

УДК 581.15:575.8:582.477.6

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ *Juniperus deltoides* R.P. Adams В КРЫМСКО-КАВКАЗСКОМ РЕГИОНЕ ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

© 2024 г. Е. В. Хантемирова<sup>1</sup>, \*, Ц. Радукова<sup>2</sup><sup>1</sup> Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия<sup>2</sup> Пловдивский университет им. П. Хилендарского, кафедра ботаники и биологического образования, Пловдив, 4000 Болгария

\*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 19.06.2023 г.

После доработки 21.09.2023 г.

Принята к публикации 25.09.2023 г.

В северо-восточной части ареала изучена структура генетической изменчивости можжевельника дельтовидного *Juniperus deltoides* R.P. Adams (семейство Cupressaceae) – важного компонента средиземноморских аридных и полуаридных экосистем. Для генотипирования выборок из шести популяций этого вида в западных регионах Крыма, Кавказа и на Балканах впервые были применены пять ядерных микросателлитных локусов, разработанных для другого вида – *J. cedrus* Webb & Berthel. Для *J. deltoides* характерен средний уровень внутривидовой генетической изменчивости ( $H_e$  варьирует от 0.428 до 0.602) с наименьшими значениями в крымских популяциях. Филогенетический анализ выявил статистически значимую дифференциацию исследуемых популяций (9.9% от общей изменчивости,  $P < 0.001$ ) на три генетические группы: Западный Крым, Кавказ (Краснодарский край) и Балканы (Болгария). Первые две группы соответствуют ранее выявленной азиатской группе *J. deltoides*, третья – балканской группе. Дифференциация крымских популяций от географически близких кавказских популяций показана нами впервые.

**Ключевые слова:** *Juniperus deltoides*, ядерная ДНК, SSR-маркеры, генетическое разнообразие.

**DOI:** 10.31857/S0016675824020032 **EDN:** DRSEKX

Важным компонентом средиземноморских аридных и полуаридных экосистем является теплолюбивый и исключительно засухоустойчивый вид можжевельник колючий или красный – *Juniperus oxycedrus* L. (семейство Cupressaceae). Это небольшое деревце или кустарник с красновато-коричневыми шишкоягодами и колючей хвоей. Внутри этого изменчивого вида выделяют четыре подвиды, различающихся по габитусу, размеру шишкоягод и ширине хвои [1]. Из них наиболее распространенным является *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, который свою очередь также оказался неоднороден. Применение молекулярных методов и анализ содержания терпеноидов в листьях выявили существенные различия между западно- и восточно-средиземноморскими особями, что послужило причиной выделения двух отдельных видов – типичного *J. oxycedrus* в западном Средиземноморье и нового вида *J. deltoides* R.P. Adams в Восточно-Средиземноморском регионе (Балканы, Малая Азия, Крым) [2–4] (рис. 1). Внешние отличия *J. deltoides* незначительны и сводятся к линейно-треугольным листьям и на-

личию на шишкоягоде выступающих кончиков семенных чешуй (у *J. oxycedrus* узколанцетные листья и незаметные рубчики на шишкоягоде). Отсутствие явных морфологических различий между этими двумя таксонами позволило рассматривать *J. deltoides* как криптовид [3]. Предполагают, что так же, как у многих других древесных видов, эта дифференциация связана с расселением из разных рефугиумов в плейстоцене – восточных популяций из восточно-средиземноморских плейстоценовых рефугиумов в Малой Азии и на Аравийском полуострове, а западных – из западно-средиземноморских рефугиумов в южной части Пиренейского полуострова и Северо-Западной Африки [6, 7].

Можжевельник колючий, произрастающий в районе наших исследований (Крымский п-ов, Краснодарский край и Болгария), находится в восточной части обширного ареала и, согласно вышеупомянутым исследованиям, относится к *J. deltoides*. Хотя существуют мнения, что отличия этого криптовиды отражают скорее внутривидовую изменчивость [1, 8], мы в данной работе

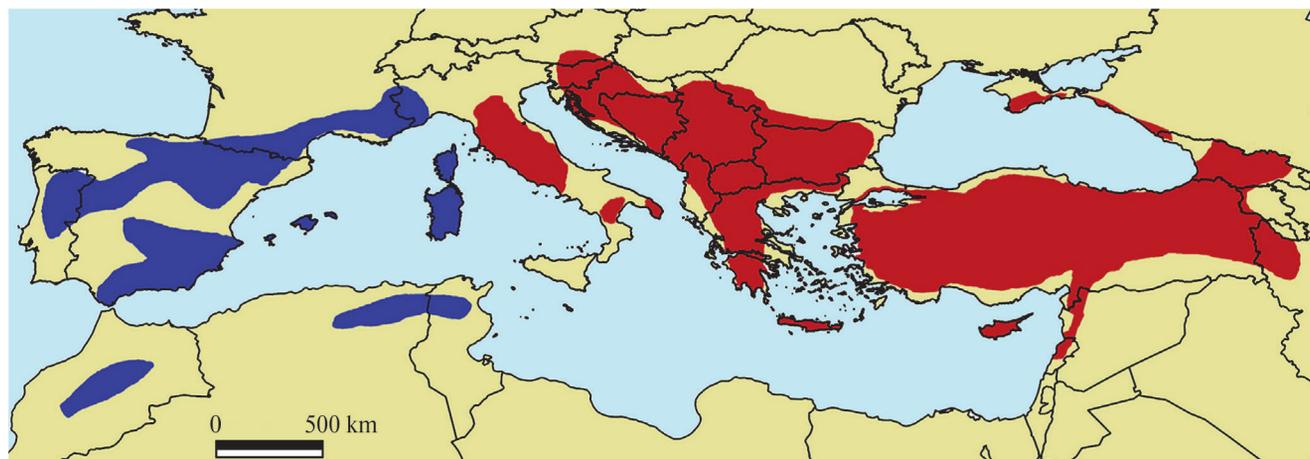


Рис. 1. Ареалы *Juniperus deltooides* (красный цвет) и *J. oxycedrus* (синий цвет) по R.P. Adams [3].

будем использовать номенклатурное название *J. deltooides*.

Использование ядерных микросателлитов (SSR-маркеров) для этого видового комплекса позволило выявить дальнейшую дифференциацию *J. deltooides* на балканскую и азиатскую группы [9]. В азиатской группе оказался и *J. deltooides*, собранный на Крымском п-ове. Однако материал исследования с полуострова был ограничен всего одной популяцией и не позволил сделать конкретные выводы, помимо общих предположений об ограниченном потоке генов, вызванном фрагментацией ареала и/или выживанием в разных рефугиумах во время последних ледниковых циклов.

В целом, следует признать, что исследования биогеографических закономерностей у *J. deltooides* почти не охватывают крымско-кавказский регион, где проходит северо-восточная граница ареала этого вида. Этот вид растет здесь в горах на небольших высотах и не образует сомкнутых лесов, в отличие от другого распространенного древовидного можжевельника *J. exelsa* M. Bieb. Ареал *J. deltooides* в данном регионе в течение прошлого века значительно сократился в результате антропогенного воздействия и подвергся фрагментации. Этот вид включен в Красные Книги Республики Крым и Краснодарского края [10, 11]. Крымский п-ов с точки зрения филогеографии заслуживает особого изучения. Этот уникальный полуостров, который почти полностью окружен Черным и Азовским морями, принято считать самым удаленным северо-восточным эксклавом природы Средиземноморья [12]. Можно предположить, что *J. deltooides* из изолированных популяций Крыма может иметь некоторые генетиче-

ские отличия от *J. deltooides*, обитающих в других районах Причерноморья (Болгария, Грузия и Анатолийское побережье Турции).

Основной целью данного исследования является оценка генетической изменчивости и популяционной структуры *J. deltooides* в районе бассейна Черного моря, а также определение существующих биогеографических тенденций и генетических связей между популяциями по данным изменчивости пяти микросателлитных локусов. Полученные результаты и выводы обеспечат теоретическую основу для разработки стратегии сохранения этого вида можжевельника.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мультилокусный генетический анализ с помощью ядерных микросателлитов был проведен на 117 образцах ДНК из шести природных популяций можжевельника колючего (две популяции из Краснодарского края, три из Крыма и одна из Болгарии) (табл. 1, рис. 2,а).

ДНК выделяли методом Devey [13] из сухой хвои, засушенной в силикагеле. На четырех образцах ДНК *J. deltooides* были протестированы 28 пар праймеров: 6 пар, разработанных для *J. communis* L. [14], 9 пар, разработанных для *J. przewalskii* Ком. [15], 13 пар – для *J. cedrus* Webb & Berthel. [16]. Успешно аплифицированные локусы использовали для дальнейшего тестирования. Для этого на восьми образцах ДНК *J. deltooides* из двух популяций из разных географических точек проводили амплификацию с немечеными олигонуклеотидами, затем визуализировали продукты реакции на акриламидных гелях с серебряным окрашивани-

**Таблица 1.** Исследуемые популяции *Juniperus deltoides* и параметры генетического разнообразия

№	Популяция	Координаты, с. ш./в. д.	Высота над уровнем моря, м	N	Ne	Ho	He	F
Краснодарский край								
1	Большой Утрищ	N 44°45' /E 37°23'	125	24	2.58	0.379	0.582	0.318
2	Сукко	N 44°48' /E 37°26'	39	22	2.70	0.382	0.602	0.362
среднее					2.64	0.381	0.592	
Крымский полуостров								
3	Чуфут-Кале	N 44°44' /E 33°55'	457	23	2.67	0.308	0.570	0.457
4	Бахчисарай	N 44°45' /E 33°54'	332	19	2.32	0.260	0.468	0.426
5	Мыс Мартьян	N 44°30' /E 34°14'	130	19	2.04	0.258	0.428	0.323
среднее					2.33	0.275	0.489	
Болгария								
6	г. Пловдив, д. Марково	N 42°02' /E 24°42'	607	10	2.27	0.431	0.509	0.137

Примечание.  $N$  – общее количество образцов,  $Ne$  – эффективное число аллелей на локус,  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $He$  – ожидаемая гетерозиготность,  $F$  – индекс фиксации.

ем и смотрели, есть ли изменчивость. Локусы, разработанные для *J. przewalskii*, у *J. deltoides* оказались неизменчивыми. Из локусов, разработанных для *J. communis*, были отобраны *Jc16*, *Jc31*, *Jc32* и *Jc35*, как нормально амплифицируемые и изменчивые, но в дальнейшем они были исключены из анализа из-за трудностей с интерпретацией. Пять локусов, разработанных для *J. cedrus* (*Jce01*, *Jce08*, *Jce10*, *Jce11* и *Jce13*), оказались изменчивыми и для *J. deltoides* и из них был составлен мультиплекс с учетом температуры отжига праймеров, сочетания флуоресцентного красителя и длины продукта (табл. 2). Использовалась следующая программа ПЦР: 5 мин при 95°C, затем 35 циклов: 30 с при 95°C, 45 с при 60°C, 90 с при 72°C и 15 мин при 72°C. ПЦР-продукт разводили в пять раз. 1 мкл разбавленного ПЦР-продукта смешивали с 8.5 мкл формамида и 0.5 мкл размерного стандарта или маркера молекулярной массы S-450 (Гордиз). Длины амплифицированных фрагментов определяли на НАНОФОР-05. Хроматограммы расшифровывались в программе GeneMapper v. 4.0 сначала автоматически, а затем проверялись вручную.

С помощью программ GENALEX v. 6.5 [17] и ARLEQUIN v. 3.5.2 [18] вычисляли следующие параметры генетической изменчивости: эффективное число аллелей на локус ( $Ne$ ), число уникальных аллелей, наблюдаемая ( $Ho$ ) и ожидаемая ( $He$ ) гетерозиготности, индекс фиксации ( $F$ ), коэффициент генетической дифференциации популяций ( $F_{ST}$ ). Тест на равновесие Харди-Вайнберга (HWE) был выполнен с помощью

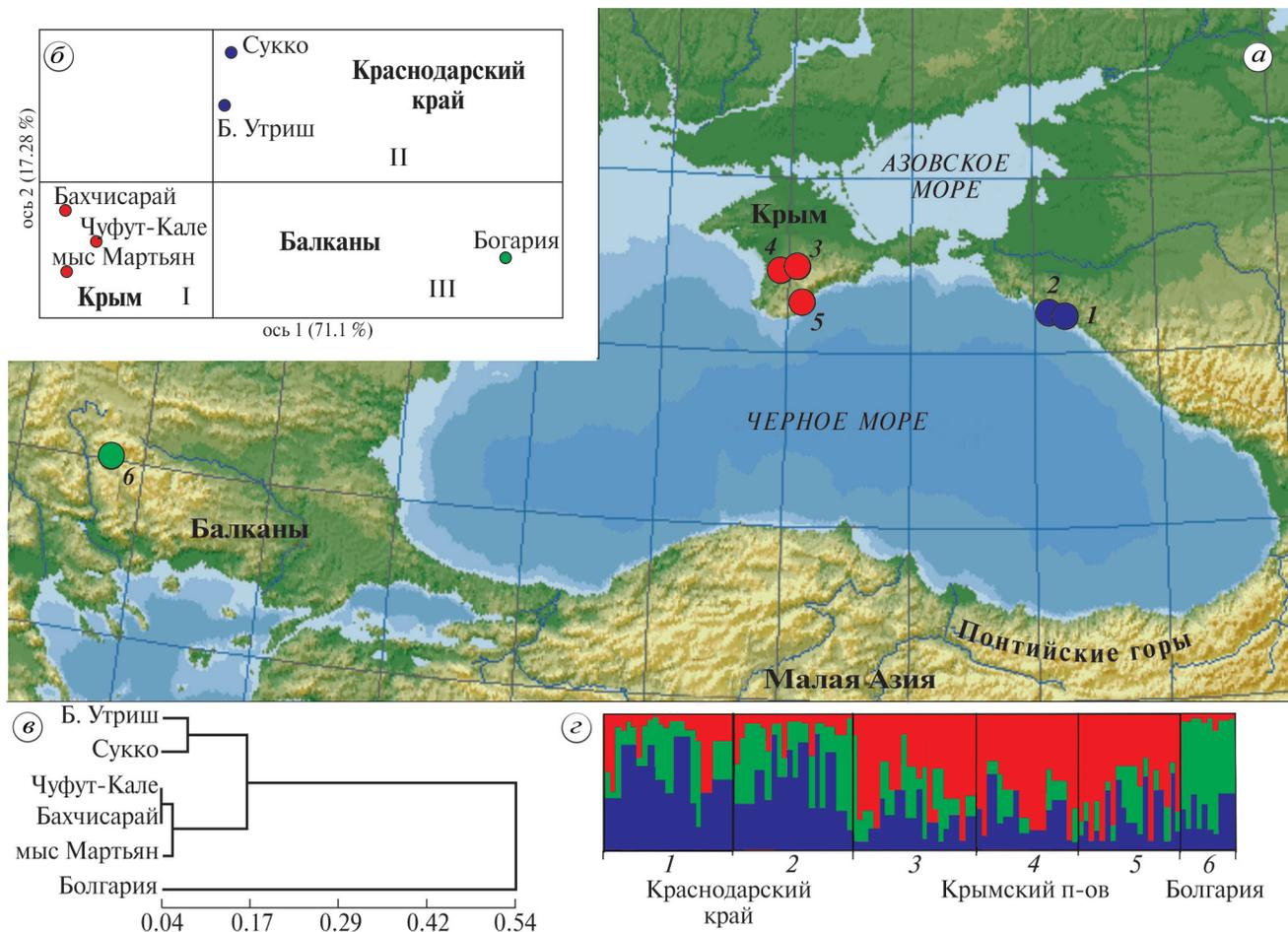
GENEPOP v. 4.2 [19]. Частоту нулевых аллелей оценивали методом Брукфилда [20], реализованным в программном обеспечении MICRO-CHECKER 2.2.3 [21].

Несколько подходов были использованы для изучения популяционной структуры и филогенетических анализов *J. deltoides*. С помощью анализа главных координат (PCoA в GENALEX v. 6.5) была проведена кластеризация популяций на основе матрицы парных генетических дистанций (DA) Nei [22]. Матрицы значений D были использованы также для построения UPGMA дендрограммы в пакете программ NTSYSpc 2.1 [23].

Вклад генотипов в каждую изучаемую популяцию оценивали на основе байесовского подхода с алгоритмом MCMC (цепь Маркова Монте-Карло) с помощью STRUCTURE 2.3.4 [24]. Наиболее вероятное количество кластеров определяли на основе апостериорной вероятности данных для заданного  $K$  методом Evanno

**Таблица 2.** Характеристика пяти микросателлитных локусов, используемых для *Juniperus deltoides*

Локус	Мотив	Температура отжига, °C	Размер фрагмента, п. н.	Число аллелей
Jce01 F: FAM	(AAACCT)6	60	233–251	4
Jce08 F: FAM	(ATAC)10	60	161–201	8
Jce10 F: FAM	(ATC)10	60	272–293	6
Jce11 F: HEX	(TTC)10	60	327–346	6
Jce13 F: TAMRA	(CATA)12	60	194–222	7



**Рис. 2.** Очертания района исследований с расположением исследованных популяций *J. deltoides*, распределение генетических групп и графики с оценками SSR-полиморфизма. Номера популяций и географические координаты пояснены в табл. 1. *a* – распределение генетических групп *J. deltoides* на основе полиморфизма SSR-маркеров. Цвет значков соответствует группам SAMOVA и PCoA. *б* – ординация популяций *J. deltoides* методом главных координат (PCoA) на основе их генетических дистанций; римскими цифрами обозначены группы согласно SAMOVA. *в* – UPGMA-дендрограмма популяций *J. deltoides*, построенная на основе их генетических дистанций в программе NTSYSpc 2.1. *г* – результаты анализа STRUCTURE.

в программе STRUCTURE HARVESTER [25]. Для идентификации популяционных кластеров был также использован пространственный анализ молекулярной изменчивости (SAMOVA v. 1.0) [26]. Корреляцию между генетическим и географическим расстояниями для пар выборок анализировали посредством теста Мантелла [27].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате мультилокусного анализа в популяциях *J. deltoides* выявлен 31 аллельный вариант, из них 6 уникальных. Все локусы полиморфны с числом аллелей, варьирующим от четырех до восьми. Самые высокие показатели генетического разнообразия оказались в популяциях Краснодарского края, самые низкие – в крым-

ских популяциях. В целом *J. deltoides* показал средний уровень генетического разнообразия.

Согласно тесту Харди–Вайнберга, три локуса (*Jce08*, *Jce10*, *Jce11*) из пяти показали значимое отклонение ( $P < 0.01$ ). В локусах *Jce08* и *Jce11* это может быть связано с наличием нуль-аллелей. Во всех популяциях (кроме болгарской) наблюдаются отклонения от Харди–Вайнберга с дефицитом гетерозигот. Значения  $F$  высоко положительные, варьирующие от 0.137 до 0.457.

Степень генетической дифференциации между всеми анализируемыми популяциями  $F_{ST} = 14\%$ . Согласно тесту Мантелла, наблюдается высокий коэффициент корреляции по генетическим расстояниям между популяциями

*J. deltooides*, основанный на частотах SSR-маркеров, и географическими расстояниями между ними ( $r = 0.869$ ,  $p = 0.06$ ). В результате пространственного анализа молекулярной изменчивости (SAMOVA) все популяции делятся на три группы по географическому расположению: Болгария, Крым и Краснодарский край. Дифференциация между этими же тремя группами была выявлена при помощи анализа главных координат на основании генетических дистанций между популяциями (рис. 2, б). Крымские популяции значительно отделены от остальных по первой главной координате (71.1% от общей изменчивости). Согласно второй главной компоненте, популяция из Болгарии дифференцируется от популяций Краснодарского края (17.28% изменчивости). На UPGMA-дендрограмме видно, что наибольшие генетические дистанции между болгарской популяцией и всеми крымско-кавказскими (рис. 2, в). Такие же три группы выявились при оценке данных STRUCTURE ( $K = 3$ ,  $\Delta K = 5.18$ ) (рис. 2, г). Применение AMOVA для трех генетических кластеров показало статистически значимую дифференциацию (9.9% от общей изменчивости,  $P < 0.001$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни генетического разнообразия и дифференциации у *J. deltooides*, обнаруженные в нашей работе, сходны с результатами, полученными для этого вида при помощи трех SSR-маркеров польскими исследователями [9]. Средняя ожидаемая гетерозиготность  $H_e$  в этой работе составляла 0.519, в нашей – 0.527. У *J. exelsa* в Турции среднее  $H_e$  равно 0.524 [28]. Эти показатели соответствуют среднему уровню генетического разнообразия и свидетельствуют о том, что антропогенная фрагментация в этих популяциях не оказала значительного влияния на показатели генетического разнообразия. Низкий показатель дифференциации у *J. exelsa* (2%) по сравнению с полученным в нашей работе у *J. deltooides* (9.9%) может свидетельствовать о лучшем генном потоке у первого вида или о более однородном произрастании вида на территории, на которой отбирали образцы.

При сравнении показателей генетического разнообразия у *J. deltooides* с таковыми у *J. communis* [29] оказывается, что у последнего они значительно выше ( $H_e = 0.708$ ). Это может быть связано с тем, что *J. communis*, являясь холодостойким видом, имеет более широкий современный ареал и, возможно, способен был переживать леднико-

вые периоды в микрорефугиумах. При этом коэффициенты инбридинга у обоих видов одинаково высоки, что может определяться биологическими особенностями данных видов. Есть мнение, что это явление характерно для многих видов семейства Cupressaceae [30].

В работе с использованием SSR маркеров [9] статистически значимая дифференциация (6.7% от общей изменчивости,  $P < 0.001$ ) была обнаружена между популяциями *J. deltooides* балканской группы (Греция, Босния и Герцеговина) и популяциями азиатской группы (Турция, Израиль и дополнительная популяция из Крыма). Выявленную структуру авторы объясняют фрагментацией ареала и/или различными рефугиумами, в которых этот вид выживал во время последнего ледникового максимума. По результатам изменчивости ITS ядерной ДНК и двух хлоропластных маркеров (*petN-psbM*, *trnS-trnG*) крымские популяции *J. deltooides* также оказались в одной группе с популяциями этого вида из Малой Азии (Турции) [31].

Мы обнаружили сходную дифференциацию популяций *J. deltooids*, согласно которой популяция *J. deltooides* из Болгарии может относиться к балканской группе, а крымские и кавказские популяции этого вида, по-видимому, – к азиатской группе. Кроме того, наши результаты выявили дальнейшую дифференциацию азиатской группы, показав обособленность крымских популяций от материковых кавказских.

Дифференциация крымских популяций *J. deltooides* не только от болгарской популяции, но и от географически близких популяций этого вида из Краснодарского края, может определяться общим своеобразием флоры этого полуострова и сложной геологической историей Черноморской впадины, а также неоднократными трансгрессиями моря – появлением и исчезновением сухопутных мостов суши. Крымская флора имеет смешанные черты, так как в прошлом испытывала влияние флоры Балкан, Кавказа и Малой Азии [12, 32]. Это нашло свое отражение и в генетической структуре некоторых видов. Например для крымского бука *Fagus taurica* Popl. доказано гибридное происхождение от балканского *F. sylvatica* s. str и кавказского *F. orientalis* Lipsky [33].

Для других крымских древесных видов, наоборот, миграции из разных географических источников с последующей изоляцией могли

вызывать процессы генетической дифференциации. Например, по результатам анализа изменчивости хлоропластной ДНК, робуроидные дубы на полуострове делятся на две генетические группы: западную и восточную. При этом западная группа оказывается близка к группе дубов из Малой Азии, а восточная – к группе из закавказских гаплотипов [34]. Авторы делают предположения о разных путях колонизации дубов на полуострове.

Несмотря на то, что применение ITS и хлоропластных маркеров к многочисленным выборкам из восточной, западной и центральной частей Крыма не выявило дифференциации *J. deltooides* на полуострове [31], возможно это могли бы сделать микросателлитные маркеры.

Таким образом, данные, полученные в настоящей работе с использованием микросателлитных локусов, которые мы впервые применили к этому виду, подтверждают результаты других исследований, а также могут дать новую информацию, которая позволит сделать конкретные выводы о происхождении и расселении *J. deltooides* на северо-восточном краю ареала. Необходимы дальнейшие исследования с привлечением большего числа выборок из Крыма, Кавказа и Турции.

Работа выполнена в рамках государственного задания института экологии растений и животных УрО РАН № 122021000090-5.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farjon A., Filer D. An Atlas of the World's Conifers: an Analysis of Their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status. 2013. Brill, Leiden-Boston. 524 p.
2. Adams R.P. *Juniperus deltooides*, a new species, and nomenclatural notes on *Juniperus polycarpus* and *J. turcomanica* (Cupressaceae) // *Phytologia*. 2004. V. 86. P. 49–53.
3. Adams R.P., Morris J.A., Padney R.N., Schwarzbach A.E. Cryptic speciation between *Juniperus deltooides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean // *Biochem. System. and Ecology*. 2005. V. 33. P. 771–787. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.01.001>
4. Adams R.P. Morphological comparison and key to *Juniperus deltooides* and *J. oxycedrus* // *Phytologia*. 2014. V. 96. P. 58–62.
5. Roma-Marzio F., Najar B., Alessandri et al. Taxonomy of prickly juniper (*Juniperus oxycedrus* group): A phytochemical-morphometric combined approach at the contact zone of two cryptospecies // *Phytochemistry*. 2017. V. 141. P. 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.05.008>
6. Bennet K.D., Tzedakis P.C., Willis K.J. Quaternary refugia of north European trees // *J. Biogeogr.* 1991. V. 18. P. 103–115. <https://doi.org/10.2307/2845248>
7. Willis K., Rudner E., Sümege P. The full-glacial forests of Central and Southeastern Europe // *Quaternary Research*. 2000. V. 53. I. 2. P. 203–213. <https://doi.org/10.1006/qres.1999>
8. Klimko M., Boratynska K., Montserrat J.M. et al. Morphological variation of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean region // *Flora*. 2007. V. 202. P. 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2006.03.006>
9. Boratynski A., Wachowiak W., Dering M. et al. The biogeography and genetic relationships of *Juniperus oxycedrus* L. and related taxa from the Mediterranean and Macaronesian regions // *Bot. J. Linn. Soc.* 2014. V. 174. P. 637–653. <https://doi.org/10.1111/boj.12147>
10. Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы / Отв. ред. Ена А.В., Фатерыга А.В.. Симферополь: ООО “ИТ “АРИАЛ”, 2015. 480 с.
11. Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы 3-е изд. Краснодар: 2017. 850 с.
12. Ена А.В. Природная флора Крымского полуострова. Симферополь: Н. Орианда, 2012. 232 с.
13. Devey M.E., Bell J.S., Smith D.N., Neale D.B. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
14. Michalczyk I.M., Sebastiani I.F., Buonamici A. et al. Characterization of highly polymorphic nuclear microsatellite loci in *Juniperus communis* L. // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. P. 346–348. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01227.x>
15. Zhang Q., Yang Y.Z., Wu G.L. et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA primers in *Juniperus przewalskii* Kom (Cupressaceae) // *Conserv.* 2008. V. 9. P. 767–769. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9387-y>
16. Rumeu B., Sosa P.A., Nogales M., Gonzalez-Perez M.A. Development and characterization of 13 SSR markers for an endangered insular juniper (*Juniperus cedrus* Webb & Berth.) // *Conserv. Genet. Resources*. 2013. V. 5. P. 457–459. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9827-y>
17. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
18. Excoffier L., Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: A new series

- of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. P. 564–567.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
19. Raymond M., Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism // *J Hered.* 1995. V. 86. P. 248–249.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
  20. Brookfield J. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency // *Mol. Ecol.* 1996. V. 5. P. 453–455.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00098.x>
  21. Oosterhout C.V., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // *Mol. Ecol. Notes.* 2004. V. 4. P. 535–538.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
  22. Nei M., Tajima F., Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data // *J. Mol. Evol.* 1983. V. 19. P. 153–70.  
<https://doi.org/10.1007/BF02300753>
  23. Rohlf F.J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis systems // Exeter Software, Applied Biostatistics. New York: 1992. 225 p.
  24. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959.  
<https://doi.org/doi:10.1093/genetics/155.2.945>
  25. Earl D.A., von Holdt B.M. Structure harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conserv. Genet. Resour.* 2012. V. 4. P. 359–361.  
<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
  26. Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 2571–2581. doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x
  27. Mantel N.A. The detection of disease clustering and generalized regression approach // *Cancer. Res.* 1967. V.27. P. 209–220.
  28. Evren O., Kaya N. High genetic diversity within and low differentiation among *Juniperus excelsa* M. Bieb. populations: Molecular markers reveal their genetic structure patterns // *Turk. J. Bot.* 2021. V. 45. P. 192–202.  
<https://doi.org/10.3906/bot-2006-22>
  29. Хантемирова Е.В., Бессонова В.А. Генетическое разнообразие можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) в Евразии и на Аляске по данным анализа ядерных микросателлитов // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 3. С. 316–326. EDN: INZGJC  
<https://doi.org/10.31857/S0016675823030050>
  30. Ritland C., Pape T., Ritland K. Genetic structure of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) // *Can. J. Bot.* 2001. V. 79. P. 822–828.  
<https://doi.org/10.1139/b01-053>
  31. Lantushenko A.O., Korenkova O.O., Syrovets A.A. et al. Morphological and phylogenetic features of the Crimean population of *Juniperus deltoides* R.P. Adams // *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektcii.* 2023. V. 27(4). P. 306–315.  
<https://doi.org/10.18699/VJGB-23-37>
  32. Тахтаджян А.Л. Флористические области Земли. Л.: Наука, 1978. 247 с.
  33. Gömöry D., Paule L., Mačejovský V. Phylogeny of beech in western Eurasia as inferred by approximate Bayesian computation // *Acta Soc. Bot. Pol.* 2018. V. 87. I. 2.  
<https://doi.org/10.5586/asbp.3582>
  34. Semerikova S.A., Podergina S.M., Tashev A.N., Semerikov V.L. Phylogeography of Oaks in the Crimea Reveals Pleistocene Refugia and Migration Routes // *Russ. J. Ecology.* 2023. V. 54. № 3. P. 197–212.

## Differentiation of *Juniperus deltoides* R.P. Adams in the Crimean-Caucasian Region According to the Variability of Microsatellite DNA Markers

E. V. Hantemirova<sup>1</sup>, \*, Tz. Radoukova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Division of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144, Russia

<sup>2</sup>Department of Botany and Biological Education, University of Plovdiv “Paisii Hilendarski”, Plovdiv, 4000 Bulgaria.

\*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

The structure of genetic variability of the prickly juniper *Juniperus deltoides* R.P. Adams (family Cupressaceae), an important component of Mediterranean arid and semi-arid ecosystems was studied. We used for the first time 5 nuclear microsatellite loci developed for another juniper species *J. cedrus* Webb & Berthel. to genotype samples from 5 populations of *J. deltoides* located at the northeastern limit of the range in Eurasia (Western Crimea, Transcaucasia) and one Balkan population (Bulgaria). *J. deltoides* is characterized by an average level of genetic variability (*H<sub>e</sub>* varies from 0.428 to 0.602) with the lowest values in the Crimean populations. Phylogenetic analyses revealed three genetic groups: Western Crimea, Transcaucasia (Krasnodar Territory) and Bulgarian population. Application of AMOVA to these groups showed statistically significant differentiation (9.9% of total variability, *P* < 0.001). The first two groups correspond to the previously identified Asian group of *J. deltoides*, and the third group corresponds to the Balkan group. The differentiation of the Crimean populations from geographically close Caucasian populations is shown by us for the first time.

**Keywords:** *Juniperus deltoides*, nuclear DNA, simple sequence repeat (SSR), genetic diversity.