

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

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

**МОЛЕКУЛЯРНИЙ БАРКОДИНГ *GALINSOGA PARVIFLORA* CAV.
ТА *G. QUADRIRADIATA* RUIZ & PAV. НА ОСНОВІ ISSR ТА
rpl32-trnL ДІЛЯНКИ ХЛОРОПЛАСТНОЇ ДНК**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, групи 607
спеціальність 162 Біотехнології
та біоінженерія

Близнюк Катерина Геннадіївна

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

Магістерська робота присвячена комплексному дослідженню генетичної мінливості інвазійних видів *Galinsoga parviflora* та *G. quadriradiata* за допомогою аналізу нуклеотидних послідовностей хл-ДНК *rpl32-trnL* та ISSR-маркерів. Оцінити потенціал цих маркерів для виявлення внутрішньовидової гібридизації та розробити оптимальну стратегію молекулярного баркодингу для систематики роду *Galinsoga*.

На основі молекулярного баркодингу, встановлено, що українські та інші європейські популяції *G. quadriradiata* характеризуються низьким рівнем генетичного різноманіття. На відміну від представників виду *G. parviflora*, що демонструють значно вищу генетичну варіабельність. Результати дослідження підтверджуються аналізом 18 рисунків та 9 таблиць, з використанням 97 джерел, більшість з яких – англomовні.

Ключові слова: молекулярний маркер, ISSR-маркер, міжгенний спейсер, *Galinsoga*.

Annotation

The master's thesis is devoted to a comprehensive study of the genetic variability of the invasive species *Galinsoga parviflora* and *G. quadriradiata* using the analysis of nucleotide sequences of chlDNA *rpl32-trnL* and ISSR markers. To assess the potential of these markers for detecting intraspecific hybridization and to develop an optimal molecular barcoding strategy for the taxonomy of the genus *Galinsoga*.

Based on molecular barcoding, it was found that Ukrainian and other European populations of *G. quadriradiata* are characterized by a low level of genetic diversity, in contrast to representatives of the species *G. parviflora*, which demonstrate significantly higher genetic variability. The results of the study are supported by an analysis of 18 figures and 9 tables, using 97 sources, most of which are English-language.

Keywords: molecular marker, ISSR- marker, intergenic spacer, *Galinsoga*.

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

_____ К.Г.Близнюк

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Молекулярні маркери як інструменти для вивчення еволюції та філогенезу.....	7
1.2. Використання ISSR для оцінки генетичної різноманітності рослин.....	10
1.3. Порівняльний аналіз хлоропластних маркерів у різних таксономічних груп рослин.....	12
1.3.1. Аналіз хлоропластних маркерів для ДНК-баркування.....	12
1.3.2. Ефективність використання хлоропластних ділянок геному для класифікації організмів.....	15
1.4. Історія розповсюдження та сучасний стан систематики роду <i>Galinsoga</i>	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	22
2.1. Об'єкт та матеріал для досліджень.....	22
2.2. Методи досліджень.....	26
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	32
3.1. Оцінка генетичної диференціації між популяціями <i>G. parviflora</i> та <i>G. quadriradiata</i> за допомогою <i>rpl32-trnL</i>	32
3.2. Оцінка генетичного різноманіття популяцій <i>G. parviflora</i> та <i>G. quadriradiata</i> за даними ISSR-маркерів.....	38
ВИСНОВКИ.....	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	49
ДОДАТКИ.....	61

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МГС – міжгенний спейсер

ПЛР – полімеразно ланцюгова реакція

хлДНК – хлоропластна ДНК

INDEL – індели (інсерція / делеція)

SNP – однонуклеотидний поліморфізм

ISSR – мікросателітні повтори

hSTR – короткі тандемні повтори

UBC – University of British Columbia

ВСТУП

Генетичний аналіз став невід'ємною частиною сучасних біологічних досліджень, дозволяючи вирішувати широкий спектр завдань, від систематики та еволюційної біології до медицини та сільського господарства. На відміну від фенотипічних ознак, які можуть змінюватися під впливом середовища, генетична інформація є стабільною і надійною характеристикою організму. Крім того, молекулярні маркери дозволяють виявити навіть незначні відмінності між організмами, що є критично важливим для розуміння еволюційних процесів та збереження власного біорізноманіття (Pérez de la Torre et al., 2012; Mirzaei, 2021; Kucherenko et al., 2022).

Аналіз генетичної структури рослинних популяцій інвазійних видів за допомогою молекулярних маркерів дозволяє відстежувати шляхи їх розповсюдження, визначати джерела інтродукції та оцінювати рівень генетичного різноманіття (Kurose et al., 2020; Liu et al., 2021; Wróbel et al., 2021). *Galinsoga parviflora* та *G. quadriradiata* є яскравими представниками таких рослин, завдаючи значної шкоди сільському господарству та природним екосистемам. Розробка ефективних стратегій боротьби з ними залежить від можливості точного їх виявлення та ідентифікації (De Cauwer et al., 2014). Водночас, не зважаючи на значну кількість досліджень, присвячених цим видам, питання їхньої таксономічної ідентифікації залишається актуальним.

Визначити точну видову належність представників роду *Galinsoga* часто буває складно через високу морфологічну мінливість та здатність до міжвидового схрещування. Молекулярний баркодинг, заснований на аналізі специфічних ділянок ДНК, є одним із перспективних підходів для вирішення цієї проблеми (Canne, 1977; Pérez de la Torre et al., 2012; Skuza et al., 2019; Liu et al., 2021; Abouseada et al., 2023; Safhi et al., 2023), а поєднання різних молекулярних маркерів підвищує надійність результатів генетичного аналізу, надаючи детальнішу картину їхньої еволюції та поширення (Wróbel et al., 2021).

Метою роботи було провести порівняльний аналіз європейських популяцій

Galinsoga parviflora Cav. та *G. quadriradiata* Ruiz & Pav. за допомогою молекулярного баркодингу нуклеотидних послідовностей спейсерної області rpl32-trnL хлДНК та ISSR-маркерів на предмет їх генетичного різноманіття та можливості внутрішньої гібридизації.

Для реалізації мети були поставлені наступні **завдання**:

- 1) отримати препарати ДНК для зразків різних популяцій *G. parviflora* та *G. quadriradiata*, що зростають на території України та Західної Європи;
- 2) ампліфікувати спейсерну ділянку rpl32-trnL хлДНК отриманих зразків ДНК та провести порівняльний аналіз її нуклеотидної послідовності за допомогою різного програмного забезпечення на предмет можливості використання для баркодингу різних популяцій *G. parviflora* та *G. quadriradiata*;
- 3) провести порівняльний аналіз результатів ISSR-баркодингу препаратів ДНК різних популяцій *G. parviflora* та *G. quadriradiata* за допомогою восьми праймерів з метою встановлення розмаху їх генетичного різноманіття.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Молекулярні маркери як інструменти для вивчення еволюції та філогенезу

Генетичні маркери є універсальними інструментами молекулярної біології, що дозволяють ідентифікувати та диференціювати організми на основі їхніх унікальних генетичних особливостей (Mirzaei, 2021; Kucherenko et al., 2022). Технологія маркерів є потужним інструментом для вивчення генетичного різноманіття біологічних популяцій, що працюють за принципом виявлення варіацій у послідовності ДНК. Вони можуть базуватися на різних довжинах фрагментів ДНК після обробки рестриктазами (RFLP), на ампліфікації специфічних ділянок ДНК за допомогою ПЛР (RAPD, SSR тощо) або на аналізі одонуклеотидних замін (SNP). Вибір конкретного типу маркера залежить від мети дослідження та особливостей об'єкта (Amiteye, 2021; Kucherenko et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Ефективність генетичних маркерів застосування у дослідженнях значною мірою залежить від їхніх характеристик. Серед ключових вимог до них можна виділити: високу варіабельність, чіткість передачі спадкової інформації, нейтральність щодо дії відбору, а також зручність у використанні та аналізі. Водночас, створення універсального маркера, що ідеально би відповідав усім цим критеріям, є достатньо складним завданням (Amiteye, 2021; Mirzaei, 2021).

Результати досліджень демонструють, що методи RAPD та ISSR є ефективними для аналізу генетичного різноманіття плодових культур (Korbin et al., 2002). Сиквенування геному ячменю та застосування SNP- і GBS-генотипування дозволили виявити низку нових геномних ділянок, пов'язаних з цінними ознаками (Rajendran et al., 2022). ДНК-маркери CDDP, DAMD та SCoT виявилися корисними для вивчення генетичного різноманіття троянд (Saidi et al., 2017). Мікросателіти (SSR) зарекомендували себе як потужний інструмент для вивчення генетичної структури популяцій рису, дозволяючи встановлювати походження сортів (Becerra

et al., 2015). Величезну внутрішньо- та міжвидову різноманітність видів роду *Jasminum* вдалося встановити за допомогою ISSR (Akhtar et al., 2021). Аналіз даних SRAP успішно продемонстрував себе у дослідженнях сільськогосподарських культур, а також патогенних грибів, зокрема таких як *Fusarium oxysporum*, *Lepista nuda* і *Pyricularia oryzae* (Zhang et al., 2022).

Як молекулярні маркери використовують як ділянки ядерних, так і цитоплазматичних генів. Зокрема, показана наявність рекомбінації між мітохондріальним і ядерним геномами (Kartavtsev, 2021). Аналіз мітохондріальної 12S і ядерної 5S рРНК дозволяє виявляти внутрішньовидову генетичну структуру популяцій. Застосування мітохондріальних маркерів є перспективним для ідентифікації видів у продуктах харчування та проведення екологічних досліджень (Mohammed-ElSherif et al., 2020).

На відміну від тварин, у яких мітохондріальна ДНК є стабільним маркером для філогенетичних досліджень, у рослин структура мтДНК характеризується значною варіабельністю, що пов'язано з наявністю кількох субгеномних форм та активними рекомбінаційними процесами. Тому для вивчення філогеографії та філогенії у рослинних організмів частіше використовують хлоропластну ДНК, якій притаманна більш стабільна структура (Duminil & Besnard, 2021) (див. дод. Б, рис. 1).

Хлоропластний є найбільш консервативним серед геномів, присутніх у рослинному організмі. Водночас, наявна в ньому генетична інформація містить достатньо даних для проведення порівняльного аналізу та вивчення диверсифікації видів завдяки наявності важливих функціональних генів (Alzahrani, 2021). Одним з перспективних напрямків його аналізу є ДНК-баркодинг (див. дод. Б, рис. 2), суть якого у використанні коротких, стандартизованих фрагментів ДНК для ідентифікації видів та біомоніторингу екосистем (Skuzza et al., 2019; Safhi et al., 2023). Метод є ефективним, швидким і точним. Сучасні методи ДНК-баркодингу включають mini-barcoding (ідентифікація видів навіть із сильно деградованою ДНК), meta-barcoding (аналіз біорізноманіття зразків у суміші видів) та super-barcoding (визначення видової спорідненості). Хоча й існує проблема низького

рівня успішності ПЛР-ампліфікації, застосування методу, завдяки його простоті, високій успішності ідентифікації та відтворюваності (Zhu et al., 2022; Safhi et al., 2023).

Консервативні повторювані послідовності та мінливі спейсерні області притаманні ділянкам, що кодують 5S рДНК (Тинкевич & Волков, 2014а). МГС, особливо у покритонасінних рослин, характеризуються високою швидкістю еволюції та містять регуляторні області, що беруть участь у контролі транскрипції (de Souza et al., 2020). Їх аналіз дозволяє виявляти генетичні відмінності між різними видами та популяціями, а також досліджувати еволюційні процеси, що відбуваються на молекулярному рівні (Тинкевич & Волков, 2014б; Стратійчук et al., 2019).

Для філогенетичних досліджень рослин 5S рДНК є популярним молекулярним маркером. Нуклеотидний поліморфізм некодувальних ділянок 5S рДНК дозволяє розрізнити близькоспоріднені види та виявляти філогенетичні зв'язки між різними таксонами. Дослідження різних родин рослин, таких як Elaeagnaceae, Rosaceae, Solanaceae, показали високу інформативність цієї області геному (Давидюк et al., 2013; Тинкевич & Волков, 2014а; Тинкевич & Волков, 2014б; Панчук et al., 2019; Стратійчук et al., 2019 Alexandrov et al., 2021). Так, встановлено, що *L. punctata* притаманне мозаїчне розташування кластерів 5S рДНК (Chen et al., 2021). Також виявлена значна варіабельність у числі і структурі повторюваних одиниць. Зокрема, у видів *Phleum pratense* (Іщенко et al., 2018), *Brunfelsia uniflora* (Шелифіст et al., 2018) та *Mandragora autumnalis* (Шелифіст et al., 2019) була ідентифікована висока гомогенність повторюваних одиниць 5S рДНК, що контрастує з поліморфізмом, характерним для представників родини Araceae (Chen et al., 2021).

Для виявлення і класифікації повторюваних одиниць 5S рДНК в геномах покритонасінних рослин широко застосовується метод графічної кластеризації RepeatExplorer. Зокрема, вона дозволяє ідентифікувати різні типи повторюваних одиниць 5S рДНК та визначати їх філогенетичні відносини. Це особливо важливо для дослідження гібридних комплексів, оскільки дозволяє встановити батьківські

види і прослідкувати за еволюцією поліплоїдних геномів (Garcia et al., 2020; Vozárová et al., 2021).

Візуалізувати локалізацію 5S рДНК на хромосомах дозволяє комбінація FISH-гібридизації із 5S рДНК-зондами, виявляючи таким чином між- і внутрішньовидову варіабельність каріотипів (Aguilera et al., 2016). Так, дослідження локалізації кластерів 45S та 5S рДНК у представників роду *Hedysarum* виявило значну варіабельність каріотипів, підтверджуючи їх високу інформативність для таксономічних досліджень (Yurkevich et al., 2021).

На сьогодні успішно залучаються у дослідження і такі нові методи, як технологія високопродуктивного сиквенування (HTS) та ізотермічна ампліфікація, що може служити універсальним штрих-кодом для автентифікації будь-якого виду рослин (Chen et al., 2023).

1.2. Використання ISSR для оцінки генетичної різноманітності рослин

У більшості досліджень генетичного різноманіття використовують ISSR-маркери. Це високо мінливі маркери, що здатні виявляти мультилокусні ділянки досліджуваного геному. В основі їх використання лежить виявлення повсюдно присутніх у геномі мікросателітних послідовностей, яким притаманна значна варіабельність. ISSR належить до класу мультилокусних, переважно домінантних генетичних маркерів (Ng & Tan, 2015). Вони є корисними в аналізі генетичного різноманіття нижче видового рівня, а саме у вивченні структури популяції та диференціації (Mint Abdelaziz et al., 2020).

Праймери для ISSR складаються з декількох копій мікросателітних повторів, що забезпечує специфічну гібридизацію з комплементарними ділянками геному. Закріплений кінець праймера підвищує його специфічність, мінімізуючи ризик неспецифічних взаємодій і «проковзування» полімерази (polymerase slippage) (див. дод. Б, рис. 3; Ng & Tan, 2015).

Завдяки використанню ISSR-ПЛР отримують відтворювані, поширені та поліморфні багатолокусні карти геномів рослин. Це універсальний, зручний у

застосуванні (відсутня потреба в даних про послідовність) маркер, використання якого не потребує дороговартісного обладнання (Pérez de la Torre et al., 2012; Ng & Tan, 2015; Sousa et al., 2015).

Маркери ISSR успішно застосовувалися для дослідження генетичного різноманіття багатьох культур, включаючи помідори, баклажани і маракуйю. Використання ISSR дозволяє ідентифікувати найкращі батьківські лінії для отримання гібридів з бажаними ознаками (підвищена врожайність, стійкість до хвороб), оцінити генетичне різноманіття, визначити спорідненість між сортами та видами, а також розробити генетичні карти. Так, за їх використання при дослідженні генетичного різноманіття 25 диких видів роду *Passiflora* був показаний високий рівень поліморфізму, особливо міжвидовий, що відкриває перспективу створення молекулярних паспортів для ідентифікації різних видів *Passiflora* у банку зародкової плазми (Sousa et al., 2015). За допомогою системи ISSR була показана близька ідентичність між *Jasminum multiflorum* і *J. elongatum* (Akhtar et al., 2021). Використання нейтральних ISSR-маркерів дозволило оцінити генетичне різноманіття роду *Calibrachoa* та виявити високу генетичну варіабельність серед 35 генотипів, дозволяючи їх однозначно ідентифікувати (Pérez de la Torre et al., 2012).

Поліморфізм ISSR і SCoT використовували при дослідженні генетичної мінливості, систематики та селекції різних рослин. Зокрема, ці маркери були ефективно використані для диференціації генотипів *Medicago sativa*, *Nigella sativa*, *Pistacia lentiscus*, *Moringa oleifera*, *Lathyrus spp.*, *Crepidium acuminatum*, *Zea mays*, *Hordeum spp.* та *Amaranthus hybridus* (Abouseada et al., 2023).

Дослідження показало, що маркери ISSR ефективно оцінюють генетичну різноманітність *Balanites aegyptiaca*, важливу для відновлення екосистем Сахелю. Використання 16 поліморфних праймерів ISSR виявило значну генетичну різноманітність серед семи природних популяцій цього виду (Mint Abdelaziz et al., 2020). Інвертовані повтори як генетичний індикатор дозволяють виявити поліморфізм ДНК, що є важливим для ідентифікації та покращенню комерційно важливих міжвидових гібридів кави (*Coffea arabica* L.). Використання

міжмікросателітних маркерів сприяє генетичному вдосконаленню, забезпечуючи точну ідентифікацію та оцінку генетичних ресурсів (Amruthakumar et al., 2024). Виявити 75 локусів (81.88% з них поліморфні) серед 52 досліджених зразків *Canna edulis*, що свідчить їх про високу генетичну різноманітність, дозволило використання 14 праймерів ISSR (Le et al., 2024). Значний поліморфізм виявлений для дев'яти з 15 праймерів інвертованих повторів (ISSR) у популяції *Robinia pseudoacacia* L. Ефективність цих маркерів для встановлення філогенетичних зв'язків на рівні родини Fabaceae підтверджена при дослідженні послідовностей ITS1 та trnL-F МГС (Uras et al., 2024). Загалом використання комбінації різних типів молекулярних маркерів дозволяє отримати більш повну та достовірну інформацію про генетичну структуру популяцій і філогенетичні відносини інвазивних видів, що показано і на прикладі видів роду *Eragrostis* (Wróbel et al., 2021).

1.3. Порівняльний аналіз інформативності хлоропластних маркерів при дослідженні різних таксономічних груп рослин

1.3.1. Аналіз хлоропластних маркерів для ДНК-баркування

Використання хлоропластних геномів як молекулярних маркерів стало стандартним підходом у сучасній філогенетиці. Зокрема, застосування методів порівняльної геноміки та біоінформатичного аналізу дозволяє ідентифікувати синапоморфні ознаки та реконструювати філогенетичні відносини між таксонами (Chen et al., 2022). Аналіз хлоропластних маркерів відіграє ключову роль у розкритті еволюційних взаємовідносин між таксонами та уточненні їх систематичного положення. Дослідження останніх років (Jafari et al., 2021; Alzahrani, 2021; Wong et al., 2022; Guo et al., 2023) підтверджують високу інформативність цього підходу.

Повторювані послідовності хлоропластного геному не лише впливають на його структуру, але й відіграють важливу роль у процесах рекомбінації. Їх порівняльний аналіз показав важливість цих ділянок у виникненні інсерцій, делецій та заміщення гену (Feng et al., 2020; Cui et al., 2022). Так, дуплікації одного

нуклеотиду сприяють замінам, вставкам і реверсіям (Li et al., 2024). Консервативність структури й успадковування по материнській лінії геному хлоропластів робить його цінним інструментом у філогенетичних дослідженнях (див. дод. Б, рис. 2). Його типова структура включає по одній великій (LSC) і малій (SSC) області та два інвертовані повтори (IR) (Feng et al., 2020; Cui et al., 2022; Zhu et al., 2022). Різноманітні мутаційні події можуть слугувати синапоморфіями, тобто бути спільними похідними ознаками, що об'єднують певні групи організмів. Різні ділянки геному можуть еволюціонувати незалежно, що може призводити до неконгруентних топологій філогенетичних дерев. Наприклад, у представників родини *Roaceae* було виявлено три інверсії в області LSC геному хлоропласта. У представників *Asteraceae* подібні перебудови мають місце і в LSC, і в SSC областях (Liu et al., 2020).

Найпоширенішим класом у хлоропластному геномі є одонуклеотидні А/Т повтори, що зумовлено їх високим вмістом у ньому. Одонуклеотидні повтори дуже варіабельні та схильні до невідповідностей ковзання та варіацій довжини, ще більше підвищуючи їх різноманітність та еволюційне значення. Впливати на експресію генів, регулювати структуру та функцію білка можуть й інші повтор, наприклад ди- та тринуклеотидні. Окрім цього, у хлоропластах існує перевага певних кодонів для кодування амінокислот. Таким чином, певні варіації можуть бути на користь селекції рослин і їх генетичного вдосконалення та сприяти отриманню культур із покращеною врожайністю, стресостійкістю тощо (Li et al., 2024).

Серед численних генів хлоропластного геному однією з еволюційно-динамічних моделей для його аналізу є *matK* (*maturase K*), що володіє високою універсальністю, здатністю розрізняти та точно визначати філогенію. Даний маркер характеризується високими варіативністю послідовності та коефіцієнтом ефективності сиквенування. Еволюція *matK*, ПЛР-ампліфікація, довжина, точне відокремлення у покритонасінних, а також сегрегація внутрішньо- та міжвидової дивергенції в проміжку баркодингу зумовлюють зручність його використання таких дослідженнях (Cabelin & Alejandro, 2016; Zhu et al., 2022). Його ПЛР-ампліфікація

високоєфективна у покритонасінних та обмежено у голонасінних рослин (~90% та 83% зразків відповідно), тоді як у криптогамів вона незначна (10%) (Vijayan & Tsou, 2010). Його рекомендують застосовувати паралельно з trnH-psbA та trnL-F праймерами (Cabelin & Alejandro, 2016).

Міжгенний спейсер psbA-trnH, розташований між генами, що кодують білок фотосистеми II та тРНК гістидину, є однією з найбільш мінливих ділянок хлоропластного геному (Dudas, 2016). Останнє робить його цінним інструментом для молекулярної систематики, особливо при роботі з деградованими зразками. Розробленим для цієї ділянки праймерам притаманна висока ефективність ампліфікації. За їх використання успішно ідентифікують широкий спектр рослин, включаючи орхідні та папороті (Zhu et al., 2022).

Для вивчення родинних зв'язків між видами в межах одного роду часто використовують ділянки хлоропластного геному, такі як trnT^(UGU)-trnL^(UAA) МГС, інтрон trnL та trnL-trnF^(GAA) МГС (Holt et al., 2004). Міжгенний спейсер trnL-F характеризується надзвичайною мінливістю, що робить його незамінним інструментом для дослідження внутрішньородової різноманітності покритонасінних рослин (Poczai & Huvönen, 2011).

Не зважаючи на перспективність вивчення мікроструктурних змін цієї області для дослідження філогенетичних зв'язків, отримані результати слід інтерпретувати з обережністю, оскільки процеси рекомбінації можуть призводити до появи паралельних еволюційних змін, зокрема утворення псевдогенів. Це ускладнює відтворення філогенетичних відносин. Яскравим прикладом такої проблеми є виявлення псевдогенів trnF в хлоропластах різних рослин (Drábková et al., 2004; Poczai & Huvönen, 2011).

Некодувальні ділянки геному, як правило, характеризуються більш високою частотою інделів, ніж нуклеотидних замін. Дана особливість ускладнює вирівнювання послідовностей, що може призвести до помилок при встановленні гомологічних ділянок. Не зважаючи на це, індели містять важливу філогенетичну інформацію, особливо короткі, пов'язані зі структурою тРНК. Слід зазначити, однак, що такі індели можуть виникати незалежно в різних еволюційних лініях,

призводячи до появи паралельних змін і ускладнюючи реконструкцію філогенетичних відносин (див. дод. Б, рис. 4) (Drábková et al., 2004; Holt et al., 2004).

Області trnL-F хлоропластного геному притаманна висока швидкість накопичення мутацій, призводячи до виникнення значного генетичного різноманіття, в наслідок чого з'являється можливість розрізняти навіть близькоспоріднені види рослин. Не зважаючи на деякі технічні труднощі, пов'язані з наявністю повторюваних послідовностей, МГС залишається незамінним об'єктом досліджень у молекулярній систематиці (Zhu et al., 2022).

1.3.2. Ефективність використання хлоропластних ділянок геному для класифікації організмів

Результати аналізу використання у дослідженнях філогенетичних відносин серед покритонасінних ndhF-rpl32, rpl32-trnL^(UAG), ndhC-trnV^(UAC), 5'rps16-trnQ^(UUG), psbE-petL, trnT^(GGU)-psbD, petA-psbJ та інтрону rpl16 показали значне зростання їх популярності. Найбільш часто, не зважаючи на важчу ампліфікацію, серед цих областей використовують rpl32-trnL (Morris & Shaw, 2018). Вона локалізована в суміжний із МГС ndhF-rpl32 ділянкою SSC-області і характеризується високою варіабельністю нуклеотидної послідовності та довжини (див. дод. Б, рис. 5). Показано, що ця ділянка є інформативною при вивченні таксонів низького рівня (Shaw et al., 2007; Peterson et al., 2014; Safar et al., 2014). Також показано, що rpl32-trnL має значно вищу дискримінаційну здатність при ідентифікації видів роду *Dinebra*, ніж matK (Peterson et al., 2014).

Чітко ідентифікувати китайські популяції та екотипи ряски вдалося завдяки дослідженню варіабельності спейсерних послідовностей atpH-atpF та psbK-psbI (Chen et al., 2022). За допомогою біоінформатичного аналізу хлоропластних геномів представників роду *Pinellia* були виявлені ключові ділянки геному, що відповідають за філогенетичні відмінності, та підтверджений високий рівень міжвидового різноманіття (Cui et al., 2022). Для різних сортів та видів абрикоса показана висока мінливість ділянок psbA-trnK^(UUU), rpoC1-rpoB, rpl32-trnL^(UAG),

trnK-rps16, ndhG-ndhI, ccsA-ndhD та ndhF-trnL (Yi et al., 2023).

У філогенетичному дослідженні геномів чотирьох видів роду злакових за допомогою atpB-rbcL, rps16-rps3 та rpl32-trnL^(UAG) було показано, що рід *Zoysia*, будучи сестринським до роду *Sporobolus*, утворює монофілетичну групу (Cheon et al., 2021). Монофілетичність виявлена для роду *Ludwigia* при використанні маркерів clpP, ucf2 та ucf1, що показали значне генетичне різноманіття серед видів родини Onagraceae (Nguyen et al., 2024). На основі аналізу нуклеотидних послідовностей ядДНК ITS та хлДНК rpl32-trnL^(UAG), було навпаки встановлено, що секція Anthylloidei не є монофілетичною (Safar et al., 2014).

Використання молекулярних маркерів при вивченні систематики та філогенії роду *Phyllostachys* показало вищу генетичну варіабельність некодувальних ділянок хлоропластного геному, ніж кодувальних. Гени, такі як petB, trnQ-UUG і atpH, демонструють особливо високий рівень мутацій, що робить їх перспективними для баркодингу. Відносно високий рівень варіабельності демонструють міжгенні області ділянок rpl32-trnL^(UAG), rpl14-rpl16, rpl22-rps19, rps12-clpP та trnR^(UCU)-trnM^(CAU), що робить їх потенційними молекулярними маркерами в реконструкції еволюційної історії роду (Li et al., 2024). Дослідження accD і rpl32-trnL^(UAG), rbcL областей лікарських видів *Asparagus meiocladus* та *A. munitus* дозволило отримати важливі дані для точнішої ідентифікації видів роду та вивчення їхніх еволюційних взаємин (Tian et al., 2023).

Для отримання більш повних та достовірних результатів молекулярні дослідження доцільно поєднувати з іншими методами аналізу. Зокрема, проводити комбінований аналіз із використанням декількох молекулярних маркерів (Jafari et al., 2021). Штрих-кодування хлоропластної ДНК (хлДНК) у поєднанні з морфологічними та біохімічними характеристиками виявилось ефективним для дослідження генетичного різноманіття манго (Shi et al., 2023; Kumar et al., 2022). Проте, через різну ефективність маркерів на рівні таксону та відповідно групи організмів, вибір універсального маркера для ДНК-баркодингу є складним завданням. Так, для видів жита matK та rbcL виявилися недостатньо інформативними, тоді як комбінація з некодуючою послідовністю psbA-trnH

забезпечила більш точну їх ідентифікацію (Skuzza et al., 2019). Для родини Аросунасеае пропонується поєднання *matK* (основний) із *psbA-trnH* та *trnL-F* (допоміжні) (Cabelin & Alejandro, 2016). Водночас, для міжгенного спейсера *psbA-trnH* притаманні висока мінливість і часті структурні зміни, що обмежує його використання як універсального молекулярного маркера для ідентифікації видів. Отже, при виборі маркерів для філогенетичних досліджень необхідно враховувати особливості конкретної таксономічної групи (Olsson et al., 2022).

Для багатьох рослинних видів характерна варіабельність спейсерної області *rpl32-trnL*, що робить її корисним інструментом для дослідження філогенетичних відносин. Так, популяції *Impatiens glandulifera*, які відомі своєю інвазійністю та адаптивністю, як на Британських островах, так і в його рідному ареалі, продемонстрували значне її генетичне різноманіття (Kurose et al., 2020). Високу інформативність цього маркера для таксономічних досліджень, особливо для розрізнення близьких видів, продемонстровано для *Heracleum mantegazzianum* та *H. sphondylium* (Рошка та ін., 2024).

Такі особливості притаманні й іншим маркерам. Так, для *accD-psaI*, *ndhA*, *psbE-petL*, *rpl32-trnL*, *trnW-psaJ*, *trnS^{GCU}-trnG^{GCC}* ділянок хлДНК білих і рожевих сортів лотоса *Nelumbo nucifera* притаманний низький рівень генетичної мінливості, тобто навіть комбінований аналіз цих ділянок не є достатньо інформативним для їх диференціації (Thanh et al., 2022).

1.4. Історія розповсюдження та сучасний стан систематики роду *Galinsoga*

Рід *Galinsoga* Ruiz & Pavón належить до триби *Heliantheae* підродини *Carduoideae* Kitam. родини *Asteraceae*. Триба включає 170 родів, розповсюджених в основному в Америці. Рід *Galinsoga*, що включає приблизно 14 видів, які походять з Нового Світу, тісно пов'язаний з родами *Sabazia* (Мексика та Південна Америка) і *Alloispermum* (Південна Америка). Існує думка щодо належності їх до єдиного великого роду *Galinsoga* (<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.120145>; Kazi Tani, 2012).

З усіх видів роду *Galinsoga* лише *G. quadriradiata* Ruiz & Pav. (незбутниця війчаста, син. *G. ciliata*) та *G. parviflora* Cav. (незбутниця дрібноквіткова) мігрували далеко за межі Південної Америки, де мають статус бур'янів, ставши рудеральними та випадковими рослинами в усіх досить теплих регіонах світу (рослини-космополіти). *G. parviflora* вважається бур'яном щонайменше в 40 переважно помірних і субтропічних країнах світу (Holm et al., 1979). Це два споріднені види, яким властива низка відмінностей. *G. quadriradiata* відрізняється від *G. parviflora* більшою волосистістю, особливо вираженою на квітконосах, а також наявністю довгих загострених лусочок на насінні. В останнього, навпаки, кількість волосків менша, а лусочки на насінні коротші (<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.120145>).

Кількість хромосом у *G. parviflora* становить $2n=16$, тоді як у *G. quadriradiata*, який є тетраплоїдним видом і може гібридизуватися із *G. parviflora*, $2n = 32$. *G. quadriradiata*, що походить з Мексики, є морфологічно найбільш мінливим видом у цьому роді (Canne, 1977). Вважається, що він є сегментарним алотетраплоїдом (Gopinathan & Babu, 1982). Ці види *Galinsoga* значно відрізняються за поширенням і чисельністю, незважаючи на їхню морфологічну схожість і спорідненість (De Cauwer et al., 2014).

За екологічними вимогами *G. quadriradiata* (походження – Мексика) є більш тіньовитривалим видом. Це звичайний бур'ян більшості помірних і субтропічних регіонів світу та найбільш морфологічно мінливий представник роду (<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.25299>).

Важливими ознаками розповсюдження можуть бути генетична різноманітність, фенотипова пластичність, а також взаємодія з іншими видами та умовами середовища. Поєднання високої морфологічної мінливості, гібридизації та складних еволюційних історій робить систематику роду *Galinsoga* однією з найскладніших у родині Asteraceae (Węgrzynek et al., 2007; Liu et al., 2021).

Існує припущення щодо можливості гібридизації між досліджуваними видами з іншими представниками роду, зокрема із *G. subdiscoidea* та *G. unxioides*. На потенційну гібридизацію із представниками *Sabazia*, близького до *Galinsoga*

роду, зокрема із *S. sarmentosa*, вказують виявлені проміжні фенотипи. Види цих родів досить близькі за морфологічними ознаками. Так, найбільша подібність до видів роду *Sabazia* притаманна *G. formosa*, а далі в порядку її зменшення йдуть *G. elata*, *G. durangensis* та *G. mollis*. Видом з невизначеною спорідненістю *G. filiformis* представлена секція *Stenocarpa* (морфологічні ознаками знаходиться між секціями *Elata* та *Galinsoga*, див. дод. Б, рис. 6). У межах роду виділяється *G. boliviensis*, морфологічно більш схожий із *G. quadriradiata*, ніж із *G. caligensis*, тоді як *G. elata* близька до *G. formosa* (Canne, 1977).

G. parviflora була завезена до Східної Прусії французькими військами у 1807 році. Ризик занесення нових інвазійних видів та поширення вже існуючих існує й при сучасних військових конфліктах. Особлива небезпека пов'язана з гібридами адвентивних рослин, з вищими адаптивними властивостями і більшою агресивністю (Зав'ялова та ін., 2022).

G. quadriradiata, вперше була зареєстрована в Європі наприкінці дев'ятого століття, тоді як сьогодні вона поширена в багатьох європейських країнах. Після 1945 року цей вид потрапив в Україну та в північно-західні та центральні регіони сусідніх держав, де він був описаний у 70-х роках. Щодо *G. quadriradiata* більшості європейських країн, в яких вона зараз натуралізована, існує гіпотеза про його ненавмисну інтродукцію через ймовірне транспортування як забруднювача імпортованого насіння та саджанців декоративних рослин тощо (<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.120145>). З моменту першого звіту про виявлення незбутниці в'їжджатої на горі Лушань у провінції Цзянсі Китаю (1979 р.) її було виявлено в усіх його відповідних кліматичних районах (Liu al., 2021).

Динаміка поширення видів *G. quadriradiata* та *G. parviflora* суттєво відрізняється. Так, *G. parviflora* через більш ранню інтродукцію та здатність до більш дальнього поширення насіння розповсюджувалася швидше. Однак, для окремих європейських країн, наприклад Литви, виявлена протилежна тенденція. Виявлені відмінності можуть бути пов'язані як із кліматичними факторами та історією їх інтродукції, так і з помилковою ідентифікацією видів (наприклад Польща, 1807 р.) (Węgrzynek et al., 2007). На сьогодні спостерігається феномен

зменшення чисельності та розповсюдження *G. quadriradiata* вздовж шляхів інвазії на висоті, що пояснюють швидкою адаптацією виду до нових умов, зумовленою генетичними змінами та фенотиповою пластичністю. Дане спостереження суперечить поширеній гіпотезі про постійне зростання інвазивності видів вздовж шляхів їх розповсюдження (Liu et al., 2021).

Дослідження диференціації ознак, пов'язаних з розповсюдженням, у інвазійної рослини *G. quadriradiata* вздовж градієнта висоти в горах Китаю показало складну картину. Спостерігалось збільшення співвідношення маси насіння до площі (MAR) з висотою, що може сприяти більш ефективному розповсюдженню насіння високогірними популяціями. Генетичну варіацію 23 популяцій із 45 було кількісно визначено за допомогою маркерів ISSR (UBC 816, UBC 817, UBC 818, UBC 826, UBC 847, UBC 855 і UBC 857). Водночас, генетичне різноманіття зменшувалося з висотою. Результати тепличного експерименту підтвердили, що популяції з різних висот демонструють різну реакцію на умови середовища, що вказує на важливу роль фенотипічної пластичності у формуванні ознак, пов'язаних з розповсюдженням. Отримані дані свідчать про те, що здатність до розповсюдження інвазійних рослин може змінюватися вздовж градієнта висоти і не завжди зростає під час розширення ареалу (Liu et al., 2021).

Як вже зазначалося, представникам роду *Galinsoga* притаманна дуже висока подібність між собою та з видами інших родів, що тривалий час заважало визначенню їх точної родової належності. Результати молекулярних досліджень підтриби *Galinsoginae* показують, що рід *Galinsoga* не є монофілетичною групою, а деякі його види мають гібридне походження. Так, *G. crozierae* та *G. subdiscoidea* Cronquist є сестринськими до клади, що включає білолігульні види *G. (Stenocarpha) filiformis* Hemsl. та *G. (Tricarpha) durangensis* (Longpre) J. M. Canne. Ці чотири види утворюють сестринські групи з іншими видами *Galinsoga*-*Sabazia* та *Alloispermum*. Розміщення цієї ієрархічної системи класифікації в *Galinsoga* ґрунтується насамперед на результатах дослідження ITS (Panero, 2003).

De Moraes (2020) пропонує переглянути таксономічне положення видів *G. megapotamica* та *G. uniflora*, вважаючи доцільним перенесення *G. megapotamica*

до роду *Hymenoxys* як нового гетеротипового синоніма *H. tweediei* через вагоміший пріоритет останнього. Аналогічно, до роду *Actinea* як синонім *A. heterophylla* пропонується включити *G. uniflora*. Однак, враховуючи наявність іншого виду *Helenium heterophyllum*, для *G. uniflora* використовувати нову комбінацію *Actinea megapotamica* (de Moraes, 2020).

Наведені дані свідчать, що систематика роду *Galinsoga* далека від свого завершення і потребує для розуміння багатьох спірних питань проведення досліджень організації геному із використанням молекулярних маркерів.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкт та матеріал для досліджень

Об'єктом дослідження були нуклеотидні послідовності міжгенних спейсерів *rpl32-trnL* хлДНК та мікросателітні послідовності різних популяцій двох представників роду *Galinsoga* – *G. parviflora* та *G. quadriradiata*.

Для дослідження були зібрані зразки інвазійних видів роду *Galinsoga* з різних регіонів України та кількох Європи (табл. 1). Видову належність встановлювали за традиційними морфологічними ознаками.

Таблиця 1.

Вид	Легенда	Походження зразку	Дані		GPS координати
			ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	Gal1	с. Шацьк, Волинська обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	51.61003402, 23.85947654
	Gal6	с. Нижня Яблунька, Турківський р-н, Львівська обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	49.20629603, 22.84840778
	Gal27	с. Карапчів, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.09116727, 25.84780262
	Gal28	с. Горбова, Герцаївський р-н, Чернівецька обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	48.35096344, 26.17018801
	Gal29	с. Замостя, Вижницький р-н, Чернівецька обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	48.53710695, 25.37410694
	Gal30	окол. м. Сторожинець, Чернівецька обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	48.35167205, 25.69339248
	Gal38	околиці с. Лунка, Герцаївський р-н, Чернівецька обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	48.31127657, 26.26209727
	Gal44	с. Байраки, Герцаївський р-н, Чернівецька обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	48.28739389, 26.09983771
	Gal46	м. Городенка, Івано-Франківська обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.67401917, 25.49486637
	Gal47	с. Проходи, Волинська обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	51.78796766, 25.46692572
	Gal48	с. Григорівка, Хмельницька обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	49.72563983, 27.18990333
	Gal52	м. Герца, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.14992985, 26.25383069
	Gal54	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.27144896, 25.93587813
	Gal56	м. Коростишів, Житомирська область, Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	50.1911, 29.0317
	Gal58	с. Долішній Шепіт, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.0134202, 25.28583608

	Gal61	с. Юрківці, Чернівецька обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.50305081, 25.93285795
	Gal63	м. Чорнобиль, Київська область, Україна	ISSR	–	51.1646, 30.1248
	Gal64	с. Боришківці, Тернопільська обл., Україна	ISSR	–	48.55326356, 26.3591551
	Gal66	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.29161269, 25.92147334
	Gal68	с. Буца, Рівненська обл., Україна,	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	50.3235, 26.3018
	Gal70	с. Горошова, Тернопільська обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.54670275, 26.10724104
	Gal72	м. Кременець, Тернопільська обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	50.0626, 25.4418
	Gal73	с. Верхня Рожанка, Львівська обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.77541355, 23.49851056
	Gal74	м. Клайпеда, Клайпедський повіт, Литва	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	55.70506215, 21.1528391
	Gal75	м. Київ, Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	50.3112, 30.272
	Gal76	м. Київ, Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	50.3837798, 30.47712168
	Gal8	між с. Лази і с. Гриньків, Рожнятівський р-н, Івано-Франківська обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	48.71024, 24.11518
<i>Galinsova quadriradiata</i> Ruiz & Pav.	Gal15	с. Купка, Глибоцький р-н, Чернівецька обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	48.24753524, 25.78785739
	Gal45	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.29466391, 25.92642525
	Gal49	с. Долішній Шепіт, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.0134202, 25.28583608
	Gal50	м. Сторожинець, Чернівецька обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.16294823, 25.71715359
	Gal51	м. Герца, Чернівецька обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.14992985, 26.25383069
	Gal53	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.27171318, 25.93630729
	Gal55	м. Коростишів, Житомирська обл., Україна	ISSR	–	50.32152276, 29.06398558
	Gal57	м. Кашкайш, Естремадура, Португалія	ISSR	–	38.6957593, -9.428550058
	Gal59	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.27691346, 25.9380189
	Gal60	м. Краків, Малопольське воєводство, Польща	ISSR	–	50.06626777, 19.96011517
	Gal62	с. Нижні Ворота, Закарпатська обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.77495619, 23.10388538
	Gal65	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	ISSR	–	48.29161269, 25.92147334
	Gal67	м. Городенка, Івано-Франківська обл., Україна	ISSR	–	48.67458595, 25.50044537
	Gal69	с. Горошова, Тернопільська обл., Україна	ISSR	<i>rpl32-trnL</i>	48.54670275, 26.10724104
	Gal71	м. Дрогобич, Львівська обл., Україна	ISSR	–	49.352132, 23.469862
	Gal79	м. Рахів, Закарпатська обл., Україна	–	<i>rpl32-trnL</i>	48.054636, 24.201834

Отримані дані про географічне поширення видів візуалізовано на карті, створеній за допомогою онлайн-інструменту Google My Maps (рис. 1).

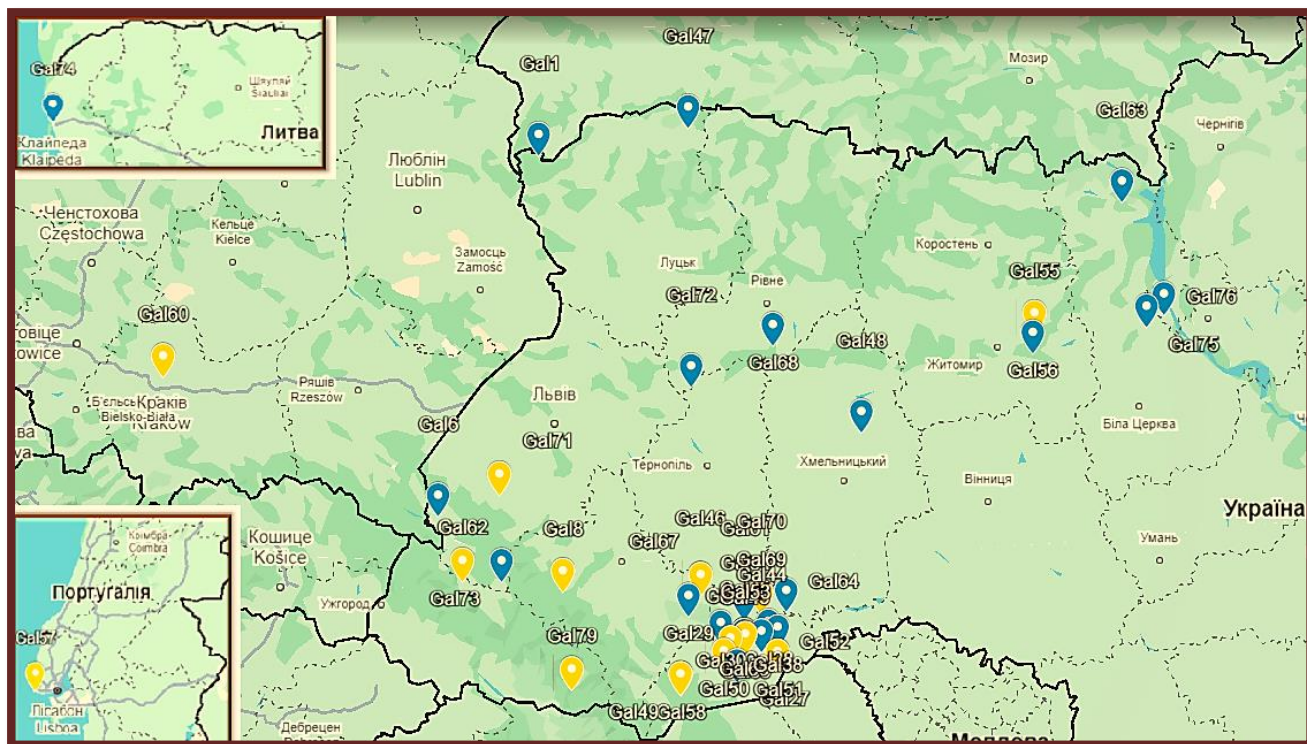


Рис. 1. Місця зростання досліджуваних зразків *Galinsoga parviflora* та *G. quadriradiata*

Однорічні рослини *Galinsoga quadriradiata* Ruiz & Pavon (волосиста незбутниця) та *Galinsoga parviflora* Cav. (дрібноквіткова незбутниця) що походять з Північної та Центрально-Південної Америки, нині широко розповсюджені у помірних та субтропічних регіонах світу. Останній вважається бур'яном щонайменше в 40 країнах світу. *G. quadriradiata* може знизити врожайність на 10-50% на полях, завдаючи значних економічних збитків сільському господарству. Обидва поширюються насінням (<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.120145>; <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.25299>).

Точна ідентифікація цих видів ускладнена через їхню морфологічну схожість та наявність гібридів. Для достовірного визначення необхідно ретельно вивчати дрібні деталі квітки, такі як форма плівок та папусів, а також волосистість стебла. *Galinsoga quadriradiata* відрізняється від *G. parviflora* за кількома ознаками, але наявність гібридів ускладнює цей процес (рис. 2; Van der Meijden, 2005).



Рис. 2. Морфологічна відмінність двох видів роду *Galinsoga*, де:

А – *G. quadriradiata*; Б – *G. parviflora*

(<https://oregonflora.org/taxa/index.php?taxon=5239>;

<https://wildflowersearch.org/search?&tsn=37414>)

Спочатку інтродукція видів *Galinsoga* в Європу не викликала занепокоєння. Проте з часом вони адаптувалися до нових умов і стали агресивними бур'янами, особливо на легких піщаних ґрунтах з низькорослими культурами (Van der Meijden, 2005). *Galinsoga parviflora* (Cav.) – це не тільки бур'ян, а й перспективна лікарська рослина. Однак, незважаючи на численні дослідження, інформація про медичне застосування виду все ще недостатньо поширена серед широкого загалу (Ripanda et al., 2023).

Незважаючи на значну шкоду, яку завдають види роду *Galinsoga* сільському господарству, ефективні методи боротьби з ними є обмеженими. Постійне посилення екологічних стандартів призводить до скорочення асортименту дозволених гербіцидів. Крім того, такі біологічні особливості цих бур'янів, як швидке розмноження, відсутність періоду спокою насіння та здатність до вегетативного розмноження, ускладнюють їхнє знищення. Густа і розгалужена коренева система робить механічні методи боротьби неефективними. Для успішного контролю *Galinsoga* необхідне застосування комплексу агротехнічних заходів та, за можливості, використання біологічних методів боротьби (Canne, 1977; De Cauwer et al., 2014).

З метою вивчення філогенетичних зв'язків та генетичної структури популяцій, нами було проаналізовано нуклеотидні послідовності спейсерні ділянки rpl32-trnL хлДНК та варіації в моделях смуг для восьми праймерів ISSR у видів *G. parviflora* та *G. quadriradiata*.

2.2. Методи досліджень

Виділення ДНК

Екстракцію загальної ДНК здійснювали зі свіжого рослинного матеріалу чи гербарних зразків за допомогою осадження цетавлоновим методом.

1. Наважку 0,3-0,4 г рослинного матеріалу заморожують з використанням рідкого азоту, подрібнюють в ступці і, не даючи розморозитися, додають підігрітий до 65°C буфер для лізису наступного складу: 10% цетавлон $\times$ 1 М трис-НСІ (рН 8,0) $\times$ 0,5 М ЕДТА $\times$ 5 М NaCl $\times$ протеїназа (20 мкл на 3-4 мл) $\times$ 0,1% β -меркаптоетанол.
2. Лізис здійснюють на водяній бані при 65°C протягом 2 год.
3. Надалі до лізату додають рівний об'єм суміші хлороформ $\times$ ізоаміловий спирт (24:1), пробірки струшують і центрифугують 5 хв при 13000 g.
4. У роботі 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 очищують 80% етанолом, центрифугують при 13000 g протягом 5 хв та сушать за кімнатної температури до зникнення запаху етанолу.
6. Висушений осад розчиняють у 100 мкл буферу TE (10 mM трис-НСІ, рН 8,0 $\times$ 1 mM ЕДТА).

Для підтвердження успішного виділення ДНК та оцінки її якості, отримані препарати аналізують за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі. Візуалізацію фрагментів ДНК здійснюють за допомогою флуоресцентного барвника бромистого етидію.

Електрофорез ДНК в агарозному гелі

1. Для електрофорезу використовують 1 $\times$ ТВЕ буферну систему (трис-борат ЕДТА, рН 8,0: 0,089 М трис $\times$ 0,089 М борна кислота $\times$ 0,002 М ЕДТА).
2. Аналіз геномної ДНК здійснюють в 1%, а ПЛР-продуктів та продуктів

рестрикції – у 2% агарозному гелі. До визначеної кількості агарози додають 20 мл 1× TBE і нагрівають у мікрохвильовій печі (5-7 хв за потужності 300-450 Вт) до повного її розчинення.

3. Розчин агарози охолоджують до температури 50-55°C і заливають у форму для електрофорезу зі вставленою гребінкою.
4. Після того застигання агарози форму поміщають в камеру для проведення електрофорезу та заливають 1×буфером TBE так, щоб гель був повністю ним покритий на 2-3 мм.
5. Обережно, щоб не пошкодити лунки, витягують гребінку та спейсери.
6. Готують проби для нанесення. Для цього до буферу для нанесення (1×TE × 50% гліцерин × 0,25% розчин бромфенолового синього) додають препарат ДНК. Співвідношення об'єму проби і буферу – 1:5.
7. Під буфер у сформовані в гелі лунки вносять проби ДНК.
8. Як ДНК-маркер використовують 100 bp та 1 kbp фірми Biotium.
9. Приєднують прилад для електрофорезу до блоку живлення.
10. Електрофорез здійснюють при напруженості поля 5 V/см², так щоб головний барвник дійшов майже до кінця гелю.
11. Після закінчення електрофорезу, забарвлюють гель у 200 мл 1× буферу TBE із бромистим етидієм в концентрації 10 мг/мл.
12. Для візуалізації ДНК гель переносять на скло транслюмінатора і фотографують його в ультрафіолетовому світлі.
13. Квантифікацію ДНК проводять за допомогою програмного забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

Полімеразна ланцюгова реакція

Перед проведенням ПЛР концентрацію та чистоту ДНК визначали за допомогою спектрофотометра. Відомо, що забруднення ДНК та варіації в її концентрації можуть негативно впливати на результати ПЛР. Для оптимізації умов ISSR-ПЛР, що є чутливим до концентрації ДНК, всі зразки були розведені до концентрації близько 10-20 ng. Такий підхід відповідає рекомендаціям Ng & Tan

(2015), які вказують на оптимальний діапазон концентрації ДНК (10-50 ng) для цього методу. Вимірювання оптичної густини розчину при довжині хвилі 260 нм на спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

- Ділянки *rpl32-trnL^(UAG)* хлДНК

Для ампліфікації послідовності хлоропластної ДНК застосовують праймери psbA-trnH, trnL-trnF у яких присутній комплементарний до кодувальних ділянок мотив (табл. 2).

Таблиця 2.

**Послідовності праймерів, використаних для ампліфікації
rpl32-trnL ділянки хлДНК**

Позначення праймера	Послідовність
trnL ^(UAG)	5'-CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT-3'
rpl32-F	5'-CAGTTCCAAAAAACGTACTTC-3'

Реагенти для приготування проби ДНК наведені в таблиці 3.

Таблиця 3.

Компоненти	Об'єм, мкл
H ₂ O, бідистильована	7
MyTaq™ HS Red Mix 5 ^x	10
Primer Fd	0.5
Primer Rev	0.5
Препарат ДНК (10 ng)	2
Загальний об'єм реакційної суміші	20

Ампліфікацію проводять на приладі для ПЛР за наступною програмою:

35 циклів ПЛР ампліфікації, що включають:

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

Для перевірки на вміст продуктів ПЛР проводять електрофоретичний аналіз в агарозному гелі 2% концентрації.

- ISSR-маркери

ISSR-маркери передбачають ампліфікацію ділянок геному, обмежених інвертованими мікросателітними повторами (зазвичай довжиною 2-5 нуклеотидів). Для цього використовують один або кілька праймерів, комплементарних до цих повторів, з додаванням 1-4 нуклеотидів на 5'- або 3' кінці для підвищення специфічності (Abouseada et al., 2023).

Для ампліфікації ISSR маркерів було використано вісім ISSR-праймерів з набору UBC (University of British Columbia – табл. 4).

Таблиця 4.

Послідовності праймерів, використаних для ампліфікації ISSR

Праймер	Послідовність праймера	Температура гібридизації, °C
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
UBC 809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50
UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52
UBC 827	ACACACACACACACACG	52
UBC 835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	56
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	54
UBC 857	ACACACACACACACACYG	56

Реагенти для приготування проби ДНК наведені в таблиці 5.

Таблиця 5.

Компоненти	Об'єм, мкл
H ₂ O, бідистильована	7,2
MyTaq™ HS Red Mix 5 ^x	10
Primer	0,8
Препарат ДНК (10 ng)	2
Загальний об'єм реакційної суміші	20

Для кожного праймера використовували оптимальну температуру гібридизації, яка була визначена експериментально та зазначена в таблиці 4. Ампліфікацію цільового гена проводили за стандартним протоколом ПЛР на термоциклері BioRad T100. Температурний профіль реакції був наступним:

- 1) активація полімерази при 95°C, 3 хв;
- 2) денатурація при 95°C, 20 с;
- 3) посадка праймера (анелювання) при 61°C, 20 с;

- 4) синтез ДНК (елонгація) – 72°C, 45с;
- 5) закінчення ампліфікації – 72°C, 3 хв;
- 6) охолодження до 4°;
- 7) загальна кількість циклів ампліфікації – 35.

Для аналізу ПЛР-продуктів проводили їх електрофоретичне розділення у 2 та 3% агарозних гелях. З метою візуалізації фрагментів ДНК гель забарвлювали етидієм бромідом. Для визначення точної довжини ампліфікованих фрагментів використовували молекулярні маркери 100 bp та 1 kbp фірми Biotium.

Очистка ПЛР-продуктів *rpl32-trnL^(UAG)* хлДНК

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 із супернатантом у мікропробірці Епандорф: додають 3 об'єми 96% етанолу, залишають суміш на 20-30 хв для утворення осаду при t = -20°C, після чого центрифугують 8 хв при 13000 g.
3. Осад промивають 50 мкл 80% етанолу, центрифугують 2 хв при 13000 g та сушать 20-25 хв при t = 37°C.
4. Висушений осад розчиняють в 14 мкл бідистильованої води.

Сиквенування і аналіз сиквенсів *rpl32-trnL^(UAG)*

Для визначення нуклеотидної послідовності ампліфікованих фрагментів хлДНК зразки було направлено на фірму LGC Genomics (Німеччина). Первинну обробку отриманих даних сиквенування здійснювали за допомогою програмного забезпечення Chromas. Для подальшого їх аналізу та складання консенсусної послідовності використовували біоінформатичні пакети DNASTAR, Geneious v 5.5.

Для проведення порівняльного геномного аналізу видів *G. parviflora* та *G. quadriradiata* було використано стандартний протокол біоінформатичного аналізу, який включав пошук гомологів у базі даних GenBank за допомогою алгоритму BLAST. Як еталонні для порівняльного аналізу ділянки *rpl32-trnL* було обрано наявні у базі даних GenBank нуклеотидні послідовності видів *G. parviflora* (Gapar_GB: GPARV20171209) та *G. quadriradiata* (Gaqua_GB: GQUAD20160711).

Отримані послідовності було анотовано за допомогою програми EditSeq. Далі, для виявлення гомологічних ділянок та оцінки рівня їхньої ідентичності було проведено множинне вирівнювання послідовностей за алгоритмом ClustalW у програмі Megalign.

Статистичний аналіз ISSR

Для аналізу електрофореграм продуктів ПЛР використовували програмне забезпечення TotalLab TL120. Кожна ПЛР-реакція повторювалася тричі для оцінки відтворюваності результатів. Для подальшого статистичного аналізу отриманих даних використовували програмний пакет GenAlEx 6.503. Були розраховані наступні параметри генетичної різноманітності: відсоток поліморфних смуг (PPB), вміст поліморфної інформації (PIC), ефективна кількість алелів (N_e), інформаційний індекс Шеннона (I), очікувана гетерозиготність (H_e) та незміщена очікувана гетерозиготність (uH_e). Варто зазначити, що значення PIC розраховували додатково в MS Excel на основі частот алелів, отриманих у GenAlEx, згідно з методикою Ivanovych et al. (2017).

Матрицю бінарних даних, отриману в результаті молекулярно-генетичного аналізу, було перетворено на матрицю генетичних відстаней за допомогою коефіцієнта Дайса, реалізованого в програмному забезпеченні DARwin 6.0.21. Для оцінки генетичної спорідненості між 33 зразками роду *Galinsoga* було побудовано дендрограму методом незваженого приєднання сусідів (UWN-J). Крім того, для виявлення основних тенденцій у варіації генетичних даних було проведено аналіз головних компонент (PCoA) з використанням перших п'яти компонентів, що пояснювали найбільшу частку дисперсії даних.

Для дослідження генетичної структури популяції та виявлення потенційних гібридів було застосовано байєсівський підхід кластеризації, реалізований у програмі STRUCTURE 2.3.4. Цей метод дозволяє визначити, до якої міри кожен індивід належить до різних генетичних кластерів. Оптимальну кількість кластерів (K) було визначено за допомогою методу Evanno, який впроваджено в програмному забезпеченні STRUCTURE HARVESTER (Earl & von Holdt, 2012). Це дозволило ідентифікувати найбільш ймовірну кількість генетичних кластерів у вибірці.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка генетичної диференціації між популяціями *G. parviflora* та *G. quadriradiata* за допомогою *rpl32-trnL*

Рід *Galinsoga* належить до родини Asteraceae і є одним з найбільш поширених інвазійних представників флори у світі. Рід не є монофілетичною кладою, зустрічаються часті випадки гібридизації між видами *Galinsoga* (н-д, *G. parviflora* та *G. quadriradiata*) та представниками інших родів (н-д, *Sabazia*, *Alloispermum*), що призводять до утворення гібридних форм і ускладнюють ідентифікацію видів. Для деяких видів *Galinsoga* існує невизначеність щодо їх родової належності, що вимагає додаткових досліджень (Canne, 1977; Panero, 2003; de Moraes, 2020).

Для вирішення вказаних проблем необхідні комплексні дослідження, що потребують системної оцінки з використанням молекулярних маркерів (Canne, 1977; Panero, 2003; Kazi Tani, 2012; Liu et al., 2021), які, для отримання більш повних і точних результатів, доцільно поєднувати з іншими методами аналізу. Так, хлоропластні маркери хоча й виявили меншу варіабельність, однак дозволили встановити видоспецифічні мутації, доповнюючи загальну картину генетичної різноманітності (Wróbel et al., 2021). Серед таких маркерів особливий інтерес представляє ділянка *rpl32-trnL*, що знаходиться між генами, які кодують білок рибосомної великої субодиниці 32 та тРНК лейцину з антикодоном UAG (*trnL*^{UAG}) (Shaw et al., 2007; Safar et al., 2014).

Види роду *Galinsoga*, відомі своєю інвазійністю та космополітизмом, є серйозною загрозою для біорізноманіття багатьох регіонів світу. Космополітичне поширення цих видів обумовлене, зокрема, антропогенним фактором (<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.120145>). З метою розуміння генетичних механізмів, що лежать в основі їхньої інтродукції, нами було проведено дослідження генетичної структури європейських популяцій *Galinsoga*. З цією метою нами були отримані препарати ДНК, якість яких визначали за допомогою електрофоретичного аналізу в 1% агарозному гелі (див. дод. Б, рис. 7).

Для дослідження філогенетичних відносин і популяційної структури між різними видами рослин було проведено ампліфікацію ділянки *rpl32-trnL* за допомогою ПЛР. Результати електрофоретичного аналізу отриманих ампліконів наведено на рис. 3.

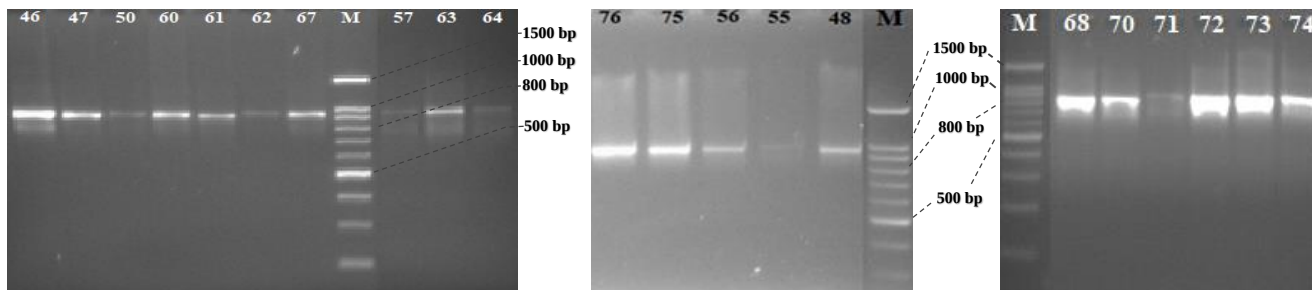


Рис. 3. Електрофоретичний профіль ПЛР-продуктів, отриманих до ділянки *rpl32-trnL*, у зразків роду *Galinsoga*, де: *G. parviflora* – 46-48, 56, 61, 63, 64, 68, 72-76; *G. quadriradiata* – 50, 55-57, 60, 62, 67, 71

Аналіз отриманих після сиквенування даних показав, що довжина міжгенного спейсера *rpl32-trnL* у більшості зразків *G. parviflora* коливається в межах 812-815 нп, тоді як у зразків *G. quadriradiata* її розміри дещо вищі і становлять 833-836 нп. Наші результати узгоджуються з літературними даними щодо цього показника для інших видів, у яких середня довжина спейсера дорівнює 1018 нп і коливається у межах 543-1417 нп (Safar et al., 2014; Shaw et al., 2007).

Надалі анотовані послідовності підлягали вирівнюванню в програмі MegAlign. Аналіз множинного вирівнювання дозволив ідентифікувати характерні для кожного виду *Galinsoga* особливості, пов'язані з кількістю та розташуванням однонуклеотидних замін, делецій та інсерцій (рис. 4). Подібний підхід був застосований для аналізу *Cannabis sativa*, у якого в цій ділянці виявлені різні типи поліморфізмів, зокрема короткі тандемні повтори, однонуклеотидні поліморфізми та індели (див. дод. Б, рис. 8; Roman et al., 2019).

Як видно з наведених даних, досліджувані послідовності містять різноманітні однонуклеотидні поліморфізми та індели. Окремим з них (позиції консенсусної послідовності 1, 361, 596 нп) притаманна чітка видоспецифічність, зустрічаючись за одним-двома винятками в усіх представників. Найчастіше в нуклеотидних

послідовностях досліджуваних видів зустрічається трансверсія А→Т. Майже в усіх *G. quadriradiata* у позиції 361 конценсусної послідовності наявний тимін, а в позиції 596 – аденін. У *G. parviflora*, навпаки – відповідно аденін і тимін. Із загальної схеми, зокрема, випадають Gal46 і Gal74, які за морфологічними ознаками визначені як *G. parviflora*, та Gal51, визначений як *G. quadriradiata*. Особливістю їх нуклеотидних послідовностей є значна подібність зі зразками іншого досліджуваного виду, що наводить на думку про ймовірність неправильного визначення їх видової належності.

Рис. 4. Фрагменти вирівнювання МГС rpl32-trnL ділянки, що містять області SNP, інделів та дуплікацій *Galinsoga parviflora* та *G. quadriradiata*

(Gal46 та Gal74), зібраних в різних країнах (Івано-Франківська обл. України та Литва відповідно). Всі ці зразки характеризуються наявністю 21-нуклеотидної дуплікації в положенні 488 нп консенсусної послідовності, тобто виявлені нами відмінності у довжині спейсерної ділянки досліджуваних видів зумовлені наявністю цієї дуплікації. Зразок *G. quadriradiata* Gal51 такого фрагмента не містить, тобто спостерігається аналогічна картина, що й у випадку з одонуклеотидними замінами.

Наступним кроком дослідження було визначення ступеня подібності МГС *rpl32-trnL* досліджуваних послідовностей. Отримані результати наведені в табл. 6. Аналіз генетичної спорідненості серед представників роду *Galinsoga* показав, що більшість зразків демонструють дуже високий рівень ідентичності, який коливається в межах 98,8–100%. Найнижчий показник подібності (98,8%) був зафіксований між зразками *G. parviflora* Gal56 та найбільш варіабельними популяціями виду *G. quadriradiata* Gal59 та Gal62. Нуклеотидні послідовності особин, зібраних у Чернівецькій (Gal59) та Закарпатській (Gal62) областях мають ступінь спорідненості з іншими зразками 98,9%, зокрема із Gal75 (Київ). Окрім перерахованих, найбільші відмінності були зафіксовані також для зразків Gal56, Gal15 та Gal79.

Попередні дослідження Wang et al. (2018) та Zhang et al. (2019) встановили близьку спорідненість *G. quadriradiata* з *Guizotia abyssinica* та підтвердили традиційну таксономію родини Asteraceae, де *G. parviflora* та *G. quadriradiata* утворюють монофілетичну групу (див. дод. Б, рис. 9-10). Наші результати, отримані за допомогою методу максимальної парсимонії, підтверджують ці висновки та надають додаткові деталі про філогенетичні відносини в межах роду *Galinsoga*. Використовуючи програмне забезпечення Geneious Prime та iTol, ми побудували філогенетичне дерево на основі отриманого вирівнювання послідовностей, що дозволило відстежити еволюційні зв'язки між досліджуваними таксонами (рис. 5).

Таблиця 6.

Ступінь подібності (%) нуклеотидних послідовностей rpl32-trnL між генних спейсерів хл/ІНК *Galinsoda parviflora* та *G. quadriradiata*

	Gal179	Gal169	Gal162	Gal159	Gal151	Gal150	Gal115	Gal18	Gapar_GB	Gal176	Gal175	Gal174	Gal173	Gal172	Gal170	Gal168	Gal161	Gal156	Gal148	Gal147	Gal146	Gal144	Gal138	Gal129	Gal128	Gal16	Gal1
Gal179	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal169	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal162	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal159	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal151	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal150	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal115	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal18	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gapar_GB	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal176	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal175	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal174	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal173	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal172	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal170	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal168	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal161	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal156	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal148	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal147	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal146	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal144	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal138	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal129	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal128	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal16	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Gal1	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9

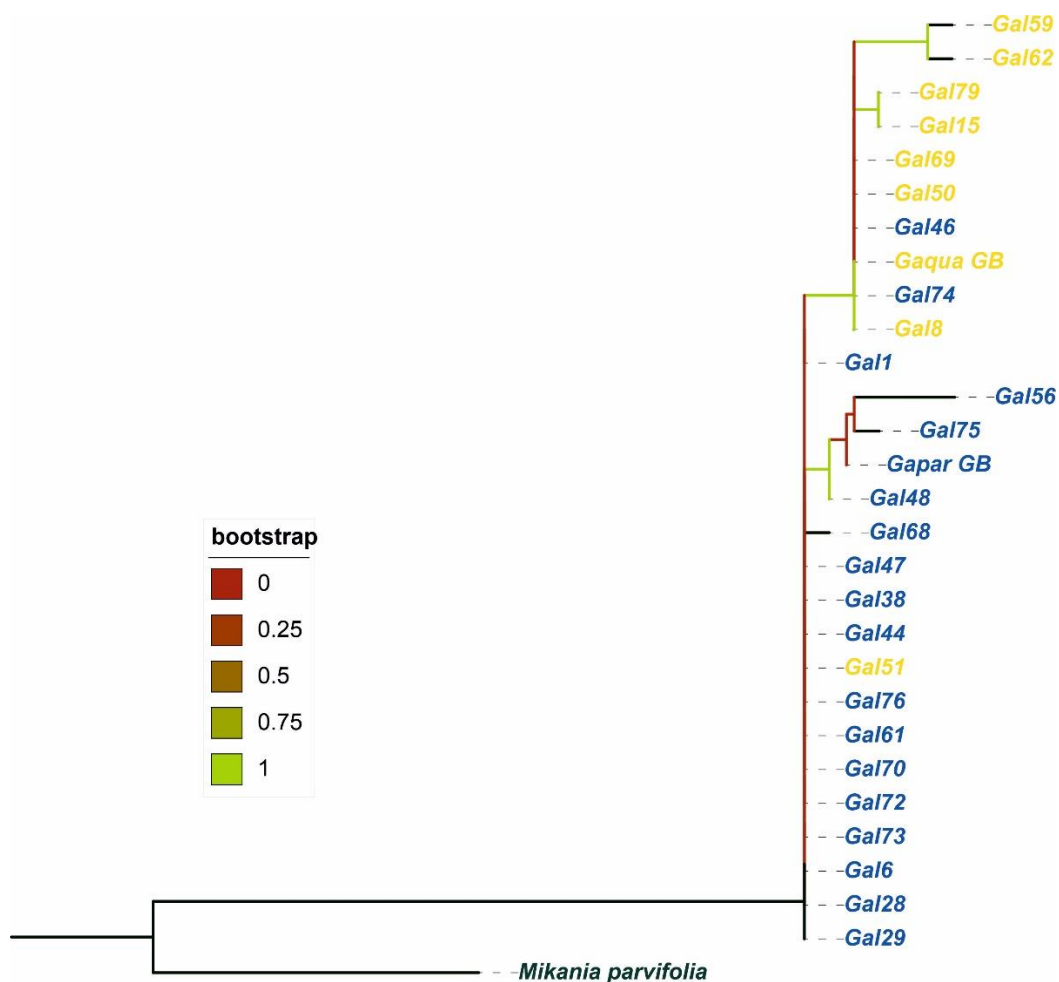


Рис. 5. Філодендрограма представників роду *Galinsoga*, побудована на основі порівняльного аналізу послідовностей МГС rpl32-trnL

Філогенетичний аналіз на основі послідовностей міжгенного спейсеру між генами rpl32 і trnL хлоропластного геному виявив чітку дихотомію в межах роду *Galinsoga*, розділяючи види *G. parviflora* та *G. quadriradiata*. Для коректного проведення порівняльного аналізу, окрім вже описаних послідовностей, отриманих з бази даних GenBank (Gapar_GB та Gaqua_GB), як аутгрупу було обрано вид *Mikania parvifolia*. Спостерігається певна кореляція між філогенетичним зв'язком та географічним поширенням, що вказує на можливу внутрішньовидову диференціацію. Як видно з представлених на рис. 5 результатів, дві паралельні гілки формують на філогенетичному дереві зразки Gal59 та Gal62 відносно Gal15 та Gal79. Цікаво, що зразки Gal59 і Gal15 походять з Чернівецької області, тоді як Gal62 й Gal79 – із Закарпаття. Також спостерігається чітке відгалуження зразків

G. parviflora із утворенням окремої клади, які об'єднують українські зразки (Gal56, Gal75, Gal48) та китайський (Gapar_GB).

Отже, нами були виявлені певні видоспецифічні властивості нуклеотидної послідовності *rpl32-trnL* спейсерної області хлДНК. Зокрема, особливістю *G. quadriradiata* є наявність у положенні 488 конценсусної послідовності дуплікації розміром 21 нп. Тому несподіваністю стало виявлення зразків Gal46 (Україна) та Gal74 (Литва), які, незважаючи на морфологічну подібність до виду *G. parviflora*, за молекулярними даними виявилися ближчими до виду *G. quadriradiata*. Зокрема, за наявністю специфічної дуплікації у *rpl32-trnL* спейсерній області хлДНК. Зразок Gal51 (Чернівецька обл.), визначений за морфологічними ознаками як *G. quadriradiata*, навпаки, її не містить. Отримані результати наводять на думку про необхідність більш детального аналізу їх видової належності. Для підтвердження отриманих результатів бажано провести додаткові філогенетичні аналізи з використанням інших молекулярних маркерів та більшої кількості таксонів.

3.2. Оцінка генетичного різноманіття популяцій *G. parviflora* та *G. quadriradiata* за даними ISSR-маркерів

Використання комбінації різних типів молекулярних маркерів дозволяє отримати більш повну та достовірну інформацію про генетичну структуру популяцій і філогенетичні зв'язки, насамперед у інвазійних видів рослин. Серед таких досліджень досить ефективними виявився аналіз присутніх у геномі мікросателітних послідовностей (Wróbel et al., 2021). Техніка ISSR-ПЛР дозволяє генерувати велику кількість поліморфних фрагментів ДНК. Хоча і відомо, що інтерпретація отриманих даних може бути важча через неоднозначність гомології деяких фрагментів, що ускладнює визначення генотипів (Robarts & Wolfe, 2014). У літературі є повідомлення про використання методу ISSR для вивчення генетичного різноманіття тільки для *G. quadriradiata*, що зростає на території Китаю (Li et al., 2015; Liu et al., 2021).

Отримані нами препарати ДНК були використані для постановки ISSR-ПЛР з допомогою восьми універсальних праймерів UBC. Електрофореграми розподілу фрагментів для одного з них представлені на рис. 6.

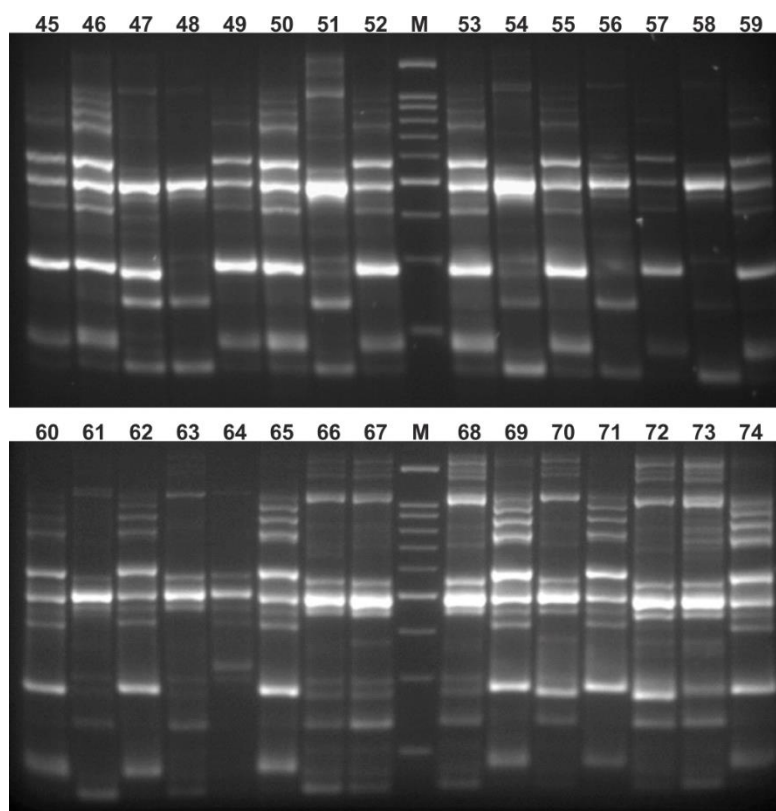


Рис. 6. Електрофоретичний розподіл ПЛР-продуктів у зразків роду

***Galinsoga*, отриманих з використанням праймера UBC 810, де:**

***G. parviflora* – 46-48, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72-74,**

***G. quadriradiata* – 45, 49-51, 53, 55, 57, 59, 60, 62, 65, 67, 69, 71**

Як видно з представлених даних, при використанні праймера UBC 810 для постановки ПЛР було отримано складний профіль поліморфізму ДНК. При порівняльному аналізі розділення фрагментів, притаманних різним видам, прослідковується видова специфічність. Подібні закономірності спостерігалися і при використанні інших праймерів. Водночас, слід зауважити, що кількісне різноманіття фрагментів залежало як від видової належності зразка, так і від використаного праймера. Загалом, для всіх досліджуваних ISSR було виявлено 157 чітких фрагментів ДНК різної довжини. Найбільшу кількість поліморфних фрагментів (27 смуг у електрофоретичному профілі) було отримано при використанні праймера UBC 835, тоді як найменшу (14 смуг) – при використанні

UBC 836. Кількість поліморфних алелів, виявлених за допомогою праймерів UBC 807, 836 та 835, варіювала від 9 до 23. Загалом було ідентифіковано 131 унікальних алелів (табл. 7). Таке різноманіття свідчить про високий рівень генетичної мінливості зразків обох досліджуваних представників роду *Galinsoga*.

За допомогою MS Excel був вирахований PIC, на основі частот діапазону, отриманий в GenAlEx (табл. 7). Для використаних восьми маркерів ISSR він коливався від 0,499 до 0,541 із середнім значенням 0,523. Найбільш інформативним виявився праймер UBC 809, для якого PIC дорівнював 0,541. Придатність праймерів ISSR-ПЛР для генетичного профілювання роду *Galinsoga* оцінювали шляхом розрахунку загальної кількості ампліфікованих смуг, кількості поліморфних смуг, відсотка поліморфних смуг, вмісту поліморфної інформації, дискримінаційною та роздільною здатностями.

Таблиця 7.

**Параметри обчислень поліморфізму та інформативності ISSR-маркери
у досліджуваних генотипів роду *Galinsoga***

Праймер	Довжина фрагментів ДНК (нп)	ТВ	РВ	РРВ (%)	PIC	DP	RP
UBC 807	190-1400	15	9	60	0.523	0.788	78.182
UBC 809	160-1000	17	16	94.12	0.541	0.683	5.758
UBC 810	170-1650	22	19	86.36	0.519	0.699	13.030
UBC 811	300-1300	23	20	86.96	0.503	0.777	14.667
UBC 827	310-1250	19	15	78.95	0.516	0.786	4.970
UBC 835	140-1350	27	23	85.19	0.499	0.722	10.424
UBC 836	180-1070	14	9	64.29	0.532	0.885	12.242
UBC 857	320-1550	20	20	100	0.525	0.717	4.848
Разом / Середнє	140-1650	157	131	83.44	0.523	0.881	12.242

Примітка: ТВ – загальна кількість ампліфікованих смуг, РВ – кількість поліморфних смуг, РРВ – відсоток поліморфних смуг, PIC – вміст поліморфної інформації, DP – дискримінаційна здатність, RP – роздільна здатність.

За допомогою програмного забезпечення STRUCTURE була проведена байєсівська кластеризація (рис. 6А), результати якої вказують на те, що всі 33 досліджувані генотипи чітко розподіляються між двома досліджуваними видами, які на рисунку позначені як «Parviflora» та «Quadriradiata». При аналізі критерію ΔK , що відповідає визначеній за морфологічними ознаками видовій

приналежності, для більшості зразків отриманий розподіл був підтверджений (рис. 6В). Проте, як видно з наведених результатів, для деяких зразків спостерігається невідповідність між їх генетичними даними та ідентифікацією за морфологічними ознаками. Зокрема, зразки Gal46 і Gal52, віднесені до виду *G. parviflora* на основі даних морфології, за результатами молекулярного аналізу є представниками виду *G. quadriradiata*. Аналогічна тільки протилежна картина спостерігається для зразків Gal51 і Gal67, ідентифікованих як *G. quadriradiata*. Як видно з наведених на рис. 6В результатів, вони виявилися генетично ближчими до виду *G. parviflora*.

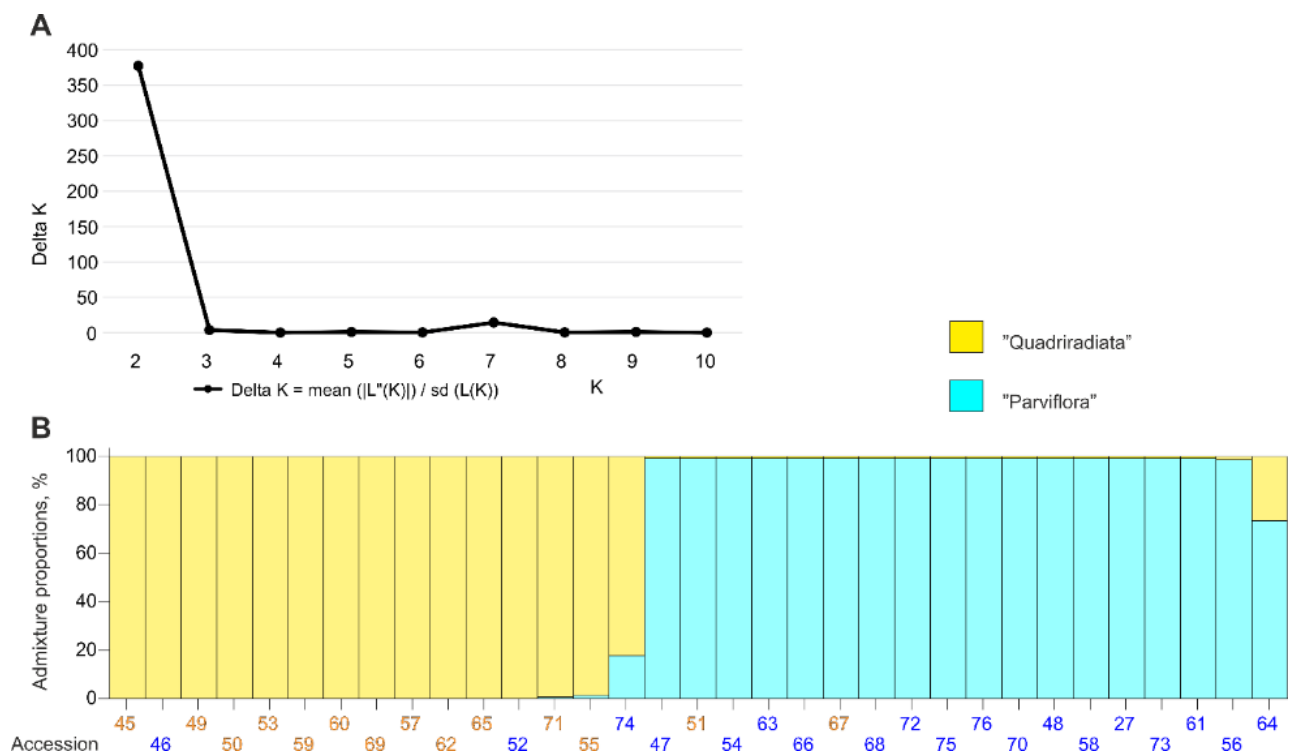


Рис. 6. Результати кластерного аналізу за даними ISSR-маркерів, де:

А - залежність статистики ΔK від числа кластерів (K); **Б** - розподіл індивідуальних генотипів між двома кластерами. Кожен зразок представлений вертикальним стовпчиком, розділеним на дві частини, що відповідають частці алелів, успадкованих від *G. quadriradiata* та *G. parviflora* (жовтий та блакитний кольори відповідно); назви зразків *G. quadriradiata* та *G. parviflora*, ідентифікованих морфологічно, зазначені відповідно помаранчевим та синім кольорами

Для кількох досліджуваних зразків було виявлена наявність у їх геномі генетичного матеріалу обох видів, тобто за допомогою байєсівської кластеризації

вдалося виявити гібридні індивіди. Так, суміш генетичного матеріалу від обох батьківських видів містять геноми зразків Gal64 та Gal74. Однак, якщо для першого встановлена наявність 73,7% генетичного матеріалу *G. parviflora* та 26,3% – *G. quadriradiata*, то для другого виявлена протилежна залежність щодо частки у геномі генетичного матеріалу кожного з видів: 18,2% та 81,8% відповідно. Ознаки гібридизації, хоча й у значно меншій кількості (0,9%, 1,6%, 1,2%), були встановлені ще для трьох інших зразків (відповідно для Gal56, Gal55 та Gal71). Такі низькі значення свідчать про наявність в їхньому геномі лише незначних фрагментів від іншого виду. Швидше за все, ці зразки виникли в результаті так званого «зворотного схрещування», в основі якого лежить схрещування гібридної особини з одним із батьківських видів.

Слід зауважити, що про можливість події гібридизації між *G. parviflora* та *G. quadriradiata* вже було зроблене припущення на основі аналізу морфологічних та цитогенетичних даних (Canne, 1976; Canne, 1977; Canne, 1983; Van der Meijden, 2005; Yavorska, 2008). Результати нашого дослідження, заснованого на застосуванні різних молекулярних маркерів, надають прямі докази існування цього процесу. Через різний рівень плоїдності цих видів очікувалося, що гібриди між диплоїдним *G. parviflora* та тетраплоїдним *G. quadriradiata* будуть триплоїдними (Canne, 1983). Однак, аналіз генетичної структури виявлених гібридів не підтверджує цю гіпотезу. Ми припускаємо, що такі гібриди могли виникнути в результаті зворотних схрещувань триплоїдних гібридів з одним із батьківських видів. Дане припущення узгоджується з результатами досліджень, отриманих при вивченні індійських зразків (Gopinathan & Babu, 1982).

Отже, використання ISSR-маркерів при вивченні видів роду *Galinsoga* дозволяє на молекулярному рівні не тільки уточнювати видову належність конкретного зразка, але і виявляти події гібридизації, що мали місце в його еволюції.

Аналіз генетичного різноманіття видів *G. parviflora* та *G. quadriradiata* за допомогою індексів Шеннона (I) та очікуваної гетерозиготності (H_e) показав, що *G. parviflora* характеризується значно вищим рівнем генетичного різноманіття

порівняно з таким *G. quadriradiata* (табл. 8). Значення цих показників для *G. quadriradiata*, встановлені нами, відповідають результатам, отриманим при аналізі китайських популяцій цього виду (Liu et al., 2021). Також подібним для європейських і китайських популяцій даного виду виявився відсоток поліморфних смуг (PPB). Для китайських популяції *G. quadriradiata* він знаходиться в діапазоні 8.88-29.51% (Li et al., 2015). Лише незначно перевищує верхню межу цього діапазону отримане нами значення (31.21%) для європейських зразків *G. quadriradiata*, тоді як для *G. parviflora* спостерігається майже двократне його переважання. Це свідчить, що рівень генетичного різноманіття *G. quadriradiata* у різних, навіть достатньо віддалених, регіонах є відносно стабільним, тоді як зразки *G. parviflora* демонструють значно більшу генетичну варіабельність.

Таблиця 8.

Показники генетичної мінливості видів *G. quadriradiata* та *G. parviflora*

Вид		N	PB	PPB (%)	N_a	N_e	I	H_e	uH_e
<i>G. quadriradiata</i>	M	15	49	31.21	1.025	1.125	0.124	0.078	0.082
	SE				0.062	0.020	0.017	0.012	0.012
<i>G. parviflora</i>	M	18	89	54.14	1.350	1.295	0.254	0.169	0.176
	SE				0.063	0.031	0.023	0.016	0.017

Примітка: M – середнє значення; SE – стандартна похибка; N – кількість аналізованих індивідуумів; PB – кількість поліморфних смуг; PPB – відсоток поліморфних смуг; N_a – кількість різних алелів; N_e – ефективна кількість алелів; I – індекс Шеннона; H_e – очікувана гетерозиготність; uH_e – незміщена очікувана гетерозиготність

Як видно з наведених у таблиці даних, розрахований для *G. quadriradiata* індекс Шеннона (0,124) практично у двічі менший за такий для *G. parviflora*, що вказує на його значно менше генетичне різноманіття. Дана особливість, ймовірно, пов'язана з ефектом засновника, обумовленим обмеженим розміром вихідної популяції (Galera & Sudnik-Wójcikowska, 2010). Такий висновок узгоджується з існуючими даними про обмежене географічне поширення *G. quadriradiata* в Європі порівняно з *G. parviflora* (Galera & Sudnik-Wójcikowska, 2010).

Генетичну спорідненість зразків досить чітко можна характеризувати за допомогою аналізу дендрограм, тому надалі отримані для досліджуваних ISSR-маркерів дані використали для побудови UWN-J дендрограми (рис. 7).

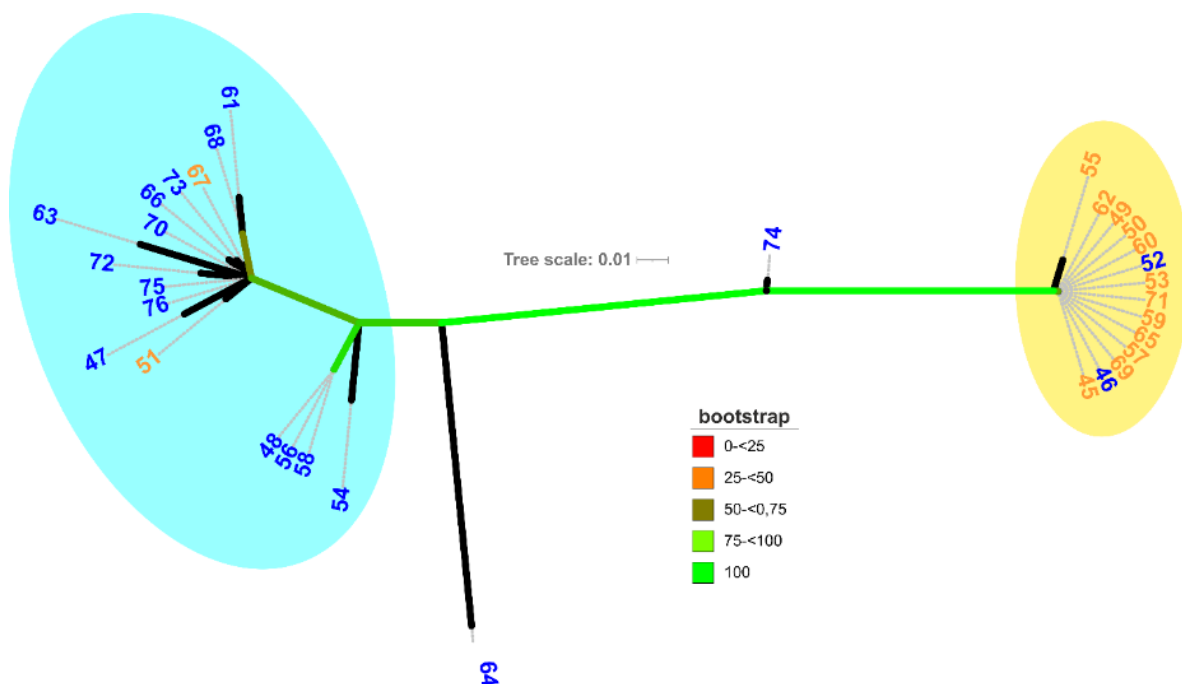


Рис. 7. UWN-J дендрограма генетичної спорідненості видів роду *Galinsoga*, побудована за даними ISSR-маркерів, де ідентифіковані морфологічно як *G. parviflora* зразки позначені синім, *G. quadriradiata* – помаранчевим

Як видно з представленого рисунку, всі досліджувані зразки *G. parviflora* та *G. quadriradiata* розподіляються на дві відокремлені групи, позначені раніше як «Parviflora» та «Quadriradiata», що мають високу статистичну підтримку. Даний розподіл повністю відповідає аналізу отриманих результатів шляхом байєсівської кластеризації при використанні програмного забезпечення STRUCTURE (див. рис. 6B). Зразки Gal64 та Gal74, ідентифіковані нами як гібриди, займають на дендрограмі проміжне положення. При цьому гілка, що веде до зразка Gal64, розташована ближче до клади *G. parviflora* і є найдовшою на дереві, вказуючи на значні генетичні відмінності цього зразка від інших. Зразок Gal74, навпаки, утворює коротшу гілку та демонструє меншу генетичну дистанцію до виду *G. quadriradiata*.

За винятком одного зразка клада «Quadriradiata» сформована щільною групою, що свідчить про існування між ними високої генетичної однорідності. Зразок Gal55 (м. Коростишів, Житомирська обл.), однак, є сестринським до цієї групи, що може свідчити про його географічну ізоляцію або інші генетичні процеси. Клада «Parviflora» поділяється на дві основні субклади. Одна з них

об'єднує зразки Gal48, Gal56 та Gal58, що можуть вказувати на їхнє спільне походження або ж на адаптацію до схожих умов середовища. Інша субклада включає решту зразків, за винятком Gal54. Звертає на себе увагу формування довшої гілки на дендрограмі порівняно з такими інших представників виду *G. parviflora* у зразка Gal63, що походить із зони Чорнобильської катастрофи. Дана особливість є свідченням наявності перебудови у його геномі.

Для вивчення глибини взаємозв'язків між всіма досліджуваними зразками отримані результати були проаналізовані за допомогою методу основних компонент (PCoA), проведеному за п'ятьма осями, які пояснюють 62,3%, 7,06%, 4,31%, 3,6% і 3,3% варіації, відповідно. Виявлені раніше особливості групування досліджуваних зразків спостерігаються і в цьому випадку, тобто також спостерігається групування зразків «*Parviflora*» та «*Quadriradiata*», які виявились значно дистанційно розділеними на графіках за осями 1/2 та 1/3 (рис. 8). Як і при інших використаних методах аналізу отриманих даних зразки *G. quadriradiata*, на відміну від зразків *G. parviflora*, утворюють щільну групу, що також підтверджує наше твердження про низьке генетичне різноманіття популяцій даного виду. Як і при використанні інших методів опрацювання отриманих даних, при аналізі їх за допомогою методу PCoA гібридні зразки Gal64 та Gal74 займають на графіках ізольоване положення.

На загал результати, отримані при побудові дендрограми та методом PCoA додатково підтверджують, що *G. parviflora* має порівняно високе, а *G. quadriradiata* низьке генетичне різноманіття. Серед усіх проаналізованих зразків найбільш своєрідною виявилась гібридна форма Gal64, що підтверджують результати, отримані різними методами. Ймовірною причиною цього може бути походження Gal64 від предкової форми, що мала рідкісний генотип або значні структурні перебудови у геномі внаслідок міжвидової гібридизації (Volkov et al., 1999; Rieseberg, 2001; de Tomás & Vicient, 2023).

Як і при використанні хлоропластного маркеру (див. рис. 4-5), так у випадку ISSR-маркерів (рис. 6-8) для деяких зразків наявна невідповідність між виявленим генотипом та його видовою ідентифікацією на основі морфологічних ознак. Так,

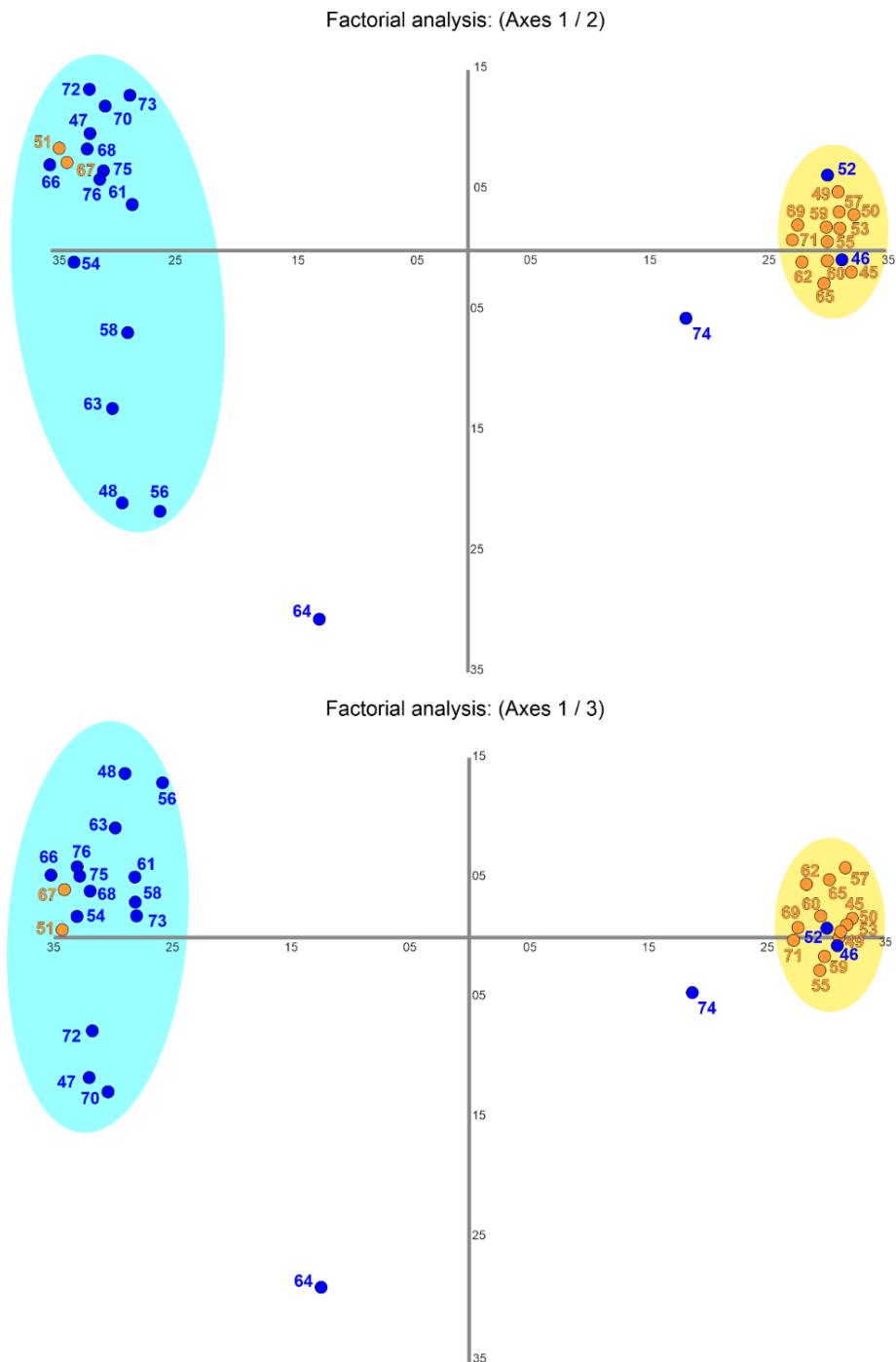


Рис. 8. Результати аналізу генетичної подібності зразків роду *Galinsoga* методом основних координат. Назви зразків рослин, ідентифікованих морфологічними ознаками як *G. parviflora* та *G. quadriradiata*, наведені відповідно синім та помаранчевим кольорами; на блакитному та жовтому фоні наведено зразки, які за результатами аналізу у програмі STRUCTURE належать до кластерів «Parviflora» та «Quadriradiata»

зразки Gal46 і Gal52, визначені як *G. parviflora*, за результатами баркодингу належать до *G. quadriradiata*, тоді як зразки Gal51 і Gal67, навпаки, належать не до

G. quadriradiata, а до *G. parviflora*, оскільки генетично вони є типовими представниками своїх видів.

Результати кластерного аналізу (див. рис. 6) відкидають можливість пояснення їх морфологічних характеристик гібридним походженням. Імовірно, виявлені між морфологічною ідентифікацією та генетичним баркодингом розбіжності зумовлені широкими межами модифікаційної мінливості ознак, що використовуються для визначення видової приналежності. Відомості щодо помилкової ідентифікації *G. parviflora* та *G. quadriradiata* наявні для різних частин їх природного й адвентивного ареалів (Canne, 1977; Zhai et al., 2018).

Проведений аналіз не виявив залежності між географічною віддаленістю досліджених зразків та генетичною дистанцією між ними. Для *G. quadriradiata* всі зразки є близькоспорідненими, включно із зразком Gal57 із найбільш віддаленого локалітету у Португалії. Також, зразки *G. parviflora* з різних регіонів України, наприклад Gal66, Gal67, Gal68, Gal75 та Gal76, виявились найбільш спорідненими (див. рис. 6-7). Слід зазначити, що така ситуація, коли певний генотип має широке географічне розповсюдження та водночас на спільній території зустрічаються різні генотипи, є типовою для інвазійних видів і пов'язана з їх розповсюдженням внаслідок діяльності людини (Smith et al., 2020). Отримані результати яскраво підкреслюють важливість молекулярних методів для точного визначення видової належності рослин.

Найбільш географічно віддалений зразок Gal57 (*G. quadriradiata*), що підлягав аналізу, походить із Португалії. Не зважаючи на це, він виявився генетично близьким до інших представників свого виду, що свідчить про відсутність чіткої географічної структури популяцій. Наявність такої високої генетичної однорідності для широкого географічного ареалу є типовою для інвазійних видів і є свідченням їх швидкого, ймовірно завдяки антропогенному фактору, розповсюдження (Smith et al., 2020).

Дані випадки морфологічної мінливості, не пов'язаної з генетичними відмінностями, підкреслюють необхідність комплексного підходу до таксономічних досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Довжина міжгенного спейсеру rpl32-trnL хлДНК *G. parviflora* коливається у межах 812-815 нп, у *G. quadriradiata* – у межах 833-836 нп.
2. Найчастіше у послідовностях *G. quadriradiata* та *G. parviflora* зустрічається трансверсія А→Т. У позиції 361 конценсусної послідовності майже в усіх зразках *G. quadriradiata* наявний тимін, а в позиції 596 – аденін. У *G. parviflora*, навпаки, відповідно аденін і тимін. Особливістю *G. quadriradiata* є наявність дуплікації розміром 21 нп у положенні 488 конценсусної послідовності.
3. Аналіз результатів ISSR-баркодингу показує низьке генетичне різноманіття українських та інших європейських популяцій *G. quadriradiata*. Рівень генетичного різноманіття у популяціях *G. parviflora* є суттєво вищим. Зразки Gal64 та Gal74 демонструють гібридне походження між *G. parviflora* та *G. quadriradiata*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Давидюк, Ю. М., Молода, О. О., & Волков, Р. А. (2013). Молекулярна організація 5S рДНК *Solanum betaceum* Cav. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 11(1), 14-19.
2. Зав'ялова, Л. В., Коломійчук, В. П., Кучер, О. О., Протопопова В. В., Шевера, М. В. (2022). Оцінка загрози спалаху фітоінвазій внаслідок війни. *Подолання екологічних ризиків і загроз для довкілля в умовах надзвичайних ситуацій – 2022: Збірник матеріалів I Міжнародної науково-практичної конференції (26–27 травня 2022 року, Полтава – Львів)*. Полтава: НУПП.
3. Іщенко, О. О., Деревенко, Т. О., & Панчук, І.І. (2018). 5S рДНК тимофіївки лучної *Phleum pratense* L. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 10(2), 107-112. <https://doi.org/10.31861/biosystems2018.02.107>
4. Панчук, І. І., Касіяничук, Р. М., & Волков, Р. А. (2019). Субповтори у 5S рДНК як молекулярний маркер у популяціях *Acer platanoides* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 25, 80-85. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1143>
5. Рошка, Н., Деревенко, Т., & Чорней, І. (2024). Використання ділянки *grl32-trnL* хлоропластного геному у молекулярній таксономії видів роду *Hieracium*. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 16(1), 58-64. <https://doi.org/10.31861/biosystems2024.01.058>
6. Стратійчук, А. С., Деревенко, Т. О., & Тинкевич, Ю. О. (2019). Організація повторюваної ділянки 5S рДНК *Quercus imbricaria* Michx. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*, 17(2), 179-186. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.17.2.1219>
7. Тинкевич, Ю. О., & Волков, Р. А. (2014). Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Среp. *Доповіді Національної академії наук України*, (5), 143-148.
8. Тинкевич, Ю. О., & Волков, Р. А. (2014). Структурна організація 5S

- рибосомної ДНК *Rosa rugosa*. *Цитологія і генетика*, 48(1), 3-9.
9. Шелифіст, А. Є., Тинкевич, Ю. О., & Волков, Р. А. (2018). Молекулярна організація 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 16(1), 61-68. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.16.1.903>
10. Шелифіст, А. Є., Якобишен, Д. В., & Волков, Р. А. (2019). Молекулярна будова 5S рДНК *Mandragora autumnalis* Bertol. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*, 17(2), 187-195. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.17.2.1220>
11. Abouseada, H. H., Mohamed, A. S. H., Teleb, S. S., Badr, A., Tantawy, M. E., Ibrahim, S. D., Ellmouni, F. Y., & Ibrahim, M. (2023). Genetic diversity analysis in wheat cultivars using SCoT and ISSR markers, chloroplast DNA barcoding and grain SEM. *BMC Plant Biology*, 23(193), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04196-w>
12. Aguilera, P. M., Debat, H. J., Scaldaferrro, M. A., Marti, D. A., & Grabiele, M. (2016). FISH-mapping of the 5S rDNA locus in chili peppers (*Capsicum*-*Solanaceae*). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 88(1), 117-125. <https://doi.org/10.1590/0001-37652301620140616>
13. Akhtar, N., Hafiz, I. A., Hayat, M. Q., Potter, D., Abbasi, N. A., Habib, U., Hussain, A., Hafeez, H., Bashir, M. A., & Malik, S. I. (2021). ISSR-based genetic diversity assessment of genus *Jasminum* L. (*Oleaceae*) from Pakistan. *Plants*, 10(7), 1270. <https://doi.org/10.3390/plants10071270>
14. Alexandrov, O. S., Razumova, O. V., & Karlov, G. I. (2021). A comparative study of 5S rDNA non-transcribed spacers in *Elaeagnaceae* species. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.3390/plants10010004>
15. Alzahrani, D. A. (2021). Complete Chloroplast Genome of *Abutilon fruticosum*: Genome structure, comparative and phylogenetic analysis. *Plants*, 10(2), 270. <https://doi.org/10.3390/plants10020270>
16. 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>

17. Amruthakumar, S., Manivel, B., Sivamani, K., Sethuraman, T., Rao, N. S. P., & Ganesh, D. (2024). Molecular identity for commercially important inter-specific hybrids of *Coffea* using ISSR-DNA marker: implication on genetic improvement. *Plant Biotechnology Reports*, 18(3), 425-436. <https://doi.org/10.1007/s11816-023-00878-x>
18. Becerra, V., Paredes, M., Gutiérrez, E., & Rojo, C. (2015). Genetic diversity, identification, and certification of Chilean rice varieties using molecular markers. *Chilean journal of agricultural research*, 75(3), 267-274. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392015000400001>
19. Cabelin, V. L. D., & Alejandro, G. J. D. (2016). Efficiency of matK, rbcL, trnH-psbA, and trnL-F (cpDNA) to molecularly authenticate Philippine ethnomedicinal Apocynaceae through DNA barcoding. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 3), S384–S388. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.185780>
20. Canne, J. M. (1976). *The systematics of the genus Galinsoga (Compositae: Heliantheae)*. The Ohio State University.
21. Canne, J. M. (1977). A revision of the genus *Galinsoga* (Compositae: Heliantheae). *Rhodora*, 79(819), 319-389. <http://www.jstor.org/stable/23311822>
22. Canne, J. M. (1983). Cytological and morphological observations in *Galinsoga* and related genera (Asteraceae). *Rhodora*, 85(843), 355-366. <http://www.jstor.org/stable/23311205>
23. Chen, G., Stepanenko, A., & Borisjuk, N. (2021). Mosaic arrangement of the 5S rDNA in the aquatic plant *Landoltia punctata* (Lemnaceae). *Frontiers in Plant Science*, 12, 678689. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.678689>
24. Chen, G., Stepanenko, A., Lakhneko, O., Zhou, Y., Kishchenko, O., Peterson, A., et al. (2022). Biodiversity of duckweed (Lemnaceae) in water reservoirs of Ukraine and China assessed by chloroplast DNA barcoding. *Plants*, 11(11), 1468. <https://doi.org/10.3390/plants11111468>
25. Chen, S., Yin, X., Han, J., Sun, W., Yao, H., Song, J., & Li, X. (2023). DNA barcoding in herbal medicine: Retrospective and prospective. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13(5), 431-441.

<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.03.008>

26. Cheon, S. H., Woo, M. A., Jo, S., Kim, Y. K., & Kim, K. J. (2021). The chloroplast phylogenomics and systematics of *Zoysia* (Poaceae). *Plants*, 10(8), 1517. <https://doi.org/10.3390/plants10081517>
27. Cui, N., Chen, W., Li, X., & Wang, P. (2022). Comparative chloroplast genomes and phylogenetic analyses of *Pinellia*. *Molecular Biology Reports*, 49(8), 7873-7885. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07617-5>
28. De Cauwer, B., Devos, R., Claerhout, S., Bulcke, R., & Reheul, D. (2014). Seed dormancy, germination, emergence and seed longevity in *Galinsoga parviflora* and *G. quadriradiata*. *Weed Research*, 54(1), 38-47. <https://doi.org/10.1111/wre.12055>
29. De Moraes, P. L. R. (2020). The taxonomic identity of two neglected Sprengel names, *Galinsoga megapotamica* and *G. uniflora* (Asteraceae), with remarks upon Friedrich Sellow's collections galore. *Phytotaxa*, 438(3), 163-181. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.438.3.1>
30. De Souza, T.B., Gaeta, M.L., Martins, C., & Vanzela, A.L.L. (2020). IGS sequences in *Cestrum* present AT- and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Molecular Biology Reports*, 47, 55-66. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05104-y>
31. De Tomás, C., & Vicient, C. M. (2023). The genomic shock hypothesis: genetic and epigenetic alterations of transposable elements after interspecific hybridization in plants. *Epigenomes*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.3390/epigenomes8010002>
32. Drábková, L., Kirschner, J., Vlček, Č., & Pačes, V. (2004). TrnL–trnF intergenic spacer and trnL intron define major clades within *Luzula* and *Juncus* (Juncaceae): Importance of structural mutations. *J Mol Evol*, 59(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S00239-004-2598-7>
33. Dudas, K. O. (2016). Phylogenetic Studies in the Genus *Persea* Mill. (Lauraceae). *Doctoral dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Biologie*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15179.39209>
34. Duminil, J., & Besnard, G. (2021). Utility of the mitochondrial genome in plant

- taxonomic studies. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2222, 107-118.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_6
35. Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4, 359-361.
<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
 36. Feng, S., Zheng, K., Jiao, K., Cai, Y., Chen, C., Mao, Y., et al. (2020). Complete chloroplast genomes of four *Physalis* species (Solanaceae): lights into genome structure, comparative analysis, and phylogenetic relationships. *BMC Plant Biol*, 20(242), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02429-w>
 37. Galera, H., & Sudnik-Wójcikowska, B. (2010). Central European botanic gardens as centres of dispersal of alien plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 79(2), 147-156.
 38. Garcia, S., Wendel, J. F., Borowska-Zuchowska, N., Aïnouche, M., Kuderova, A., & Kovarik, A. (2020). The utility of graph clustering of 5S ribosomal DNA homoeologs in plant allopolyploids, homoploid hybrids, and cryptic introgressants. *Frontiers in Plant Science*, 11(41). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00041>
 39. Gopinathan, M. C., & Babu, C. R. (1982). Cytogenetics of *Galinsoga parviflora* Cav. and *G. ciliata* (Raf.) Blake, and their natural hybrids (Asteraceae). *New phytologist*, 91(3), 531-539. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1982.tb03331.x>
 40. Guo, C., He, Y., Zeng, X., Xiong, X., Qiu, P., Huang, X., & Yang, H. (2023). Chloroplast DNA reveals genetic population structure in *Sinomenium acutum* in subtropical China. *Chinese Herbal Medicines*, 15(2), 278-283.
<https://doi.org/10.1016/j.chmed.2022.11.003>
 41. Holm, L.G., Pancho, J.V., Herbenger, J.P., & Plucknett, D.L. (1979). *A Geographical Atlas of World Weeds*. New York, USA: John Wiley & Sons.
 42. Holt, S. D. S., Horová, L., & Bureš, P. (2004). Indel patterns of the plastid DNA trnL–trnF region within the genus *Poa* (Poaceae). *Journal of Plant Research*, 117, 393–407. <https://doi.org/10.1007/s10265-004-0172-4>

43. Ivanovych, Y. I., Udovychenko, K. M., Bublyk, M. O., & Volkov, R. A. (2017). ISSR-PCR fingerprinting of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Cytology and Genetics*, 51, 40-47. <https://doi.org/10.3103/S0095452717010066>
44. Jafari, A., Vaezi, J., Forghanifard, M. M., & Forest, F. (2021). A revised infrageneric classification of *Bellevalia* Lapeyr. (Asparagaceae: Scilloideae) based on molecular analysis. *Phytotaxa*, 525(1), 070–084. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.525.1.9>
45. Kartavtsev, Y. P. (2021). Some examples of the use of molecular markers for needs of basic biology and modern society. *Animals*, 11(5), 1473. <https://doi.org/10.3390/ani11051473>
46. Kazi Tani, C. (2012). Une nouvelle espèce naturalisée en Algérie : *Galinsoga parviflora* Cav. *Poiretia*, 4, 17-24. <http://poiretia.maghreb.free.fr/>
47. Kucherenko, Y., Zviahintseva, A., Kobyzeva, L., Kolomatska, V., Makliak, K., Vasko, N., et al. (2022). Marker-assisted selection and use of molecular markers in sunflower breeding for resistance to diseases and parasites. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*, 38, 14-29. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2022-38-2>
48. Kumar, S., Kaushik, R. A., Jain, D., Saini, V. P., Babu, S. R., Choudhary, R., & Ercisli, S. (2022). Genetic diversity among local mango (*Mangifera indica* L.) germplasm using morphological, biochemical and chloroplast DNA barcodes analyses. *Molecular Biology Reports*, 49(5), 3491–3501. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07186-7>
49. Kurose, D., Pollard, K. M., & Ellison, C. A. (2020). Chloroplast DNA analysis of the invasive weed, Himalayan balsam (*Impatiens glandulifera*), in the British Isles. *Scientific reports*, 10(1), 10966. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67871-0>
50. Le, T. L., Jang, D. C., Anh, L., Pham, M., Le, H. D., Nguyen, T. H., Nguyen, V. K., Nguyen, T. H., Hoang, T. N., Vu, D. T., Bui, K., Vu, H., Dinh, T. H., Tran, A. T., Phan, T. T. H., Tong, V. G., Le, C., & Vu, N. T. (2024). Genetic diversity and population structure of *Canna edulis* accessions in Vietnam revealed by ISSR markers. *Vegetos*, 37(3), 1009-1018. <https://doi.org/10.1007/s42535-023-00633-1>

- 51.Li, G., Liu, G., & Liu, C. (2024). Comparative genomics of eight complete chloroplast genomes of *Phyllostachys* species. *Forests*, 15(10), 1785. <https://doi.org/10.3390/f15101785>
- 52.Li, X. C., Qi, S. Y., Yao, J., & Yang, L. (2015). Genetic diversity and differentiation of invasive plant *Galinsoga quadriradiata* populations in China. *Chinese Journal of Ecology*, 34(12), 3306-3312. <https://www.cje.net.cn/EN/Y2015/V34/I12/3306>
- 53.Liu, Q., Li, X., Li, M., Xu, W., Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, J. S. (2020). Comparative chloroplast genome analyses of *Avena*: insights into evolutionary dynamics and phylogeny. *BMC plant biology*, 20(406), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02621-y>
- 54.Liu, R. L., Yang, Y. B., Lee, B. R., Liu, G., Zhang, W. G., Chen, X. Y., Song, X. J., Kang, J. Q., & Zhu, Z. H. (2021). The dispersal-related traits of an invasive plant *Galinsoga quadriradiata* correlate with elevation during range expansion into mountain ranges. *AoB Plants*, 13(3), plab008. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plab008>
- 55.Mint Abdelaziz, S., Medraoui, L., Alami, M., Pakhrou, O., Makkaoui, M., Boukhary, O. M. S. A., & Filali-Maltouf, A. (2020). Inter simple sequence repeat markers to assess genetic diversity of the desert date (*Balanites aegyptiaca* Del.) for Sahelian ecosystem restoration. *Scientific Reports*, 10(1), 14948. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71835-9>
- 56.Mirzaei, S. (2021). Application of molecular markers in plant sciences; An overview. *Central Asian Journal of Plant Science Innovation*, 1(4), 192-200. <https://doi.org/10.22034/CAJPSI.2021.04.02>
- 57.Mohammed-ElSherif, G., Galal-Khallaf, A., Osman, A. G., Hassab El-Nabi, S. E., & Mohammed-Geba, K. (2020). Evaluating the use of the multilocus genetic marker “5S rDNA” for the discrimination of different species of family *Lethrinidae* in red sea, Egypt. *Egyptian Journal of Zoology (EJZ)*, 74(74), 22-29. <https://doi.org/10.21608/ejz.2020.33134.1035>
- 58.Morris, A. B., & Shaw, J. (2018). Markers in time and space: a review of the last

- decade of plant phylogeographic approaches. *Molecular Ecology*, 27(10), 2317-2333. <https://doi.org/10.1111/mec.14695>
59. Ng, W. L., & Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? *ASM Science Journal* , 9(1), 30-39.
 60. Nguyen, H. D., Do, H. D. K., & Vu, M. T. (2024). Comparative genomics revealed new insights into the plastome evolution of *Ludwigia* (Onagraceae, Myrtales). *Science Progress*, 107(3). <https://doi.org/10.1177/00368504241272741>
 61. Olsson, S., Giovannelli, G., Roig, A., Spanu, I., Vendramin, G.G., & Fady, B. (2022). Chloroplast DNA barcoding genes matK and psbA-trnH are not suitable for species identification and phylogenetic analyses in closely related pines. *iForest - Biogeosciences and Forestry*, 15(2), 141-147. <https://doi.org/10.3832/ifor3913-015>
 62. Panero, J. L. (2003). A New Species of *Galinsoga* (Asteraceae: Millerieae: Galinsoginae) from Northwestern Mexico. *Lundellia*, 2003(6), 148-151.
 63. Pérez de la Torre, M., García, M., Heinz, R., & Escandón, A. (2012). Analysis of genetic variability by ISSR markers in *Calibrachoa caesia*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(5), 8-8. <https://doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-8>
 64. Peterson, P. M., Romaschenko, K., & Soreng, R. J. (2014). A laboratory guide for generating DNA barcodes in grasses: a case study of *Leptochloa* s.l. (Poaceae: Chloridoideae). *Webbia: Journal of Plant Taxonomy and Geography*, 69(1), 1-12. <https://doi.org/10.1080/00837792.2014.927555>
 65. Poczai, P. & Hyvönen, J. (2011). Identification and characterization of plastid trnF^(GAA) pseudogenes in four species of *Solanum* (Solanaceae). *Biotechnology Letters*, 33(11), 2317–2323. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0701-x>
 66. Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in ecology & evolution*, 16(7), 351-358. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02187-5](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02187-5)
 67. 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(2).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13517>

68. Robarts, D. W., & Wolfe, A. D. (2014). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in plant sciences*, 2(7), 1400017. <https://doi.org/10.3732/apps.1400017>
69. Roman, M. G., Gangitano, D., & Houston, R. (2019). Characterization of new chloroplast markers to determine biogeographical origin and crop type of *Cannabis sativa*. *International journal of legal medicine*, 133(6), 1721-1732. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02142-w>
70. Safar, K. N., Osaloo, S. K., Maassoumi, A. A., & Zarre, S. (2014). Molecular phylogeny of *Astragalus* section *Anthylloidei* (Fabaceae) inferred from nrDNA ITS and plastid *rpl32-trnL*^(UAG) sequence data. *Turkish Journal of Botany*, 38(4), 637-652. <https://doi.org/10.3906/bot-1308-44>
71. Safhi, F. A., Alshamrani, S. M., Bogmaza, A. F. M., & El-Moneim, D. A. (2023). DNA barcoding of wild plants with potential medicinal properties from Faifa mountains in Saudi Arabia. *Genes*, 14(2), 469. <https://doi.org/10.3390/genes14020469>
72. Saidi, A., Eghbalnegad, Y., & Hajibarat, Z. (2017). Study of genetic diversity in local rose varieties (*Rosa* spp.) using molecular markers. *Banat's Journal of Biotechnology*, 8(16), 148-157. [https://doi.org/10.7904/2068-4738-VIII\(16\)-148](https://doi.org/10.7904/2068-4738-VIII(16)-148)
73. Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American journal of botany*, 94(3), 275-288. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.3.275>
74. Shi, W., Song, W., Liu, J., Shi, C., & Wang, S. (2023). Comparative chloroplast genome analysis of *Citrus* (Rutaceae) species: Insights into genomic characterization, phylogenetic relationships, and discrimination of subgenera. *Scientia Horticulturae*, 313, 111909. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111909>
75. Skuza, L., SzućKo, I., Filip, E., & Adamczyk, A. (2019). DNA barcoding in

- selected species and subspecies of Rye (*Secale*) using three chloroplast loci (matK, rbcL, trnH-psbA). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 54-62. <https://doi.org/10.15835/NBHA47111248>
76. Smith, A. L., Hodkinson, T. R., Villellas, J., Catford, J. A., Csergő, A. M., Blomberg, S. P. et al. (2020). Global gene flow releases invasive plants from environmental constraints on genetic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(8), 4218-4227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915848117>
 77. Sousa, A. G. R., Souza, M. M., Melo, C. A. F., & Sodr , G. A. (2015). ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 18534-18545. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.December.23.41>
 78. Thanh, L. D., Kim, H. H. T., & Thuy, T. L. L. (2022). Analysis genetic variation and phylogenetic relationships of local lotus collected in Thua Thien hue province, Vietnam by DNA barcoding. *Research Journal of Biotechnology*, 17(2). <http://dx.doi.org/10.25303/1702rjbt4856>
 79. Tian, Y., Liu, X., Xu, Y., Yu, B., Wang, L., & Qu, X. (2023). Comparative and phylogenetic analysis of *Asparagus meiocladus* Levl. and *Asparagus munitus* Wang et SC Chen plastomes and utility of plastomes mutational hotspots. *Scientific Reports*, 13(1), 15622. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42945-x>
 80. Uras, M. E., Filiz, E., Sen U., &  zyi it, I. I. (2024). Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Robinia pseudoacacia* L. populations using ISSR markers, ITS1 and trnL-F intergenic spacer sequences. *Journal of Forest Science*, 70(1), 1-13. <https://doi.org/10.17221/95/2023-JFS>
 81. Van der Meijden, R. (2005). *Heukels flora van nederland 23e druk*. Wolters-Noordhoff.
 82. Vijayan, K., & Tsou, C. H. (2010). DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current science*, 99(11), 1530-1541.
 83. Volkov, R. A., Borisjuk, N. V., Panchuk, I. I., Schweizer, D., & Hemleben, V. (1999). Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid

- Nicotiana tabacum*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(3), 311-320.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026112>
84. 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643548>
 85. 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.
<https://doi.org/10.1007/s12686-017-0771-8>
 86. Węgrzynek, B., Tokarska-Guzik, B., Trueman, I. C., & Cohn, E. (2007). *Galinsoga* species in Poland: History of spread and habitat preferences of two successful alien weeds. *Biological Invasions—From Ecology to Conservation*; Rabitsch, W., Essl, F., Klingenstein, F., Eds, 200-209.
 87. Wong, K.-H., Wu, H.-Y., Kong, B.L.-H., But, G.W.-C., Siu, T.-Y., Hui, J.H.-L., et al. (2022). Characterisation of the complete chloroplast genomes of seven *Hyacinthus orientalis* L. cultivars: insights into cultivar phylogeny. *Horticulturae*, 8(5), 453. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050453>
 88. Wróbel, A., Klichowska, E., Baiakhmetov, E., Nowak, A., & Nobis, M. (2021). Invasion of *Eragrostis albensis* in Central Europe: distribution patterns, taxonomy and phylogenetic insight into the *Eragrostis pilosa* complex. *Biological Invasions*, 23(7), 2305-2327. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02507-6>
 89. Yavorska, O. (2008). New records of some alien plants in the Kyiv urban area. *Visnyk of Lviv Univ. Biology Series*, 48, 44-48.
 90. Yi, R., Bao, W., Ao, D., Bai, Y. E., Wang, L., & Wuyun, T. N. (2023). Sequencing and phylogenetic analysis of the chloroplast genome of three apricot species. *Genes*, 14(10), 1959. <https://doi.org/10.3390/genes14101959>
 91. Yurkevich, O. Y., Samatadze, T. E., Selyutina, I. Y., Romashkina, S. I., Zoshchuk, S. A., Amosova, A. V., & Muravenko, O. V. (2021). Molecular cytogenetics of eurasian species of the genus *Hedysarum* L. (Fabaceae). *Plants*, 10(1), 89.

<https://doi.org/10.3390/plants10010089>

92. Zhai Qiang, Z. Q., Wang WeiBin, W. W., Qu Bo, Q. B., & Shao MeiNi, S. M. (2018). A supplementary study of two species of *Galinsoga* in the Liaoning Province. *Bulletin of Botanical Research*, 38(3), 338-342.
93. Zhang, C., Zhu, L., Wang, M., Tang, Y., Zhou, H., Sun, Q., Yu, Q., & Zhang, J. (2022). Evaluation of SRAP markers efficiency in genetic diversity of *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils in China. *Oil Crop Science*, 7(3), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2022.08.005>
94. 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. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1623106>
95. Zhu, S., Liu, Q., Qiu, S., Dai, J., & Gao, X. (2022). DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances. *Chinese Medicine*, 17(112), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00655-y>.
96. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.120145>
97. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.25299>

ДОДАТКИ

Охорона праці в галузі

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 пр

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.
4. У кожній лабораторії повинні бути списки небезпечних речовин.

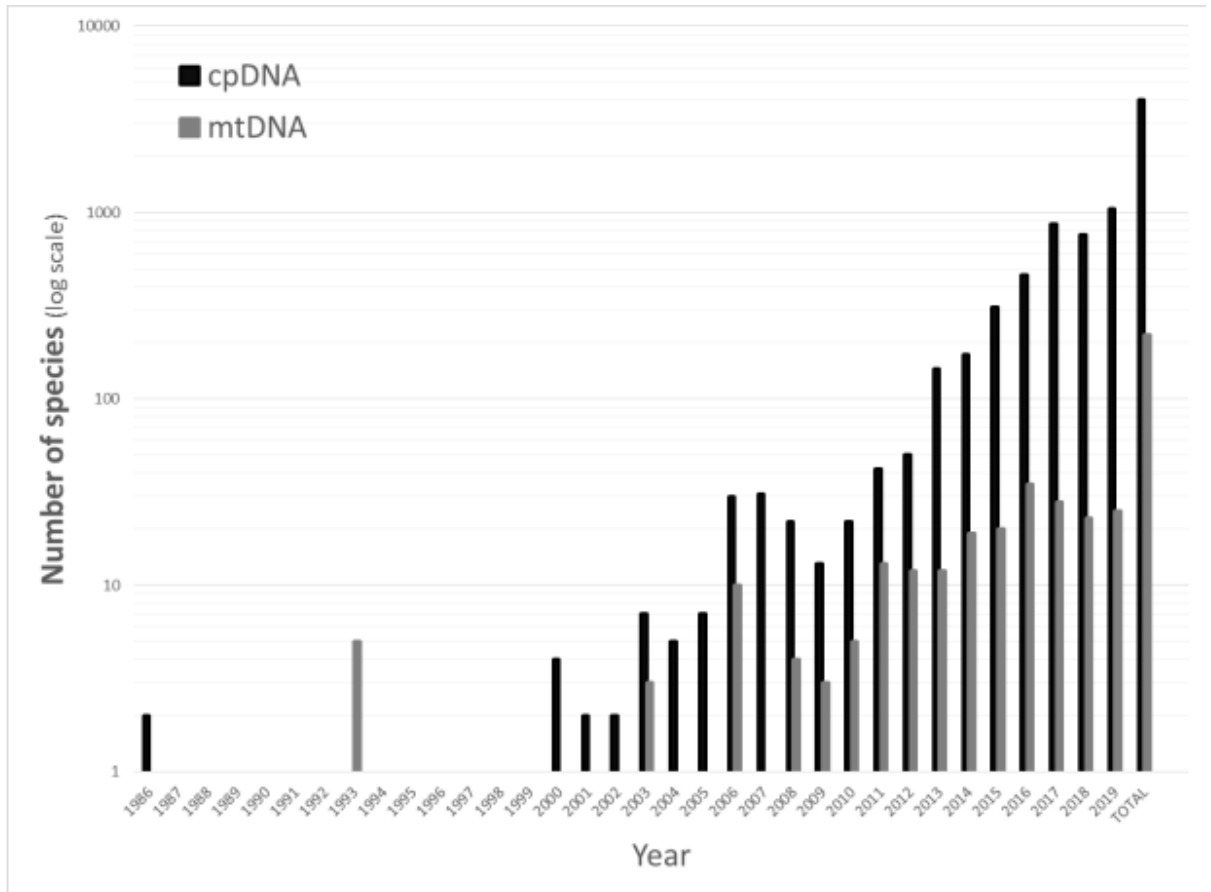


Рис. 1. Динаміка збільшення числа рослинних видів, для яких отримано повні послідовності мтДНК і хтДНК (Duminil & Besnard, 2021)

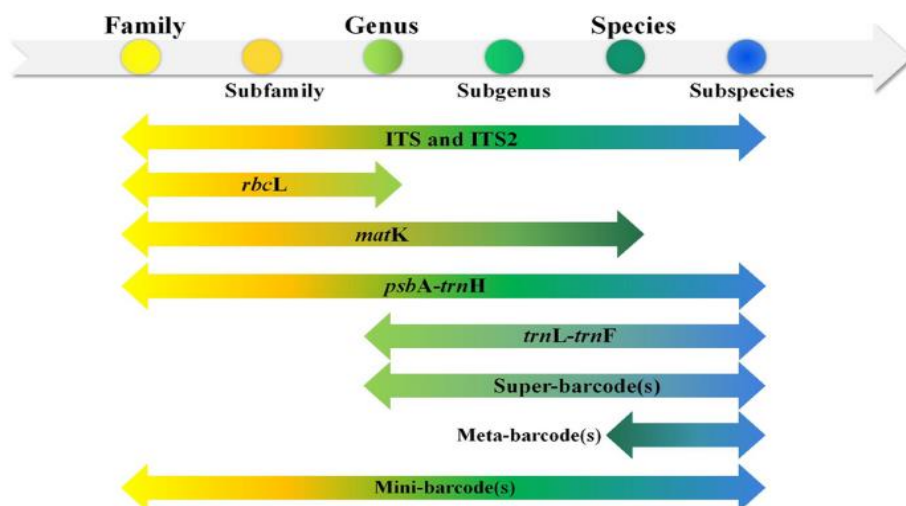


Рис. 2. Придатність методу ДНК-баркодингу на основі хлоропластних маркерів для ідентифікації рослин на різних таксономічних рівнях (Zhu et al., 2022)

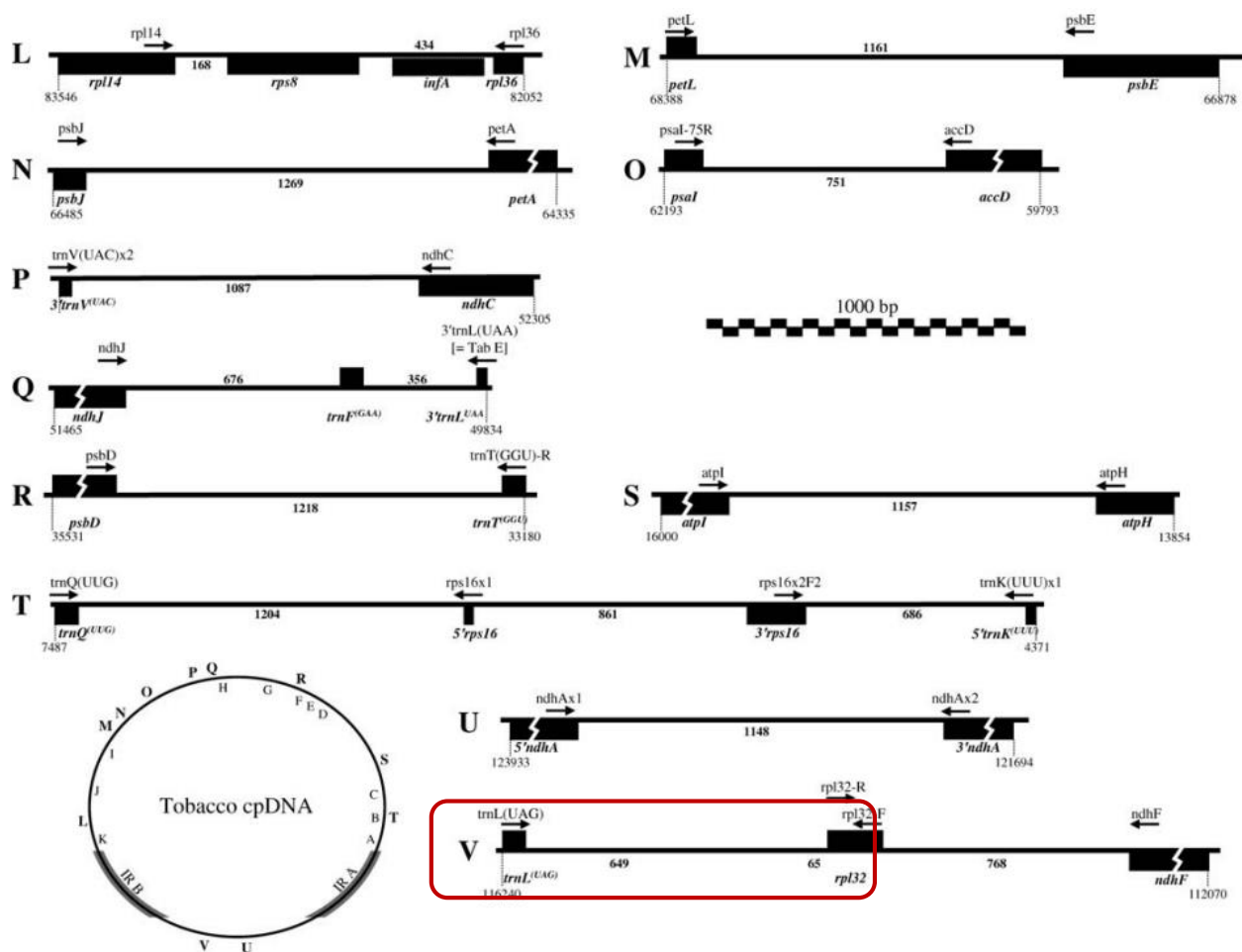


Рис. 5. Масштабована карта 13 некодувальних ділянок хлДНК, досліджених у цьому дослідженні (на основі геному хлоропласту тютюну). Орієнтація та відносьне розташування генів позначені літерами від L до V. Конкретні позиції кожної з 13 ділянок цього дослідження позначені цифрами на початку та в кінці кожної ділянки. Назви генів курсивом, а назви праймерів для ампліфікації та секвенування - прямим шрифтом зі стрілками напрямку. Довжини некодувальних ділянок вказані в центрі кожного міжгенного спейсеру та інтрону (Shaw et al., 2005)

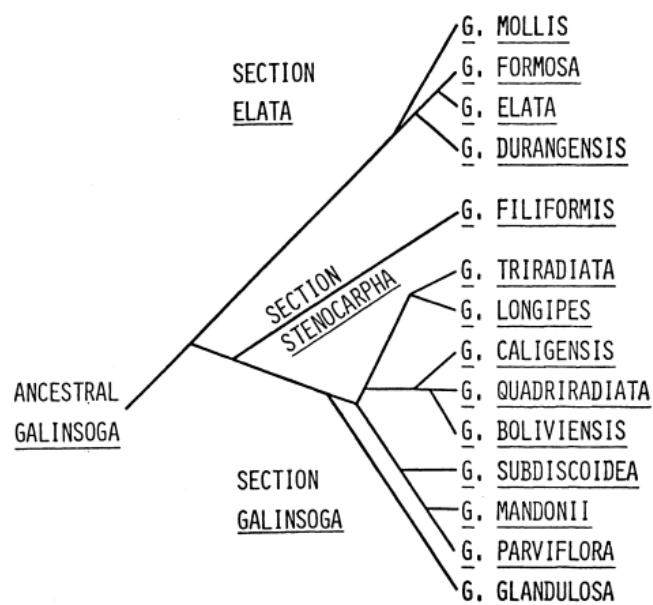


Рис. 6. Запропонований філогенез для *Galinsoga*. Кількість розгалужень вказує на відносний ступінь віддалення від предкової *Galinsoga* (Canne, 1977).

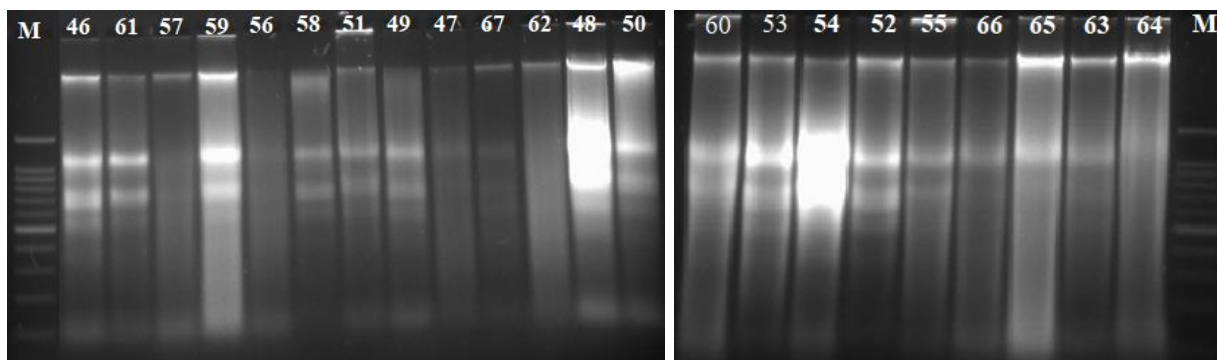


Рис. 7. Електрофореграма зразків ДНК в агарозному гелі у видів роду *Galinsoga*, де: 46-48, 52, 54, 56, 58, 61, 63-64, 66 – *G. parviflora*; 49-51, 53, 55, 57, 59, 60, 62, 65, 67 – *G. quadriradiata*

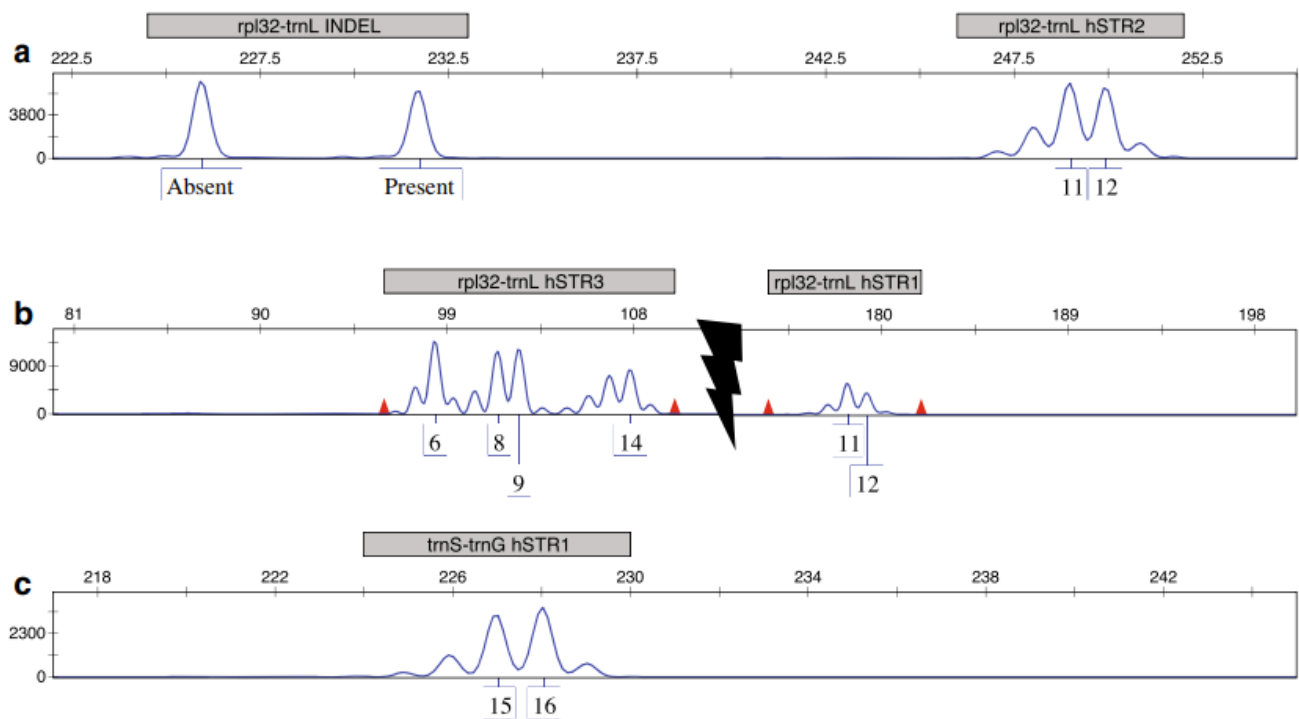


Рис. 8. Стандартні набори фрагментів ДНК відомої довжини (алельні драбини) для хлоропластних маркерів, де: а – rpl32-trnL INDEL та hSTR2, б – rpl32-trnL hSTR1 та hSTR3, в – trnS-trnG hSTR1 (Roman et al., 2019)

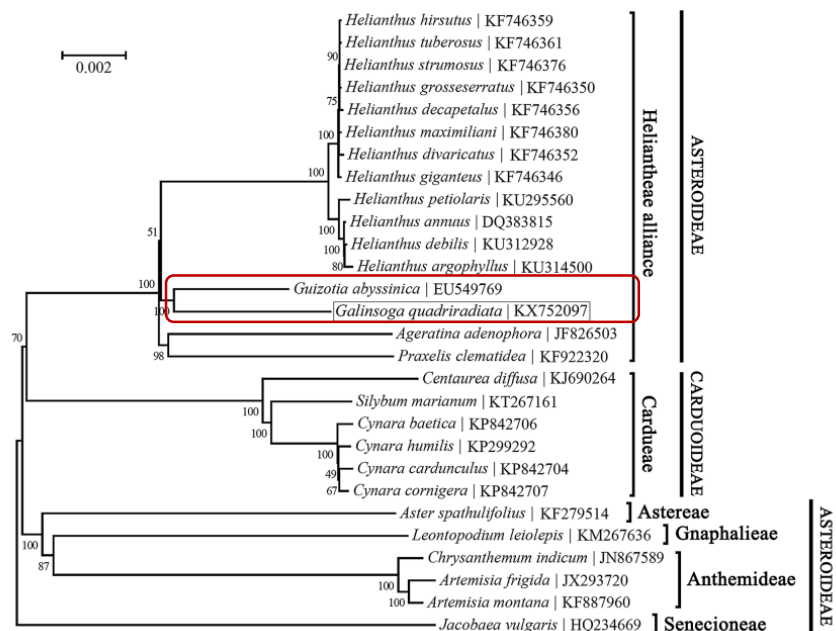


Рис. 9. Філогенетичні зв'язки 28 видів родини Asteraceae на основі аналізу сусідніх з'єднань (NJ) конкатенатних кодуючих послідовностей PCGs хлоропластів (Wang et al., 2018)

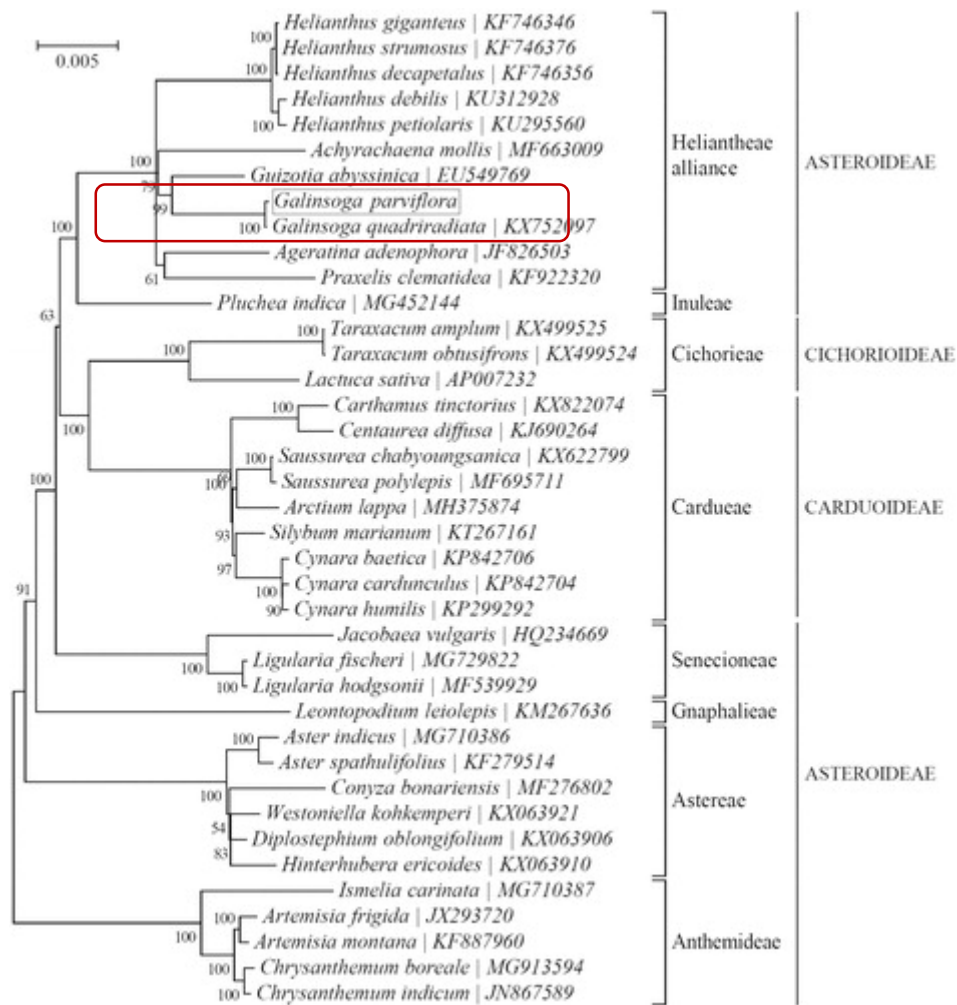


Рис. 10. Філогенетичне дерево побудоване за допомогою програми MEGA 7.0. Вид *Galinsoga parviflora* чітко групується з іншими видами роду *Galinsoga*, що підтверджує результати попередніх досліджень (Zhang et al., 2019).

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

МАТЕРІАЛИ
студентської наукової конференції
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

**НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ
БІОЛОГІЇ, ХІМІЇ ТА БІОРЕСУРСІВ**
16-18 квітня 2024 року



Чернівці
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича
2024

1	Валерія Адамкович. Оптимізація екстракції картопинок Rhodotorula minuta	3
2	Мар'яна Андрійків. Вміст оксиду азоту в печінці шурів після часткової гепатектомії на тлі токсичного ураження ацетамінофеном	5
3	Валентина Андрюк. Особливості вирощування Monogardidium sp. на середовищі BG-11	7
4	Анастасія Анфілофіва. Екосистемні послуги «Парку-скверу» (м. Чернівці, Соборна площа)	9
5	Павло Банар. Втрати медоносних бджіл у Чернівецькій області за три роки спостережень	11
6	Уляна Бачинська. Тематичні екскурсії – ефективний інструмент вчителя для підвищення рівня розумової діяльності учнів загальноосвітніх навчальних закладів при вивченні біології	13
7	Вікторія Бінкова. Азотетинові похідні метилового естеру п-амінобензойної кислоти	15
8	Катерина Блізнюк. Характеристика tnpI-tnpL спейсерної ділянки хлоропластного генома Galinsoga parviflora Cav. та G. quadriradiata Ruiz & Pav.	17
9	Владислав Бодян. Відновлення ґрунтів, ушкоджених унаслідок військових дій	19
10	Василь Бойчук. Бонітетна оцінка ґрунтів та сфери її застосування	21
11	Еріка Бойчук. Вискозиметрія сумішей гуарової та ксантанової камеді	23
12	Валерія Бринзіла. Динаміка вмісту супероксиду в мітохондріальній фракції печінки шурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії	25

National Academy of Sciences of Ukraine
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

XVIII All-Ukrainian Conference
of Young Scientists
May 21-22, 2024

BOOK OF ABSTRACTS

The conference is devoted to the heroic work
of Ukrainian scientists during the war

Kyiv 2024

Characterization of trnT-L and ITS1-5.8S rRNA-ITS2 sequences in
species of the genus *Galinsoga*

K.Blyzniuk, V.Shurypa, Yu.Tynkevich, A.Shelyfist
Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Biology,
Chemistry and Bioresources, Yuriy Fedkovych Chernivtsi National
University

blyzniuk.kateryna@chnu.edu.ua

Aim. Invasive plants pose a significant threat to biodiversity. Allochthonous species of the genus *Galinsoga* of the family *Asteraceae* (*Asteres*), *G. parviflora* Cav. and *G. quadriradiata* Ruiz & Pav., are abundant in Ukraine. They were imported to Europe from Central and South America. Traditional taxonomy uses morphological features, which are very similar in species of the genus *Galinsoga*. Consequently, the question of their systematic position remains unresolved. Molecular markers are successfully used in the study of evolutionary processes, particularly the phenomenon of invasion. This work aimed to study the nucleotide polymorphism of the trnT-L (cpDNA) and ITS1-5.8S-ITS2 (nrDNA) regions and estimate their potential for the DNA barcoding of invasive species of the genus *Galinsoga*. **Methods.** Three samples of *G. parviflora* were collected from various natural growth locations in the Chernivtsi region. DNA was extracted from herbarium samples using the Cetylavlon method. Intergenic spacer (IGS) of trnT-L and ITS1-5.8S-ITS2 regions were PCR amplified with universal primers complementary to the flanking regions of coding sequences. PCR products were purified and sequenced by Sanger at LGC Genomics (Germany). Comparative analysis was performed using DNA nucleotide sequences available in the GenBank database: *G. parviflora* (MH050163, MH050164), *G. quadriradiata* (OP824346), and *G. caliginosa* Ruiz & Pav. (OQ412026). The annotated sequences were aligned in the MegAlign program (Clustal W method). **Results.** We managed to sequence only the 5'-end fragment of the trnT-L spacer. Samples of *G. parviflora* and *G. quadriradiata* available in GenBank contain full IGS sequences. In general, the spacer region of trnT-L reaches 536 bp. It was found that all compared sequences of trnT-L contain an A-rich motif (13 bp) at position 225. The spacer region of trnT-L appears to be identical for all analyzed samples. Therefore, this part of the chloroplast genome is not suitable for DNA barcoding of *Galinsoga* species. The ITS1-5.8S-ITS2 region of the nuclear genome revealed minor differences. This area consists of three parts: two internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S rRNA gene. The nucleotide sequence of the 5.8S gene was identical in all compared samples. All identified SNPs were found in the spacer regions. ITS1 in all samples was 257 bp long. Two SNPs (at 121 and 230 bp positions of alignment) and one two-nucleotide substitution (at 12 bp) are present in the sample of *G. parviflora* (MH050164). The C→G transversion (at 230 bp) is also present in *G. parviflora* (MH050163). The size of ITS2 is 226 bp for all samples. *G. parviflora* (MH050163, MH050164) and *G. caliginosa* (OQ412026) contain one SNP each. **Conclusions.** Of the two regions analyzed, only ITS1-5.8S-ITS2 appears to be relatively polymorphic. An unexpected result is the identity of ITS1-5.8S-ITS2 sequences of Ukrainian samples of *G. parviflora* and a sample of *G. quadriradiata* from GenBank.

БЛИЗНЮК К.Г., ШУРІПА В.О., ШЕЛІФІСТ А.Є., ВОЛКОВ Р.А.

Чернівецький національний університет імені Юрія Філевського, Чернівці, Україна
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

ВИКОРИСТАННЯ ДІЛЯНКИ ITS1-5.8S-ITS2 ДЛЯ БАРКОДІНГУ ВИДІВ РОДУ *GALINSOGA*

Одна з актуальних проблем, вирішення яких потребують залучення молекулярних маркерів – це явище біологічної інвазії. Інвазійні рослини витісняють аборигенні види з їх природних місць зростання, що, в кінцевому рахунку, може призвести до їх повного зникнення, порушуючи рівновагу в екосистемах. Яскравим прикладом інвазії є струнне розповсюдження в Україні *Galinsoga parviflora* Cav. та *G. quadriradiata* Kunz & Ravn. (Asteraceae). Проблема ідентифікації видів цього роду ускладнюється значною морфологічною подібністю його представників.

Нуклеотидні послідовності внутрішніх транскрибованих спейсерів ITS1 та ITS2 між ділянками, які кодують 5.8S, 18S та 25S рРНК у складі ядерної 35S рДНК відомі високою ефективністю використання для ДНК-баркодингу рослин. Водночас, у кожному окремо взятому випадку необхідно перевіряти доцільність та ефективність застосування обраної ділянки для вирішення поставленої задачі.

Нами був проведений аналіз доцільності використання нуклеотидних послідовностей ділянки ITS1-5.8S-ITS2 (960 ITS1-2) при дослідженні генетичної різноманітності *G. parviflora* та *G. quadriradiata*. Для визначення на території Чернівецької області було відібрано по дві популяції кожного з цих видів. ЦПР-ампліфікати ділянки ITS1-2 для кожного зразку синтезували методом Пішпа. Для порівняльного аналізу використовували наведені у базі даних GenBank послідовності *G. quadriradiata* (GU318550), *G. parviflora* (F7696962, KY968894, MN050163, MN050164) та, в якості зовнішньої групи, *Seneciothus maculatus* (F7696963).

При побудові сітки філогенетичних кластерів на основі синтезованих нуклеотидних послідовностей ITS1-2 було виявлене наступне групування досліджуваних зразків. (1) Усі послідовності *G. parviflora* формують єдину компактну групу. (2) Рідні з геномів *G. quadriradiata* розподіляються між на п'ятьма групами, дві з яких (№ 1 та 5) локалізуються на сітці спільно із послідовностями *G. parviflora* та викопоподібні із ними та між собою, тоді як послідовності у складі трьох інших груп суттєво відрізняються від них. Для кожної із виявлених груп були генеровані консенсусні послідовності, які використовували у подальшому порівняльному аналізі. Встановлено, що консенсусні послідовності ITS1-2 *G. parviflora* та груп № 1 та 5 *G. quadriradiata* ідентичні між собою, а також зі деякими зразками, наведеними у базі даних GenBank. Найбільш віддалена група № 3 *G. quadriradiata* містить послідовності ITS1-2, які відрізняються від решти послідовностей *G. parviflora* численними нуклеотидними замінками в обох спейсерних ділянках. Пошук в базі даних GenBank не показав наявності ITS1-2, подібних до нього варіанту. Імовірно, у геномі *G. parviflora* ця група послідовностей з'явилась завдяки гібридизації з неідентифікованим видом рослини Астеркає, для якого ділянка ITS1-2 ще не проаналізована. Послідовності груп № 2 та 4 ITS1-2 із геномів *G. quadriradiata*, які збігаються на філогенетичній сітці, проміжне положення, імовірно мають рекомбінантне походження. На загал, отримані результати підтримують уявлення про гібридне походження *G. quadriradiata*.

Отримані результати свідчать про можливість застосування послідовностей ITS1-2 для баркодингу видів роду *Galinsoga* за умови більш глибокого аналізу їх внутрішнь-отомного різноманіття, що можливо за умови синтезування ЦПР-продуктів з використанням технологій наступного покоління (NGS), зокрема - методу Пішпа.

Близнюк, К.Г., Шуріпа, В.О., Шеліфіст, А.Є.,
Волков, Р.А. Використання ділянки ITS1-5.8S-
ITS2 для баркодингу видів роду *Galinsoga*.

Збірник тез конференції XIX Міжнародної
наукової конференції “Фактори

ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ УКРАЇНСЬКИХ ПОПУЛЯЦІЙ ІНВАЗІЙНИХ ВИДІВ РОДУ *GALINSOGA* ЗА ДОПОМОГОЮ ISSR-МАРКЕРІВЮ.О. ТИНКЕВИЧ¹, К.Г. БЛИЗНЮК¹, Я.І. ІВАНОВИЧ^{1,2}, Н.М. РОШКА¹,А.І. ТОКАРЮК¹, А.Б. ШЕЛІФСТ¹, Р.А. ВОЛКОВ^{1*}¹Черкаський національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Колумбівського, 2, 23012, Черкаси, Україна
²Кафедра ботаніки, мисливства та полювничих рослин, Шведський університет сільськогосподарських наук, Уппсала, Швеція

*e-mail: r.volkov@slu.se

Автор для кореспонденції – Волков Р.А., e-mail: r.volkov@slu.se

Для двох видів *Galinsoga*, *G. parryiflora* Cav. та *G. quadriradiata* Ruiz & Pav., належать до найбільш успішних інвазійних рослин, які завоювали субтропічні широти південних та субтропічних регіонів. Їх природний ареал простягається від Північної до Південної Америки, а адвективна частина ареалу охоплює всі материкові, острівні Антарктиди. Не дивлячись на величезну значущість *G. parryiflora* та *G. quadriradiata*, генетичне різноманіття європейських популяцій цих видів все ще залишається невідомим. В цій роботі ми використали ISSR маркери для дослідження українських популяцій *G. parryiflora* та *G. quadriradiata* та порівняли їх з результатами з туркменії Північної Америки та Португалії. Отримані результати засвідчують низьке генетичне різноманіття (індекс Шеннона $H' = 0.124$) популяцій *G. quadriradiata*, зрештою причому, чого не має бути малий розмір експлоататорської популяції, заповненої з Америки до Сходу Європи. Водночас, різноманітність різноманітності у популяціях *G. parryiflora* є суттєво вищою ($H' = 0.254$). Дані генетики *G. parryiflora* та *G. quadriradiata* мають внутрішню розбіжність та, в свою чергу, різні тенденції згуртування на спільній мережі. Отримані дані добре узгоджуються із гіпотезою про стосунок до батьківських видів як основних дисперсних агентів інвазійних видів роду *Galinsoga*. Серед досліджених українських екземплярів форм *G. parryiflora* та *G. quadriradiata* ми виявили походження від лісів між *G. parryiflora* та *G. quadriradiata* екзотичних насаджених зелених стовбурів з одним із батьківських видів.

Ключові слова: ботаніка, біологічне різноманіття, генетичний поліморфізм, молекулярна генетика, міжвидова гібридизація, молекулярні маркери.

Вступ. Рід *Galinsoga* родини *Asteraceae* (Астерові) включає в себе різні екзотичні види (PONS, 2024) або 15 (WFO, 2024) видів тропічних рослин. Природний ареал роду включає південну частину Північної Америки та Південну Америку, з включенням зони дощових лісів.

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2025

Найбільш інтенсивно природний ареал мають два види: *G. parryiflora* Cav. та *G. quadriradiata* Ruiz & Pav., які також є одними з найбільш успішних інвазійних видів рослин. На згаданих вище видів належать всі матеріали з Антарктиди (GBIF, 2024). Вважається, що поширення обох видів на території Європи пов'язане із стеченням з ботаничних садів, куди вони були завезені наприкінці 18-го сторіччя (Galenka and Sedaluk-Wojcikowska, 2010). Завезення обидвох рослин між ботаничними садами інвазійних рослин має відносно у висхідній частині почався майже одночасно у всіх частинах Європи. Оскільки екзотичним матеріалом, завезеним у Перу та Венесуелу, була переважно клонівність особин (Galenka and Sedaluk-Wojcikowska, 2010), можна очікувати низького генетичного різноманіття цих видів в американській частині їх ареалу. Проте, екологічно досвідченими показують диференціацію популяцій *G. quadriradiata* за темпами росту, заповненням азоту та конкурентоздатністю із місцевими видами (Zhang et al., 2024). Інвазійні види *Galinsoga* є небезпечними бур'янами, які можуть знижувати значні втрати врожаю для бобових, капуст, томатів та помідорів (Dimala, 2008). Вважається, що інвазійні *G. parryiflora* та *G. quadriradiata* є найбільш поширеними інвазійними видами на території України *G. parryiflora* досі зустрічається лише частіше. Частково це може пояснюється більш широким екологічним спектром *G. quadriradiata* (Fyfe et al., 1998). Проте, дані стосовно згуртованості варто трактувати із обережністю, адже ці види морфологічно дуже подібні і їх можна легко сплутати. Крім того, кожен вид може досягати значно ширшого діапазону морфологічної мінливості (Sala, 1977; Dimala, 2008). Зокрема, для *G. quadriradiata* було показано існування трьох морфо-

diversity in *Galinsoga officinalis* L. using ISSR and RAPD markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 59:865–872. <https://doi.org/10.1007/s10723-011-9737-0>

Ward SM, Reid SD, Hargreaves J, Sutton G, Beck KG (2008) Genetic variation in invasive populations of yellow toadflax (*Linaria vulgaris*) in the western United States. *Weed Sci.* 56(3):584–599. <https://doi.org/10.1614/WS-07-157.1>

WFO World Flora Online (2022) Available from: <http://www.worldfloraonline.org/> (accessed 14 August 2024)

Xu SZ, Li ZY, Gu XH (2018) DNA barcoding of invasive plants in China: A resource for identifying invasive plants. *Mol. Ecol. Resour.* 18(1):118–126. <https://doi.org/10.1111/1753-0998.12715>

Yang J, Tang L, Guo YL, Sun WB (2011) Genetic diversity of an alien invasive plant *Miconia radicans* (Zingiberaceae) in China. *Weed Sci.* 59(4):531–537. <https://doi.org/10.1007/s13765-011-0042-3>

Yevchenko O (2008) New records of some alien plants in the Kyiv urban area. *Vysnyk of Lviv Univ. Biology Series.* 48:44–48

Ye WH, Li F, Cao HL, Ge XT (2002) Genetic uniformity of *Abrus precatorius* in South China. *Weed Res.* 42(4):397–402. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2002.00248.x>

Ye WH, Ma HP, Cao HL, Ge XT (2004) Genetic structure of the invasive *Chromolaena odorata* in China. *Weed Res.* 44(3):129–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2004.00281.x>

Zhai Q, Wang WB, Qu B, Xiao MN (2018) A preliminary study of two species of *Galinsoga* in the Lingsha Province. *Bull. Bot. Res.* 28(3):328–342

Zhang Q, Ye JF, Li CT, Nijasa DM, Rahjasa NR, Onoluo WO, Li LM, Lin B, Chen ZD (2021) New insight into the formation of biodiversity hotspot of the Kanyas forest. *Divers. Distrib.* 26(12):1696–1711. <https://doi.org/10.1111/ddi.13854>

Zhang WG, Song X, Pei L, Lin G, Chen XY, Lin RL, Huang FF, Zou JB, Zhu ZH (2014) Elevated nitrogen and co-evolution history with competition shape the invasion process of *Galinsoga quadriradiata*. *J. Plant Ecol.* 17(4):me047. <https://doi.org/10.1093/jpe/ptu047>

Надійшло в редакцію
Після рецензування
Принято до друку 18.01.25