

Глава 2.

СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО

УДК 577

doi: 10.31360/2225-3068-2021-78-44-54

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ
КОЛЛЕКЦИИ ГЕРМОПЛАЗМЫ ЦИТРУСОВЫХ
НА ЗАПАДНОМ КАВКАЗЕ**

Конинская Н.Г., Шхалахова Р.М., Кулян Р.В.

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

Коллекция цитрусовых культур на Западном Кавказе является одной из наиболее северных коллекций этих культур в мире и включает в себя ряд акклиматизированных в регионе морозоустойчивых генотипов. В настоящее время она состоит из более 200 различных видов и сортов, однако их таксономическая принадлежность, популяционная структура и генетическое разнообразие не анализировались. В нашем исследовании проведено генотипирование 130 образцов базовой коллекции цитрусовых ФИЦ СНИЦ РАН, включая 24 вида и межвидовых гибрида с использованием 13 микросателлитных и 13 хлоропластных ДНК-маркеров. Эффективные молекулярные маркеры для генотипирования цитрусовых культур были установлены. Были выявлены генетические дистанции в коллекции и уточнена таксономическая принадлежность генотипов. Полученные результаты станут важной основой для стратегии сохранения геноресурсов, разработки новых селекционных программ и повышения эффективности селекции.

Ключевые слова: *Citrus*, генобанк, цитоплазматическая наследственность, ДНК-маркер, гаплотип, микросателлиты, генетическое разнообразие.

Цитрусовые культуры произрастают в более 130 странах с тропическим и субтропическим климатом (<http://www.fao.org>, 2020). Мировое производство цитрусовых составило более 153 миллионов тонн в 2018 (<https://www.statista.com>). Сегодня основными странами производителями этих плодов являются страны средиземноморского бассейна, юго-восточной Азии, восточной Австралии, Япония, Южная Африка, Мадагаскар, восточное и западное побережья Америк [19].

Черноморское побережье западного Кавказа является одним из наиболее северных регионов произрастания цитрусовых культур в открытом грунте [27]. Интродукция цитрусовых культур в регион началась в

1902 г. из стран средиземноморья, США, Турции, Ирана и Японии, и в 1930-х началась их селекция, в результате которой выведены десятки адаптированных сортов лимона, мандарина, помело [27], однако это генетическое разнообразие долгое время не было охарактеризовано.

Зарубежные исследования геноресурсов цитрусовых культур в основном базируются на таких методах анализа ДНК, как анализ простых коротких повторов (SSR), сиквенсах внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), ядерной рибосомальной ДНК (nrDNA), однонуклеотидных полиморфизмах (SNPs) или сиквенсах ДНК органелл [1, 5, 6, 11, 24]. Среди всех маркеров кодоминантные ядерные микросателлиты (nrSSR) обладают рядом преимуществ, таких как высокая степень полиморфизма, воспроизводимость и надёжность, локус-специфичность, техническая простота в использовании [15, 28]. В сравнении с ядерными, ДНК органелл может предоставить уникальную информацию о материнской наследственности и происхождении таксонов, т. к. она передается только по материнской линии у высших растений [2]. ДНК органелл не подвергается рекомбинации и размер популяции не влияет на результат анализа. Анализ хлоропластной ДНК в сочетании с ядерной ДНК может обеспечить нас уникальной информацией о демографической истории видов [2].

Цель нашего исследования – проанализировать генетическое разнообразие и филогенетические взаимосвязи в базовой коллекции цитрусовых культур на Западном Кавказе на основе ядерных и хлоропластных ДНК-маркеров.

Объекты и методика исследований.

Растительный материал и выделение ДНК. ДНК выделяли из высушенных в силикагеле листьев [3] из коллекции цитрусовых культур, поддерживаемой на базе ФИЦ СЦ РАН (Сочи). 130 образцов, предположительно 24 видов, принадлежащих к трём родам *Citrus*, *Fortunella* spp., *Poncirus*, и межвидовых гибридов были включены в данное исследование. Выделение ДНК проводилось набором DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) согласно инструкции производителя. Все образцы были разведены до 10 нг/мкл и хранились при температуре -20°C .

Генетический анализ. Для анализа SSR полиморфизма 15 пар праймеров, разработанных ранее для цитрусовых, были объединены в четыре мультиплекса по 2–4 пары праймеров в каждом (табл. 1). Кроме того, 14 пар праймеров к цитоплазматической ДНК (orgDNA) также были объединены в 4 мультиплекса по 2–4 пары праймеров в каждом.

Таблица 1

**Маркеры и праймеры
для ncSSR - и orgDNA-анализа коллекции цитрусовых**

Название	Сиквенс праймера 5'-3'	Источник	Ссылка
SSR			
ATC09	F: TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG R: TGTGAGTGTTTGTGCGTGTG	<i>Citrus</i> spp.	[1]
CAT01	F: GCTTTCGATCCCTCCACATA R: GATCCCTACAATCCTTGGTCC	<i>Citrus</i> spp.	[1]
AMB-3	F: AACACACACACTCGCCTCAC R: CAGCCAAATGTGGAGAGACC	<i>Citrus</i> spp.	[13]
CCSM13	F: CTAGAGCCGAATTCACC R: AACAGCTACCAAGACACC	<i>Citrus sinensis</i>	[20]
CCSM17	F: ACATGGACAGGACAATAAG R: GTTATGATACGTCTGTGTCC	<i>Citrus</i> spp.	[12]
CCSM18	F: AACAGTTGATGAAGAGGAAG R: GTGATTGCTGGTGTCTGTT	<i>Citrus</i> spp.	[12]
CCSM147	F: GCTATGTTATGATACGTCTG R: AGACTCACGTAACCTACTTC	<i>Citrus</i> spp.	[14]
C24033	F: GCAGCAATTCTGAAGGAAGG R: ACGGCCTCAATGGAACCTAT	Lemon, lime kumquat	[25]
CTG 1006372	F: TCAGCACTGAATCCAATCCA R: GTGAGAGCTTGAGGCTGACC	Lemon, lime kumquat	[25]
TAA41	F: AGGTCTACATTGGCATTGTC R: ACATGCAGTGCTATAATGAATG	<i>Citrus</i> spp.	[16]
TAA45	F: GCACCTTTTATACCTGACTCGG R: TTCAGCATTTGAGTTGGTTACG	<i>Citrus</i> spp.	[16]
AG14	F: AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA R: CTTCTCTTGCGGAGTGTTT	<i>Citrus</i> spp.	[1]
GT03	F: GCCTTCTTGATTTACCGGAC R: TGCTCCGAACCTTCATCATTG	<i>Citrus</i> spp.	[1]
AC01	F: TTTGACATCAACATAAAACAAGAAA R: TTTTAAAATCCCTGACCAGA	<i>Citrus</i> spp.	[1]
EST_SSR_5	F: AAGGCATAGCAAAGAAGCCA R: CTTGGGCCATCATCTACTGG	<i>Citrus</i> spp.	[18]

orgDNA		
F: CAGTGCTAGTTATCCAGTTACAGA R: CGGGCAACCCATTCTTATTATT	<i>Citrus</i> spp.	[26]
F: CTCCAAGCTAACGATGC R: CTGTCCTATCCATTAGACAATG	<i>Citrus</i> spp.	[4]
F: GGCCATAGGCTGGAAAGTCT R: GTTTATGCATGGCGAAAAGG	<i>Citrus</i> spp.	[4]
F: GGAACATAGCATAGGG R: TTTGATATAGGCTCGCT	<i>Citrus</i> spp.	[10]
F: TTTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA R: TTCGCCGCCGTAATAAATAG	Angio- sperms	[29]
F: GTGGTAAAGACAAGATACTTGG R: ATGGCATGAAACAACCCGA	<i>Citrus</i> spp.	[26]
F: CGCACACTAAGCATAGCAAT R: CCTCTACAAACCATTGGAGCTA	<i>Citrus</i> spp.	[26]
F: TGGAGAAGGTTCTTTTTCAAGC R: CGAACCCCTCGGTACGATTAA	<i>Citrus</i> spp.	[4]
F: GGGTGAAGTCGTAACAAGGT R: GAGGTTCGGAATGGGATCGGG	<i>Citrus</i> spp.	[10]
F: TCATTAACCAACTCCGTACCA R: GGCGCGTCAATAACAAATCT	<i>Citrus</i> spp.	[26]
F: ATCGTACCGAGGGTTCGAAT R: GATCCAGGGCGTAATCCCG	Angio- sperms	[29]
F: CGATGCATATGTAGAAAGCC R: CATTACGTGCGACTATCTCT	Angio- sperms	[29]
F: GACCTTCACCTCAAATCA R: TTCAGATAACACGCACC	<i>Citrus</i> spp.	[10]
F: ACATCATTATTGTATACTCTTTC R: CAACAGATAAACTGTCAAG	Angio- sperms	[29]

Праймер форвард в каждой ПЦР-реакции был помечен 4 различными красителями (ATTO565, ATTO550, ATTO532 и 6-FAM, Eurofins, Germany). Мультиплексная ПЦР проводилась с использованием набора 'type-it microsatellite kit'® (Qiagen, Germany). Электрофорез мультиплексов выполняли на приборе 3500xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) на базе Julius Kühn-Institut (JKI), Institute for Breeding Research on Fruit Crops (Дрезден, Германия).

Статистический анализ. Параметры генетического разнообразия по ncSSR и orgDNA локусам анализировали с использованием программ GeneAlex ver. 6.5 [21, 22]. Генетическая структура коллекции анализировалась с использованием программы STRUCTURE ver. 2.3.4. [23]. Программа STRUCTURE HARVESTER [7] применялась для выявления достоверного количества популяций K на основе метода Evanno's ΔK [9]. Для анализа частот аллелей маркеров orgDNA сравнение генетических групп проводилось с использованием программы Haplotype Analysis [9]. Для выявления генетических дистанций между образцами цитрусовых применяли анализ главных координат (PCoA) в программе GeneAlex ver. 6.5.

Результаты исследований

Параметры генетического разнообразия маркеров ncSSR и orgDNA. Тринадцать из 15 ncSSR маркеров показали воспроизводимые результаты и выраженный полиморфизм в коллекции цитрусовых. Два ncSSR маркера AMB-3 и CCSM17 показали низкую эффективность амплификации и были исключены из дальнейшего анализа. Среднее количество аллелей на локус $N_a = 13,96$ было выявлено по 13 полиморфным локусам с минимальным $N_a = 5$ у C24033 до максимального $N_a = 22$ по CCSM13 (табл. 2). Среднее количество эффективных аллелей составило $N_e = 5,28$. Наибольшее количество эффективных аллелей выявлено у AC01 и составило $N_e = 10$, а наименьшее количество эффективных аллелей выявлено по маркеру C24033 и составило $N_e = 3,02$. Средняя ожидаемая гетерозиготность $H_e = 0,79$, с наименьшей для маркера C24033 ($H_e = 0,67$) и наибольшей для маркера AC01 ($H_e = 0,90$).

Из 14 orgDNA маркеров, 13 показали воспроизводимые результаты с чётким полиморфизмом в коллекции цитрусовых. Маркер SPCC9 показал низкое качество амплификации и был исключен из анализа. Количество аллелей по 13 orgDNA маркерам варьировало $N_a =$ от 2 до 9 (табл. 3). Всего 66 аллелей было детектировано при среднем количестве $N_a = 5$ аллелей на локус. Среднее количество эффективных аллелей составило $N_e = 2,46$. Генетическое разнообразие $h = 0,46$.

Таблица 2

**Параметры генетического
разнообразия в коллекции цитрусовых
по 13 ncSSR**

ncSSR	N	N_a	N_e	H_o	H_e
AC01	130	17.00	9.61	0.89	0.90
AG14	130	15.00	4.49	0.65	0.78
ATC09	129	10.00	3.29	0.67	0.70
C24033	130	5.00	3.02	0.77	0.67
CAT01	129	14.00	3.52	0.65	0.72
CCSM13	126	22.00	7.50	0.73	0.87
CCSM147	130	12.00	5.33	0.88	0.81
CCSM18	130	12.00	4.77	0.46	0.79
CTG1006372	126	15.00	5.94	0.68	0.83
EST_SSR_5	130	15.00	5.61	0.66	0.82
GT03	130	14.00	3.36	0.67	0.70
TAA45	130	9.00	4.63	0.87	0.78
TAA41	129	18.00	7.60	0.84	0.87
<i>Среднее</i>	129	13.69	5.28	0.72	0.79

Примечание: N – количество анализируемых особей; N_a – общее количество аллелей;
 N_e – количество эффективных аллелей ($= 1 / (\sum p_i^2)$);
 p_i – относительная частота i -го аллели;
 H_o – наблюдаемая гетерозиготность (= кол-во гетерозигот/ N);
 H_e – ожидаемая гетерозиготность ($= 1 - \sum p_i^2$)

Таблица 3

**Параметры генетического
разнообразия в коллекции цитрусовых
по 13 orgDNA маркерам**

orgDNA маркер	N	N_a	N_e	h
ссmp10.2 ¹	130	2	1.08	0.07
ссmp2.2 ¹	130	4	1.08	0.07
ссmp6.2 ¹	130	8	2.17	0.54
ссmp7.2 ¹	124	2	1.03	0.03
CSL01 ¹	129	8	3.70	0.73
CSL09 ¹	130	8	4.24	0.76

CSS03 ¹	130	2	1.03	0.03
CSS04 ¹	130	6	2.84	0.65
nad2_4-3 ²	130	4	2.61	0.62
nad7_1-2 ²	130	3	1.90	0.47
rrn5_rrn18-1 ²	130	3	1.99	0.50
SPCC1 ¹	130	9	3.79	0.74
SPCC11 ¹	130	7	4.53	0.78
<i>Среднее</i>	129	5	2.46	0.46

Примечание: N – количество анализируемых образцов;

N^a – количество различных аллелей;

N_e – количество эффективных аллелей ($= 1/(\sum p_i^2)$);

p_i – относительная частота i-го аллеля;

h = разнообразие ($1 - \sum p_i^2$)

Выявление генотипов с идентичными фингерпринтами. Двадцать два образца были разделены на 5 групп с идентичными ДНК-фингерпринтами (табл. 4). Эти 22 образца относятся к разным видам: *C. × limon* var. *limon*, *C. × aurantium* var. *sinensis* и *C. × aurantium* var. *unshiu* (табл. 4). Некоторые из этих образцов могут быть синонимичными, такие как апельсин ‘Washington navel’ и ‘Washington navel карлик’ или почти идентичными, такие как ‘Thompson navel’, который является почковой мутацией от другого сорта апельсина ‘Washington navel’. Однако, некоторые образцы показали идентичные ДНК-фингерпринты хотя фенотипически они совсем различны по признакам формы плода, формы листа.

Таблица 4

**Пять групп 22 образцов
цитрусовых с одинаковым характером распределения аллелей.**

Группа	Вид	Сорт
1	<i>C. × limon</i> var. <i>limon</i>	‘Chakvatadze’, ‘Pavlovskii’, ‘Turetskii’, ‘Gizenko’, ‘Uvarova’, ‘Mir’, ‘Salafolia’, ‘Dioskuriya’, ‘Antico di rocca’
2	<i>C. × limon</i> var. <i>limon</i>	‘Sone Guinea’, ‘Moskovskii’, ‘Toskana’
3	<i>C. × aurantium</i> var. <i>sinensis</i>	‘Thompson navel’, ‘Washington navel’, ‘Washington navel dwarf’, ‘Moro’
4	<i>C. × aurantium</i> var. <i>unshiu</i>	Clone № 22, ‘Millenium 1’, ‘Kodorskii’
5	<i>C. × aurantium</i> var. <i>unshiu</i>	‘Kelasurski’i, ‘Hybrid № 10’, ‘Clone № 3’

Генетические дистанции между образцами. Анализ основных координат (PCoA) согласовывался с данными генетической структуры (STRUCTURE) и показал взаимосвязи восьми кластеров на основе Байесовской модели (рис 1). Однако некоторые образцы кластеров 3 (синие точки) и 7 (серые точки), ранее идентифицированные методом STRUCTURE, не попали в разные группы при анализе PCoA. Единичные генотипы помело *C. maxima* сгруппировались близко с апельсинами, подтверждая их близкую генетическую связь.

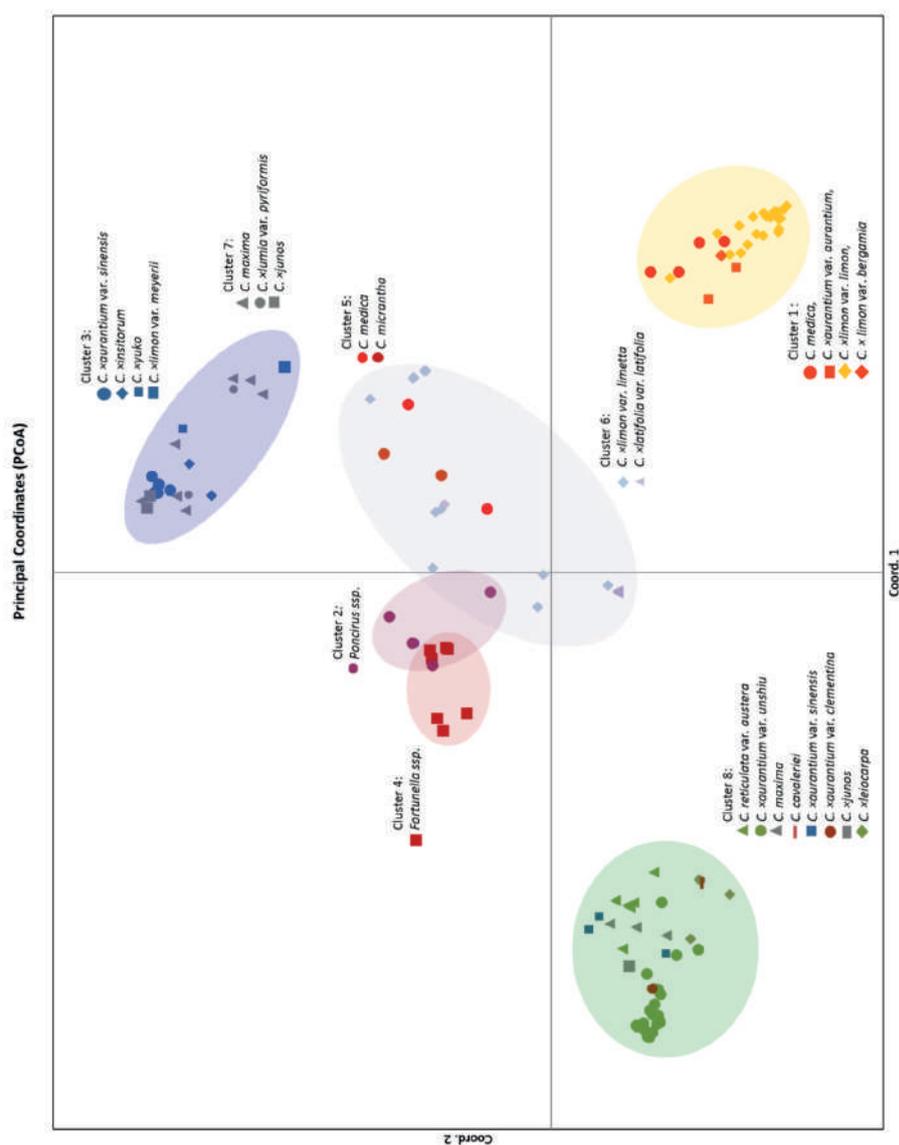


Рис 1. Анализ основных координат (PCoA) и парные дистанции между генотипами, рассчитанные по ncSSR и orgDNA-маркеров. Разные виды цитрусовых показаны разными цветами

Генотипы от диких родичей – понцирус *Poncirus* spp. и кумкват – *Fortunella* spp. А также предковые виды цитрон – *C. medica* и лайм – *C. micrantha* показали сравнимые генетические связи с другими видами, за одним исключением. Сладкие (лиметта) и кислые лаймы сгруппировались очень близко к диким и предковым видам, что показывает их более тесное родство с предковыми видами, чем у других видов.

Заключение. Наше исследование показало, что сочетание ядерных и цитоплазматических ДНК-маркеров является эффективным инструментом для оценки генетического разнообразия, генетической структуры и филогенетических связей в коллекции цитрусовых. Было выявлено 20 ошибочно классифицированных образцов, и выявлены идентичные фингерпринты синонимичных сортов. Была подтверждена таксономическая принадлежность 110 генотипов, выявлены доли примесей и происхождение отечественных сортов цитрусовых культур. Полученные результаты будут важны для паспортизации геноресурсов, и целенаправленной селекции цитрусовых, для повышения генетического разнообразия в коллекции цитрусовых культур на Кавказе.

Публикация подготовлена в рамках реализации
ГЗ ФИЦ СЦ РАН № 0492-2021-0006

Библиографический список

1. Barkley N.A., Roose M.L., Krueger R.R., Federici C.T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs) // TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik. – 2006. – № 112. – P. 1519-1531. – <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0255-9>.
2. Bendich A. Mitochondrial DNA, chloroplast DNA and the origins of development in eukaryotic organisms // Biology direct 5. – 2010. – № 42. – <https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-42>.
3. Chase M.W., Hills H.H. Silica-Gel – an Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies // Taxon. – 1991. – № 40. – P. 215-220. – <https://doi.org/10.2307/1222975>.
4. Cheng Y., de Vicente M.C., Meng H., Guo W., Tao N., Deng X. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera // Tree Physiol. – № 25. – P. 661-672. – <https://doi.org/10.1093/treephys/25.6.661>.
5. Curk F., Ancillo G., Ollitrault F., Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P., Garcia-Lor A., Navarro L., Ollitrault P. Nuclear species-diagnostic SNP markers mined from 454 amplicon sequencing reveal admixture genomic structure of modern citrus varieties // Plos One. – 2015. – № 10. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125628>.
6. Curk F., Ollitrault F., Garcia-Lor A., Luro F., Navarro L., Ollitrault P. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. // Annals of Botany. – 2016. – № 117. – P. 565-583. – <https://doi.org/10.1093/aob/mcw005>.
7. Earl D.A., Vonholdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genetics Resources. – 2012. – № 4 – P. 359-361. – <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.

8. Eliades N.-G., Eliades D. HAPLOTYPE ANALYSIS: software for analysis of haplotype data. – 2009. – <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19029.93922>.
9. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // *Molecular Ecology*. – 2005. – № 14(8). – P. 2611-2620. – <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
10. Froelicher Y., Mouhaya W., Bassene J.B., Costantino G., Kamiri M., Luro F., Morillon R., Ollitrault P. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny // *Tree Genet Genomes*. – 2011. – № 7(1). – P. 49-61. – <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0314-x>.
11. Garcia-Lor A., Ancillo G., Navarro L., Ollitrault P. Citrus (Rutaceae) SNP markers based on Competitive Allele-Specific PCR; transferability across the Aurantioideae subfamily // *Appl Plant Sci*. – 2013. – № 1(4). – <https://doi.org/10.3732/apps.1200406>.
12. Golein B., Bigonah M., Azadvar M., Golmohammadi M. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers // *Sci Hortic-Amsterdam*. – 2012. – № 148. – P. 147-153. – <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.012>.
13. Hamz E. Genetic diversity of some citrus varieties based on microsatellite and rapid molecular markers in Egypt // *World. J. Agri. Sci*. – 2013. – № 9(4). – P. 316-324. – <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.4.1753>.
14. Hong Q.B., Ma X.J., Gong G.Z., Peng Z.C., He Y.R. QTL Mapping of Citrus Freeze Tolerance // *Xii International Citrus Congress – International Society of Citriculture*. – 2015. – № 1065. – P. 467-474. – <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.57>.
15. Kalia R., Rai M., Kalia S., Singh R., Dhawan A. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants // *Euphytica*. – 2011. – № 177(3). – P. 309-334. – <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>.
16. Kijas J.M.H., Thomas M.R., Fowler J.C.S., Roose M.L. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – № 94. – P. 701-706.
17. Liu S.-R., Li W.-Y., Long D., Hu C.-G., Zhang J.-Z. Development and characterization of genomic and expressed SSRs in citrus by genome-wide analysis // *Plos One*. – 2013. – № 8(10). – e75149. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075149>.
18. Luro F.L., Costantino G., Terol J., Argout X., Allario T., Wincker P., Talon M., Ollitrault P., Morillon R. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping // *BMC Genomics*. – 2008. – № 9. – <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-287>.
19. Magoulas A., Tsimenides N., Zouros E. Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) // *Mol Biol E*. – 1996. – № 13. – P. 178-190. – <https://doi.org/10.1093/oxford-journals.molbev.a025554>.
20. Novelli V.M., Cristofani M., Souza A.A., Machado M.A. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) // *Genet Mol Biol*. – 2006. – № 29(1). – P. 90-96. – <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100018>.
21. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology*. – 2006. – № 6(1). – P. 288-295. – <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
22. Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // *Bioinformatics*. – 2012. – № 28(19). – P. 2537-2539. – <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
23. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multi-locus genotype data // *Genetics*. – 2000. – № 155(2). – P. 945-959.
24. Romdhane B., Riahi M., Selmi L.A., Zoghalmi N. Patterns of genetic structure and evidence of gene flow among Tunisian Citrus species based on informative nSSR markers

- // Comptes rendus biologies. – 2016. – № 339. – P. 371-377. – <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.06.005>.
25. Shahzadi K., Naz S., Riaz S. Assessing genetic diversity of Pakistani Citrus varieties using microsatellite markers // Journal of animal and plant sciences. – 2014. – № 24. – P. 1752-1757. – ISSN 1018-7081.
26. Shimizu T., Kitajima A., Nonaka K., Yoshioka T., Ohta S., Goto S., Toyoda A., Fujiyama A., Mochizuki T., Nagasaki H., Kaminuma E., Nakamura Y. Hybrid Origins of Citrus Varieties Inferred from DNA Marker Analysis of Nuclear and Organelle Genomes // Plos One. – 2016. – № 11. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166969>.
27. Volk G., Samarina L., Kulyan R., Gorshkov V., Malyarovskaya V., Ryndin A., Polek M., Krueger R., Stover E. Citrus genebank collections: international collaboration opportunities between the US and Russia // Genet Resour Crop Ev. – 2018. – № 65. – P. 433-447. – <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0543-z>.
28. Wambulwa M.C., Meegahakumbura M.K., Kamunya S., Muchugi A., Möller M., Liu J., Xu J.-C., Ranjitkar S., Li D.-Z., Gao L.-M. Insights into the Genetic Relationships and Breeding Patterns of the African Tea Germplasm Based on nSSR Markers and cpDNA Sequences // Front Plant Sci. – 2016. – № 7. – P. 1244-1244. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01244>.
29. Weising K., Gardner R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms // Genome. – 1999. – № 42(1). – P. 9-19.

**GENETIC DIVERSITY
OF CITRUS GERMPLASM COLLECTION
OF WESTERN CAUCASUS**

Koninskaya N.G.: Shkhalakhova R.M., Kulyan R.V.

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

The collection of citrus crops in the Western Caucasus is one of the most northern collections of these crops in the world and includes a number of frost-resistant genotypes acclimatized in the region. Currently, it consists of more than 200 different species and cultivars, but their taxonomic affiliation, population structure and genetic diversity have not been analyzed. In our study, the genotyping of 130 samples of the basic collection of citrus fruits from FRC SSC of RAS, including 24 species and interspecific hybrids, has been carried out using 13 microsatellite and 13 chloroplast DNA markers. Effective molecular markers for genotyping citrus crops have been established. The genetic distances in the collection have been identified and the taxonomic affiliation of the genotypes has been clarified. The obtained results will become an important basis for strategies for the conservation of gene resources, as well as to develop new selection programs and improve the efficiency of selection.

Key words: *Citrus*, genebank, cytoplasmic heredity, DNA-marker, haplotype, microsatellites, genetic diversity.