

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 634.11:575.174.015.3:577.21

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-57-67>

Поступила в редакцию 05.05.2023

Received 05.05.2023

**Е. А. Фомина<sup>1</sup>, А. Н. Заинчковская<sup>1</sup>, П. В. Кузмицкая<sup>1</sup>, О. Ю. Урбанович<sup>1</sup>,  
П. А. Пашкевич<sup>2</sup>, Л. С. Сидор<sup>2</sup>, Б. Ю. Аношенко<sup>2</sup>, Л. В. Гончарова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДЕРЕВЬЕВ ЯБЛОНИ СТАРОГО ПЛОДОВОГО САДА ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ

**Аннотация.** На основе секвенированной последовательности генома яблоны сорта Golden Delicious, нуклеотидная последовательность которого находится в базе данных GenBank, *in silico* был проведен дизайн молекулярных маркеров SSR типа, которые ограничивают область тетра- и гексануклеотидных повторов. Отобраны наиболее информативные из них, которые показали четкие пики на капиллярном электрофорезе и позволили выявить высокий уровень полиморфизма отдельных областей генома яблоны. Разработанные SSR-маркеры можно эффективно использовать для оценки генетического разнообразия и ДНК-идентификации сортов яблоны, установления сортового соответствия. Данные маркеры были применены для анализа генетического разнообразия деревьев яблоны старого плодового сада Центрального ботанического сада (ЦБС) НАН Беларуси, посадка деревьев в котором осуществлялась с 1932 по 1940 г. Показано, что растущие в саду деревья генетически близки как к старинным местным сортам, так и к отдельным иностранным. Установлено, что среди деревьев старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси представлены такие сорта, как Антоновка обыкновенная, Минское, Папировка, Уэлси, Мельба, Богатырь. Полученные результаты будут использованы для сохранения генетических ресурсов ценной для страны плодовой культуры, которой является яблона, а также для разработки дизайн-проекта новой коллекции-экспозиции плодовых растений при реконструкции участка старых насаждений.

**Ключевые слова:** яблона, SSR-маркеры, ДНК-идентификация, аллель, генетическое разнообразие

**Для цитирования:** Генетическое разнообразие деревьев яблоны старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси / Е. А. Фомина [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 57–67. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-57-67>

**Alena A. Famina<sup>1</sup>, Anna N. Zainchkovskaya<sup>1</sup>, Polina V. Kuzmitskaya<sup>1</sup>, Oksana Yu. Urbanovich<sup>1</sup>,  
Pavel A. Pashkevich<sup>2</sup>, Larisa S. Sidor<sup>2</sup>, Boris Yu. Anoshenko<sup>2</sup>, Lyudmila V. Goncharova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

## GENETIC DIVERSITY OF APPLE TREES IN THE OLD ORCHARD OF THE CENTRAL BOTANICAL GARDEN OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

**Abstract.** Based on the sequence of the Golden Delicious apple genome, whose nucleotide sequence is located in the GenBank database, the design of molecular markers of SSR type that limit the area of tetra- and hexanucleotide repeats was carried out *in silico*. The most informative of them were selected, which showed clear peaks on capillary electrophoresis and made it possible to reveal a high level of polymorphism in certain apple genome regions. The developed SSR markers can be effectively used for the genetic diversity assessment and DNA identification of apple varieties, establishment of the varietal correspondence. These markers were used to analyze the genetic diversity of apple trees in the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (CBG) where trees were planted from 1932 to 1940. It is shown that the trees growing in the garden are genetically close to old local varieties, as well as to individual foreign ones. It is established that among the trees of the CBG old orchard there are such varieties as Antonovka obyknovennaya, Minskoe, Papirovka. Wealthy, Melba, Bogatyr'. The obtained results will be used to save the genetic resources of the fruit crop valuable for the country, which is an apple tree, as well as to develop a design project of a new fruit plants collection-exposition when reconstructing the area of old plantings.

**Keywords:** apple tree, SSR markers, DNA identification, allele, genetic diversity

**For citation:** Famina A. A., Zainchkovskaya A. N., Kuzmitskaya P. V., Urbanovich O. Yu., Pashkevich P. A., Sidor L. S., Anoshenko B. Yu., Goncharova L. V. Genetic diversity of apple trees in the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 57–67 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-57-67>

**Введение.** Яблоня (*Malus × domestica* Borkh.) возделывается человеком более 4 тыс. лет и является одной из важнейших плодовых культур в странах с умеренным климатом. За это время создано более 10 тыс. сортов этой ценной культуры, различающихся по происхождению, морфологическим признакам, хозяйственным и биологическим свойствам. Необходимым элементом селекции яблони является идентификация сортов. Она проводится главным образом по морфологическим признакам и биохимическому составу плодов. Развитие технологии молекулярных маркеров позволяет дополнить традиционные методы идентификации сортов новыми молекулярными методами, которые имеют ряд существенных преимуществ [1].

В настоящее время для идентификации сортов яблони в большинстве случаев используются SSR-маркеры, созданные на основе динуклеотидных повторов [2–6]. Однако использование таких маркеров имеет определенные недостатки, в частности трудности при визуализации продуктов амплификации на секвенаторе. Определенную помощь в усовершенствовании SSR-анализа может оказать создание маркеров, ограничивающих повторы с более сложной организацией повторяющегося мотива. Они обладают большей точностью и надежностью, лучше подходят для практического использования [7].

Цель данного исследования – разработка EST-SSR-маркеров, ограничивающих простые повторы с тетра- и гекса-повторяющимися мотивами в геноме яблони. Такие маркеры более удобны для ДНК-идентификации и позволяют более точно определять длины аллелей SSR-локусов. С их помощью проведена оценка генетического разнообразия деревьев яблони, произрастающих на территории старого плодового сада Центрального ботанического сада (ЦБС) НАН Беларуси.

**Материалы и методы исследования.** На основе нуклеотидной последовательности генома яблони сорта Golden Delicious, находящейся в базе данных GenBank, был проведен дизайн 32 пар праймеров, подобранных к отдельным регионам 1–17-й хромосомы. Поиск повторов выполняли с помощью программы Unipro UGENE [8]. Разработанные праймеры ограничивали область генома, включающую простой повтор с длиной повторяющейся единицы не меньше 4 нуклеотидов.

Для проведения исследования была создана коллекция, включающая ДНК 25 сортов яблони домашней разного генетического происхождения и 101 образец деревьев старого плодового сада, растущих на территории ЦБС НАН Беларуси. Препараты ДНК были получены из почек отдельного растения. Для выделения ДНК использовали Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, ЕС), руководствуясь рекомендованным протоколом.

Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 20 мкл имела следующий состав: 67 мМ Трис-НСl, рН 8,8; 16 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 мМ dNTP; 250 нМ прямого и обратного праймеров, 50 мкг ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: 94 °С – 4 мин; 35 циклов: 94 °С – 30 с, 50 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин. Продукты амплификации разделяли на секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 («Синтол», Россия). Форвард праймер каждого маркера был мечен одним из флуоресцентных красителей (FAM, R6G, TAMRA, ROX), что позволило проводить анализ продуктов амплификации, полученных в результате реакции мультиплекса.

Для оценки уровня полиморфизма и информативности маркеров использовали несколько параметров, которые были рассчитаны для каждого локуса микросателлитных последовательностей отдельно. Так, частоту встречаемости аллелей рассчитывали как отношение доли каждого аллеля к общему их количеству; долю уникальных генотипов – как отношение количества генотипов, обладающих уникальным составом SSR-аллелей, к общему их количеству.

Уровень наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) рассчитывали для каждого локуса отдельно как отношение числа гетерозигот к общему количеству исследованных образцов, а уровень ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) для каждого локуса – как  $H_e = 1 - \sum(p_i)^2$ , где  $p_i$  – частота встречаемости  $i$ -го аллеля.

Эффективное число аллелей ( $N_e$ ) рассчитывали по формуле  $N_e = 1/(1 - H_e)$  [9].

Для расчета индекса Райта ( $F$ ) использовали значения аллельных частот, а также показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности:  $F = 1 - H_o/H_e$ .

Величину информационного полиморфизма маркеров (*PIC*) вычисляли по формуле

$$PIC = 1 - \sum(p_i)^2,$$

где  $p_i$  – частота  $i$ -го аллеля [10].

Дискриминационную силу маркера (*PD*) рассчитывали по формуле

$$PD = 1 - \sum(g_i)^2,$$

где  $g_i$  – частота встречаемости  $i$ -го генотипа [11].

Количественный неиерархический кластерный анализ осуществляли методом Байеса с использованием программы Structure 2.3.4 [12]. В данной программе путем байесовского анализа методом марковских цепей Монте-Карло на основании расчета частот аллелей в каждой из генетически обособленных групп оценивали вероятность разбиения выборки на  $K$  популяций. Для анализа использовали модель генетического смешения (*admixture*). Для определения количества генетически однородных групп и вычисления  $\Delta K/K$  использовали ресурс Structure Harvester [13], на котором реализован метод Evanno [14]. В проведенном нами анализе число предполагаемых кластеров ( $K$ ) варьировалось от 1 до 10, длина *burn-in* периода была равна 3, количество Марковских цепей Монте-Карло – 1 000, для  $K$  была сделана 1 итерация.

**Результаты и их обсуждение.** На основании анализа сиквенса генома яблони, представленного в базе данных GenBank, был проведен дизайн праймеров, ограничивающих микросателлитные повторы с длиной повторяющегося мотива больше четырех нуклеотидов. При проведении анализа информативности разработанных *SSR*-маркеров установлено, что не все маркеры удовлетворяют необходимым требованиям (в частности, не позволяют выявлять полиморфные аллели в исследуемых локусах микросателлитных последовательностей, показывают нечеткие фрагменты при разделении на секвенаторе, не дают возможности оценить данные в мультиплексной ПЦР-реакции). Праймеры, не отвечающие необходимым требованиям, были исключены из дальнейшего исследования (данные не представлены). По результатам анализа было отобрано 8 пар молекулярных маркеров-кандидатов, расположенных на разных хромосомах генома яблони: MC11L02, MC03L1, MC06L2, MC17L01, MC10L1, MC08L01, MC04L1, MC09L04 (табл. 1). Шесть разработанных маркеров содержат тетра-нуклеотидный повторяющийся мотив, два маркера ограничивают гексануклеотидные повторы. Данные маркеры показали четкие пики после разделения продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза на секвенаторе

Т а б л и ц а 1. **EST-SSR-маркеры, ограничивающие простые повторы с тетра- и гекса-повторяющимся мотивом в геноме яблони, и места их локализации на хромосомах**

Table 1. **EST-SSR markers limiting simple repeats with tetra- and hexa-repeated motif in the apple genome and their localization on chromosomes**

Маркер	Хромосома	Последовательность праймеров 5'- 3'	Повторяющийся мотив
MC11L02	11	F: TACTCTCTCCGCCTGCTTT R: CGTCAACATCATCATCATATCTTTC	TTCT
MC03L1	3	F: TCAGGAAAATGCCAGTCCTC R: CCACTCGGGGTATTTGACTG	CCTGCA
MC06L2	6	F: TCCTCCGTCGTCTTGAGTCT R: GGTGCGGTGCTTGAAAGA	CTGCCT
MC17L01	17	F: CAGAGTTCCTAACCCACCA R: CCAACAAGCCACTGTGAAAA	TCCA
MC10L1	10	F: CGTAATTCGGAAAATGTTAATGTTG R: GATGATCACCATGCTGCACT	AAAC
MC08L01	8	F: TGGATATGCCATAATGAAATCTG R: AGTTTGAAGTGGGGCGTTAC	TGTA
MC04L1	4	F: ACTCAGGACCGGCTCAACTA R: ATGCACATTACGCTGTCTGC	TACA
MC09L04	9	F: GAGACGTACCCCAAGGACAA R: GGGACAATTCCGTCCTTTTCA	CATA

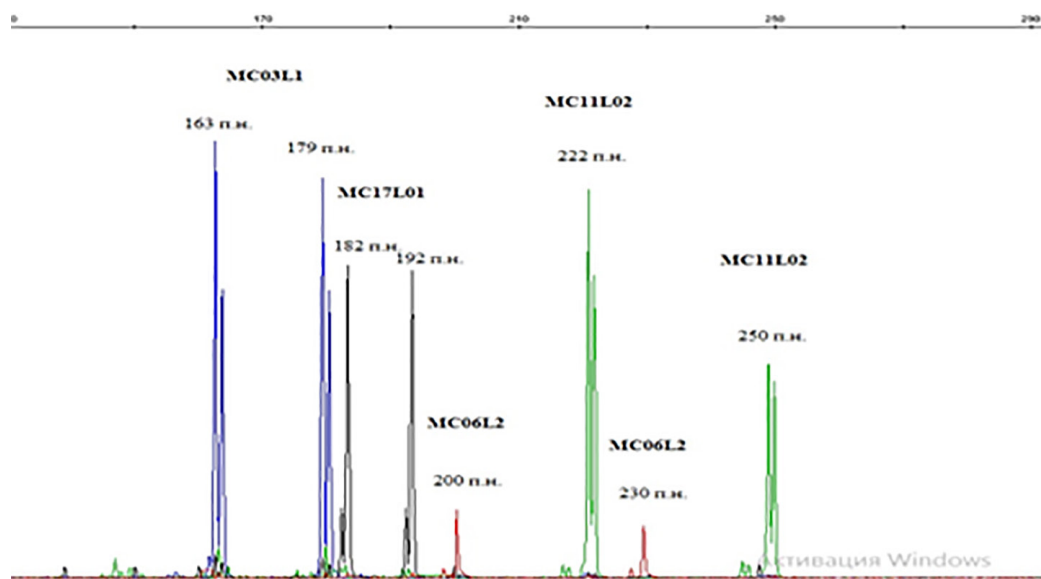


Рис. 1. Аллели индивидуального дерева № 86 старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси, выявленные с помощью маркеров MC011L02 (метка R6G), MC06L2 (метка ROX), MC03L1 (метка FAM) и MC17L04 (метка TAMRA) после разделения фрагментов амплификации методом капиллярного электрофореза. Цифрами над пиками обозначена длина аллелей, п. н.

Fig. 1. Alleles of individual tree No. 86 of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, identified using markers MC011L02 (R6G label), MC06L2 (ROX label), MC03L1 (FAM label) and MC17L04 (TAMRA label) after capillary electrophoresis separation of amplification fragments. The numbers above the peaks indicate the length of alleles, bp

(рис. 1). Они не демонстрируют «лестницу пиков», характерную для динуклеотидных повторов, в том числе у яблони [15].

Эффективность применения молекулярных маркеров для генетического исследования по ДНК-идентификации сортов определяется несколькими параметрами. Один из них – количество выявляемых аллелей. Чем более разнообразен состав аллелей, выявляемый с помощью молекулярного маркера в популяции исследуемых генотипов, тем выше его эффективность для оценки генетического разнообразия. С помощью 8 разработанных SSR-маркеров у индивидуальных деревьев старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси выявлено в общей сложности 78 аллелей, в среднем 9,75 аллеля на локус (рис. 2, табл. 2). Наибольшее количество аллелей представлено в локусах MC06L2 и MC04L1 – 16 и 14 соответственно. Данный показатель различается для каждого вида растений в зависимости от уровня генетического разнообразия вида, объема проанализированной выборки и ряда других параметров [1, 16, 17]. У представителей как современных, так и старинных сортов яблони он может различаться [15]. Так, например, среди 292 генотипов старых яблонь, отобранных в садах на территории Литвы, с помощью 7 SSR-маркеров был выявлен 81 полиморфный аллель [5].

$H_e$  в среднем составил 0,243,  $H_o$  – 0,713,  $N_e$  – 1,430. В среднем значение  $F$  составило 2,493, что указывает на избыток гетерозигот среди исследуемых генотипов. Поддержанию высокого уровня гетерозиготности способствует перекрестное опыление яблони, а механизмы самонесовместимости препятствуют самоопылению. Сорта яблонь в основном получают в результате перекрестного опыления. Ряд сортов является межвидовыми гибридами. Дискриминационная сила маркера варьировалась от 0,629 для маркера MC17L01 до 0,948 для маркера MC04L1 и в среднем составила 0,847. Поскольку маркер MC08L01 является полилокусным, расчет для него значений  $H_o$ ,  $H_e$ ,  $N_e$ ,  $F$ , а также  $PD$  не представлялся возможным. В целом показатели, отражающие информативность разработанных молекулярных маркеров, достаточно высокие по сравнению с другими маркерами, используемыми для генетической характеристики генотипов яблони различного генетического происхождения [2, 7, 18, 19].

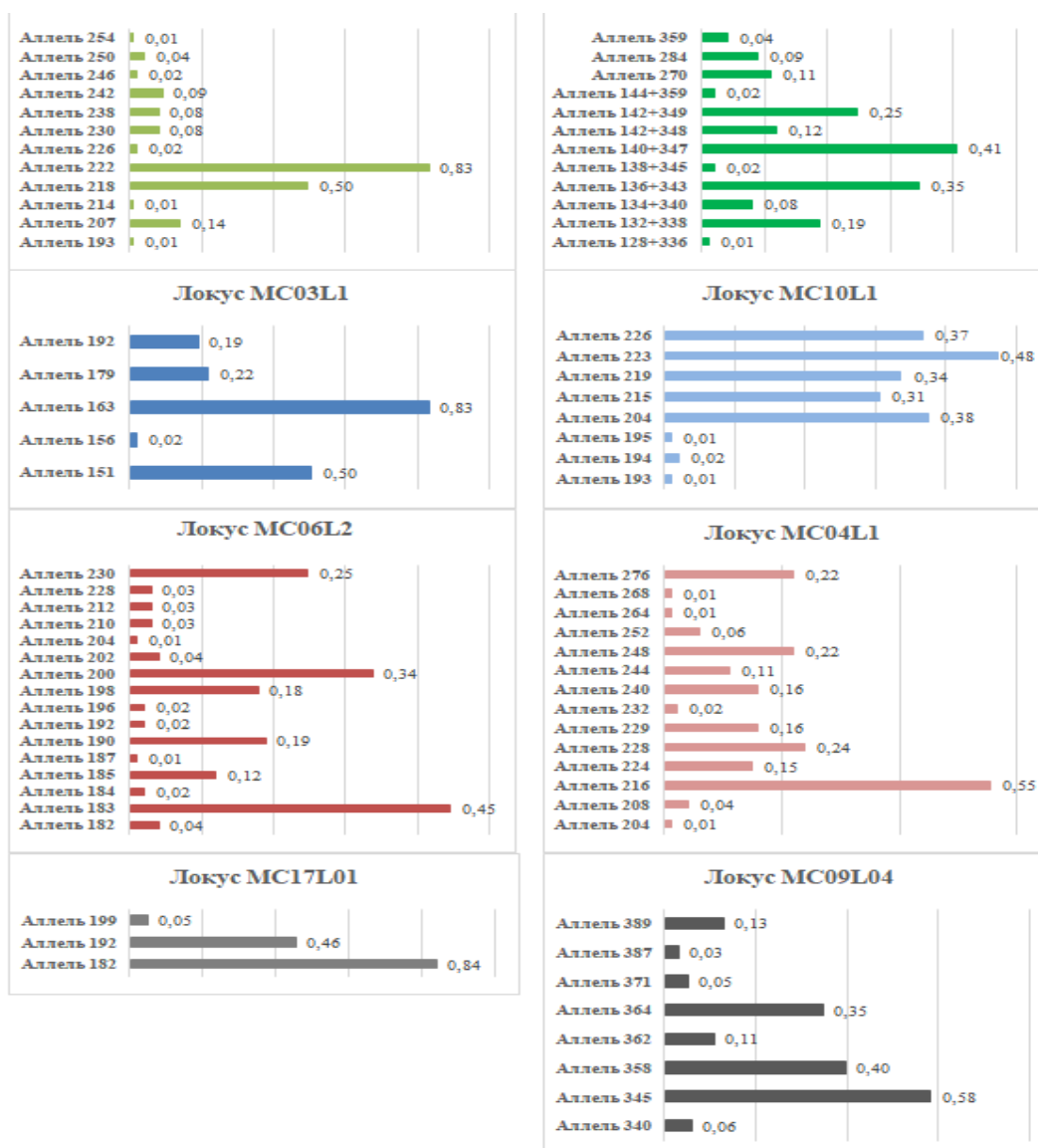


Рис. 2. Частота встречаемости SSR-аллелей в образцах деревьев яблони старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси

Fig. 2. Occurrence frequency of SSR alleles in the samples of the apple trees of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

Таблица 2. Аллели микросателлитных локусов, количество уникальных генотипов, уровни ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой ( $H_o$ ) гетерозиготности, эффективное число аллелей ( $N_e$ ), индекс Райта ( $F$ ), дискриминационная сила маркера ( $PD$ ) индивидуальных деревьев яблони старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси

Table 2. Alleles of microsatellite loci, number of unique genotypes, levels of expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosity, effective number of alleles ( $N_e$ ), Wright index ( $F$ ), marker discrimination power ( $PD$ ) of individual apple trees of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

SSR-маркер	Варьирование размера фрагментов амплификации, п. н.	Кол-во аллелей	Кол-во уникальных генотипов	$H_o$	$H_e$	$N_e$	$F$	$PD$
MC11L02	193–254	12	19	0,772	0,021	1,021	-35,986	0,833
MC03L1	151–192	5	8	0,743	-0,030	0,971	25,836	0,774
MC06L2	182–230	16	32	0,713	0,538	2,167	-0,324	0,931
MC17L01	182–199	3	6	0,337	0,082	1,089	-3,113	0,629
MC10L1	193–226	8	17	0,842	0,290	1,409	-1,899	0,917
MC08L01	128–359	12	29	-	-	-	-	-
MC04L1	204–276	14	32	0,901	0,451	1,823	-0,996	0,948
MC09L04	340–389	8	18	0,683	0,347	1,530	-0,971	0,900
Среднее значение		9,75	20,13	0,713	0,243	1,430	-2,493	0,847



Разработанные SSR-маркеры были применены для оценки генетического разнообразия деревьев старого плодового сада, растущих на территории ЦБС НАН Беларуси. Коллекция представлена 101 деревом, сортовая принадлежность которых неизвестна. Результаты SSR-анализа показали, что 30 деревьев имели уникальные генотипы, не встречающиеся у других деревьев (рис. 3). Генотипы 71 дерева могли встречаться в повторностях у двух и более деревьев, в связи с чем число уникальных генотипов среди них составило 25. Так, например, идентичными оказались деревья № 25–29 (выделены на рис. 3 одним цветом) и деревья № 51, 52, 53, 79, 83. Сравнение схемы посадки с данными генетического анализа показывает, что часть деревьев в саду была высажена в повторностях в рядах по три штуки. Но эта тенденция не распространяется на весь сад. По всей видимости, за продолжительное время выращивания сада часть деревьев погибла и могла быть заменена другими сортами или гибридным материалом.

Ряд	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1	12	13	27		38	39	50	51	62	63	75	76	87			95	
2	2	11	14	26	28	37	40	49	52	61	64	74	77	86	88			
3	3		15	25	29	36	41	48	53	60	65	73	78	85	89	94	96	101
4	4		16	24	30			47	54		66	72	79	84	90		97	100
5	5	10	17	23	31			46	55	59	67	71	80	83				
6	6	9	18	22	32	35	42	45	56	58		70		82		93		99
7	7	8	19	21	33	34	43	44	57		68	69		81	92	92		98

Рис. 3. Схема расположения деревьев старого плодового сада НАН Беларуси. Цифры на схеме соответствуют номеру дерева. Номера деревьев, отнесенные к одному генотипу, выделены одним цветом. Не выделены цветом номера деревьев, генотип которых встречается один раз. Пустые квадраты означают отсутствие насаждений

Fig. 3. Tree location scheme in the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. The numbers on the scheme correspond to the tree number. Tree numbers assigned to the same genotype are highlighted in one color. The numbers of trees, whose genotype occurs once, are not highlighted in color.

Empty squares mean no plantings

Для оценки генетического разнообразия деревьев яблони старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси данные SSR-анализа оценивали с помощью программы Structure. Результаты представлены на рис. 4. С использованием алгоритма программы Structure было выявлено, что подвергшиеся анализу деревья яблони отличаются высоким уровнем генетического разнообразия, при этом отдельные группы деревьев имеют общее происхождение. Так, при  $K = 8$  в кластер, обозначенный красным цветом, вошли деревья, относящиеся к сорту Мельба. Кластер с аллелями, обозначенными преимущественно зеленым цветом, включает крэбы (Crab apples). Синим цветом обозначен кластер, в который вошли старинный сорт США Уэлси и сорт белорусской селекции Минское, полученный в результате свободного опыления сорта Уэлси. Происхождение Уэлси неизвестно. Предполагается, что он мог произойти в результате свободного опыления сорта Боровинка. Результаты, представленные на рис. 4, говорят в пользу этого предположения. Старинным сортам, таким как Штрейфлинг, Чулановка, Макинтош, близки по составу аллелей 24 дерева старого плодового сада (желтый цвет на рис. 4). В то же время состав аллелей таких старинных сортов, как Пепин литовский и Черное дерево, указывает на их большую отдаленность от этого кластера. Аллели, свойственные им, а также генетически близким к ним деревьям, выделены розовым цветом.

Результаты показывают, что часть деревьев плодового сада генетически близка к старинному русскому сорту Антоновка обыкновенная (голубой цвет на рис. 4). По всей видимости, этот сорт, повсеместно выращиваемый ранее в стране и характеризующийся высокой зимостойкостью

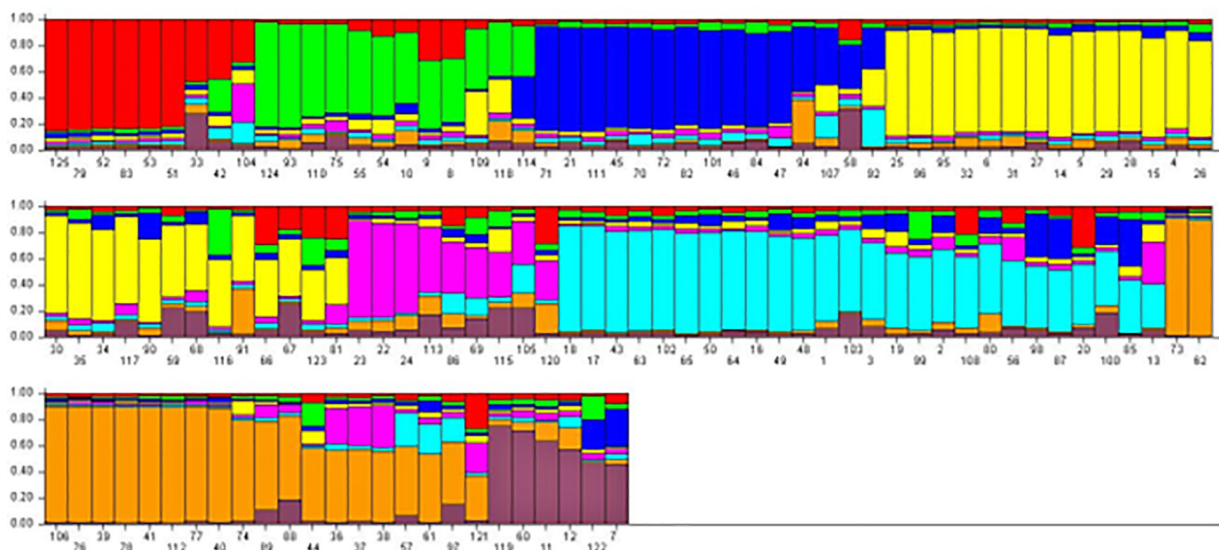


Рис. 4. Результаты кластеризации деревьев яблони, полученные с помощью программы Structure v. 2.3.4 (K = 8): 1–101 – номера деревьев старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси; референсные сорта: 102 – Антоновка обыкновенная, 103 – Антоновка белая, 104 – Банановое, 105 – Белорусский синап, 106 – Белый налив, 107 – Боровинка, 108 – Коробовка крупноплодная, 109 – Коштеля, 110 – Креб, 111 – Минское, 112 – Папировка, 113 – Пепин литовский, 114 – Серуэл, 115 – Черное дерево, 116 – Чулановка, 117 – Штрейфлинг, 118 – Discovery, 119 – Empire, 120 – Golden Delicious, 121 – Gravenstein, 122 – Idared, 123 – McIntosh, 124 – Red Silver, 125 – Мельба

Fig. 4. Results of apple tree clustering obtained using the program Structure v. 2.3.4 (K = 8): 1–101 – numbers of the trees of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus; reference varieties: 102 – Antonovka obyknovennaja, 103 – Antonovka belaja, 104 – Bananovoe, 105 – Belorusskij sinap, 106 – Belyj naliv, 107 – Borovinka, 108 – Korobovka krupnoplodnaja, 109 – Koshtelja, 110 – Kreb, 111 – Minskoe, 112 – Papirovka, 113 – Pepin litovskij, 114 – Serujel, 115 – Chernoe derevo, 116 – Chulanovka, 117 – Shtrejfling, 118 – Discovery, 119 – Empire, 120 – Golden Delicious, 121 – Gravenstein, 122 – Idared, 123 – McIntosh, 124 – Red Silver, 125 – Melba

и устойчивостью к болезням, мог встречаться в родословной деревьев, входящих в данный кластер. Антоновка обыкновенная встречается в родословной многих современных сортов (<https://vniispk.ru/>). Данный сорт широко использовался в селекционных программах России и Беларуси [17]. В другой обширный кластер (оранжевый цвет на рис. 4) вошли старинные сорта Папировка и Белый налив. Результаты анализа показывают, что часть деревьев плодового сада генетически близка к этим распространенным в нашей стране сортам.

На основании полученных данных о составе SSR-аллелей в геноме индивидуальных деревьев составлены молекулярно-генетические паспорта деревьев яблони, растущих в старом плодородном саду ЦБС НАН Беларуси (см. табл. 3). Их сравнение с молекулярно-генетическими формулами старых сортов, представленных в коллекции ДНК Института генетики и цитологии НАН Беларуси, позволило определить, что дерево № 7 относится к сорту Богатырь, деревья № 45, 46, 47 – к сорту Уэлси, № 43 – к сорту Антоновка обыкновенная, № 51, 52, 53, 79, 83 – к сорту Мельба, № 70, 71, 72 – к сорту Минское, № 73, 76, 77, 78 – к сорту Папировка.

Определение сортовой принадлежности деревьев в старинных садах имеет важное значение для сохранения генетических ресурсов и развития селекционных программ [20, 21]. Так, в старинных плодовых садах Литвы при анализе 292 деревьев удалось определить 12 сортов. Ими оказались распространенные в этом регионе старинные сорта, включая сорт Коробовка [5]. Однако точная идентификация сортовой принадлежности генотипов старых деревьев, особенно в локальных популяциях, далеко не всегда возможна [5]. Этому препятствует отсутствие референсных генотипов, относительно которых можно провести сравнение, так как часть старых сортов или образцов могла не сохраниться до настоящего времени либо не попала в поле зрения исследователей. Кроме того, некоторые деревья могут являться не сортами, а неизвестными гибридами, возникновение которых уже невозможно проследить.

Т а б л и ц а 3. Молекулярно-генетические формулы 101 индивидуального дерева яблони старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси, полученные с помощью 8 SSR-маркеров

T a b l e 3. Molecular genetic formulas of 101 individual apple trees of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus obtained using 8 SSR markers

№ дерева	Формула сорта
1, 2, 3	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>190, 230</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>215, 226</sub> E <sub>142, 348</sub> Ж <sub>216, 276</sub> З <sub>340, 358</sub>
4, 5, 6	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>185, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204</sub> E <sub>140, 284, 347</sub> Ж <sub>244, 276</sub> З <sub>345</sub>
7	A <sub>218, 226</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>183, 204</sub> Г <sub>182, 199</sub> Д <sub>223</sub> E <sub>136, 142, 343, 349</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>364, 389</sub>
8, 9	A <sub>218, 238</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>228</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>136, 270, 343</sub> Ж <sub>208</sub> З <sub>345, 358</sub>
10	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>136, 138, 140, 343, 345, 347</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>345, 364</sub>
11, 12	A <sub>222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>185, 198</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>136, 343</sub> Ж <sub>228, 248</sub> З <sub>345</sub>
13	A <sub>222, 230</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>190, 230</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>204, 226</sub> E <sub>132, 338, 359</sub> Ж <sub>216, 229</sub> З <sub>345, 358</sub>
14, 15	A <sub>230, 242, 250</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>200, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 219, 226</sub> E <sub>140, 347, 359</sub> Ж <sub>216, 240, 244</sub> З <sub>364</sub>
16, 17, 18	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>132, 134, 338, 340</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>364</sub>
19	A <sub>218, 242</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>132, 140, 338, 347</sub> Ж <sub>216, 248</sub> З <sub>362, 364</sub>
20	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 226</sub> E <sub>132, 338</sub> Ж <sub>216, 229</sub> З <sub>364</sub>
21	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>200, 212</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>142, 270, 348</sub> Ж <sub>224, 240</sub> З <sub>345, 389</sub>
22, 23, 24	A <sub>222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>198, 230</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>136, 343</sub> Ж <sub>229, 276</sub> З <sub>345, 358</sub>
25, 26, 27, 28, 29	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 226</sub> E <sub>140, 347</sub> Ж <sub>216, 240</sub> З <sub>345, 389</sub>
30, 31, 32	A <sub>222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>226</sub> E <sub>134, 140, 340, 347</sub> Ж <sub>216, 244</sub> З <sub>358, 371</sub>
33	A <sub>222, 254</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>183, 228</sub> Г <sub>182, 199</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>136, 142, 343, 348</sub> Ж <sub>229, 240</sub> З <sub>364</sub>
34	A <sub>218, 222, 250</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>226</sub> E <sub>140, 347, 359</sub> Ж <sub>216, 268</sub> З <sub>345, 362, 389</sub>
35	A <sub>218</sub> B <sub>163</sub> B <sub>182, 200</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>219, 226</sub> E <sub>134, 140, 340, 347</sub> Ж <sub>232, 240</sub> З <sub>364, 389</sub>
36, 37, 38	A <sub>207, 222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>198, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 219</sub> E <sub>136, 343</sub> Ж <sub>228, 276</sub> З <sub>340, 358</sub>
39, 40, 41, 62	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>198, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>228</sub> З <sub>345, 358</sub>
42	A <sub>222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>183, 202</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>226</sub> E <sub>142, 348</sub> Ж <sub>208, 240</sub> З <sub>364</sub>
43	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>132, 142, 338, 348</sub> Ж <sub>216, 248</sub> З <sub>358, 364</sub>
44	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>140, 347</sub> Ж <sub>208, 248</sub> З <sub>364</sub>
45, 46, 47	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>200</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>142, 270, 349</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>345</sub>
48, 49, 50	A <sub>222, 242</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>132, 142, 338, 349</sub> Ж <sub>216, 276</sub> З <sub>358, 362</sub>
51, 52, 53, 79, 83	A <sub>222, 238</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 226</sub> E <sub>136, 142, 343, 349</sub> Ж <sub>229, 248</sub> З <sub>345, 364</sub>
54, 55	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>202</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>216, 248</sub> З <sub>364</sub>
56	A <sub>214, 218</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223</sub> E <sub>132, 338</sub> Ж <sub>216, 229</sub> З <sub>358</sub>
57, 61	A <sub>222, 246</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>140, 142, 347, 349</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>345, 358</sub>
58	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>190, 198</sub> Г <sub>182, 199</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>142, 144, 348, 359</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>364, 371</sub>
59	A <sub>222, 230</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 185</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 226</sub> E <sub>284</sub> Ж <sub>228, 248</sub> З <sub>345</sub>
60	A <sub>222, 226</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>183, 198</sub> Г <sub>192, 199</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>144, 359</sub> Ж <sub>228, 229</sub> З <sub>358, 389</sub>
63, 64, 65	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 219</sub> E <sub>132, 142, 338, 349</sub> Ж <sub>216, 252</sub> З <sub>345, 387</sub>
66, 67	A <sub>222, 230</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 185</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>226</sub> E <sub>136, 284, 343</sub> Ж <sub>248</sub> З <sub>345, 362</sub>
68	A <sub>222</sub> B <sub>151</sub> B <sub>185, 190</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>140, 347</sub> Ж <sub>228, 276</sub> З <sub>345, 389</sub>
69	A <sub>218</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 185</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223</sub> E <sub>132, 136, 338, 343</sub> Ж <sub>229, 248</sub> З <sub>358</sub>
70, 71, 72	A <sub>218</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>190, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>142, 349</sub> Ж <sub>224, 248</sub> З <sub>345, 364</sub>
73, 76, 77, 78	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>200, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>140, 347</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>358</sub>
74	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>198, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215, 223, 226</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>228, 244, 264</sub> З <sub>345, 358</sub>
75	A <sub>193, 218, 222, 238</sub> B <sub>151, 156, 179, 192</sub> B <sub>183, 185, 187, 196</sub> Г <sub>182, 192, 199</sub> Д <sub>194, 195, 204, 223</sub> E <sub>136, 138, 140, 343, 345, 347</sub> Ж <sub>204, 240, 276</sub> З <sub>362, 364</sub>
80, 100	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>192, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>132, 142, 338, 349</sub> Ж <sub>216, 240</sub> З <sub>345, 358</sub>
81	A <sub>218, 230</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>200, 202</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>216, 229</sub> З <sub>364</sub>
82, 84	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>183, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>142, 270, 348</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>345, 389</sub>
85, 87	A <sub>218, 242</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204</sub> E <sub>142, 349</sub> Ж <sub>252, 276</sub> З <sub>362, 364</sub>



№ дерева	Формула сорта
86	A <sub>222, 250</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>200, 230</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 219</sub> E <sub>132, 136, 338, 343</sub> Ж <sub>229, 240</sub> З <sub>345, 364</sub>
88, 89	A <sub>222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>198, 230</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>345, 358</sub>
90	A <sub>222, 230</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 210, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>134, 140, 270, 340, 347</sub> Ж <sub>216, 224, 244</sub> З <sub>364, 371</sub>
91	A <sub>222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>184, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>140, 284, 347</sub> Ж <sub>232, 244</sub> З <sub>345, 358, 364</sub>
92	A <sub>218, 242</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>182, 184</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 219</sub> E <sub>142, 349</sub> Ж <sub>252, 276</sub> З <sub>362, 364</sub>
93	A <sub>222</sub> B <sub>156, 163</sub> B <sub>196</sub> Г <sub>196</sub> Д <sub>193, 194</sub> E <sub>128, 140, 336, 347</sub> Ж <sub>216</sub> З <sub>345</sub>
94	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>200, 210, 212</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 219</sub> E <sub>142, 348</sub> Ж <sub>216, 240</sub> З <sub>358</sub>
95, 96	A <sub>222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>182</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 226</sub> E <sub>140, 284, 347</sub> Ж <sub>248, 276</sub> З <sub>345</sub>
97	A <sub>222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>198, 200</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>136, 343</sub> Ж <sub>216, 248</sub> З <sub>345, 358</sub>
98	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>190, 200</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>132, 270, 338</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>345, 364</sub>
99	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>183, 185</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>223</sub> E <sub>132, 338</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>345, 364</sub>
101	A <sub>218</sub> B <sub>151</sub> B <sub>200, 210, 212</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>142, 270, 348</sub> Ж <sub>216</sub> З <sub>345</sub>

Тем не менее, сохранение богатства имеющихся генетических ресурсов имеет важное значение для продовольственной безопасности страны, получения сортов с высоким уровнем адаптации, способных успешно произрастать в условиях, к которым они были адаптированы. Известно, что тенденции в селекции яблони приводят к сужению генетического разнообразия успешных коммерческих сортов. Генетическое разнообразие культивируемых в настоящее время сортов яблони составляет лишь малую часть всего генетического разнообразия этого вида [22].

**Заключение.** Таким образом, созданные нами *in silico* молекулярные маркеры, ограничивающие тетра- и гексануклеотидные повторы, по всем рассчитанным показателям не уступают широко используемым маркерам для ДНК-идентификации и имеют высокую диагностическую ценность. Данные маркеры расположены на разных хромосомах яблони. Их можно применять в реакции мультиплексной ПЦР. Они являются эффективным инструментом для оценки генетического разнообразия и идентификации генотипов яблони. С их помощью показано, что среди деревьев старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси представлены такие сорта, как Антоновка обыкновенная, Минское, Папировка, Уэлси, Мельба и Богатырь. Часть индивидуальных генотипов представлена несколькими деревьями. В целом исследованные деревья яблони характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия. Они генетически близки как к местным старинным сортам, так и к отдельным иностранным. Полученные результаты могут быть использованы для сохранения генетических ресурсов ценной для страны плодовой культуры, которой является яблоня.

#### Список использованных источников

1. Урбанович, О. Ю. Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши / О. Ю. Урбанович. – Минск: Право и экономика, 2013. – 208 с.
2. Genetic identity and diversity of apple accessions within a candidate collection for the Norwegian National Clonal Germplasm Repository / M. Meland [et al.] // Horticulturae. – 2022. – Vol. 8, N 7. – P. 630. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070630>
3. Урбанович, О. Ю. Паспортизация сортов яблони на основе SSR-маркеров / О. Ю. Урбанович, З. А. Козловская, Н. А. Картель // Докл. НАН Беларуси. – 2008. – Т. 52, № 5. – С. 93–99.
4. Урбанович, О. Ю. Методические рекомендации по идентификации и паспортизации сортов яблони и груши на основе ДНК-маркеров / О. Ю. Урбанович, З. А. Козловская, Н. А. Картель. – Минск: Право и экономика, 2011. – 31 с.
5. SSR analysis based on molecular characterisation of apple germplasm in Lithuania / I. B. Mažeikienė [et al.] // Zemdirbyste = Agriculture. – 2019. – Vol. 106, N 2. – P. 159–166. <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.021>
6. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / R. Liebhard [et al.] // Mol. Breed. – 2002. – Vol. 10, N 4. – P. 217–241. <https://doi.org/10.1023/A:1020525906332>
7. Development of SSR databases available for both NGS and capillary electrophoresis in apple, pear and tea / S. Nishio [et al.] // Plants. – 2021. – Vol. 10, N 12. – P. 2796. <https://doi.org/10.3390/plants10122796>
8. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov [et al.] // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, N 8. – P. 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

9. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W. H. Li // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76, N 10. – P. 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
10. Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // Evolution. – 1965. – Vol. 19, N 3. – P. 395–420. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1965.tb01731.x>
11. Kloosterman, A. D. PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis / A. D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar // Int. J. Leg. Med. – 1993. – Vol. 105, N 5. – P. 257–264. <https://doi.org/10.1007/BF01370382>
12. Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. – 2000. – Vol. 155, N 2. – P. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
13. Earl, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D. A. Earl, B. M. Vonholdt // Cons. Genet. Res. – 2011. – Vol. 4, N 2. – P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
14. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // Mol. Ecol. – 2005. – Vol. 14, N 8. – P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
15. Characterization of microsatellite loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars / S. Sikorskaite [et al.] // Žemdirbystė = Agriculture. – 2012. – Vol. 99, N 2. – P. 131–138.
16. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple / C. M. Richards [et al.] // Tree Genet. and Genom. – 2009. – Vol. 6, N 2. – P. 339–347. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0190-9>
17. Urbanovich, O. Y. Identification of apple tree cultivars growing in Belarus using SSR-markers / O. Y. Urbanovich, Z. A. Kazlovskaya // Acta Hort. – 2009. – Vol. 839. – P. 479–486. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.65>
18. Genetic characterization of the apple germplasm collection in Central Italy: the value of local varieties / G. Marconi [et al.] // Front Plant Sci. – 2018. – Vol. 9. – Art. 1460. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01460>
19. A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) / J. Cmejlova [et al.] // Plant Sci. – 2021. – Vol. 303. – P. 110768. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768>
20. Identification of unknown apple (*Malus × domestica*) cultivars demonstrates the impact of local breeding program on cultivar diversity / B. L. Gross [et al.] // Genet. Resour. Crop Evol. – 2018. – Vol. 65, N 5. – P. 1317–1327. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0625-6>
21. Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level / J. Urrestarazu [et al.] // BMC Plant Biol. – 2016. – Vol. 16, N 1. – Art. 130. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0818-0>
22. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers / J. Urrestarazu [et al.] // Tree Genet. Genom. – 2012. – Vol. 8, N 6. – P. 1163–1180. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0502-y>

## References

1. Urbanovich O. Yu. *Molecular methods of identification and genotyping of apple and pear*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2013. 208 p. (in Russian).
2. Meland M., Aksic M. F., Frøynes O., Konjic A., Lasic L., Pojskic N., Gasi F. Genetic identity and diversity of apple accessions within a candidate collection for the Norwegian National Clonal Germplasm Repository. *Horticulturae*, 2022. vol. 8, no. 7, p. 630. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070630>
3. Urbanovich O. Yu., Kozlovskaya Z. A., Kartel' N. A. Passportization of apple varieties based on SSR markers. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Reports of the National Academy of Sciences of Belarus], 2008, vol. 52, no. 5, pp. 93–99 (in Russian).
4. Urbanovich O. Yu., Kozlovskaya Z. A., Kartel' N. A. *Guidelines for the identification and certification of apple and pear varieties based on DNA markers*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2011. 31 p. (in Russian).
5. Mažeikienė I., Šikšnienienė J. B., Baniulis D., Gelvonauskienė D., Frercks B., Starkus A., Žebrauskienė A., Stanys V. SSR analysis based on molecular characterisation of apple germplasm in Lithuania. *Zemdirbystė = Agriculture*, 2019, vol. 106, no. 2, pp. 159–166. <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.021>
6. Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C. D., Tarchini R., Van De Weg E., Gessler C. *Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (Malus × domestica Borkh.)*. *Molecular Breeding*, 2002, vol. 10, no. 4, pp. 217–241. <https://doi.org/10.1023/A:1020525906332>
7. Nishio S., Kunihisa M., Taniguchi F., Kajiya-Kanegae H., Moriya S., Takeuchi Y., Sawamura Y. Development of SSR databases available for both NGS and capillary electrophoresis in apple, pear and tea. *Plants*, 2021, vol. 10, no. 12, p. 2796. <https://doi.org/10.3390/plants10122796>
8. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
9. Nei M., Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, vol. 76, no. 10, pp. 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
10. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 1965, vol. 19, no. 3, pp. 395–420. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1965.tb01731.x>
11. Kloosterman A. D., Budowle B., Daselaar P. PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 1993, vol. 105, no. 5, pp. 257–264. <https://doi.org/10.1007/BF01370382>

12. Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, vol. 155, no. 2, pp. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
13. Earl D. A., Vonholdt B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 2011, vol. 4, no. 2, pp. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
14. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 2005, vol. 14, no. 8, pp. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
15. Sikorskaite S., Gelvonauskiene D., Stanys V., Baniulis D. Characterization of microsatellite loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Žemdirbystė=Agriculture*, 2012, vol. 99, no. 2, pp. 131–138.
16. Richards C. M., Volk G. M., Reilley A. A., Henk A. D., Lockwood D. R., Reeves P. A., Forsline P. L. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genetics & Genomes*, 2009, vol. 6, no. 2, pp. 339–347. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0190-9>
17. Urbanovich O. Y., Kazlovskaia Z. A. Identification of apple tree cultivars growing in Belarus using SSR-markers. *Acta Horticulturae*, 2009, vol. 839, pp. 479–486. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.65>
18. Marconi G., Ferradini N., Russi L., Concezzi L., Veronesi F., Albertini E. Genetic characterization of the apple germplasm collection in Central Italy: the value of local varieties. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, art. 1460. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01460>
19. Cmejlova J., Rejlova M., Paprstein F., Cmejla R. A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Science*, 2021, vol. 303, p. 110768. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768>
20. Gross B. L., Wedger M. J., Martinez M., Volk G. M., Hale C. Identification of unknown apple (*Malus × domestica*) cultivars demonstrates the impact of local breeding program on cultivar diversity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2018, vol. 65, no. 5, pp. 1317–1327. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0625-6>
21. Urrestarazu J., Denancé C., Ravon E., Guyader A., Guisnel R., Feugey L. [et al.]. Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level. *BMC Plant Biology*, 2016, vol. 16, no. 1, art. 130. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0818-0>
22. Urrestarazu J., Miranda C., Santesteban L. G., Royo J. B. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, vol. 8, no. 6, pp. 1163–1180. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0502-y>

### Информация об авторах

Фомина Елена Анатольевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Fomina@igc.by

Зайчкова Анна Николаевна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: A.Zainchkovskaya@igc.by

Кузмицкая Полина Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: P.Kuzmitskaya@igc.by

Урбанович Оксана Юрьевна – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Пашкевич Павел Андреевич – канд. с.-х. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: P.Pashkevich@cbg.org.by

Сидор Лариса Сергеевна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: L.Sidor@cbg.org.by

Аношенко Борис Юрьевич – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Anoshenko@cbg.org.by

Гончарова Людмила Владимировна – канд. биол. наук, доцент, заместитель директора по научной и инновационной работе. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: L.Goncharova@cbg.org.by

### Information about the authors

Alena A. Fomina – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Fomina@igc.by

Anna N. Zainchkovskaya – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: A.Zainchkovskaya@igc.by

Polina V. Kuzmitskaya – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: P.Kuzmitskaya@igc.by

Oksana Yu. Urbanovich – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Pavel A. Pashkevich – Ph. D. (Agric.), Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: P.Pashkevich@cbg.org.by

Larisa S. Sidor – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: L.Sidor@cbg.org.by

Boris Yu. Anoshenko – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: B.Anoshenko@cbg.org.by

Ljudmila V. Goncharova – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Deputy Director for Research and Innovation. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: L.Goncharova@cbg.org.by