

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ *JUGLANS REGIA*: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Абстракт. Реликтовые ореховые леса Азербайджана представляют ценный генофонд, что позволило в свое время Н.И.Вавилову включить их в один из центров разнообразия, происхождения и доместикации грецкого ореха. Особую ценность представляют ореховые леса Талыша, как уникального природного образования. Грецкий орех здесь, совместно произрастая с представителями Гирканской флоры, имеет огромное формовое разнообразие и с этих позиций представляет величайшую ценность как хранитель богатого генофонда. Нахчыван, как один из древних очагов доместикации ореха является носителем ценного генофонда в культуре.

Сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия ореха грецкого для настоящих и будущих поколений актуальная научная проблема.

На протяжении 35 лет автором проводятся исследования по разработке системной методологии комплексного изучения и оценки биологического разнообразия, консервации и устойчивого использования генофонда грецкого ореха. В статье излагаются основные аспекты и результаты биотехнологии вегетативного размножения, молекулярно-генетических исследований, устойчивого использования и консервации генофонда грецкого ореха.

Введение. Грецкий орех (*Juglans regia* L.) - ценная орехоплодовая порода, по комплексу полезных свойств занимает особое место в плодоводстве. Несмотря на высокий спрос, Мировое производство орехов остается низким (табл.1).

Причин тому две:

- эндемизм, узкий ареал естественного распространения грецкого ореха. На Земном шаре существует три очага естественного произрастания ореха: преднеазиатский, среднеазиатский и китайский [1];

- ограниченность регионов по почвенно-климатическим условиям для широкого промышленного разведения ореха. По комплексу природных показателей лишь 5 % суши благоприятны для промышленного ореховодства.

В указанных причинах кроются пути научного решения развития ореховодства, достижения высокого производства валовых урожаев товарных орехов.

Эндемизм грецкого ореха. Еще 80 лет назад Н.И. Вавилов предсказывал, что дикие сородичи культурных растений станут незаменимым источником полезных

генов для аграрного производства. На сегодняшний день не существовали бы многие коммерческие сорта ореха, если бы не генплазма диких рас. Дикорастущий грецкий орех ценный генофонд, они устойчивы к биотическим и абиотическим факторам среды [2,3,4,8,16,21].

Биологическое разнообразие грецкого ореха еще не нашло полного практического применения, хотя генетические возможности для отбора и выведения новых форм и сортов, отвечающих потребностям человека, неограниченны.

Невозможно предсказать, какие дикие разновидности могут потребоваться через десятилетия или даже века для использования их полезных аллелей в культурных сортах. Поэтому, чтобы предотвратить потери «лучших» генов, требуется сохранить как можно более широкий спектр диких рас – генетического разнообразия, даже те разновидности ореха, у которых на сегодняшний день нет видимых полезных признаков.

На биологическое разнообразие грецкого ореха отрицательное влияние оказывают антропогенный фактор и меняющиеся условия среды, что вызывает невосполнимую генетическую утрату и размер угрозы генетической эрозии грецкого ореха очень велик. Поэтому было бы крайне недальновидно потерять генетическое разнообразие этого вида.

Ограниченность ареала выращивания. В целях повышения производства орехов предусматривает:

- расширения площадей возделывания;
- повышения урожайности с единицы площади.

Первый путь - экстенсивное направление, ограничены земельные ресурсы, даже 5 % суши, благоприятных для произрастания ореха и те в большинстве случаев заняты другими культурами.

Второй путь (повышение погектарной урожайности) – интенсивное направление, предусматривает воздействие, как на среду выращивания, так и на само растение. Влияние на среду выращивания включает комплекс агротехнических мероприятий по закладке и эксплуатации насаждений (система обработки почвы и содержания междурядий, внесение удобрений, ирригация,

проведение мер борьбы с болезнями и вредителями и др.). Проведение этих мероприятий необходимо, неотъемлемая часть технологии выращивания, практически исчерпал свои возможности и в целом служит сохранению фактического урожая.

Воздействие на само растение располагает не востребуемыми возможностями и прежде всего это генетический потенциал вида.

Результаты и обсуждение. С утратой каждого дерева безвозвратно утрачивается генетический ресурс ореха. «Дикий» генофонд, целесообразно сохранить, прежде всего, в «дикой природе», в условиях естественного произрастания (*in situ* охрана). Создание клоновых и коллекционных садов (*ex situ* охрана), а также широкое промышленное разведение грецкого ореха выдвигает необходимость разработки и внедрения в производственную практику надежных способов вегетативного размножения.

Вегетативное размножение ореха прививкой проводится двумя способами – окулировкой и копулировкой. Самым распространенным и технологически простым способом вегетативного размножения грецкого ореха является летняя окулировка. Разработаны техника и технология поведения окулировок, изучены факторы, влияющие на приживаемость привитых глазков и на сохранность окулянтов, определены оптимальные сроки их производства в зависимости от почвенно-климатических условий республики. Прививку ореха способом улучшенная копулировка, в приклад и способом за кору необходимо проводить в период пика сокодвижения, а для устранения отторжения прививочных компонентов под влиянием интенсивного сокодвижения важно ниже места окулировки в 2-3-х местах проводить поперечный надрез коры до камбиального слоя. Наилучшие результаты получены при прививке способом улучшенная копулировка и вприклад.

Применением новейших методов биотехнологии для высших растений является их клональное размножение [6,9,25]. Для клонального микроразмножения грецкого ореха применяют две питательные среды – базовая питательная

среда Мурасиге - Скуга (MS – Murashige and Skoog medium) и питательная среда Дравер - Кунжуки (DKW – Driver-Kunijuki Walnut medium, табл. 2).

Для микроклонального размножения ореха использовали соматические эмбрионы, отбирая хорошо развитые зародыши с ярко выраженными корешками и точкой роста. Для просушки отобранный зародыш в чашках Петри без питательной среды помещали в эксикатор с нитратом аммония для просушки до оптимальной влажности. Эксикатор помещался в темное место при комнатной температуре. Через неделю, высушенный до оптимума, зародыш становится похож на жареную кукурузу и приобретает цвет слоновой кости. Подготовленный таким образом для микроклонального размножения эмбрион просеивали в чашку Петри с DKW питательной средой без стимуляторов роста.

После недели зародыш регенерировал, образуя каллус. Каллус пересаживали в DKW питательную среду со стимулятором роста для регенерации вегетативного роста. Для управления процессами формообразования использовали ауксин - индолил-3-масляная кислота. Проведены опыты по выявлению концентрации ауксина на скорость и интенсивность корнеобразования черенков грецкого ореха.

С увеличением концентрации ауксина ускоряется как процесс так и интенсивность корнеобразования. При концентрации ауксина 0,50 г/л наблюдается замедление процесса. Оптимальная концентрацией ауксина для корнеобразования ореха 0,2-0,4 г/л. Высокие показатели были получены при концентрации 0,3 г/л.

“Слабое звено” метода микроклонального размножения *in vitro* низкая сохранность микрочеренков после пересадки в субстрат в закрытом грунте (25-30 %). Требуется проведение исследований адаптивной способности после пересадки из *in vitro*, а также в направлении оптимизации микроклимата в закрытом грунте.

Грецкий орех исключительно полиморфный вид. Полиморфизм ореха наблюдается более чем в 50 признаках и наиболее ярко проявляется в формовой разнообразии плодов [1,2,5,16].

Изучение видимого полиморфизма проведено методом морфологического описания эндокарпа с последующей оценкой частоты встречаемости в популяциях по биометрическому анализу генеральной совокупности, включающей Большой и Малый Кавказ, Талыш и Нахичевань (дикорастущий орех и семенное потомство). Образцы орехов были собраны в период экспедиций (2007-2012 гг.) как генплазма коллекция, предусматривалось также проведение биометрической оценки. С каждого дерева был собран не менее 100 орехов.

Биометрический анализ орехов для оценки видимого полиморфизма проведен по общепринятой методике [16,18,19]. Средние арифметические генеральной совокупности использованы для оценки частоты встречаемости деревьев ореха в популяциях по массе, форме (К), толщине скорлупы и проценту выхода ядра.

Грецкий орех в Азербайджане характеризуется высокой степенью вариабельности биометрических показателей плодов (табл. 4). Для генеральной совокупности вариация по массе плодов составляет 600%, по форме эндокарпа - 200%, по толщине скорлупы -500-600 % и по выходу ядра -200 %.

Амплитуда изменчивости массы плодов 4-24 г. Большинство деревьев в популяциях сосредоточено в классах с массой 8-14 г при частоте встречаемости 0,795. Аналогичный характер распределения наблюдается и по форме эндокарпа. При амплитуде изменчивости коэффициента формы от 0,9 до 1,5 в популяциях преобладают деревья с коэффициентом формы 1,0- 1,3 (частота 0,844), что характеризует их по форме как овальные и слегка вытянутые.

Выход ядра, в зависимости от толщины скорлупы, в естественных популяциях варьирует от 30 до 70 %-ов. Деревья с высоким выходом ядра сконцентрированы вокруг средней величины (55%). Между выходом ядра и толщиной скорлупы существует тесная коррелятивная связь.

Полиморфизм имеет практическое значение, свидетельствует о различной селективной ценности признаков, формирует генофонд популяции, характеризует биоразнообразие и используется для обозначения прерывистой генетической изменчивости вида [7,12]. Морфологический метод описания видимого

полиморфизма не позволяет выявить генетическую структуру и оценить генетическое богатство популяций дикорастущего ореха [10,11,13]. Для исследования биологического разнообразия, генетической структуры и оценки гетерозиготности выполнены молекулярно-генетические анализы¹.

Шесть популяций грецкого ореха из Большого Кавказа (Габала, Исмайллы, Шеки) и Талыша (Биласар, Гирканский Национальный Парк, Селигавул) испытаны по 12 локусам, используя стандартные протоколы хпДНК анализов (СТАВ, PCR и SSR протоколы) [20,22,26].

Хлоропласт ДНК материал экстрагировали из замороженных в жидком азоте листьев методом воздействия сепилтриметиламмония брома (cetyltrimethylammonium bromide, СТАВ)

и инкубировали до реакции полимеразы - ПЦР (PCR-polymerase chain reaction) с использованием 12-ти праймеров (табл. 4). Качество исходного хпДНК материала и ПЦР оценено электрофорезис методом в гелях агарозы.

SSR анализы (Simple Sequence Repeat – Повтор Простых Последовательностей) выполнены на капиллярном биоанализаторе ABI 3100 с программным обеспечением сбора данных (PE/Applied Biosystems). Оценка результатов SSR анализов показала наличие существенного генетического полиморфизма в пределах и между популяциями (табл. 5).

Анализ генетической структуры и дифференциации шести популяций грецкого ореха, по три из Большого Кавказа и из Талыша, показал умеренный диапазон изменчивости. Наблюдаемое число аллелей колеблется от 2 до 11 аллелей при среднем значении 5,6 аллелей в локусе. Популяции значительно отличались как по частоте, так и по составу для десяти из двенадцати оцененных аллелей, и среднее число аллелей в локусе колебалось от 4,0 до 4,6 с частотой 92 %. В пределах популяций частота встречаемости некоторых аллелей ниже среднего, что дифференцирует популяции в пределах и между Кавказом и Талышом.

¹ Анализы выполнены автором в Лаборатории по Клонированию и Генплазма Хранилища США (NCGR UCDA , Davis California).

Для оценки генетического родства популяций проведена кластеризация (составлены кладограммы) методом объединения соседей. Метод основан на принципе минимальной эволюции, называется также методом матриц расстояний и учитывает генетическое расстояние между парами изучаемых популяций - UPGMA анализ метод, основанный на непредвзятой генетической идентификации и объединения соседей [23,24,27]. Кластеризация методом объединения соседей показывает, что популяции из Талыша являются сестринской, а не предковой группой для популяций Кавказа.

Заключение. Полиморфизм, создавая биологическое разнообразие вида, формирует генофонд популяции, как генетический ресурс является исходным селекционным материалом, имеет селекционное значение, свидетельствует о различной селективной ценности признаков. Полиморфизм диких рас ореха требует охрану, устойчивого использования и консервацию путем закладки в генетические банки. Результаты молекулярной филогенетики подтверждают естественное произрастание и происхождение ореха грецкого не только для Талыша, а в целом на Кавказе. Высокий уровень генетической дифференциации популяций объясняется широким диапазоном пространственных и временных изменений, на которые грецкий орех проявляет высокую адаптивную изменчивость, что создает превосходный источник генплазма материала.

Широкие возможности в направлении интенсификации ореховодства открывают современные методы биотехнологии выращивания и вегетативного размножения посадочного материала, молекулярно - генетические исследования и геновая инженерия растений [14,21,22].

Генно-инженерные манипуляции с растениями породили некоторые опасения. Учитывая полемику сторонников “за” и “против” генетически модифицированных организмов (ГМО), важно выразить свою позицию. Вполне обоснованны опасения по поводу создания ГМО путем встраивания в геном организма чужеродного ДНК. Эти опасения связаны с возможностями выхода генетических векторов и трансгенных растений из-под контроля биотехнологов. Вместе с приобретением искомого признака трансгенный организм приобретает

целый набор новых качеств, вызванных как плейотропным действием нового белка, так и свойствами встроенной конструкции. Неконтролируемый перенос чужеродных генетических конструкций (фрагментов ДНК), определяющих различные типы устойчивости к пестицидам, вредителям и болезням растений, вследствие переопыления с дикорастущими родственными видами вызывают опасения утраты биоразнообразия и формирование “суперсорняковости” [17]. Однако, комплекс «сорняковости» вряд ли может формироваться в результате трансплантации одного или нескольких генов. Эти опасения предусматривают необходимость тщательного тестирования генно-инженерных растений перед их переносом в полевые условия, перед вводом в культуру.

Встраивание в геном организма-хозяина новых близкородственных конструкций ДНК имеет цель получить новый признак, недостижимый для данного организма путем традиционных методов селекции или требующий длительный период времени. Создание высокоурожайных, с высокими товарными качествами плодов и толерантных к стрессовым факторам сортов и форм грецкого ореха на современном этапе возможно путем проведения генно-инженерных манипуляций по “разрезанию” и “сшиванию” конструкций ДНК, путем трансплантации в ДНК локусов урожайности, тонкокорости и крупности плодов, резистантности, кистевидного расположения плодов и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилов Н.И. Проблемы происхождения, география, генетика, селекция растений, растениеводства и агрономии. Избранные сочинения, М.-Л. 1965, том V - с.14-78.
2. Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. Л., Колос,1971 - 752 с.
3. Ибрагимов З. А. Биологическое разнообразие ореха грецкого в Азербайджане // Лесное хозяйство. М., 2009, № 5 - с. 23-25.
4. Ибрагимов З. А. Генофонд ореха грецкого в Азербайджане// Аграрная наука. М., 2009, № 7 - с. 12-13.
5. Ибрагимов З. А. Популяционная изменчивость ореха грецкого //Аграрная наука Азербайджана. Баку, 2009, № 3-4 - с. 55-56.
6. Ибрагимов З.А. Базовая питательная среда и культура тканей ореха *in vitro*// Аграрная наука. М.,2010, № 3 – с. 17-18.

7. Ибрагимов З.А. Биоразнообразии и генетическое родство популяций ореха грецкого // НАНА Гянджинский Региональный Научный Центр «Сборник известий» 2009, № 37 - с.15-19.
8. Ибрагимов З.А. Генофонд ореха грецкого в Азербайджане // Аграрная наука. М., 2009, № 7 - с. 12-13.
9. Ибрагимов З.А. Культура тканей *Juglans regia in vitro* // Аграрная наука Азербайджана, Баку, 2010, № 1-2 - с. 57-58
10. Ибрагимов З.А. Молекулярно-генетические исследования биологического разнообразия *Juglans regia* L. в Азербайджане // Садоводство и виноградарство. М., 2010, № 5 – с. 20-22.
11. Ибрагимов З.А. Полиморфизм микросателлитных локусов *Juglans regia* в Азербайджане /Сб. научных трудов «Научное обеспечение развития АПК в условиях реформирования» Санкт – Петербургского Госагроуниверситета. С-П., 2011 - с. 30-32.
12. Ибрагимов З.А. Популяционная изменчивость ореха грецкого // Аграрная наука Азербайджана. Баку, 2009, № 3-4 - с. 55-56.
13. Ибрагимов З.А. Филогенез ореха грецкого – *Juglans regia* L.// Аграрная наука Азербайджана. Баку, 2009, № 5 - с. 60-62.
14. Клаг У.С., Каммингс М. Р. Основы генетики. М.: Техносфера, 2007, 896 с.
15. Команич И.Г. Биология, культура, селекция грецкого ореха. Кишинев, 1980 - 144 с.
16. Кулиев А.И. Отбор лучших хозяйственно ценных форм ореха грецкого / Труды АзербНИИЛХА, том 6, Барда, 1966 - с.292-296.
17. Куликов А.М. ГМО и риски их использования/В сб. “ГМО скрытая угроза России”. Центр экологической политики России. Общественная Ассоциация Генетической Безопасности. Москва, 2004 - с. 46-71.
18. Рихтер А.А., Ядров А.А. Грецкий орех. М. Агропромиздат, 1985 - 215 с.
19. Щепотьев Ф. Л. Орех грецкий / В кн. Орехоплодовые лесные культуры. М., 1978 - с. 5-93.
20. Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin 19, 1987. P. 11–15.
21. Ibrahimov Z.A., McGranahan G.H., Leslie C.A., Aradhiya M.K. Persian walnut improvement in Azerbaijan // Annals of agrarian science. Tbilisi, Georgia, 2007, Vol, 5, № 4 - p. 18-21.
22. McGranahan G. H., Leslie C. A. Advances in genetic improvement of walnut at the University of California, Davis / Proceedings of the 5th International Walnut Symposium. Sorrento, Italy, 2006 - p.117-122.
23. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics 89, 1978 - p. 583-590.
24. Nei Masatoshi. Molecular population genetics and evolution // Amsterdam: North-Holland Pub. Co.; New York: American Elsevier Pub. Co., 1975 - p.487-509.
25. Vahdati K. Somatik Embryogenesis and Embryo Maturation in Persian Walnut / Proceedings of the fifth international walnut symposium, Sorrento, Italy, 2006 - p. 199-205.
26. Woeste K., Burns R., Rhodes O. and Michler C. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut // J. Hered, 93, 2002 - p. 58-60
27. Wright S. Evolution and the genetics of Populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago & London. The University of Chicago Press, 1978 - 582 p.
28. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

Ибрагимов З.А., АГАУ, г. Гянджа

**БИОТЕХНОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ *JUGLANS REGIA*: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ
РЕЗЮМЕ**

Грецкий орех реликт Третичного периода, отличается исключительным полиморфизмом. Вариабельность биометрических показателей плодов по массе орехов - 600%, по форме эндокарпа -200%, по толщине скорлупы -500-600 % и по выходу ядра -200 %. Оценка двенадцати простых повторов (SSR анализы) показала наличие существенного генетического полиморфизма в пределах и между популяциями. Популяции значительно отличались как по частоте, так и по составу для десяти из двенадцати оцененных аллелей, и среднее число аллелей в локусе колебалось от 4,0 до 4,6 с частотой 92 %. Результаты молекулярной филогенетики однозначно подтверждают естественное происхождение грецкого ореха не только для Талыша, но и в целом на Кавказе.

Ibrahimov Z.A., ASAU, Ganja

**BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR -GENETIC RESEARCHES
JUGLANS REGIA: THE CONDITION AND PROSPECTS
SUMMARY**

The Caucasus nation of Azerbaijan is regarded as one of the centers of origin, diversity, and domestication of walnut. Walnut shows a wide range of adaptations to a multitude of environments created rich pools of the Germplasm. The walnut can be grouped according to weight, shell thickness, kernel percentage and shape. About 70-80% of walnut populations have an average shell thickness of 0.5-2.0 mm and a kernel percentage of 45-55%.

The six walnut populations from Azerbaijan included in the study exhibited significant amount of polymorphisms within and among populations for the twelve microsatellite loci assayed. Within-population genetic diversity measures indicated that the populations are panmictic and well differentiated from each other. The Caucasus populations showed marginal differentiation among them and exhibited considerable divergence from the Talysh populations. The Talysh populations located within the famous Tertiary relic Hyrcan flora are probably ancient as compared to that of the Caucasus, and formed a basal sister group.

Мировое производство орехов по основным странам производителям (FAO)

Таблица 1.

№ п /п	Страна	Валовое производство по годам, тыс. т									
		1990	1995	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
1	КНР	149	230	309	252	343	393	436	499	499	503
2	США	205	212	216	276	255	295	294	322	317	290
3	Турция	115	110	116	116	120	130	126	150	170	172
4	Иран	44	119	130	168	178	150	168	170	68	170
5	Украина	-	76	49	55	57	78	90	91	68	82
6	Мексика	-	-	60	65	70	71	81	79	68	79
7	Франция	24	21	28	27	33	23	26	32	40	33
8	Индия	20	25	31	29	30	31	34	32	36	33
9	Египет	-	-	20	26	27	27	27	32	27	27
10	Румыния	26	22	31	33	37	50	15	47	23	26
11	Сербия	-	18	23	15	-	25	22	21	23	25
12	Чили	8	9	-	12	14	13	14	15	18	23
13	Греция	22	22	23	22	19	20	19	21	23	22
14	Австрия	12	13	17	15	13	20	17	17	18	19
15	Германия	12	13	18	15	16	16	16	16	16	17
16	Италия	15	10	16	-	15	15	15	16	15	16
17	Узбекистан	-	-	-	-	12	14	15	16	18	15
18	Пакистан	17	18	22	-	13	13	13	14	14	15
19	Испания	8	8	11	-	13	-	-	-	-	14
20	Марокко	-	-	-	17	-	-	-	-	-	14
21	Венгрия	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Аргентина	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Болгария	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	СССР(бывш.)	95									
25	Азербайджан	-	8	-	-	-	-	-	-	10	-
26	Беларусь	-	9	12	12	-	-	12	-	12	12
27	Грузия	-	10	15	12	13	16	-	13	-	-
28	Молдова	-	-	-	-	13	17	17	13	-	-
29	Рос. Фед-ция	-	-	12	12	-	-	-	-	-	-
	Всего	812	961	1159	1179	1291	1417	1457	1616	1483	1607

ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕТНЕЙ ОКУЛИРОВКИ ГРЕЦКОГО ОРЕХА



ПРИВИВКА ОРЕХА ЧЕРЕНКОМ (КОПУЛИРОВКА)

Копулировка язычком вприклад



Прививка черенком закору



Прививка ореха черенком способом улучшенная копулировка



Обвязка и покрытие садовым варом копулировок



Питательная среда Драйвер-Кунжуки (Driver- Kunijuki -Walnut Medium – **DKW Medium**) для клонального микроразмножения грецкого ореха

Таблица 2

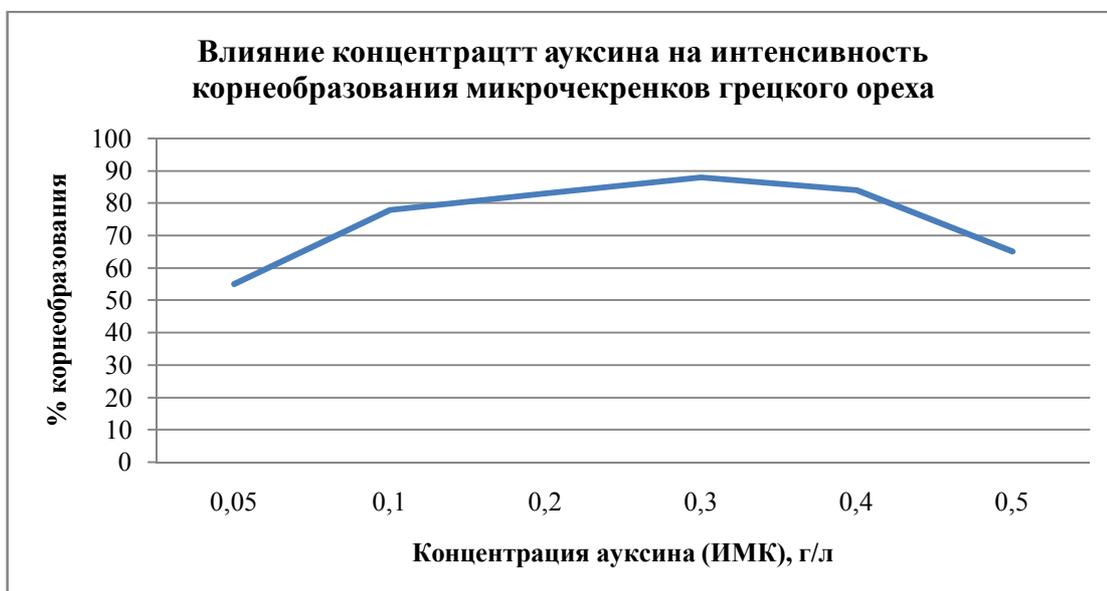
Компонент среды	Название	Химическая формула, обозначение	Количество, г/л
Маточные растворы для питательной среды DKW			
A	Нитрат аммония	NH_4NO_3	141,60
	Нитрат кальция	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	196,80
	Нитрат цинка	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	1,70
B	Сульфат калия	K_2SO_4	77,950
C	Сульфат магния	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	74,0
	Сульфат марганца	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,350
	Сульфат меди	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,50
	Сульфат никеля		0,0530
D	Хлористый кальций	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	14,90
E	Фосфат калия	KH_2PO_4	26,50
	Борная кислота	H_2BO_3	0,480
	Молибденовая сода	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,90
F	Этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,540
	Сульфат железа	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,380
G	Тиамин	B_1	0,20
	Никотиновая кислота	PP (B_3)	0,10
	Глицин	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	0,200
H	Мио – инозитол	B_{12}	10,00
Приготовление 1 л базовой питательной среды DKW Medium			
DKW	По 10 мл A, C, D, E, F, G, H (каждого)		
	20 мл B		
	Индолил-3- масляная кислота	IBA	0,10
	6-бензоламинопуридин	6 - BAP	1,00
	pH 5,5 (калибруется с помощью 0,1% HCl или KOH)		
	Биогель	Gelriter/Phytogel	2,10

КУЛЬТУРУ ТКАНЕЙ ГРЕЦКОГО ОРЕХА *IN VITRO*

**Проращивание
соматического эмбриона**



**Регенерация
соматического эмбриона**



Концентрации ауксина и интенсивность корнеобразования

ПОЛИМОРФИЗМ ГРЕЦКОГО ОРЕХА

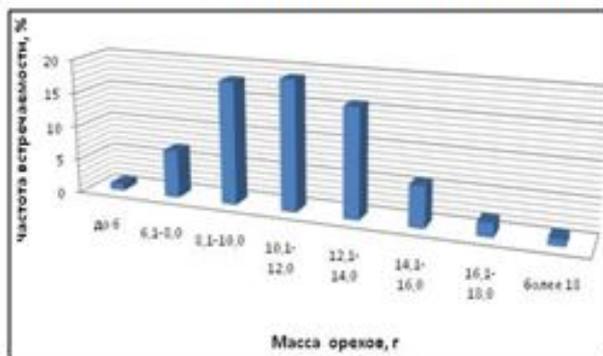


Биометрические показатели плодов грецкого ореха в естественных популяциях
Таблица 3.

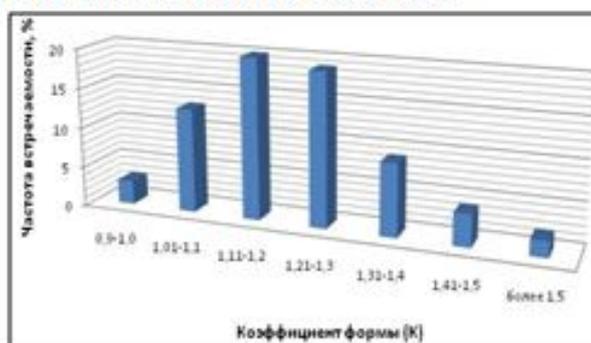
Показатель		Единица измерения	Амплитуда изменчивости	Среднее
Высота (H)		мм	27,8 - 45,1	35,04
Диаметр	Д ₁ (по створке)	мм	21,9 - 33,7	29,80
	Д ₂ (по шву)	мм	23,6 - 34,6	29,31
Коэффициент формы (K)*		-	0,71 - 1,52	1,02
Масса		г	4,04 - 24,6	9,96
Толщина скорлупы		мм	0,52 - 3,08	1,26
Выход ядра		%	38,85 - 67,03	48,06
Масличность (содержание сырого жира)		%	52,7 - 73,5	67,15
Белок		%	7,14 - 22,0	14,2

* $K = \frac{2H}{D_1 + D_2}$; при $K \approx 1$ эндокарп шаровидной, при $K > 1$ - вытянутой (продолговатой), при $K < 1$ - сжатой (овальной) формы.

Распределения деревьев ореха грецкого по массе эндокarpa



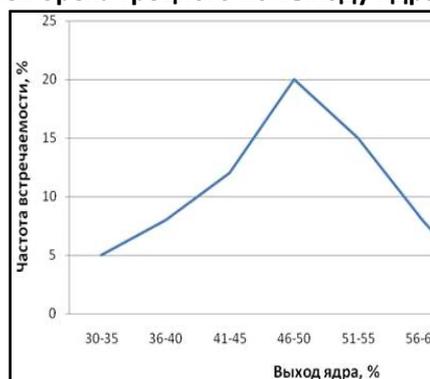
Распределения деревьев ореха грецкого по форме эндокarpa

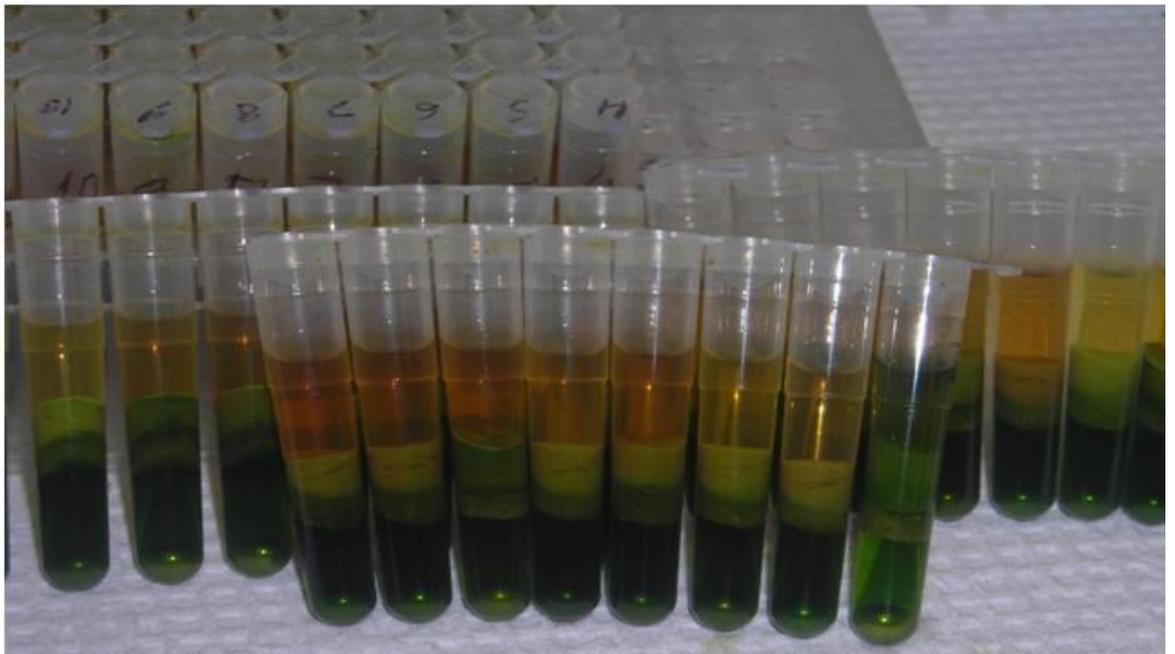
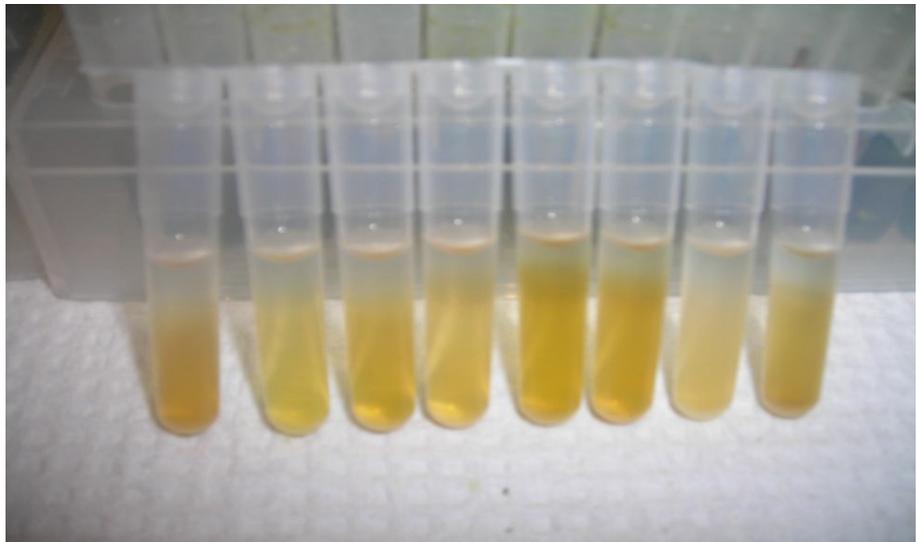
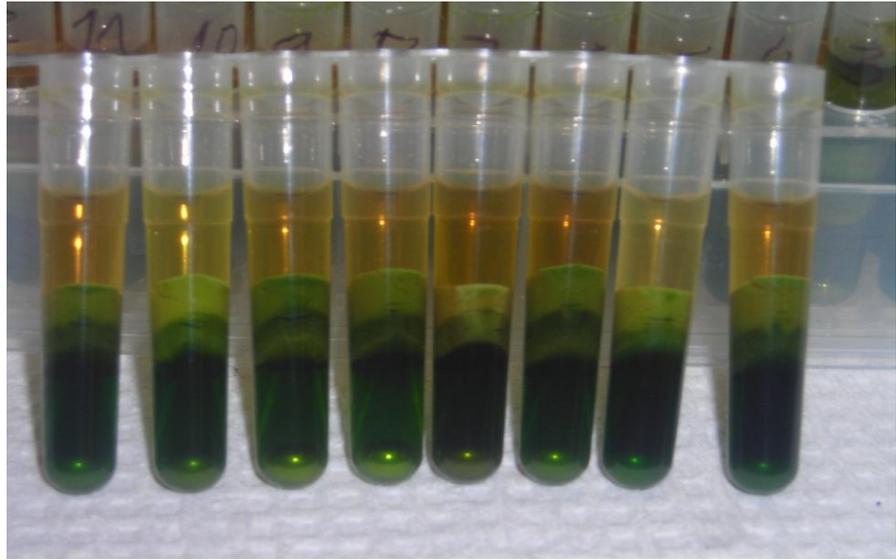


Распределения деревьев ореха грецкого по толщине скорлупы

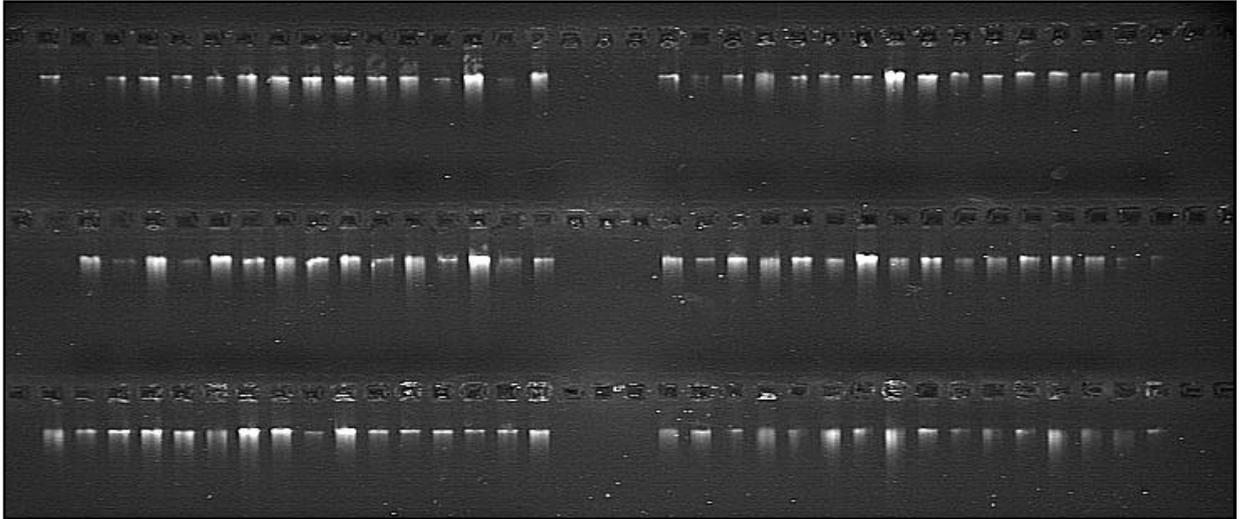


Распределения деревьев ореха грецкого по выходу ядра

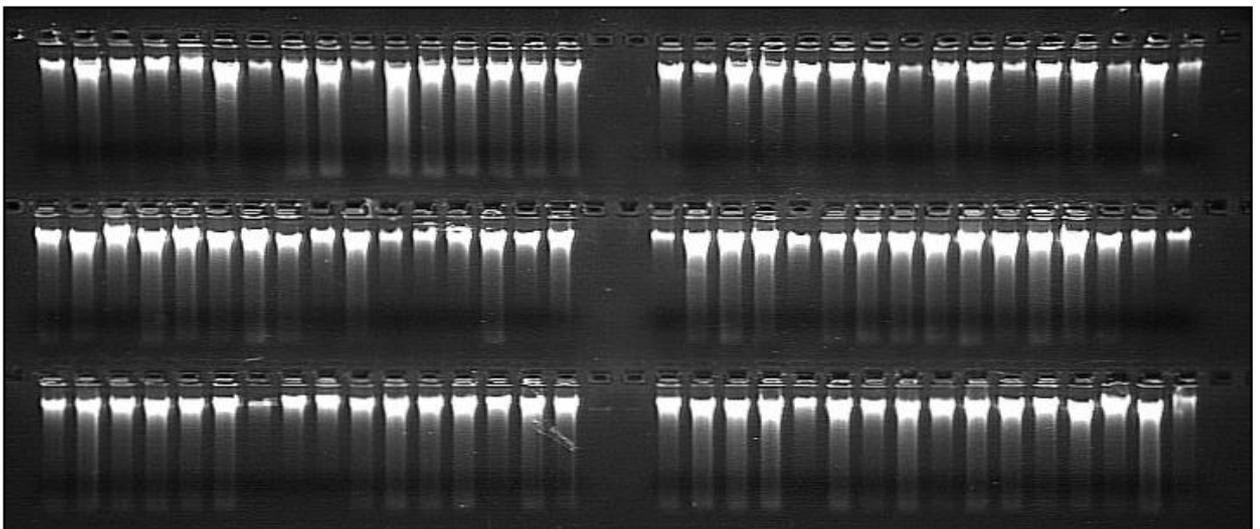




Экстрагирование хлоропласт ДНК



Электрофорезис оценка качества исходного хпДНК



Электрофорезис оценка качества хпДНК после ПЦР

Нуклеотидная последовательность праймеров для SSR анализов
грецкого ореха

Таблица 4.

Локус	Начальный фрагмент 5'-3'	Конечный фрагмент 5'-3'
<i>WGA004</i>	<i>TGTTGCATTGACCCACTTGT</i>	<i>TAAGCCAACATGGTATGCCA</i>
<i>WGA009</i>	<i>CATCAAAGCAAGCAATGGG</i>	<i>CCATTGCTCTGTGATTGGG</i>
<i>WGA089</i>	<i>ACCCATCTTTCACGTGTGTG</i>	<i>TGCCTAATTAGCAATTTCCA</i>
<i>WGA118</i>	<i>TGTGCTCTGATCTGCCTCC</i>	<i>GGGTGGGTGAAAAGTAGCAA</i>
<i>WGA178</i>	<i>CTTTGAGGGAGGTGGTGGTA</i>	<i>GCTGGAGATAGCCGATCATC</i>
<i>WGA225</i>	<i>AATCCCTCTCCTGGGCAG</i>	<i>TGTTCCACTGACCACTTCCA</i>
<i>WGA318</i>	<i>TCTCATCCATCGATAGCAACC</i>	<i>GTGAGAGCAAGAGAGGGTCCG</i>
<i>WGA321</i>	<i>TCCAATCGAAACTCCAAAGG</i>	<i>TGTCCAAAGACGATGATGGA</i>
<i>WGA331</i>	<i>TCCCCCTGAAATCTTCTCCT</i>	<i>CGGTGGTGTAAAGGCAAATG</i>
<i>WGA338</i>	<i>GAGTTTTCTACCGCCCTTCC</i>	<i>TATTGAAATGAAGACCGGGC</i>
<i>WGA349</i>	<i>GTGGCGAAAGTTTATTTTTTGC</i>	<i>ACAAATGCACAGCAGCAAAC</i>
<i>WGA376</i>	<i>GCCCTCAAAGTGATGAACGT</i>	<i>TCATCCATATTTACCCCTTTCG</i>

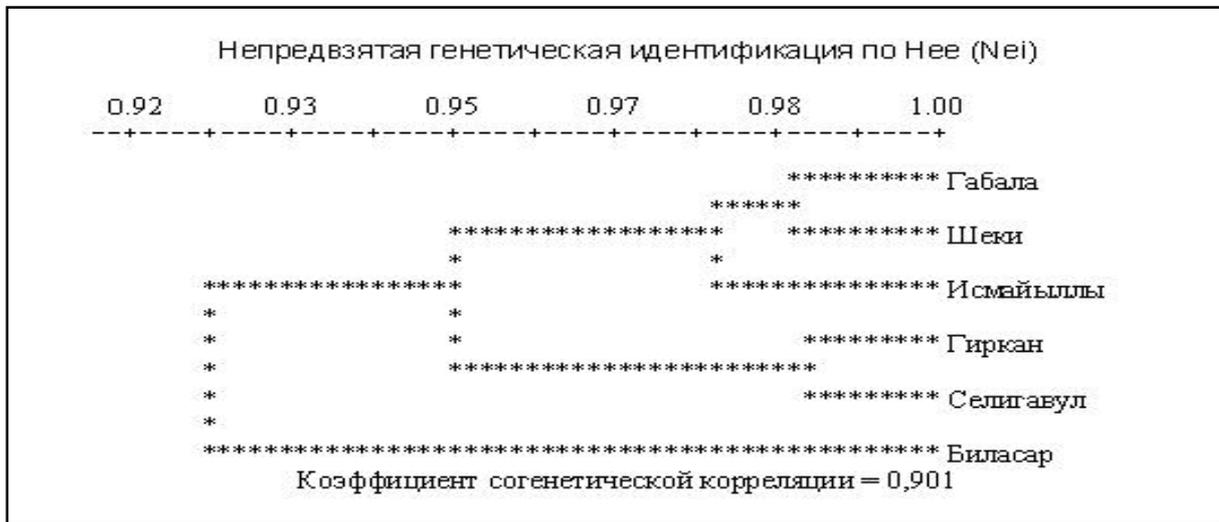
Оценка генетического разнообразия популяций
(в скобках - стандартная ошибка)

Таблица 5.

Популяция	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>PI</i>	<i>H_(O)</i>	<i>H_(E)</i>	<i>F</i>
Габала	30,4 (0,4)	4,3 (0,5)	91,7	0,579 (0,075)	0,602 (0,066)	0,038
Исмайылы	30,1 (0,3)	4,3 (0,4)	91,7	0,582 (0,063)	0,597 (0,065)	0,025
Шеки	27,2 (0,9)	4,1 (0,5)	91,7	0,568 (0,064)	0,602 (0,066)	0,056
Биласар	28,6 (0,9)	4,0 (0,4)	91,7	0,652 (0,068)	0,612 (0,060)	0,065
Гиркан	27,4 (1,4)	4,6 (0,7)	91,7	0,552 (0,066)	0,588 (0,064)	0,061
Селигавул	29,8 (0,7)	4,6 (0,5)	91,7	0,565 (0,069)	0,585 (0,063)	0,034

N- среднее количество проб для исследования локусов; *A*- среднее количество аллелей в локусе; *PI* – процент полиморфизма локуса; *H_(O)*, *H_(E)* – средние значения гетерозиготности; *H_(O)*- наблюдаемая (фактическая), *H_(E)* –ожидаемая гетерозиготность (объективная оценка по Nei,1978); *F*- оценка генетической изменчивости по 12 локусам.

ФИЛОГЕНЕЗ ГРЕЦКОГО ОРЕХА



Генетическое родство популяций



Филогенетическая кладограмма популяций