

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

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

**Використання 5S рДНК для баркодингу рідкісних та
інвазійних видів рослин**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконав:

студент 6 курсу, групи 507
спеціальність

Кулаков Денис Богданович

Керівник:

Доктор біологічних наук,
професор **Волков Р.А.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри

протокол № ____ від _____ 2024 р.

Зав. кафедри

проф. Волков Р.А.

Чернівці – 2024

Анотація

В дипломній роботі наводяться дані аналізу послідовності міжгенного спейсеру (IGS) 5S рибосомної ДНК представників роду *Aconitum* та ряду інвазійних видів Флори України. Послідовності були клоновані та сиквеновані автором або зібрані із використанням біоінформатичних методів. Отримані дані були використані для аналізу організації і еволюції IGS 5S рДНК досліджуваних видів та філогенетичного аналізу.

Робота була виконана у 2023 - 2024 роках на базі кафедри Молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича.

Об'єм роботи складає 47 сторінку і включає 3 таблиці та 12 рисунків. В роботі використано 44 літературних джерел.

Ключові слова: IGS 5S рДНК, *Aconitum*, *Galinsoga*, інвазійні рослини, молекулярний баркодинг, філогенія.

Abstract

The thesis presents data on the analysis of the sequence of the intergenic spacer (IGS) 5S ribosomal DNA of representatives of the genus *Aconitum* and several invasive species of the Flora of Ukraine. The IGS 5S rDNA regions were cloned and sequenced by the author or assembled using bioinformatic methods. The obtained data were used to analyze the organization and evolution of the IGS 5S rDNA of the studied species and phylogenetic analysis.

The work was carried out in 2023 - 2024 at the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of the Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University.

The work is 47 pages long and includes 3 table and 12 figures. 44 literature sources were used in the work.

Keywords: IGS 5S rDNA, *Aconitum*, *Galinsoga*, invasive plants, molecular barcoding, phylogeny.

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

_____ Д.Б. Кулаков

ЗМІСТ

ВСТУП.....

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика рДНК

1.2. Будова 5S рДНК.....

1.3. Молекулярно-генетичні дослідження рослин використанням 5S рДНК....

1.4. Баркодинг і систематика інвазійних та рідкісних видів рослин.....

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Організація та еволюція IGS 5S рДНК у представників роду *Aconitum*

3.2. Поліморфізм IGS 5S рДНК у різних груп інвазійних рослин флори України

ВИСНОВКИ.....

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....

ДОДАТКИ.....

ВСТУП

Захист рідкісних видів рослин та боротьба з інвазійними видами у сучасному світі є важливими інструментами збереження цілісності екосистем. Проте дуже часто класичних підходів недостатньо для визначення таксономічного статусу певного виду. На сьогодні використання генетичного аналізу є обов'язковим для успішної ідентифікації виду та розіміння взаємовідносин між видами. Тому пошук ефективних молекулярних маркерів для філогенетичного аналізу є досить актуальною темою на сьогодні.

Aconitum являє собою рід трав'янистих рослин, до якого входить багато токсичних, фармацевтично важливих та декоративних видів. Проте багато представників цього роду досі мають неясний таксономічний статус. Наприклад, таксономічне положення представників комплексу *Anthora*, зокрема і його представників занесених у Червону книгу України, в межах роду залишається суперечливим. Хлоропластні і ядерні геномні області, використані раніше для філогенетичного аналізу, виявилися недостатньо варіабельними. З огляду на це, актуальним є пошук більш інформативних молекулярних маркерів, особливо ядерної локалізації. Нещодавно були проведені перші дослідження організації та еволюції ділянки міжгенного спейсера (intergenic spacer - IGS) 5S рибосомної ДНК (рДНК) для представників роду *Aconitum* (Tynkevich et al., 2022). Проте, аналіз послідовності IGS 5S рДНК був проведений лише для незначного числа видів, переважно з групи *Anthora*.

Galinsoga — рід квіткових рослин родини складноцвітих (*Asteraceae*). Види цього роду походять з Центральної і Південної Америки та натуралізувалися в Європі, Азії, Африці та Австралії. На території України зростає два види: *Galinsoga quadriradiata* (Незбутниця волохата) та *G. parviflora* (Незбутниця дрібноцвіта). Обидва представники роду є агресивними інвазійними видами. Припускають, що між *G. quadriradiata* та *G. parviflora* утворюються гібриди, які потенційно можуть бути більш інвазійними ніж батьківські види. Виявлення гібридизації та інтрогресії між

видами *Galinsoga* можливе лише з використанням молекулярно-генетичних методів.

Heracleum це рід дво- та багаторічних трав'янистих рослин родини окружкових (*Apiaceae*). Види роду зростають у помірній зоні північної півкулі і в горах тропіків Африки й Південно-Східної Азії. В Україні можна зустріти 8 видів. На території України особливого значення набув *H. sosnowskyi*, як карантинна отруйна рослина, яку легковажно завезли за часів СРСР як силосну культуру..

Reynoutria — рід квіткових рослин родини горцяних (*Polygonaceae*) , також відомого як родина споришів або гречаних. Рід походить зі східного Китаю та Східної Азії, хоча види були завезені до Європи та Північної Америки. Члени роду, включаючи *R. japonica* і його гібрид з *R. sachalinensis*, є високо інвазійними рослинами.

Impatiens — рід із понад 1000 видів квіткових рослин, широко розповсюджених у Північній півкулі та тропіках. Для України особливо важливим є інвазійний вид *Impatiens parviflora*, який був завезений з Середньої Азії у ботанічні сади і в подальшому поширився по території більшості континентів.

Для представників згаданих вище родів інвазійних рослин з території України на сьогодні відсутні молекулярно-генетичні дослідження.

З огляду на вищезазначене **метою** цієї роботи було проаналізувати організацію та еволюцію ділянки ядерного геному IGS 5S рДНК у представників різних груп роду *Aconitum* та інвазійних рослин та оцінити можливість їх молекулярної ідентифікації.

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

- 1) Зібрати рослинний матеріал та виділити геномну ДНК;
- 2) Провести ПЛР-ампліфікацію, клонування та секвенування ділянки IGS 5S рДНК;
- 3) Провести структурний, еволюційний та філогенетичний аналіз секвенованих послідовностей IGS 5S рДНК.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика рДНК

Еукаріотичні рибосоми (80S) складаються з великої (60S) і малої (40S) субодиниць (де S - коефіцієнт седиментації одиниці Сведберга), які еволюційно консервативні. Біогенез рибосоми включає синтез та процесинг чотирьох рРНК, 18S, 5,8S, 25S/28S і 5S, і приблизно 80 рибосомальних білків. Гени рРНК (рДНК) присутні в геномі як багатогенне сімейство, переважно розташоване в NOR (nucleolus-organizing region – область організації ядра). У всіх вищих організмів у ядрі формуються обидві субодиниці рибосоми. Після експорту субодиниць рибосоми в цитоплазму функціонально вони пов'язуються з транслятивною мРНК до 80S комплексу (Sáez-Vásquez et al., 2019; Hemleben et al., 2004; McStay et al., 2008).

Рибосомальна ДНК (рДНК) є важливим компонентом геномів організмів і зазвичай присутня у великій кількості копій. Відносна кількість і розмір масивів рДНК у ядерній ДНК може сильно варіювати, коливаючись від ~0,4% у людини (з приблизно 500 копіями, розкиданими на п'яти хромосомах) до майже 17% у *Drosophila melanogaster* (80–600 на статевих хромосомах). На сьогоднішній день еукаріотична клада, що демонструє найбільшу кількість повторів рДНК (до 22 000 транскрипційних одиниць), є *Streptophytes* та *Chlorophytes*. На рівні транскрипції рибосомальна РНК є найпоширенішою, становлячи в середньому 80% загальної РНК клітини. Завдяки своїй центральній ролі в клітинному метаболізмі рДНК демонструє надзвичайно високий ступінь консервативності серед організмів (Wicke et al., 2011).

18S, 5.8S і 25S рРНК (або 28S у ссавців) транскрибуються однією одиницею, відомою як 45S рДНК у рослинах, 47S рДНК у клітинах ссавців і 35S рДНК у дріжджах. 5S рРНК кодується транскрипційно розділеними одиницями 5S рДНК. Кожен масив 45S рДНК містить змінну кількість повторюваних одиниць тандемної транскрипції, які відокремлені одна від

одної міжгенними спейсерами. Гени, що кодують малу рибосомну субодиницю (SSU, 18S), 5,8S рРНК і велику рибосомну субодиницю (LSU, 25S або 26S у рослин, 28S у тварин), розділені двома внутрішніми транскрибованими спейсерами (ITS 1 і 2) і утворюють одну одиницю транскрипції. Кожна одиниця фланкована 5'- і 3'-зовнішніми транскрибованими спейсерами (ETS), як частиною міжгенного спейсера (IGS). Середня частина IGS між 3'- і 5'-ETS не транскрибується, і іноді її називають нетранскрибованим спейсером (NTS). Масиви 45S рДНК часто виглядають як субтеломерне вторинне звуження (Wicke et al, 2011; McStay et al., 2008; Hemleben et al., 2004).

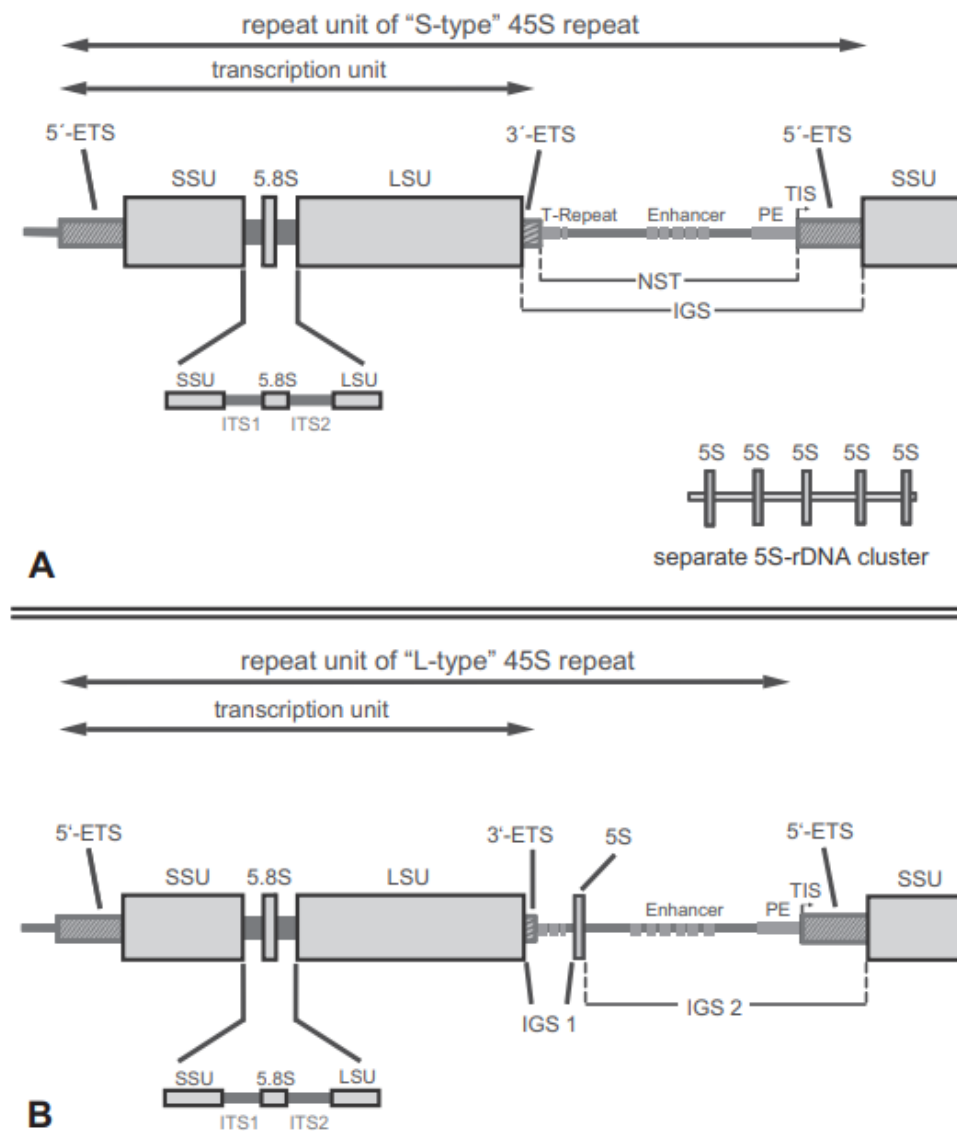


Рис. 1.1. Організація ядерної рибосомної ДНК. Організація кластерів рДНК S- і L-типу (Wicke et al, 2011).

Хромосомне розташування ділянки, що кодує 5S рРНК, варіабельне як у прокаріотичних, так і в еукаріотичних організмах. У вищих рослин і тварин гени 5S рРНК часто утворюють окремі кластери. Масив 5S рДНК може бути знайдений у більш ніж одному локусі або на тій же хромосомі, що й повтори 45S, або розкиданий по геному. У рослин кількість копій генів 5S РНК може коливатися від 2000 до 75 000 (Wicke et al, 2011; Hemleben et al., 2004).

З доступністю геномних послідовностей і підвищеним інтересом до генів рРНК сільськогосподарських культур і різних модельних рослин (наприклад, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Brassica rapa*) розташування та організація генів рРНК у окремих кластерах 45S і 5S було широко прийнятий для покритонасінних. Згодом цей тип організації рДНК, позначений як організація «S-типу» («S» для поділу), був прийнятий для всіх основних ліній наземних рослин. Однак, було зареєстровано інше розташування в різних віддалено споріднених лініях еукаріот, таких як водорості, криптомонади, гриби та найпростіші. У цій організації «L-типу» («L» для зчеплення) ген 5S рРНК вбудований у NTS повторюваної одиниці 45S (рис. 1.1). У таких випадках 5S рРНК здебільшого транскрибується на тому самому ланцюзі, що й одиниця транскрипції 45S (Wicke et al, 2011).

45S рДНК транскрибуються РНК-полімеразою I (Pol I) у процесі, що вимагає великої кількості загальних факторів транскрипції. Отримані транскрипти попередників рРНК (пре-рРНК) обробляються численними факторами рибонуклеопротейну для отримання зрілих рРНК 18S, 5.8S і 25S/28S. 5S рДНК транскрибується РНК Pol III за допомогою процесу, що включає специфічні фактори транскрипції TFIIIA, TFIIIB і TFIIIC. 18S рРНК збираються з рибосомальними білками малої субодиниці (RPS), тоді як 5,8S і 25S/28S рРНК збираються з рибосомальними білками великої субодиниці, а також 5S рРНК, утворюючи малу 40S і велику 60S субодиниці відповідно. Збірка субодиниць рибосоми відбувається котранскрипційно і потребує понад

200 додаткових факторів, відомих як фактори біогенезу рибосом (Sáez-Vásquez et al., 2019; McStay et al., 2008).

1.2 Будова 5S рДНК.

Ділянки, що кодують 5S рРНК (рДНК), присутні в геномах усіх клітинних організмів. У еукаріотів 5S рДНК належить до класу повторюваних послідовностей і представлена сотнями або тисячами копій тандемно розташованих повторюваних одиниць. На відміну від більшості повторюваних послідовностей, чиї функції в основному залишаються невизначеними, активність 5S рДНК життєво важлива для клітини, забезпечуючи утворення 5S рРНК, яка необхідна для складання функціональних рибосом. Кількість копій повторів рДНК вища, ніж необхідна для синтезу рРНК, а надлишкові копії рДНК замовчуються епігенетично (Douet and Tourmente, 2007; Hemleben et al., 2004; Tynkevich et al., 2022).

Кожен повтор 5S рДНК складається з еволюційно консервативної ділянки, що кодує 5S рРНК (кодувальна послідовність) і варіабельного міжгенного спейсера (IGS), послідовність якого схильна до мутацій. Висока еволюційна стабільність кодувальної послідовності є результатом очищуючого добору для підтримки функції 5S рРНК як компонента великої субодиниці рибосоми. На відміну від кодувальної послідовності, основна частина IGS не транскрибується і, ймовірно, не виконує жодної функції. Відповідно, вважається, що будь-яка мутація в IGS є селективно нейтральною. Тому цей регіон еволюціонує з високою швидкістю (Simon et al., 2018; Volkov et al., 2001; Hemleben et al., 2004).

Транскрипцію 5S рДНК забезпечують РНК-полімераза III (Pol III) і відповідні транскрипційні фактори (TF). Промотор Pol III складається з внутрішнього та зовнішнього елементів. Внутрішні елементи промотора, А-Вох, проміжний елемент (ІЕ) та С-Вох, розташовані в кодувальній послідовності і представляють мішені для TF, які необхідні для залучення Pol III до комплексу ініціації транскрипції. Відповідно, мутації у внутрішніх

елементах промотору повинні не лише порушувати структуру 5S рРНК і рибосоми, а й впливати на зв'язування TF з промотором і, таким чином, на експресію 5S рДНК (Hemleben et al., 2004; Douet and Tourmente, 2007 Sáez-Vásquez et al., 2019).

Хоч IGS є еволюційно мінливою ділянкою, так як його основна частина не транскрибується, в ньому розташовують певні консервативні елементи, в тому числі і зовнішня частина промотора (Рис. 1.2.). До елементів зовнішнього промотора, які беруть участь у ініціації транскрипції, належать АТ-збагачена ділянка («TATA»-box), мотив GC та С-кінцевий нуклеотид, який в деяких родів може бути замінений на інший нуклеотид (наприклад, заміна С на Т у представників роду *Quercus*). Також безпосередньо після 3' кінця кодувальної ділянки на початку IGS знаходяться мотиви, які виконують функцію термінації транскрипції і являють собою оліго-Т послідовності (Tynkevich et al., 2014; Stratiichuk et al., 2019; Tynkevich et al., 2020).

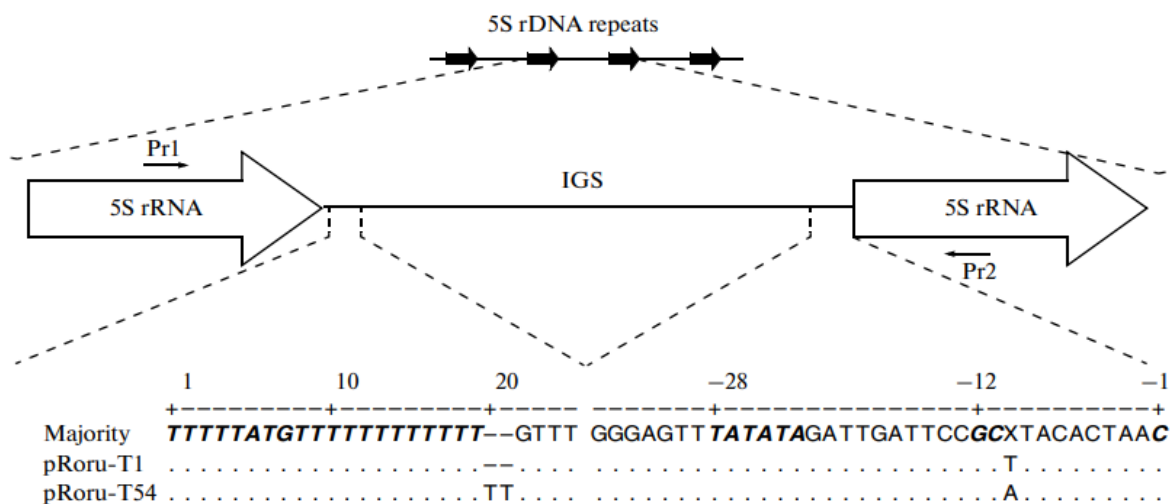


Рис. 1.2. Структурна організація 5S рДНК *Rosa rugosa* (Tynkevich et al., 2014).

Підсумовуючи вищесказане, 5S рДНК є важливим елементом геному еукаріотів, що відповідає за синтез 5S рРНК, одного з ключових компонентів великої субодиниці рибосоми. При цьому, особливості структурної організації та висока еволюційна мінливість IGS робить цю ділянку зручним інструментом для вивчення закономірностей молекулярної еволюції та з'ясування генетичних дистанцій між близькоспорідненими таксонами.

1.3. Молекулярно-генетичні дослідження рослин з використанням 5S рДНК

На відміну від 35S рДНК, окремі варіанти 5S рДНК можуть співіснувати в геномі рослин протягом тривалого часу без участі в гомогенізації одна з одною. Ця здатність 5S рДНК особливо проявляється у варіантах, розташованих на різних хромосомах та батьківських варіантах 5S рДНК у геномах гібридів. Також цікавим є те, що кодуєча область 5S рРНК демонструє певну родинну специфічність, особливо на 5'-кінці: гени 5S рРНК починаються з GGA у Solanaceae, з AGG у Fabaceae і GGG у Brassicaceae та в Poaceae (Hemleben et al., 2004). Відповідно, 5S рДНК стала привабливим інструментом для дослідження молекулярної еволюції повторюваних послідовностей, ідентифікації гібридів та філогенетичних досліджень покритонасінних.

Mel'nyk et al., у 2024 році проаналізували нуклеотидну послідовність клонованих ділянок IGS видів *G. laciniata*, *G. cruciata* та *G. dahurica*. Вчені встановили наявність типових регуляторних елементів у ділянках термінатора і зовнішнього промотора гена 5S рРНК. На основі порівняльного аналізу було виділено дві групи видів, які суттєво відрізняються за організацією цієї ділянки геному. Одна з них включає *G. asclepiadea* і види секцій *Gentiana*, *Ciminalis* і *Calathianae*, а друга – види секцій *Cruciata* і *Pneumonanthe*. *G. laciniata* (sect. *Chondrophyllae*) відрізняється за послідовністю IGS від видів обох груп. Загалом, результати групування таксонів узгоджуються із уявленнями про систематику роду і свідчать, що ділянка IGS 5S рДНК може бути зручним маркером для дослідження питань еволюції й систематики видів роду.

У міжвидових гібридах і алополіплоїдах явище однобатьківського сайленсингу 35S рДНК добре задокументовано. Проте існує помітна відсутність інформації про сайленсинг 5S рДНК у гібридів і алополіплоїдів. Щоб усунути цю прогалину в знаннях, Mandáková et al. у 2024 році проаналізували експресію 5S і 35S рДНК в алополіплоїдах *Cardamine* (Brassicaceae), а саме, *C. × insueta* ($2n = 3x = 24$, склад геному RRA), *C. flexuosa* ($2n = 4x = 32$, ААНН), і *C. scutata* ($2n = 4x = 32$, РРАА), які мають спільного диплоїдного предка (АА). Вчені використовували високопродуктивне секвенування транскриптомів і геномів і філогенетичний аналіз варіантів 5S рРНК. Геномна організація рДНК була додатково досліджена за допомогою кластеризації та флуоресцентної гібридизації *in situ*. У аллотриплоїді *C. × insueta* дослідники спостерігали однобатьківську домінантну експресію локусів 5S і 35S рДНК. В аллотетраплоїдах *C. flexuosa* та *C. scutata* характер експресії відрізнявся: 35S рДНК експресувалася з субгенома А, тоді як 5S рДНК експресувалася з партнерського субгенома. Як *C. flexuosa*, так і *C. scutata*, але не *C. × insueta*, показали зміни кількості копій і локусів. Вчені зробили висновок, що в стабілізованих алополіплоїдах транскрипція компонентів рибосомальної РНК відбувається з різних субгеномів. Це явище, мабуть, призводить до утворення химерних рибосом, що містять молекули рРНК, що походять від різних батьківських джерел. Дослідники припустили, що взаємодія епігенетичного сайленсингу та перебудови рДНК вводить додатковий рівень варіацій у багатомолекулярних рибосомальних комплексах, потенційно сприяючи еволюційному успіху алополіплоїдів.

Vozárová et al., у 2021 році дослідили 5S рДНК представників роду *Rosa*. Рід *Rosa* включає понад 100 деревних видів, що характеризуються інтенсивною гібридизацією, інтрогресією та загальною складною історією еволюції. Окрім багатьох диплоїдних видів ($2n = 2x = 14$), часто зустрічаються поліплоїди в діапазоні від $3x$ до $10x$. У данному дослідженні вчені проаналізували 5S рДНК у 19 видів, що охоплюють два підроди та

основні секції підроду *Rosa*. На додаток до диплоїдів і поліплоїдів із регулярним_мейозом, в дослідження була включена 5х шипшина (*Rosa* секція *Caninae*), у якої відбувається асиметричний мейоз, який диференціює двовалентні та одновалентні хромосоми. Використовуючи геномні ресурси, дослідники реконструювали одиниці 5S рДНК, щоб виявити їхні філогенетичні зв'язки. Крім того, були розроблені локус-специфічні зонди, отримані з міжгенних спейсерів (IGS), і визначені положення та кількість родин 5S рДНК у хромосомах. Дві основні родини 5S рДНК (названі відповідно 5S_A та 5S_B) були виявлені у змінних співвідношеннях як у диплоїдних, так і в поліплоїдних видів, включаючи членів ранніх дивергентних підродів, *Rosa persica* та *Rosa minutifolia*. У межах підроду *Rosa* види секції *Rosa* ампліфікувала лише варіант 5S_A, тоді як таксони інших секцій містили обидва варіанти у змінних співвідношеннях. Сімейство 5S_B часто було спільно локалізовано з 35S рДНК у хромосомах ядерцевих організаторів (NOR), тоді як спільна локалізація сімейства 5S_A з NOR спостерігалася лише у виняткових випадках. Алопентаплоїдні шипшини продемонстрували чіткий розподіл родин 5S рДНК між двовалентними та одновалентними хромосомами. Підсумовуючи, два дивергентні сімейства 5S рДНК домінують у геномах троянд. Обидві родини генів, очевидно, виникли на початку історії роду, вже 30 мільйонів років тому, і, очевидно, пережили численні події видоутворення після цього. Ці спостереження узгоджуються з відносно повільним оборотом генома в роду *Rosa*.

1.4. Баркодинг і систематика досліджуваних інвазійних та рідкісних видів рослин.

Як було наведено вище, IGS 5S рДНК успішно використовується для з'ясування філогенетичних зв'язків у багатьох групах рослин. Проте аналіз цього регіону в межах родини *Ranunculaceae* раніше застосовувався лише до триби *Anemoneae* (Mlinarec et al., 2016; Mlinarec et al., 2012).

Aconitum являє собою монофілетичну групу, яка, за загально прийнятою філогенією, поділяється на два підроди: *Aconitum* та *Lycostonum* (Jabbour and Renner, 2012). Філогенія роду *Aconitum* в основному вивчалася з використанням внутрішніх транскрибованих спейсерів (ITS) з ядерного геному, та ділянок хлоропластного геному (Shyryn et al., 2020; Tynkevich et al., 2022B). Також були охарактеризовані повні послідовності геному хлоропластів у трьох видів: *A. angustius*, *A. finetianum*, *A. sinomontanum* subg. *Lycostonum* для порівняння з іншими видами *Aconitum*, щоб прояснити їх філогенетичні відносини. Довжина послідовностей геному хлоропластів становила 156 109 нп у *A. angustius*, 155 625 нп у *A. finetianum* і 157 215 нп в *A. sinomontanum*, причому кожен вид володів 126 генами та мав 84 гена, що кодують білок (Kong et al., 2017).

У представників роду *Aconitum* молекулярна організація, еволюція та поліморфізм IGS 5S рДНК вперше були проаналізовані зовсім нещодавно (Tynkevich et al., 2022A). Області IGS були сиквеновані для двох видів, що належать до комплексу *Anthora* (*A. anthora* та *A. jacquinii*) та для *A. moldavicum* підвиду *simonkaianum*, представника підроду *Lycostonum*. Окрім експериментально отриманих послідовностей IGS, також використовували збірку *in silico* для короткого зчитування повної бібліотеки геному *A. bulleyanum*, сиквенованої методом Illumina. Аналіз послідовностей IGS показав, що ця ділянка у видів цього роду є відносно довгою, довжиною від 574 до 619 нп. Варіабельність IGS пояснюється численними нуклеотидними замінами, тоді як короткі олігонуклеотидні інсерції/делеції зустрічаються лише на 5'-кінці спейсера. IGS *Aconitum* містить чотири консервативні регіони, два з яких відповідають елементам зовнішнього промотору та термінатора РНК-полімерази III, тоді як функція двох інших залишається невідомою. Перший з них демонструє гомологію з кодуючою ділянкою 5S рРНК, тоді як другий має високий рівень схожості з геномними 17 послідовностями таксономічно віддалених родин однодольних і дводольних, що може бути пов'язано з передбачуваним горизонтальним переносом генів.

Філогенетичний аналіз послідовностей IGS 5S рДНК показав значну генетичну відстань між *A. anthora* + *A. jacquinii* та представниками підродів *Aconitum* і *Lycotium*, що підтверджує розгляд комплексу *A. anthora* як окремого підроду.

G. quadriradiata та *G. parviflora* це два близькоспоріднені види, які, згідно з філогенетичним аналізом, разом з 10 іншими видами згруповані в трибу Heliantheae. Данний аналіз виконувався з використанням хлоропластного геному обох видів, секвенуваного за допомогою методу Illumina. У *G. parviflora* круговий геном має розмір 151 811 н.п., який складається з однієї великої однокопійної (LSC) та однієї малої однокопійної (SSC) областей розміром 83 594 bp і 18 141 н.п. відповідно, і розділених парою інвертованих повторів (IR), довжиною по 25 038 н.п. Він кодує загалом 113 видів генів (80 кодуючих білок, 29 тРНК і чотири види рРНК), у яких 19 з них мають подвійні копії. Загальний вміст GC становить 37,7%, тоді як вміст GC у LSC, SSC та IR областях становить 35,8%, 31,3% та 43,1% відповідно. У *G. quadriradiata* круговий геном має довжину 151 917 нп і складається з пари інвертованих повторюваних областей (IRs, 25 041 н.п. кожна), великої однокопійної області (LSC, 83 620 bp) і малої однокопійної області (SSC, 18 215 bp). Він кодує загалом 111 видів генів (80 кодуючих білок, 27 видів тРНК і чотири види рРНК), причому 21 з них зустрічається в подвійних копіях. Інтрони були виявлені в десяти видах PCG і шести тРНК. Нуклеотидний склад асиметричний (31,07% А, 18,58% С, 19,08% G & 31,27% Т) із загальним вмістом АТ 62,34% (Wang et al., 2018; Zhang et al., 2019). Також для *G. quadriradiata* були секвензовані області ITS за допомогою методів прямого секвенування. Проте кожен із зразків демонстрував багаторазовий поліморфізм довжини, що унеможливлювало отримання чистої послідовності ITS (Schilling et al., 2018).

Heracleum L. — широко поширений таксономічно складний рід родини Apiaceae (Umbelliferae) підродина Apiodeae. Рід включає приблизно 65–120 видів, причому Кавказ і гірський регіон Китаю і Гімалаїв є двома основними центрами його різноманітності. Філогенетичні зв'язки видів *Heracleum* та

споріднених таксонів були досліджені з використанням послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера (ITS1 та ITS2) ядерної рибосомної ДНК, ділянок хлоропластного геному, наприклад, ділянки *rpl32-trnL* (Eidi et al., 2021) та методом ddRAD сиквенування (Daemi-Saeidabad et al., 2020). Хоча рід *Heracleum* давно визнаний природною групою, молекулярно-філогенетичні дослідження показали, що він не є монофілетичним. (Yu et al., 2011). Є данні про створення хромосомної збірки геному для *H. sosnowskyi*. Геномний аналіз виявив надзвичайно високу кількість генів (55106) у геномі борщівника, на відміну від 25–35 тисяч, знайдених у більшості рослин. Однак не було знайдено жодних слідів дублювання всього геному, на відміну від близькоспорідненої *Daucus carota* (морква), яка має приблизно тридцять тисяч генів. Аналіз геномної близькості дубльованих генів вказує на тандемні дуплікації як основну причину збільшення геному.

Reynoutria входить до триби Polygonaeae підродини Polygonoideae. У межах триби він найбільш тісно пов'язаний з родами Muehlenbeckia та Fallopia, утворюючи так звану «кладу RMF». Ряд молекулярно-філогенетичних досліджень прояснив ці взаємозв'язки; *Reynoutria* є добре підтвердженим монофілетичним таксоном. Для філогенетичного аналізу використовувалися ділянки хлоропластного геному (*matK*, *ndhF*, 3' *rps16* -5' *trnK*, *trnL* - *trnF* 3' *trnV* - *ndhC*) та ядерного геному (другий інтрон LEAFY та nrITS) (Schuster et al., 2015; Schuster et al., 2011). Для *R. japonica* та *R. sachalinensis* було оцінено внутрішньогеномний поліморфізм області ITS1-2 за допомогою сиквенування ампліконів методом Illumina. Було виявлено, що послідовності ITS1-2 досліджуваних видів представлені деякими мажорними та мінорними підкласами/варіантами, що вказує на їх неповну гомогенізацію. Кількість мажорних варіантів коливається від двох у *R. japonica* до шести у *R. sachalinensis*. Варіанти ITS1-2, які широко поширені в геномі одного виду, можуть бути присутніми в малій кількості в іншого виду, що вказує на можливу міжвидову гібридизацію. Отримані в

досліджені результати свідчать про необхідність урахування внутрішньогеномного поліморфізму ITS1-2 при виконанні баркодингу, реконструкції філогенії таксонів низького рівня та ідентифікації гібридних форм (Tynkevich et al., 2024).

Разом з родом *Hydrocera* (один вид), *Impatiens* складають родину *Balsaminaceae*. Таксономічно, рід *Impatiens* важко класифікувати. Через напівсукулентні стебла та м'ясисті листки забезпечити добре висушені гербарні зразки складно. Квітки надзвичайно крихкі, і в висушених зразках більшість згорнута та зрощена, що робить розділення та реконструкцію різних частин трудомістким завданням (Yu et al., 2016).

Молекулярна філогенетика зробила великий внесок у розуміння взаємозв'язків у *Impatiens*. Fujiihashi et al., у 2002 опублікував першу молекулярну філогенію роду. Однак використання дуже віддаленої зовнішньої групи (*Tropaeolum*, *Tropaeolaceae*) та обмежена вибірка таксонів призвела до дуже обмеженої інформації про внутрішньородові зв'язки. Друге молекулярне інфрагенне дослідження *Balsaminaceae*, засноване на послідовностях внутрішніх транскрибованих спейсерів (ITS) для 111 видів, дало значно детальніші філогенетичні данні (Yuan et al., 2004). Згодом внутрішньородові зв'язки *Impatiens* були додатково вивчені за допомогою аналізу на основі пластид (Janssens et al., 2006). Yu et al., у 2016 представили, наскільки відомо, найповніший філогенетичний аналіз роду, заснований на сукупних філогенетичних даних. Сорок шість морфологічних ознак були об'єднані з даними послідовності з трьох генетичних регіонів, включаючи ядерні ITS і ділянки хлоропластної ДНК (*atpB-rbcL* і *trnL-F*). Аналіз, представлений в статті, збігається з попередніми дослідженнями. На основі як морфологічних, так і молекулярних доказів було побудовано нову схему класифікації, у якій *Impatiens* розділено на два підроди – *Clavicularia*, який є монофілетичним, та *Impatiens*, який далі поділяється на сім секцій.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Рослинний матеріал. Матеріалом для дослідження були відібрані гербарні та зібрані в дикій природі зразки представників роду *Aconitum*, *Galinsoga*, *Heracleum*, *Impatiens* та *Reynoutria*. Зразки рослин перелічені в Таблиці 1.

Таблиця 2.1

Рослинний матеріал, використаний в дослідженні

Назва роду	Назва виду	Назва зразка	Місце збору/Джерело отримання
<i>Aconitum</i>	<i>Aconitum moldavicum</i>	AcMol1	Гербарій ботанічного саду Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича
	<i>Aconitum sachalinense / yezoense</i>	AcYen1	Гербарій ботанічного саду університету м. Монреаль, Канада
	<i>Aconitum henryi</i>	AcHen1	Гербарій ботанічного саду університету м. Монреаль, Канада
	<i>Aconitum carmichaelii</i>	AcCarm1	Гербарій ботанічного саду університету м. Монреаль, Канада
	<i>Aconitum barbatum</i>	AcBar1	Гербарій, зібраний на території Монголії
	<i>Aconitum lasiocarpum</i>	AcLas2	Гербарій ботанічного саду Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича
	<i>Aconitum septentrionale</i>	AcSep1	Гербарій, зібраний на території Монголії

	<i>Aconitum czekanovskyi</i>	AcCze1	Гербарій, зібраний на території Монголії
	<i>Aconitum coreanum</i>	AcCor1	Гербарій, зібраний на території Монголії
	<i>Aconitum glandulosum</i>	AcGlac1	Гербарій, зібраний на території Монголії
	<i>Aconitum turczaninowii</i>	AcTur1	Гербарій, зібраний на території Монголії
<i>Galinsoga</i>	<i>Galinsoga parviflora</i>	Gal28	Чернівецька обл., Герцаївський р-н, с. Горбова, Буковинське Прикарпаття, узбіччя дороги
		Gal30	Чернівецька обл., окол. м. Сторожинець, Буковинське Прикарпаття, вздовж залізничної колії
	<i>Galinsoga quadriradiata</i>	Gal14	Чернівецька обл., м. Чернівці, 1-й провулок Ходорівського, Буковинське Прикарпаття
		Gal15	Чернівецька обл., Глибоцький р-н, с. Купка, Буковинське Прикарпаття, вздовж залізничної колії біля перехрестя на с. Корчівці
<i>Heracleum</i>	<i>Heracleum sosnowskyi</i>	HeSos1	Львівська обл., Яворівський р-н, зх. околиця с. Великопілля
	<i>Heracleum carpaticum</i>	HeCar1	Сектор Рахова: гора Піп Іван, Карпати
<i>Impatiens</i>	<i>Impatiens parviflora</i>	ImPar4	Рівненська обл., смт. Клевань, мішаний ліс біля лісопилки

		ImPar5	Львів - Винники, долина вздовж дороги
<i>Reynoutria</i>	<i>Reynoutria japonica</i>	ReJap1	Чернівці, Лермонтова 3, узбіччя

Виділення ДНК із рослинного матеріалу:

Для виділення ДНК застосовували змінену методику з використанням цетавлону (Rogers et al., 1994), який слугував детергентом та з використанням колонок для додаткового очищення ДНК:

1. Рослинні гербаризовані зразки, вагою 0.1-0,5 г. заморожували за допомогою рідкого азоту, після чого розтирали в ступці та додавали буфер для лізису 1мл, який містить: 20 мМ ЕДТА, 3% цетавлон, 0,2% β -меркаптоетанол, 100 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1,4 М NaCl, та знову розтерти;

2. Додавали β -меркаптоетанол 10 мкл, отриманий гомогенат переносили у мікропробірку об'ємом 2 мл;

3. Лізис проводили на водяній бані за 65°C протягом 30 хв.

4. Для депротейнізації додавали рівний об'єм суміші хлороформ-ізоамілового спирту, добре перемішували та центрифугували 7 хв. при 13 тис.об./с., супернатант обережно відбирали. Цей етап проводили двічі;

5. До супернатанту додавали подвійний об'єм буфер для осадження, який містив: 10% СТАВ, 5М NaCl, бідистильована вода. Суміш інкубували при 22° С протягом 1 години;

6. Утворений осад ДНК центрифугували при 13 тис.об./с. 15 хв., після чого до відібраного супернатанту додавали хлороформ-ізоаміловий спирт (рівний об'єм) та центрифугували 7 хв. при 13 тис. обертів, цей етап проводили двічі;

7. До відібраної верхньої фази додавали 0,6 об'єму ізопропанолу, добре перемішували та залишали зразки в мікропробірках на ніч в морозильній камері;

8. ДНК очищали від ізопропанолу, шляхом центрифугування 10 хв. при 13 тис. об./с., далі відбирали верхню фазу та додавали 96% спирт, знову центригували при тих самих параметрах;

9. Відбирали обережно спирт, щоб не зачепити осад, та залишали в термоблоці відкриті мікропробірки при 56° С. Після повного випаровування спирту в мікропробірки додавали 100 мкл води для розчинення ДНК.

Електрофорез ДНК в агарозному гелі:

Якість виділених зразків ДНК оцінювали методом електрофорезу у агарозному гелі.

1. Для електрофорезу використовували буферну систему 1× TBE (трис-борат ЕДТА: 0,089 М трис, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА, рН=8.0).

2. Приготування агарозного гелю: до необхідної кількості агарози додавали відповідний об'єм 1×TBE. Для аналізу геномної ДНК виготовляли агарозний гель концентрацією 1%, для ПЛР-продуктів та продуктів рестрикції – із концентрацією 2%.

3. Після охолодження агарозного гелю до 50-55°С додавали бромистий етидій для забарвлення зразків ДНК у гелі;

4. Далі у форму для електрофорезу ставили гребінки та виливали розчин агарози;

5. Після застигання агарози в прилад для електрофорезу заливали 1х TBE буфером на 2-3 мм над гелем, та після обережно забирали гребінку, щоб не пошкодити лунки.

6. Підготування проб для нанесення: для цього змішували розчинену ДНК з буфером для нанесення (1×TE, 50% гліцерин, 0,25% розчин бромфенолового синього).

7. Електрофоретичне розділення проходило при напрузі 80-90V, щоб барвник досягнув 2/3 гелю.

8. Візуалізацію проб ДНК здійснювали за допомогою транслюмінатора та при ультрафіолетовому світлі фотографували ДНК; використовувалося програмне забезпечення приладу GelDoc2000 (BioRad, США).

Ампліфікація 5S рДНК

Для ампліфікації порвтовривальної ділянки 5S рДНК методом полімеразної ланцюгової реакції, використовували праймери 5S-14a та 5S-15, нуклеотидні послідовності яких було розраховано виходячи з існуючих даних в літературі про кодувальну ділянку 5S рДНК у рослин.

Комплементарні праймери для ПЛР-ампліфікації 5S рДНК:

5S-14a 5'-GCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3')

5S-15 5'-GCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGA -3'

5S-14a-Not 5'-CAATGCGGCCGCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3'

5S-15-Not 5'-CATTGCGGCCGCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGA-3'

Згідно з паспортних даних застосованої нами ДНК-полімерази полімерази MyTaq (Bioline) ми робили розрахунок реакційної суміші для ПЛР повторювальної ділянки 5S рДНК. До якої входили такі компоненти: ДНК, Полімераза, буфер MyTaq, праймери по 0,12 мкл., бідистильована вода. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора BioRad T100 (BioRad, США).

Якість зразків після ампліфікації здійснювали в 2% агарозному гелі.

Клонування

За методом “тупих кінців” провели клонування ПЛР-продуктів у плазмідний векор pJet 1.2. з використанням реактивів CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) за наступним протоколом:

1. У 2,5 мкр. буферу (сольовий розчин + АТФ) додавали 1,75 мкр. ПЛР-продукту та 0,25 мкр Blunting enzyme. Після цього суміш інкубували в ПЛР-машині 5 хв. при температурі 70°;

2) Потім до суміші додавали 0,25 мкр. плазмідного вектора pJet 1.2 та 0,25 мкр. лігази та інкубували в ПЛР-машині 1 год. при температурі 22°;

3) Опісля проводили очистку хлороформ-ізоаміловим спиртом: до зразка додавали 15 мкр. бідистильованої води та 20 мкр. хлороформ-ізоамілового спирту та центрифугували за швидкості 13 тис. об/сек. 3 хв. Далі відбирали супернатант в стерильну мікропробірку.

Трансформація *E. coli* методом електропорації

За допомогою методу електропорації продукти лігування вбудували в клітини *E. Coli* використовуючи прилад *E. coli* Pulsher (BioRad, США). Підготовка електрокомпетентних бактерій значно легша, ніж підготовка клітин для трансформації хімічними методами. Бактерії просто вирощують до середини логарифмічної фази, охолоджують, центрифугують, інтенсивно промивають крижаним буфером або H₂O, щоб зменшити іонну силу клітинної суспензії, а потім суспендують у крижаному буфері, що містить 10% гліцерину. ДНК можна негайно ввести в бактерії, піддавши їх короткому електричному розряду високої напруги. Крім того, суспензію клітин можна швидко заморозити та зберігати при -70°C до 6 місяців перед електропорацією без втрати ефективності трансформації (Sambrook et al., 2006).

Електропорацію проводили за наступним протоколом:

1. 5 мкр. ДНК додавали в 50 мкр. майже повністю розмороженої суспензії компетентних клітин;

2. Далі пробу в мікропробірці обережно перемішували піпетуванням та переносили в охолоджену кювету для електропорації;

3. Кювету переносили в прилад і проводили електропорацію за наступних умов: напруга - 2,500 мВ; напруженість електричного поля 12,5 кВ/см; тривалість імпульсу 3,2-3,8 мс.

4. Після проведення електропорації бактеріальну суспензію додавали в мікропробірку з 500 мкл. середовища LB та інкубували при 37°C 50 хв

Опісля провели посів на середовище яке містило ампіцилін (метод прямої селекції за стійкістю до ампіциліну). Наявність вставки у плазмідах перевіряли методом ПЛР-ампліфікації на колоніях, використовуючи праймери pJET1.2 Forward та pJET1.2 Reverse, комплементарними до фланкуючих інсерт ділянок вектора. За рахунок їх гібридизації з векторною ДНК обох боків від полілінкеру ми можемо ідентифікувати вставку. Колонії, в яких було виявлено рекомбінантні плазмідни вирощували протягом ночі на рідкому поживному середовищі LB. Після зупинки росту бактеріальний осад збирали центрифугуванням і виділяли з нього плазмідну ДНК методом лужного лізису.

Сиквенування

Отримані препарати плазмідної ДНК використовували у якості матриці для ПЛР-ампліфікації інсертів 5S рДНК із праймерами pJET 1.2 Fd pJet 1.2 Rev. ПЛР-продукти після очищення хлороформом та переосадження етиловим спиртом сиквенували методом Сенгера на фірмі LGC genomics (Німеччина). Сиквенування проводили з праймерів використаних для ампліфікації.

Суміш ПЛР-продуктів IGS 5S рДНК, ампліфікованих з використанням унікальних комбінацій праймерів, була сиквенована методом Illumina з використанням сервісу сиквенування ампліконів фірми GENEWIZ (Німеччина).

Філогенетичний аналіз: Для пошуку гомологічних послідовностей застосували програму BLAST (Mount et al., 2007). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали методом G-INS-I, імplementованим на сервері MAFFT (Kato et al., 2019). Філогенетичний аналіз проводили використовуючи метод максимальної правдоподібності - Maximum-Likelihood за допомогою програмного забезпечення Geneious (Hasegawa et al., 1991; Kearse et al., 2012).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ампліфікація, клонування та секвенування повторів 5S рДНК представників роду *Aconitum*

В результаті ампліфікації шляхом ПЛР було отримано ПЛР-продукти для зразків *A. moldavicum*, *A. lasiocarpum*, *A. carmichaelii*, *A. sachalinense*, *A. henryi*, *A. septentrionale*, *A. barbatum*, *A. czekanovskyi*, *A. coreanum*, *A. glandulosum*, *A. turczaninowii*. Електрофорез виявив, що в результаті ПЛР-ампліфікації для кожного з використаних зразків ДНК утворився продукт, довжиною приблизно 700 нп. Після клонування продуктів ПЛР у плазмідний вектор і скринінгу клонів на секвенування були відправлені від однієї до трьох рекомбінантних плазмід на екземпляр рослини. Довжина ПЛР-продуктів, які разом з інсертом містили фланкуючі області плазмід, складала приблизно 800 нп.

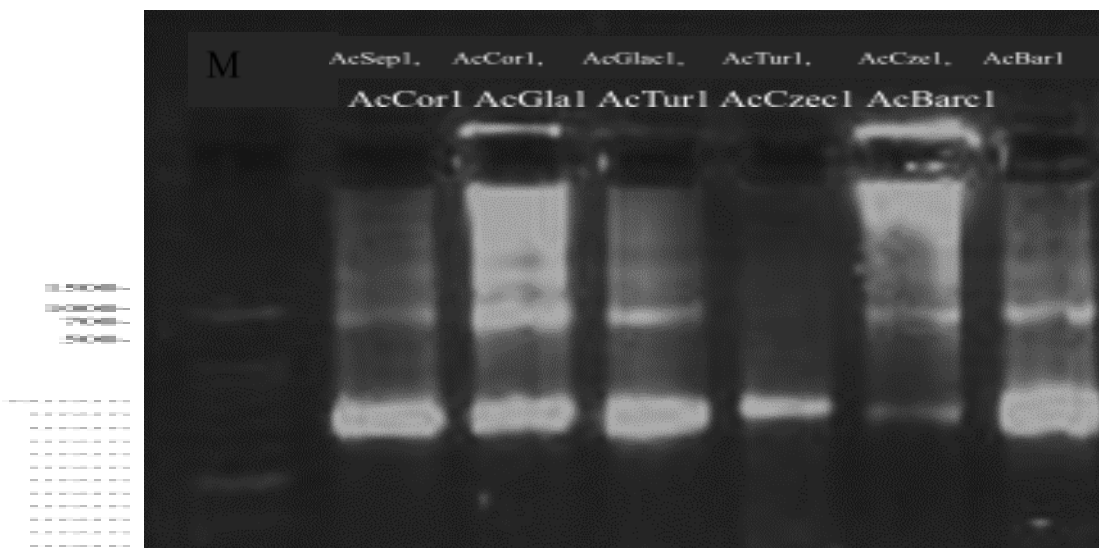


Рис. 3.1. Приклад електрофоретичного розділення ПЛР-продуктів 5S рДНК представників роду *Aconitum*: AcSep1 - *A. septentrionale*; AcCor1 - *A. coreanum*; AcGla1 - *A. glandulosum*; AcTur1 - *A. turczaninowii*; AcCze1 - *A. czekanovskyi*; AcBar1 - *A. barbatum*. М – 100 bp ДНК маркер.

Ділянки IGS були секвовані для клонів зі зразків п'яти видів, які належать до підроду *Aconitum* (*A. lasiocarpum*, *A. carmichaelii*, *A. sachalinense*, *A. barbatum*, *A. henryi*) та для *A. moldavicum*, представника підроду *Luscoctonum*. Аналіз отриманих послідовностей показав, що всі клони містять послідовності IGS 5S рДНК, фланковані з обох боків фрагментами консервативних транскрибованих послідовностей, у тому числі послідовностями праймерів, використаних для ПЛР. Характеристики IGS 5S рДНК секвованих нами клонів та зібраних біоінформатично риботипів наведені в таблиці 1. Порівняння секвованих в цій роботі послідовностей з секвенсами отриманими в нашій лабораторії раніше показало, що довжина IGS 5S рДНК у представників роду *Aconitum* коливається від 570 нп (AcCarm1-3) до 619 нп (AcJac3-1).

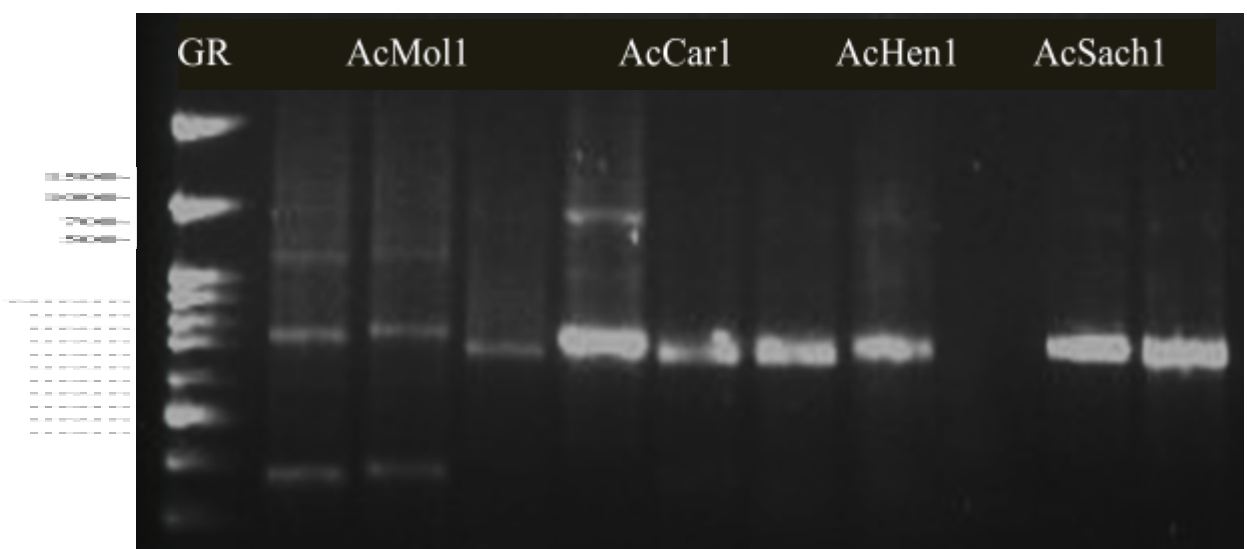


Рис. 3.2. Приклад електрофоретичного розділення продуктів ПЛР-ампліфікації на колоніях клонів 5S рДНК представників роду *Aconitum*: AcMol1 - *A. moldavicum*; AcCar1 - *A. carmichaelii*; AcSach1 - *A. sachalinense*; AcHen1 - *A. henryi*. М – 100 bp ДНК маркер.

Таблиця 3.1

Характеристика сиквенованих клонів/риботипів IGS 5S рДНК
для представників роду *Aconitum*.

Назва виду	Назва зразка	Назва клону / риботипу	Довжина IGS, нп	Вміст GC-пар, %
<i>Aconitum moldavicum</i>	AcMol1	AcMol1-2	609	49,3
		AcMol1-3	607	49,7
		AcMol1-6	609	49,8
<i>Aconitum sachalinense / yenzoense</i>	AcYen1	AcYen1-2	617	43,1
<i>Aconitum henryi</i>	AcHen1	AcHen1-8	618	43,6
<i>Aconitum carmichaelii</i>	AcCarm1	AcCarm1-3	570	46,7
<i>Aconitum barbatum</i>	AcBar1	AcBar1-2	612	49,1
<i>Aconitum lasiocarpum</i>	AcLas2	AcLas2-6	580	45,8
<i>Aconitum scaposum</i>	SRR14085846	<i>C6R1</i>	608	51,1
		<i>C7R1</i>	608	50,9

Вирівнювання послідовностей зразків IGS 5S рДНК представників роду *Aconitum*

Для вирівнювання були взяті секвеновані нами клони і риботиби, а також, клони і риботиби, отримані на нашій кафедрі раніше (*A. anthora*, *A. jacquinii*, *A. simonkaianum*, *A. bulleyanum*), і послідовність IGS *A. kusnezoffii*, з бази даних Genbank. Крім того нами був зібраний з повногеномної бібліотеки коротких зчитувань Illumina риботип *Dephinium exaltatum* як зовнішня група для порівняння з видами роду *Aconitum*. Загалом, для вирівнювання було використано 28 послідовностей.

Множинне вирівнювання послідовностей отримане методом G-INS-I за допомогою сервера MAFFT мало загальну довжину 666 нп. Середній відсоток подібності між послідовностями склав 73.1%. Кількість ідентичних сайтів сягає 93(14% від загальної кількості). На 5' кінці та в районі ~610 нп виявлені олігонуклеотидні інсерції / делеції (індели). Точкові нуклеотидні заміни та короткі інсерції/делеції присутні по всій довжині вирівнювання. Середній вміст GC-пар у IGS 5S рДНК у представників роду *Aconitum* дорівнює 46,7%.

Вирівнювання показало, що в IGS 5S рДНК видів роду *Aconitum* присутні 3 консервативні регіони (CR 1 – 3 відповідно) (Рис. 3.3). Ще один регіон, що знаходиться на відстані ~530 нп від початку IGS, який, як вважалося раніше, є також консервативним (Tynkevich et al., 2022A) в нашому аналізі виявився занадто мінливим, щоб вважати його таким.

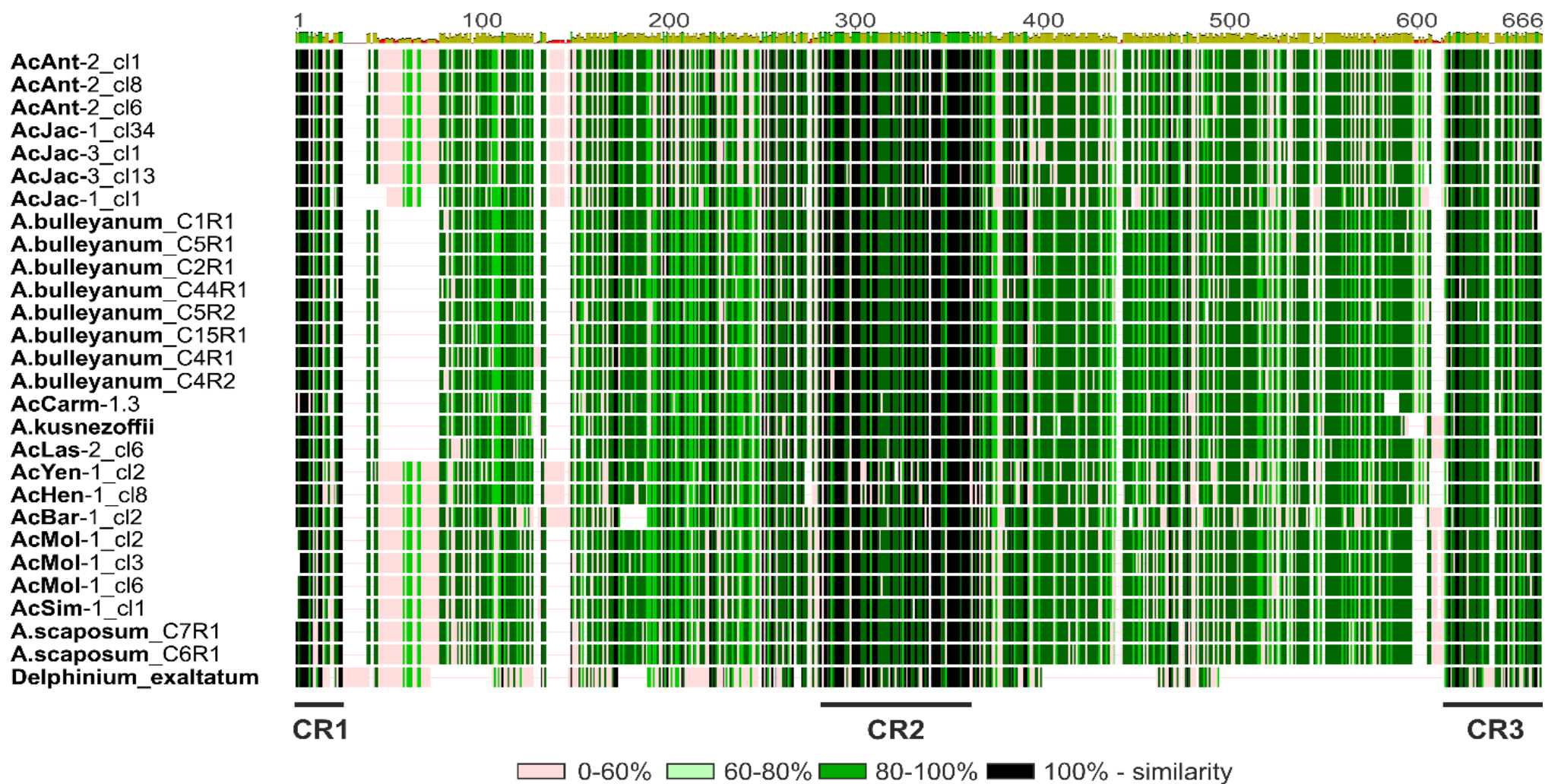


Рис. 3.3. Множинне вирівнювання послідовностей IGS 5S рДНК. Градація кольору вказує на рівень гомології між різними регіонами (%). Підкреслені ділянки – консервативні регіони (CR 1 – 3).

Фрагменти CR1 та CR3 вирівнювання IGS 5S рДНК представників роду *Aconitum*.

Консервативний регіон CR1 знаходиться на початку IGS та являє собою термінаторну область, яка містить типовий мотив СТТТТТ (Рис. 3.4). Майже у всіх досліджуваних видів цей мотив ідентичний. Лише у *A. carmichaelii* присутня транзиція Т→С (ССТТТТ). Даний регіон виконує функцію термінації транскрипції і схожі полі-Т регіони присутні у більшості досліджених родах покритонасінних (Volkov et al., 2001; Cloix et al., 2003; Tynkevich et al., 2014).

Консервативний регіон CR3 розташовується на 3'-кінці IGS та являє собою зовнішню промоторну область (Рис. 3.4). У ідентичному регіоні зовнішнього промотора модельної генетичної рослини *A. thaliana* (родина *Brassicaceae*), та представників деяких інших родин, в позиціях -28, -13 і -1 цієї ділянки IGS знаходяться шестинуклеотидний ТАТА-бокс, GC-динуклеотид і С-нуклеотид, відповідно (Cloix et al., 2003; Douet et al., 2007; Tynkevich et al., 2014).

У роду *Aconitum* зовнішній промоторний регіон суттєво відрізняється від описаного вище, та є дещо мінливим. Кінцевий С-нуклеотид у деяких видів замінений іншим нуклеотидом; GC-динуклеотид у більшості видів перетворився на GT-динуклеотид.

На місці ТАТА-боксу в видів роду *Aconitum* присутній полі-Т регіон, з консенсусною послідовністю ТТТТGTA. В деяких видів присутні одонуклеотидні заміни. Така видозміна ТАТА-боксу у представників покритонасінних не рідкість (Ischenko et al., 2021; Tynkevich et al., 2022), але зазвичай присутня саме ТАТА-послідовність. Різниця в послідовностях АТ-багатого регіону між *Aconitum* та іншими родами покритонасінних ймовірно має бути спряжена з різницею у доменах впізнавання факторів транскрипції, що може стати цікавою темою для подальших досліджень.

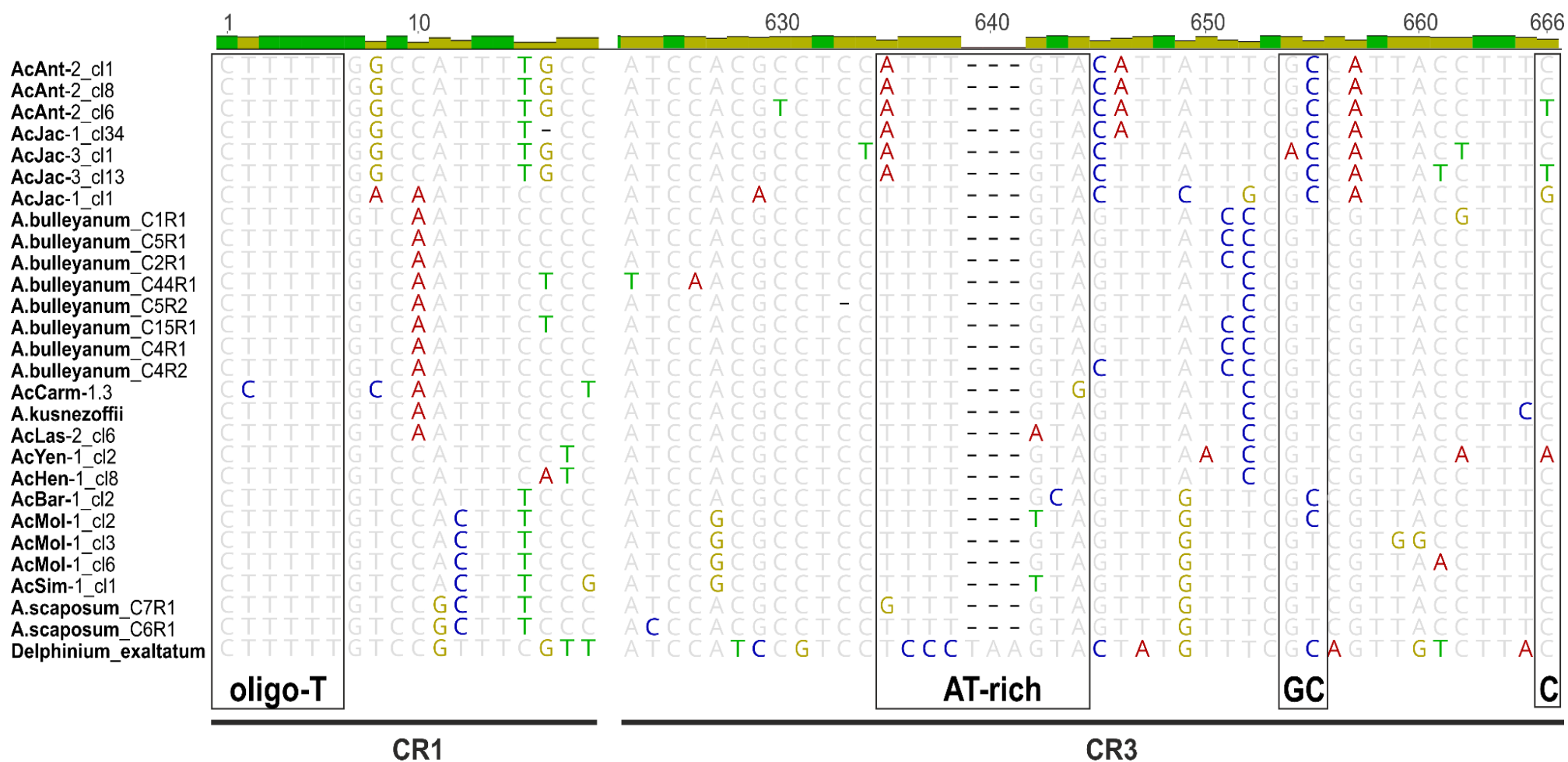


Рис. 3.4. Нуклеотидні послідовності консервативних регіонів CR1 та CR3 IGS 5S рДНК досліджуваних представників роду *Aconitum*.

Окремо в плані поліморфізмів CR3 регіону потрібно виділити представників комплексу *Anthora*. У даних видів найчастіше зустрічається нуклеотидна заміна кінцевого нуклеотида С, в них не відбулося заміни динуклеотида GC на GT, а також у всіх представників комплексу в полі-Т регіоні присутня трансверсія Т→А (ATTTGTA).

Фрагмент CR2 вирівнювання IGS 5S рДНК представників роду *Aconitum*. Горизонтальний перенос ДНК.

Консервативний регіон CR2 у центральній частині IGS має довжину 74 нп у видів роду *Aconitum* (Рис. 3.5). Можливе функціональне значення, або інші причини консервативності даного регіону наразі невідомі.

Пошук BLAST у базі даних Genbank виявив гомологію між цією областю та центральною частиною IGS 5S рДНК у представників інших двох родів родини Ranunculaceae: *Anemone* і *Pulsatilla* та IGS 5S рДНК *Allium ursinum* (родина Amaryllidaceae). Крім того гомологічна послідовність розкидана в кількості від однієї до п'яти копій на більшості хромосом в повногеномній збірці ясеня - *Fraxinus pennsylvanica* (родина Oleaceae). Причому, ця послідовність не була ідентифікована ні в 5S рДНК, ні в повних геномних бібліотеках інших представників родів *Allium* і *Fraxinus*. Наявність гомологічних послідовностей у центральній частині IGS у видів різних віддалено споріднених родів вважається досить рідкісним явищем. А тим більш у видів з різних родин.

Цікавим фактом є ще те, що орієнтація даної послідовності в IGS 5S рДНК представників родів *Anemone* і *Pulsatilla* є зворотною в порівнянні з представниками родів *Aconitum* і *Delphinium*. Точно не можна сказати, що стало причиною такої інверсії. Цікавим було б дослідити, чи цей регіон був наявний у спільного предка цих видів, і інверсія відбулася пізніше, чи в родів *Anemone* і *Pulsatilla* цей регіон з'явився пізніше і вбудовувався в геном в зворотній орієнтації.

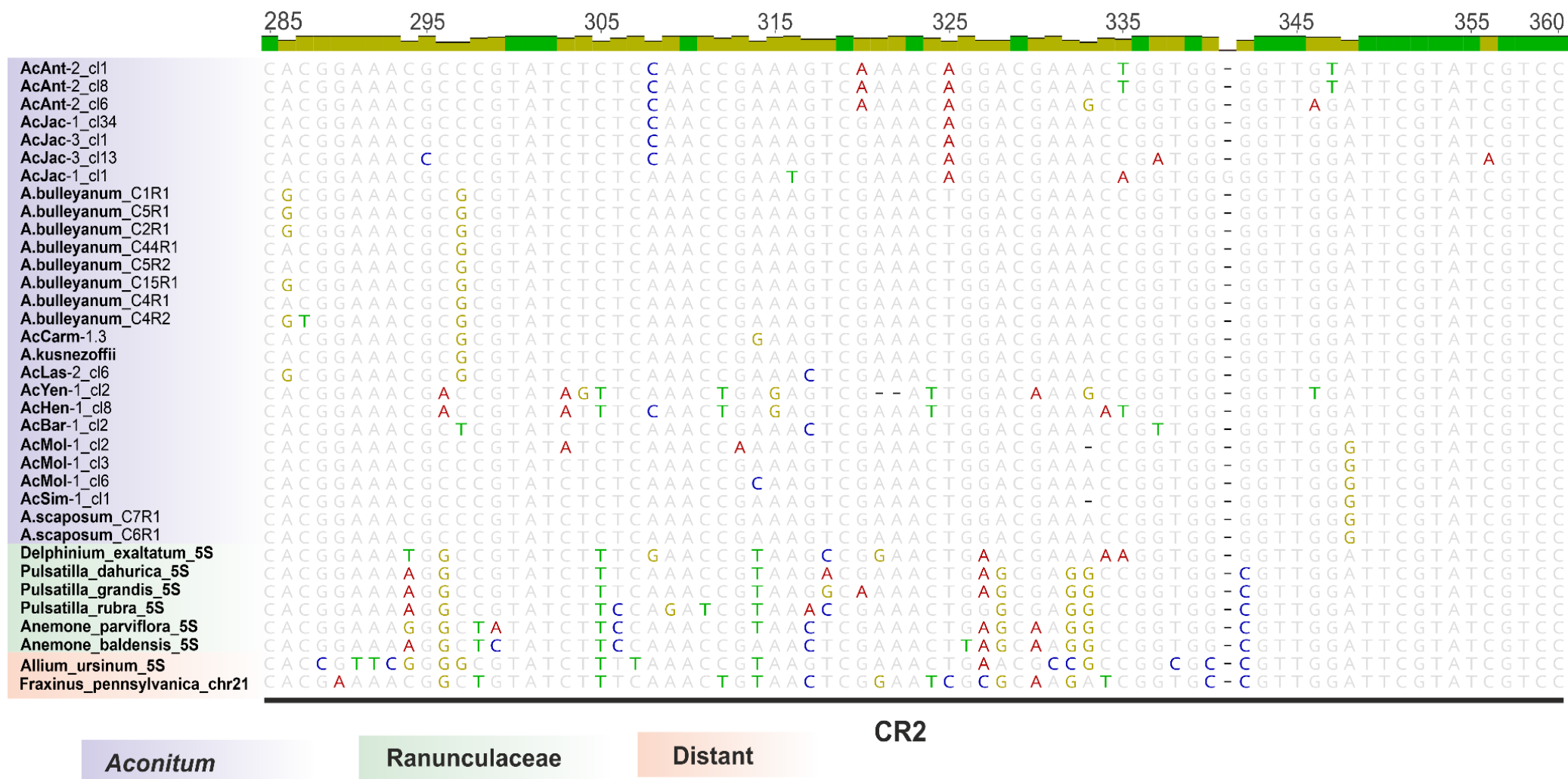


Рис. 3.5. Порівняння центральної частини IGS 5S рДНК (CR2) у представників роду *Aconitum* з гомологічними послідовностями, знайденими в базі даних Genbank для представників родів *Pulsatilla*, *Anemone*, *Fraxinus* і *Allium*.

Причини та механізми перенесення послідовності регіону CR2 в IGS 5S рДНК представників трьох філогенетично віддалених родин наразі невідомі. Одним з пояснень цього феномену може бути горизонтальний перенос генів. Горизонтальний перенос генів, схоже що, не є такою рідкістю, так як дані про наявність цього явища у інших родинах рослин поступають все частіше, включаючи випадки перенесення рДНК (Bartha et al., 2022). Судячи з усього горизонтальний перенос генів є важливим і невід'ємним явищем для еволюції геному рослин.

Філогенетичний аналіз

Вирівнювання послідовностей IGS 5S рДНК були використанні для побудови вкоріненої філогенетичної дендрограми методом максимальної правдоподібності (Maximum-Likelihood) за допомогою програмного забезпечення Geneious. Отримана дендрограма поділяє зразки на три базальні клади, перша з яких охоплює всі послідовності IGS *A. bulleyanum*, *A. kusnezoffii*, *A. lasiocarpum*, *A. carmichaelii*, *A. sachalinense*, *A. henryi* та *A. barbatum*, тобто, видів, які належать до підроду *Aconitum*; друга включає всі послідовності IGS представників підроду *Lycoctonum* - *A. simonkaianum*, *A. scaposum* та *A. moldavicum*; третя охоплює види комплексу *Anthora* - *A. anthora* та *A. jacquinii* (Рис. 3.6).

На філогенетичному дереві видно, що представники комплексу *Anthora* чітко відокремленні від підродів *Aconitum* і *Lycoctonum* та формують окрему кладу. Більшість послідовностей у цій кладі дуже схожі і формують спільну кладу з невеликою довжиною субклад та гілок, за винятком послідовності *A. jacquinii* 1_clone1, яка досить сильно відрізняється від інших зразків. Це можна пояснити псевдогеним перетворенням повтору 5S рДНК у данному клоні. Отримані результати узгоджуються з даними, отриманими в попередньому дослідженні нашої кафедри (Tynkevich et al., 2022A) та підтверджують думку деяких таксономістів про доцільність визнання комплексу *Anthora* як окремого підроду роду *Aconitum*.

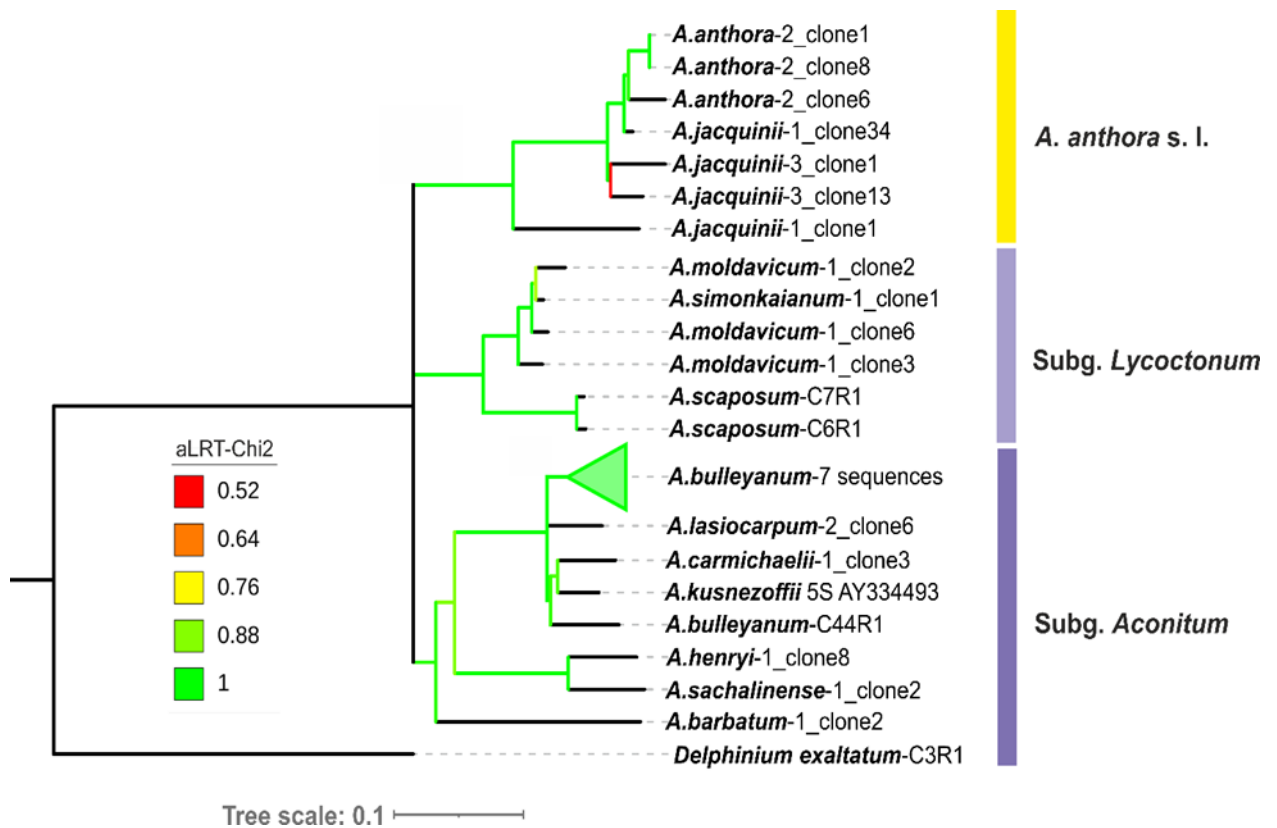


Рис. 3.6. Вкорінена філогенетична дендрограма, побудована методом максимальної правдоподібності (Maximum-Likelihood) на основі порівняння послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Aconitum*.

Підрид *Aconitum* являється найчисленнішим і найрізноманітнішим в межах роду. На філогенетичному дереві видно, що види *A. bulleyanum*, *A. kusnezoffii*, *A. lasiocarpum* та *A. carmichaelii* розташовані досить близько один і формують спільну кладу. *A. sachalinense* та *A. henryi* відокремлені від вище перелічених видів і формують сестринську до них групу. *A. barbatum* являється найбільш віддаленим видом з проаналізованих нами в межах підроду *Aconitum*.

Підрид *Lycoctonum* є другим по чисельності та різноманітності підродом. *A. simonkaianum* та *A. moldavicum* формують одну кладу в межах підроду, що говорить на користь визнання підвидового статусу *A. simonkaianum* по відношенню до *A. moldavicum*. *A. scaposum* формує сестринську, чітко відокремлену кладу.

Ампліфікація, клонування та сиквенування повторів 5S рДНК інвазійних видів рослин

Завдяки ПЛР ампліфікації було отримано ПЛР-продукти для 4 родів інвазійних рослин флори України: *Galinsoga*, *Heracleum*, *Impatiens*, *Reynoutria*. В результаті ПЛР-ампліфікації для кожного роду були отримані ПЛР продукти певної довжини: *Galinsoga* - ~500 н.п., *Heracleum* - ~350 н.п., *Impatiens* - ~300 н.п., *Reynoutria* - ~300 н.п. Після клонування продуктів ПЛР у плазмідний вектор і скринінгу клонів на сиквенування була відправлена суміш клонів. При цьому кожен клон містив специфічний праймер, що дозволило в подальшому ідентифікувати їх.

Області IGS були секвеновані методом Сенгера для клонів зі зразків 6 видів: *Galinsoga parviflora* (2 клони), *Galinsoga quadriradiata* (1 клон), *Heracleum sosnowskyi* (1 клон), *Heracleum carpathicum* (2 клони), *Impatiens parviflora* (4 клони), *Reynoutria japonica* (2 клони). Аналіз отриманих послідовностей показав, що всі клони містять послідовності IGS 5S рДНК, фланковані з обох боків фрагментами консервативних транскрибованих послідовностей, у тому числі послідовностями праймерів, використаних для ПЛР. Характеристики IGS 5S рДНК секвенованих нами клонів наведені в таблиці 2.

Також, для видів роду *Galinsoga*, методом ПЛР ампліфікації, був отриманий амплікон з використанням 4 зразків для двох видів – *G. parviflora* (зразки Gal28 та Gal30) та *G. quadriradiata* (зразки Gal14 та Gal15). Електрофорез виявив, що в результаті ПЛР-ампліфікації для кожного зразка були отримані ПЛР-продукти довжиною ~500 н.п.

Ділянки 5S рДНК були секвеновані методом Illumina, в результаті чого було отримано 1922 послідовності різних варіантів IGS. Для *G. parviflora* було отримано 722 послідовності (292 для Gal28 та 430 для Gal30), а для *G. quadriradiata* – 1260 (603 для Gal14 та 657 для Gal15).

Таблиця 3.2

Характеристика сиквенованих клонів IGS 5S рДНК
для представників інвазійних видів

Назва роду	Назва виду	Назва зразка	Назва клону	Довжина IGS, нп	Вміст GC-пар, %
<i>Galinsoga</i>	<i>Galinsoga parviflora</i>	Gal30	GaPar19-1	348	43,97
			GaPar19-2	352	44,6
	<i>Galinsoga quadriradiata</i>	Gal15	GaQua11-1	357	42,3
<i>Heracleum</i>	<i>Heracleum sosnowskyi</i>	HeSos1	HeSos1-1	235	20,43
			HeCar1-1	235	16,6
	<i>Heracleum carpathicum</i>	HeCar1	HeCar1-2	230	18,26
<i>Impatiens</i>	<i>Impatiens parviflora</i>	ImPar4	ImPar4-1	178	24,72
			ImPar4-2	218	34,86
		ImPar5	ImPar5-1	174	30,4
			ImPar5-2	174	31
<i>Reynoutria</i>	<i>Reynoutria japonica</i>	ReJap1	ReJap1-1	197	49,75
			ReJap1-2	206	45,73

Аналіз IGS отриманих зразків інвазійних видів

В результаті сиквенування клонів було отримано ряд варіантів IGS для кожного з родів. У *Reynoutria* спостерігався дуже високий вміст GC-пар, такий же, як і в *Aconitum*, але при цьому довжина IGS у *Reynoutria* приблизно в 3 коротша, ніж в *Aconitum*. Це може свідчити про те, що IGS у *Reynoutria* є відносно еволюційно молодого послідовність, можливо через те, що відбулося вбудування багатої на GC-пари вставки. Відповідно, дуже низький вміст GC-пар у IGS *Heracleum* може бути спричинений еволюційною древністю цієї ділянки. Таке “старіння” міжгенного спейсера можна пояснити накопиченням мутацій, пов’язаних з дезамінування метильованого С, в наслідок чого відбувається заміна С-Т, відповідно пара GC замінюється на АТ.

Проаналізувавши отриманні зразки, ми вирішили перевірити, чи є залежність між довжиною IGS та вмістом GC-пар в ділянці. Для цього був побудований графік в програмному забезпеченні EXCEL з використанням значень довжин IGS та вмісту GC-пар (Рис. 3.7). На графіку видно, що кореляція між довжиною IGS та вмістом GC-пар справді є, хоч і зразки *Reynoutria* та *Heracleum* дещо відхиляються від лінії тренду.



Рис. 3.7. Графік залежності між довжиною (нп) та вмістом GC-пар (%) в IGS 5S рДНК.

Сиквеновані ділянки 5S рДНК, зразків *Galinsoga*, були вирівняні за допомогою метода G-INS-I в сервері MAFFT (Рис 3.8) . Загальна довжина вирівнювання складає 497 нп. Середній відсоток подібності між послідовностями складає %. Кількість ідентичних сайтів дорівнює (14% від загальної кількості). На 5' кінці в районі ~410 нп та 3' кінці в районі ~60 виявлені олігонуклеотидні інсерції/делеції (індели). У центральній частині вирівнювання у багатьох варіантів IGS присутні делеції, довжиною від кількох десятків до кількох сотень нп. Середній вміст GC-пар у IGS 5S рДНК у представників роду *Aconitum* дорівнює 46,7%.

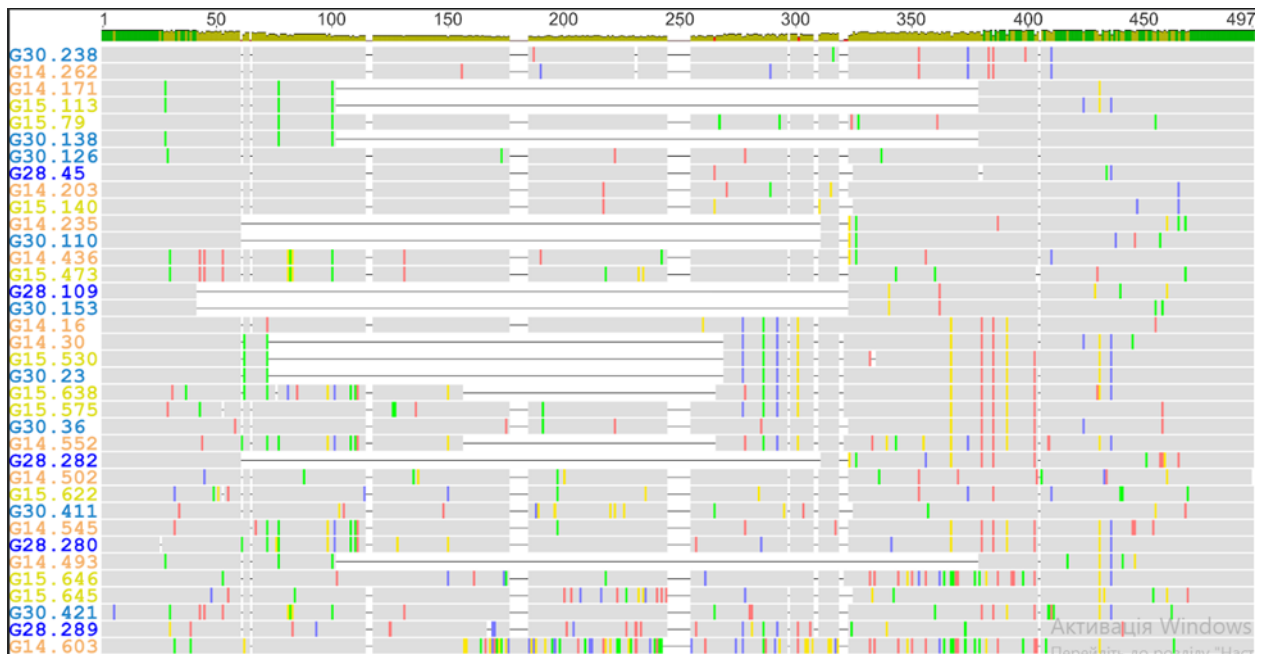


Рис. 3.8. Вирівнювання різних структурних варіантів послідовностей IGS 5S рДНК, отриманих в результаті сиквенування методом Illumina ампліконів чотирьох зразків рослин роду *Galinsoga*.

Філогенетичний аналіз послідовностей IGS 5S рДНК *Galinsoga*

Вирівнювання послідовностей IGS 5S рДНК були використанні для побудови кругової та некоріненої філогенетичних дендрограм методом максимальної правдоподібності (Maximum-Likelihood) за допомогою програмного забезпечення FastTree. На круговій дендрограмі (Рис. 3.9) видно, що більшість варіантів IGS 5S рДНК притаманні як для *G. parviflora*, (зразки Gal28 та Gal30) так і для *G. quadriradiata* (зразки Gal14 та Gal15). Проте деякі варіанти IGS 5S рДНК в переважній більшості зустрічалися саме в *G. quadriradiata*. На некоріненій дендрограмі (Рис.3.10) помітно, що це сильно диверговані варіанти IGS (довга виділена гілка), а також варіанти з великими делеціями (короткі виділені гілки). В перспективі, ці варіанти IGS можна буде використовувати як видоспецифічний молекулярний маркер.

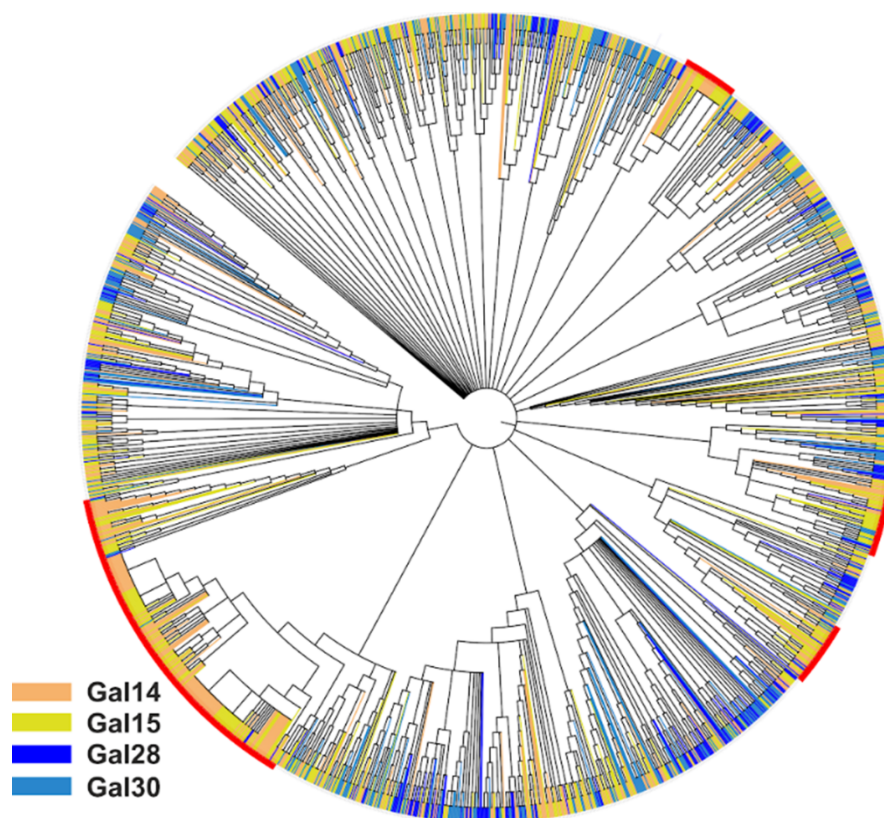


Рис. 3.9. Кругова філогенетична Maximum-Likelihood дендрограма побудована на основі порівняння послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Galinsoga*. Червоним виділені клади переважно специфічні для *G. quadriradiata*.

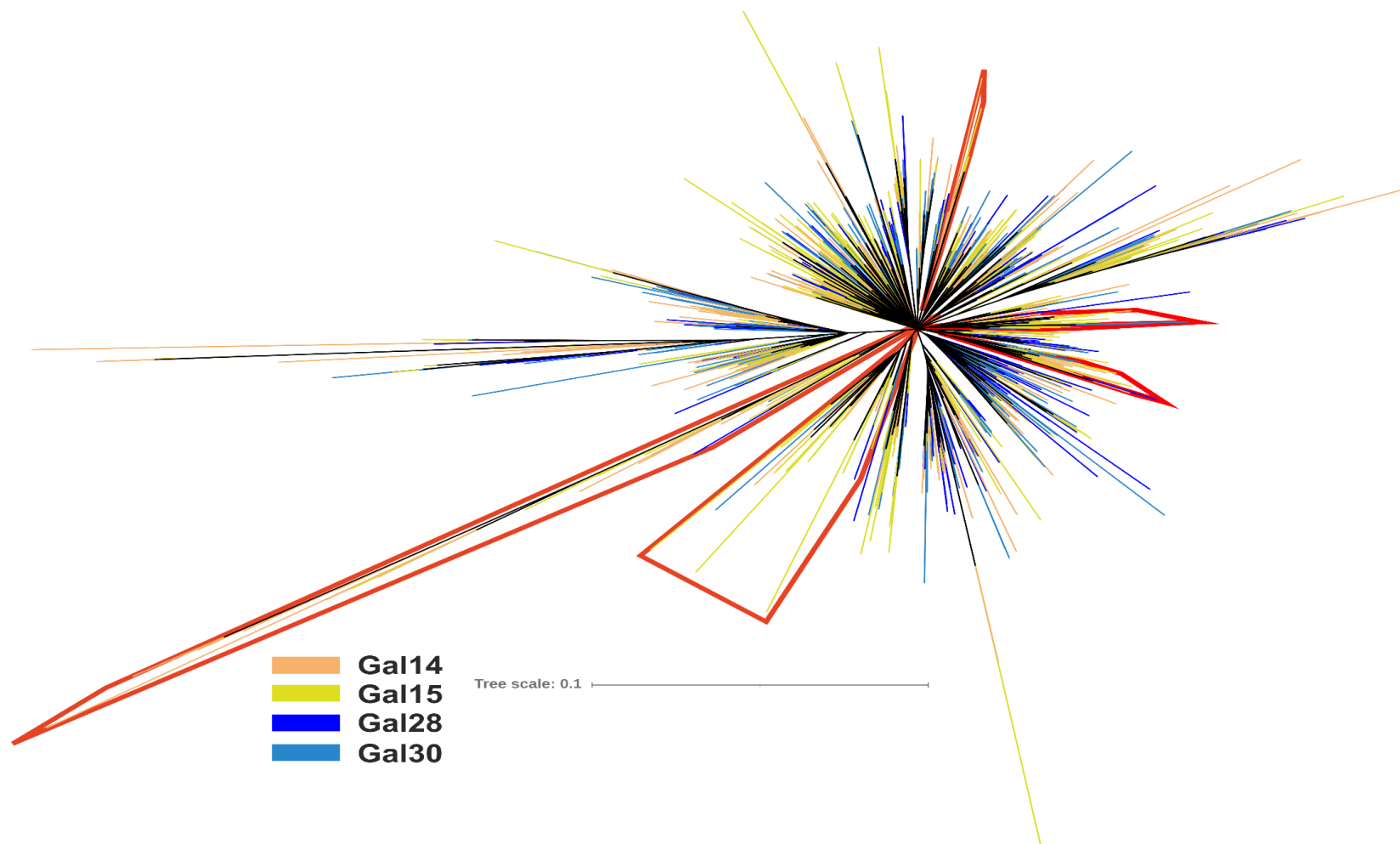


Рис. 3.10. Невкорінена філогенетична дендрограма, побудована на основі порівняння послідовностей IGS 5S рДНК амплікона *Galinsoga*. Червоним виділені послідовності, характерні для *G. quadriradia* філогенетична Maximum-Likelihood дендрограма побудована на основі порівняння послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Galinsoga*.

ВИСНОВКИ

1. В IGS 5S рДНК видів роду *Aconitum* виявлено три консервативні регіони: CR1 регіон, що відповідає термінаторній ділянці; CR2 регіон, що відповідає зовнішньому промотору РНК-полімерази III. В CR3 консервативному регіоні спостерігається наявність послідовності, що імовірно, виникла внаслідок горизонтального перенесення ДНК.
2. Послідовності IGS *A. anthora* s. l. групуються у межах ізольованої кладки високого порядку, що підтверджує думку про доцільність визнання комплексу *Anthora* в якості третього підроду роду *Aconitum*.
3. Більшість отриманих варіантів IGS 5S рДНК *Galinsoga* є спільними для *G. parviflora* та *G. quadriradiata*. Певні варіанти IGS 5S рДНК, що переважно зустрічаються в *G. quadriradiata*, можуть бути використанні для молекулярної ідентифікації даного виду.
4. Порівняння IGS різних родів покритонасінних демонструє наявність позитивної кореляції між довжиною IGS та вмістом GC-пар в ньому.
5. Структура IGS 5S рДНК демонструє значний поліморфізм, що дозволяє успішно використовувати дану ділянку для молекулярного баркодингу рідкісних та інвазійних рослин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mel'nyk, V. M., Andreev, I. O., Volkov, R. A., & Kunakh, V. A. (2024). Міжгенний спейсер 5S рДНК деяких видів секцій Cruciata і Chondrophyllae та його застосування в таксономії роду *Gentiana*. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 34, 75-81.
2. Stratiichuk, A. S., Derevenko, T. O., & Tynkevych, Y. O. (2019). Організація повторюваної ділянки 5S рДНК *Quercus imbricaria* Michx. *Visnik ukrains' kogo tovaristva genetikeriv i selekcioneriv*, 17(2), 179-186.
3. Tynkevich, Y. O., Bushyla, K. D., & Volkov, R. A. (2020). Організація міжгенного спейсера 5s рДНК *Quercus rubra* L. та його спорідненість з українськими видами роду *Quercus*. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 26, 125-131.
4. Bartha, L., Mandáková, T., Kovařík, A., Bulzu, P. A., Rodde, N., Mahelka, V., ... & Banciu, H. L. (2022). Intact ribosomal DNA arrays of *Potentilla* origin detected in *Erythronium* nucleus suggest recent eudicot-to-monocot horizontal transfer. *New Phytologist*, 235(3), 1246-1259.
5. Cloix, C., Yukawa, Y., Tutois, S., Sugiura, M., & Tourmente, S. (2003). In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *The Plant Journal*, 35(2), 251-261.
6. Daemi-Saeidabad, M., Shojaeiyan, A., Vivian-Smith, A., Stenøien, H. K., & Falahati-Anbaran, M. (2020). The taxonomic significance of ddRADseq based microsatellite markers in the closely related species of *Heracleum* (Apiaceae). *Plos one*, 15(5), e0232471.
7. Douet, J., & Tourmente, S. (2007). Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*, 99(1), 5-13.
8. Eidi, M., Ebadi, M. T., Falahati Anbaran, M., & Shojaeiyan, A. (2021). Phylogenetic relationships in the *Heracleum* sp. species Complex from Iran by using nuclear ribosomal DNA (ITS) and *rpl32-trnL*. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(3), 372-383.

9. França, L. T., Carrilho, E., & Kist, T. B. (2002). A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly reviews of biophysics*, 35(2), 169-200.
10. Fujihashi, H., Akiyama, S., & Ohba, H. (2002). Origin and relationships of the Sino-Himalayan *Impatiens* (Balsaminaceae) based on molecular phylogenetic analysis, chromosome numbers and gross morphology.
11. Hasegawa, M., Kishino, H., & Saitou, N. (1991). On the maximum likelihood method in molecular phylogenetics. *Journal of molecular evolution*, 32, 443-445.
12. Hemleben, V., Volkov, R.A., Zentgraf, U., Medina, F.J. (2004). Molecular Cell Biology: Organization and Molecular Evolution of rDNA, Nucleolar Dominance, and Nucleolus Structure. In: Esser, K., Lüttge, U., Beyschlag, W., Murata, J. (eds) *Progress in Botany*. Progress in Botany, vol 65. Springer, Berlin, Heidelberg.
13. Ishchenko, O. O., Bednarska, I. O., & Panchuk, I. I. (2021). Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytology and Genetics*, 55, 10-18.
14. Janssens, S., Geuten, K., Yuan, Y. M., Song, Y., Küpfer, P., & Smets, E. (2006). Phylogenetics of *Impatiens* and Hydrocera (Balsaminaceae) using chloroplast atpB-rbcL spacer sequences. *Systematic Botany*, 31(1), 171-180.
15. Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1160-1166.
16. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & 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.
17. Kong, H., Liu, W., Yao, G., & Gong, W. (2017). A comparison of chloroplast genome sequences in *Aconitum* (Ranunculaceae): a traditional herbal medicinal genus. *PeerJ*, 5, e4018.

- 18.Mandáková, T., Krumpolcová, A., Matyášek, R., Volkov, R., Lysak, M. A., & Kovařík, A. (2024). Uniparental silencing of 5S rRNA genes in plant allopolyploids—insights from Cardamine (Brassicaceae). *The Plant Journal*.
- 19.McStay, B., & Grummt, I. (2008). The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 24(1), 131-157.
- 20.Mlinarec, J., Franjević, D., Bočkor, L., & Besendorfer, V. (2016). Diverse evolutionary pathways shaped 5S pDHK of species of tribe Anemoneae (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 182(1), 80-99.
- 21.Mlinarec, J., Šatović, Z., Malenica, N., Ivančić-Baće, I., & Besendorfer, V. (2012). Evolution of the tetraploid *Anemone multifida* (2 n= 32) and hexaploid *A. baldensis* (2 n= 48) (Ranunculaceae) was accompanied by rDNA loci loss and intergenomic translocation: Evidence for their common genome origin. *Annals of Botany*, 110(3), 703-712.
- 22.Mount, D. W. (2007). Using the basic local alignment search tool (BLAST). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007(7).
- 23.Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1994). Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In *Plant molecular biology manual* (pp. 183-190). Springer, Dordrecht.
- 24.Sáez-Vásquez, J., & Delseny, M. (2019). Ribosome biogenesis in plants: from functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *The Plant Cell*, 31(9), 1945-1967.
- 25.Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Transformation of *E. coli* by electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot3933.
- 26.Schilling, E. E., & Floden, A. A. R. O. N. (2018). Barcoding the Asteraceae of Tennessee, tribes Heliantheae and Millerieae. *Phytoneuron*, 83, 1-9.
- 27.Schuster, T. M., Reveal, J. L., Bayly, M. J., & Kron, K. A. (2015). An updated molecular phylogeny of Polygonoideae (Polygonaceae):

- Relationships of *Oxygonum*, *Pteroxygonum*, and *Rumex*, and a new circumscription of *Koenigia*. *Taxon*, 64(6), 1188-1208.
28. Schuster, T. M., Wilson, K. L., & Kron, K. A. (2011). Phylogenetic relationships of *Muehlenbeckia*, *Fallopia*, and *Reynoutria* (Polygonaceae) investigated with chloroplast and nuclear sequence data. *International journal of plant sciences*, 172(8), 1053-1066.
29. Shyryn, A., Anna, I., Raushan, K., Anar, M., & Yerlan, T. (2020). Phylogenetic assessment of tree species of *Aconitum* L. from Kazakhstan by using ITS and matK markers. *Eurasian unity of scientists*, (10-2 (79)), 4-9.
30. Simon, L., Rabanal, F. A., Dubos, T., Oliver, C., Lauber, D., Poulet, A., ... & Probst, A. V. (2018). Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 46(6), 3019-3033.
31. Steemers, F. J., & Gunderson, K. L. (2005). Illumina, Inc. *Pharmacogenomics*, 6(7), 777-782.
32. Tynkevich, Y. O., & Volkov, R. A. (2014). Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytology and genetics*, 48, 1-6.
33. Tynkevich, Y. O., Biliay, D. V., & Volkov, R. A. (2022B). Utility of the *trnH-psbA* region for DNA barcoding of *Aconitum anthora* L. and related taxa. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 31, 134-41. 18.
34. Tynkevich, Y. O., Novikov, A. V., Chorney, I. I., & Volkov, R. A. (2022A). Organization of the 5S pDHK Intergenic Spacer and Its Use in the Molecular Taxonomy of the Genus *Aconitum* L. *Cytology and Genetics*, 56(6), 494-503.
35. Tynkevich, Y. O., Shelyfist, A. Y., Kozub, L. V., Hemleben, V., Panchuk, I. I., & Volkov, R. A. (2022). 5S Ribosomal DNA of genus *Solanum*: molecular organization, evolution, and taxonomy. *Front. Plant Sci.*, 13.
36. Tynkevich, Y. O., Yakobyshen, D. V., Cherkazianova, A. S., Shelyfist, A. Y., & Volkov, R. A. (2024). Intragenomic Polymorphism of the ITS1-5.8

- S-ITS2 Region in Invasive Species of the Genus *Reynoutria*. Cytology and Genetics, 58(6), 536-546.
37. Volkov, R. A., Zanke, C., Panchuk, I. I., & Hemleben, V. (2001). Molecular evolution of 5S pDHK of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 1273-1282.
38. Vozárová, R., Herklotz, V., Kovařík, A., Tynkevich, Y. O., Volkov, R. A., Ritz, C. M., & Lunerová, J. (2021). Ancient origin of two 5S rDNA families dominating in the genus *Rosa* and their behavior in the Canina-type meiosis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 643548.
39. Wang, X. Y., Zhou, Z. S., Liu, G., & Qian, Z. Q. (2018). Characterization of the complete chloroplast genome of the invasive weed *Galinsoga quadriradiata* (Asterales: Asteraceae). *Conservation genetics resources*, 10, 89-92.
40. 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.
41. Yu, S. X., Janssens, S. B., Zhu, X. Y., Lidén, M., Gao, T. G., & Wang, W. (2016). Phylogeny of *Impatiens* (Balsaminaceae): integrating molecular and morphological evidence into a new classification. *Cladistics*, 32(2), 179-197.
42. Yu, Y., Downie, S. R., He, X., Deng, X., & Yan, L. (2011). Phylogeny and biogeography of Chinese *Heracleum* (Apiaceae tribe Tordylieae) with comments on their fruit morphology. *Plant Systematics and Evolution*, 296, 179-203.
43. Yuan, Y. M., Song, Y. I., Geuten, K., Rahelivololona, E., Wohlhauser, S., Fischer, E., ... & Küpfer, P. (2004). Phylogeny and biogeography of Balsaminaceae inferred from ITS sequences. *Taxon*, 53(2), 391-404.
44. 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, 4(2), 2106-2108.

ДОДАТКИ