

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья

УДК 575.22:634.7:635.9:574.1

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-168-181



In silico-анализ геномов представителей семейства Rosaceae Juss. с целью создания ISAP-маркеров

А. М. Камнев¹, М. Е. Лапкасов¹, А. А. Тюкалова², С. В. Жидяева², О. Ю. Антонова^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

²Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, Краснодарский край, Россия

Автор, ответственный за переписку: Антон Михайлович Камнев, antonkamen@mail.ru

Актуальность. Семейство Розовые (Rosaceae Juss.) – таксон, к которому относится ряд экономически ценных культур. Исследования генетического разнообразия как сортов и селекционных форм культурных растений этого семейства, так и их диких родичей имеют важное значение для привлечения нового материала в генетические коллекции и в селекцию. Хорошим инструментом для их быстрого и информативного анализа могут служить маркеры, основанные на полиморфизме ретротранспозонов, в том числе ISAP-маркеры, детектирующие различия в расположении SINE-транспозонов. Поскольку SINE-элементы обладают высокой гетерогенностью, ISAP-маркеры, разработанные для одного вида, могут оказаться непригодны для работы с другими видами.

Материалы и методы. Проведен анализ геномов представителей пяти видов родов *Fragaria* L., *Rosa* L. и *Rubus* L. Для выравнивания SINE-последовательностей и их кластеризации с целью последующего дизайна праймеров разработана оригинальная биоинформационная программа. Апробация праймеров, созданных для малины и розы, была выполнена на ограниченных выборках (28 и 21 образец соответственно).

Результаты. В гаплоидных геномах представителей родов *Fragaria*, *Rosa* и *Rubus* выявлено от 857 до 3477 SINE-элементов, при этом во всех геномах они были распределены на хромосомах неравномерно. Применение биоинформационных методов для анализа выявленных SINE-последовательностей позволило для каждой культуры разработать специфичные праймеры. Сформированная система ISAP-маркеров показала высокую степень генерируемого полиморфизма ($\text{PIC} > 0,90$). Праймеры, подобранные для рода *Rosa*, оказались способными генерировать ПЦР-продукты и у представителей других культур семейства Rosaceae, включая вишню, грушу и землянику, однако наблюдаемый полиморфизм был существенно ниже.

Заключение. Полученная система ISAP-маркеров способна генерировать большое количество полиморфных фрагментов. Это позволяет применять ее для генотипирования и изучения генетического разнообразия как сортов, так и дикорастущих популяций.

Ключевые слова: ретротранспозоны, SINE, ISAP-маркеры, Rosaceae, биоинформационный анализ

Благодарности: результаты получены при финансовой поддержке исследования, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории “Сириус”» (соглашение № 18-03 от 10.09.2024).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы

Для цитирования: Камнев А.М., Лапкасов М.Е., Тюкалова А.А., Жидяева С.В., Антонова О.Ю. *In silico*-анализ геномов представителей семейства Rosaceae Juss. с целью создания ISAP-маркеров. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2025;186(4):168-181. DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-168-181

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-168-181

In silico analysis of the genomes within the Rosaceae Juss. family to develop ISAP markers

Anton M. Kamnev¹, Mikhail E. Lapkasov¹, Alina A. Tyukalova², Serafima V. Zhidiyaeva², Olga Yu. Antonova^{1,2}

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

² Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, Krasnodar Territory, Russia

Corresponding author: Anton M. Kamnev, antonkamen@mail.ru

Background. The rose family (Rosaceae Juss.) is an economically important taxon that includes a number of cultivated species. Studying the genetic diversity of crop wild relatives within this family is important to include new genetic material into genetic collections and utilize it in breeding practice. Markers based on retrotransposon polymorphism, including ISAP markers that detect differences in the location of SINE transposons, can be a useful tool for rapid and informative analysis of natural Rosaceae populations. Since SINE elements are highly heterogeneous, ISAP markers developed for one species may be unsuitable for the others.

Materials and methods. Genomes representing five species of the genera *Rubus* L., *Rosa* L. and *Fragaria* L. were analyzed *in silico*. An original bioinformatics program was developed to align and cluster the SINE sequences. The primers designed for raspberry and rose were tested on limited subsets (28 and 21 accessions, respectively).

Results. From 857 to 3477 SINEs were identified in the haploid genomes of the studied genera; an uneven distribution of elements across chromosomes was observed in all genomes. Bioinformatics methods applied to analyze the obtained SINE sequences made it possible to develop specific primers for each crop. The designed ISAP marker system revealed a high degree of generated polymorphism in the samples ($PIC > 0.90$). The primers developed for the genus *Rosa* were also capable of generating PCR products in other crops from the Rosaceae family, including cherry, pear, and strawberry, although the observed polymorphism was significantly lower.

Conclusion. The developed ISAP marker system can generate large amounts of polymorphic fragments. Therefore, it may be used for genotyping and molecular certification of cultivars as well as for studying the genetic diversity of wild populations.

Keywords: retrotransposons, SINE, ISAP markers, Rosaceae, bioinformatics analysis

Acknowledgments: the results were obtained with financial support from the state program for the Sirius Federal Territory "Scientific and technological development of the Sirius Federal Territory" (Agreement No. 18-03 dated Sept. 10, 2024). The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Kamnev A.M., Lapkasov M.E., Tyukalova A.A., Zhidiyaeva S.V., Antonova O.Yu. *In silico* analysis of the genomes within the Rosaceae Juss. family to develop ISAP markers. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2025;186(4):168-181. (In Russ.). DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-168-181

Введение

Семейство Розовые (Rosaceae Juss.) включает в себя около 3000 видов, распространенных преимущественно на территориях с умеренным климатом. Представители его достаточно разнообразны по жизненным формам и включают в себя как деревья и кустарники, так и травянистые виды. К розовым относится целый ряд плодовых, ягодных, орехоплодных и цветочных культур, которые ценятся за свои вкусоароматические, питательные и декоративные свойства (яблоня, груша, малина, ежевика, земляника, слива, вишня, абрикос, персик, миндаль, роза и прочие) (Folta, Gardiner, 2009).

Конвенция по биологическому разнообразию и связанная с ней Концепция глобального биоразнообразия на период после 2020 года особо акцентируют внимание на сохранении разнообразия всех существующих растительных видов, а также сохранении как можно более высокого внутривидового разнообразия (Hoban et al., 2020). Это касается и диких родичей культурных растений. Образцы из популяций диких видов представляют особую ценность для селекции: их вовлечение в процесс выведения новых форм повышает разнообразие культивируемого генофонда, позволяет привнести в него новые важные гены, ассоциированные с адаптацией к местным климатическим условиям, с устойчивостью к патогенам и абиотическим стрессам, а также способные повысить питательную ценность растений (Brozynska et al., 2016). Знание генетической структуры популяций позволяет, помимо всего прочего, разрабатывать более эффективные подходы к сохранению таких популяций как *ex situ*, так и *in situ* (Vetchinnikova et al., 2012). Все вышеизложенное справедливо и для представителей семейства розовых.

Для изучения генетического разнообразия видов семейства розовых используется широкий спектр различных классов маркеров – RFLP, AFLP, SSR, ISSR, RAPD и др. (Hadonou et al., 2004; Mezhnina et al., 2016; Aristya et al., 2019; Kamnev et al., 2020). Однако их использование может быть сопряжено с целым рядом проблем. Значительная часть диких родичей культурных растений семейства розовых являются диплоидами (Index to Plant Chromosome Numbers, IPCN), (<https://legacy.tropicos.org/Project/IPCN>); соответственно, при использовании микросателлитных (SSR) маркеров у таких образцов для анализа доступно не более двух различных аллелей, что отражается на уровне детектируемого полиморфизма. Например, культивируемые сорта малины во многих случаях демонстрировали достаточно низкий уровень разнообразия: показатели PIC составляли от 0,3 до 0,4, и лишь в единичных локусах были выявлены значения PIC > 0,75 (Dossett et al., 2012; Girichev et al., 2015). Соответственно, для изучения генетического разнообразия необходимо привлекать достаточно большое количество маркеров – как правило, не менее 10 (Girichev et al., 2015; Mezhnina et al., 2016; Han et al., 2024).

Еще одной проблемой SSR- и AFLP-маркеров является определенная трудоемкость процесса анализа и необходимость использования дорогостоящего оборудования (аппараты для электрофореза в полиакриламидном геле и капиллярного электрофореза). Преодолеть трудности SSR-генотипирования можно с помощью маркеров таких типов, как ISSR и RAPD, но их отличает низкая воспроизводимость результатов, поскольку в обоих случаях используемые праймеры не являются локус-специфичными (Matveeva et al., 2011).

В связи с вышеупомянутыми трудностями актуальным является применение маркерных систем, генерирующих высокополиморфные фрагменты и при этом не требующих больших денежных и трудовых затрат. Таковыми могут являться ретротранспозонные маркерные системы. Маркеры, основанные на ретротранспозонном полиморфизме, успешно могут использоваться для генотипирования, а механизм дуплицирования ретротранспозонов, при котором исходная последовательность не вырезается из своего локуса, а только копируется в новый (с оставлением исходной копии в прежнем локусе), позволяет использовать ретротранспозонные маркеры еще и в филогенетических исследованиях. (Melnikova et al., 2013; Kalendar et al., 2017).

Существуют два типа ретротранспозонов – имеющие длинные концевые повторы (Long Terminal Repeats, LTR) и не имеющие таковых (non-LTR-ретротранспозоны). Последние, в свою очередь, делятся на LINE-элементы (длинные диспергированные повторы – Long Interspersed Repeats) и SINE-элементы (короткие диспергированные повторы – Short Interspersed Repeats) (Kalendar et al., 2002). SINE-элементы представляют собой достаточно короткие (до 500 пар нуклеотидов) последовательности, не кодирующие белки и нуждающиеся для транспозиции в одновременном присутствии других ретротранспозонов. В строении SINE-элементов выделяют промоторные элементы (A и B боксы), а также 3'-полиадениновые или политиминовые концы; последовательности, относящиеся к данному типу, окружены дуплицированными таргет-сайтами (Target Site Duplication, TSD) (Wenke et al., 2011).

SINE-ретротранспозоны обладают чрезвычайно высокой гетерогенностью, что крайне затрудняет их идентификацию. На данный момент существует несколько подходов к поиску данных элементов в геноме: через разработку праймеров, включающих последовательности промоторных боксов A и B, с последующей амплификацией, клонированием и секвенированием полученных фрагментов (Borodulina, Kramerov, 2005); отжиг праймеров, разработанных для SINE-элементов одного вида на ДНК родственного вида (Sormin et al., 2021), а также биоинформатический метод. В рамках последнего были разработаны две программы для поиска SINE-элементов в полногеномных последовательностях: SINE-Finder (Wenke et al., 2011) и AnnoSINE (Li et al., 2022). Алгоритмы обеих программ используют знания о структуре SINE-ретротранспозонов (наличие A и B боксов, а также концевых повторов). Программы успешно показали себя в поиске SINE-элементов в геномах картофеля, табака, томата, растений семейств нимфейных, ивовых и амарантовых (Seibt et al., 2012; Schwichtenberg et al., 2016; Reiche et al., 2021), а также у классических объектов генетики – арабидопсиса и риса (Li et al., 2022).

На базе найденных SINE-последовательностей в геномах представителей семейств пасленовых, нимфейных и ивовых К. М. Seibt с соавторами (Seibt et al., 2012) разработали метод ISAP-маркирования (Inter-SINE Amplified Polymorphism), основанный на полиморфизме последовательностей, находящихся между двумя SINE-ретротранспозонами (Kalendar et al., 2017). Его преимущества (высокий полиморфизм, большое количество ампликонов, относительная простота – для анализа результатов амплификации достаточно электрофореза в агарозном геле) позволяют сделать вывод о большом потенциале методики и возможных перспективах ее применения по отношению к представителям розовых.

Метод является сравнительно новым, но уже успешно применяется для различных культур: известны исследования по генотипированию картофеля (*Solanum tuberosum* L.) (Seibt et al., 2012), тополя (*Populus* L.) (Reiche et al., 2021), а также дыни (*Cucumis melo* L.) (Sormin et al., 2021). ISAP-маркеры, разработанные для дыни, оказались пригодны и для работы с колеусами (*Coleus* spp.) (Sormin et al., 2021). Наиболее развита ISAP-система маркеров для картофеля. В работе немецких исследователей при помощи только одной комбинации праймеров удалось сгенерировать 20 полиморфных фрагментов, что позволило различить 237 из 364 сортов (Seibt et al., 2012).

На сегодняшний день у нас нет сведений об исследованиях по ISAP-маркированию представителей семейства розовых – для них применяли ретротранспозонные IRAP- и S-SAP-маркеры, основанные на LTR-последовательностях (Antonius-Klemola et al., 2006; Melnikova et al., 2012; Sun et al., 2015; Badakhshan et al., 2018). Разработанные для представителей одного рода IRAP-маркеры могут применяться для видов, относящихся к другому: существует опыт, в котором маркеры такого типа, разработанные для черемухи, пытались применить на образцах вишни, сливы, яблони, ежевики, груши и малины – доля эффективно генерировавших фрагменты праймеров составила 35,1%, 31,8%, 9,2%, 8,6%, 6,5% и 0,89% соответственно (Liang et al., 2016). Подобное применение праймеров, разработанных для родственной культуры, может быть полезно для быстрой предварительной оценки генетического разнообразия изучаемого объекта, но при изучении внутриродового и внутривидового разнообразия может дать смазанную и даже неверную картину. SINE-элементы и разработанные на их основе ISAP-маркеры более видоспецифичны и потому могут предоставить более точные данные.

На данный момент в базе геномов GDR (Genome Database of Rosaceae; <https://www.rosaceae.org>), а также в генбанке NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) содержатся полногеномные последовательности различных представителей семейства розовых, включая виды родов *Fragaria* L. (*F. × ananassa* Duch. ex West., *F. vesca* L., *F. viridis* (Duch.) West. и другие), *Rubus* L. (*R. chingii* Hu, *R. idaeus* L., *R. occidentalis* L.) и *Rosa* L. (*R. rugosa* Thunb. и другие). Наличие программы, предназначенной для поиска SINE-элементов в полногеномных сиквенсах, позволяет приступить к разработке ISAP-системы для генотипирования представителей этих родов и начать применение этой системы в целом для семейства розовых.

Цель настоящей работы – поиск и анализ SINE-последовательностей в геномах видов земляники, малины и розы, а также разработка первых ISAP-праймеров для изучения внутривидового разнообразия этих культур.

Материалы и методы

Материал исследования

Поскольку предполагается, что разрабатываемые ISAP-маркеры будут пригодны и для изучения генетического разнообразия природных популяций, и для генотипирования сортов, в изучаемую выборку были включены образцы как сортов, так и видеообразцов.

Апробацию праймеров для рода *Rubus* проводили на выборке 28 сортов малины (*R. idaeus*) отечественной селекции: 'Аврора', 'Акварель', 'Алая Россыпь', 'Антарес', 'Арочная', 'Веста', 'Высокая', 'Добрая', 'За Здравие', 'Затонская', 'Зоренька Алтая', 'Блеск', 'Иллюзия', 'Кассиопея', 'Кредо', 'Лель', 'Любительская Свердловска', 'Муз', 'Ого-

нек', 'Персиковая', 'Прелесть', 'Ровница', 'Рубиновая', 'Славянка', 'Соколенок', 'Фантазия', 'Фрегат'.

Выборка для анализа рода *Rosa* включала образцы двух видов: *R. multiflora* Thunb. (19 образцов) и *R. chinensis* Jacq. (2 образца), произрастающие в биоценозах федеральной территории «Сириус» и в прилегающих районах.

Другие рода семейства розовых, использованные для апробации маркеров на трансферабельность, представлены ограниченными выборками по 16 образцов:

- земляника (*Fragaria*): сорта *F. × ananassa* 'Алена', 'Великан', 'Гирлянда', 'Подарок Весны', 'Торпеда', 'Царско-сельская', 'Mieze Schindler', 'Surecrop', образцы видов *F. mandshurica* Staudt. (к-49706), *F. moschata* Weston. (к-49729), *F. orientalis* L. (к-49701, к-49720), *F. vesca* (к-49731), *F. viridis* (к-49735, к-49754), а также сорт земклуники 'Купчиха';

- груша: сорта *Pyrus communis* L. 'Абадзехская', 'Аптекарская Летняя', 'Арбузка', 'Бергамот Летний', 'Бергамот Немецкий', 'Бере Жиффар', 'Леони Бувье', 'Местная Войкова', 'Мускатная Малая', 'Панна', 'Петровская', 'Прокопянка', 'Санитарный Советник', 'Тривинель', 'Южанка' и сорт *Pyrus caucasica* Fed. 'Поддулька сладкая';

- вишня: сорта *Prunus cerasus* L. 'Алатырская', 'Багряная', 'Десертная Волжская', 'Долгожданная', 'Достижение', 'Жаворонок', 'Изобильная', 'Комсомольская', 'Костычевская', 'Малиновка', 'Маяк', 'Норма', 'Прима', 'Союзная', 'Тихоновская', 'Флора'.

Поиск SINE-последовательностей в геномах представителей семейства розовых

Для анализа в исследование взяли депонированные в базе генетических данных по Rosaceae Genome Database of Rosaceae (GDR) и в Генбанке NCBI полногеномные последовательности ДНК следующих видов: земляники садовой *Fragaria × ananassa* (*Fragaria × ananassa Camarosa* Genome Assembly v1.0.a1), земляники лесной *F. vesca* (*Fragaria vesca* 'Hawaii 4' NAU Genome v1.0), земляники зеленой *F. viridis* (*Fragaria viridis* YNG Genome v1.0), малины западной *Rubus occidentalis* (*Rubus occidentalis* Whole Genome v3.0 Assembly & Annotation) и розы морщинистой *Rosa rugosa* (Genome assembly drRosRug01.1, GCA_958449725.1).

Поиск SINE-последовательностей в этих геномах проводили с помощью программы SINE-Finder, разработанной T. Wenke соавторами (Wenke et al., 2011). Найденные последовательности выравнивали с помощью алгоритма Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).

По результатам выравнивания с помощью программы UGENE версии 38.1 (UGENE team et al., 2012) были построены кладограммы SINE-семейств изученных геномов. Для дополнительной обработки результатов выравнивания написали скрипт на языке программирования Python, позволивший выделить входящие в тот или иной кластер последовательности, который приведен в Приложении 1 (Electronic Supplementary Materials, Suppl. 1)¹. Последовательности, входящие в один кластер, дополнительно выравнивали в программе MEGA X (Kumar et al., 1994).

К консервативным районам, встречающимся в наибольшем числе последовательностей одного кластера, при помощи программного обеспечения Primer3Plus (Un-

¹ Приложение 1 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2025-4-168-181> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 1. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2025-4-168-181>

тергассер et al., 2012) были разработаны праймеры по принципу, предложенному в работе K. M. Seibt с соавторами (Seibt et al., 2012). Последовательности праймеров выбирались в наиболее консервативных участках, не входящих в А- и В-боксы SINE-элемента, при этом прямой и обратный праймеры были ориентированы «хвост к хвосту», то есть друг от друга. Такое расположение праймеров приводит к амплификации районов ДНК между двумя ретротранспозонами. Пример использования данного принципа приведен на рисунке 1.

В результате проведенного анализа разработали 28 пар ISAP-праймеров; их полный список приведен в таблице 1.

Проведение ПЦР

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси состава: 1 × реакционный буфер Biolabmix, 2 mM MgCl₂, 0,4 мМ каждого из dNTPs, по 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров и 1 ед. HS-Taq-ДНК полимеразы («Биолабмикс», № 7010).

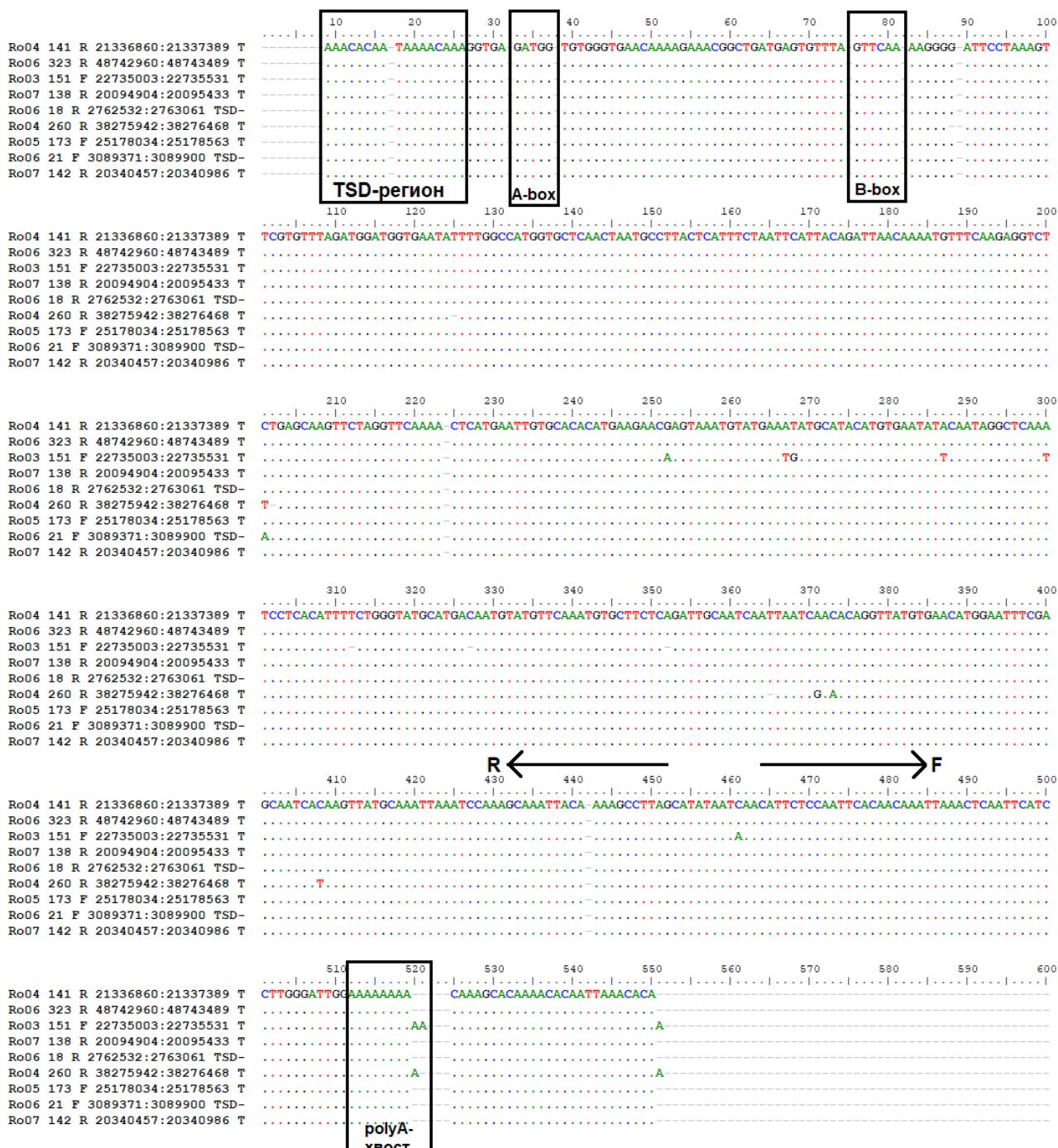


Рис. 1. Схема разработки ISAP-праймеров на примере SINE-последовательностей малины

Fig. 1. An example of ISAP primers developed for the raspberry SINE-sequences

Таблица 1. ISAP-праймеры, разработанные на основе данных анализа геномов розоцветных
Table 1. ISAP primers based on the data from the Rosaceae genome analysis

Культура / Crop	Название праймеров / Primer name	Последовательность F-праймера (5' → 3') / F-primer sequence (5' → 3')	Последовательность R- праймера (5' → 3') / R-primer sequence (5' → 3')	T°
Роза (<i>Rosa rugosa</i>)	ROSE-CL0	ggggtaggagtgaatcccttg	agatagtgggtgcctaacc	58
	ROSE-CL1	atcaagggtggaaatgggg	accaaaggcttaccacc	48
	ROSE-CL2	gggcattcagaccacacaata	atctgtaatcacgtccatcac	58
	ROSE-CL3	cacagtggagcattcacatg	cacaccaacaaggcaagaa	62
	ROSE-CL5	aagggttatctggccta	acccaactaagaagaacca	52
	ROSE-CL6	cgctgaagggttatcttgg	cctagccacttgcacagctc	58
	ROSE-CL7	gcacagttggagcattcaca	ctttgacagctcgggttc	58
	ROSE-CL10	agttgcgagggttggaaagatg	gtttctctcccttgc	55
Малина (<i>Rubus idaeus</i>)	RubFam1	gcatagttggaggcattcac	caggcactytgctgcaat	55
	RubFam2	aagcaaggctcgagttc	gccttgtgaatggagcag	59
	RubFam3_gr1	gagtgaaatchtgtatcc	aggtagtgggtghtctaa	56
	RubFam3_gr2	gagtgaaatchtgtatcc	ctaccycatggactc	56
	RubFam5	gttaagatattcatgatgaga	atcgaaaaatagatatmacaa	53
	RubFam6	gccttgtgaatggagcag	ggaacaagctcattaccactt	54
	RubFam7	ttctaggttcaaaactcatgaa	aaatgagtaaggcattgtga	59
	RubFam8.2	acaaagtaaactcaattcatcc	atccatctaaacacgaacttta	58
	RubFam8.3	cattctccaattcacaacaat	ctaaggctttgtatattgc	57
	RubFam9	cttagcaaatgtggaaattc	ccaaaggacatttctagatta	59
Земляника (<i>Fragaria × ananassa</i>)	F-an_ISAP1	ttggttcgttcattgttta	accgttcatgcttataatta	55
	F-an_ISAP2	tgttgtgttacctaattct	gttagagaagtgcagtgc	56
	F-an_ISAP3	taaccaagaggctgtgtt	agagaagtgcagtgtttcca	59
	F-an_ISAP4	caatattcctcgacggtac	gtccagaagttctcctcatg	59
	F-an_ISAP5	actgaaaatgtttaaacc	cgtttaggggttgacttac	52
<i>F. vesca</i>	F-ves_ISAP1	agatttggttcgttcatg	ggtgagatgtgat	58
	F-ves_ISAP2	ggcattcaaaactacgattt	ggagatgtgat	56
	F-ves_ISAP3	gcagatttgggtcggtt	tggagatgtgat	57
<i>F. viridis</i>	F-vir_ISAP1	caattttattctgggtggcca	tttaactccaatttagcgtcg	58
	F-vir_ISAP2	agggtttgtgaaaacctatg	gagagatgacaacttccaa	57

Использовали несколько вариантов ПЦР-программ:

(1) программа, подобранная по литературным источникам (Seibt et al., 2012; Sun et al., 2015), используемая для работы с ретротранспозонными маркерами: 94°C – 4 мин; 37 циклов [94°C – 40 с, T_m (температура отжига) – 40 с, 72°C – 2 мин] и в заключение 72°C – 10 мин;

(2) программа, включающая в себя этап тачдауна: 94°C – 3 мин 30 с; 8 циклов [94°C – 45 с, (T_m+4)°C – 45 с

с понижением T_m на 0,5°C за цикл; 72°C – 1 мин]; 30 циклов [94°C – 45 с, T_m – 45 с; 72°C – 1 мин] и финальная элонгация при 72°C – 10 мин;

(3) программа с удлинением времени элонгации в каждом цикле, начиная с одиннадцатого: 95°C – 5 мин, затем 10 циклов [95°C – 45 с, T_m – 45 с, 72°C – 2 мин 30 с], после чего 30 циклов [95°C – 45 с, T_m – 45 с, 72°C – 2 мин 30 с с увеличением времени элонгации на 10 с/цикл] и в заключение 72°C – 7 мин.

Таблица 2. Распределение по хромосомам SINE-элементов в геномах изучаемых объектов**Table 2. Distribution of SINEs across chromosomes in the genomes of the studied species**

Хромосома / Chromosome	Вид / Species							
	<i>Rubus occidentalis</i>	<i>Rosa rugosa</i>	<i>Fragaria vesca</i>	<i>Fragaria viridis</i>	<i>Fragaria × ananassa</i>			
					-1*	-2*	-3*	-4*
1	241	1046	114	109	86	128	122	98
2	261	523	142	100	110	121	110	138
3	277	426	165	170	121	140	117	141
4	265	432	142	136	62	109	144	99
5	275	390	104	121	118	102	118	94
6	343	384	170	141	167	115	184	145
7	306	276	84	80	126	129	106	78
ВСЕГО / TOTAL	1968	3477	921	857	790	844	901	793

Примечание: * – гаплоидный набор *F. × ananassa* имеет 28 хромосом, однако он представлен четырьмя разными субгеномами (поскольку является октопloidным видом гибридного происхождения), соответственно в полногеномной последовательности каждая хромосома имеет индексы -1, -2, -3, -4 (например, 1-1, 1-2, 1-3, 1-4); число SINE-элементов приведено для хромосом каждого субгена

Note: * – the haploid set of *F. × ananassa* contains 28 chromosomes, but it is represented by four different subgenomes (since it is an octoploid species of hybrid origin), therefore, in the genome-wide sequence, each chromosome has indexes -1, -2, -3, and -4 (for example, 1-1, 1-2, 1-3, and 1-4); the number of SINEs is given for the chromosomes of each subgenome

Проведение электрофореза

Электрофорез проводили в 2-процентных агарозных гелях в электрофоретических камерах Bio-Rad в течение 2–3 часов при напряжении 5 В/см. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем УФ-свете. Для определения размеров фрагментов использовали программу Image Lab фирмы Bio-Rad.

Статистическая обработка результатов

Для определения достоверности различий между геномами по количеству SINE-элементов использовали критерий χ^2 . Для оценки уровня полиморфизма применяли индекс PIC (Polymorphic Index Content), вычисляя значение по формуле $PIC = 1 - \Sigma(p_i^2)$, где p_i – частота i -аллеля, выявленного в данной выборке (Nei, 1973).

Результаты и обсуждение

Анализ полногеномных последовательностей представителей семейства розовых для выявления SINE-элементов и разработка ISAP-праймеров

Малина

При анализе полногеномной последовательности *Rubus occidentalis* (*Rubus occidentalis* Whole Genome v3.0 Assembly & Annotation) программа SINE-Finder обнаружила 1968 целевых последовательностей. Из них 1048 имели прямую ориентацию (последовательности А- и В-боксов располагались ближе к 5'-концу геномной последовательности, а поли-А «хвост» – ближе к 3'-концу), и еще 920 последовательностей располагались в обратной ориентации. Среднее число SINE-элементов на хромосому составило 281,1. При этом их распределение по хромосомам оказалось неравномерным: тест χ^2 при $p = 0,05$ показал, что число ретротранспозонов на хромосомах 6 и 7 было достоверно больше, чем на остальных (табл. 2).

В результате выравнивания всех выявленных последовательностей была построена кладограмма (рис. 2), на которой SINE-ретротранспозоны распределились на 17 групп. Последовательности, вошедшие в один кластер (одно SINE-семейство), были дополнительно выравнены с помощью алгоритма CLUSTALW в программе MEGA X (Kumar et al., 1994).

По итогу проведенных работ удалось разработать праймеры для восьми семейств, в которых по результатам выравнивания в программе MegaX наблюдались обширные группы гомологичных последовательностей. В некоторых семействах в целях подбора более специфичных праймеров были выделены подсемейства (например, в семействе RubFam8). Семейства, для которых разработаны праймеры, отмечены на представленной кладограмме (см. рис. 2).

Роза

В полногеномной последовательности *Rosa rugosa* (Genome assembly drRosRugo1.1, GCA_958449725.1) выявлено 3477 SINE-ретротранспозонов. Среднее число на хромосому составило 475,4 элемента, однако очевидна неравномерность их распределения по геному (что подтверждается тестом χ^2): число SINE-элементов на хромосоме 1 в два-три раза превышает их число на любой другой хромосоме изученной последовательности (см. табл. 2).

С помощью программы ClustalO найденные SINE-элементы были выравнены, по результатам выравнивания построена дендрограмма, на которой выделились 11 основных и 16 мажорных кластеров (Electronic Supplementary Materials, Suppl. 2)²; для последовательностей 8 кластеров были разработаны специфичные праймеры.

² Приложение 2 представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2025-4-168-181> / Electronic Supplementary Materials, Suppl. 2. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2025-4-168-181>

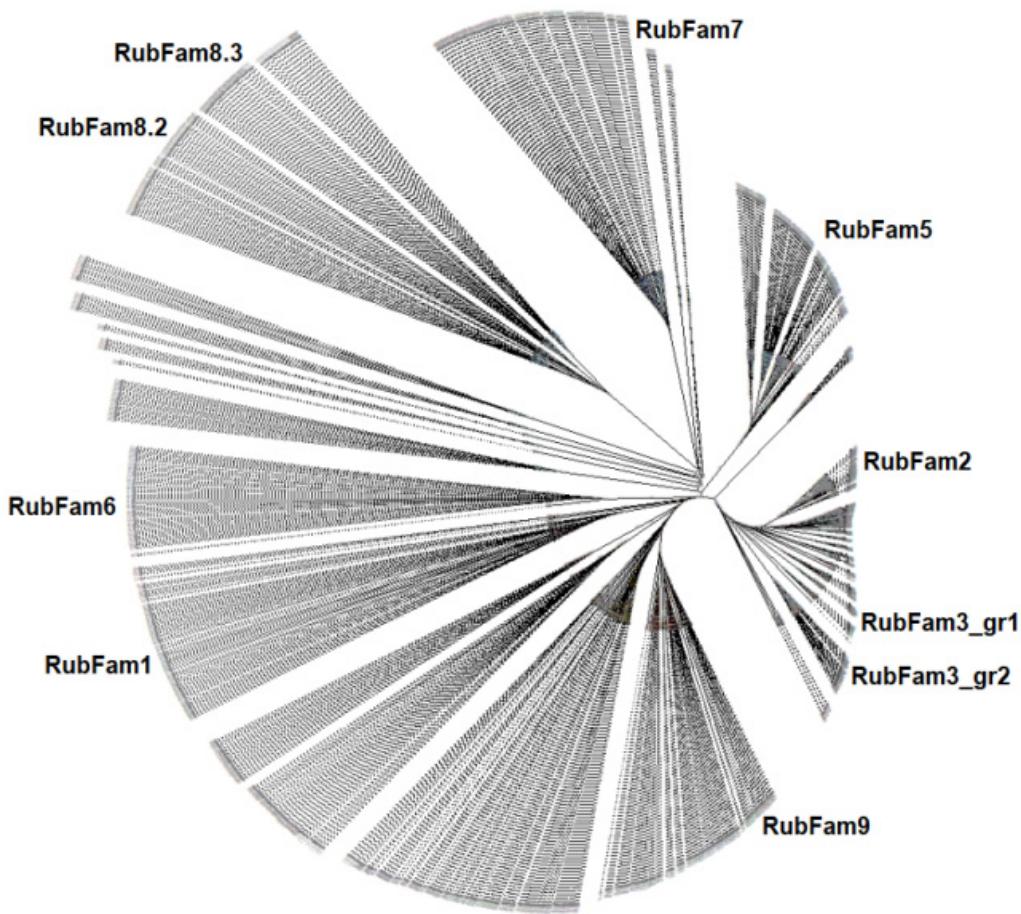


Рис. 2. Дендрограмма распределения SINE-последовательностей, выявленных в геноме *Rubus occidentalis* L.
(жирным шрифтом подписаны семейства, для которых велась разработка праймеров)

Fig. 2. Dendrogram showing the distribution of SINE sequences found in the *Rubus occidentalis* L. genome
(the families for which primers were developed are boldfaced)

Земляника

Для рода *Fragaria* были проанализированы геномы октопloidного вида *F. × ananassa* (*Fragaria × ananassa* Camarosa Genome Assembly v1.0.a1) и двух диплоидных видов *F. vesca* (*Fragaria vesca* 'Hawaii 4' NAU Genome v1.0) и *F. viridis* (*Fragaria viridis* YNG Genome v1.0).

В геноме *F. vesca* найдено 921 SINE-элементов, у *F. viridis* – 857 элементов. Ожидаемо, у *F. × ananassa* количество выявленных ретротранспозонов было гораздо больше (в сумме – 3328). Однако среднее число SINE-элементов на хромосому у всех трех видов было сопоставимо: 118,8 для *F. × ananassa*, 132,4 для *F. vesca* и 125 для *F. viridis*.

При этом распределение SINE-элементов по хромосомам в геномах *F. vesca* и *F. viridis* оказалось неравномерным; тест χ^2 при $p = 0,05$ показал, что у *F. viridis* хромосома 3 содержала достоверно больше этих последовательностей, а хромосома 7, наоборот, достоверно меньше (см. табл. 2). Аналогично у *F. vesca* хромосома 6 достоверно отличалась по содержанию SINE-элементов в большую сторону, а хромосома 7 – в меньшую.

По результатам выравнивания SINE-элементов с помощью программы ClustalO были построены кладограммы. Выявленные ретротранспозоны образовали у *F. viridis* 11 кластеров, у *F. vesca* – 24 кластера и у *F. × ananassa* –

85 кластеров (см. Electronic Supplementary Materials, Suppl. 2; рис. 2).

Сравнение разных видов семейства розовых между собой не проводили, поскольку нумерация хромосом в опубликованных геномах может быть произвольной. Однако стоит отметить, что число SINE-ретротранспозонов у *Rubus occidentalis* на одной хромосоме, как правило, в 2–3 раза больше, чем у видов рода *Fragaria* (см. табл. 2). Также стоит отметить, что число выявленных SINE-элементов в геноме *Rosa rugosa* сопоставимо с числом таких в геноме *Fragaria × ananassa* (соответственно 3477 и 3328), хотя первый вид имеет диплоидное число хромосом, а второй – октопloid гибридогенного происхождения.

Выравнивание последовательностей и разработка праймеров

Дальнейшая задача состояла в том, чтобы для каждого кластера выявить консервативные участки, к которым с помощью программы Primer3Plus можно было бы подобрать праймеры для амплификации полиморфных фрагментов. Данный этап усложнялся большим количеством и гетерогенностью SINE-элементов, что делало очень затруднительным их распознавание вручную, поэтому нами была разработана программа на языке

программирования Python. Суть программы заключается в поэтапной обработке файлов, начиная от прочтывания филогенетического дерева и вычисления из него блоков, которые представляют собой набор номеров последовательностей, составляющих собой семейство SINE-элементов. После получения файла с блоками в программе имеется функционал для дальнейшего декодирования этих номеров в генетические последовательности. Для упрощения дальнейшей работы у программы есть дополнительная функция создания файлов с разрешением FASTA с помещением в них генетических последовательностей, входящих в одно семейство. Исходный код данной программы размещен в приложении 1 (см. Electronic Supplementary Materials, Suppl. 1).

Созданная программа реализует поэтапную обработку данных, направленную на упрощение анализа семейств (кластеров, блоков) SINE-элементов. Работа программы осуществляется с использованием библиотек Python: tkinter, re, os, math, datetime, threading. Первая вкладка программы, названная "Обработка файла", позволяет проанализировать филогенетическое дерево, где код при помощи алгоритма выделяет и записывает в текстовый файл структурные блоки, соответствующие семействам SINE-элементов, каждый из которых представляет собой набор номеров последовательностей. Основой работы алгоритма является последовательное применение шаблонов (паттернов) для извлечения нужных данных из файлов на различных этапах обработки. Важным для получения корректных результатов является первоначальный паттерн, используемый при анализе документа, содержащего филогенетическое дерево. Исходные данные имеют характерные особенности: иерархия ветвей первоначально обозначается фигурными скобками в формате phylotree. При преобразовании файла в текстовый формат фигурные скобки заменяются круглыми, что учитывается при разработке шаблонов поиска. Паттерн для выделения блоков имеет вид: "`\s*\(\s*\(\s*\(\s*\(\s*\(\s*(.*?)\)?=\(\s*\(\s*\(\s*\(\s*\(\s*\(\s*(\n)\)`". Данная конструкция предназначена для поиска текста между двумя последовательностями из шести открывающих скобок, где "(" соответствует символу открывающей скобки, "\s*" означает ноль или более пробельных символов или переносов текста, "(.*?)" захватывает любые символы до выполнения условия в правой части паттерна, а "(?==...)" проверяет последующее наличие паттерна без его включения в результат, то есть это не вызовет ошибки, при которой часть информации не будет проанализирована из-за того, что не будет соблюдаться условие.

Данный паттерн не является универсальным, поскольку количество скобок в файлах, экспортруемых из Clustal Omega, может варьироваться. Поэтому в программу была интегрирована функция аддитивной настройки шаблона для оптимальной работы с различными наборами данных. При этом для конкретно изучаемых геномов земляники указанный паттерн показал пригодность для выявления кластеров с высокой степенью гомологии. Следующие вкладки программы – “Анализ блоков” и “Разделение результатов” – не требуют ручного введения паттерна, поскольку используют заранее подготовленные шаблоны для работы с файлами, где структура данных более предсказуема, так как задается мануально программой на первых этапах. После успешного формирования файла, содержащего кластеры SINE-элементов, во вкладке “Анализ блоков” программа предоставляет функциональность для преобразования номеров последовательностей в удобочитаемый вид.

довательностей в соответствующие генетические последовательности, что завершает цикл анализа.

Последовательности с наиболее высокой степенью гомологии (сходства) были сгруппированы, и для самых консервативных районов были разработаны праймеры таким образом, как это показано на рисунке 1. Отобранные праймеры проверили на способность образовывать шпильки различной конфигурации с помощью сервиса OlygoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

В результате было разработано 10 пар праймеров для *Rubus occidentalis*, 8 пар праймеров для *Rosa rugosa*, 5 пар праймеров для *Fragaria × ananassa*, 2 пары праймеров для *F. viridis* и 3 пары праймеров для *F. vesca* (см. табл. 1).

Апробация праймеров и отбор ISAP-маркеров

Праймеры, разработанные для малины и розы, были апробированы на ограниченных выборках образцов. Следует отметить, что ISAP-праймеры амплифицируют последовательности между двумя соседними SINE-элементами, расстояние между которыми и, соответственно, размер получаемых фрагментов могут быть значительными. Поэтому при подборе условий ПЦР важно добиться стабильного образования фрагментов больших размеров (1000–3000 пн).

В этих целях мы апробировали три разные программы (см. раздел «Материалы и методы») и показали, что наилучшие результаты давала программа 3, в которой в каждом цикле происходило увеличение времени элонгации. Такой принцип был, например, с успехом использован в работе по исследованию аллельного состава *S*-локуса у черешни при амплификации с консенсусными праймерами, которые должны были воспроизведимо генерировать фрагменты больших размеров (Sonneveld et al., 2003).

Для малины всего было разработано 10 пар праймеров для восьми SINE-семейств (см. табл. 1). Все они способны генерировать синтез продуктов ПЦР с ДНК изученных сортов малины. Однако часть разработанных маркеров оказалась непригодна для генотипирования: одни генерировали слишком большое количество фрагментов, что затрудняло процесс учета и занесения в базу данных, другие, наоборот, генерировали единичные фрагменты, а продукты амплификации третьих оказались мономорфны. Наиболее полиморфными и удобными для генотипирования оказались пары праймеров RubFam5_ISAP и RubFam8.2_ISAP, а также комбинация прямого праймера из пары RubFam5_ISAP и обратного из пары RubFam8.2_ISAP. Данные по выявленному полиморфизму у изученной выборки 28 сортов малины представлены в таблице 3.

Все отобранные маркеры были высокополиморфны – в каждом локусе выявлено от 9 до 20 ПЦР-фрагментов различной подвижности (аллелей); значения индекса PIC находились в интервале 0,848–0,938 при среднем 0,903. Наблюдалась также высокая степень гетерозиготности протестированных образцов – среднее число аллелей у одного генотипа в зависимости от маркера составило от 4,8 до 12.

Все праймеры, специфичные к последовательностям восьми SINE-семейств *Rosa rugosa* (см. табл. 1), успешно амплифицировали полиморфные фрагменты при апробации на ограниченной выборке образцов видов *R. multiflora* (19 генотипов) и *R. chinensis* (2 генотипа). Аналогично праймерам, разработанным для малины, многие из праймеров ROSE Cl## генерировали слишком большое

Таблица 3. Характеристики ISAP-маркеров, отобранных в результате апробации на ограниченных выборках образцов

Table 3. Characteristics of ISAP markers selected as a result of their testing on limited subsets of accessions

Маркер / Marker	Общее число выявленных полиморфных фрагментов / Total number of identified polymorphic fragments	Среднее число полиморфных фрагментов на образец / Average number of polymorphic fragments per accession	PIC
Маркеры, разработанные для <i>Rubus occidentalis</i>, при апробации на выборке сортов малины (28 генотипов) / Markers developed for <i>Rubus occidentalis</i> -- the results of testing on a subset of raspberry cultivars (28 genotypes)			
RubFam5_ISAP	9	4,8	0,848
RubFam8.2_ISAP	20	7,8	0,922
RubFam5_ISAP-F+ RubFam8.2_ISAP-R	16	12,0	0,938
Среднее значение / Mean value	15	8,2	0,903
Маркеры, разработанные на основе последовательности <i>Rosa rugosa</i>, при апробации на выборке образцов шиповника (21 генотип) / Markers developed for <i>Rosa rugosa</i> – the results of testing on a subset of <i>Rosa L.</i> representatives (21 genotypes)			
ROSE_Cl-0	19	5,9	0,950
ROSE_Cl-3	18	3,2	0,939
ROSE_Cl-6	52	8,6	0,944
ROSE_Cl-7	19	4,1	0,946
Среднее значение / Mean value	27	5,5	0,945

число фрагментов, трудно поддающихся учету. Однако нам удалось отобрать четыре пары, пригодные для проведения генотипирования образцов розы (см. табл. 3, рис. 3).

Аналогично ISAP-праймерам, разработанным для малины, праймеры на основе последовательности *R. rugosa* детектировали у исследованных образцов розы и шиповника очень высокий уровень полиморфизма – в среднем наблюдалось 27 аллелей, а при амплификации с праймерами ROSE_Cl-6 было выявлено 52 фрагмента с различной подвижностью. Значения PIC во всех случаях превышали 0,930; среднее число аллелей

у образца составило 5,5 несмотря на то, что подавляющее их число относилось к диплоидному виду *R. multiflora*.

Одним из главных критериев, предъявляемых к маркерным системам, используемым в генотипировании, является воспроизводимость (Omasheva et al., 2013). Поэтому в процессе апробации праймеров этому вопросу уделили большое внимание – проводили несколько повторностей ПЦР, а в случае малины использовали как минимум две независимо выделенные пробы ДНК. При этом наблюдали достаточно хорошую воспроизводимость результатов (рис. 4).

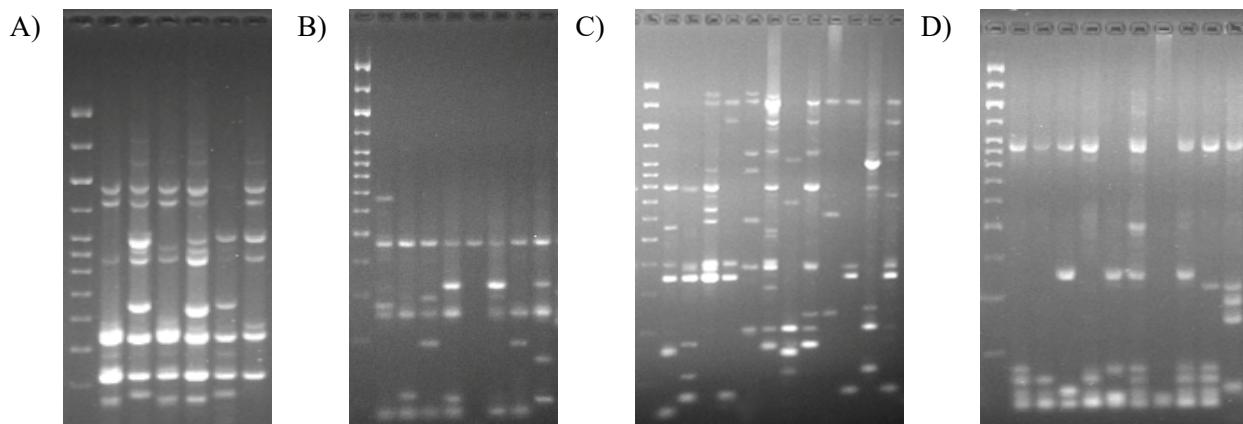


Рис. 3. Продукты амплификации с праймерами, разработанными на основе последовательности *Rosa rugosa* Thunb., при апробации с ДНК образцов шиповника: А) ROSE-Cl0, Б) ROSE-Cl3, В) ROSE-Cl6, Г) ROSE-Cl7

Fig. 3. PCR products with the primers based on *Rosa rugosa*'s sequence during their testing on the DNA of beach rose accessions: A) ROSE-Cl0, B) ROSE-Cl3, C) ROSE-Cl6, and D) ROSE-Cl7

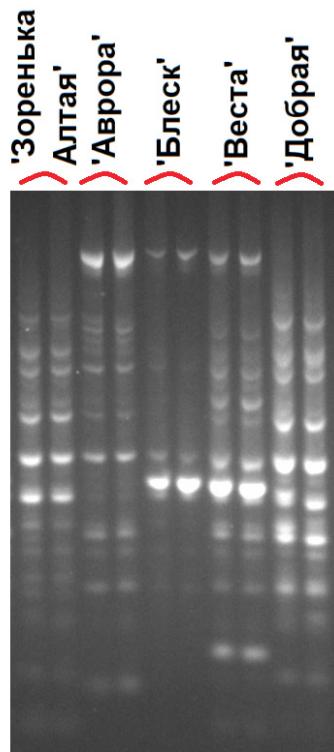


Рис. 4. Продукты ПЦР, полученные для двух независимо выделенных препаратов ДНК малины при использовании ISAP-праймеров RubFam5_F/RubFam8.2_R

Fig. 4. PCR products obtained for two independently isolated raspberry DNA samples using the ISAP primers RubFam5_F/RubFam8.2_R

Кроме того, проверили трансферабельность маркеров, то есть возможность применения праймеров, разработанных для одного рода, для амплификации с ДНК представителей другого. Для этого праймеры ROSE_Cl## использовали для проведения ПЦР с ДНК сортов земляники, груши и вишни (по 16 генотипов каждой культуры). Результаты представлены в таблице 4 и частично на рисунке 5. Видно, что в ряде случаев праймеры, специфичные к последовательностям розы, обладали способностью генерировать ПЦР-продукты и у других культур, относящихся к семейству розовых. Однако спектры про-

дуктов ПЦР были обеднены фрагментами, число которых в большинстве случаев не превышало 2 или 3. Тем самым основное преимущество ISAP-маркеров – высокий уровень выявляемого полиморфизма – свелось на нет. Вероятно, обедненность маркерных профилей можно объяснить сильной дивергенцией SINE-последовательностей даже у родственных видов и родов. Таким образом, при принципиальной возможности использовать одни и те же маркеры для генотипирования представителей разных видов ISAP-маркеры требуют индивидуальной разработки для каждой культуры.

Таблица 4. Применимость праймеров, разработанных для рода *Rosa* L., для амплификации с ДНК представителей других родов

Table 4. Transferability of ISAP markers developed for *Rosa* L. to other genera

Маркер / Marker	Род / Genus		
	<i>Fragaria</i>	<i>Prunus</i> subgen. <i>Cerasus</i>	<i>Pyrus</i>
ROSE-Cl0	-	-	-
ROSE-Cl1	-	+	-
ROSE-Cl3	+	+	+
ROSE-Cl5	-	-	+
ROSE-Cl6	+	+	-
ROSE-Cl7	+	+	-
ROSE-Cl10	-	-	-

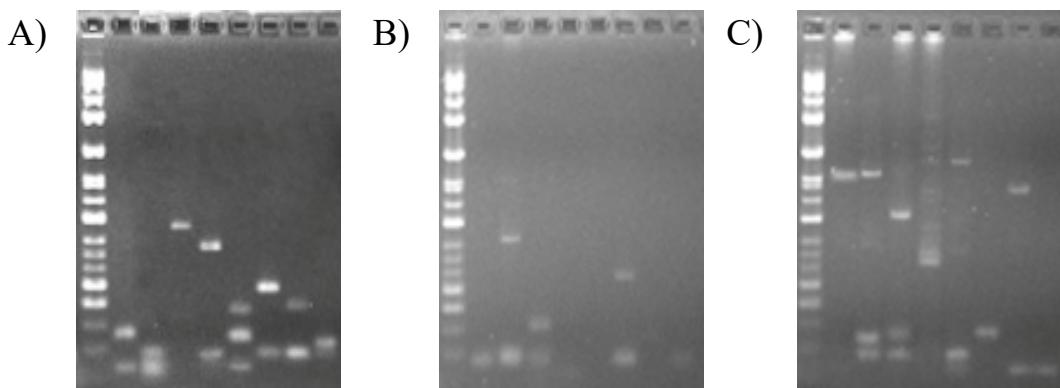


Рис. 5. Продукты амплификации ДНК различных культур семейства розовых с праймерами ROSE-Cl3, разработанными на основе последовательности генома *Rosa rugosa* L.: А) сорта земляники, В) сорта вишни, С) сорта груши

Fig. 5. DNA amplification products in other genera with the ROSE-Cl3 primers based on the *Rosa rugosa* genome sequence: A) strawberry cultivars, B) cherry cultivars, and C) pear cultivars

Заключение

В результате анализа геномов различных видов семейства розовых (а именно родов *Fragaria*, *Rosa* и *Rubus*) в каждом из них удалось выявить последовательности SINE-ретротранспозонов, на основании чего были разработаны праймеры для формирования ISAP-системы генотипирования, которую возможно применять для представителей семейства розовых. Отобранные маркеры характеризуются значительным полиморфизмом, что делает их ценными не только для генотипирования и паспортизации сортов, но также и для изучения дикорастущих популяций представителей видов этих родов. Перспективным в дальнейшем представляется применение как разработанных маркеров, так и изложенной в данной статье методики в целом для представителей других родов семейства розовых.

References / Литература

- Antonius-Klemola K., Kalendar R., Schulman A.H. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006;112(6):999-1008. DOI: 10.1007/s00122-005-0203-0
- Aristya G.R., Kasiamdari R.S., Setyoningrum R., Larasati B. Genetic variations of strawberry cultivars of *Fragaria × ananassa* and *Fragaria vesca* based on RAPD. *Biodiversitas*. 2019;20(3):770-775. DOI: 10.13057/biodiv/d200322
- Badakhshan H., Kamangar M.S., Mozafari A.A. Characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cultivars using SCoT, ISSR and IRAP markers. *Crop Breeding Journal*. 2018;8(2):61-72. DOI: 10.22092/CBJ.2018.123510.1028
- Borodulina O.R., Kramerov D.A. PCR-based approach to SINE isolation: Simple and complex SINEs. *Gene*. 2005;349:197-205. DOI: 10.1016/j.gene.2004.12.035
- Brozynska M., Furtado A., Henry R.J. Genomics of crop wild relatives: expanding the gene pool for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*. 2016;14(4):1070-1085. DOI: 10.1111/pbi.12454
- Clustal Omega. Multiple Sequence Alignment (MSA): [website]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/jDispatcher/msa/clustalo> [accessed Oct. 01, 2025].
- Dossett M., Bassil N.V., Lewers K.S., Finn C.E. Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) evaluated by simple sequence repeat markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2012;59(8):1849-1865. DOI: 10.1007/s10722-012-9808-8
- Folta K.M., Gardiner S.E. (eds). *Genetics and genomics of Rosaceae*. New York, NY: Springer; 2009. DOI: 10.1007/978-0-387-77491-6
- GDR. Genome Database of Rosaceae: [website]. Available from: <https://www.rosaceae.org> [accessed Oct. 01, 2025].
- Girichev G., Hanke M.V., Peil A., Flachowsky H. SSR fingerprinting of a German *Rubus* collection and pedigree based evaluation on trueness-to-type. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2015;64(1):89-103. DOI: 10.1007/s10722-015-0345-0
- Hadonou A.M., Sargent D.J., Wilson F., James C.M., Simpson D.W. Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping. *Genome*. 2004;47(3):429-438. DOI: 10.1139/g03-142
- Han C., Yang G., Zhang H., Peng H., Yang J., Zhu P. et al. Development and validation of genome-wide SSR molecular markers of *Tapes dorsatus*. *Molecular Biology Reports*. 2024;51(1):73. DOI: 10.1007/s11033-023-08949-6
- Hoban S., Bruford M., D'Urban Jackson J.D., Lopes-Fernandes M., Heuertz M., Hohenlohe P.A. et al. Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biological Conservation*. 2020;248:108654. DOI: 10.1016/j.biocon.2020.108654
- Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer™: Primer analysis tool: [website]. Available from: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> [accessed Oct. 01, 2025].
- IPCN Chromosome Reports. Index to Plant Chromosome Numbers (IPCN): [website]. Available from: <https://legacy.tropicos.org/Project/IPCN> [accessed Oct. 01, 2025].
- Kalendar R.N., Aizharkyn K.S., Khapilina O.N., Amenov A.A., Tagimanova D.S. Plant diversity and transcriptional variability assessed by retrotransposon-based molecular markers. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1):128-134. DOI: 10.18699/VJ17.231
- Kalendar R.N., Glazko V.I. Types of molecular genetic markers and their application. *Plant Physiology and Genetics*. 2002;34(4):141-156. [in Russian] (Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. *Физиология растений и генетика*. 2002;34(4):141-156).

- Kamnev A.M., Antonova O.Yu., Dunaeva S.E., Gavrilenco 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
- Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Bioinformatics*. 1994;10(2):189-191. DOI: 10.1093/bioinformatics/10.2.189
- Li Y., Jiang N., Sun Y. AnnoSINE: a short interspersed nuclear elements annotation tool for plant genomes. *Plant Physiology*. 2022;188(2):955-970. DOI: 10.1093/plphys/kiab524
- Liang Y., Lenz R.R., Dai W. Development of retrotransposon-based molecular markers and their application in genetic mapping in chokecherry (*Prunus virginiana* L.). *Molecular Breeding*. 2016;36(8):109. DOI: 10.1007/s11032-016-0535-2
- 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).
- Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Speranskaya A.S., Krinitina A.A., Dmitriev A.A., Belenikin M.S. et al. The FaRE1 LTR-retrotransposon based SSAP markers reveal genetic polymorphism of strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars. *Journal of Agricultural Science*. 2012;4(11):111. DOI: 10.5539/jas.v4n11p111
- Melnikova N.V., Speranskaya A.S., Darii M.V., Belenikin M.S., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V. Retrotransposon-based molecular markers and their use for genetic diversity assessment in plants. *Bulletin of the Russian State Agrarian Correspondence University*. 2013;14(19):32-35. [in Russian] (Мельникова Н.В., Сперанская А.С., Дарий М.В., Беленинин М.С., Дмитриев А.А., Кудрявцева А.В. Использование молекулярных маркеров, основанных на ретротранспозонах, для изучения генетического разнообразия растений. *Вестник Российского государственного аграрного заочного университета*. 2013;14(19):32-35).
- Mezhnina O.A., Urbanovich O.Yu. Identification of strawberry (*Fragaria ananassa*) using SSR-markers. *Molecular and Applied Genetics*. 2016;20:37-45. [in Russian] (Межнина О.А., Урбанович О.Ю. Идентификация сортов земляники садовой (*Fragaria ananassa*) с использованием SSR-маркеров. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2016;20:37-45).
- NCBI. National Center for Biotechnology Information: [website]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [accessed Oct. 01, 2025].
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973;70(12):3321-3323. DOI: 10.1073/pnas.70.12.3321
- Omasheva M.E., Aubakirova K.P., Ryabushkina N.A. Molecular markers. Causes and consequences of genotyping errors (Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования). *Biotechnology. Theory and Practice*. 2013;4(4):20-28. [in Russian] (Омашева М.Е., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования. *Биотехнология. Теория и практика*. 2013;(4):20-28). DOI: 10.11134/btp.4.2013.3
- Reiche B., Kögler A., Morgenstern K., Brückner M., Weber B., Heitkam T. et al. Application of retrotransposon-based Inter-SINE Amplified Polymorphism (ISAP) markers for the differentiation of common poplar genotypes. *Canadian Journal of Forest Research*. 2021;51(11):1650-1663. DOI: 10.1139/cjfr-2020-0209
- Schwichtenberg K., Wenke T., Zakrzewski F., Seibt K.M., Minoche M., Dohm J. et al. Diversification, evolution and methylation of short interspersed nuclear element families in sugar beet and related Amaranthaceae species. *The Plant Journal*. 2015;85(2):229-244. DOI: 10.1111/tpj.13103
- Seibt K.M., Wenke T., Wollrab C., Junghans H., Muders K., Dehmer K.J. et al. Development and application of SINE-based markers for genotyping of potato varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012;125(1):185-196. DOI: 10.1007/s00122-012-1825-7
- Sonneveld T., Tobutt K.R., Robbins T.P. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;107(6):1059-1070. DOI: 10.1007/s00122-003-1274-4
- Sormin S.Y.M., Purwantoro A., Setiawan A.B., Teo C.H. Application of inter-SINE amplified polymorphism (ISAP) markers for genotyping of *Cucumis melo* accessions and its transferability in *Coleus* spp. *Biodiversitas*. 2021;22(5):2918-2929. DOI: 10.13057/biodiv/d220557
- Sun J., Hao Y., Li L., Song Y., Fan L., Zhang S. et al. Evaluation of new IRAP markers of pear and their potential application in differentiating bud sports and other Rosaceae species. *Tree Genetics and Genomes*. 2015;11(2):25. DOI: 10.1007/s11295-015-0849-y
- UGENE team; Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(15):e115. DOI: 10.1093/nar/gks596
- Vetchinnikova L.V., Titov A.F., Topchieva L.V., Rendakov N.L. Estimation of genetic diversity of Karelian birch populations in Karelia using microsatellite markers. *Ecological Genetics*. 2012;10(1):34-37. [in Russian] (Ветчинникова Л.В., Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Рендаков Н.Л. Оценка генетического разнообразия популяций карельской бересклета в Карелии с помощью микросателлитных маркеров. *Экологическая генетика*. 2012;10(1):34-37).
- Wenke T., Döbel T., Sörensen T.R., Junghans H., Weisshaar B., Schmidt T. Targeted identification of short interspersed nuclear element families shows their widespread existence and extreme heterogeneity in plant genomes. *The Plant Cell*. 2011;23(9):3117-3128. DOI: 10.1105/tpc.111.088682

Информация об авторах

Антон Михайлович Камнев, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, antonkamen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8103-2191>

Михаил Евгеньевич Лапкасов, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, m.lapkasov@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-0178-0805>

Алина Артуровна Тюкалова, магистрант, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, distantsiya2020@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0006-6722-0907>

Серафима Валерьевна Жидяева, 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, zhidiyaeva.sv@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0009-0000-2982-0115>

Ольга Юрьевна Антонова, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, 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, olgaant326@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>

Information about the authors

Anton M. Kamnev, Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, antonkamen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8103-2191>

Mikhail E. Lapkasov, Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, m.lapkasov@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-0178-0805>

Alina A. Tyukalova, MSc Student, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settlem., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, distantsiya2020@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0006-6722-0907>

Serafima V. Zhidiyaeva, Associate Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settlem., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, zhidiyaeva.sv@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0009-0000-2982-0115>

Olga Yu. Antonova, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, Researcher, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settlem., Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, olgaant326@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>

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 01.12.2025; одобрена после рецензирования 15.12.2025; принятая к публикации 16.12.2025.
The article was submitted on 01.12.2025; approved after reviewing on 15.12.2025; accepted for publication on 16.12.2025.