

УДК: 577.212.3

Ортиков Эльер Абдумажитович,
аспирант,
Алиева Кумуш Баходир кизи,
младший научный сотрудник,
Худайбердиева Сабина Алишер кизи,
младший научный сотрудник,
Асатуллаев Тимур Нусратуллаевич,
младший научный сотрудник,
Курбаналиева Мамура Баходир кизи,
младший научный сотрудник,
Мустафина Феруза Усмановна,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан

Ortikov Elyor Abdumajidovich,
PhD student,
Alieva Kumush Bahodir kizi,
junior scientific fellow,
Khudayberdieva Sabina Alisher kizi,
junior scientific fellow,
Asatulloev Timur Nusratulloevich,
junior scientific fellow,
Kurbanalieva Mamura Bahodir kizi,
junior scientific fellow,
Mustafina Feruza Usmanovna,
candidate of Biological Sciences,
senior fellow,

Institute of Botany of the Academy of Sciences of Uzbekistan

ПОЛИМОРФИЗМ УЧАСТКОВ ДНК ХЛОРОПЛАСТОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПОДРОДА *SCORPIRIS* SPACH (*IRIDACEAE* JUSS.)

Аннотация. Информация о результатах исследований полиморфных участков хлоропластного генома 4х эндемичных видов подрода *Scorpiris*, а именно *Juno austrotschatkalica* Tojibaev, F. Karim, et Turgunov, *Juno pseudocapnoides* Rukšāns, *Juno victoris* (F.O. Khass., Khuzhan. and Rakhimova) M.B. Crespo, Mart.-Azorín and Mavrodiev и *Iris hippolyti* (Vved.) Kamelin, представлены в данной статье. Исследования были направлены на выявление наиболее варибельных участков для использования при дизайне праймеров.

Ключевые слова: полиморфизм, хлоропластный геном, *Scorpiris*.

***SCORPIRIS* SPACH (*IRIDACEAE* JUSS.) ТУКУМ АЛДЫНДАГЫ АЙРЫМ ТҮРЛӨРҮНДӨГҮ ХЛОРОПЛАСТТАРДЫН ДНК БӨЛҮКТӨРҮНҮН ПОЛИМОРФИЗМИ**

Аннотация. *Scorpiris* түркүмүнүн хлоропласт геномунун 4 эндемикалык түрүнүн полиморфтук аймактарын изилдөөнүн натыйжалары жөнүндө маалымат, атап айтканда

Juno austrotschatkalica Tojibaev, F. Karim, et Turgunov, *Juno pseudocapnoides* Rukšāns, *Juno victoris* (F.O. Khass., Khuzhan. and Rakhimova) M.B. Crespo, Mart.-Azorín and Mavrodiev и *Iris hippolyti* (Vved.) Kamelin ушул макалада берилген. Изилдөө праймердин дизайнында колдонуу үчүн эң өзгөрүлмө аймактарды аныктоого багытталган.

Негизги сөздөр: полиморфизм, хлоропластык геном, *Scorpiris*.

POLYMORPHISM OF CHLOROPLAST DNA REGIONS OF SOME SPECIES FROM *SCORPIRIS* SPACH SUBGENERA (*IRIDACEAE* JUSS.)

Abstract. The information about the research results of the polymorphic regions of chloroplast genomes of 4 endemic species from *Scorpiris* subgenera, namely *Juno austrotschatkalica* Tojibaev, F. Karim, et Turgunov, *Juno pseudocapnoides* Rukšāns, *Juno victoris* (F.O. Khass., Khuzhan. and Rakhimova) M.B. Crespo, Mart.-Azorín and Mavrodiev and *Iris hippolyti* (Vved.) Kamelin, is presented in this article. The research aimed to detect the most variable regions to use for specific primer design.

Key words: polymorphism, plastome, *Scorpiris*.

Iridaceae Juss является одной из самых больших семейств в порядке *Asparagales* Link., включающей около 1800 видов, объединенных в 60 родов. Семейство подразделяется на четыре подсемейства: *Isophysidoideae* Takhtajan ex Thorne and Reveal., *Nivenioideae* Goldblatt, *Iridoideae* Eaton и *Ixioideae* [1]. *Iridoideae* включает четыре большие трибы: распространенные в Старом Свете виды трибы *Irideae*; произрастающие в большинстве своем в Новом Свете виды трибы *Sisyrinchieae*; и две трибы, включающие в себя виды, произрастающие только в Новом Свете: *Tigridaeae* и *Trimezieae* [1, 2, 3, 4].

Род *Iris* L. является одним из наиболее распространенных в Северном полушарии, включающем около 250–300 видов [5, 6]. Современные филогенетические исследования доказали, что род *Iris* s.l. является одним из наиболее сложных: некоторые авторы предложили выделить данный род в качестве отдельной трибы [7], другие авторы считают необходимым выделить несколько подродов внутри рода [8, 9].

Согласно классификации Mathew (1989), род *Iris* подразделяется на шесть подродов и двенадцать секций: *Hermodactyloides* Spach., *Iris*, *Limniris* (Tausch) Spach, *Nepalensis* (Dykes) G.H.M.Lawr., *Scorpiris* Spach

и *Xiphium* (Mill.) Spach, из которых подрод *Nepalensis* и подрод *Xiphium* являются монофилетическими, а подрод *Limniris* полифилетическим. Подрод *Scorpiris* и подрод *Iris* определяются монофилетическими, если *I. falcifolia* исключается из подрода *Iris* и перемещается в подрод *Scorpiris* [7, 8].

Род *Iris* не является монофилетическим [8, 11, 12, 13, 14], однако, если роды луковичных видов *Iridodictyum* s.str., *Juno* и *Xiphium*, а также роды *Chamaeiris* Medik. и *Junopsis* Schulze, включающие виды, имеющими корневища и корни, а также монотипные роды *Belamcanda* (*I. domestica*), *Hermodactylus* (*I. tuberosa*) и *Pardanthopsis* (*I. dichotoma*) будут включены в *Iris* s.l., в этом случае род *Iris* становится монофилетическим, но весьма гетерогенным [7, 8]. Центральная Азия по праву является одним из центров разнообразия рода *Iris* L., где произрастает 54 вида [15], 36 из которых являются эндемиками для данной территории. Один из наиболее больших подродов *Scorpiris* включает секцию *Juno* (Tratt.) Benth. ex Benth. et Hook с 26 видами и секцию *Physocaulon* (Rodion.) Mathew et Wendelbo, ex Wendelbo с 6 видами.

Большинство авторов в филогенетических исследованиях семейства *Iridaceae* используют различные участки хлоропластного генома: ген *rps4* [16], интроны *rps4* и

trnL, спейсерного участка *trnL/trnF* и ген *rbcL* [4], ген *rps4* и спейсерный участок *trnL/trnF* [11], ген *matK*, интрон *trnK* и спейсерный участок *trnL/trnF* [8, 12, 13], ген *matK*, спейсерные участки *rpl14-rps8*, *infA-rpl36*, *trnE/trnT*, интрон *trnL* и спейсерный участок *trnL/trnF* [17] и т.д. Однако даже эти участки часто не достаточно вариабельны для получения хороших результатов при реконструкции филогенеза.

Важно отметить, что применение наиболее часто используемых участков хлоропластного ДНК не всегда дает хорошую резолюцию при реконструкции филогенетических взаимосвязей внутри семейства Iridaceae.

В данной статье описываются хлоропластные геномы четырех видов подрода *Scorpiris*: *Juno austrotschatkalica* Tojibaev, F. Karim, et Turgunov, *J. pseudocapnoides* Rukšāns, *J. victoris* (F.O. Khass., Khuzhan. and Rakhimova) M.B. Crespo, Mart.-Azorín and Mavrodiev и *Iris hippolyti* (Vved.) Kamelin с целью выявления наиболее подходящих участков – кандидатов для разработки специфичных праймеров.

Материал и методы: гербарный материал четырех видов ириса, *J. austrotschatkalica*, *J. pseudocapnoides*, *J. victoris* и *I. hippolyti* собран в ходе экспедиционных обследований в период 2020–2021 гг. и передан в гербарный фонд TASH. Свежесобранные ли-

стья без признаков инфицирования высушались с использованием индикаторного силикогеля. Выделение ДНК осуществлялось с использованием 2% СТАБ, секвенирование материала производилось на Illumina HiSeq 4000. Аннотация генома проводилась с использованием Geneious v.10.0.2 [18]. С целью исследования вариабельных участков, хлоропластные геномы, а также отдельные участки генома, выравнивались с использованием Mauve v. 2.3.1 [19]. Статистические данные по содержанию нуклеотидов, частоты использования кодонов получены с использованием программ MEGA6 v. 6.06 [20], показатели нуклеотидного разнообразия определялись с использованием DnaSP v. 5.10.01 [21]. Анализ повторяющихся последовательностей проводился с использованием программ Tandem Repeats Finder v. 4.07b [22] и REPuter [23]. Повторяющиеся нуклеотидные последовательности длиной ≥ 30 bp были использованы для дальнейшего анализа. Вторичная структура анализировалась с использованием программы MFOLD [24].

Результаты. Хлоропластные геномы *J. austrotschatkalica*, *J. pseudocapnoides*, *J. victoris*, и *I. hippolyti* имеют типичное строение, характерное для покрытосеменных растений, включая структурную организацию, набор генов и последовательность их расположения (табл. 1, 2).

Таблица 1

Сравнение основных структурных особенностей пластов *Juno austrotschatkalica*, *Juno pseudocapnoides*, *Juno victoris* и *Iris hippolyti*

| Свойства | <i>J. austrotschatkalica</i> | <i>J. pseudocapnoides</i> | <i>J. victoris</i> | <i>I. hippolyti</i> |
|--|------------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|
| Длина хлоропластного генома (bp) | 150,887 | 151,393 | 151,143 | 151,171 |
| Длина инвертированных повторов (IR) (bp) | 25,455 | 25,463 | 25,455 | 25,463 |
| Длина LSC (bp) | 81,732 | 82,228 | 81,929 | 81,938 |
| Длина SSC (bp) | 18,245 | 18,239 | 18,304 | 18,307 |
| Число кодирующих участков | 133 | 133 | 133 | 133 |
| Число генов | 113 | 113 | 113 | 113 |
| Число белок кодирующих генов | 79 | 79 | 79 | 79 |
| Число генов, дуплированных в инвертированных повторах IR | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Число открытых рамок считывания | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Число псевдогенов | 1 (<i>yefl</i>) | 1 (<i>yefl</i>) | 1 (<i>yefl</i>) | 1 (<i>yefl</i>) |
| Число генов <i>tRNA</i> | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Число генов <i>rRNA</i> | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Число генов с интронами | 20 | 20 | 20 | 20 |

В сравнительном аспекте были исследованы 83 белок кодирующих участков, 113 спейсеров и 18 интронов хлоропластных геномов видов *J. austrotschatkalica*, *J. pseudocarpnoides*, *J. victoris* и *I. hippolyti*, принадлежащих роду *Iris*. В результате сравнительного анализа определены 14 участков

генома с высоким значением нуклеотидной вариабельности и дивергентности длин нуклеотидных последовательностей (рис. 1, 2): *rps16/trnQ*, *atpF/atpH*, *rps3/rpl22*, *trnK / rps16*, *rps15/ycf1*, *petA/psbJ*, *lpsbA*, *trnG/trnfM*, *trnR/atpA*, *atpA/atpF*, *rps8/rpl14*, *trnL/trnF*, *trnG/trnR* и *psaA/ycf3*.

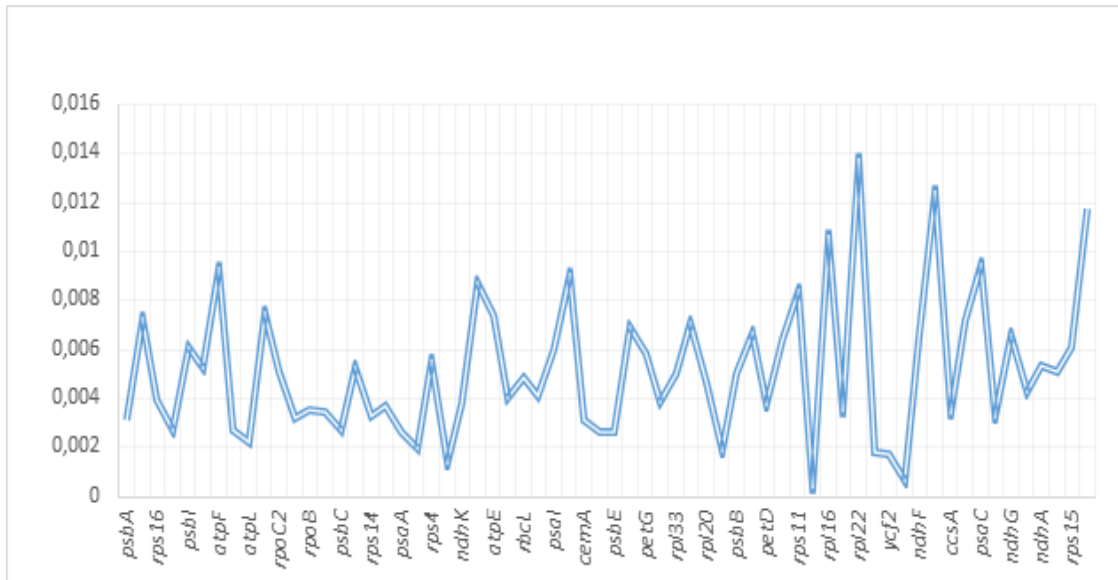


Рисунок 1. Полиморфизм белок кодирующих генов пластовов *Juno austrotschatkalica*, *Juno pseudocarpnoides*, *Juno victoris* и *Iris hippolyti*. Гены с длиной <200 п.о. и показателем нуклеотидного разнообразия <0,02 не отражены на графике

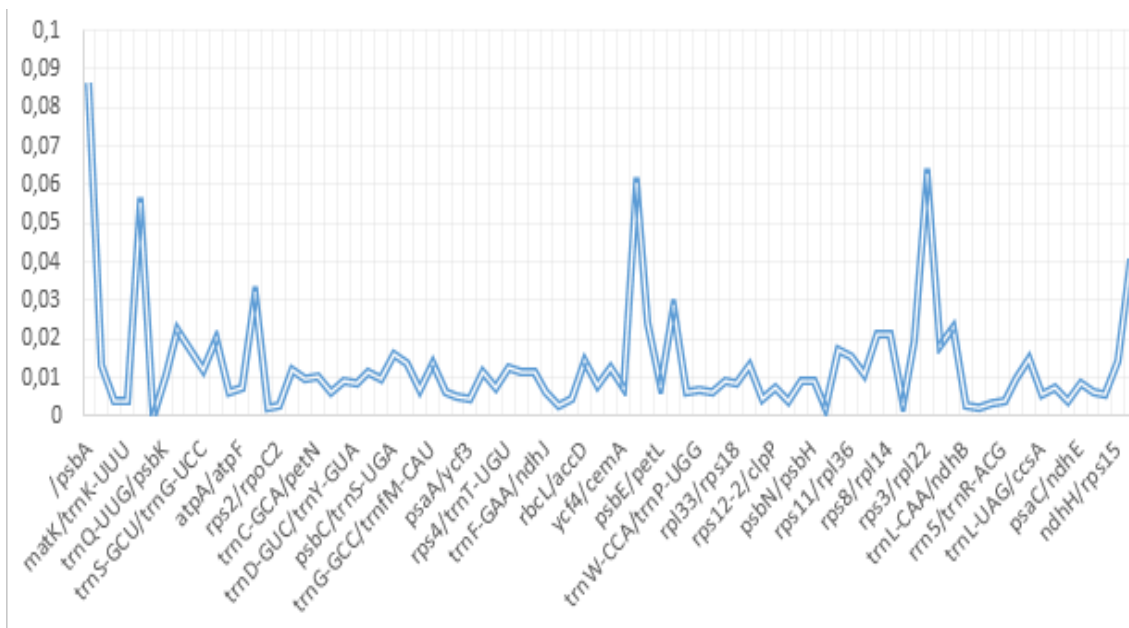


Рисунок 2. Полиморфизм спейсерных участков пластовов *Juno austrotschatkalica*, *Juno pseudocarpnoides*, *Juno victoris* и *Iris hippolyti*. Гены с длиной <200 п.о. и показателем нуклеотидного разнообразия <0,02 не отражены на графике

Таблица 2

Список генов, идентифицированных в пластомах *Juno austrotschatkalica*, *Juno pseudocapnoides*, *Juno victoris* и *Iris hippolyti*

| Группа генов | Название генов | Количество |
|--|---|------------|
| Рибосомальные РНК | rrn4.5 (x2), rrn5 (x2), rrn16 (x2), rrn23 (x2) | 4 |
| Транспортные РНК | trnA-UGC(x2) ^a , trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnM-CAU, trnG-UCC ^a , trnG-GCC, trnH-GUG(x2), trnI-CAU (x2), trnI-GAU (x2) ^a , trnK-UUU ^a , trnL-CAA (x2), trnL-UAA ^a , trnL-UAG, trnM-CAU, trnN-GUU (x2), trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG (x2), trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-GAC(x2), trnV-UAC ^a , trnW-CCA, trnY-GUA | 30 |
| Белоккодирующие гены | | |
| Фотосинтез | | |
| Фотосистема I | psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ, ycf3 ^b | 5 |
| Фотосистема II | psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ | 15 |
| Комплекс цитохром b/f | petA, petB ^a , petD ^a , petG, petL, petN | 6 |
| NADH-дегидрогеназа | ndhA ^a , ndhB(x2) ^a , ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK | 11 |
| АТФ синтаза | atpA, atpB, atpE, atpF ^a , atpH, atpI | 6 |
| Большая субъединица Rubisco | rbcL | 1 |
| АТФ-зависимые протеазы | clpP ^b | 1 |
| Белки мембран | cemA | 1 |
| Рибосомальные белки | | |
| Большие субъединицы | rpl2 (x2, part) ^a , rpl14, rpl16 ^a , rpl20, rpl22, rpl23 (x2), rpl32, rpl33, rpl36 | 9 |
| Малые субъединицы | rps2, rps3, rps4, rps7 (x2), rps8, rps11, rps12 ^a (x2), rps14, rps15, rps16 ^a , rps18, rps19 | 12 |
| Транскрипция/трансляция | | |
| DNA-зависимые RNA полимеразы | rpoA, rpoB, rpoC1 ^a , rpoC2 | 4 |
| Другие белки | accD, ccsA, infA, matK | 4 |
| Гипотетические белки и открытые рамки чтения | ycf1 (x2, part), ycf2 (x2), ycf4 | 3/4 |
| Общее количество уникальных генов | | 113 |

Скрининг этих участков указал на наличие вторичных структурных образований («шпилек») (табл. 3), большинство из которых формировалось с участием палиндромных или прямых тандемных повторов. Часто, вторичные структуры приводят к образованию инверсий и использование участков генома, где обнаруживаются вторичные структурные образования, приводит к ошибочным заключениям. Среди проанализированных участков хлоропластных геномов *J. austrotschatkalica*, *J. pseudocapnoides*, *J.*

victoris и *I. hippolyti*, спейсерные участки *atpF/atpH*, *rps15/ycf1*, *atpA/atpF*, *trnL/trnF*, *trnG/trnR*, *psaA/ycf3* характеризовались высоким уровнем варибельности и отсутствием «шпилек». Эти участки рекомендованы как маркерные участки для дизайна *Iris* специфичных праймеров. Данная работа выполнена в рамках бюджетной программы ПФИ-5 «Дерево жизни: однодольные Узбекистана» Института ботаники Академии наук Республики Узбекистан.

Таблица 3
Вариабельные участки пластовов *Juno austrotschatkalica*, *Juno pseudocarpoides*, *Juno victoris* и *Iris hippolyti*

| # | Участок | Индели (bp) | Число полиморфных участков | Нуклеотидное разнообразие | Дивергентность (%) | Примечания |
|----|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|--|
| 1 | <i>rps16</i> / <i>trnQ-UUG</i> | 1;206;1 | 13 | 0,00967 | 17.1 | Палиндромная повторяющаяся последовательность длиной 24 п.о., формирующая шпилечную вторичную структуру |
| 2 | <i>atpE/atpH</i> | 1;99;2 | | 0.03152 | 14.8 | Вторичные структуры не формируются. |
| 3 | <i>rps3/rpl22</i> | 1;1;26;6 | 10 | 0.0625 | 13.6 | Две прямые повторяющиеся последовательности длиной 20 п.о. каждая, формирующие шпилечную вторичную структуру; хлоропластный геном <i>J. pseudocarpoides</i> |
| 4 | <i>trnK-UUU</i> / <i>rps16</i> | 2;1;11;120;2;1;6;3 | 12 | 0.0546 | 11.7 | Палиндромная повторяющаяся последовательность длиной 20 п.о., формирующая шпилечную вторичную структуру; хлоропластные геномы <i>J. austrotschatkalica</i> и <i>J. pseudocarpoides</i> |
| 5 | <i>rps15/ycf1</i> | 2;25;13;4;1;4;5;2;2;1;36 | 29 | 0.04088 | 11.3 | Вторичные структуры не формируются. |
| 6 | <i>petA/psbJ</i> | 5;1;7;134 | 42 | 0.05971 | 11.4 | Две диспергированные палиндромные повторяющиеся последовательности длиной 21 п.о. каждая, формирующие шпилечную структуру |
| 7 | <i>psbA</i> | 0 | 13 | 0.08658 | 8.7 | Палиндромная повторяющаяся последовательность длиной 20 п.о. |
| 8 | <i>trnG-GCC</i> / <i>trnM-CAU</i> | 7;1;20;6 | 10 | 0.01353 | 7.8 | Две прямые повторяющиеся последовательности длиной 20 п.о., формирующие шпилечную вторичную структуру; хлоропластный геном <i>J. pseudocarpoides</i> |
| 9 | <i>trnR-UUCU</i> / <i>atpA</i> | 1;1;13 | 3 | 0.00612 | 7 | Две прямые повторяющиеся последовательности длиной 13 п.о. каждая, формирующие шпилечную вторичную структуру; хлоропластный геном <i>I. hippolyti</i> |
| 10 | <i>atpA/atpF</i> | 7 | 1 | 0.00714 | 6.8 | Вторичные структуры не формируются. |
| 11 | <i>rps8/rpl14</i> | 20 | 10 | 0.0625 | 6.8 | Две прямые повторяющиеся последовательности длиной 20 п.о., формирующие шпилечную вторичную структуру; хлоропластный геном <i>J. pseudocarpoides</i> |
| 12 | <i>trnL-UAA</i> / <i>trnF-GAA</i> | 2;5;35 | 7 | 0.01153 | 6.7 | Вторичные структуры не формируются. |
| 13 | <i>trnG-UCC</i> / <i>trnR-UUCU</i> | 6;4;3 | 5 | 0.0202 | 5.6 | Вторичные структуры не формируются. |
| 14 | <i>psaA/ycf3</i> | 6;1;2;4;24;4 | 5 | 0.00473 | 4.4 | Вторичные структуры не формируются. |

Литература

1. Goldblatt P (1990) Phylogeny and classification of the Iridaceae. *Ann Missouri Bot Gard* 77: 607–627.
2. Goldblatt P, Manning JC (2008) The Iris family. Natural history and classification. Timber Press Incl, London 290.
3. Goldblatt P (1991) An overview of the systematics, phylogeny and biology of the southern African Iridaceae. *Contributions from the Bolus Herbarium* 13:1-74.
4. Reeves G, Chase MW, Goldblatt P, Rudall P, Fay MF, Cox AV, Lejeune B, Souza-Chies T (2001) Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. *Am J Bot* 88:2074-2087. <https://doi.org/10.2307/3558433>
5. Goldblatt P, Manning JC, Rudall P (1998) Iridaceae. In: Kubitzki, K. (Ed.) The families and genera of flowering plants. Springer, Berlin, Heidelberg and New York 295–333. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7_37
6. Crespo MB, Martínez-Azorín M, Mavrodiev E (2015) Can a rainbow consist of a single colour? A new comprehensive generic arrangement of the ‘Iris sensu latissimo’ clade (Iridaceae), congruent with morphology and molecular data. *Phytotaxa* 232(1):1-78. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.232.1.1>
7. Mavrodiev EV, Martínez-Azorín M, Dranishnikov P, Crespo MB (2014) At least 23 genera instead of one: The case of Iris L. s.l. (Iridaceae). *PLOS One* 9(8):e106459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106459>
8. Wilson CA (2011) Subgeneric classification in Iris re-examined using chloroplast sequence data. *Taxon* 60:27–35. <https://doi.org/10.1002/tax.601004>
9. Lazkov GA, Sennikov AN, Koichubekova GA, Naumenko AN (2014) Taxonomic corrections and new records in vascular plants of Kyrgyzstan. *Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica* 90:91–110.
10. Mathew B. (1989) The Iris, ed. 2. Timber Press, Portland 215.
11. Tillie N, Chase MW, Hall T (2001) Molecular studies in the genus Iris L.: a preliminary study. *Annali di Botanica (Roma)* 1:105–112. <https://doi.org/10.4462/annbotrm-9068>
12. Wilson CA (2004) Phylogeny of Iris based on chloroplast matK gene and trnK intron sequence data. *Mol Phylog Evol* 33:402–412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2004.06.013>
13. Wilson CA (2009) Phylogenetic relationships among the recognized series in Iris section Linniris. *Syst Bot* 34:277–284. <http://dx.doi.org/10.1600/036364409788606316>
14. Mavrodiev EV (2010) Is there an alternative treatment of including genus Belamcanda to the genus Iris (Iridaceae)? In: Shmakov AI. (Ed.) Problems of botany of South Siberia and Mongolia. Proceedings of the 9th International Scientific and Practical Conference (Barnaul, 25–27 October 2010):148–155. [in Russian].
15. Khassanov FO, Rakhimova N (2012) Taxonomic revision of the genus Iris L. (Iridaceae Juss.) for the flora of Central Asia. *STAPFIA* 97:174–179.
16. Souza-Chies TT, Bittar G, Nadot S, Carter L, Besin E, Lejeune B (1997) Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene rps4. *Plant Syst Evol* 204:109–123. <https://doi.org/10.1007/BF00982535>
17. İkinci N, Hall T, Lledo MD, Clarkson JJ, Tillie N, Seisums A, Saito T, Harley M, Chase MW (2011) Molecular phylogenetics of the Juno irises, Iris subgenus Scorpiris (Iridaceae), based on six plastid markers. *Bot J Linn Soc* 167:281–300. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01176.x>

18. *Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A* (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12):1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
19. *Darling AE, Mau B, Perna NT* (2010) Progressive Mauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE* 5(6): e11147. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
20. *Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S* (2013) MEGA6: Molecular evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12):2725–2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
21. *Librado P, Rozas J* (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11):1451-1452. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
22. *Benson G*. (1999) Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27(2):573–580. <https://doi.org/10.1093/nar/27.2.573>
23. *Kurtz S, Choudhuri JV, Ohlebusch E, Schleiermacher C, Stoye J, Giegerich R* (2001) REPuter: The manifold applications of repeat analysis on a genomic scale. *Nucleic Acids Res* 29(22):4633-4642. <http://dx.doi.org/10.1155/2008/41269610.1093/nar/29.22.4633>
24. *Zuker M* (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31(13):3406–3415. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg595>