

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИДАТНОСТІ PSBA-TRNH ТА
ITS1-5.8S -ITS2 МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ
БАРКОДИНГУ ВИДІВ РОДІВ *GONOLIMON* ТА
*GALINSOGA***

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконав:

студент 4 курсу, групи 407
спеціальність 162 Біотехнології
та біоінженерія

Шурипа Владислав Олександрович

Керівник:

Кандидат біологічних наук,
доцент **Шелифіст А.Є.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № ____ від _____ 2024 р.
Зав. кафедри _____ проф. Волков Р.А.

Чернівці – 2024

Анотація

Бакалаврська робота присвячена дослідженню нуклеотидних послідовностей *psbA-trnH* та ITS1-5.8S -ITS2 хлоропластних міжгенних спейсерів представників роду *Goniolimon* та *Galinsoga*. Проводиться аналіз доцільності їх використання при вирішенні питань систематики в межах роду *Galinsoga*.

Мінімальний ступінь спорідненості з показником 91,9% виявлений між зразками *G. besserianum*. Міжгенні спейсери *psbA-trnH* області *Galinsoga parviflora* та *G. quadriradiata* становлять 371 нп і володіють 100% ступенем спорідненості.

Нуклеотидні послідовності ITS1-5.8S-ITS2 ділянок ядерної рДНК представників роду *Galinsoga* також є високоподібними. У геномі *G. quadriradiata* виявлені п'ять різновидів цієї ділянки.

Ключові слова: *psbA-trnH*, ITS1-5.8S-ITS2, міжгенний спейсер, *Galinsoga*, *Goniolimon*, нуклеотидна послідовність.

The bachelor's thesis is devoted to the study of nucleotide sequences *psbA-trnH* and ITS1-5.8S -ITS2 of chloroplast intergenic spacers of representatives of the genera *Goniolimon* and *Galinsoga*. An analysis of the expediency of their use in solving taxonomic issues within the genus *Galinsoga* is carried out.

The minimum degree of relatedness with an indicator of 91.9% was found between samples of *G. besserianum*. The *psbA-trnH* intergenic spacers of *Galinsoga parviflora* and *G. quadriradiata* are 371 np and have a 100% degree of relatedness.

The ITS1-5.8S-ITS2 nucleotide sequences of nuclear rDNA regions of representatives of the genus *Galinsoga* are also highly similar. Five varieties of this region were found in the *G. quadriradiata* genome.

Keywords: *psbA-trnH*, ITS1-5.8S -ITS2, intergenic spacer, *Galinsoga*, *Goniolimon*, nucleotide sequences.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ В.О.Шурипа

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Загальні риси будови генному, характеристика та особливості використання молекулярних маркерів у дослідженнях	6
1.1.1. Загальна характеристика генному за його інформаційним (спадковим) наповненням	6
1.1.2. Загальна характеристика існуючих молекулярних маркерів	7
1.2. Сучасний стан та перспективи використання молекулярних маркерів у філогенії родині <i>Asteraceae</i> та роду <i>Galinsoga</i>	11
1.2.1. Характеристика родів родини <i>Asteraceae</i>	11
1.2.2. Характеристика видів <i>G. parviflora</i> та <i>G. quadriradiata</i>	14
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	16
2.1. Об'єкт та матеріал для досліджень	16
2.2. Методи досліджень	18
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	24
3.1. Характеристика придатності хлоропластної ділянки <i>psbA-trnH</i> для баркодингу видів родів <i>Goniolimon</i> та <i>Galinsoga</i>	24
3.2. Характеристика придатності ITS1-5.8S-ITS2 ділянки 35S рДНК для баркодингу видів роду <i>Galinsoga</i>	29
ВИСНОВКИ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	38
ДОДАТКИ	45
ДОДАТОК А. Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях	46
ДОДАТОК Б. Філогенія таксонів рослин та особливості будови ділянок молекулярних маркерів	49

ВСТУП

За свою історію людство встигло акумулювати велику кількість інформації про різноманіття живих організмів, зокрема представників рослинного світу, що призвело до необхідності їх класифікації. На даний момент розвитку систематики, задля більш точного визначення спорідненості варто використовувати ДНК-маркери, по яким можливе точніше визначення місця організму на «еволюційному дереві» (рис. 1 додатку Б) (Buzurović et al., 2020), оскільки хромосомні зміни займають вагоме місце в диверсифікації усього живого. Так, порівняння каріотипів на філогенетичному рівні дозволяє заглибитися в еволюційну історію (Jang et al., 2013).

В контексті вище сказаного, варто згадати і про необхідність перегляду існуючої систематики, в зв'язку з переходом від APG III до APG IV (рис. 1 додатку Б) (Byung et al. 2016). Одним із «інструментів» такого аналізу може слугувати використання ядерних спейсерів ITS (Internal Transcribed Spacer), як генетичних маркерів. Зокрема їх копійності, довжини та ступеня мінливості (Garcia et al., 2010).

Ядерні спейсери ITS представників родини *Asteraceae*, на разі, активно досліджуються та залучаються до філогенетичного аналізу (Wicke et al., 2011), встановлення їхньої еволюції. Також, вони можуть дати поштовх до розуміння причин, характеру появи та успадкування поліплоїдій у рослинному світі (Fernández et al., 2022), а також впливу поліплоїдії та розміру геному на здатність рослин до накопичення поживних речовин та різних способів розмноження (Inceer et al., 2018).

Для роду *Goniolimon* характерний високий рівень внутрішньовидового поліморфізму, що змушує використовувати інші способи класифікації, зокрема використання молекулярних маркерів (Buzurović et al., 2018). Також філогенетичний аналіз може пролити світло на специфічний характер інвазійності, який характерний для багатьох представників родини *Asteraceae*, які своєю діяльністю здатні змінювати цілі біотопи (Funk 2009).

Рід *Galinsoga* Ruiz & Pav. (незбутниця) налічує за даними різних джерел від

14 до 19 видів (Зеленець та ін., 2011) (рис. 1 додатку Б). Кілька її представників проявляють інвазивну активність до культурних рослин (DiTommaso et al., 2022). Крім цього існує значна подібність між представниками всередині роду (Canne 1977). Застосування молекулярних маркерів відкриє можливість отримати більш повну еволюційну картину згаданих таксонів рослин та розуміння родинних відносин у межах кожного із родів.

Тому **метою** роботи було зробити порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей міжгенних спейсерів psbA-trnH та ITS1-5,8S-ITS2 молекулярних маркерів на предмет доцільності їх використання для баркодингу видів родів *Goniolimon* та *Galinsoga*.

Відповідно до мети були поставлені наступні **завдання**:

- 1) виділити ДНК п'яти зразків представників роду *Goniolimon* (*G. besseratum*, *G. graminifolium* та *G. tataricum*) та чотирьох роду *Galinsoga* (*G. parviflora* та *G. quadriradiata*),
- 2) ампліфікувати psbA-trnH ділянки хлоропластної та ITS1-5,8S-ITS2 ядерної ДНК за допомогою ПЛР, використовуючи специфічні до них праймери,
- 3) сиквенувати отримані ПЛР-продукти та провести їх порівняльний аналіз за допомогою відповідного програмного забезпечення.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні риси будови генному, характеристика та особливості використання молекулярних маркерів у дослідженнях

1.1.1. Загальна характеристика генному за його інформаційним (спадковим) наповненням.

Загалом усі гени багатоклітинних організмів можна розподілити на 2 типи: 1) «*гени домашнього господарства*» (housekeeping genes); та 2) "*гени розкоші*" (luxury genes) (Roslim, 2019). Перша група – наявна в усіх клітинах, від цих генів залежать універсальні функції, які характерні для всіх клітин. Вони забезпечують «базову» життєдіяльність клітини. Ці гени кодують процеси реплікації ДНК, трансляції, транскрипції, анаболізму і катаболізму (Amiteye, 2021).

Складність життєвого циклу багатоклітинних організмів накладає свої вимоги на особливості функціонування їх генів. Так, велика кількість генів і цілі їх блоки функціонують лише на певних стадіях ембріогенезу і не транскрибуються в клітинах дорослого організму (Amiteye, 2021).

Досить загальною ознакою генів першої групи, для еукаріотичних організмів, є розташування в регуляторних зонах так званих CpG-острівців – ділянок із підвищеним вмістом динуклеотидів CpG. Їх вміст приблизно у п'ять разів менший за очікуваний унаслідок метилювання цитозину. В регуляторних ділянках він є одним із механізмів репресії генів. Відповідно, гени, які зберігають свою активність у більшості клітин, містять неметилювані динуклеотиди CpG, вміст яких зберігається на високому рівні (Amiteye, 2021). Прикладами генів домашнього господарства є гени, які кодують білки, такі як актин (ACT), тубулін (TUB), убіквітин (UBQ) тощо (Roslim, 2019).

Розглянемо другий тип генів – «*гени розкоші*», які відповідають за термінальне диференціювання, необхідне для виконання специфічних функцій, які властиві певній клітині чи групі клітин. Вони кодують специфічні білки, що характерні для зрілих та функціонально активних клітин. Вони забезпечують

пристосування організму до навколишнього середовища (Amiteye, 2021)

Часто, вони збираються в геномні кластери, або острівки. Вони широко поширені в прокаріот та еукаріот. Наприклад, в *Pseudomonas syringae* присутній кластер, який відповідає за біосинтез ряду фітоксинів та фактора вірулентності рослин (De Oliveira et al., 2024). У людини також присутні подібні кластери. Зокрема, це кластер гену β -глобіну в хромосомі 11 (Thompson et al., 2021). Іншим прикладом кластерів, що повторюються, є гени рибосомної РНК, але в цьому випадку кластер є одиницею транскрипції (Amiteye, 2021).

Рибосома – рибонуклеопротейновий комплекс, який складається з молекул рибосомної РНК (рРНК) і рибосомних білків. Структурно, розподіляється на дві субодиниці (рис. 3 додатку Б) (Amiteye, 2021; Roslim, 2019). Молекула 18S рРНК, яка є складовою еукаріотичної рибосоми, відіграє важливу роль у точності зчитування стартового кодону під час ініціації трансляції. Послідовність ДНК 18S є більш консервативною, ніж 26S/28S (Gillespie et al., 2006; Porter & Golding 2012).

Також, варто зазначити, що, деякі колективи дослідників провели дослідження генів 26S/28S і 18S, та запропонували їх до використання в якості, порівняльної групи для тваринних організмів (Bao et al., 2016; Hou et al., 2017; Singh et al., 2018).

Структура обох рибосом і принципи їхньої роботи подібні. Синтез еукаріотичних рРНК 18S, 5,8S і 28S здійснюється в ядерці, яке формується на тандемних повторах кластера відповідних генів рРНК (Amiteye, 2021; Roslim, 2019), (рис. 3 додатку Б).

Первинний продукт транскрипції містить три фрагменти майбутніх рРНК, розділені спейсерами, оскільки кластер транскрибується як одне ціле.

1.1.2. Загальна характеристика хлоропластних та ядерних молекулярних маркерів.

ДНК-маркери, інакше – молекулярно-генетичні маркери – це поліморфна ознака, що виявляється методами молекулярної біології на рівні нуклеотидної

послідовності ДНК для певного гена або для будь-якої іншої ділянки хромосоми при порівнянні генотипів різних особин, порід, сортів, ліній.

Існують різні ДНК маркери, які можна використовувати задля зчитування та секвенування геномів. Їх можна розділити на дві категорії. Перша – маркери на основі ДНК-зондів, а друга – ПЛР-маркери. До першої категорії можна віднести такі методи: RFLP, VNTR, а до другої: SSR, RAPD, ISSR, AFLP, SSAP, IRAP, REMAP, RBIP, iPBS.

Інакше, маркери можна групувати в залежності від тієї ділянки, яка знаходиться між ними, або від організмів, в яких вони наявні.

Зокрема, можливо виділити групу, яка знаходиться на мікросателітах в ядерному геномі, вона може ґрунтуватися на змінній кількості тандемних повторів або VNTR (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33900607/>), ISSR (<https://www.wur.nl/en/show/Inter-Simple-Sequence-Repeats-ISSR.htm>), SSAP (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33900607/>).

Для бактерій більш підходить метод випадкових ампліфікованих поліморфних ДНК (RAPD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/>). Для рослин кориснішим можна назвати генотипування (SSR) (https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-1966-6_6). Для близько споріднених, клонів сортів – AFLP (<https://www.wur.nl/en/show/Inter-Simple-Sequence-Repeats-ISSR.htm>).

Для генотипування більш віддалених особин та таксонів можна використовувати ISSR (<https://www.wur.nl/en/show/Inter-Simple-Sequence-Repeats-ISSR.htm>) та SSAP (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33900607/>). Останні особливо для культур, для яких не розшифровані геноми. Можуть бути корисними в програмах селекції для покращення або розвитку високоврожайних культур. Одними зі структур, які могли надати інформацію, корисну для розуміння ступеня родинної спорідненості, є молекули хлоропластної ДНК (хлДНК), а саме, генетична трансформація одного чи декількох генів у пластидний геном з метою його інтеграції. Інтерес пов'язаний перш за все з високим рівнем експресії та можливістю накопичення суттєво більшої кількості білкового продукту.

Перевагою ж трансформації хлДНК є те, що, на відміну від трансформації ядерної ДНК, вона здійснюється шляхом гомологічної рекомбінації (рис. 4 додатку Б), (Сенников, 2019).

Також для встановлення філогенії використовують ядерні маркери. Одні з них – це внутрішні транскрибовані спейсерні послідовності (ITS) розташовані між рибосомальними ДНК одиницями. Діляки ITS1 та ITS2, обрамляють ген 5.8S рРНК. (Wicke et al., 2011).

ITS ділянки – це некодувальні послідовності, які відіграють важливу роль в процесингу рРНК (рис. 5 додатку Б). Ідентифікація спейсерів дозволяє більш точно визначати межі функціональних локусів та їх порівняння з відповідними локусами у повторях, в середині виду, роду (рис. 1 додатку Б) (Fernández et al., 2022). У рослин ITS1 та ITS2 варіюють за довжиною та складом нуклеотидів, що відображає їх адаптацію до різних екологічних умов та еволюційні зміни, зокрема ITS1 – 263 пн та ITS2 – 231 нп (Samuel et al., 2006). Поблизу 5S рРНК гена часто розташовується кластер з кількох ITS, що свідчить про складну організацію рРНК оперонів у геномі рослин. (Jang et al., 2013; Dobešová et al., 2014). ITS можуть розташовуватися безпосередньо поруч із геном 5S рРНК, що може мати значний вплив на регуляцію транскрипції та стабілізацію рибосомної структури (Garcia et al., 2010).

Ці послідовності мають високий рівень мінливості, у порівнянні з генами і використовуються для з'ясування філогенетичних відносин на видовому та родовому рівнях, особливо цікаві при дослідженні популяції видів з поліплоїдним каріотипом (Inceer et al., 2018). Зокрема в популяціях з тетра-, гекса- і октоплоїдними представниками в межах одного виду (Fernández et al, 2022).

Сучасні методи секвенування та біоінформатичні інструменти дозволяють детально аналізувати ITS, що сприяє розумінню еволюційних процесів та адаптацій у різних екосистемах.

Точне визначення філогенії окремих видів рослин досягається шляхом порівняння частоти копійності генів 35S та їхньої структури. Так, дослідження (Wang et al., 2015) свідчить про факт більшої кількості копій 35S в голонасінних

ніж в покритонасінних та демонструє більшу спорідненість хвойних (*Pinales*) до печіночників (*Marchantiopsida*) та подібний за довжиною до ранніх дивергентних наземних рослин.

Окрім цього, важливо відмітити значення ITS у якості допоміжного методу при визначенні філогенії, коли дата розходження, налічує десятки мільйонів років. Та у випадку, коли існують протерічні моделі дивергенції (Muñoz-Torrero et al., 2015; Samuel et al., 2006).

Цікавим виявився факт відокремлення у *Tanacetum achilleifolium* одного локусу 35S рДНК, у той час коли, а інший залишався локалізованим разом із 5S (Olanj et al., 2015).

Підсумовуючи, варто зазначити, що використання тільки одного типу маркерів не завжди виявиться ефективним. Так, колективом (Isuosuo et al., 2024), який зіткнувся із такою ж проблемою при дослідженні *Treulia africana* L. запропоновано поєднати використання рДНК ITS та генів psbA-trnH.

Цей ген є у складі хлоропласту усіх організмів від ціанобактерій до вищих судинних рослин, що дозволяє відслідкувати його еволюцію до появи фотосинтезуючих організмів. Він кодує білок D1 фотосистеми II (PSII), який є важливим для фотосинтезу. Цікавою особливістю є те, що з плином еволюції він став беззмстовним, що може свідчити про часті точкові мутації, або відсутність впливу селекції (Li et al., 2022).

Ген наявний в папоротей у вигляді двох копій, одна з яких втратила свою функціональну активність. Така ситуація могла виникнути в наслідок конкуренції папоротей за світло. Так, папороті, які мають одну копію гена мають кращу здатність до адаптації, що, призвело, до однієї копії в покритонасінних (Sen et al., 2012).

Цікавим виявився факт відокремлення у *Tanacetum achilleifolium* одного локусу 35S рДНК, у той час коли, а інший залишався локалізованим разом із 5S (Olanj et al., 2015).

Підсумовуючи, можна сказати, що використання маркера psbA-trnH дозволяє розширити наші знання про рослинний світ, його еволюцію та філогенію.

1.2. Сучасний стан та перспективи використання молекулярних маркерів у філогенії родині *Asteraceae* та роду *Galinsoga*

1.2.1. Характеристика родів родини *Asteraceae*.

Родина *Asteraceae* (айстрові) одна з найбільших за кількістю видів родин квіткових рослин (*Magnoliophyta*). До неї відносять близько 32,913 видів, які відносяться до 1,911 родів. Представники родини поширені на території всієї Земної кулі за винятком Антарктиди. Таксон *Asteraceae* відділився від інших квіткових рослин бл. 80 млн. років тому у Крейдовий період (Judith et al., 1977).

Родина характеризується монофілетичністю та охоплює близько 10% біорізноманіття квіткових рослин. Виділяється специфічною будовою, що вирізняє її серед інших родин, зокрема специфічним суцвіттям, що має гетерогенну будову квіток у межах однієї рослини. Квітки розвиваються з центру до країв суцвіть. Присутні наступні типи запилення: автохорія та алохорія (яку можна розділити на зоо-, антро-, анемохорії). Плід – сім'янка. Насіння без ендосперму, часто володіє специфічними пристосуваннями для розселення вітром (рід *Taraxacum*) (Funk 2009).

Філогенія *Asteraceae* досить складна через велику кількість видів та їх розповсюдження по світу. Навіть у межах останніх п'яти років зустрічається декілька класифікацій (рис. 6 додатку Б). Це можна пояснити значною кількістю видів родини, а також застосуванням дослідниками різних методів дослідження (Tani et al., 2012; Semple et al., 2023).

Для родини характерною ознакою є наявність базального числа хромосом $x=9$. Це не виключає наявності таких видів з більшою кількістю хромосом, зокрема *Schlechtendalia luzulifolia*, яка є єдиним відомим $2n = 16$ видом у *Barnadesieae*. Так, види з хромосомним числом (ХЧ) $x=8$ і менше, прийнято вважати ендеміками, більшість з яких вимерли до нашого часу. Розподіл ХЧ в *Asteraceae* має діапазон від $2n = 4$ у *Xanthisma gracile* (Nutt.) та у *Brachyscome dichromosomatica* C.R.Carter до $2n =$ бл. 432 (48 n ; $n = 9$) для *Olearia. albida* Hook. F. (Semple et al., 2023).

Підсумовуючи вище сказане, для родини характерний діапазон рівня плоїдності від $2n$ до $48n$ при $x=9$ (Semple et al., 2023).

Присутність ендеміків серед представників родини не є дивним, оскільки батьківщиною *Asteraceae* є Південна Америка та Мексика, багаті на ендеміки з $x=8$, зокрема такими видами є *Corymbium glabrum*, *C. villosum*, *Lapsana communis* та ін. (Semple et al., 2023).

Також, варто зазначити, що такі явища як поліплоїдія, анеуплоїдія, дисплоїдія більш характерна для видів, які розселяються на добре зволжених біотопах, в тому числі на узбережжях. Також спостерігається цікава кореляція, що зі збільшенням ступеня поліплоїдії може змінюватися діапазон толерантності до рН води і ґрунту (Haskell et al., 1952; Jose et al., 1999).

За однією з класифікацій родину розділяють на 14 підродини. В її основі покладена кількість хромосом у представників цих підродин (Semple et al., 2023).

Підродина *Asteroideae*, в свою чергу ділиться на ряд триб, одна з них – надтриба *Heliantheae*. У межах цієї надтриби виділяють трибу *Milerieae* (34 роди та 380 видів) (Funk 2009), яку автори дослідження поділили на «групи» (рис. 7 додатку Б) *Milerieae* I (MI) та *Milerieae* II (MII). До групи MII відносять рід *Guardiolla*, а до групи MI відносять роди: *Guizotia*, *Sigesbeckia*, *Smallanthus*, *Tridax* та *Galinsoga* (Semple et al., 2023)

Представниками роду *Galinsoga* є однорічні, дводольні трав'янисті рослини з великою варіабельністю ознак. Цей рід названий на честь Ігнасіо де Галінсоґи, іспанського лікаря та ботаніка (Damalas et al., 2008; Bharathi et al., 2021). Перші згадки про вид *G. parviflora* були знайдені у 1714 році (Feuillée, 1714).

Наприкінці XIX ст. вид (*G. parviflora*) почав розповсюджуватися по Європі. У 1870 р. його виявили в Бельгії, у 1910 р. перші осередки цієї рослини виникають у північних і північно-східних районах Франції. Голландії вона з'явилася в 1862 р., у Бельгії — в 1887, в Англії — в 1807, у Данії і Норвегії — в 1906 р.

Вперше, на територію України вона потрапила у 1837 у м. Коломию. Слідом за *G. parviflora* поширюється і *G. quadriradiata* (*G. ciliata* (Rafin.) Blake) (Damalas et al., 2008; Протопопова та ін., 1989). Існує також факт занесення до Алжиру з

живцями різних підщеп, які G.S.P.G. Saf-Saf, одна з трьох садівничих установ Міністерства сільського господарства Алжиру, імпортувала з Франції та Італії з 1990 року. Тому дуже ймовірно, що популяція *G. parviflora*, яка була створена там протягом майже двадцяти років (до 2010р.), походить від насіння, випадково внесеного в субстрати для вирощування (Tani et al., 2012)

Історію опису таксону *Galinsoga* для будь якого виду важко досліджувати через близьку фенотипову спорідненість до інших представників *Asteraceae*. В наслідок цього багато з дослідників висувують велику кількість різні назв для окремих видів даного таксону. Ця тенденція добре помітна за даними, наведеними на сайті WFO Plant List (<https://wfoplantlist.org>), де *G. parviflora* має 25 синонімічних назв, а *G. quadriradiata* – 52.

В усіх видів квітки розташовані в кінцевих і пахвових цимозних скупченнях. Кількість рядів приквіток стабільна в межах кожного виду. Формують парашутик (Tani et al., 2012; Ripanda et al., 2023). Розмір і форма квітколожа досить однакові в межах кожного виду. Обмежена в рамках конкретного виду й кількість язичкових і трубчастих квіток (Jose et al., 1999; Santosa et al., 2020).

Представники роду *Galinsoga* широко поширені від Канади до Аргентини, проте за винятком двох видів (*G. parviflora* та *G. quadriradiata*) зустрічаються лише в Новому Світі (Judith et al., 1977), головним чином в Південній Америці (Rabitsch et al, 2008). Види *Galinsoga* здатні колонізувати навіть гірські місцевості з сухим кліматом, представники роду були знайдені в горах у межах Республіки Киргизія на висотах 1100-1300 м (Lazkov et al, 2014). Також поширюються у вологій місцевості, де рівень вологості коливається у межах 480-1200 (о. Ява) (Santosa et al., 2020) та островах Тихого океану (Judith et al., 1977).

Окрім того, що більшість представників цього роду пристосовані до певних умов, вони мають власні взаємозв'язки з фауною, перш за все – комахами. Наприклад, в Південній Америці *G. parviflora* часто є місцем гніздування *Menochilus sexmaculatus* (хижака *Aphis brassicae* та *Myzus persicae*), *Diadegma semiclausum* (паразита *Plutella xylostella*) та негативно впливає на нематоди *Meloidogyne incognita* та *Cephalobus litoralis* (Studzińska-Sroka, et al.,

2018; Bharathi et al., 2021).

У межах роду зустрічаються хромосомні числа $n=8, 9$. При цьому, 43% видів мають $n=8$; для *G. filiformis* було отримано значення $n=8$ та анеуплоїдний варіант із $n=9$; для *G. parviflora* $n=8$, хоча був знайдений зразок із $2n=18, 32, 36$, що вказує на поліплоїдією; така ж ситуація в *G. quadriradiata*, в якого у нормі $n=9$, але часто можна зустріти геноми з $2n=16, 24, 32$, що також може свідчити про поліплоїдію та анеуплоїдію (Jose et al., 1999; Semple et al., 2023).

1.2.2. Характеристика видів *G. parviflora* та *G. quadriradiata*.

Як вже було зазначено вище, *G. parviflora* є невеликою однорічною трав'янистою рослиною заввишки 50-70 см, хоча є повідомлення про розмір від 2 до 111 см (Haliniarz et al., 2020). Має дрібні бічні білі язичкові та внутрішні жовті трубчасті квітки. На стадії сходів з'являються круглі сім'ядолі зі злегка заглибленим кінчиком. Довжина листків становить 1–6 см, ширина – 0,5–4 см (Ripanda et al., 2023). Вони рідко або помірно волосисті з обох поверхонь, із зубчастими краями.

Обидва вище описані види роду *Galinsoga* (іноді згадується також вид *G. formosa*) знайшли своє використання в народній медицині. Використовуються як продуцент ряду метаболітів з антиоксидатною, антибіотичною, протизапальною, цитокінетичною, загоювальною, дерматологічною, властивостями (Bazylko et al., 2012). Зокрема, виявлено наявність 48 БАР, які потенційно можна використовувати в терапевтичній чи профілактичній лікувальній діяльності (Badilla et al., 2022; Ripanda et al., 2023). Деякі метаболіти можливо використовувати в промисловій хімії, як добавку для створення засобів для прання (Musinguzi et al., 2022)

Було підтверджено можливість використання метилового, етилового та водного екстракту листя та квіток *G. parviflora* в якості профілактичного препарату при ураженнях важкими металами (Ag, Cd, Hg, Fe). Хоча і здатні самотійно їх накопичувати, чим цікаві, як засіб біоремедіації (Ranjitha et al., 2017; Mahmood et al.,

2021; Nan et al., 2023). Окрім цього, довели що накопичуючи деякі іони металів (Ag^+ , Fe^{3+}), своїх тканинах (квіти, листя), чим потенційно корисні у фармацевтичній сфері (Wanakai et al., 2019; Mahmud et al., 2021). Можна стверджувати, що рослина не є токсичною і її можна вживати в їжу (Bharath, et al., 2021).

Отже, існує нагальна потреба мінімізувати кількість прогалин у сучасній систематиці родів *Goniolimon* та *Galinsoga*. Для існуючого природного видового біорізноманіття існує загроза як можливого зникнення виду через його рідкісність, так і через неконтрольовану інвазію іншими видами. Розробка ефективних засобів для боротьби з цією проблемою на пряму пов'язана з необхідністю чіткого розуміння їх систематичного положення.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкт та матеріал для досліджень

Об'єктом дослідження були нуклеотидні послідовності хлоропластних *psbA-trnH* та ядерних *ITS1-5.8S-ITS2* міжгенних спейсерів на предмет з'ясування можливості їх використання для баркодингу представників родів *Goniolimon* та *Galinsoga*.

Матеріалом для дослідження слугували гербарні зразки рослин, що зростають на території України (табл. 1).

Таблиця 1.

Вид	Легенда	Країна / регіон
<i>Goniolimon besserianum</i>	GoBes2	Херсон. обл., с. Іванівка, Голопристанський район №1
	GoBes3	Херсон. обл., Херсонський р-н, окол. с. Зеленівка, projected reserve "Zelenivskyi Steppe" steppe & limestone outcrops
<i>Goniolimon graminifolium</i>	GoGra2	Херсон. обл., Голопристанський р-н, Black Sea Biospheric Reserve, section "Ivano-Rybalchanska" sandy steppe
	GoGra3	Херсон. обл., окол. с. Бобровий Кут, Великоолександрівський р-н, projected reserve "Bobrovyi Kut" Sandy steppe
<i>Goniolimon tataricum</i>	GoTat2	Миколаїв. обл., Єланецький р-н, Природний заповідник «Єланецький степ» (Elanetskyi Natural Reserve)
<i>Galinsoga parviflora</i>	GaPar_16	Чернівецька обл., Глибоцький р-н, с. Карапчів, Буковинське Прикарпаття, узбіччя залізничної колії біля ст. Карапчів
	GaPar_22	Чернівецька обл., Герцаївський р-н, околиці с. Лунка
<i>Galinsoga quadriradiata</i>	GaQua_11	Чернівецька обл., Глибоцький р-н, с. Купка, Буковинське Прикарпаття, вздовж залізничної колії біля перехрестя на с. Корчівці
	GaQua_26	Чернівецька обл., м. Чернівці, лісопосадка біля автовокзалу на Кемпінгу

Goniolimon besserianum – баторічна рослина з великою розлогою кроною. Належить до родини Plumbaginaceae (рис. 8 додатку Б). У висоту досягає 10-35 см. Стебла сильно галузяться. Квітконосних стебел 1-6 нпа рослину. Листки, які біля основи стебла, лопатчато-, еліптично-ланцетні або лінійні, гострі, звужені в

крилатий черешок. Суцвіття напівкулясто-щиткоподібне. Квіти по 1–2 в колосках, віночок рожево-фіолетовий, чашечка гола. Час цвітіння: травень (Доброчаєва и др., 1987).

G. tataricum - багаторічна рослина з товстим каудексом з широким і жорстком'ясистим листям у прикореневих розетках. Її можна віднести до чагарників та карликових рослин (20-40 см.) Суцвіття - пухкі або густі колоски, розташовані на кінцевих, квітконосів. Квітки дрібні, фіолетово-рожеві у 2-6-квіткових колосках. Має широкий природний ареал, а саме: Апеннін, Східній Європі Середня Азія (Malek Mohammadi et al., 2017; Ding et al., 2022;). Є найбільш розповсюдженим серед роду *Goniolimon* (Ding et al., 2022). Рослини активно колонізували солончакові та піщані арени, дюни, кам'яністі ґрунти (принаймні один вид). Іноді на сипучих схилах, виконуючи важливу функцію по протидії спустелюванню ґрунтів. Популяції переважно розсіяні або ізольовані. На території Євро-Середземномор'я рід представлений, представлений ендемічними видами.

G. graminifolium (Aiton) Boiss. - зростає на піщаних аренах надзаплавних терас, іноді на супіщаних ґрунтах степових схилів. Він є трав'янистою стрижнекореневою рослиною 20-40 см заввишки. Суцвіття його розлоге, колоски одноквіткові, на кінцях гілочок утворюють довгі й рідкі однорядні колосоподібні суцвіття (Захарова та ін., 2017).

Усі види *Galinsoga* мають прямостоячі стебла, смугасті по всій довжині і часто мають червонуватий колір. Стеблове опушення складається з багатоклітинних кластерів, притиснутих до трихом різної довжини та щільності. Розгалуження протилежне, у різних видів стебла можуть бути як сильно або слабо розгалужені. Усі види мають тонкий, слабо розвинений стрижневий корінь із кількома бічними корінцями з інтенсивним ростом та додаткових коренів від основи стебла (Damalas et al., 2008; Kazlauskienė et al., 2023).

G. parviflora утворює головку з двома типами сім'янок: язичкові сім'янки без сосочка або, рідше, з рудиментарним сосочком, утвореним чотирма-шістьма короткими щетинками, вдвічі меншими за довжину лусочок у трубчастих сім'янок, які мають сосочок (Damalas et al., 2008; Haliniarz et al., 2020).

Galinsoga quadriradiata – є найбільш мінливим видом у роді *Galinsoga*. Ця мінливість спричинена географічною та репродуктивною ізоляцією. Завдяки самозаплідненню і ранньому цвітінні вид здатний ефективно колонізувати нові місця. Природні та антропогенні чинники сприяють гібридизації, яка посилює морфологічну пластичність і генетичну різноманітність цього таксону.

Рослини представлені однорічними травами, стебла мають прямі та розлогі, з міжвузлями близько 6 см завдовжки. Густота листя збільшується знизу до верху. Листкова пластина яйцеподібна з гострою чи тупою верхівкою, краї має війчасті або зубчасті. Квітки біло-червоно-фіолетового забарвлення.

У рідних ареалах виду можна виділити два морфологічні варіанти: один поширений від Північної Південної Америки до Канади, інший — від Мексики до Колумбії. (Canne, 1977)

Морфологічно мінливий вид, *G. parviflora* може бути зовні схожим на *G. quadriradiata*, що призводить до плутанини між двома видами. Однак деякі ознаки можуть допомогти їх відрізнити, наприклад велика кількість крайових сім'ядольних волосків у *G. parviflora*, листкові пластинки в неї довші, а сім'янки вужчі порівняно з *G. quadriradiata*. Незважаючи на ці відмінності, рід *Galinsoga*, особливо бур'янисті види, демонструє значні морфологічні варіації, що ускладнює диференціацію видів виключно на основі морфологічних характеристик (Damalas et al., 2008).

Зокрема, дослідження (Areington et al., 2022) показало, що вплив підвищених температур здатен впливати на фенотипову пластичність, біохімічний склад та адаптацію здатність.

2.2. Методи досліджень

Виділення ДНК

Екстракцію загальної ДНК здійснювали гербарних зразків за допомогою цетавлонового методу.

1. Наважку: 0,3-0,4 г рослинного матеріалу заморожують з використанням рідкого

азоту, розминають в ступці і, не даючи розморозитися, додають підігрітий до 65°C буфер для лізису, що містить: 10% цетавлон, 1 М трис-НСІ (рН 8,0), 0,5 М ЕДТА, 5 М NaCl, протеїназа (20 мкл на 3-4 мл), 0,1% β-меркаптоетанол.

2. Лізис: здійснюють на водяній бані за 60°C протягом 2 год.
3. Потім додають до лізату рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), пробірки струшують і центрифугують за 13000 g, 5 хв.
4. Надалі використовують супернатант, до якого додають 0,6 об'єму попередньо охолодженого ізопропанолу та залишають на 10 хв. при -20°C для утворення осаду, який концентрують за допомогою центрифугування протягом 10 хв. при 13000 g.
5. Осад очищають 80% етанолом, центрифугують при 13000 g протягом 5 хв., сушать за кімнатної температури до зникнення запаху етанолу.
6. Осад розчиняють у 100 мкл буферу TE (10 mM трис-НСІ, 1 mM ЕДТА) .

Оцінюють чи якісно були виділені зразки за допомогою електрофорезу у 1% агарозному гелі, а кількість – завдяки вимірювання оптичної густини розчину при довжині хвилі 260 нм (1 од. – 50 нг ДНК) на спектрофотометрі ND-1000 NanoDrop.

Електрофорез ДНК в агарозному гелі

1. Використовують для електрофорезу 1×TBE буферну систему (трис-борат ЕДТА: 0,089 М трис, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА, рН 8.0).
2. Аналіз геномної ДНК здійснюють на агарозному гелі концентрацією 1%, а для аналізу ПЛР-продуктів та продуктів рестрикції – 2%. До визначеної кількості агарози додають 30 мл 1× TBE і нагрівають в МХП (5-7 хв за потужності 300-450 Вт) до повного розчинення агарози.
3. Охолоджують розчин до температури 50-55°C.
4. Розчин агарози заливають у форму для електрофорезу та вставляють гребінку.
5. Після того як, агароза застигла та охолола форму поміщають в камеру для проведення електрофорезу та заливають 1×буфером TBE так, щоб гель був повністю покритий буфером на 2-3 мм.
6. Обережно, щоб не пошкодити лунки, витягують спейсери та гребінку.

7. Готують проби для нанесення. Для цього до буферу для нанесення додають розчинену ДНК (1×TE, 50% гліцерин, 0,25% розчин бромфенолового синього). Співвідношення об'єму проб і буферу – 5:1.
8. Вносять проби ДНК на гель у лунки під буфер.
9. Як ДНК-маркер використовують GeneRuler DNA Ladder Mix, SMO 3310, 1 mg DNA/ml (Thermo scientific) та BS II KS (+) / Msp I.
10. Приєднують прилад для електрофорезу до блоку живлення.
11. Електрофорез здійснюють при напруженості поля 5 V/см², так щоб головний барвник дійшов майже до кінця гелю.
12. Після закінчення електрофорезу, забарвлюють гель у 200 мл 1× буферу TBE із бромистим етидієм в концентрації 10 мг/мл.
13. Щоб візуально побачити ДНК, гель переносять на скло транслюмінатора та в ультрафіолетовому світлі фотографують ДНК.
14. Квантифікацію ДНК проводять за допомогою програмного забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Для ампліфікації послідовності хлоропластної ДНК застосовують праймери psbA-trnH, у яких присутній комплементарний до кодувальних ділянок хлоропластної ДНК мотив (табл. 2), для ампліфікації ділянки ITS1-5.8S-ITS2 – праймери, комплементарні до ділянок генів 18S та 28S рРНК.

Таблиця 2.

Праймери, використані для ПЛР-ампліфікації

Позначення праймера	Напрямок праймеру	Послідовність
psbA	Прямий	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'
trnH	Зворотний	5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'
YT2001	Прямий	5'-AAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGG-3'
YT2004	Зворотний	5'-CGGAGGAGAAGAACTTACAAGGA-3'
NewITSFd	Прямий	5'-GAACCTGCGGAAGGATCATTGTC-3'
NewITSRev	Зворотний	5'-CGGGGCTACCCGCTGAATTTA

Компоненти для проби додають у певній послідовності, відображеній в таблиці 3.

Ампліфікацію проводять на приладі для ПЛР за наступною програмою:
35 циклів ПЛР ампліфікації, що включають:

- 1) активація полімерази при 95°C протягом 15 хвилин;
- 2) денатурація при 95°C, 15 с;
- 3) посадка праймера (анелювання) при 57°C, 30 с;
- 4) синтез ДНК (елонгація) - 72°C, 30с;
- 5) закінчення ампліфікації - 72°C, 8 хв.;
- 6) охолодження до 4°.

Таблиця 3.

Компоненти	Об'єм, мкл
H ₂ O, бідистильована	6,76
Pol Fire Pol 5 ^x	2
Priimer Fd	0.12
Primer Rev	0.12
Препарат ДНК	1
Загальний об'єм реакційної суміші	10

За допомогою праймерів, комплементарних до фланкувальних фрагментів кодуювальної послідовності генів 18S та 26S, ампліфікували ділянку ITS1-5.8S-ITS2. Загалом, використовували чотири праймери в різних комбінаціях (див. табл. 2).

ПЛР-ампліфікацію проводили з використанням 2^x полімеразної суміші MyTaq™ HS Red Mix (Meridian Bioscience) згідно рекомендацій виробника. Температура гібридизації для всіх комбінацій праймерів складала 57 °C. Кількість ДНК на 20 мкл реакційної суміші становила 10-20 нг.

Довжину та концентрацію всіх варіантів ПЛР-продуктів аналізували методом електрофоретичного розділення у 2% агарозному гелі.

Очистка ПЛР-продуктів

1. До ПЛР-продуктів додають рівну кількість суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), інтенсивно збовтують та центрифугують 5 хв при 13000 g.

2. Опісля працюють з супернатантом у мікропробірці: додають 3 об'єми 96% етанолу залишають суміш на 20-30 хв. для утворення осаду при $t = -20^{\circ}\text{C}$ і центрифугували 8 хв. 13000 g.
3. Осад промивають 50 мкл 80% етанолу, та центрифугують 2 хв за 13000 g.
4. Осад сушать 20-25 хв при $t = 55^{\circ}\text{C}$.
5. Осад розчиняють в 10-12 мкл бідистильованої води.

Сиквенування ампліконів

ПЛР-продукти хлДНК сиквенували на фірмі LGC Genomics, Німеччина. Первинну обробку та аналіз фрагменту, що був отриманий, здійснювали за використання комп'ютерної програми Chromas та пакетів програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR, Geneious v 5.5.

ПЛР-продукти ITS1-5.8S-ITS2 двох зразків *G. parviflora* і двох – *G. quadriradiata* змішували в еквімолярній концентрації. Після об'єднання сумарний амплікон очищали екстракцією з 2% агарозного гелю за допомогою набору Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Сиквенування амплікону здійснювали методом Illumina з використанням сервісу Amplicon-EZ (GENEWIZ)

Послідовності psbA-trnH (*G. elatum* *G. dshungaricum* і *G. speciosum*) та ITS1-5.8-ITS2 (*G. parviflora* і *G. quadriradiata*) для проведення порівняльного аналізу шукали у GenBank за допомогою програми BLAST.

Таблиця 4.

Послідовності представників роду *Galinsoga*, взяті для порівняння psbA-trnH ділянки з бази даних GenBank

Вид	Легенда	Країна / регіон
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	GU818377	Нова Зеландія/ Крайстчерч
<i>Galinsoga quadriradiata</i>	HE966643	Італія/ Мілан
<i>Ruiz & Pav.</i>	GU818377	Нова Зеландія/ Крайстчерч,

Біоінформатичні процедури. Контроль якості отриманих в результаті сиквенування парних Illumina рідів проводили з використанням програми fastp 0.23.4 (Chen et al., 2018). Контроль включав трімінг адаптерів, видалення коротких

рідів, трімінг рідів за якістю та проводився за порівняно жорстких параметрів: -l 200, -cut_tail, -cut_front cut_tail_window_size 1, cut_tail_mean_quality 30. За допомогою програми SeqKit 0.15.0 (Shen et al., 2016) «чисті» ріди були переведені у формат FASTA, після чого парні ріди були об'єднані без перекриття та сортовані за послідовностями праймерів на чотири файли, відповідно до сиквенованих зразків (табл. 1).

Таблиця 5.

**Послідовності представників роду *Galinsoga* взяті, для порівняння
ITS1-5.8S -ITS2 ділянки з бази даних GenBank**

GenBank Acc. No		
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	FJ696962	MH050163
	KY968894	MH050164
	MF440593	MZ489672
	MF440619	OP824343
	MG217430	OP824344
	MG218694	OP824345
<i>Galinsoga quadriradiata</i> Ruiz & Pav.	OQ412026	OQ412027
	OP824346	GU818550

Вирівнювання послідовностей та філогенетичний аналіз. Вирівнювання послідовностей ділянки ITS1-5.8S-ITS2 проводили MAFFT з використанням методу G-INS-i (Katoh & Standley, 2013).

Філогенетичну сітку обрахували за алгоритмом Neighbor-Net, використовуючи програму SplitsTree5 (Huson & Bryant, 2006).

Модель найкращої відповідності нуклеотидних замінів для вирівнювання основних варіантів ділянки ITS1-5.8S-ITS2 оцінювали за найменшим значенням Баєсового інформаційного критерію (BIC) за допомогою програми IQTree 2.3 (Minh et al., 2020). Maximum likelihood філогенетичне дерево було побудовано з використанням моделі GTR+F+G4. Значення bootstrap підтримки гілок було обраховано за 1000 реплікацій дерева.

Анотування сиквенсів проводилося у програмі EditSeq, після чого їх вирівнювали й аналізували у програмі Megalign (Clustal W та Clustal V методами).

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика придатності хлоропластної ділянки *psbA-trnH* для баркодингу видів родів *Goniolimon* та *Galinsoga*

На території України найбільш поширені види (*Goniolimon tataricum*, *G. graminifolium*). (Alcaraz et al., 1987; Malekmohammadi et al., 2017; Mahmood et al., 2021). Історія периферійних популяцій цього виду на західних Балканах та Апеннінах була досить складною та обумовлена місцевими геоісторичними подіями. Ці події сприяли численним хвилям розширення ліній зі сходу на захід, що походять з джерел за межами Балканського півострова, які періодично диверсифікувалися та займали локалізовані території на Балканах протягом плейстоцену (Buzurović et al., 2020).

Як для суміжних родів *Acantholimon* та *Limonium*, для роду *Goniolimon* характерний високий рівень внутрішньовидового поліморфізму. Так, зовнішні структурні особливості *G. tataricum* незначною мірою відрізняються залежно від умов росту та онтогенезу, що в свою чергу змушує використовувати інші способи класифікації, зокрема на основі результатів дослідження молекулярних маркерів (Buzurović et al., 2017).

Нами було вирішено перевірити придатність *psbA-trnH* ділянки хлДНК для баркодингу цієї групи рослин. Препарати ДНК були виділені з п'яти зразків роду *Goniolimon*: *G. besseranum* (GoBes2, GoBes3) *G. graminifolium*, (GoGra2, GoGra3) та *G. tataricum* (GoTat2). Надалі їх використовували для постановки ПЛР. Результати реакції перевіряли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (рис. 2).

Перш за все слід зауважити, що ПЛР-продукти, отримані для всіх зразків ДНК мають однакову довжину. Виходячи з довжини фрагментів маркера, приблизний їх розмір становить близько 250 нуклеотидних пар. Надалі всі ПЛР-продукти піддавали очистці та знову перевіряли за допомогою електрофорезу. Очищені зразки використовували для сиквенування. На жаль, один з них був низької якості, тому у подальших дослідженнях його не використовували.

На основі аналізу отриманих результатів перш за все можна сказати, що всі послідовності, використані для порівняння, мають довжину 152 нп. Дана відмінність зумовлена наявністю чотирьохнуклеотидного інделу у положенні 68 консенсусної послідовності.

Цікавим є те, що в зразках GoDsh30_GB та GoEla7_GB він представлений ділянкою «TTTC», тоді як у GoSpe5_GB – «GTGA». Відмінність у довжині МГС psbA-trnH області GoBes3 зумовлена наявністю у положенні 14 консенсусної послідовності додаткового тиміну.

Щодо загальної характеристики досліджуваної послідовності, то практично в усіх досліджуваних зразків виявлені відмінності локалізовані у частині спейсера, що межує з 3'-кінцем гену psbA. Виняток становить тільки наявний у GoGra2 в положенні 124 консенсусної послідовності цитозин, замість притаманного всім порівнюваним зразкам аденіну. У зразків, взятих для порівняння, така особливість не виявлена.

Серед виявлених відмінностей привертає на себе увагу, що тільки у досліджуваних нами зразках GoBes2, GoBes3, GoGra2 та GoTat2 у положенні 8 консенсусної послідовності наявна одонуклеотидна вставка пурину (A/G), при чому у зразків *G. besseranum* виявлені різні азотисті основи.

Найбільші відмінності притаманні зразку GoBes2. В середній області його спейсерної ділянки виявлені три фрагмента, яким притаманні тринуклеотидні заміни. Цікавим виявився той факт, що тринуклеотидна заміна, наявна у положенні 59 консенсусної послідовності також присутня у зразку взятому з Genbank. Для розуміння ступеня спорідненості порівнюваних зразків за допомогою програмного забезпечення зробили їх порівняльний аналіз (табл. 4).

Загалом можна сказати, що з 55 нуклеотиду консенсусної послідовності по 102 наявно багато таких мутацій, як (індели/інсерції) та послідовності з кількох нуклеотидів. Отже, можна припустити, що міжгенний спейсер досліджуваної області в середині послідовності більш варіабельний, ніж на її кінцях.

Як видно з наведених у таблиці результатів, ступінь подібності досліджуваних нами зразків коливається у межах 91,9-99,3%. Відносно зразків,

взятих нами для порівняння, значення дещо нижчі, однак слід не забувати, що на величину даного показника впливає також і наявність в сиквенсі нерозшифрованих областей.

Таблиця 4.

Ступінь подібності (у %) міжгенного спейсера psbA-trnH хлДНК

GoBes2	GoBes3	GoGra2	GoTat2	GoDsh30_GB	GoEla7_GB	GoSpe5_GB	
***	92.6	91.9	92.6	86.5	87.8	89.2	GoBes2
	***	98.0	99.3	89.9	91.2	88.5	GoBes3
		***	97.3	88.5	89.9	87.2	GoGra2
			***	89.9	91.2	88.5	GoTat2
				***	98.7	90.8	GoDsh30_GB
					***	92.1	GoEla7_GB
						***	GoSpe5_GB

Філогенетичне дерево, побудоване методом Maximum-Likelihood (рис. 4) показало специфічний розподіл зразків. Зокрема, GoBes2 та GoBes3 виявилися найбільш віддаленими, хоча вони відносяться до одного виду. Вони розмістилися взагалі на двох різних кладах. Зразок GoBes3 виявився більш спорідненим до GoTat2 та GoGra2.

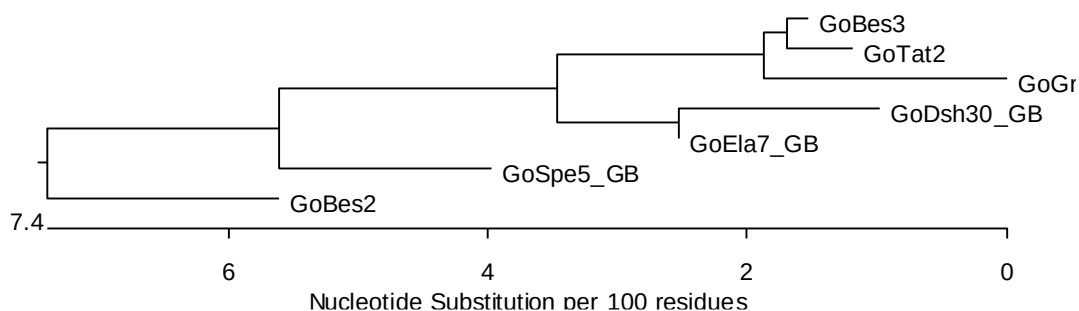


Рис. 4. Філогенетичне дерево представників роду *Goniolimon*, побудоване на основі порівняння міжгенних спейсерів psbA-trnH області

Враховуючи, що зразки GoBes2 та GoBes3 належать до одного виду, є не зрозумілим розміщення їх на двох різних кладах. Одним із пояснень може бути

необхідність перевірки точності визначення видової належності зразків. Водночас, відомо, що на основі використання тільки одного молекулярного маркера можна отримати суперечливі результати, залежно від використаної системи дослідження. У зв'язку з цим є необхідність використання для аналізу досліджуваних нами зразків ще кілька незалежних молекулярних маркерів.

Отже, даний маркер можна використовувати при вирішенні складних питань систематики представників роду *Goniolimon*. На жаль, велика кількість таксонів рослин різного рангу потребує уточнення/вирішення, можливого лише на основі використання молекулярних маркерів. Дана проблема є достатньо гострою як для рідкісних видів, якими є представники роду *Goniolimon*, так і навпаки, для видів, що стрімко захоплюють нові природні ареали, тобто проявляють ознаки інвазивності. Яскравими представниками останніх є види роду *Galinsoga*. Для розуміння явища інвазії також необхідно чітко розуміти його генетичне підґрунтя та родинні відносини в середині роду. Серед представників роду *Galinsoga* України найбільш поширеними є *G. parviflora* та *G. quadriradiata*.

На територію України *G. parviflora* вперше потрапила у 1837. Слідом за нею поширюється і *G. ciliata* (Rafin.) Blake (Протопопова, 1989; Damalas et al., 2008). У 1930-х роках представники цих видів були поширені в усіх лісових та лісостепових районах України, порушуючи екологічну рівновагу. І якщо спочатку поширення мало антропохорний характер, то надалі відбувалося і насіннєве розмноження, завдяки чому вони з часом «закріпилися» в нових для себе екосистемах (Протопопова, 1989).

Для деяких видів роду *Galinsoga* psbA-trnH ділянка хлоропластної ДНК вже розшифрована. У попередніх дослідженнях нашої лабораторії було показано неефективність використання psbA-trnH маркера для аналізу деяких інвазивних видів. Тому ми провели тестове дослідження на основі порівняння даних, наявних у базі даних GenBank. Результати досліджень наведені у табл. 5.

Як видно з представлених результатів, жодної відмінності у цій ділянці виявлено не було, що свідчить про недоцільність використання даної ділянки ДНК для баркодингу видів роду *Galinsoga*. Тому надалі для дослідження цієї групи

рослин нами проведена спроба з'ясування доцільності використання з цією метою іншого молекулярного маркера.

Таблиця 5.

**Ступінь подібності у (%) міжгенного спейсера psbA-trnH хлДНК
представників роду *Galinsoga***

GaQua_ GU818377	GaPar_ DQ006151	GaQua_ HE966643	Представники роду <i>Galinsoga</i>
	100	100	GaQua_ GU818377
		100	GaPar_ DQ006151
			GaQua_ HE966643

**3.2. Характеристика придатності ITS1-5.8S-ITS2 ділянки
35S рДНК для баркодингу видів роду *Galinsoga***

Досить успішними при вирішенні спірних питань систематики є ядерні молекулярні маркери. Тому надалі ми вирішили перевірити придатність для таких досліджень роду *Galinsoga* міжгенних спейсерів 35S рДНК. Нами були отримані ПЛР-продукти цих ділянок, які надалі були просиквеновані за допомогою методу ілюміна Illumina. Аналізу підлягали зразки двох популяцій *G. parviflora* та двох *G. quadriradiata*. Використання чотирьох різних праймерів (двох прямих і двох зворотних) дозволили у подальшому розрізняти видову та популяційно належність отриманих фрагментів послідовностей.

Особливістю методу сиквенування Illumina є поступове зчитування досліджуваної послідовності, в результаті якого отримують суміш невеликих за розміром ділянок – рідів, які потребують у подальшому детального опрацювання. Він включає видалення коротких рідів, а також їх трімінг за якістю. Після проведення всіх необхідних операцій так звані «чисті» ріди зберігали у форматі FASTA. На жаль специфіка умов експерименту була така, що не дозволила нам отримати повну нуклеотидну послідовність ITS1-5.8-ITS2 області. У зв'язку з цим отримані парні ріди у подальшому були об'єднані без перекриття. Водночас, при аналізі послідовностей, наявних у базі даних GenBank ми виявили, що ген 5,8S

рРНК становить 164 нп.

При побудові філогенетичної сітки на основі відібраних нуклеотидних послідовностей було виявлене специфічне групування досліджуваних зразків (рис. 5). Так, усі ріди обох популяцій *G. parviflora* формують достатньо компактну групу (на рис. Позначена як GaPar_6), однак не розділену на дві гілки, що могли би належати різним підвидам.

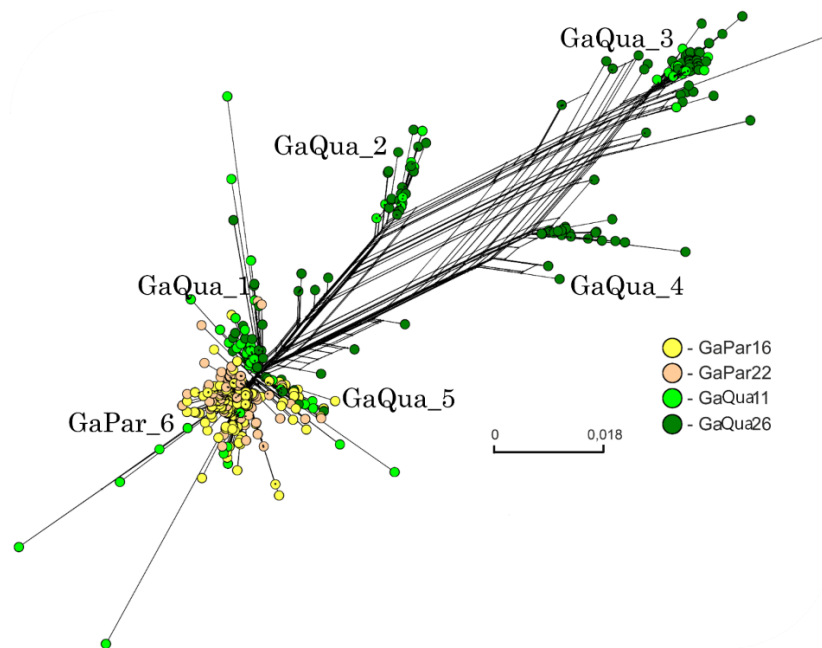


Рис. 5. Філогенетична сітка NeighborNet, яка відображає спорідненість представників роду *Galinsoga* на основі порівняння ITS1 та ITS2

Зовсім іншими особливостями характеризуються зразки *G. quadriradiata*. Так, всі зібрані послідовності розподілилися між різними п'яти групами, які ми умовно позначили GaQua_1, GaQua_2, GaQua_3, GaQua_4 та GaQua_5. Як видно з представлених на рис.5 результатів, перша і п'ята групи найбільш близько локалізовані біля послідовностей *G. parviflora*, тоді як інші три суттєво від них віддалені. Слід зауважити, що у жодному з випадків практично не відбувалося відгалуження ділянки, притаманної зразкам конкретної популяції. Найбільш «чистою», хоча і не на 100%, виявилася четверта група.

На далі нами з кожної із описаних груп були вибрані по 5-7 нуклеотидних послідовностей і за допомогою програмного забезпечення MegAlign отримані для них конценсусні послідовності. Саме ці ділянки використовували у подальшому

Оскільки отримані нами нуклеотидні послідовності не містили внутрішньої ділянки (дещо більшої за ген 5.8S рРНК) у подальшому ми досліджували окремо спорідненість ITS1 та ITS2 областей. Для порівняльного аналізу ми використовували зразки, наявні у базі даних GenBank: *G. quadriradiata* – GU818550, *G. parviflora* – FJ696962, KY968894, MH050163 та MH050164, як аутгрупу – *Smallanthus maculatus* (FJ696963). Майже повна ITS1 спейсерна ділянка (відсутній її 3'-кінець) представлена на рисунку 6.

Рис. 6. Нуклеотидні послідовності ITS1 35S рДНК, вирівнянні за допомогою програми MegAlign

Як видно з представлених результатів за будовою цієї області найбільше відрізняються сиквенси *G. quadriradiata*, побудовані на основі конценсусних послідовностей, отриманих нами для груп для 3 (GaQua_3) та 4 (GaQua_4). Вони є ідентичними, про що свідчить їх стовідсотковий ступінь подібності (табл. 6). Зокрема, заміни виявлені у позиціях 12-13 (СТ→АС), 82-83 (ТС→ГТ), 208-209 (СТ→ТА), 214-215 (ГА→ТС) конценсусних послідовностей для цих груп. Також наявний трьохнуклеотидний індел у положенні 154 та низка інших одонуклеотидних мутацій по всій довжині порівнюваних ділянок.

Достатньо багато виявлено відмінностей досліджуваних зразків від послідовності виду, використаного як аутгрупи (мінімальна спорідненість становить 82,5%). Слід зауважити, що приблизно тільки половина з виявлених одно/двонуклеотидних замін збігаються із такими конценсусних послідовностей груп GaQua_3 та GaQua_4. Виявлені особливості у будові частини нуклеотидних послідовностей *G. quadriradiata* наштовхують на думку про можливу подію гібридизації у його межах. Цікавим є факт 100% подібності інших досліджуваних нами зразків, не зважаючи на різну видову належність.

Таблиця 6.

Ступінь подібності (у %) ITS1 35S рДНК представників роду *Galinsoga*

GaQua_1gr	GaQua_2gr	GaQua_3gr	GaQua_4gr	GaQua_5gr	GaQua_GU 818550	GaPar_6gr	GaPar_FJ69 6962	GaPar_KY9 68894	GaPar_MH0 50163	GaPar_MH0 50164	SmMac_FJ6 96963	
***	100.0	87.3	87.3	100.0	99.1	100.0	99.1	99.1	98.7	97.4	84.2	GaQua_1gr
	***	87.3	87.3	100.0	99.1	100.0	99.1	99.1	98.7	97.4	84.2	GaQua_2gr
		***	100.0	87.3	87.5	87.3	87.5	87.5	87.9	88.8	82.5	GaQua_3gr
			***	87.3	87.5	87.3	87.5	87.5	87.9	88.8	82.5	GaQua_4gr
				***	99.1	100.0	99.1	99.1	98.7	97.4	84.2	GaQua_5gr
					***	99.1	100.0	100.0	99.6	98.4	85.8	GaQua_GU818550
						***	99.1	99.1	98.7	97.4	84.2	GaPar_6gr
							***	100.0	99.6	98.4	85.8	GaPar_FJ696962
								***	99.6	98.4	85.8	GaPar_KY968894
									***	98.8	85.4	GaPar_MH050163
										***	85.8	GaPar_MH050164
											***	SmMac_FJ696963

На основі порівняльного аналізу досліджуваних нуклеотидних послідовностей було побудоване філогенетичне дерево (рис. 7).

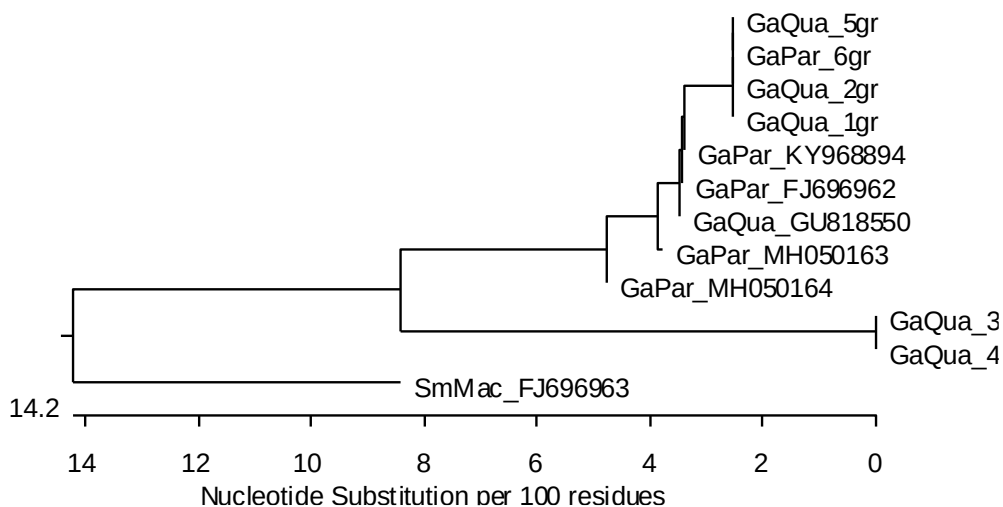


Рис. 7. Філогенетичне дерево представників роду *Galinsoga*, побудоване на основі порівняння ITS1 35S рДНК

Як бачимо з представлених результатів послідовності 3 і 4 груп формують окрему сестринську гілку від усіх інших представників роду (як наших, так і взятих із бази даних GenBank). Помітним стає той факт, що інші наші зразки утворюють окрему гілку, при чому, зразок з 6 групи – *G. parviflora* виявляється спорідненим до 1, 2, 5 і 6 груп *G. quadriradiata*.

Наступним кроком наших досліджень було порівняння нуклеотидних послідовностей другого внутрішнього транскрибованого спейсеру. Як і у випадку з ITS1, нами ця область частково не сиквенована (53 нп), а саме її 5'-кінець. Результати вирівнювання отриманих нами консенсусних послідовностей із зразками бази даних GenBank представлені на (рис. 8). Останні два нуклеотиди послідовності, які не показані на рисунку, ідентичні в усіх зразках і представлені динуклеотидом АТ.

Як видно з представлених результатів за будовою цієї області також найбільше відрізняються сиквенси *G. quadriradiata*, однак для цієї ділянки 35S рДНК відмінності притаманні, на відміну від ITS1, для 2 і 3 груп. Даним послідовностям також притаманний стовідсотковий ступінь подібності між собою (табл. 7). Такі особливості також настановлюють на думку про можливу подію

недавньої гібридизації у межах виду *G. quadriradiata*. Водночас, наявні відмінності, пов'язані із організацією ITS1 та ITS2, дають підґрунтя для припущення щодо участі у його молекулярних перетвореннях додатково і процесу кросинговеру.

Majority	XXXXXXXXXXXXXXXXX-XXXX--X-X--XX---XXXXX-X-XXXXX---XXXXXCGGAGATTGGTCTCCCGTGCTT -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 10 20 30 40 50 60 70
GaQua_1gr	-----C.....
GaQua_2gr	-----.....
GaQua_3gr	-----.....
GaQua_4gr	-----.....
GaQua_5gr	-----.....
GaQua_GU818550	ATCACGTCGCCCCACCAAGCCCACCTCTTTGGAGGGAGGCGTTGGAATGGGG.....
GaPar_6gr	-----.....
GaPar_FJ696962	ATCACGTCGCCCCACCAAGCCCACCTCTTTGGAGGGAGGCGTTGGAATGGGG.....
GaPar_KY968894	ATCACGTCGCCCCACCAAGCCCACCTCTTTGGAGGGAGGCGTTGGAATGGGG.....
GaPar_MH050163	ATCACGTCGCCCCACCAAGCCCACCTCTTTGGAGGGAGGCGTTGGAATGGGG...K.....
GaPar_MH050164	ATCACGTCGCCCCACCAAGCCCACCTTTTTGGAGGGAGGCGTTGGAATGGGG.....
SmMac_FJ696963	ATCACGTCGCCCCACAAAGC--ATCCCTTCA-AGGGACGTGTTGGG-CGGGG.....A...A.
Majority	-TAGTGCGGTTGGCCTAAATGGGAGCCTCCTCAAGAGTGACGCACGGCTAGTGGTGGTTGTTATGACTGTCGTCT -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 80 90 100 110 120 130 140 150
GaQua_1gr	-.....
GaQua_2gr	G.G.C.....AA.G.....T..T..
GaQua_3gr	G.G.C.....AA.G.....T..T..
GaQua_4gr	-.....
GaQua_5gr	-.....
GaQua_GU818550	-.....
GaPar_6gr	-.....
GaPar_FJ696962	-.....
GaPar_KY968894	-.....
GaPar_MH050163	-.....
GaPar_MH050164	-.....
SmMac_FJ696963	G.T...T.....A...T.M.....G.....A.....AAG.T.A.....
Majority	CTTTGCTGTGCGTTTTGATTCTTGGGGTAAAAGCTCTTAAATCACCCGTGACCCGTTGTCTTTTGATGACGATTCG -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 160 170 180 190 200 210 220
GaQua_1gr	
GaQua_2gr	TC..T.....C.....AG.G.....G.....C.....
GaQua_3gr	TC..T.....C.....AG.G.....G.....C.....
GaQua_4gr	
GaQua_5gr	
GaQua_GU818550	
GaPar_6gr	
GaPar_FJ696962	
GaPar_KY968894	
GaPar_MH050163	
GaPar_MH050164	
SmMac_FJ696963	.G.-.TC..A.....AC...A..A.G..A.....GAT.....TTG...C.....C.....T.C.....

Рис. 8 Нуклеотидні послідовності міжгенних спейсерів ITS2 35S рДНК, вирівнянні за допомогою програми MegAlign

Як видно із наведених у таблиці 7 результатів, мінімальний ступінь спорідненості представників роду *Galinsoga* для ділянки ITS2 значно нижчий, порівняно з ITS1, і становить 67,6%. Водночас, як і в попередніх дослідженнях, інші досліджувані нами зразки обох видів показують 100% ступінь подібності.

Таблиця 7.

Ступінь подібності (у %) міжгенного спейсера ITS1 рДНК роду *Galinsoga*

GaQua_1gr	GaQua_2gr	GaQua_3gr	GaQua_4gr	GaQua_5gr	GaQua_GU818550	GaPar_6gr	GaPar_FJ696962	GaPar_KY968894	GaPar_MH050163	GaPar_MH050164	SmMac_FJ696963	
***	85.0	85.0	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	98.8	99.4	70.5	GaQua_1gr
	***	100	85.5	85.5	85.1	85.5	85.1	85.1	84.5	85.1	71.8	GaQua_2gr
		***	85.5	85.5	85.1	85.5	85.1	85.1	84.5	85.1	71.8	GaQua_3gr
			***	100	100	100	100	100	99.4	100	71.1	GaQua_4gr
				***	100	100	100	100	99.4	100	71.1	GaQua_5gr
					***	100	100	100	99.6	99.6	68.0	GaQua_GU818550
						***	100	100	99.4	100	71.1	GaPar_6gr
							***	100	99.6	99.6	68.0	GaPar_FJ696962
								***	99.6	99.6	68.0	GaPar_KY968894
									***	99.1	67.6	GaPar_MH050163
										***	68.0	GaPar_MH050164
											***	SmMac_FJ696963

Надалі для досліджуваної спейсерної ділянки було побудоване філогенетичне дерево на (рис. 9.). Окрему гілку, сестринську до інших представників роду, у даному випадку утворюють зразки другої і третьої конценсусних послідовностей.

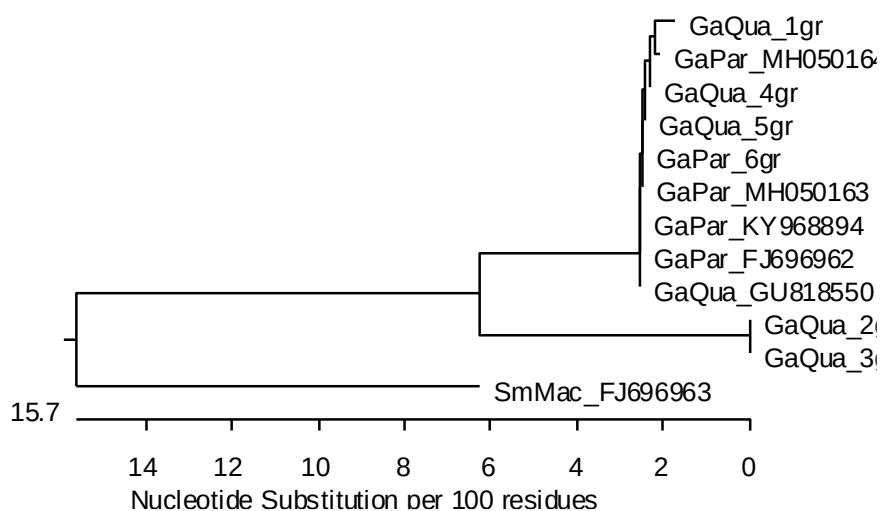


Рис. 9. Філогенетичне дерево представників роду *Galinsoga*, побудоване на основі порівняння ITS2 35S рДНК

Оскільки ми провели дослідження обох спейсерних послідовностей області ITS1-5.8S-ITS2 35S рДНК за винятком незначних її ділянок, було вирішено

побудувати загальне філогенетичне дерево 35S рДНК (рис. 10). Як видно з представлених результатів, зразки 2-4 груп рідів виду *G. quadriradiata* займають відокремлену позицію, формуючи у межах представників свого роду окрему гілку.

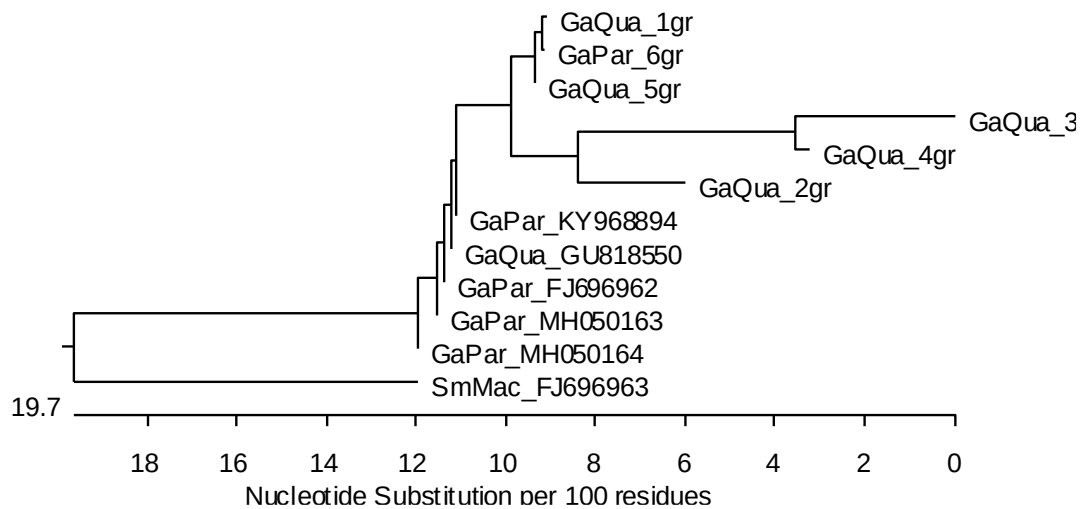


Рис. 10. Філогенетичне дерево представників роду *Galinsoga*, побудоване на основі порівняння ITS1-5.8S-ITS2 ділянки 35S рДНК

Ми провели порівняльний аналіз наших послідовностей із 11 зразками інших 6 видів споріднених родів. Однак, у жодному з випадків таких особливостей будови спейсерної ділянки не виявлено.

Отже, аналіз ITS1-5.8Sp-ITS2 послідовностей також не є оптимальним для баркодингу видів роду галінсога. Водночас, доцільно перевірити їх придатність для порівнянь на міжродовому рівні. Підставою для таких міркувань є проведений нами глибокий порівняльний аналіз даної області для 72 представників споріднених родів, на якому представники різних родів чітко групуються на окремих гілках філогенетичного дерева (рис. 18 додатку Б).

Отримані результати свідчать про необхідність проведення більш глибокого дослідження на молекулярному рівні виду *G. quadriradiata* для розуміння виявлених для нього відмінностей.

ВИСНОВКИ

1. Нагромадження мутацій у *G.graminifolium*, *G. tataricum* і *G. besserianum* спостерігається більше у половині спейсера, що межує з 3'-кінцем гену psbA. Мінімальний ступінь спорідненості з показником 91,9% виявлений між зразками *G. besserianum*.
2. Міжгенні спейсери psbA-trnH області *Galinsoga parviflora* та *G. quadriradiata* становлять 371 нп і володіють 100% ступенем спорідненості.
3. Нуклеотидні послідовності ITS1-5.8S-ITS2 ділянок ядерної рДНК представників роду *Galinsoga* володіють високим рівнем спорідненості. У геномі *G. quadriradiata* виявлені п'ять різновидів цієї ділянки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Доброчаева, Д., Котов, М., Прокудин, Ю. Н. и др. (1987). Определитель высших растений Украины. *Наукова думка*.
2. Захарова, М., Овсієнко, В., Мойсієнко, І., & Садова О. (2017) Еколого-ценотична характеристика *Goniolimon graminifolium* (AITON) Boiss. на території Нижнього Придніпров'я. *Заповідна справа у Степовій зоні України* (до 90-річчя від створення Надморських заповідників) праці всеукр. наук.-практ. конф. (с. Гурзуф, 14-15 березня 2017 року). Серія: «*Conservation Biology in Ukraine*», 2(2), 85-88.
3. Протопопова В. (1989). Рослини-мандрівники. *Рад. шк.*
4. Сенников, А.Н. (2019) Флора Узбекистана, 3. *Маънавият*.
5. Amiteye S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10), e08093. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093>
6. Areington, C. A., Neto, M. C. L., Watt, P., & Seršen. (2022). Assessing the utility of selected photosynthetic and related traits in screening *Amaranthus dubius* Mart. ex Thell. and *Galinsoga parviflora* Cav. 1796 seedlings for elevated temperature stress tolerance. *South African Journal of Botany*, 145, 444–457. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.02.037>
7. Badilla, J., & Fiangaan, M. (2022). Pharmacognostic Evaluation and Acute Toxicity Test of the Formulated Tisane Powder of Gallant Soldier (*Galinsoga parviflora* Cav., Asteraceae) Aerial Parts from Benguet, Philippines. *Pharmacognosy Journal*, 14(1), 193–204. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.25>
8. Bazyłko, A., Stolarczyk, M., Derwińska, M., & Kiss, A. K. (2012). Determination of antioxidant activity of extracts and fractions obtained from *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga quadriradiata*, and a qualitative study of the most active fractions using TLC and HPLC methods. *Natural Product Research*, 26(17), 1584–1593. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.582469>
9. Bharathi, D. R., Bhat, W. H., M, R. K., Ahmed, S. S., Dinesan, A., Pavithran, A., & George, D. M. (2021). Ethnobotanical and pharmacological profile of *Galinsoga*

- parviflora*. *Deleted Journal*, 63–69. <https://doi.org/10.46795/ijhcbs.v2i4.243>
10. Buzurović, U., Bogdanović, S., Brullo, S., Niketić, M., & Tomović, G. (2018). *Goniolimon africanum* (Plumbaginaceae), a new endemic species from North Africa. *Phytotaxa*, 349(3), 287–297. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.349.3.10>
 11. Buzurović, U., Tomović, G., Niketić, M., Bogdanović, S., & Aleksić, J. (2020). Phylogeographic and taxonomic considerations on *Goniolimon tataricum* (Plumbaginaceae) and its relatives from south-eastern Europe and the Apennine Peninsula. *Plant Systematics and Evolution*, 306(29). <https://doi.org/10.1007/s00606-020-01636-0>
 12. Byng, J., Chase, M., Christenhusz, M., Fay, M., Judd, W., Mabberley, D., Sennikov, A., Soltis, D., Soltis, P., Stevens, P. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. (2016). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
 13. Canne, J. (1977). A revision of the genus *Galinsoga* (Compositae: Heliantheae) *Rhodora*. *Journal of the New England botanical club*, 79(818), 319–389.
 14. Damalas, C. A. (2008). Distribution, biology, and agricultural importance of *Galinsoga parviflora* (Asteraceae). *Weed Biology and Management*, 8(3), 147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2008.00290.x>
 15. De Oliveira, L. O., Rody, H. V. S., Aguilera, S., & Murillo, J. (2024). Acquisition, Evolution, and Diversification of Genomic Islands: A Case Study of a Virulence Gene Cluster in *Pseudomonas syringae*. bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2024.06.12.598671>
 16. Ding, Q., Li, R., Ren, X., Chan, L., Ho, V. W. S., Xie, D., et al. (2022). Genomic architecture of 5S rDNA cluster and its variations within and between species. *BMC Genomics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08476-x>
 17. Dobešová, E., Malinská, H., Matyášek, R., Leitch, A. R., Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Kovařík, A. (2014). Silenced rRNA genes are activated and substitute for partially eliminated active homeologs in the recently formed allotetraploid, *Tragopogon mirus* (Asteraceae). *Heredity*, 114(3), 356–365. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.111>

18. Fernández, P., Hidalgo, O., Juan, A., Leitch, I. J., Leitch, A. R., Palazzesi, L., Pegoraro, L., Viruel, J., & Pellicer, J. (2022). Genome Insights into Autopolyploid Evolution: A Case Study in *Senecio doronicum* (Asteraceae) from the Southern Alps. *Plants*, 11(9), 1235. <https://doi.org/10.3390/plants11091235>
19. Feuillée, L. (1714). Histoire des plantes medecinales qui sont le plus en usage aux royaumes de l'Amerique meridionale, du Perou & du Chily, : composée sur les lieux par ordre du Roy, dans les années 1709. 1710. & 1711. *Journal des observations physiques, mathematiques et botaniques, Faites par l'ordre du Roy sur les Côtes Orientales de l'Amerique Meridionale, & dans les Indes Occidentales, depuis l'anné*, (2), 769 urn:oclc:record:1157135406
20. Funk, V. A. (2009). Systematics, evolution, and biogeography of *Compositae*. *International Association for Plant Taxonomy*, Institute of Botany, University of Vienna, Rennweg 14, 1030 Vienna, Austria, 1001.
21. Garcia, S., Panero, J., Siroky, J., & Kovarik, A. (2010). Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-176>
22. Haliniarz, M., Chojnacka, S., Róžańska-Boczula, M., Gawęda, D., & Woźniak, A. (2020). *Galinsoga parviflora* Response to Different Application Rates of the Herbicide Chwastox Turbo 340 SL in Spring Barley. *Acta Agrobotanica*, 73(3). <https://doi.org/10.5586/aa.7335>
23. Han, X., & Li, X. (2023). Analysis of double phytoextraction of Cadmium and microplastics by *Galinsoga quadriradiata* in soil an exploration for a comprehensive treatment method for the environment. *Applied and Computational Engineering*, 24(1), 7–24. <https://doi.org/10.54254/2755-2721/24/20230671>
24. Haskell, G., & Marks, G. E. (1952). Chromosome ecology of british galinsoga species. *John Innes Horticultural Institution, Bayfordbury, Hertford, Herts.* 382-387.
25. Inceer, H., Garnatje, T., Hayırlıoğlu-Ayaz, S., Pascual-Díaz, J. P., Vallès, J., & Garcia, S. (2018). A genome size and phylogenetic survey of Mediterranean *Tripleurospermum* and *Matricaria* (Anthemideae, Asteraceae). *PloS One*, 13(10),

e0203762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203762>

26. Isuosuo, C. C., Akaneme, F. I., & Urom, U. N. (2024). Identification of *Treculia africana* L. varieties using Internal Transcribed Spacer Region 1 (ITS 1) and Internal Transcribed Spacer Region 2 (ITS 2) DNA barcodes. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4355610/v1>
27. Jang, T., Emadzade, K., Parker, J., Temsch, E. M., Leitch, A. R., Speta, F. et al. (2013). Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-136>
28. Kazlauskienė, D., Nenortienė, P., Kvedaravičius, D., Daukšienė, J., & Velžienė, S. (2023). Investigation of the qualitative and quantitative composition of amino acids in the herb of small flowered *Galinsoga* (*Galinsoga parviflora* L.) using gas chromatography. *Chemija*, 34(2). <https://doi.org/10.6001/chemija.2023.34.2.2>
29. Lazkov, G., Sennikov, A., Koichubekova, G., Naumenko, A. (2014). Taxonomic corrections and new records in vascular plants of Kyrgyzstan, 3. *Memoranda - Societatis pro Fauna et Flora Fennica*, 90, 91–110.
30. Mahmood, M. R., Junayed, A., Bhowmick, C., Sompa, S., Sultana, T., Akter, T. et al. (2021). Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from leaf and flower extracts of *Galinsoga formosa*. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 4(2), 178. <https://doi.org/10.5455/jabet.2021.d118>
31. Malekmohammadi, M., Lack, H. W., Lomonosova, M. N., & Akhiani, H. (2017). The discovery, naming and typification of *Limonium gmelina* (Plumbaginaceae). *Willdenowia*, 47(2), 99–106. <https://doi.org/10.3372/wi.47.47201>
32. Muñoz-Torrero, D., Vinardell, M., P., & Palazón, J. (2015). Recent Advances in Pharmaceutical Sciences V, *Research Signpost*, 5(4), 85-100. <https://doi.org/10.1007/978-981-99-2302-1>
33. Musinguzi, A., Tigalana, D., Tumusiime, G., & Ildephonse, N. (2022). Development of antimicrobial cotton fabric through application of dye extracts from *Galinsoga parviflora* plant leaves, 37-42
34. Olanj, N., Garnatje, T., Sonboli, A., Vallès, J., & Garcia, S. (2015). The striking and

- unexpected cytogenetic diversity of genus *Tanacetum* L. (Asteraceae): a cytometric and fluorescent in situ hybridisation study of Iranian taxa. *BMC Plant Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0564-8>
35. Panero, J., Jansen, R., & Clevinger, J. (1999). Phylogenetic relationships of subtribe Ecliptinae (Asteraceae: Heliantheae) based on chloroplast DNA restriction site data. *American journal of botany*, 86(3), 413–427.
 36. Rabitsch, W., Essl, F. & Klingenstein, F. (Eds.). (2008). Biological Invasions– from Ecology to Conservation. *Neobiota*. 7, 200-209.
 37. Ranjitha, S., & Suganthi, A. (2017). Preliminary phytochemical analysis of *Galinsoga parviflora* (Cav) leaves and flowers. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(3), 18–20. <http://www.pharmacyjournal.in/archives/2017/vol2/issue3/2-3-15>
 38. Ripanda, A., Luanda, A., Sule, K. S., Mtabazi, G. S., & Makangara, J. J. (2023). *Galinsoga parviflora* (Cav.): A comprehensive review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological studies. *Heliyon*, 9(3), e13517. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13517>
 39. Roslim, D. I., Ashfira, A., Mutiarawati, D., Rosmeilinda, T. F., Aisyah, N., Herman, H. et al. (2019). Isolation of Partial Housekeeping Genes on Tuntun Angin (*Elaeocarpus floribundus*). *Journal of Biology & Biology Education*, 11(2), 194-201.
 40. Samuel, R., Gutermann, W., Stuessy, T. F., Ruas, C. F., Lack, H., Tremetsberger, K., et al. (2006). Molecular phylogenetics reveals Leontodon (Asteraceae, Lactuceae) to be diphyletic. *American Journal of Botany*, 93(8), 1193–1205. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.8.1193>
 41. Santosa, E., Zaman, S., Guntoro, D., & Susila, A. D. (2020). Agroecology and Uses of *Galinsoga parviflora* as Indigenous Vegetable in Highland of Kuningan, Banjarnegara and Wonosobo, Indonesia. *Jurnal Agronomi Indonesia*, 48(3), 339–347. <https://doi.org/10.24831/jai.v48i3.32800>
 42. Semple, J. C., & Watanabe, K. (2023). An overview to the index to chromosome numbers in Asteraceae Database: revisiting base chromosome numbers, polyploidy, descending dysploidy, and hybridization. In *Methods in molecular biology*, 161–171.

https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3389-2_12

43. Singh, A., Patel, A., Gupta, N., & Jain, U. (2022). Hepatoprotective activity of *Galinsoga parviflora* Cav. against CCl₄ induced hepatotoxicity in albino rats. 1.
44. Studzińska-Sroka, E., Dudek-Makuch, M., Chanaj-Kaczmarek, J., Czepulis, N., Korybalska, K., Rutkowski, R. et al. (2018). Anti-inflammatory activity and phytochemical profile of *Galinsoga parviflora* Cav. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 23(9), 2133. <https://doi.org/10.3390/molecules23092133>
45. Tani., C. K. (2012). Une nouvelle espèce naturalisée en Algérie: *Galinsoga parviflora* Cav. *Poiretia*, 4, 17-24.
46. Thompson, C., Kohorst, M. A., Rangan, A., Bortnova, J. M., Porter, T. R., Nguyen, P. L., Wieben, E. D., Hasadsri, L., Hoyer, J. D., & Oliveira, J. L. (2021). Large β Globin Gene Cluster Deletions and Implications on Transcription Factor Regulation in Hemoglobin Switching - A Novel ϵ $G\gamma$ $A\gamma$ Deletion with Intact LCR. *Blood*, 138(Supplement 1), 3083. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-151768>
47. Wanakai, S. I., Kareru, P., Makhanu, D. S., Madivoli, E. S., Maina, E. G., & Nyabola, A. O. (2019). Catalytic degradation of methylene blue by iron nanoparticles synthesized using *Galinsoga parviflora*, *Conyza bonariensis* and *Bidens pilosa* leaf extracts. *SN Applied Sciences/SN Applied Sciences*, 1(10). <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1203-z>
48. Wang, W., Ma, L., Becher, H., Garcia, S., Kovarikova, A., Leitch, I. J. et al. (2015). Astonishing 35S rDNA diversity in the gymnosperm species *Cycas revoluta* Thunb. *Chromosoma*, 125(4), 683–699. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0556-3>
49. Wicke, S., Costa, A., Muñoz, J., & Quandt, D. (2011). Restless 5S: The re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.023>
50. Zhang, Z., Chen, Y., Jiang, X., Zhu, P., Zeng, Y., Tang, T., & Li, L. (2019). Characterization of the complete chloroplast genome sequence of *Galinsoga parviflora* and its phylogenetic implications. *Mitochondrial DNA. Part B, Resources*, 4(2), 2106–2108. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1623106>

51. <https://wfoplantlist.org>
52. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33900607/>
53. <https://www.wur.nl/en/show/Inter-Simple-Sequence-Repeats-ISSR.htm>
54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33900607/>
55. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/>
56. https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-1966-6_6
57. <https://www.wur.nl/en/show/Inter-Simple-Sequence-Repeats-ISSR.htm>

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Вимоги безпеки перед початком роботи

1. Лабораторія має знаходитись у прибраному та чистому стані; на робочих місцях мають знаходитись лише необхідні прилади та матеріали, запаси зберігаються у шафах або на складі.
2. Перед початком роботи потрібно:
 - оглянути та упорядкувати робоче місце;
 - перевірити витяжну систему;
 - перевірити правильність підключення устаткування до електромережі;
 - перевірити справність струмопровідних дротів і відсутність оголених ділянок;
 - переконатися в наявності захисного заземлення приладів.
3. Забороняється приступати до роботи при виявленні пошкодження обладнання. Працівник зобов'язаний повідомити керівнику про виявлені пошкодження.

Вимоги безпеки під час виконання роботи

1. Необхідно використовувати захисний одяг (лабораторний бавовняний халат, при необхідності гумові рукавички та окуляри; при роботі з дрібнодисперсними речовинами потрібно носити респіраторні маски, при роботі з рідким азотом – захисний щиток або окуляри);
2. Двері під час роботи мають бути зачинені;
3. При роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами потрібно дотримуватись запобіжних заходів. Зберігати вибухові та горючі речовини необхідно в окремих приміщеннях у невеликих кількостях і в місцях, захищених від світла, вологи і пилу;
4. При роботі з леткими речовинами слід користуватись витяжною шафою.

У приміщеннях кафедри забороняється:

- працювати без нагляду співробітника або лаборанта;
- працювати у верхньому одязі;
- користуватися косметикою, палити, їсти, пити та зберігати продукти

харчування;

- викидати в раковини скло, сміття, виливати концентровані кислоти, луги, органічні розчинники, легкозаймисті та горючі рідини;
- зберігати реактиви у посуді без етикеток.

По закінченні роботи слід мити руки.

Проведення гентехнічних робіт

У лабораторії мають працювати лише кваліфіковані співробітники, які пройшли інструктаж керівника кафедри або лабораторії. Інструктаж з техніки безпеки має проводитись не рідше одного разу на 6 місяців, що має бути підтверджено підписом у журналі з техніки безпеки. Всі гентехнічні роботи мають фіксуватися у письмовому вигляді.

Правила роботи з мікроорганізмами:

- двері під час роботи мають бути закриті;
- має використовуватись захисний одяг (лабораторний халат, при необхідності гумові рукавички та окуляри або захисна маска);
- у лабораторії заборонено, їсти, пити та зберігати продукти харчування;
- слід запобігати утворення аерозолів;
- по закінченню роботи слід мити руки;
- лабораторія має знаходитись у прибраному та чистому стані;

Транспортування та знищення бактерій і трансгенних організмів:

Перенесення бактерій з однієї лабораторії до іншої має відбуватися лише у стійкій до розбивання посуді або у контейнерах. Це стосується також залишків використаних бактеріальних культур.

Всі бактеріальні відходи, забруднені матеріали, посуд та інструменти мають бути проавтоклавовані або простерилізовані іншим шляхом. Користуватися автоклавом дозволяється лише персоналу, який пройшов відповідний інструктаж та отримав допуск.

Робота з хімічними речовинами

Робота з хімічними речовинами має бути орієнтована на такі принципи:

1. Робота з шкідливими речовинами повинна відповідати вимогам техніки безпеки та захисту довкілля.
2. Використання токсичних та потенційно канцерогенних речовин необхідно зводити до мінімуму.
3. У лабораторії можна зберігати лише ті речовини, які необхідні для роботи найближчим часом.

У кожній лабораторії повинні бути списки небезпечних речовин.

Філогенія таксонів рослин та особливості будови ділянок
молекулярних маркерів



Рис. 1. Філогенетичне дерево порядку Caryophyllales

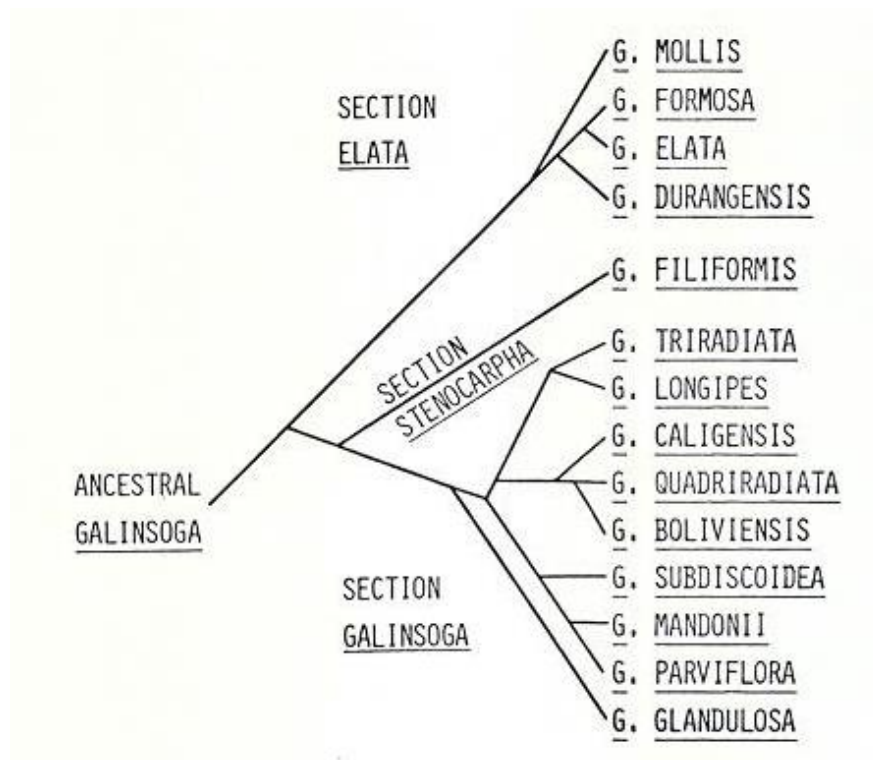


Рис. 2. Філогенетичне дерево таксону *Galinsoga*

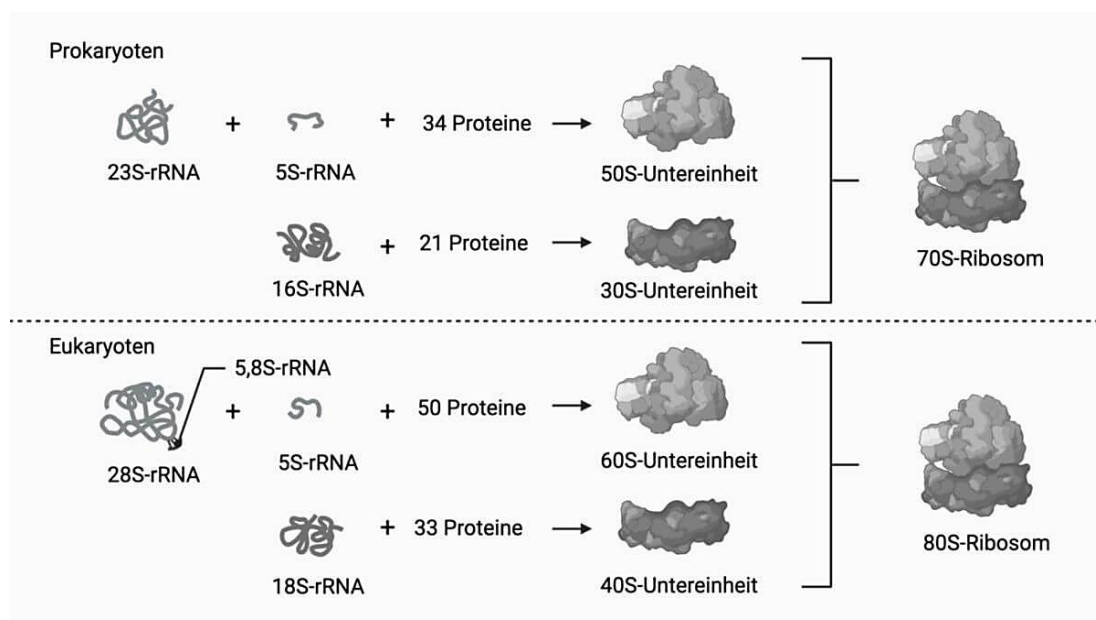
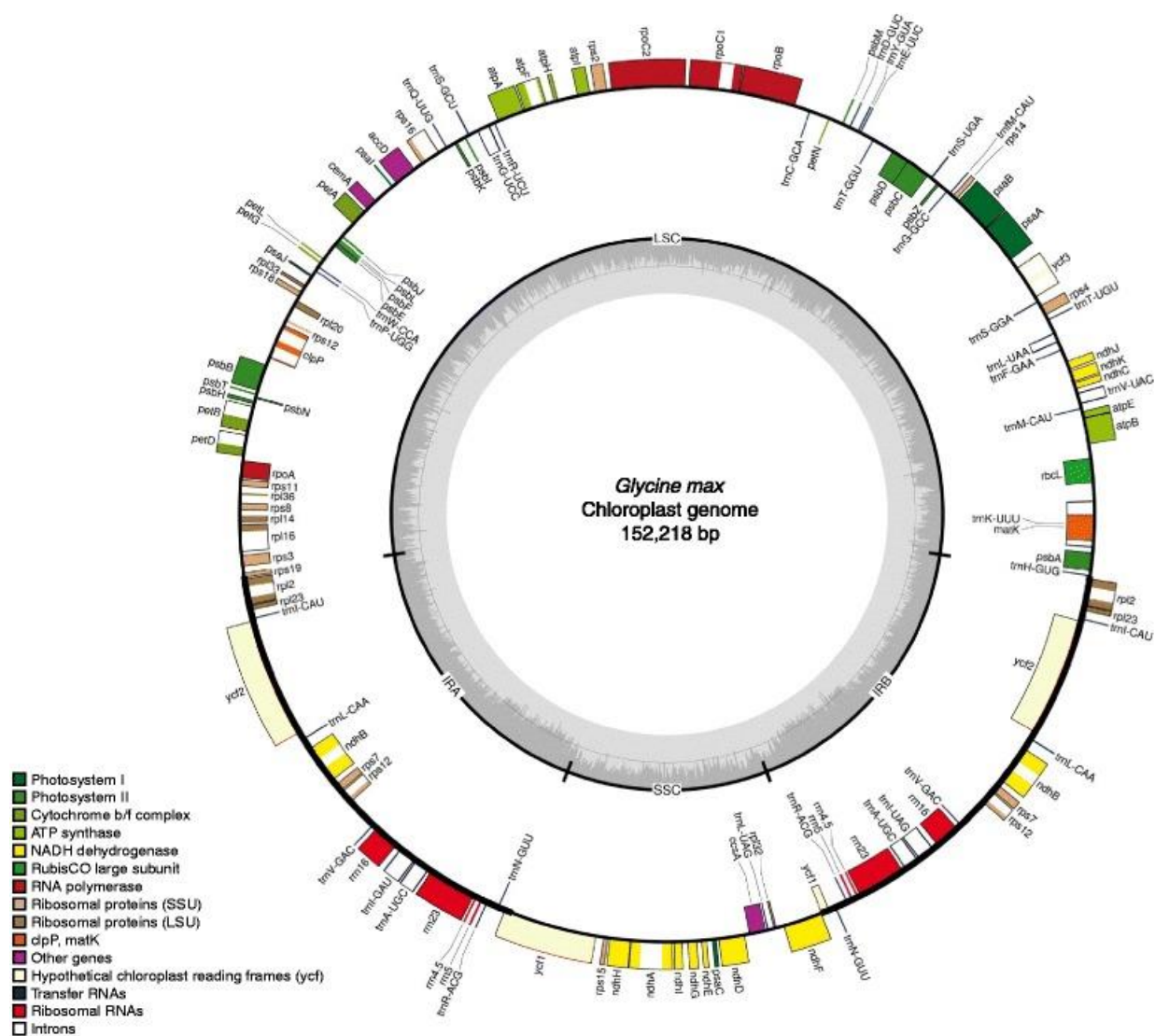


Рис. 3. Схема будови окремих субодиниць рибосомної РНК і способу їх поєднання для створення рибосомальних субодиниць (<https://flexikon.doccheck.com/de/5,8S-rRNA>)



(b)

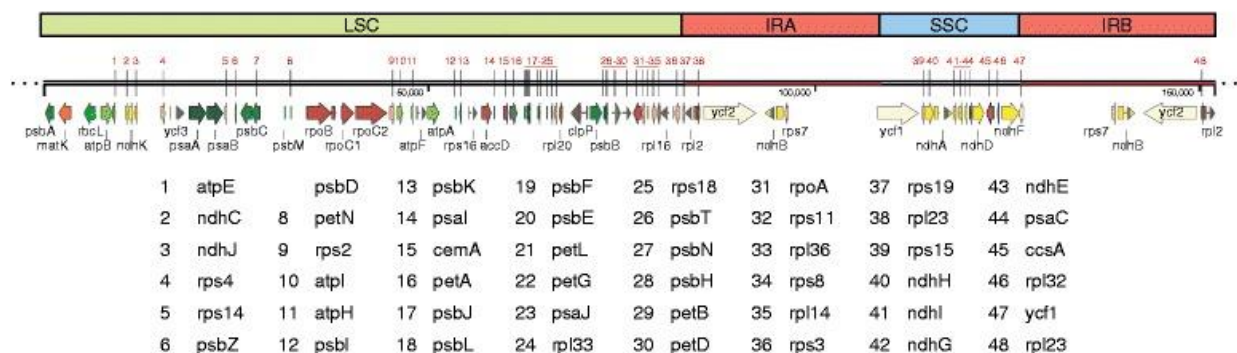


Рис. 4. Приклад будови пластому на основі хлДНК сої (*Glycine max*), який було використано для підвищення стійкості до комах та гербіцидів

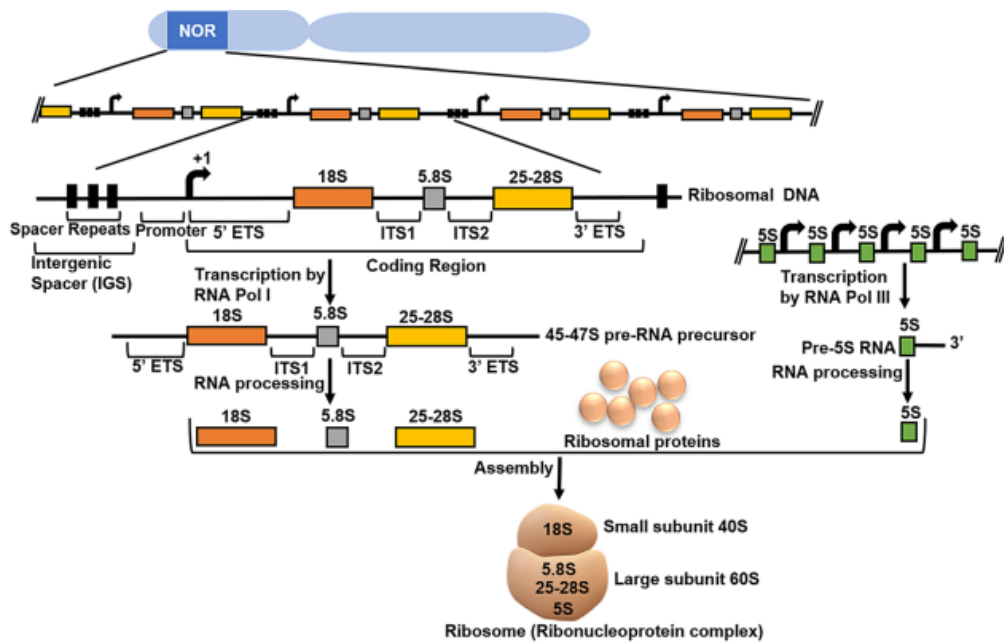


Рис. 5. Розташування генів рРНК і біогенез рибосом. Будова 35S рДНК та структура тандемних повторів

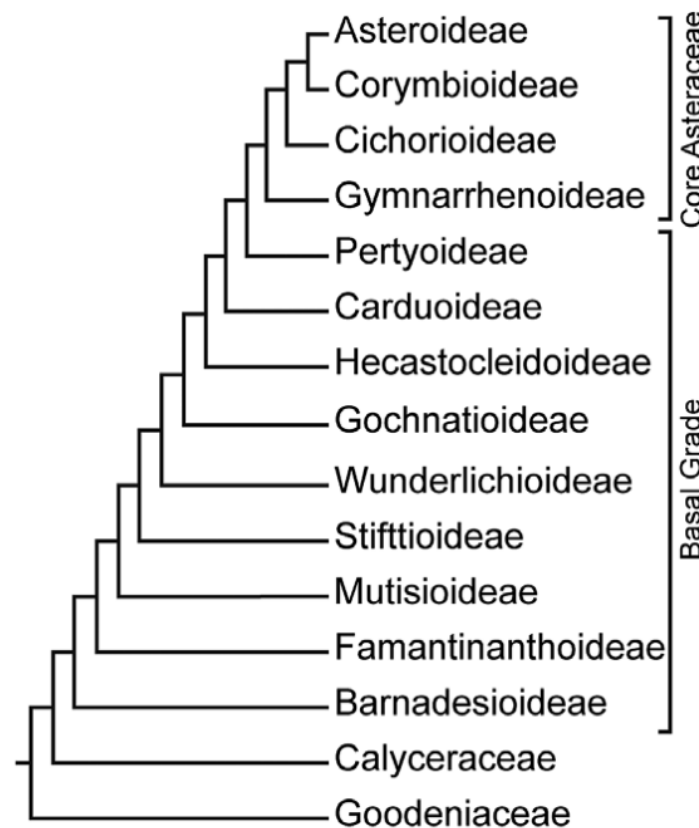


Рис. 6. Філогенетичне дерево порядку Caryophyllales

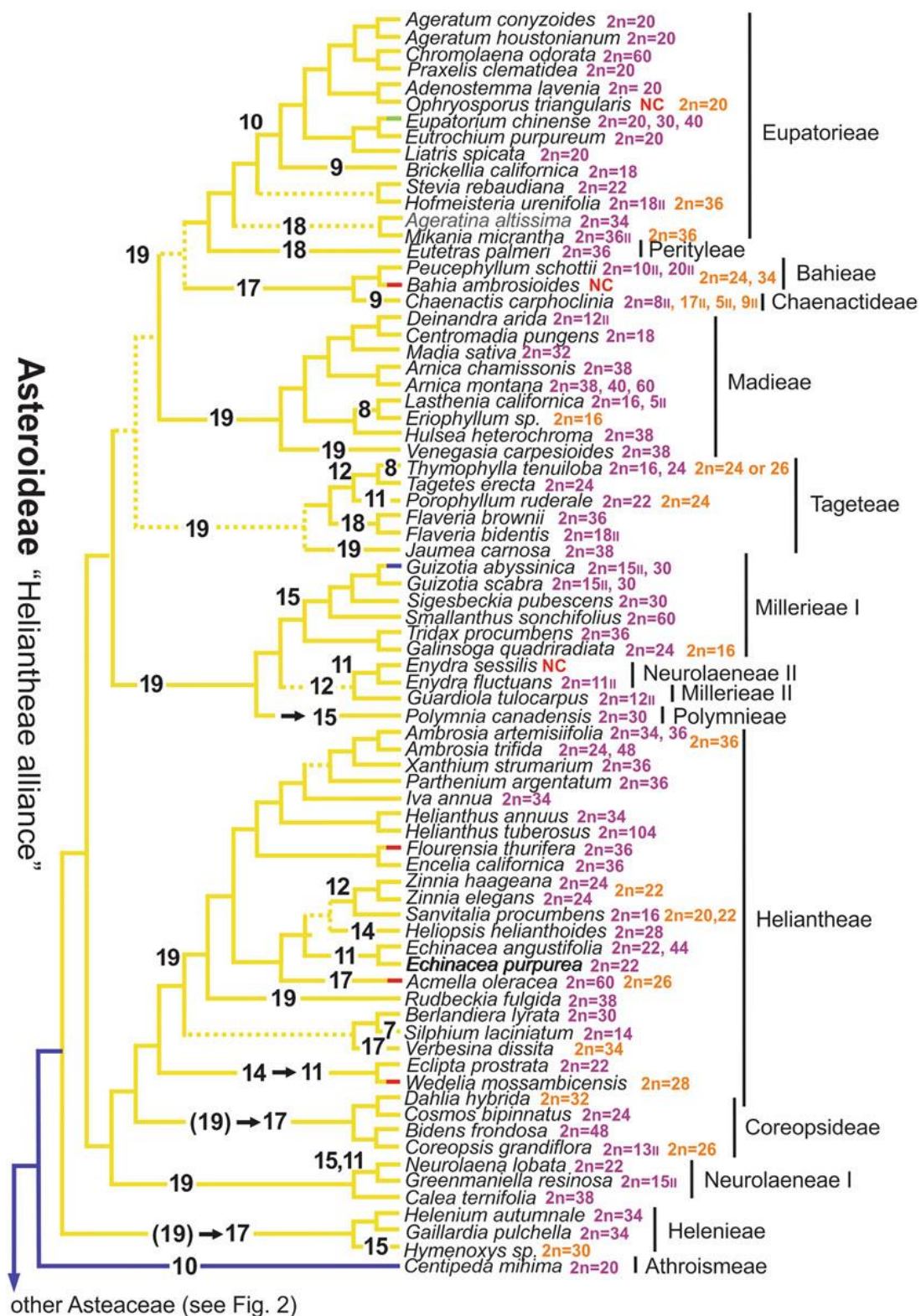


Рис. 7. Філогенетичне дерево надтриби Heliantheae на основі хромосомних чисел

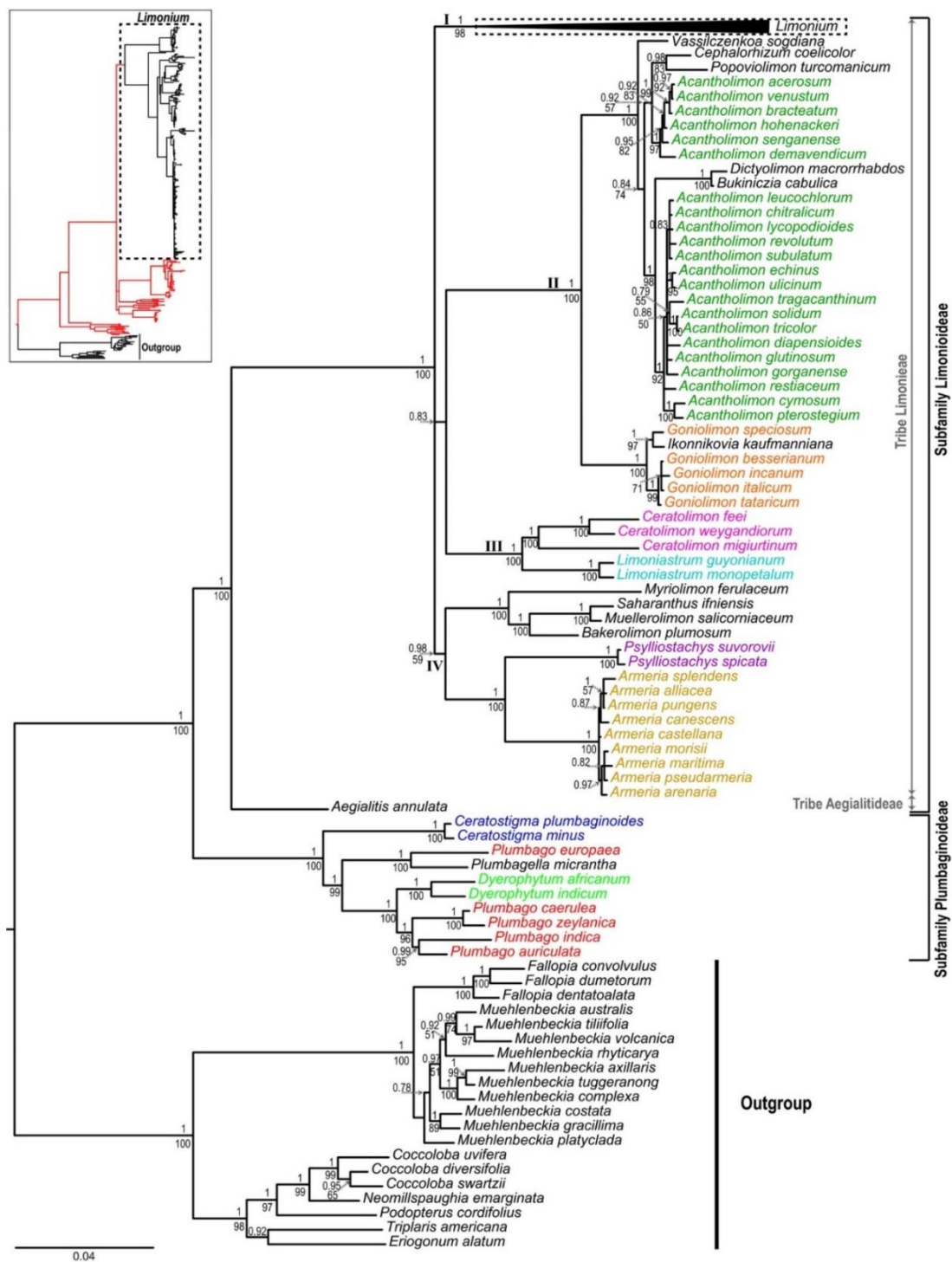


Рис. 8. Філогенетичне дерево таксону Plumbaginaceae



Рис. 9. Філогенетичне дерево таксону *Galinsoga* та споріднених до нього родів *Sigesbeckia*, *Smallanthus*, *Lecocarpus* та *Tridax*, побудоване на даних GenBank