективных аллелей ($=1/(\sum p_i^2)$);
 $h = 1 - \sum p_i^2$ – разнообразие

Полученные данные подтвердились на основе анализа PCoA, который показал, что наиболее дистантными от основной выборки являются образцы из пос. Шафита и горы Пикет, а также образцы из г. Гагры (рис. 2).

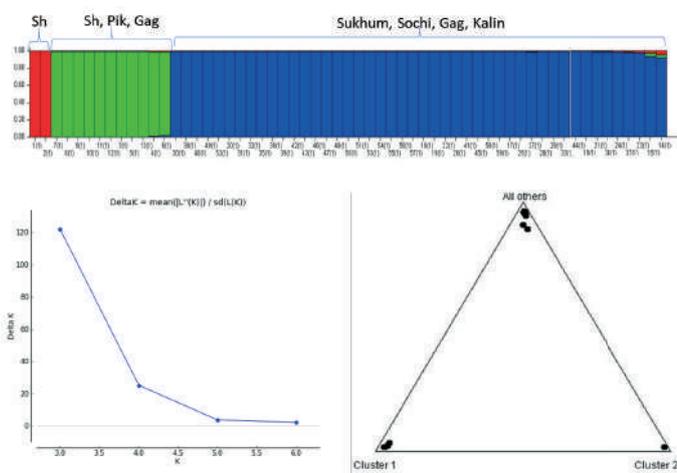


Рис. 1. Генетическая структура диких популяций *D. lotus* на основе SSR- и ISSR-маркеров

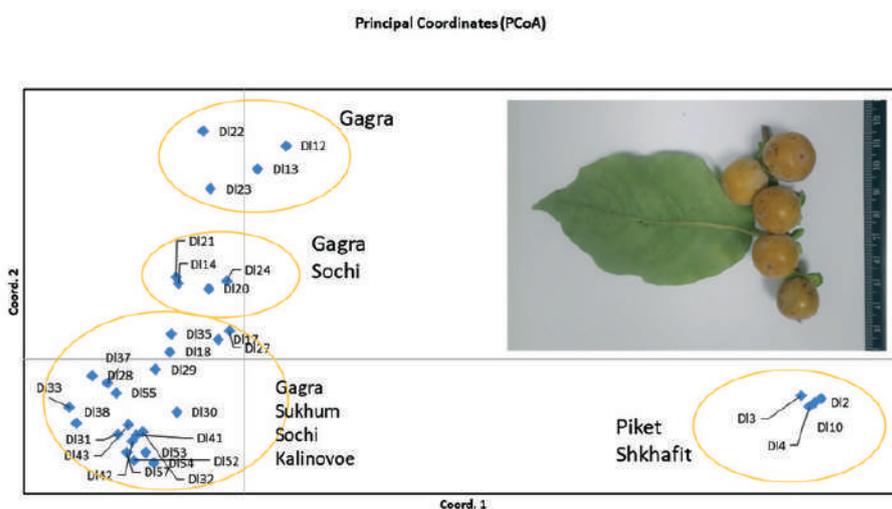


Рис. 2. Генетические дистанции в популяциях *D. lotus* на основе SSR- и ISSR-маркеров

Однако в целом для *D. lotus*, по сравнению с другими видами хурмы (*D. kaki*, *D. virginiana*) отмечен низкий уровень генетического разнообразия и отсутствие существенных генетических примесей в анализируемых образцах. С другой стороны, есть данные других авторов, что внутривидовое генетическое разнообразие велико у *D. lotus* на основе маркеров RAPD [37] и SCoT [35]. В наших

экспериментах, выявлено, что низкое генетическое разнообразие показывает наличие большого количества генетически идентичных образцов в исследованных популяциях. Предположительно, *D. lotus* был завезён на Западный Кавказ из одного источника зародышевой плазмы, отсюда однородность, низкое генетическое разнообразие и отсутствие примесей в генетических кластерах.

Заключение. Таким образом, наши результаты показали эффективность использования SSR- и ISSR-маркеров для исследований внутривидового генетического разнообразия в ценопопуляциях *Diospyros lotus*, произрастающих на территории Западного Кавказа.

Установлено, что из 19 микросателлитных (SSR) маркеров только три (ssrdk14, ssrdk26, ssrdk30) выявили явный полиморфизм в популяциях хурмы кавказской. Из 10 апробированных ISSR-маркеров пять (ISSR815, ISSR880, ISSR13, ISSR814.1, ISSR15) показали высокую эффективность.

Анализ структуры популяций показал три генетических кластера, из которых популяции растений хурмы кавказской, произрастающие в окрестностях пос. Шафит и г. Гагры образовали два отдельных кластера, а все остальные популяции вошли в смешанный кластер. При этом установлен низкий уровень генетического разнообразия хурмы кавказской с незначительным количеством генетических примесей. Это позволяет предположить, что *D. lotus* была интродуцирована на Западный Кавказ из единого источника зародышевой плазмы. Полученные результаты являются важной основой для реализации природоохранных мер.

Публикация подготовлена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/4 и в рамках реализации ГЗ ФИЦ СХЦ РАН № 0492-2021-0006.

Библиографический список

1. Омаров М.Д., Авидзба М.А. Развитие корневой системы хурмы восточной в зависимости от помологического сорта привоя // Садоводство и виноградарство. – 2012. – № 5. – С. 29-31. – eISSN 2618-9003.
2. Омаров М.Д. Результаты селекционной работы по улучшению сортимента хурмы восточной (*Diospyros kaki* L.) во влажных субтропиках России // Проблемы развития АПК региона. – 2016. – Т. 27. – № 3(27). – С. 68-72. – ISSN 2079-0996.
3. Омаров М.Д., Кулян Р.В. Основные направления селекции хурмы восточной в субтропической зоне Краснодарского края // Проблемы развития АПК региона. – 2017. – Т. 30. – № 2(30). – С. 42-46. – ISSN 2079-0996.

4. Омаров М.Д., Кулян Р.В. Селекция хурмы восточной во влажных субтропиках Краснодарского края // Новые технологии. – 2017. – № 2. – С. 105-111. – ISSN 2072-0920.
5. Омаров М.Д., Кулян Р.В. Создание новых форм хурмы восточной на Черноморском побережье Краснодарского края // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2015. – № 2. – С. 23-26. – ISSN 1992-2582.
6. Azhar M., Muhammad H.A., Siti N.I., Parween K.S.A.S. Optimization of ISSR Markers for Molecular DNA Fingerprinting in *Aquilaria* sp. // In Nuclear Technical Convention; IAEA: – Bangi, Malaysia, 2013. – Vol. 45. – № 43. – P. 1-8.
7. Barkley N.A., Krueger R.R., Federici C.T., Roose M.L. What phylogeny and gene genealogy analyses reveal about homoplasy in citrus microsatellite alleles // Plant Syst. Evol. 2009. – № 282. – P. 71-86. – <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0208-2>.
8. DARWIN6.0 Software. Available online: <https://darwin.cirad.fr/> (accessed on 10 January 2021).
9. Deng L., Liang Q., He X., Luo C., Chen H., Qin Z. Investigation and Analysis of Genetic Diversity of *Diospyros* Germplasms Using SCoT Molecular Markers in Guangxi // PLoS ONE 2015. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136510>.
10. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1991. – № 12. – P. 13-15.
11. Earl D.A., Vonholdt B.M. Structure Harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Resour. – 2011. – № 4. – P. 359-361. – <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
12. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study // Mol. Ecol. 2005. – № 14. – P. 2611-2620. – <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
13. Fu J., Liu H., Hu J., Liang Y., Liang J., Wuyun T., Tan X. Five Complete Chloroplast Genome Sequences from *Diospyros*: Genome Organization and Comparative Analysis // PLoS ONE. – 2016. – № 11. – e0159566. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159566>.
14. Guan C., Chachar S., Zhang P., Hu C., Wang R., Yang Y. Inter- and Intra-specific Genetic Diversity in *Diospyros* Using SCoT and IRAP Markers // Hortic. Plant J. – 2020. – Vol. 6. – № 2. – P. 71-80. – <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2019.12.005>.
15. Guan C., Zhang P., Hu C., Chachar S., Riaz A., Wang R., Yang Y. Genetic diversity, germplasm identification and population structure of *Diospyros kaki* Thunb. from different geographic regions in China using SSR markers // Sci. Hortic. – 2019. – № 251. – P. 233-240. – <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.062>.
16. Guo D.-L., Luo Z.R. Genetic relationships of the Japanese persimmon *Diospyros kaki* (Ebenaceae) and related species revealed by SSR analysis // Genet. Mol. Res. – 2011. – № 10. – P. 1060-1068. – <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1100>.
17. Intrigliolo D.S., Visconti F., Bonet L., Parra M., Besada C., Abrisqueta I., Rubio J.S., De Paz J.M. Persimmon (*Diospyros kaki*) Trees Responses to Restrictions in Water Amount and Quality. In Water Scarcity and Sustainable Agriculture in Semiarid Environment, 1st ed.; Garcia Tejero I.F., Duran Zuazo V.H., Eds.; Elsevier: Amsterdam: The Netherlands, – 2018. – P. 149-177. – <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813164-0.00008-9>.
18. Jing Z., Ruan X., Wang R., Yang Y. Genetic diversity and relationships between and within persimmon (*Diospyros* L.) wild species and cultivated varieties by SRAP-markers // Plant Syst. Evol. 2013. – № 299. – P. 1485-1492. – <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0810-1>.
19. Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants // Euphytica, 2011. – № 177. – P. 309-334. – <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>.

20. Liang Y., Han W., Sun P., Liang J., Wuyun T., Li F., Fu J. Genetic diversity among germplasms of *Diospyros kaki* based on SSR-markers // *Sci. Hortic.* – 2015. – № 186. – P. 180-189. – <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.015>
21. Luz G.C., Striato D.K., Mangolin C.A., Machado M.F.P.S. ISSR-markers to assess genetic diversity of cultivated populations from artificial selection of *Stevia rebaudiana* (Bert.) // *Bertoni. Breed. Sci.* – 2020. – № 70(4). – P. 508-514. – <https://doi.org/10.1270/jsbbs.20014>.
22. Mondal T.K. Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction // *Euphytica.* – 2002. – № 128. – P. 307-315. – <https://doi.org/10.1023/A:1021212419811>.
23. Naval M., Zuriaga E., Pecchioli S., Llácer G., Giordani E., Badenes M.L. Analysis of genetic diversity among persimmon cultivars using microsatellite markers // *Tree Genet. Genomes.* – 2010. – № 6. – P. 677-687. – [10.1007/s11295-010-0283-0](https://doi.org/10.1007/s11295-010-0283-0).
24. Pinar H., Yildiz E., Kaplankiran M., Toplu C., Unlu M., Serce S., Ercisli S. Molecular characterization of some selected persimmon genotypes and cultivars by SRAP- and SSR-markers // *Genetika.* – 2017. – № 49 – P. 693-704. – <https://doi.org/10.2298/GENSR1702693P>.
25. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multi-locus genotype data // *Genetics.* – 2000. – № 155. – P. 945-959. – <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
26. Raddová J., Ptáčková H., Cechová J., Ondrášek I. Genetic analysis of the genus *Diospyros* ssp. using RAPD and i-PBS methods. *Acta univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* – 2012. – № 60. – P. 205-216. – [10.11118/actaun201260080205](https://doi.org/10.11118/actaun201260080205).
27. Reddy P.M., Sarla N., Siddiq E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding // *Euphytica.* – 2002. – № 128. – P. 9-17. – <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>.
28. Robert H.G., Faik A.A., Millson M., Huang H.S., Chuang L.T., Sanz C., Golding J.B. Changes in sugars, acids and fatty acids in naturally parthenocarpic date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruit during maturation and ripening // *Eur. Food Res. Technol.* – 2005. – № 221. – P. 113-118. – <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1201-9>.
29. Roy S.C., Chakraborty B.N. Genetic diversity and relationships among tea (*Camellia sinensis*) cultivars revealed by RAPD and ISSR based fingerprinting // *Indian J. Biotechnol.* – 2009. – № 8. – P. 370-376. – ISSN 0975-0967.
30. Šarhanová P., Pfanzelt S., Brandt R., Himmelbach A., Blattner F.R. SSR-seq: Genotyping of microsatellites using next-generation sequencing reveals higher level of polymorphism as compared to traditional fragment size scoring // *Ecol. Evol.* – 2018. – № 8(22). – P. 10817-10833. – <https://doi.org/10.1002/ece3.4533>.
31. Soriano J.M., Pecchioli S., Romero C., Vilanova S., Llacer G., Giordani E., Badenes M.L. Development of microsatellite markers in polyploid persimmon (*Diospyros kaki* L.) from an enriched genomic library // *Mol. Ecol. Notes.* – 2006. – № 6. – P. 368-370. – <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01236.x>.
32. Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Doug-las-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) // *Theor. Appl. Genet.* – 1996. – № 92. – P. 40-45. – <https://doi.org/10.1007/BF00222949>.
33. Wambulwa M.C., Meegahakumbura M.K., Chalo R., Kamunya S., Muchugi A., Xu J.C., Liu J., Li D.Z., Gao L.M. Nuclear microsatellites reveal the genetic architecture and breeding history of tea germplasm of East Africa // *Tree Genet. Genomes.* – 2016. – № 12. – P. 1-10. – <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0963-x>.

34. Yang Y., Ruan X., Wang R. Indigenous Persimmon Germplasm Resources in China // Acta Hort. – 2013. – P. 89-96. – <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.996.9>.
35. Yang Y., Yang T., Jing Z. Genetic diversity and taxonomic studies of date plum (*Diospyros lotus* L.) using morphological traits and SCoT markers // Biochem. Syst. Ecol. – 2015. – № 61. – P. 253-259. – <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.06.008>.
36. Yesiloglu T., Çimen B., Incesu M., Yilmaz B. Genetic Diversity and Breeding of Persimmon. In Breeding and Health Benefits of Fruit and Nut Crops; Jaya, R., Nageswara-Rao, M., Eds.; IntechOpen: London, UK, – 2018. – <https://doi.org/10.5772/intechopen.74977>.
37. Yildirim N., Ercisli S., Agar G., Orhan E., Hizarci Y. Genetic variation among date plum (*Diospyros lotus*) genotypes in Turkey // Genet. Mol. Res. – 2010. – № 9. – P. 981-986. – <https://doi.org/10.4238/vol9-2gmr787>.
38. Yonemori K., Honsho C., Kanzaki S., Ino H., Ikegami A., Kitajima A., Sugiura A., Parfitt D.E. Sequence analyses of the ITS regions and the matK gene for determining phylogenetic relationships of *Diospyros kaki* (persimmon) with other wild *Diospyros* (*Ebenaceae*) species // Tree Genet. Genomes. – 2007. – № 4. – P. 149-158. – <https://doi.org/10.1007/s11295-007-0096-y>.

**ANALYZING THE GENETIC DIVERSITY
OF KAKI PERSIMMON (*DIOSPYROS LOTUS* L.) BASED
ON SSR AND ISSR DNA-MARKERS**

**Shkhalakhova R.M., Koninskaya N.G., Malyarovskaya V.I.,
Tsaturyan G.A., Shurkina E.S.**

*Federal Research Centre
the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,
Sochi, Russia, e-mail: lab-bfbr@vniisubtrop.ru*

Diospyros lotus L. plants growing in seven geographically remote cenopopulations in the Western Caucasus were studied for the first time. SSR and ISSR-markers were used to identify the genetic structure of *D. lotus*. 19 microsatellite (SSR) and 10 (ISSR) markers have been tested in total. It was found that out of 19 SSR markers, only three (ssrdk14, ssrdk26, ssrdk30) have revealed a clear polymorphism in populations of kaki persimmon. Out of 10 ISSR-markers, five (ISSR815, ISSR880, ISSR13, ISSR814.1, ISSR15) have showed high efficiency. The analysis of the population structure has showed three genetic clusters, of which the populations from v. Shkhafit and c. Gagra have formed two separate clusters, and all other populations have formed a mixed cluster. A low level of genetic diversity with an insignificant amount of genetic impurities has been established. This suggests that *D. lotus* was introduced to the Western Caucasus from a single source of germplasm. The results obtained are an important basis for the implementation of environmental measures.

Key words: *Diospyros lotus*, kaki persimmon, microsatellite, ISSR-marker, polymorphism, geno-typing, genetic diversity.