

Обзорная статья

УДК 575.857

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-1-224-241



Актуальные методы идентификации гибридов растений на примере ежевики

И. Ю. Журавлев¹, М. Т. Меньков¹, Е. Н. Маркова^{1,2}, Н. А. Добаркина^{1,2}, А. Я. Евлаш¹, Л. Ю. Шипилина^{1,2}, А. С. Розанов¹

¹ Научно-технологический университет «Сириус», Центр генетики и наук о жизни, Краснодарский край, Россия

² Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Лилия Юрьевна Шипилина, l.shipilina@vir.nw.ru

В статье приведен обзор последних достижений в области идентификации гибридов ежевики, включая успешные примеры использования молекулярных маркеров и ДНК-штрихкодирования для классификации сложных гибридных форм. Особое внимание уделено анализу эффективности методов в зависимости от целей исследования и доступности ресурсов.

Обзор показывает, что в будущем потребуется стандартизация методик и расширение баз данных генетических маркеров для повышения точности классификации гибридов ежевики.

Ключевые слова: *Rubus*, гибриды, молекулярные методы, штрихкодирование ДНК, секвенирование, генетические маркеры

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-16-20042 «Комплексное изучение природных и антропогенных экосистем федеральной территории «Сириус» и прилегающих областей» (<https://rscf.ru/project/24-16-20042/>).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Журавлев И.Ю., Меньков М.Т., Маркова Е.Н., Добаркина Н.А., Евлаш А.Я., Шипилина Л.Ю., Розанов А.С. Современные методы идентификации гибридов на примере ежевики. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2025;186(1):224-241. DOI: 10.30901/2227-8834-2025-1-224-241

SURVEYS

Review article

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-1-224-241

Current methods for identifying plant hybrids: a case study of blackberry

Igor Yu. Zhuravlev¹, Mikhail T. Menkov¹, Elena N. Markova^{1,2}, Nadezhda A. Dobarkina^{1,2}, Anastasia Ya. Evlash¹, Liliya Yu. Shipilina^{1,2}, Aleksey S. Rozanov¹

¹ Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, Krasnodar Territory, Russia

² N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Liliya Y. Shipilina, l.shipilina@vir.nw.ru

A review is presented on recent advancements in the identification of blackberry hybrids, including successful examples of using molecular markers and DNA barcoding for the classification of complex hybrid forms. Special attention is given to the comparative analysis of the effectiveness of such methods depending on the research objectives and resource availability. The review highlights the future need for standardizing methods and expanding genetic marker databases to improve the accuracy in the classification of blackberry hybrids.

Keywords: *Rubus*, hybrids, molecular methods, DNA barcoding, sequencing, genetic markers

Acknowledgements: this research was supported by the grant from the Russian Science Foundation, No. 24-16-20042 “Comprehensive study of natural and anthropogenic ecosystems of Sirius Federal Territory and adjacent areas” (<https://rscf.ru/project/24-16-20042/>).

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Zhuravlev I.Yu., Menkov M.T., Markova E.N., Dobarkina N.A., Evlash A.Ya., Shipilina L.Yu., Rozanov A.S. Current methods for hybrid plant identification: a case study of blackberry. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2025;186(1):224-241. DOI: 10.30901/2227-8834-2025-1-224-241

Введение

Полиплоидия является общей характеристикой сосудистых растений, и часть видов имеют полиплоидное происхождение (Adams, Wendel, 2005). Аллополиплоиды возникают в результате межвидовой гибридизации и удвоения негомологичных геномов, что также приводит к видообразованию. Гомоплоидная гибридизация также распространена у растений, однако остаются большие противоречия относительно того, как часто она приводит к видообразованию (Feliner et al., 2017). Процесс гибридизации между двумя видами может инициировать повышенную адаптивность образующегося гибрида (Meier et al., 2017). Гибридизация между близкородственными видами может создавать генотипы, позволяющие максимально приспосабливаться к условиям окружающей среды, что соответствует гипотезе сингамеона (Voecklen, 2017). Эти события часто происходят при вторичном контакте изолированных линий, а отбор способствует закреплению гибридов при колонизации новых экологических ниш. Совпадение с новыми условиями может ускорить адаптивное разделение гибридных популяций.

Таким образом, полиплоидизация, гибридизация и быстрое видообразование могут размывать границы между видами растений, делая их менее различимыми генетическими единицами. Штрихкодирование (DNA barcoding), основанное на характеристике одного или нескольких локусов ДНК, не всегда может отразить сетчатую эволюционную историю растений, особенно при сложной истории, связанной с вышеописанными событиями.

Морфологическая идентификация также затруднена фенотипической изменчивостью, вызванной различными условиями произрастания. Для решения этой проблемы ученые начали использовать молекулярные маркеры, в частности последовательности ДНК. ДНК-штрихкодирование – метод, основанный на коротких последовательностях ДНК, – стал наиболее распространенным подходом для идентификации видов (Hebert et al., 2003a). Хотя он оказался эффективным в случае применения его на животных (особенно последовательность COI для митохондриальной ДНК), стандартные ДНК-штрихкоды для растений, такие как ITS, rbcL, matK и trnH-psbA, не всегда дают удовлетворительные результаты для современных видов (Hollingsworth et al., 2016).

В 2024 г. коллектив авторов предпринял попытку охарактеризовать видовое разнообразие ежевики на Черноморском побережье, в предгорьях Кавказа между долинами рек Мзымта и Псоу, с использованием морфологических признаков. Значительная часть отобранных образцов растений представляла собой гибриды. В результате этого точное отнесение образца к тому или иному виду было затруднено.

Ежевика является важным компонентом экосистемы Черноморского побережья Кавказа и распространена повсеместно от прибрежных до предгорных районов. Ежевика формирует ниши, в которых находят кров и пищу многие виды животных и птиц. Точная идентификация и описание видов представляет собой как фундаментальную, так и прикладную задачу в биологии. Традиционные морфологические методы идентификации растений могут сталкиваться с рядом трудностей, обусловленных, например, отсутствием четких отличительных признаков между видами. Эти проблемы особенно характерны для полиплоидов.

В данной обзорной статье рассматриваются молекулярно-генетические подходы к идентификации гибридных видов ежевики.

Ежевика как представитель рода *Rubus*

Род *Rubus* L. представляет собой крупный и разнообразный таксон в подсемействе Rosoideae семейства Rosaceae (Розовые), включающий более 740 описанных видов по всему миру (Focke, 1911; Huang et al., 2023). Большинство видов рода *Rubus* обитают в регионах с умеренным климатом, но также встречаются в субтропических и субарктических зонах и могут произрастать до высоты 4500 м н. у. м. (Focke, 1911; Hummer, 1996). Важно отметить, что разные виды ежевики занимают схожие экологические ниши и часто взаимодействуют с другими видами через гибридизацию, что усложняет ее классификацию и расширяет ареал обитания (Hummer, 1996; Foster et al., 2019).

Род *Rubus* включает множество видов с широким ареалом и различными экологическими предпочтениями, среди которых ежевика занимает особое место благодаря своей экономической значимости и склонности к гибридизации.

До одомашнивания основным направлением использования представителей ежевики были лекарственные цели, наряду с употреблением в пищу ягод. Существуют записи об использовании корней, листьев, стеблей и плодов для лечения различных заболеваний (Dou et al., 2019). Плоды богаты вторичными метаболитами, такими как антоцианы и фенольные соединения, обладающие антиоксидантными свойствами (Martini et al., 2009). Ежевика содержит большое количество пищевых волокон, витамины С и К, а также марганец и ряд других микроэлементов (Lee et al., 2012).

Современные сорта ежевики выводятся для рынка свежих ягод и переработки (заморозка, сушка, консервирование), а также для частных садов. С 2007 г. крупнейшими регионами – производителями ежевики являются Европа и Северная Америка. За последние 17 лет отрасль производства ежевики претерпела быстрые изменения. Рост отрасли обусловлен увеличением потребительского спроса, появлением новых сортов, прогрессивными методами производства и круглогодичной доступностью продукции (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>).

Во флоре России имеется значительное разнообразие представителей ежевики (рис. 1). Генетически ежевики чрезвычайно пластичны и склонны к формированию гибридов. Ежевики могут скрещиваться как между собой, так и с другими представителями рода, в первую очередь с малиной. В потомстве гибридов очень часто образуются фертильные особи. Склонность к гибридизации сильно осложняет как видовую идентификацию, так и анализ разнообразия.

Исследователи подрода ежевик по-разному понимают объемы видов. Так, во флоре Восточной Европы (Krasovskaja, 2001) определено 18 видов с распространением по территории Кавказа, в частности западного Закавказья. В материалах, представленных во флоре Российского Причерноморья, имеются указания только о 7 видах (Zernov, 2013), а во «Флоре СССР» (Juzepczuk, 1941) отмечено 37 видов. Местом обитания ежевики являются территории Предкавказья, Западного и Северо-Западного Кавказа. Во флоре Республики Абхазии, как сопредельной к территории исследования, отмечается 6 видов (Kolakovskiy, 1985). Такое расхождение авторов в объеме ви-

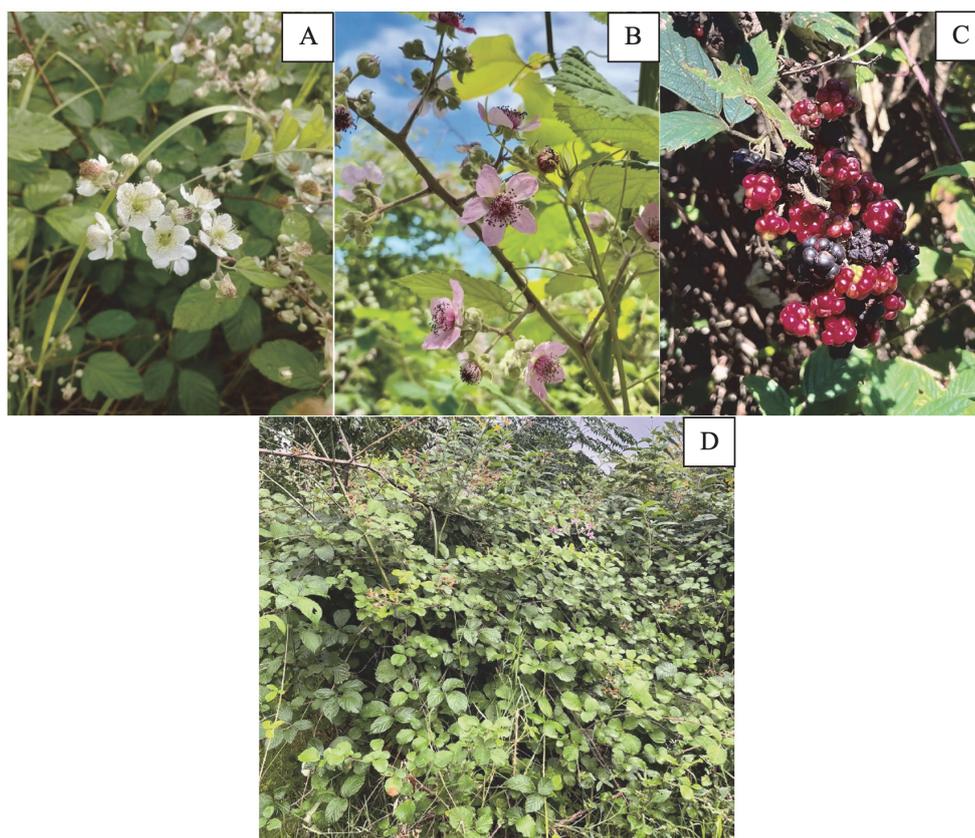


Рис. 1. Ежевика на федеральной территории «Сириус»: окраски цветка (А, В) и ягод ежевики (С); общий вид кустарника ежевики (D)

Fig. 1. Blackberry plants in Sirius Federal Territory: color variation in blackberry flowers (A and B) and fruits (C); general view of a blackberry bush (D)

дов на исследуемой территории еще раз подчеркивает необходимость их идентификации. Для точной видовой идентификации необходимо использовать молекулярно-генетические маркеры.

Молекулярно-генетические методы видовой идентификации

Генетический материал клетки представляет собой набор ядерных хромосом и ДНК органелл. Формирование каждой такой единицы на определенных этапах могло происходить индивидуально в ходе эволюции вида, сопровождаясь накоплением конкретных мутаций, которые могут быть идентифицированы молекулярно-генетическими методами. В идеальном варианте для таксономической характеристики образца или растения необходимо иметь маркер на каждый элемент генома. Такой уровень молекулярной идентификации гибридов в настоящее время затруднен (Tschen et al., 2014). Наиболее всеобъемлющий вариант анализа таксономической принадлежности последовательностей ДНК – это выявление SNP на всем протяжении генома. Для этого могут быть использованы GBS (Genotyping By Sequencing) и геномное секвенирование с малым покрытием. Однако такой подход требует значительных финансовых и временных затрат, которые не всегда оправданы при выполнении таксономического анализа. В связи с чем интересны альтернативные методы молекулярно-генетического штрихкодирования.

В последние годы молекулярно-генетические методы стали основными инструментами для изучения гене-

тического разнообразия и идентификации видов в области ботаники и сельского хозяйства. В контексте рода *Rubus*, включающего множество видов, среди которых распространены гибриды, эти методы представляют собой важные подходы для точной и надежной классификации. Молекулярные методы, такие как маркеры на основе ПЦР-анализа (и рестрикции), хлоропластное и ядерное штрихкодирование ДНК, секвенирование участков ДНК с полиморфными нуклеотидами (SNP), позволяют исследовать генетические вариации на различных уровнях, что значительно улучшает понимание эволюционных процессов и биологического разнообразия (табл. 1) (Mondini et al., 2009). Информация о полной геномной последовательности вида важна для структурирования знания о генетических последовательностях вида и выявления уникальных генетических признаков.

Широкое распространение методов ПЦР и гибридизации нуклеиновых кислот для таксономического анализа было обусловлено простотой методик и доступностью оборудования. С развитием технологических возможностей для секвенирования сначала первого, а потом второго поколений, эти методы стали менее востребованы, однако по-прежнему остаются достаточно актуальными.

Молекулярные маркеры для таксономического анализа и гибридизации на основе ПЦР

Молекулярный маркер соответствует гену или некодирующему участку генома, разные аллели которого отличаются на уровне последовательности ДНК. Такого рода полиморфизмы могут быть выявлены: (1) с помо-

Таблица 1. Молекулярно-генетические методы идентификации гибридов, рассмотренные в статье
Table 1. Genetic identification methods for hybrids described in the review

Метод идентификации	Описание
Молекулярные маркеры для таксономического анализа и гибридизации на основе ПЦР	
Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD)	Анализ включает в себя проведение ПЦР с использованием одного декануклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью
Микросателлиты (SSR)	Определение полиморфизма в коротких повторяющихся последовательностях ДНК
Межмикросателлитные последовательности (ISSR)	Праймер содержит последовательность микросателлита и один-два уникальных нуклеотида для корректной посадки праймера
Полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК (SSCP)	Анализ основан на изменении конформации однонитевой ДНК при наличии однонуклеотидного полиморфизма
Аmplифицированная область с известной нуклеотидной последовательностью (SCAR)	Аmplификация с праймерами, специфичными к определенной уникальной последовательности, ассоциированной с целевым признаком
Ретротранспозон-микросателлитные полиморфизмы (REMAP)	Аmplификация между праймером, специфичным к LTR-ретротранспозону, и праймером ISSR
Внутриретротранспозонные полиморфизмы (IRAP)	Аmplификация участков между ретротранспозонами (праймеры содержат в себе последовательности двух соседних ретротранспозонов)
Молекулярные маркеры для таксономического анализа и гибридизации на основе рестрикции и ПЦР	
Полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP)	Метод, позволяющий анализировать множество полиморфных участков по всему геному
Расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности (CAPS/dCAPS/dCAPS)	Выявление разных аллелей происходит при обработке ампликонов эндонуклеазой рестрикции
Методы ДНК-штрихкодирования	
Хлоропластное штрихкодирование	Использование специфических генов хлоропластов для идентификации видов
Ядерное штрихкодирование	Анализ ядерной ДНК с использованием специфических маркеров
Анализ SNP и геномное секвенирование	
Секвенирование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)	Анализ однонуклеотидных изменений в ДНК для идентификации видов и популяций
Полногеномное секвенирование	Метод, позволяющий детально сравнивать и анализировать геномы для выявления уникальных отличий

щью гибридизации с известными нуклеотидными последовательностями; (2) при секвенировании нуклеотидной последовательности; (3) с помощью сравнения длины ампликонов, полученных в ходе ПЦР; (4) в ходе рестрикционного анализа.

Молекулярные ДНК-маркеры обладают высокой частотой встречаемости в геноме и применяются благодаря универсальным и постоянно развивающимся методам анализа. Их использование стало востребованным в селекции, способствуя точной идентификации генетических признаков и ускоряя развитие селекционных программ (Khlestkina, 2013).

Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD)

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) – случайная амплифицированная полиморфная ДНК. В отличие от традиционного ПЦР-анализа, RAPD не требует каких-либо специфических знаний о последовательности ДНК целевого организма: идентичные 10-мерные праймеры с содержанием GC не менее 50% будут амплифицировать сегмент ДНК в зависимости от положений, которые комплементарны последовательности праймеров. Поэтому, если мутация произошла в матричной ДНК

на участке, который ранее был комплементарным праймеру, продукт ПЦР не будет получен, что приведет к другому набору амплифицированных сегментов ДНК на геле (Williams et al., 1990).

Основными преимуществами применения данного типа маркера являются небольшая стоимость, доступность оборудования и быстрый анализ. Однако у этого метода высокая чувствительность к условиям реакции, поэтому сравнивать можно только фрагменты в рамках одной ПЦР-реакции. Для повышения достоверности результатов необходимо использовать большое количество ПЦР-реакций с различными праймерами. Также почти все маркеры RAPD являются доминантными, то есть невозможно отличить, амплифицируется ли сегмент ДНК из локуса, который является гетерозиготным или гомозиготным. Кодоминантные маркеры RAPD, наблюдаемые как сегменты ДНК разного размера, амплифицируемые из одного и того же локуса, обнаруживаются лишь изредка (Atienzar, Jha, 2006).

Поскольку работа с RAPD-маркерами не требует знания нуклеотидных последовательностей, они стали одними из первых ПЦР-маркеров, которые использовали для анализа различных культур, включая малину и ежевику. Эти маркеры активно применяли для генотипирования и уточнения родословных селекционных сортов малины обыкновенной (Simla et al., 2018), малины западной (Weber, 2003) и ежевики (Stafne et al., 2003; Kagan et al., 2014), а также дикорастущих популяций *R. idaeus* L. (Graham et al., 1997).

В работе корейских исследователей RAPD-анализ с использованием 99 маркеров применили для уточнения происхождения местного сорта KCB (Korean Cultivated Bramble – ежевика, культивируемая в Корее) (Eu et al., 2008). Маркеры RAPD показали, что KCB образует отдельный субклад (подгруппа гаплогруппы), который отличается от субкладов других видов ежевик. Этот результат свидетельствует о том, что генетическая структура KCB существенно отличается от других видов ежевик. Среди исследованных видов ежевики ядерный геномный фон образцов KCB демонстрирует более близкое родство с *R. occidentalis* L., чем с *R. coreanus* Miq.

Многие исследователи подчеркивают, что метод RAPD-анализа не всегда дает стабильные и точные результаты, поэтому в настоящее время большее предпочтение отдается другим типам маркеров (Kamnev et al., 2020).

Полиморфизм коротких повторов (микросателлиты, SSR)

Микросателлиты (Simple Sequence Repeats) представляют собой короткие (2–6 п. о.) повторяющиеся последовательности ДНК, которые широко используются для исследования генетического разнообразия и видовой идентификации (Tautz, Renz, 1984). Микросателлиты обладают высокой степенью полиморфизма, что делает их особенно ценными для выявления генетических вариаций не только между близкородственными видами, но и между сортами (Matveeva et al., 2011).

SSR-маркеры имеют ряд преимуществ: они легко воспроизводимы, требуют небольших затрат и могут быть использованы для изучения разных популяций растений. В контексте гибридизации ежевики анализ микросателлитов предоставляет возможность не только идентифицировать гибридные формы, но и отслеживать генетические потоки между популяциями. К недостаткам

можно отнести необходимость наличия данных о нуклеотидных последовательностях генома для возможности подбора специфических праймеров (Matveeva et al., 2011).

Микросателлиты наследуются кодоминантно, что позволяет передавать аллели обоих родителей потомству. Они быстро мутируют из-за ошибок в репликации ДНК, что делает их полезными для идентификации особей и изучения родственных связей. Однако их эффективность снижается при работе с разными видами, поскольку изменчивость микросателлитов может быть ограничена в зависимости от объекта исследования и состава выборки.

В исследовании Дж. Грэма и соавторов была разработана система полиморфных кодоминантных микросателлитных маркеров для рода *Rubus*, в частности для малины обыкновенной (*R. idaeus*). Цель исследования заключалась в разработке инструмента для исследования генетического разнообразия между культурными и дикорастущими популяциями малины. Исследователи создали праймеры для последовательностей, фланкирующих микросателлиты, один из которых был с флуоресцентной меткой для эффективного анализа на ДНК-секвенаторе. В результате выделено 10 полиморфных локусов, полезных для исследования генетического разнообразия *Rubus* (Graham et al., 2002).

Еще одним из примеров разработки полиморфных микросателлитных маркеров в семействе Розовые является работа японских исследователей (Kimura et al., 2006). Авторы отмечают, что разработанные ими маркеры для культурной розы (*Rosa × hybrida*) показали высокий уровень полиморфизма и эффективность в генотипировании, что подтверждает значимость SSR-технологий для геномного анализа.

Межмикросателлитные последовательности (ISSR)

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) – межмикросателлитные последовательности, альтернатива RAPD. Этот метод основан на клонировании участков ДНК, ограниченных двумя микросателлитными повторами, в присутствии праймеров. Каждый праймер комплементарен последовательности определенного микросателлита (4–12 единиц повтора) и содержит на одном из концов так называемый «якорь» – последовательность из двух – четырех произвольных нуклеотидов. Эти праймеры позволяют копировать участки ДНК, находящиеся между двумя соседними микросателлитными последовательностями, что приводит к наработке значительного количества участков. Полученные паттерны продуктов ПЦР в большей степени уникальны для каждого вида и являются более надежными, чем RAPD-маркеры (Gurta M. et al., 1994).

ISSR-маркеры обладают высоким уровнем полиморфизма и могут использоваться для анализа относительно низкой генетической изменчивости популяций, поэтому они стали активно использоваться в качестве замены RAPD-маркеров. Однако в отличие от SSR-маркеров ISSR-маркеры являются доминантными, что означает, что их нельзя использовать для различения гетерозигот и создания детализированных генетических карт; кроме того, они менее воспроизводимы (Pradeep Reddy et al., 2002).

Выполненный при помощи ISSR-метода анализ образцов дикорастущей малины (*R. idaeus*) из 19 локаций

Черноморского побережья Турции, проведенный с использованием 15 ISSR-праймеров, показал, что данный метод эффективен для разработки специфичной системы идентификации генотипа (Sekic et al., 2018).

В 2009 г. В. В. Соболев и его коллеги провели исследование генотипов российских сортов малины: 15 ремонтантных (способных повторно цвести) и 12 неремонтантных, а также 5 образцов других видов рода *Rubus* (Sobolev et al., 2009). По итогам работы исследователи выдвинули гипотезу о том, что один из ISSR-маркеров, а именно K19 с (AC)8YA, может быть связан с генами, которые отвечают за признак ремонтантности (Sobolev et al., 2009).

В 2015 г. метод ISSR использовался для описания генетического разнообразия ежевики в Иране, включая прибрежный регион Каспийского моря. Исследовали 25 популяций *R. hyrcanus* Juz. из трех регионов страны и одну популяцию *R. discolor* Weihe & Nees. Анализ показал, что различия среди регионов составляют лишь 28,09% от общей вариации, а между популяциями внутри регионов – целых 66,03%. Авторы отмечают высокое генетическое разнообразие видов ежевики, особенно в центральном районе Ирана (Sedighi, Rahimmalek, 2015).

Примером выявления генетического разнообразия и оценки филогенетических связей в семействе методом ISSR является работа авторов из Турции (Sevindik et al., 2023). Для работы с семью генотипами груши (*Pyrus communis* L.) методами RAPD и ISSR они использовали в том числе последовательности хлоропластной ДНК (*trnL* intron и *trnL*-F). Результаты исследования выявили высокий уровень полиморфизма (78,94% в RAPD и 85,71% в ISSR), который подтвердил генетическое разнообразие внутри изученных генотипов и прояснил их филогенетическое положение относительно других видов семейства из родов *Alchemilla*, *Rosa*, *Sorbus*, *Malus*, *Prunus* и *Cotoneaster*. Данная работа подтвердила актуальность использования метода ISSR для таксономического анализа.

Полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК (SSCP)

SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК. Принцип SSCP-анализа заключается в изменении формы одноцепочечной ДНК, когда происходит замена одного нуклеотида (возникает однонуклеотидный полиморфизм). Это изменение формы, в свою очередь, влияет на подвижность продукта ПЦР в полиакриламидном геле, что позволяет определять исходный генотип по результатам амплификации (Hayashi, Yandell, 1993).

В исследовании корейских ученых изучался сорт КСВ (корейская культурная ежевика) для уточнения его происхождения от *Rubus coreanus* или *R. occidentalis*. По результатам SSCP-анализа трех межгенных спейсеров плазмидной ДНК (*atpB*~*rbcL*, *trnT*~*trnL* и *trnL*~*trnF*) определили, что сорт КСВ с большей вероятностью происходит от *R. occidentalis*, чем от *R. coreanus* (Eu et al., 2008).

В 2017 г. китайские ученые оптимизировали метод PCR-SSCP для анализа образцов боярышника (*Crataegus* spp.) из семейства Розовые (Sa, Na, 2017). Исследователи использовали модифицированную методику экстракции тотальной ДНК с помощью метода СТАВ и протестировали восемь пар праймеров для проведения ПЦР. Из них пять пар (*psbA*-*trnH*, *groB*, *groC1* для хлоропластной ДНК

и один ITS2 для ядерной ДНК) оказались высокоэффективными для метода PCR-SSCP. Оптимизированные условия выполнения гель-электрофореза (6-процентный полиакриламидный гель, буфер 0.5×TBE, 200 V, 4°C в течение 3–4 часов в сочетании с денатурацией ПЦР-продуктов при 98°C в течение 15 минут с использованием буфера, содержащего 1% NaOH) позволили получить качественные SSCP-электрофореграммы. Данные модификации значительно упростили молекулярно-генетический анализ представителей рода *Crataegus*, что может стать основой для дальнейшего применения SSCP-маркеров.

Аmplифицированная область с известной нуклеотидной последовательностью (SCAR)

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) – амплифицированная область с известной нуклеотидной последовательностью. Метод основан на использовании двух специфических праймеров, сконструированных на основе нуклеотидной последовательности, установленной в клонированном фрагменте RAPD, связанном с интересующим признаком. Специфические праймеры для амплификации к последовательности SCAR могут быть расположены в любом подходящем положении внутри или по бокам уникального ампликона RAPD и могут использоваться для идентификации генетического разнообразия в популяции. Из преимуществ: метод является быстрым, надежным, не чувствителен к условиям реакции и прост в проведении в любой лаборатории. Метод SCAR позволяет быстро разрабатывать маркеры, даже несмотря на то что они не являются высокополиморфными. Их можно использовать в качестве анализа аллель-специфических ассоциированных праймеров (ASAP) для обнаружения продукта, например для идентификации подвидов растений (Korekar et al., 2012). Маркеры SCAR действуют как доминантные, так и как кодоминантные.

В зависимости от уровня специфичности SCAR-маркеры применяются для определения аллелей генов, выявления определенных хромосом, построения генетических карт и обнаружения генетического материала конкретных видов. Так, SCAR-маркеры, разработанные на основе специфических RAPD-фрагментов *Rubus caesius* L. (ежевика сизая), позволили установить, что в коммерческих образцах ладанника *Cistus incanus* L. содержится от 0 до 2% примесей растительного материала ежевики (Marieschi et al., 2010). В рамках селективной программы канадской провинции Квебек с использованием SCAR-маркеров проведена идентификация разновидностей малины обыкновенной и малины фиолетовой (гибрид *Rubus idaeus* и *R. occidentalis*) (Parent, Page, 1998).

Метод SCAR (наряду с SNP) показал высокую практическую значимость для идентификации видов *R. coreanus*, *R. crataegifolius* и *R. chingii* в сырье Rubi Fructus (Yang et al., 2012). Rubi Fructus – это традиционное лекарственное сырье народной медицины Азии, представляющее собой незрелые плоды растений рода *Rubus*: в Корее это обычно *R. coreanus*, известный как Bokbunja (бокбунжа), а в Китае – *R. chingii*. Разработанные авторами SCAR-маркеры для последовательностей ядерной и хлоропластной ДНК позволили отличить каждый из трех вариантов происхождения плодов бокбунджи, а филогенетический анализ межгенных последовательностей *trnL*-F показал, что наиболее распространенными в Корее являются плоды *R. crataegifolius*.

Ретротранспозон-микросателлитные полиморфизмы (REMAP) и внутриретротранспозонные полиморфизмы (IRAP)

REMAP (Retrotransposone Microsatellite Amplified Polymorphism) – амплификация между праймером, специфичным к LTR-ретротранспозону, и праймером ISSR.

IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами.

Среди маркеров ДНК ретроэлементы и их производные являются повсеместными и широко распространенными в геномах растений. Полиморфизм, амплифицированный между ретротранспозонами (IRAP), и полиморфизм, амплифицированный между ретротранспозонами и микросателлитами (REMAP), успешно использовались в анализе генома дикого ячменя *Hordeum spontaneum* K. Koch и генетического разнообразия спартины *Spartina maritima* (Curtis) Fernald (Kalendar et al., 2000; Yannic et al., 2004). Метод IRAP выполняется на основе ПЦР-амплификации фрагментов геномной ДНК, которые расположены между двумя сайтами вставки ретротранспозона, в то время как REMAP производится на основе амплификации фрагментов между сайтом вставки ретротранспозона и сайтом микросателлита. С помощью IRAP и REMAP изучают популяции (Santana et al., 2012), различают виды или генотипы и анализируют генетическое разнообразие (Chadha, Gopalakrishna, 2005). Хотя данные типы маркеров использовались для различных видов растений, на данный момент нет опубликованных работ, где такую методику применяли для характеристики представителей рода *Rubus*.

С помощью методов IRAP и REMAP иранским ученым удалось исследовать генетическое разнообразие 25 генотипов яблони из семейства Розовые (Shahreki et al., 2022). В работе использовались 14 праймеров IRAP и REMAP. Анализ показал высокий уровень полиморфизма генетических локусов (в среднем 39,79%). Авторы отмечают, что последующий кластерный анализ позволил сгруппировать генотипы по географическому происхождению и морфологическим признакам и классифицировать районы произрастания яблони по количеству мобильных генетических элементов в геноме образцов.

Молекулярные методы с использованием маркеров на основе ПЦР и рестрикционного анализа Селективная амплификация продуктов рестрикции (AFLP)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – это молекулярно-генетический метод, который позволяет анализировать полиморфизм ДНК на уровне всего генома без необходимости предварительного знания его последовательности (Vos et al., 1995; Mueller, Wolfenbarger, 1999). Метод основан на амплификации фрагментов геномной ДНК, которые были предварительно расщеплены эндонуклеазами рестрикции (ферментами, разрезающими ДНК в определенных местах) и соединены с адаптерами, что делает AFLP особенно универсальным для исследования генетической изменчивости (Vos et al., 1995).

Метод AFLP включает несколько ключевых этапов: геномная ДНК расщепляется на фрагменты с помощью специфических эндонуклеаз рестрикции. Далее к концам полученных фрагментов присоединяются адаптеры – короткие синтетические последовательности. Затем опре-

деленные фрагменты амплифицируются методом ПЦР с использованием праймеров, комплементарных адаптерам и участкам около мест рестрикции. На заключительном этапе амплифицированные фрагменты разделяются по длине посредством гель-электрофореза или капиллярного электрофореза, что позволяет визуализировать полиморфизм (Vos et al., 1995; Mueller, Wolfenbarger, 1999).

Метод AFLP обладает высокой разрешающей способностью, которая позволяет анализировать многочисленные полиморфные участки по всему геному. Универсальность метода заключается в его применении к любым видам растений без необходимости предварительных данных о геномных последовательностях (Althoff et al., 2007).

Основным недостатком метода AFLP является сложность идентификации гомологичных маркеров (аллелей), что снижает его полезность для исследований, требующих точного определения аллельных состояний, например анализа гетерозиготности. Тем не менее, благодаря возможности быстрой генерации надежных маркеров с высоким разрешением, AFLP остается мощным инструментом для экологов и эволюционных биологов (Mueller, Wolfenbarger, 1999; Miyashita et al., 2015).

Метод AFLP наряду с SSR стал ключевым в исследовании, проведенном в районе Центральных Анд в Колумбии (Marulanda et al., 2007). В работе изучалась генетическая изменчивость диких и культивируемых видов рода *Rubus*. Авторы проанализировали 51 образец различных видов, включая *R. glaucus* Benth. (Андийская ежевика), *R. urticifolius* Poir. и *R. robustus* C. Presl. Результаты показали высокую степень полиморфизма (91,6% для AFLP), что указывает на значительное генетическое разнообразие среди популяций ежевики. В исследовании подчеркивается важность маркеров AFLP и SSR для выявления генетической изменчивости, поддержки усилий по сохранению и улучшению видов ежевики в коммерческих и селекционных целях (Marulanda et al., 2007).

В 2015 г. японские исследователи провели работу по оценке филогенетических взаимосвязей между дикими и культивируемыми видами ежевики, собранными в Японии (Miyashita et al., 2015). Для анализа использовали метод AFLP для 81 образца. В результате филогенетического анализа подроды *Anoplobatus*, *Eubatus*, *Idaeobatus* и *Malachobatus* были сгруппированы в отдельные кластеры. Особую значимость получили образцы *Rubus idaeus* var. *aculeatissimus* C.A. Mey, собранные в четырех регионах Хоккайдо, которые образовали отдельные кластеры в соответствии с географическим происхождением. Гибридные образцы, полученные от скрещивания *R. idaeus* и *R. idaeus* var. *aculeatissimus*, а также гибриды между малиной обыкновенной и *R. spectabilis* Pursh четко отличались от родительских форм, имея уникальную генетическую структуру. Результаты исследования продемонстрировали высокую эффективность AFLP-маркеров для оценки генетического разнообразия и изучения филогенетических связей у ежевики (Miyashita et al., 2015).

Расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности (CAPS/dCAPS/dCAPS)

CAPS/dCAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности. Маркеры CAPS обнаруживают полиморфизмы, возникающие в сайтах рестрикции.

В случае dCAPS-маркеров сайты рестрикции создаются во время амплификации ПЦР путем введения сайта рестрикции в сайт SNP с использованием специфических праймеров. SNP также можно обнаружить с помощью аллель-специфичных праймеров для ПЦР, соответствующих месту расположения SNP (Ugozzoli, Wallace, 1991). CAPS-метод можно рассматривать как синтез методов ПЦР и RFLP. Его особенность заключается в том, что вместо амплификации всего генома проводится ПЦР-амплификация небольшого участка ДНК. К преимуществам этого метода можно отнести: кодоминантный тип наследования; простоту в использовании; высокую эффективность CAPS-маркеров в молекулярной селекции растений, независимо от семейства изучаемых объектов. Однако есть и некоторые недостатки: CAPS-маркеры менее полиморфны по сравнению с микросателлитными.

В процессе селекции особое внимание уделялось разработке маркеров гена *Bu* (*Bushy dwarf virus resistance gene*), который отвечает за устойчивость растений к вирусу кустистой карликовости малины (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV). Этот опасный патоген наносит значительный экономический ущерб сельскому хозяйству. В 2012 г. Дж. Вард и его коллеги (Ward et al., 2012) применили метод сегрегационного масс-анализа с использованием RAPD-маркеров для поиска маркеров, специфичных для устойчивых генотипов. Ученые секвенировали фрагменты данных генотипов, таких как BC002-900, BC296-425 и BC615-600. На основе этих последовательностей были созданы CAPS-маркеры, из которых наибольшую связь с устойчивостью показал маркер BC615_553_Alu I. В дальнейшем последовательность этого маркера выровняли по референсному геному земляники, и один из генов-кандидатов оказался гомологичным по последовательности *N*-гена табака, который контролирует устойчивость к вирусу табачной мозаики. Авторами предложен внутригенный маркер *gasN_gene_1202*, который ассоциирован с устойчивостью к RBDV. Эффективность этого маркера (96,7% случаев) подтвердилась при анализе расширенной группы селективных сортов. Маркер выявили у устойчивых разновидностей, таких как Нутка, Хайда, Уилламетт, WSU 78117-1, Ньюбург, Коуичан, Чилкотин, Malling Promise и Latham.

В то же время у поражаемых генотипов RBDV данный маркер обнаружен не был (Ward et al., 2012).

Методы ДНК-штрихкодирования

Концепция применения ДНК-штрихкодов для идентификации видов была впервые предложена П. Хебертом и др. в 2003 г. (Hebert et al., 2003a). ДНК-штрихкоды представляют собой стандартизированные последовательности ДНК, длиной от 400 до 800 пар оснований (п. о.), которые используются для идентификации/классификации группы организмов после амплификации, секвенирования и сравнения с референсной базой данных, содержащей соответствующие последовательности (Hebert et al., 2003b).

Рисунок 2 демонстрирует процесс идентификации видов растений с помощью ДНК-штрихкодирования. Этапы включают: сбор образцов, экстракцию ДНК, амплификацию с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенирование полученных фрагментов и анализ данных. Полученные результаты позволяют построить филогенетическое дерево для определения эволюционных связей между видами и провести идентификацию исследуемых образцов. Заключительным этапом является создание библиотеки ДНК-штрихкодов для дальнейшего использования в ботанических и экологических исследованиях (Janzen et al., 2009; De Vere et al., 2015).

ДНК-штрихкодирование стало чрезвычайно широко используемой технологией в идентификации видов на основе молекулярных маркеров благодаря своей стандартизации, минимизации и масштабируемости. Текущие методы, производные от ДНК-штрихкодов, включают однолокусное, многолокусное штрихкодирование, мини-штрихкодирование, супер-штрихкодирование и мета-штрихкодирование (Zhu et al., 2022). За последние два десятилетия были предложены основные стандартные однолокусные штрихкоды: ITS, ITS2, matK, rbcL, psbA-trnH, trnL-trnF, trnG-trnS, с помощью которых различают виды растений. В таблице 2 приведены некоторые переменные участки хлоропластной и ядерной ДНК, а также последовательности праймеров для их амплификации.

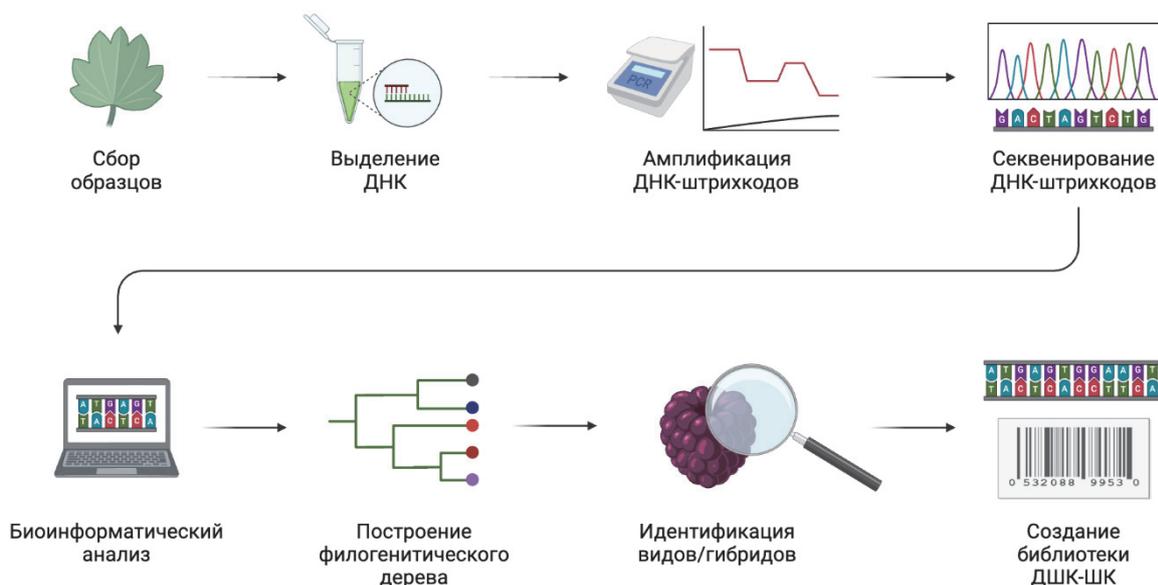


Рис. 2. Общая схема ДНК-штрихкодирования растений (рисунок создан на платформе BioRender)

Fig. 2. General DNA barcoding scheme for plants (the image was produced on the BioRender platform)

Таблица 2. Описание некоторых маркеров для ДНК-штрихкодирования растений

Table 2. Description of some markers for DNA barcoding in plants

Маркер	Полная расшифровка	Описание	Последовательности праймеров 5'-3'; длина ампликона, п. о.
ITS	Internal Transcribed Spacer (внутренний транскрибируемый спейсер)	Участок между рРНК-генами в ядерной ДНК. Высокая изменчивость делает его эффективным для видовой дифференциации (Kuyndt et al., 2005)	F: TCCGTAGGTGAACCTGCCG R: TCCTCCGCTTATTGATATGC; ≈ 715 п. о.
ITS2	Internal Transcribed Spacer 2 (второй внутренний транскрибируемый спейсер)	Второй внутренний спейсер, более короткий и консервативный, чем полный ITS. Обеспечивает высокую точность в различении близкородственных видов (Sochor et al., 2015)	
matK	Maturase K (матураза К)	Ген, кодирующий матуразу в хлоропластной ДНК. Демонстрирует высокую изменчивость среди видов (Li et al., 2016)	F: CGCCCAAGTGGAAGTCTAGT R: TCTTTCAAGCATACGACGGA; ≈ 184 п. о.
rbcl	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (ген большой субъединицы рибулозобисфаткарбоксилазы)	Ген, кодирующий большую субъединицу фермента рубиско в хлоропластной ДНК. Высокая консервативность (Uh, Jang, 2023)	F: ATGTCACCACAAACAGAAAC R: TCGCATGTACCTGCAGTAGC; ≈ 700 п. о.
psbA-trnH	Photosystem II protein D1 (psbA) –Histidine transfer RNA (<i>trnH</i>) (белок фотосистемы II D1 – транспортная РНК гистидина)	Межгенный спейсер в хлоропластной ДНК между генами <i>psbA</i> и <i>trnH</i> . Обладает высокой изменчивостью (Wang M. et al., 2013)	F: TGTA AAAACGACGCGCCAGTGTATGCAT GAACGTAATGCTC R: CAGGAAACAGCTATGACGCGCATGGTG GATTCACAATCC; ≈ 450 п. о.
trnL- trnF	Leucine transfer RNA (<i>trnL</i>) – Phenylalanine transfer RNA (<i>trnF</i>) (транспортная РНК лейцина – транспортная РНК фенилаланина)	Межгенный спейсер в хлоропластной ДНК (между генами <i>trnL</i> и <i>trnF</i>) (Yang, Pak, 2006)	F: AGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC R: GATTTGAAGTGGTGACACGAGG; ≈ 450 п. о.
trnG-trnS	Glycine transfer RNA (<i>trnG</i>) – Serine transfer RNA (<i>trnS</i>) (транспортная РНК глицина – транспортная РНК серина)	Межгенный спейсер в хлоропластной ДНК между генами <i>trnG</i> и <i>trnS</i> , используемый для штрихкодирования растений (Wang Y. et al., 2016)	F: GAACGAATCACACTTTTACCAC R: GCCGCTTTAGTCCACTCAGC ≈ 700 п. о.

В ходе практического применения ДНК-штрихкодирования выяснилось, что одного штрихкода (ДНК-ШК) недостаточно для таксономического разделения всех видов растений. Это привело к необходимости использования многолокусных ДНК-ШК. Рабочая группа Консорциума по штрихкодированию живого мира (CBOL, Consortium for the Barcode of Life), созданная в 2004 г., предложила комбинацию из локусов генов *matK* и *rbcl* для повышения точности разделения видов растений (Teechen et al., 2014).

Международный проект «Штрихкодирование жизни» направлен на стандартизацию и координацию исследований для создания глобальной базы ДНК-штрихкодов всех видов на планете. Основная цель программы – унификация подходов к идентификации видов через секвенирование определенных участков их геномов, что позволит создавать единый стандарт для классификации биологического разнообразия. Основные требования к эталонному участку ДНК-ШК: 1) **компактный размер:** длина выбранного участка должна составлять от 500 до

600–800 п. о.; 2) **стабильность внутри вида и различимость между видами**: последовательность нуклеотидов у особей одного вида должна быть одинаковой, в то время как между видами должны наблюдаться значительные различия; 3) **чтение в обоих направлениях**: для предотвращения ошибок последовательность должна быть прочитана с двух цепей ДНК; 4) **известность праймеров**: последовательности прямого и обратного праймеров должны быть определены; 5) **минимизация полиморфизма**: полиморфизм в последовательности, то есть различия между особями одного и того же вида не должны превышать 1% во избежание путаницы в идентификации (Matveeva et al., 2011).

Метод ДНК-штрихкодирования оказался достаточно востребованным, что привело к разработке модификаций, которые адаптировали его для разных задач. Мини-штрихкодирование позволяет определять виды на основе сильно деградированной ДНК, например из готовых пищевых продуктов. Этот метод эффективен в ситуациях, когда стандартные методы ДНК-штрихкодирования не могут быть применены из-за особенностей материала. Длина анализируемого фрагмента обычно составляет 100–300 п. о. (Gao et al., 2019). Мета-штрихкодирование эффективно для анализа смесей, содержащих различные виды, позволяя одновременно идентифицировать их по коротким фрагментам ДНК (De Boer et al., 2015). Этот метод особенно полезен для экологических исследований, пищевых продуктов и изучения сложных биоценозов, где присутствуют смешанные сообщества. Супер- или ультра-штрихкодирование, основанное на секвенировании генома хлоропластов растений, применяется для изучения родственных связей между видами (Kane, Cronk, 2008). При этом секвенируется и собирается полный геном органеллы, который, в отличие от ядерного генома, обладает меньшими размерами, большей межвидовой дивергенцией и меньшей внутривидовой изменчивостью.

Видовая идентификация ежевики с помощью штрихкодирования используется для точной диагностики в случаях, когда фенотипическая дифференциация невозможна. По данным онлайн-платформы для хранения и анализа данных ДНК-штрихкодирования Boldsystems (Barcode of Life Data Systems), существует 382 записи о растениях рода *Rubus*, включая ежевику вязолистную (*R. ulmifolius* Schott) с 38 записями, аллегейскую (*R. allegheniensis* Porter) – 22 записи, ежевику сизую (*R. caesius*) – 21 запись и *R. argutus* Link – 3 записи (<https://boldsystems.org/>).

ДНК-штрихкодирование находит широкое практическое применение в различных областях, включая кон-

троль качества пищевых продуктов, идентификацию видов, борьбу с фальсификацией, а также мониторинг биоразнообразия и защиту редких или исчезающих видов. Так, в 2018 г. китайские ученые провели исследование, посвященное проблеме аутентичности продуктов из ягод, которые нередко фальсифицируются и имеют состав, несоответствующий указанному. Для решения этой проблемы и разработки надежного метода идентификации как известных, так и неизвестных видов фруктов была использована технология ДНК-штрихкодирования на основе секвенирования по Сэнгеру. Чтобы уменьшить влияние условий обработки на извлечение ДНК, применялись мини-штрихкоды для гена *rbcL* и ITS, а также средний штрихкод для участка *psbA-trnH*. Разработанный метод позволил выявлять целевые виды в концентрациях от 1% до 10% в составе смешанных фруктовых соков (Wu et al., 2018).

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) – это изменения одного нуклеотида в ДНК, служащие маркерами для идентификации видов, гибридов и внутривидовой изменчивости (Gupta P. et al., 2001; Batley, Edwards, 2007). Замены нуклеотидов могут быть наследуемыми и влиять на различные биологические характеристики, включая устойчивость растений к стрессам (Jehan, Lakhanpaul, 2006). Благодаря высокой частоте SNP в геноме они позволяют детально анализировать генетическое разнообразие и структуры популяций даже в сложных гибридных комплексах (Gupta P. et al., 2001).

Для анализа однонуклеотидных полиморфизмов применяются два основных метода: генотипирование по типу GBS (Genotyping By Sequencing) и секвенирование с малым покрытием (Low-Coverage Sequencing) (табл. 3).

GBS сочетает в себе обработку ДНК эндонуклеазами рестрикции и секвенирование, позволяя выявлять тысячи однонуклеотидных полиморфизмов в разных геномах одновременно (Elshire et al., 2011). Метод GBS не требует эталонного генома для обнаружения SNP, объединяя в себе процесс выявления маркеров и генотипирование (Poland, Rife, 2012).

GBS включает несколько ключевых этапов: извлечение ДНК и ее гидролиз эндонуклеазами рестрикции, присоединение адаптеров к фрагментам ДНК, амплификацию, создание библиотеки, секвенирование методами NGS, а также биоинформатическую обработку для выявления SNP и оценки генетического разнообразия (рис. 3) (He et al., 2014).

Таблица 3. Сравнение методов GBS и секвенирования с малым покрытием

Table 3. Comparison between the genotyping-by-sequencing (GBS) and low-coverage sequencing methods

Характеристика	GBS	Секвенирование с малым покрытием
Принцип работы	Рестрикция ДНК, выборка фрагментов	Секвенирование всего генома с малой глубиной
Покрытие генома	Частичное	Широкое, но с низкой глубиной покрытия
Точность	Зависит от выбранных фрагментов	Меньшая точность для редких вариантов
Экономичность	Дешевле, не требует знания генома	Дороже GBS, но дешевле полногеномного секвенирования
Применение	Применяется для популяционных исследований	Используется для обнаружения редких SNP

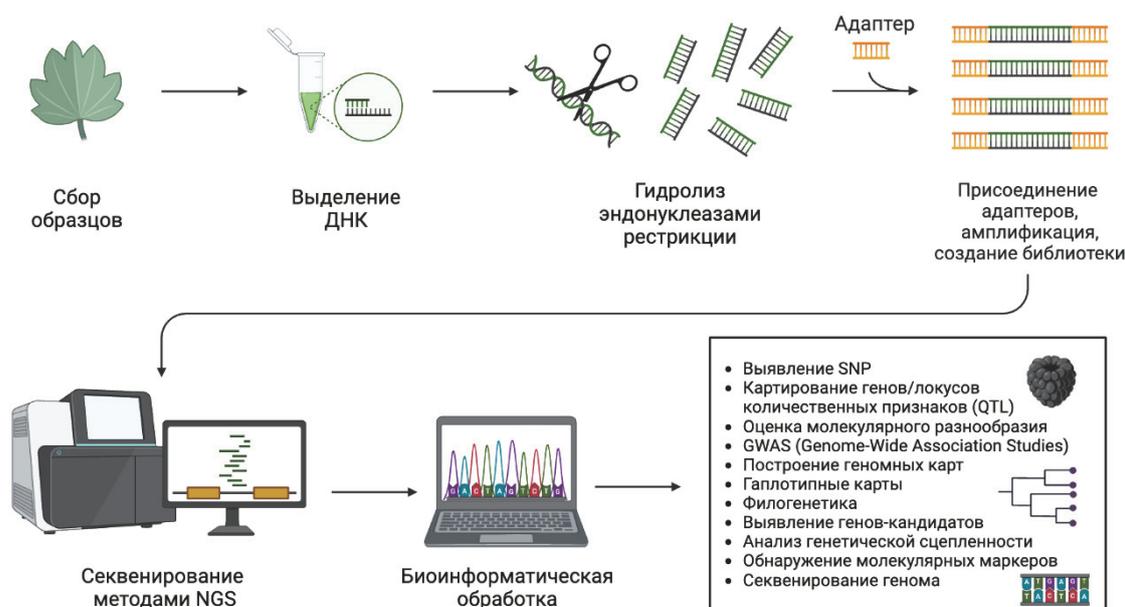


Рис. 3. Последовательность этапов процесса генотипирования GBS (рисунок создан на платформе BioRender)

Fig. 3. Steps in the genotyping-by-sequencing (GBS) process (the image was produced on the BioRender platform)

Метод GBS стал популярным благодаря своей относительной дешевизне для исследований связи генотипа с фенотипом (так как требуется меньшее покрытие генома и используются специфические маркеры) и простоте в использовании (Peterson et al., 2014; Tripodi, 2023). Хотя этот метод экономичен, он часто приводит к большому количеству пропущенных данных и требует сложного биоинформатического анализа. GBS наиболее часто используется для изучения геномов культурных растений в рамках селекционных программ, однако его эффективность может значительно варьировать в зависимости от организма и его уровня пloidности (Poland, Rife, 2012; Peterson et al., 2014).

Несмотря на многообещающий потенциал, метод GBS пока не получил широкого распространения для анализа генетического разнообразия растений – в первую очередь, ввиду высокой стоимости метода для решения задач, связанных с таксономией и скринингом гибридов, поскольку требуется более полное покрытие генома и точный анализ больших объемов данных для сравнения близкородственных видов и форм (Peterson et al., 2014). В настоящее время разработаны усовершенствованные протоколы для увеличения охвата генома и предложены новые биоинформационные конвейеры для выявления SNP и генотипирования, а также методы расчета недостающих данных (Tripodi, 2023). Большинство существующих подходов GBS разработаны на основе модельных растений, геномы которых уже секвенированы, тогда как анализ генетического разнообразия чаще применяется к немодельным видам (Frenzke et al., 2024). Несмотря на то что GBS концептуально прост, его практическое применение требует наличия у исследователей как молекулярно-биологических, так и биоинформатических навыков.

Секвенирование с малым покрытием – это подход, при котором геном каждого образца секвенируется с относительно низкой глубиной (количеством прочтений на каждую базу ДНК). Этот метод позволяет получить достаточно данных для выявления SNP при меньших за-

тратах, чем при полногеномном секвенировании с высоким покрытием (Lou et al., 2021).

Секвенирование с малым покрытием имеет ряд преимуществ и недостатков. Среди его преимуществ – экономичность (в сравнении с полногеномным секвенированием), что делает его подходящим для изучения больших популяций (Buerkle, Gompert, 2013). Кроме того, метод обеспечивает широкое покрытие генома, позволяя выявлять редкие SNP и генетические вариации. Недостатками метода являются меньшая точность, связанная с низкой глубиной покрытия, что может привести к ошибкам в выявлении SNP, особенно редких аллелей, а также необходимость в анализе большого количества образцов для получения статистически значимых результатов.

В основном GBS и секвенирование с малым покрытием используются как в селекционных программах, так и для анализа генетического разнообразия популяций растений. Так, в 2018 г. корейские ученые провели исследование, направленное на анализ генетического разнообразия мутантных генотипов рода *Rubus*, созданных с помощью гамма-облучения. В работе использовались SNP-маркеры, полученные методом генотипирования по типу GBS. Были секвенированы 14 генотипов, включая мутантные линии сорта 'Boysenberry' (гибрид малины, ежевики и логановой ягоды; сорт назван по фамилии фермера Рудольфа Бойзена) и ежевики, с применением Illumina HiSeq2000. В результате выявлено 19 634 SNP, из которых 11 328 были гомозиготными, а 8306 – гетерозиготными. Для филогенетического анализа использовались 1504 SNP, что позволило обнаружить различия между генотипами по их происхождению (Ryu et al., 2018).

В 2024 г. Чжоу Цзывэй и коллеги провели исследование, направленное на оценку генетического разнообразия и структуры популяций малины китайской (*R. chingii* Hu) в провинциях Цзянси и Фуцзянь (Zhou et al., 2024). Для анализа использовались маркеры однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), полученные с помощью метода Hupre-seq. В результате выявили 130 3850 SNP

и 433 159 вставок/делеций (InDels). Низкие значения наблюдаемой гетерозиготности, нуклеотидного разнообразия (Pi) и фиксированных индексов (Fis) указывают на низкое генетическое разнообразие внутри популяций. Анализ молекулярной вариации (AMOVA) показал, что 37,4% изменений было связано с различиями между популяциями, а 62,6% – с вариациями внутри образцов.

Таким образом, SNP-анализ предоставляет обширные возможности для идентификации гибридных форм *Rubus* и изучения генетической изменчивости. Однако, несмотря на свои преимущества, этот метод нечасто используется в таксономическом анализе растительных популяций. Это связано с тем, что объем данных, получаемых в ходе анализа, может быть избыточным для описания видового разнообразия отдельных растений или популяций, а обработка требует квалифицированных навыков в биоинформатике, что увеличивает затраты и сложность исследования. Кроме того, как GBS, так и секвенирование с малым покрытием остаются финансово затратными методами, что ограничивает их перспективность в таксономическом анализе на уровне видового разнообразия и гибридизации.

Полногеномное секвенирование представителей рода *Rubus*

Несомненно, важным аспектом для выполнения работ по таксономическому анализу является наличие баз данных, содержащих информацию о генетических последовательностях, в том числе полногеномных.

Наличие информации о последовательностях генома растения позволяет существенно упростить и систематизировать работу. Впервые в роде *Rubus* был секвенирован геном малины черной (*R. occidentalis*) в 2016 г. (VanBuren et al., 2016). Размер генома составил 243 Мб, при этом было предсказано 28 005 генов, кодирующих белки. Также идентифицированы 290 генов копий, ассоциированных с метаболизмом сахара, развития плодов и биосинтезом антоцианов. Этот геном долгое время служил базальтернативным справочным материалом для плодовых культур семейства Розовые и рода *Rubus* (малины, ежевики и их гибридов) (VanBuren et al., 2016). Геном малины обыкновенной (*R. idaeus*) был прочитан в 2019 г. Собранный *de novo* геном с полнотой 95,3% с аннотацией 35 566 генов, кодирующих белки, стал ценным источником информации для селекционеров (Wight et al., 2019). Позднее геном малины обыкновенной сорта 'Anitra' уточнили посредством секвенирования с длинными прочтениями PacBio и высокопроизводительной геномной и эпигеномной технологии захвата конформации хроматина (Hi-C) (Davik et al., 2022). Референсный геном китайской малины (*R. chingii*) опубликован в 2021 г. (Wang L. et al., 2021). Предсказано 33 130 генов, кодирующих белки, 89,28% из которых функционально аннотированы. Данная сборка генома предоставила важную информацию, включая пути биосинтеза гидролизуемых танинов, которые играют значительную роль в медицинской и пищевой ценности растения. Свой вклад в геномику рода *Rubus* внесло исследование с применением перспективного метода генотипирования Hupreg-seq на китайской малине (*R. chingii*) в 2024 г. (Zhou et al., 2024).

Метод генотипирования Hupreg-seq – это новая, эффективная и экономически выгодная технология, разработанная для подготовки библиотек ДНК и генотипирования в Хайнаньском университете (Zou, Xia, 2022). Технология Hupreg-seq сочетает в себе PCR-амплификацию

для построения библиотеки и гель-электрофорез для предварительной оценки качества библиотеки. При этом она позволяет сократить время и затраты на подготовку библиотек по сравнению с традиционным полногеномным секвенированием.

Первый опубликованный геном ежевики представили в 2023 г. Секвенирование проводили с использованием Oxford Nanopore Technology (ONT) и Hi-C. Выполнена сборка генома тетраплоидной ежевики без шипов селекции BL1 (*Rubus* L. subgenus *Rubus* Watson), которая охватила более 92% длины генома. Всего было предсказано 87 968 генов, кодирующих белки, из которых 82% функционально аннотированы: выявлены гены-кандидаты, ассоциированные с отсутствием шипов, включая MYB16, транспортеры лизина и гистидина, PDR1, Caffeoyl-CoA, белок-переносчик липидов 1, DRN, бета-кетоацилредуктазу и гомоцистеин-S-метилтрансферазу 3 (Paudel et al., 2025). В том же году аннотировали сборку генома диплоидной ежевики сорта 'Hillquist' (*R. argutus*). Сборка производилась с использованием длинных прочтений PacBio. Было предсказано в общей сложности 38 503 гена, кодирующих белок, из которых 72% функционально аннотированы (Vr̃una et al., 2023). Для диких ежевик и прочих представителей рода *Rubus* работ, описывающих геном, опубликовано не было.

Заключение

Молекулярно-генетические методы для идентификации видов ежевики используются редко, в основном из-за ее невысокой хозяйственной значимости в большинстве регионов. В обзоре приводятся не только филогенетические исследования ежевики, но и исследования других видов рода *Rubus*, семейства Rosaceae (Розовые).

В литературе наблюдается рост интереса к изучению таксономического разнообразия ежевик в разных регионах планеты. Вероятно, данная тенденция связана с увеличением доступности современных методов молекулярно-генетического анализа, которые могут обходиться без использования больших баз данных. В первую очередь, это методы, основанные на выявлении SNP (GBS). Популярность GBS объясняется малой проработкой ежевики и других представителей рода *Rubus* как объектов таксономического анализа. GBS, как и другие методы, основанные на секвенировании геномных последовательностей, – один из наиболее удобных и в настоящее время доступных инструментов для филогенетического анализа растений. Хотя секвенирование геномов эффективно для филогенетического анализа, его высокая стоимость делает ДНК-штрихкодирование более доступной альтернативой. Данные методы, в отличие от других ДНК-маркеров, дают объективную текстовую информацию, которую можно использовать при биоинформатическом анализе для выявления степени родства между образцами и построения филогенетических связей.

В рамках исследования филогенетического разнообразия ежевики на территории Черноморского побережья Кавказа наиболее актуальным представляется использование методов, основанных на ДНК-штрихкодировании. Для этого нужно использовать как ядерные, так и хлоропластные маркеры. Также одним из перспективных методов для филогенетического анализа гибридов ежевики может стать использование методов NGS в сочетании с таргетированием при помощи ПЦП подходящих генетических маркеров. Это могут быть как последовательности, содержащие отдельные SNP, так и маркеры, имею-

щие множество копий в геноме, например ITS1/ITS2. Данный подход называется мета-штрихкодированием, которое находит широкое применение для характеристики сообществ микроорганизмов. Такой вариант описан как способ определения таксономической принадлежности растений в сложных смесях, как, например, при анализе сборной травяной пыльцы (Omelchenko et al., 2022). Однако в контексте определения гибридов растений мета-штрихкодирование не применялось. Применение этого метода для образцов ежевики, собранных на Черноморском побережье России, может позволить идентифицировать генетический вклад родительских видов в гибридах и расширить возможности по их классификации на основе характерных последовательностей, связанных с каждым из родителей.

References / Литература

- Adams K.L., Wendel J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005;8(2):135-141. DOI: 10.1016/j.pbi.2005.01.001
- Althoff D.M., Gitzendanner M.A., Segreaves K.A. The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Systematic Biology*. 2007;56(3):477-484. DOI: 10.1080/10635150701427077
- Atienzar F.A., Jha A.N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutation Research*. 2006;613(2-3):76-102. DOI: 10.1016/j.mrrev.2006.06.001
- Batley J., Edwards D. SNP applications in plants. In: N.C. Oraguzie, E.H.A. Rikkerink, S.E. Gardiner, H.N. De Silva (eds). *Association Mapping in Plants*. New York, NY: Springer; 2007. p.95-102. DOI: 10.1007/978-0-387-36011-9_6
- Boecklen W.J. Topology of syngameons. *Ecology and Evolution*. 2017;7(24):10486-10491. DOI: 10.1002/ece3.3507
- BOLDSYSTEMS. BOLDv5: Identifying species through DNA barcodes: [website]. Available from: <https://boldsystems.org/> [accessed Sept. 24, 2024].
- Brûna T., Aryal R., Dudchenko O., Sargent D.J., Mead D., Buti M., et al. A chromosome-length genome assembly and annotation of blackberry (*Rubus argutus*, cv. "Hillquist"). *G3 (Bethesda)*. 2023;13(2):jkac289. DOI: 10.1093/g3journal/jkac289
- Buerkle C.A., Gompert Z. Population genomics based on low coverage sequencing: how low should we go? *Molecular Ecology*. 2013;22(11):3028-3035. DOI: 10.1111/mec.12105
- Cekic C., Calis O., Ozturk E.S. Genetic diversity of wild raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.) in North Anatolia based on ISSR markers. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2018;16(5):6835-6843. DOI: 10.15666/aer/1605_68356843
- Chadha S., Gopalakrishna T. Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers for genetic diversity assessment of the rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*). *Genome*. 2005;48(5):943-945. DOI: 10.1139/g05-045
- Davik J., Røen D., Lysøe E., Buti M., Rossman S., Alsheikh M., et al. A chromosome-level genome sequence assembly of the red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *PLoS One*. 2022;17(3):e0265096. DOI: 10.1371/journal.pone.0265096
- De Boer H.J., Ichim M.C., Newmaster S.G. DNA barcoding and pharmacovigilance of herbal medicines. *Drug Safety*. 2015;38(7):611-620. DOI: 10.1007/s40264-015-0306-8
- De Vere N., Rich T.C.G., Trinder S.A., Long C. DNA barcoding for plants. In: J. Batley (ed.). *Plant Genotyping. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1235. New York, NY: Humana Press; 2015. p.101-118. DOI: 10.1007/978-1-4939-1966-6_8
- Dou Z., Chen C., Fu X. Digestive property and bioactivity of blackberry polysaccharides with different molecular weights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(45):12428-12440. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03505
- Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S. et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One*. 2011;6(5):e19379. DOI: 10.1371/journal.pone.0019379
- Eu G.S., Chung B.Y., Bandopadhyay R., Yoo N.H., Choi D.G., Yun S.J. Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2008;11(1):39-44.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agriculture Data: [website]. Available from: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [accessed Sept. 24, 2024].
- Feliner G.N., Álvarez I., Fuertes-Aguilar J., Heuertz M., Marques I., Moharrek F. et al. Is homoploid hybrid speciation that rare? An empiricist's view. *Heredity (Edinburgh)*. 2017;118(6):513-516. DOI: 10.1038/hdy.2017.7
- Focke W.O. Species Ruborum. Monographiae generis Rubi prodromus. Pars II. In: Chr. Luerksen (ed.). *Bibliotheca Botanica*. Vol. 72(I-II). Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung; 1911. p.121-223. [in Latin and German] DOI: 10.5962/bhl.title.15533
- Foster T.M., Bassil N.V., Dossett M., Worthington M.L., Graham J. Genetic and genomic resources for *Rubus* breeding: a roadmap for the future. *Horticulture Research*. 2019;6(1):116. DOI: 10.1038/s41438-019-0199-2
- Frenzke L., Röckel F., Wenke T., Schwander F., Grützmann K., Naumann J. et al. Genotyping-by-sequencing-based high-resolution mapping reveals a single candidate gene for the grapevine veraison locus Ver1. *Plant Physiology*. 2024;196(1):244-260. DOI: 10.1093/plphys/kiae272
- Gao Z., Liu Y., Wang X., Wei X., Han J. DNA mini-barcoding: a derived barcoding method for herbal molecular identification. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:987. DOI: 10.3389/fpls.2019.00987
- Graham J., Smith K., Woodhead M., Russell J. Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. *Molecular Ecology Notes*. 2002;2(3):250-252. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00203.x
- Graham J., Squire G.R., Marshall B., Harrison R.E. Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus* detected using RAPD markers. *Molecular Ecology*. 1997;6(11):1001-1008. DOI: 10.1046/j.1365-294X.1997.00272.x
- Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;89(7-8):998-1006. DOI: 10.1007/BF00224530
- Gupta P.K., Roy J.K., Prasad M. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science*. 2001;81(4):524-535.
- Hayashi K., Yandell D.W. How sensitive is PCR-SSCP? *Human Mutation*. 1993;2(5):338-346. DOI: 10.1002/humu.1380020503
- He J., Zhao X., Laroche A., Lu Z.H., Liu H., Li Z. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breed-

- ing. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:484. DOI: 10.3389/fpls.2014.00484
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 2003a;270(1512):313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 2003b;270 Suppl 1):S96-S99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025
- Hollingsworth P.M., Li D.Z., van der Bank M., Twyford A.D. Telling plant species apart with DNA: from barcodes to genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 2016;371(1702):20150338. DOI: 10.1098/rstb.2015.0338
- Huang T.R., Chen J.H., Hummer K.E., Alice L.A., Wang W.H., He Y. et al. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae): integrating molecular and morphological evidence into an infrageneric revision. *Taxon*. 2023;72(2):278-306. DOI: 10.1002/tax.12885
- Hummer K.E. *Rubus* diversity. *HortScience*. 1996;31(2):182-183. DOI: 10.21273/HORTSCI.31.2.182
- Janzen D.H., Hallwachs W., Blandin P., Burns J.M., Cadiou J.M., Chacon I. et al. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources*. 2009;9 Suppl s1:1-26. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02628.x
- Jehan T., Lakhanpaul S. Single nucleotide polymorphism (SNP) – methods and applications in plant genetics: a review. *Indian Journal of Biotechnology*. 2006;5:435-459.
- Juzepczuk S.V. Raspberries and blackberries – *Rubus* L. (*Malina* i *yezhevika* – *Rubus* L.) In: V.L. Komarov (ed.). *Flora USSR. Vol. 10*. Moscow; Leningrad; 1941. p.5-58. [in Russian] (Юзепчук С.В. Малина и ежевика – *Rubus* L. В кн.: *Флора СССР. Т. 10* / под ред. В.Л. Комарова. Москва; Ленинград; 1941. С.5-58).
- Kagan D.I., Shestibratov K.A., Lebedev V.G., Azarova A.B., Filippov M.S., Besov S.A. et al. Certification of raspberry and blackberry cultivars, and studying their phylogenetic relationships with the RAPD analysis (Pasportizatsiya sortov maliny i yezheviki i izucheniye ikh filogeneticheskikh vzaimootnosheniy metodom RAPD-analiza). In: *Biotechnological Methods in Conservation of Biodiversity and Plant Breeding. Proceeding of the International Scientific Conference; Minsk, 18–20 August, 2014*. Minsk: The Central Botanical Gardens; 2014. p.101-104. [in Russian] (Каган Д.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Филиппов М.С., Бесов С.А. и др. Паспортизация сортов малины и ежевики и изучение их филогенетических взаимоотношений методом RAPD-анализа. В кн.: *Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции; Минск, 18–20 августа 2014 г.* Минск: Центральный ботанический сад; 2014. С.101-104). URL: http://hbc.bas-net.by/hbcinfo/books/Conf2014_Minsk_CBG_biochim.pdf [дата обращения: 14.08.2024].
- Kalender R., Tanskanen J., Immonen S., Nevo E., Schulman A.H. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(12):6603-6607. DOI: 10.1073/pnas.110587497
- Kamnev A.M., Antonova O.Yu., Dunaeva S.E., Gavrilenko T.A., Chukhina I.G. Molecular markers in the genetic diversity studies of representatives of the genus *Rubus* L. and prospects of their application in breeding. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):20-30. [in Russian] (Камнев А.М., Антонова О.Ю., Дунаева С.Е., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(1):20-30). DOI: 10.18699/VJ20.591
- Kane N.C., Cronk Q. Botany without borders: barcoding in focus. *Molecular Ecology*. 2008;17(24):5175-5176. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03972.x
- Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):1044-1054. [in Russian] (Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):1044-1054).
- Kimura T., Nishitani C., Iketani H., Ban Y., Yamamoto T. Development of microsatellite markers in rose. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(3):810-812. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01352.x
- Kolakovskiy A.A. Flora of Abkhazia: in four volumes. Vol. III (Flora Abkhazii: v chetyrekh tomakh. T. III). Tbilisi: Metsniereba; 1985. [in Russian] (Колаковский А.А. Флора Абхазии: в четырех томах. Т. III. Тбилиси: Мецниереба; 1985).
- Korekar G., Sharma R.K., Kumar R., Meenu, Bisht N.C., Srivastava R.B., et al. Identification and validation of sex-linked SCAR markers in dioecious *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae). *Biotechnology Letters*. 2012;34(5):973-978. DOI: 10.1007/s10529-012-0852-4
- Krassovskaja L.S. *Rubus* – *Rubus* L. In: N.N. Tzvelev (ed.). *Flora of Eastern Europe. Vol. X (Flora Europae Orientalis. T. X)*. St. Petersburg; 2001. p.362-393. [in Russian] (Крассовская Л.С. Рубус – *Rubus* L. В кн.: *Флора Восточной Европы. Т. X* / под ред. Н.Н. Цвелева. Санкт-Петербург; 2001. С.362-393).
- Kyndt T., Van Droogenbroeck B., Romeijn-Peeters E., Romero-Motochi J.P., Scheldeman X., Goetghebeur P. et al. Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2005;37(2):442-459. DOI: 10.1016/j.ympev.2005.06.017
- Lee J., Dossett M., Finn C.E. *Rubus* fruit phenolic research: the good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*. 2012;130(4):785-796. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.08.022
- Li Y., Tong Y., Xing F. DNA barcoding evaluation and its taxonomic implications in the recently evolved genus *Oberonia* Lindl. (Orchidaceae) in China. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1791. DOI: 10.3389/fpls.2016.01791
- Lou R.N., Jacobs A., Wilder A.P., Therkildsen N.O. A beginner's guide to low-coverage whole genome sequencing for population genomics. *Molecular Ecology*. 2021;30(23):5966-5993. DOI: 10.1111/mec.16077
- Marieschi M., Torelli A., Poli F., Bianchi A., Bruni R. Quality control of commercial Mediterranean oregano: development of SCAR markers for the detection of the adulterants *Cistus incanus* L., *Rubus caesius* L. and *Rhus coriaria* L. *Food Control*. 2010;21(7):998-1003. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.12.018
- Martini S., D'Addario C., Colacevich A., Focardi S., Borghini F., Santucci A. et al. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;34(1):50-59. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.01.010

- Marulanda M.L., López A.M., Aguilar S.B. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2007;7(3):242-252. DOI: 10.12702/1984-7033.v07n03a03
- Matveeva T.V., Pavlova O.A., Bogomaz D.I., Lutova L.A., Demkovich A.E. Molecular markers for plant species identification and phylogenetics. *Ecological Genetics*. 2011;9(1):32-43. [in Russian] [Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович Л.А., Лутова А.Е. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. *Экологическая генетика*. 2011;9(1):32-43].
- Meier J.I., Marques D.A., Mwaiko S., Wagner C.E., Excoffier L., Seehausen O. Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. *Nature Communications*. 2017;8(1):14363. DOI: 10.1038/ncomms14363
- Miyashita T., Kunitake H., Yotsukura N., Hoshino Y. Assessment of genetic relationships among cultivated and wild *Rubus* accessions using AFLP markers. *Scientia Horticulturae*. 2015;193:165-173. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.07.004
- Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*. 2009;1(1):19-35. DOI: 10.3390/d1010019
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*. 1999;14(10):389-394. DOI: 10.1016/S0169-5347(99)01659-6
- Omelchenko D.O., Krinitsina A.A., Kasianov A.S., Speranskaya A.S., Chesnokova O.V., Polevova S.V. et al. Assessment of ITS1, ITS2, 5'-ETS, and trnL-F DNA barcodes for metabarcoding of Poaceae pollen. *Diversity*. 2022;14(3):191. DOI: 10.3390/d14030191
- Parent J.G., Pagé D. Identification of raspberry cultivars by sequence characterized amplified region DNA analysis. *HortScience*. 1998;33(1):140-142.
- Paudel D., Parrish S.B., Peng Z., Parajuli S., Deng Z. A chromosome-scale and haplotype-resolved genome assembly of tetraploid blackberry (*Rubus* L. subgenus *Rubus* Watson). *Horticulture Research*. [preprint] 2025. DOI: 10.1093/hr/uhaf052
- Peterson G.W., Dong Y., Horbach C., Fu Y.B. Genotyping-by-sequencing for plant genetic diversity analysis: a lab guide for SNP genotyping. *Diversity*. 2014;6(4):665-680. DOI: 10.3390/d6040665
- Poland J.A., Rife T.W. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome*. 2012;5(3):92-102. DOI: 10.3835/plantgenome2012.05.0005
- Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 2002;128(1):9-17. DOI: 10.1023/A:1020691618797
- Ryu J., Kim W.J., Im J., Kim S.H., Lee K.S., Jo H.J. et al. Genotyping-by-sequencing based single nucleotide polymorphisms enabled Kompetitive Allele Specific PCR marker development in mutant *Rubus* genotypes. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2018;35:57-62. DOI: 10.1016/j.ejbt.2018.08.001
- Sa Y., Na D. Optimization of PCR-SSCP reaction system and reaction conditions in *Crataegus* spp. *Agricultural Science and Technology*. 2017;18(3):398-401.
- Santana M.F., de Araújo E.F., de Souza J.T., Mizubuti E.S.G., de Queiroz M.V. Development of molecular markers based on retrotransposons for the analysis of genetic variability in *Moniliophthora perniciosa*. *European Journal of Plant Pathology*. 2012;134(3):497-507. DOI: 10.1007/s10658-012-0031-4
- Sedighi E., Rahimmalek M. Evaluation of genetic diversity of *Rubus hyrcanus* using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and morphological markers. *Biologia*. 2015;70(3):339-348. DOI: 10.1515/biolog-2015-0039
- Sevindik E., Okan K., Sevindik M., Ercisli S. Genetic diversity and phylogenetic analyses of *Juglans regia* L. (Juglandaceae) populations using RAPD, ISSR markers and nrDNA ITS regions. *Erwerbs-Obstbau*. 2023;65(2):311-320. DOI: 10.1007/s10341-023-00834-7
- Shahreki M., Mahdinezhad N., Fakheri B., Fahmideh L., Aran M. Evaluation of genetic diversity of Sistan native apple genotypes using IRAP and REMP markers. *Pomology Research*. 2022;7(1):19-28. DOI: 10.30466/rip.2021.53285.1155
- Simla M., Ptak A., Kula A., Orzeł A. Assessment of genetic variability among raspberry accessions using molecular markers. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 2018;17(5):61-72. DOI: 10.24326/asphc.2018.5.6
- Sobolev V.V., Soboleva A.G., Andreeva G.N., Karlov G.I. Evaluation of interspecific and intervarietal polymorphism in raspberries and marking of the everbearing trait using ISSR-PCR analysis (Otsenka mezhvidovogo i mezhsortovogo polimorfizma maliny i markirovaniye priznaka remontantnosti s ispolzovaniyem ISSR-PTsR-analiza). *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2009;(2):103-109. [in Russian] (Соболев В.В., Соболева А.Г., Андреева Г.Н., Карлов Г.И. Оценка межвидового и межсортового полиморфизма малины и маркирование признака ремонтантности с использованием ISSR-ПЦР-анализа. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2009;(2):103-109).
- Sochor M., Vašut R.J., Sharbel T.F., Trávníček B. How just a few makes a lot: Speciation via reticulation and apomixis on example of European brambles (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2015;89:13-27. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.04.007
- Stafne E.T., Clark J.R., Pelto M.C., Lindstrom J.T. Discrimination of *Rubus* cultivars using RAPD markers and pedigree analysis. *Acta Horticulturae*. 2003;626:119-124. DOI: 10.17660/ActaHortic.2003.626.16
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 1984;12(10):4127-4138. DOI: 10.1093/nar/12.10.4127
- Techen N., Parveen I., Pan Z., Khan I.A. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;25:103-110. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.09.010
- Tripodi P. The evolution of molecular genotyping in plant breeding. *Agronomy*. 2023;13(10):2569. DOI: 10.3390/agronomy13102569
- Ugozzoli L., Wallace R.B. Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*. 1991;2(1):42-48. DOI: 10.1016/S1046-2023(05)80124-0
- Uh Y.R., Jang C.S. Establishment of real-time polymerase chain reaction-based molecular markers to distinguish between *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences*. 2023;35(1):14-25. DOI: 10.22698/JALES.20230002
- VanBuren R., Bryant D., Bushakra J.M., Vining K.J., Edger P.P., Rowley E.R. et al. The genome of black raspberry (*Rubus occidentalis*). *The Plant Journal*. 2016;87(6):535-547. DOI: 10.1111/tpl.13215
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 1995;23(21):4407-4414. DOI: 10.1093/nar/23.21.4407
- Wang L., Lei T., Han G., Yue J., Zhang X., Yang Q. et al. The chromosome-scale reference genome of *Rubus chingii* Hu pro-

- vides insight into the biosynthetic pathway of hydrolyzable tannins. *The Plant Journal*. 2021;107(5):1466-1477. DOI: 10.1111/tpj.15394
- Wang M., Zhao H.X., Wang L., Wang T., Yang R.W., Wang X.L. et al. Potential use of DNA barcoding for the identification of *Salvia* based on cpDNA and nrDNA sequences. *Gene*. 2013;528(2):206-215. DOI: 10.1016/j.gene.2013.07.009
- Wang Y., Chen Q., Chen T., Tang H., Liu L., Wang X. Phylogenetic insights into Chinese *Rubus* (Rosaceae) from multiple chloroplast and nuclear DNAs. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:968. DOI: 10.3389/fpls.2016.00968
- Ward J.A., Boone W.E., Moore P.P., Weber C.A. Developing molecular markers for marker-assisted selection for resistance to raspberry bushy dwarf virus (RBDV) in red raspberry. *Acta Horticulturae*. 2012;946:61-66. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.946.6
- Weber C.A. Genetic diversity in black raspberry detected by RAPD markers. *HortScience*. 2003;38(2):269-272.
- Wight H., Zhou J., Li M., Hannenhalli S., Mount S., Liu Z. Draft genome assembly and annotation of red raspberry *Rubus idaeus*. *BioRxiv*. [preprint] 2019. DOI: 10.1101/546135
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990;18(22):6531-6535. DOI: 10.1093/nar/18.22.6531
- Wu Y., Li M., Yang Y., Jiang L., Liu M., Wang B. et al. Authentication of small berry fruit in fruit products by DNA barcoding method. *Journal of Food Science*. 2018;83(6):1494-1504. DOI: 10.1111/1750-3841.14177
- Yang J.Y., Jang S.Y., Kim H.K., Park S.J. Development of a molecular marker to discriminate Korean *Rubus* species medicinal plants based on the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F intergenic region sequences. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2012;55(2):281-289. DOI: 10.1007/s13765-012-1044-6
- Yang J.Y., Pak J.H. Phylogeny of Korean *Rubus* (Rosaceae) based on ITS (nrDNA) and trnL/F intergenic region (cpDNA). *Journal of Plant Biology*. 2006;49(1):44-54. DOI: 10.1007/BF03030787
- Yannic G., Baumel A., Ainouche M. Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (Poaceae), a salt-marsh species in decline along the Western European Coast. *Heredity (Edinburgh)*. 2004;93(2):182-188. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800491
- Zernov A.S. Illustrated flora of the south of the Russian Black Sea region (Иллюстрированная флора юга Российского Причерноморья). Moscow: КМК; 2013. [in Russian] (Зернов А.С. Иллюстрированная флора юга Российского Причерноморья. Москва: КМК; 2013).
- Zhou Z., Liu F., Xu Y., Hu W. Genetic diversity analysis and core germplasm construction of *Rubus chingii* Hu. *Plants*. 2024;13(5):618. DOI: 10.3390/plants13050618
- Zhu S., Liu Q., Qiu S., Dai J., Gao X. DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances. *Chinese Medicine*. 2022;17(1):112. DOI: 10.1186/s13020-022-00655-y
- Zou M., Xia Z. Hyper-seq: A novel, effective, and flexible marker-assisted selection and genotyping approach. *Innovation*. 2022;3(4):100254. DOI: 10.1016/j.xinn.2022.100254

Информация об авторах

Игорь Юрьевич Журавлев, младший научный сотрудник, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, zhuravlev.iy@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0009-0005-5967-5664>

Михаил Тимофеевич Меньков, младший научный сотрудник, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, menkov.mt@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0009-0005-7915-441X>

Елена Николаева Маркова, младший научный сотрудник, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, markova.en@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9454-6594>

Надежда Александровна Добаркина, лаборант-исследователь, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, dobarkina.na@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0009-0009-4283-519X>

Анастасия Ярославовна Евлаш, младший научный сотрудник, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, evlash.ay@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0246-8929>

Лилия Юрьевна Шипилина, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, l.shipilina@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7590-3173>

Алексей Сергеевич Розанов, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, rozanov.as@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1715-6530>

Information about the authors

Igor Yu. Zhuravlev, Associate Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settle., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, zhuravlev.iy@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0009-0005-5967-5664>

Mikhail T. Menkov, Associate Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settle., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, menkov.mt@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0009-0005-7915-441X>

Elena N. Markova, Associate Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settle., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, markova.en@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9454-6594>

Nadezhda A. Dobarkina, Research Laboratory Assistant, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settle., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, dobarkina.na@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0009-0009-4283-519X>

Anastasia Ya. Evlash, Associate Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settle., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, evlash.ay@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0246-8929>

Lilija Yu. Shipilina, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settle., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, l.shipilina@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7590-3173>

Aleksey S. Rozanov, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settle., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, rozanov.as@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1715-6530>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 15.10.2024; одобрена после рецензирования 03.12.2024; принята к публикации 03.12.2024.
The article was submitted on 15.10.2024; approved after reviewing on 03.12.2024; accepted for publication on 03.12.2024.