

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

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

**ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ УКРАЇНСЬКИХ
ПОПУЛЯЦІЙ ІНВАЗІЙНОГО ВИДУ *IMPATIENS*
PARVIFLORA ЗА ДОПОМОГОЮ ISSR-МАРКЕРІВ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

Студентка 4 курсу, групи 407

спеціальність 162 Біології та
біоінженерія

Грек Тетяна Сергіївна

Керівник:

Кандидат біологічних наук,
асистент **Тинкевич Ю.О.**

До захисту допущено:

на засіданні кафедри

протокол №__ від __ 2025 р.

зав. кафедри _____ проф. Волков Р.А.

Чернівці - 2025 р.

Анотація

Бакалаврська робота присвячена дослідженню генетичної мінливості інвазійного виду *Impatiens parviflora* DC за допомогою ISSR-маркерів.

Impatiens parviflora DC. є одним із найбільш успішних видів інвазійних рослин у Центральній Європі. З використанням ISSR-маркерів здійснено баркодинг 29 зразків *I. parviflora*. Встановлено, що поліморфізм цього інвазійного виду на території України є низьким. Два основні генетичні варіанти поширені по всій дослідженій частині ареалу.

Робота була виконана у 2024-2025 роках на базі кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету.

Обсяг роботи складає 43 сторінку і включає 6 таблиць та 11 рисунків. У роботі використано 43 літературних джерел.

Ключові слова: біорізноманіття, генетичний поліморфізм, інвазійні види, молекулярні маркери, *Impatiens*

Abstract

The bachelor's thesis is devoted to the study of genetic variability of the invasive species *Impatiens parviflora* DC using ISSR markers.

Impatiens parviflora DC. is one of the most successful invasive plant species in Central Europe. Using ISSR markers, 29 samples of *I. parviflora* were barcoded. It was found that the polymorphism of this invasive species in Ukraine is low. The two main genetic variants are distributed throughout the studied part of the range.

The work was carried out in 2024-2025 at the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of Chernivtsi National University.

The thesis is 43 pages long and includes 6 tables and 11 figures. 43 literature references were used in this assignment.

Keywords: biodiversity, genetic polymorphism, invasive species, molecular markers, *Impatiens*

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	5
1.1. Загальна характеристика роду <i>Impatiens</i> L.....	5
1.2. <i>Impatiens parviflora</i> , як інвазивна рослина	7
1.3. Застосування молекулярно-генетичних маркерів для дослідження гібридизації рослин.....	9
1.4. Використання ISSR-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму	14
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	17
2.1 Матеріали дослідження	17
2.2. Методи досліджень	20
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	26
ВИСНОВКИ	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	39
ДОДАТКИ.....	44

ВСТУП

Екологічні зміни, спричинені біотичною інвазією, були визначені як зростаюча загроза глобальній стійкості. Інвазивні чужорідні види рослин вважаються одним з основних чинників втрати біорізноманіття і, таким чином, порушення екосистеми та соціально-економічних умов через різні механізми. (Rai & Singh, 2020). Особливу увагу в цьому контексті привертає *Impatiens parviflora* DC. (розрив-трава дрібноквіткова) - один із найуспішніших інвазійних видів в Європі, який активно поширюється і в Україні.

Широкі дослідження *I. parviflora* почалися задовго до початку молекулярних методів популяційних досліджень. До цього часу *I. parviflora* залишається одним з найменш генетично досліджених інвазивних чужорідних видів рослин у світі. З'ясування рівня генетичної різноманітності та структури популяцій цього виду є ключем до розуміння його адаптивного потенціалу, шляхом міграції.

Молекулярно-генетичні маркери, зокрема ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), є ефективним інструментом для вивчення популяційної структури видів, які не мають повної геномної характеристики. Вони дозволяють швидко, недорого та з високою точністю виявити внутрішньовидову генетичну варіабельність та оцінити ступінь поліморфізму між популяціями (Hailu and Asfere, 2020).

Метою цього дослідження була оцінка генетичного різноманіття українських популяцій *I. parviflora* за допомогою ISSR-маркерами.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика роду *Impatiens* L.

Рід *Impatiens* L. – це великий рід родини бальзамінові (Balsaminaceae), який налічує більше 1100 видів однорічних і багаторічних трав'янистих рослин (POWO, 2024; WFO, 2024).

Impatiens L. поширений переважно в тропічних та субтропічних регіонах Азії та Африки, а також кілька інших видів поширені в помірних регіонах Азії, Європи та Північної Америки (POWO, 2024). Зокрема на Європейському континенті зустрічаються дев'ять видів, а в Україні зафіксовано п'ять видів, з них тільки один аборигенний вид, природний ареал якого поширюється на Європу – *Impatiens noli-tangere* L. (Давидов, 2023; POWO, 2024). Зокрема одним із найбільш успішних інвазивних рослин у Центральній Європі вважається *Impatiens parviflora* DC.

Рослини роду *Impatiens* L. мають різноманітне забарвлення квіток, рясне цвітіння та унікальні типи квіток, частина з них культивуються як декоративні та лікарські (Uchneat, 2007; Pires et al., 2021; Chen et al., 2024).

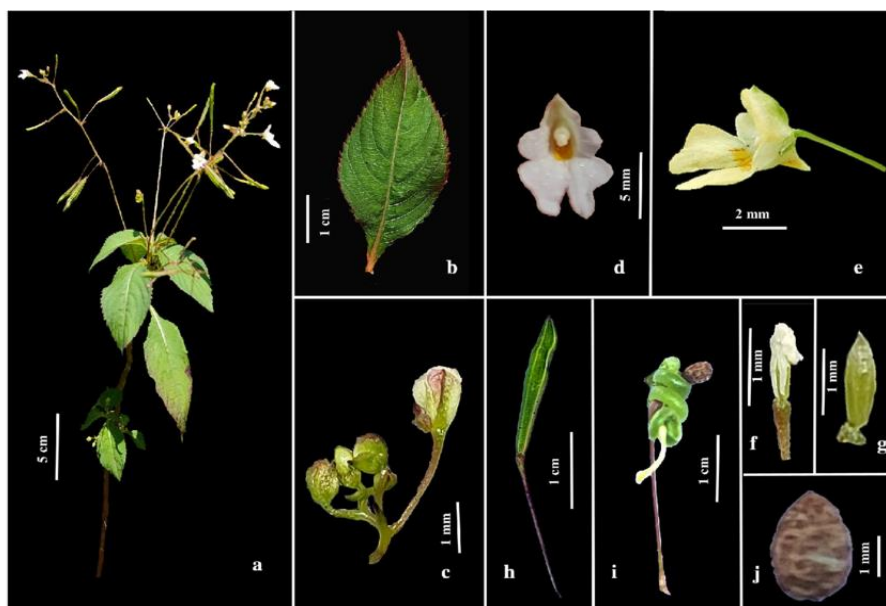


Рисунок 1. Загальна характеристика *Impatiens parviflora* DC. а – Габітус рослини;

b – листя; c – квіткові бруньки; d – вигляд спереду квітки; e – вигляд збоку квітки; f – андроцея; g – маточка; h – плід; i – розколотий плід з насінною; j – насіння (Thakur et al., 2023b)

Impatiens parviflora – це однорічна, гола, заввишки зазвичай 20-60 см, висота рослини може бути до 10 см, а іноді й до 150 см заввишки. Коренева система неглибока, бічні корені ростуть сильніше, ніж головний, а стебло часто утворює додаткові корені. Стебло пряме, голе, напівпрозоре, розширюється у вузлах. Вільно стоячі рослини можуть сильно гілкуватися, але рослини в скупченнях популяціях зазвичай не гілкуються. Нижня частина стебла зазвичай нерозгалужена, верхня – розгалужена, з листям блідо-зеленого кольору, а в сонячних місцях – з відтінком червоного кольору. Листки розташовані спіралью, але два найнижчі листки стоять навпроти. Листки мають черешок, довжина черешків поступово зменшується до верхівки стебла, на найнижчих він може досягати 4 см, а на верхніх лише близько 0,5 см. Листки 3-17 см завдовжки і 4-8 см завширшки, яйцеподібні, еліптичні або широколанцетні.

Основа листків клиноподібна, верхівка загострена або гостра, краї пилчасті, кількість пилок з обох боків становить 13-35 штук. Оцвітина – верхівкова китиця, яка зазвичай несе 4-15 листочків. Листочки зигоморфні, 7-15 мм завдовжки, корольок блідо-жовтий, іноді білий, а зів темно-жовтий з тонкими червоними візерунками. Серед п'яти чашолистків два передніх редуковані, два бічних – рудиментарні, зелені, близько 3 мм завдовжки. Задній чашолисток такого ж кольору, як і пелюстки, утворює прямий відросток 5-10 мм завдовжки. Віночок непарноперистий, бічні та задні пелюстки попарно зрослися, а передня пелюстка велика, може досягати 10 мм завдовжки. тичинки стоять по чергові з пелюстками, оцвітина вільно стоїть, пиляки зростаються. маточка утворена п'ятьма плодолистками, зав'язь вища, коробочки 15-25 мм завдовжки, голі, довгасто-ключцеподібні. Насіння коричневе, 3-5 мм завдовжки (Csiszár and Bartha, 2008; Tanner, 2022;

Thakur et al., 2023b; WFO, 2024).

1.2. *Impatiens parviflora*, як інвазивна рослина

Явище інвазії вважається одним із найнебезпечніших процесів, що становлять загрозу для сільського та лісового господарств, охорони здоров'я та світової економіки (Wilcove et al., 1998; Coakley & Petti, 2021). Інвазивні види є другою найбільшою загрозою для біорізноманіття, здатною змінити функціонування екосистем. Вони здатні проникати в природні екосистеми та витіснити нативні види (Schmidt et al., 2012b; Krokaitė et al., 2022b).

Вивчення інвазивних видів, таких як *Impatiens parviflora*, а також всі аспекти їх впливу на екосистему, є критично важливим для розробки ефективних стратегій боротьби та реабілітації територій, що зазнали інвазії.

В екології інвазії порушення вважається ключовим фактором, що сприяє проникненню інтродукованих видів у різні біотопи. Вважається, що непорушні ліси з щільним пологом виявляє високу стійкість до рослинних інвазій. Однак, більше 130 видів рослин вторглися в лісові екосистеми в помірних та тропічних регіонах світу (Martin et al., 2008). Одним з таких інвазивних видів є розрив трава дрібноквіткова *Impatiens parviflora* (Renčo et al., 2024).

Impatiens parviflora вважається одним із найбільш успішних інвазійних рослин у Центральній Європі, а також був інтродукований в Північну Америку. Його природній ареал включає Північно-Східну та Центральну Азію (POWO, 2024).

У межах інвазивного ареалу *I. parviflora* здебільшого проявляє себе як рудеральний бур'ян, однак також демонструє і унікальні серед інших інвазійних рослин можливості проникати у сталі, багаті видами фітоценози (Chmura and Sierka, 2006; Florianová and Münzbergová, 2018). Також успішно проникає у лісові екосистеми, де, як вважається, може конкурувати із аборигенним для Європи *I. noli-tangere* (Godefroid and Koedam, 2010; Dostál et

al., 2012; Renčo et al., 2024).

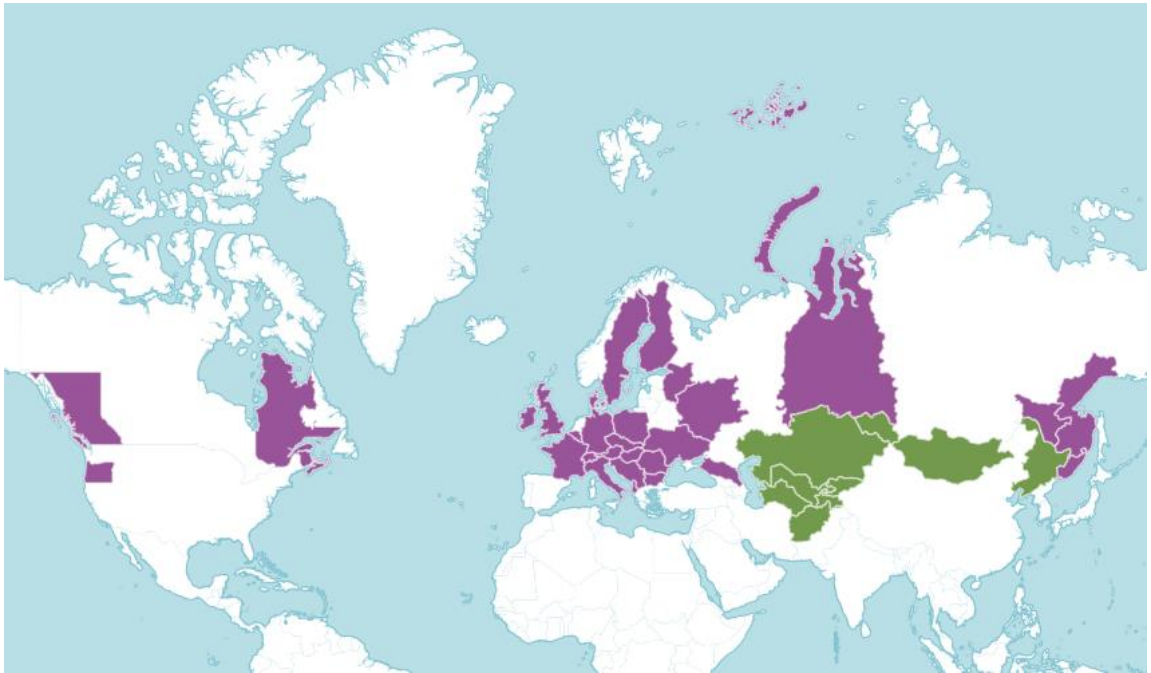


Рисунок 2. Карта походження виду *Impatiens parviflora* (POWO, 2024)

У 1831 році *I. parviflora* була культивована в ботанічному саду Женеви і протягом наступних кількох десятиліть її зафіксували як втечу в багатьох країнах Європи, часто поблизу ботанічних садів, таких як Женева, Відень, Прага, Тарту, Кенігсберг та Берлін (Galera and Sudnik-Wójcikowska, 2010; Weiss, 2021). Існує ймовірність, що усіх ботанічних садах, звідки почалася інвазія *I. parviflora*, були інтродуковані рослини з одного походження із високогірних регіонів Центральної Азії (Coombe 1956; Weiss, 2021; Vervoort et al., 2011). У зв'язку з цим, європейські популяції *I. parviflora* є однорідними за своїми морфологічними характеристиками, на відміну від помітного поліморфізму, який спостерігається в межах природного ареалу цього виду. Існує безліч переконливих свідчень щодо характеру подальшої випадкової інвазії *I. parviflora* (Coombe, 1956; Galera and Sudnik-Wójcikowska, 2010).

Міжвидова гібридизація *I. parviflora* в інвазійній частині ареалу є обмеженою через відсутність близькоспоріднених видів, оскільки єдиний аборигенний вид роду *Impatiens* в Європі, *I. noli-tangere*, належить до

філогенетично віддаленої групи (Yu et al., 2016). Проте, аналіз послідовностей ITS 35S рДНК у представників популяції *I.parviflora* з кантону Тічино в Швейцарії, які мають аномальні морфологічні ознаки, виявив їх гомоплоїдну гібридну природу. У цьому випадку другим батьківським видом став ще один інвазійний вид роду *I.balfourii* Hook.f., який є філогенетично близьким до *I.parviflora* (Van Valkenburg et al., 2019). Хоча цей вид лише починає інтегруватися в європейську флору, гібридизація з ним може стати важливим чинником підвищення генетичного поліморфізму *I.parviflora* в цьому регіоні (Schmitz and Dericks, 2010).

Генетичні дослідження українських популяцій *I.parviflora* ще не проводилися, хоча їхня поширеність і загроза для природних екосистем роблять такі дослідження надзвичайно важливими. Для ідентифікації близькоспоріднених форм, уточнення їх таксономічного статусу та вивчення міжвидової гібридизації успішно використовують високомінливі ділянки ядерного геному, зокрема IGS 5S рДНК (Rusak et al., 2016; Ishchenko et al., 2020) та ITS1-2 35S рДНК (Kolter and Gemeinholzer, 2021). Проте, для дослідження рослин із недостатньо вивченою генетикою та геномікою є методи генетичного профілювання.

1.3. Застосування молекулярно-генетичних маркерів для дослідження гібридизації рослин

Молекулярно-генетичні методи дослідження гібридизації у рослин дозволяють детально аналізувати генетичні зміни та взаємодії, що відбуваються під час схрещування різних видів рослин. Ці методи включають різноманітні технології, які використовуються для виявлення, ідентифікації та аналізу генетичного матеріалу, що сприяє розумінню механізмів успадкування генетичної різноманітності та еволюційних процесів.

Доцільно використовувати молекулярні маркери для дослідження гібридизації та інтрогресії.

Молекулярний маркер — це послідовність ДНК, яка має відоме місце розташування на хромосомі, або ген, фенотипічний прояв якого часто легко визначити і використовується для виявлення особини, або як зонд для маркування хромосом, ядра або локусу (Hailu and Asfere, 2020).

Молекулярні маркери використовуються для розрізнення генотипічних відмінностей у межах одного виду або між різними видами, якщо існують поліморфізми в маркерних нуклеотидних послідовностях. Поліморфізми можуть виникати через різні типи мутацій ДНК, такі як заміни нуклеотидів, вставки, видалення, дуплікації, транслокації, інверсії та помилки в реплікації тандемно повторюваних ділянок ДНК (Amiteye, 2021).

Молекулярні маркери можна класифікувати на три групи:

1. Маркери, що базуються на ДНК-гібридизації, такі як поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (RFLP).
2. Маркери, що базуються на ПЛР, такі як випадкове ампліфіковане поліморфне ДНК (RAPD), поліморфізм довжини ампліфікований фрагментів (AFLP) та мікросателіти або прості повтори послідовностей (SSR).
3. Маркери, що базуються на послідовності, наприклад, однонуклеотидний поліморфізм (SNP) (Yang et al., 2020).

RFLP

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (RFLP) є молекулярним методом, який використовується для розрізнення ДНК шляхом виявлення поліморфізмів у сайтах розпізнавання рестрикційних ендонуклеаз. Рестрикційні ендонуклеази — це ферменти, що розпізнають та розрізають специфічні нуклеотидні послідовності ДНК. Рослини здатні точно та швидко реплікувати свою ДНК, але на неї впливають різноманітні механізми, що викликають зміни (мутації). Це призводить до змін у основних парах через інверсії, транслокації, транспозиції або делеції, що може спричинити втрату

або набуття сайтів розпізнавання. У результаті утворюються фрагменти ДНК різної довжини (Hailu and Asfere, 2020).

Відокремлені фрагменти ДНК переносять на нітроцелюлозну мембрану за допомогою методу Саутерн блотингу. Рестрикційні ферменти не розрізають фрагмент ДНК, якщо в сайті розпізнавання присутня варіація однієї основної пари. Якщо ж така точкова мутація присутня на одній хромосомі, але відсутня на іншій, це називається гетерозиготністю за маркером, оскільки обидві смуги будуть присутні (Agarwal et al., 2008).

RAPD

Випадкова ампліфікована поліморфна ДНК (RAPD) вважається найпоширенішим типом молекулярних маркерів у наукових дослідженнях. RAPD засновані на ПЛР ампліфікації випадкових фрагментів ДНК з використанням праймерів випадкової нуклеотидної послідовності, що є недорогими та простими у використанні методом. В цій методиці застосовуються короткі праймери довжиною 10 нуклеотидів випадкової послідовності. Ці олігонуклеотиди використовуються як прямі, так і зворотні праймери. Праймери зв'язуються з комплементарними послідовностями ДНК, і коли два праймери зв'язуються з ДНК-зразком на достатній відстані для успішної ПЛР-реакції, ампліфіковані продукти ДНК візуалізуються на гелелектрофорезі. Поліморфізм оцінюється за наявністю або відсутністю смуг (Hailu and Asfere, 2020).

AFLP

Метод ампліфікованого поліморфізму довжин фрагментів (AFLP) поєднує методи RFLP та ПЛР, при цьому до фрагментів ДНК, отриманих шляхом рестрикційного розщеплення, приєднуються праймери для розпізнавання послідовностей. Ця техніка не вимагає інформації про послідовність нуклеотидів, а базується на ампліфікації селективних рестрикційних фрагментів, до яких були ліговані адаптери. Праймер складається з двох частин: довшої фіксованої частини (комплементарної і

специфічної до адапторної області на 5'-кінці) і короткої частини з 2-3 випадкових нуклеотидів (на 3'-кінці), які беруть участь у селективній ампліфікації рестрикційних фрагментів ДНК (Ramesh et al., 2020).

SSR

Прості повтори послідовностей (SSR) є випадковими тандемними повторами коротких нуклеотидних послідовностей (2-6 пар нуклеотидів).

Мікросателіти є поліморфними, дуже короткими нуклеотидними послідовностями, які успадковуються кодомінантно і багаторазово повторюються в ядерному геномі. Вони можуть бути використані для вирішення питань, що стосуються генетичної різноманітності. Оскільки секвенування наступного покоління (NGS) стало більш доступним, ідентифікація та характеристика видоспецифічних мікросателітів зараз відбувається швидше і вимагає менших зусиль (Jaskulak et al., 2022).

SNP

Однонуклеотидні поліморфізми (SNP) включають заміну одного нуклеотиду на інший або додавання чи видалення одного або кількох нуклеотидів. Деякі SNP знаходяться в кодуючих ділянках, які безпосередньо впливають на функцію білка. SNP успадковуються стабільніше, ніж мікросателіти. SNP більш придатні, ніж мікросателіти, для високопродуктивного генетичного аналізу за допомогою технології ДНК-мікрочипів.

Також для дослідження філогенетичних зв'язків широко використовується маркери на основі органел, наприклад:

Хлоропластні гени: повні послідовності хлоропластних геномів, доступні для багатьох родів, забезпечують зручну основу для дослідження варіабельних ділянок на низьких таксономічних рівнях. Визначення варіабельних локусів у хлоропластному геномі має важливе значення для молекулярної систематики та застосування ДНК-баркодинг. У філогенетичних дослідженнях широко застосовуються такі гени хлоропластів: *atpB*, *atpB-rbcL*, *matK*, *matF*, *rbcL*,

rbl16, *trnH-psbA*, *trnL-F*, *trnS-G* та інші (Dar et al., 2019). Ці маркери успішно використовували для філогенетичного аналізу таких квіткових рослин, як *Atomum*, *Carex*, *Meteoriaceae*, *Cycadales*, *Compsonuera*, *Panax*. Вважається, що найперспективнішими ділянками хлоропластного геному є *matK* і *trnH-psbA* (Dong et al., 2012). Ген *matK* визначено одним із найбільш універсальних маркерів, оскільки він корисний для ідентифікації на рівні родини, роду та виду (Dunning & Savolainen, 2010; J. Yu et al., 2011). Ген *trnH-psbA* характеризується високою варіабельністю в межах багатьох таксономічних груп (Whitlock et al., 2010).

Мітохондріальні гени: мтДНК, відокремлена великими ділянками некодуючої ДНК, активно використовується в дослідженнях на видовому рівні у філогенетиці та популяційній генетиці. Один із ключових генів – цитохромоксидаза (CO), що є частиною електронно-транспортного ланцюга. Цей ген характеризується відносно повільними темпами еволюційних змін порівняно з іншими генами мітохондрій і часто використовується для побудови філогенетичних дерев. Зокрема, гени COI та COII застосовуються для дослідження видового рівня та внутрішньопопуляційної варіативності (Dar et al., 2019).

Ядерні рибосомні гени: Гени рибосомної РНК, що кодують 5S, 5.8S, 18S і 26S рибосомну РНК (35S рДНК), повсюдно поширені в рослинах і характеризуються консервативними послідовностями, які організовані в масиви, що містять від сотень до тисяч тандемних повторів в одному або кількох геномних локусах. Завдяки своїм міжгенним (IGS) і внутрішньо транскрибованим спейсерам (ITS), що швидко розходяться, локуси рДНК стали популярними таксономічними маркерами, що виявляють алополіплоїдію та міжвидову гібридизацію в рослин (Garcia et al., 2020).

1.4. Використання ISSR-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму

Щоб ефективно протидіяти поширенню інвазивних видів на нові території, необхідно володіти глибокими знаннями як у традиційній, так і в сучасній біології (Tokarska-Guzik et al., 2010). Молекулярно-генетичні маркери, можуть бути корисними у дослідженні екологічних процесів, таких як колонізація, розселення та взаємодія між видами (Nybom et al., 2014). Генетичні дані здатні надати важливу інформацію щодо походження, шляхи поширення та механізм розповсюдження чужорідних організмів. Зростає розуміння необхідності поєднання екологічного та генетичного підходів у вивченні біологічних інвазій, адже ці дисципліни взаємопов'язані (Handley et al., 2011). Інформація про генетичну структуру інвазивних популяцій є ключовою для з'ясування чинників, що впливають на успішність поширення чужорідних видів. Крім того, глибше розуміння цих явищ необхідне для формування ефективних стратегій управління біологічними вторгненнями. Молекулярні маркери відрізняються кількістю фрагментів на праймер, ступенем поліморфізму фрагментів на праймер. SSR-локуси – це прості дво- або тринуклеотидні повтори з вищою частотою мутацій, ISSR-маркери охоплюють області між інвертованими SSR-повторами, тоді як RAPD пов'язані з анонімними послідовностями, розкиданими по всьому геному (Younis et al., 2020; Krokaitė et al., 2022). При вивченні близькоспоріднених генотипів аналіз мінливості є більш інформативним при застосуванні декількох методів.

Порівняно з іншими маркерами, ISSR мають низку переваг:

- прості в використанні
- специфічні
- універсальні для різних груп рослин
- відносно дешеві

Ці маркери виявилися дуже перспективними як метод з'ясування зв'язків між особинами в межах та між популяціями. Зокрема, ISSR використовувалися для оцінки генетичного різноманіття *Alliaria petiolate*, масштаби інвазії якого в Північній Америці подібні до поширення *Impatiens parviflora* в Європі.

Отже, міжмікросателітні послідовності (ISSR) – це ділянки геному, обмежані з двох боків мікросателітними послідовностями. ПЛР-ампліфікація цих ділянок з використанням одного праймера дає продукти ампліфікації, які можна використати як домінантні мультилокусні маркерні системи для вивчення генетичної варіабельності різних організмів. ПЛР-ампліфікація з ISSR праймерами дещо відрізняється від звичайної ПЛР, яка передбачає використання пари різних праймерів, ПЛР з ISSR використовується тільки один праймер у кожній реакції, тобто цей праймер виконує роль як «прямого», так і «зворотного» праймера (Ng & SG, 2015; Nailu and Asfere, 2020).

При аналізі електрофореграм видимі смуги вважаються домінантними маркерами й відповідають генетичним локусам із двома можливими алелями: 1 – наявність і 0 – відсутність. Це поняття не слід плутати з класичним домінуванням у менделівських моделях спадковості. Домінантний алель у системі домінантних маркерів може відповідати як гетерозиготному, так і гомозиготному генотипу для певної ділянки, де зв'язується праймер (Tsumura et al., 1996; Wolfe, 2005).

ISSR-метод є корисним інструментом для оцінки генетичного різноманіття, ідентифікації рослин. Вони були успішно застосовані в низці досліджень, наприклад, Choudhary et al. (2013) дослідили 38 зразків *Cicer arietinum*, 6 зразків *C. reticulatum* та 4 зразки *C. echinospermum* з використанням 31 ISSR-маркера. Результати показали помірний рівень різноманіття в межах зразків із середнім значенням PIC 0,125. Кластерний аналіз та аналіз основних компонент виявив чітку диференціацію між дикорослими та культурними зразками.

Motawea et al. (2015) виявили зв'язок між ISSR-маркерами та фенотиповими ознаками у 20 сортів пшениці в умовах посухи. Значення поліморфізму варіювалися від 0,08 до 0,28. Виявлено значні регресійні залежності таких ознак, як висота рослин та маса зерна, за умов зрощення, що підкреслює ефективність ISSR-маркерів у селекції.

Su et al. (2017) використали ISSR-маркери для оцінки генетичного різноманіття 102 генотипів олійної культури *C.brevistyla*. Кластерний аналіз розділив зразки на 7 груп, а аналіз дисперсії показав, що 75% варіацій припадає на внутрішньопопуляційний рівень.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Матеріали дослідження

Зразки *I. parviflora* були зібрані в межах шести областей Західної та Центральної України, а також у Польщі (табл. 1). Видову належність встановлювали за традиційними морфологічними ознаками.



Рисунок 3. Зовнішній вигляд рослини *Impatiens parviflora*

Таблиця 1.

Географічне походження зразків *I. parviflora*

Назва зразку	Походження зразку	GPS координати
ImPar27	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	48.299418, 25.925950
ImPar28	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	48.299418, 25.925950
ImPar29	м. Львів, Львівська обл., Україна	49.835959, 24.022222
ImPar30	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	48.292353, 25.959933
ImPar31	м. Краків, Малопольське воєводство, Польща	50.035231, 19.935162
ImPar32	сmt. Берегомет, Чернівецька обл., Україна	48.188936, 25.356374
ImPar35	м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., Україна	48.680226, 26.572355
ImPar36	с. Поляна, Закарпатська обл., Україна	48.64132, 22.98556
ImPar37	сmt. Берегомет, Чернівецька обл., Україна	48.175201, 25.308309
ImPar38	с. Солочин, Закарпатська обл., Україна	48.59751, 22.97779
ImPar39	сmt. Берегомет, Чернівецька обл., Україна	48.245862, 25.191894
ImPar40	м. Коростишів, Житомирська обл., Україна	50.1911, 29.0317
ImPar41	м. Київ, Україна	50.37500, 30.50607
ImPar44	м. Київ, Україна	50.351812, 30.516372
ImPar45	с. Немішаєве, Київська обл., Україна	50.57655, 30.11232
ImPar46	с. Мигалки, Київська обл., Україна	50.68210, 29.58070
ImPar47	м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., Україна	48.682219, 26.577792
ImPar49	м. Чорнобиль, Київська обл., Україна	51.178298, 30.166673
ImPar50	м. Кременець, Тернопільська обл., Україна	50.098367, 25.724830

ImPar51	с. Немішаєве, Київська обл., Україна	50.572253, 30.098497
ImPar52	с. Мигалки, Київська обл., Україна	50.68210, 29.58070
ImPar53	м. Київ, Україна	50.34649, 30.50861
ImPar54	м. Тернопіль, Тернопільська обл., Україна	49.547003, 25.563191
ImPar55	с. Ясіня, Закарпатська обл., Україна	48.261255, 24.357840
ImPar56	м. Тернопіль, Тернопільська обл., Україна	49.546291, 25.566823
ImPar58	м. Ходорів, Львівська обл., Україна	49.4032138, 24.31158052
ImPar59	м. Берегове, Закарпатська обл., Україна	48.193587, 22.639694
ImPar60	с. Вовчий, Закарпатська обл., Україна	48.567102, 23.057866
ImPar62	с. Сасівка, Закарпатська обл., Україна	48.590845, 23.098092



Рисунок 4. Гербарні зразки зібрані в м. Краків.

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 × 1 М трис-НСІ (рН 8,0) × 0,5 М ЕДТА × 5 М NaCl × протеїназа (20 мкл на 3-4 мл) × 0,1% β-меркаптоетанол.
2. Лізис здійснюють на водяній бані при 65°C протягом 2 год.
3. Надалі до лізату додають рівний об'єм суміші хлороформ×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 × 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.

Визначення концентрації та чистоти препаратів ДНК спектрофотометричним методом

1. Препарати попередньо виділеної ДНК розморозити, перемішати шляхом

- багаторазового піпетування.
2. Увімкнути спектрофотометр ND-1000.
 3. Увімкнути комп'ютер та запустити відповідне програмне забезпечення.
 4. У програмному забезпеченні обрати режим вимірювання «nucleic acid».
 5. Оптичну поверхню спектрофотометра очистити серветкою.
 6. Нанести 2 мкл дистильованої води на оптичну поверхню для ініціалізації приладу.
 7. Повторно нанести 2 мкл дистильованої води для встановлення контрольного значення.
 8. Натиснути кнопку «Blank» для проведення контрольного вимірювання.
 9. Повторно протерти оптичну поверхню.
 10. Нанести 2 мкл зразка ДНК на оптичну поверхню приладу.
 11. Натиснути кнопку «Measure» для запуску вимірювання оптичної густини зразка.
 12. Записати результати вимірювання:
 - Концентрацію ДНК (нг/мкл) — визначається за поглинанням при 260 нм. Для дволанцюгової ДНК $A_{260} = 1$ відповідає концентрації приблизно 50 нг/мкл.
 - Співвідношення A_{260}/A_{280} — показник білкового забруднення, оптимальне значення для чистої ДНК: 1,85–1,88. Значення нижче 1,8 може свідчити про наявність білків або фенолу у зразку. Вищі значення можуть вказувати на забруднення РНК.
 - Співвідношення A_{260}/A_{230} — індикатор хімічного забруднення, оптимальне значення для чистої ДНК: 2,3–2,4. Знижені значення можуть свідчити про наявність залишкових солей (EDTA, гуанідину тіоціанату), миючих засобів (Triton X-100, Tween 20), полісахаридів або інших органічних сполук. Це співвідношення є більш чутливим, але менш стабільним, тому його слід тлумачити з обережністю.

Електрофорез ДНК в агарозному гелі

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

Для ампліфікації ISSR маркерів було використано вісім ISSR-праймерів з набору UBC (University of British Columbia - табл. 2).

Таблиця 2.

Праймери, використані для ампліфікації ISSR-маркерів.

Праймер	Послідовність праймера	Температура гібридизації, °C
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	52
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	52
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	52
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	56
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	54
UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	56

Реагенти для приготування проби ДНК наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Компоненти	Об'єм, мкл
H ₂ O, бідистильована	4,7
MyTaq™ HS Red Mix 5 ^x	7,5
Primer	0,8
Препарат ДНК (10 ng)	2
Загальний об'єм реакційної суміші	15

Для різних праймерів використовували різні температури гібридизації, як зазначено раніше (Ivanovych et al. 2017).

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.

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

Для ПЛР-ампліфікації ISSR-маркерів було використано вісім UBC праймерів (табл. 2). На електрофореграмах на загал для всіх праймерів було виявлено 131 чітку смугу. Довжини ПЛР-продуктів коливались від 110 нп до 1650 нп. Кількість смуг, отриманих із застосуванням різних праймерів, становила від 6 (UBC 810) до 43 (UBC 857). Електрофореграми розподілу фрагментів для праймерів UBC 810 та UBC 857 представлені на рис.5.

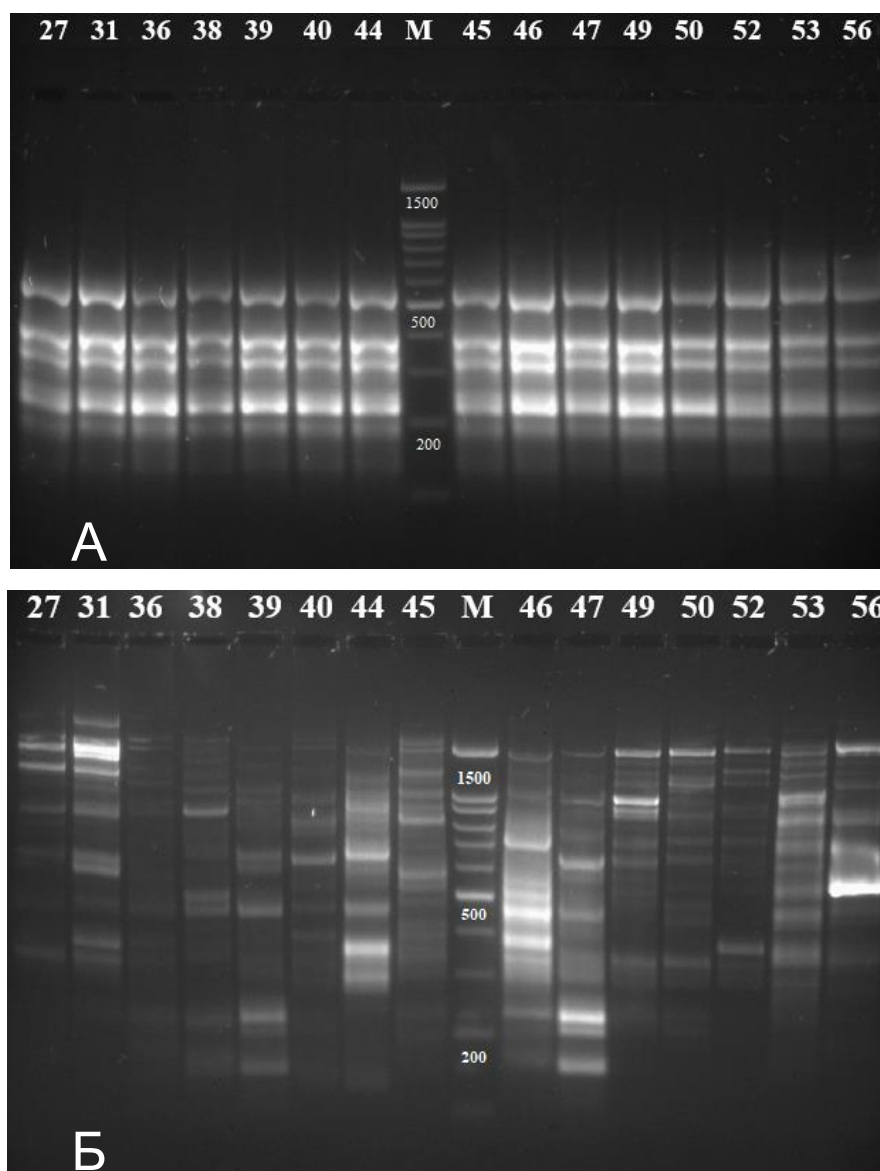


Рис. 5. Електрофорез продуктів амліфікації ISSR-маркерів для зразків *Impatiens parviflora* отриманих з використанням праймерів, де А - UBS 857; Б – UBS 810.

Кількість поліморфних алелів знаходиться у діапазоні від 0 для праймерів UBC 809 та UBC 810 до 42 для UBC 857. Загальна кількість поліморфних алелів становить 76 (табл. 4). Значення поліморфного інформаційного контенту (PIC) для використаних праймерів знаходиться в межах від 0 до 0,353, із середнім 0,118.

Таблиця 4

Аналіз патернів ISSR-ампліфікатів, отриманих для зразків *I. Parviflora*

Праймер	Довжина фрагментів ДНК (нп)	ТВ	РВ	РРВ (%)	PIC	DP
UBC 807	190-1400	9	1	11	0,017	0,013
UBC 809	160-1000	10	0	0	0	0
UBC 810	170-1650	6	0	0	0	0
UBC 811	300-1300	11	2	18	0,047	0,051
UBC 827	310-1250	24	19	79	0,253	0,291
UBC 835	140-1350	13	5	38	0,136	0,129
UBC 836	180-1070	15	7	47	0,137	0,138
UBC 857	320-1550	43	42	98	0,353	0,341
Разом / Середнє	140-1650	131	76	58	0,118	0,120

Примітки: ТВ, total number of bands (загальна кількість ампліфікованих смуг); РВ, number of polymorphic bands (кількість поліморфних смуг); РРВ, percentage of polymorphic bands (відсоток поліморфних смуг); PIC, polymorphic information content (вміст поліморфної інформації); DP, discriminating power (дискримінаційна здатність)

Згідно з даними таблиці 4, два з восьми праймерів - UBC 827 та UBC 857 - дали 51% усіх смуг на електрофореграмах і 80% поліморфних локусів. Ці праймери мають у своїх послідовностей повторювані мотиви типу (AC)_n, на

відміну від інших шести праймерів, які містять мотиви (AG)_n або (GA)_n (див. табл. 2). Подібна тенденція була зафіксована для сортів справжнього кардамону *Elettaria cardamomum* (L.) Maton (Anisha et al., 2020). Водночас у деяких інших рослин, таких як представники роду *Galinsoga* (Tynkevich et al., 2025), сорти рицини (Kim et al., 2021), черешня (Ivanovych et al., 2017) і пажитниця (Pivoriene & Pasakinskiene, 2008), схожий ефект при застосуванні цих праймерів не спостерігався. Ймовірно, велика кількість поліморфних ампліфікатів, отриманих при використанні ISSR-праймерів із (AC)_n мікросателіти. Це відрізняється від тенденції, властивої більшості вищих рослин, у яких домінують (AG)_n та (GA)_n мотиви (Srivastava et al., 2019).

Індекс генетичного різноманіття за Шенноном (*I*), що слугує мірою генетичної варіативності, для українських популяцій *I. parviflora* становить 0,260 (табл. 5). Раніше було встановлено, що для популяцій цього виду з Чехії значення індексу варіює від 0,145 до 0,219, а для литовських популяцій - від 0,047 до 0,098 (Kupcinskiene et al., 2015). Отже, рівень генетичного поліморфізму *I. parviflora* в Україні є порівняно високим і наближається до показників центральноевропейських популяцій. Значення індексу *I* подібне до того, що спостерігається у ряду інших інвазійних видів, таких як *Galinsoga parviflora* Cav. (0,254), *Linaria vulgaris* Mill. (0,388) та *Galega officinalis* L. (0,432) згідно з даними Tynkevich et al. (2025), Ward et al. (2008) і Wang et al. (2012) відповідно.

Таблиця 5

Вид		N	PB	PPB (%)	N_a	N_e	<i>I</i>	H_e	uH_e
<i>I. parviflora</i>	M	15	77	58.78	1,588	1,268	0,260	0,167	0,173
	SE				0,043	0,028	0,023	0,016	0,016

Характеристики генетичного різноманіття рослин роду *Impatiens*.

Примітки: N, кількість зразків рослин; PB, number of polymorphic bands (кількість поліморфних смуг); PPB, percentage of polymorphic bands (відсоток

поліморфних смуг); N_a , кількість різних алелів; N_e , кількість ефективних алелів; I , інформаційний індекс різноманітності Шеннона; H_e , очікувана гетерозиготність; uH_e , незміщена очікувана гетерозиготність; M , середнє значення; SE , стандартна похибка.

За допомогою байєсівського методу кластеризації в програмному забезпеченні STRUCTURE було досліджено генетичну структуру українських зразків *Impatiens parviflora*. Для визначення оптимальної кількості генетичних кластерів використовували параметр ΔK (ΔK), максимальне значення якого спостерігалось при $K=2$ (рис.6A). Таким чином, усі зразки були згруповані у два генетичні кластери (варіанти) - 1 та 2 (рис. 6B). Жоден з проаналізованих зразків не містив виключно генетичний матеріал лише одного варіанту.

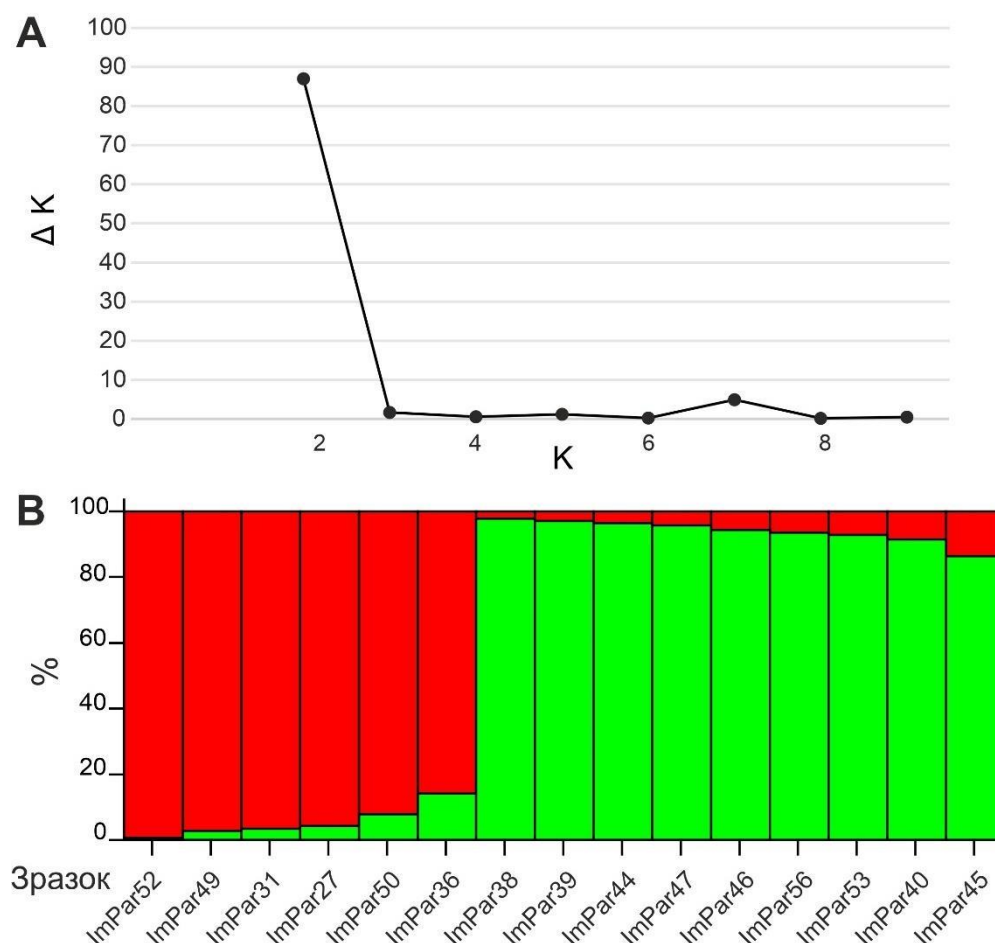


Рисунок 6. Аналіз ISSR-поліморфізму за допомогою програми STRUCTURE.

А - залежність параметру ΔK від кількості кластерів (K).

В - генетична конституція зразків *I. parviflora*, які представлені як вертикальні стовпчики.

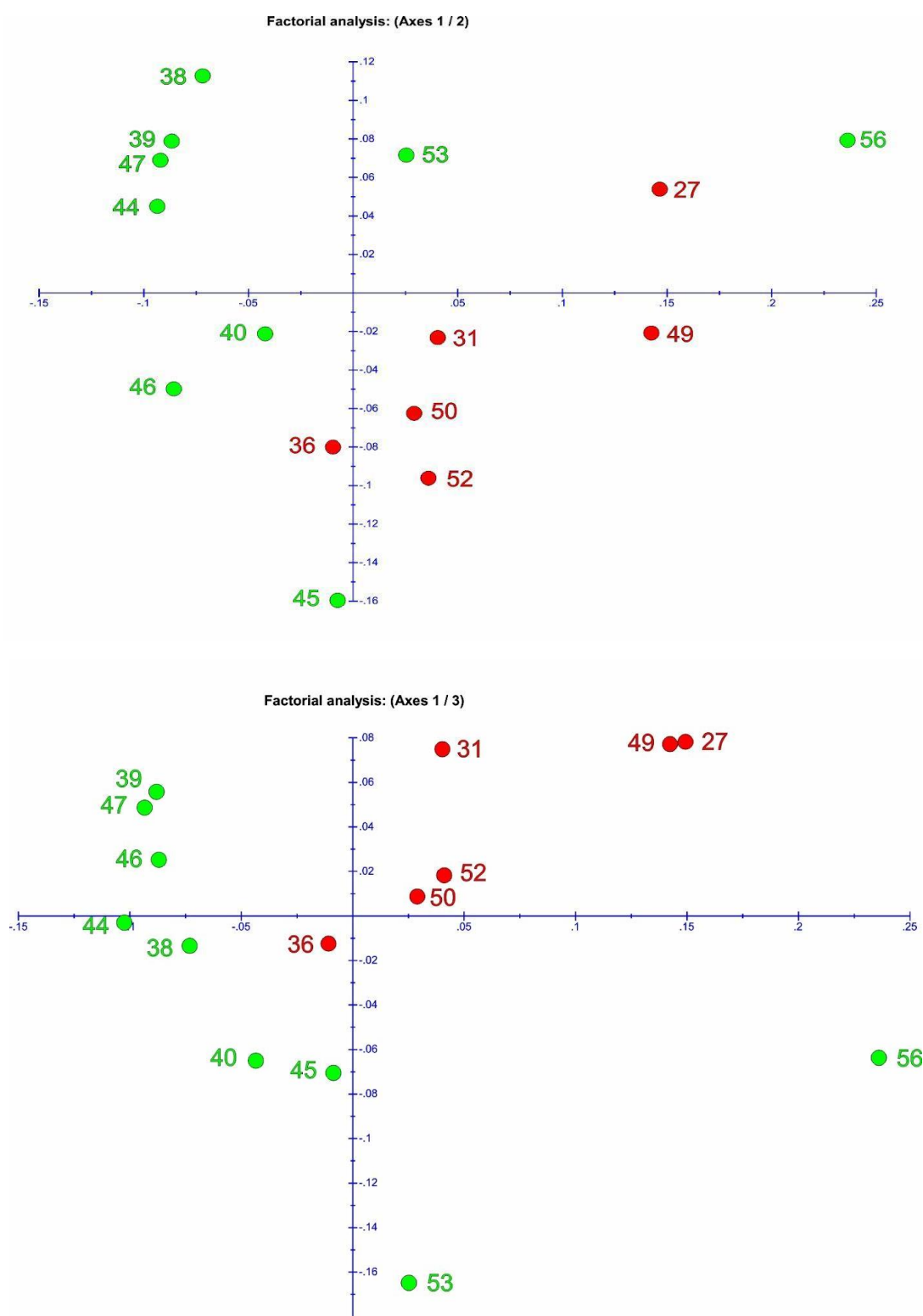
Червоним та зеленим кольорами показаний вміст генетичного матеріалу двох основних варіантів, 1 та 2, відповідно.

Зокрема, у зразках, віднесених до кластеру 1, частка генетичного матеріалу варіанту 2, становила від 1,4% до 15,2%. У зразках кластеру 2 вміст генетичного матеріалу варіанту 1 коливався в межах 2,2-12,9%. Загалом, для шести зразків домішки генетичного матеріалу іншого варіанту в геномі складала більше 5 %. На відміну від цього, у дослідженні литовських популяцій *I. parviflora*, проведеному з використанням ISSR-аналізу, зразки поділялися на три або навіть одинадцять кластерів. При цьому помітна частка генетичних домішок з інших варіантів спостерігалася лише у меншій кількості особин (Krokaitė et al., 2022).

Для оцінки ступеня подібності між зразками було здійснено аналіз методом основних компонент (PCoA), у якому враховувались п'ять основних осей, що пояснюють 29,9%, 19,8%, 12,9%, 10,3% та 7,9% загальної варіації, відповідно. Графіки за осями 1/2, 1/3, та 1/4 демонструють, що розмежування зразків, які належать до генетичних кластерів 1 і 2, є недостатньо виразним (рис. 7). Водночас зразки варіанту 1 мають тенденцію до більш компактного угруповання, особливо помітного за осями 1/4.

Зразки, у яких зафіксована найвища частка домішок іншого генетичного варіанту (ImPar36, ImPar40, ImPar45, та ImPar53), займають менш стабільні позиції у генетичному просторі, що може свідчити про їхню генетичну неоднорідність. Найбільш ізольоване положення на графіку займає зразок ImPar56, який вирізняється як серед представників власного варіанту, так і від усіх інших зразків загалом. Це може вказувати на наявність у його геномі домішки ще одного генетичного варіанту, присутність якого не була виявлена

в межах цього дослідження.



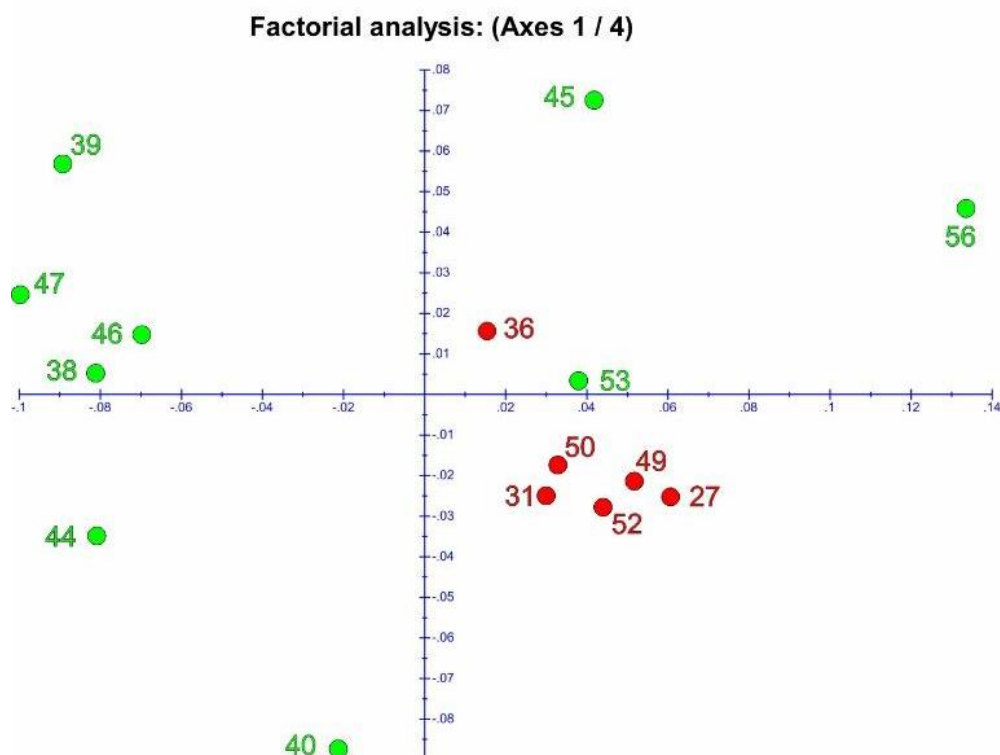


Рисунок 7. Результати аналізу генетичної подібності зразків *I. parviflora* методом основних координат.

Червоним та зеленим кольорами позначено приналежність зразків до генетичних кластерів 1 та 2, відповідно.

Зважаючи на те, що розділення в агарозному гелі не дає можливості чітко відокремити велику кількість індивідуальних продуктів для одного зразку, в подальшому ми обмежилися в використанні шести менш поліморфних праймерів. В загальному для шести праймерів було відокремлено 78 чітку смугу. Довжина ПЛР-продуктів коливалися від 100 нп до 950 нп. Кількість смуг, отриманих із застосуванням різних праймерів, становила від 8 (UBC 810) до 17 (UBC 809, UBC 811).

У подальшому для нашого аналізу ми добавили ще 14 зразків. Кількість поліморфних смуг встановлена для повної вибірки знаходиться у діапазоні від 5 для праймерів UBC 810 та UBC 836 до 15 для UBC 811. Загальна кількість поліморфних алелів становить 55 (табл.5.). Значення поліморфного інформаційного контенту (PIC) для шести використаних праймерів

знаходиться в межах від 0,030 до 0,131, із середнім 0,077. Хоча інформативність аналізу із вилученням праймерів UBC 827 та UBC 857 зменшилася, але достовірність отриманих даних збільшилася.

Таблиця 6

Аналіз патернів ампліфікації ISSR-маркерів

Праймер	Довжина фрагментів ДНК (нп)	ТВ	РВ	РРВ (%)	РІС
UBC 807	150-890	11	6	56	0,030
UBC 809	100-700	17	12	71	0,046
UBC 810	130-600	8	5	63	0,078
UBC 811	230-950	17	15	88	0,131
UBC 835	190-950	16	12	75	0,090
UBC 836	200-460	9	5	56	0,086
Разом / Середнє	170-760	78	55	69	0,077

Примітки: ТВ, total number of bands (загальна кількість ампліфікованих смуг); РВ, number of polymorphic bands (кількість поліморфних смуг); РРВ, percentage of polymorphic bands (відсоток поліморфних смуг); РІС, polymorphic information content (вміст поліморфної інформації)

Метод баєсівської кластеризації в програмі STRUCTURE було досліджено всі зразки з двох наборів. Максимальне значення параметра delta K(ΔK) спостерігалось при K=2 (рис.8А). Таким чином STRUCTURE-аналіз знову показав розділення на два генетичні кластери (рис.8В), проте всі зразки

з попереднього аналізу і частина з нового набору утворили один кластер, а другий кластер утворений 4 новими зразками. Зокрема, у зразках, належали до кластеру 1, вміст генетичного матеріалу варіанту 2 коливався в межах від 3,5% до 33,3%. У зразках, що входили до кластеру 2, частка генетичного матеріалу становила від 1,3 % до 18,2 %. Загалом, для чотирьох зразків домішки генетичного матеріалу іншого варіанту складала більше 10 %.

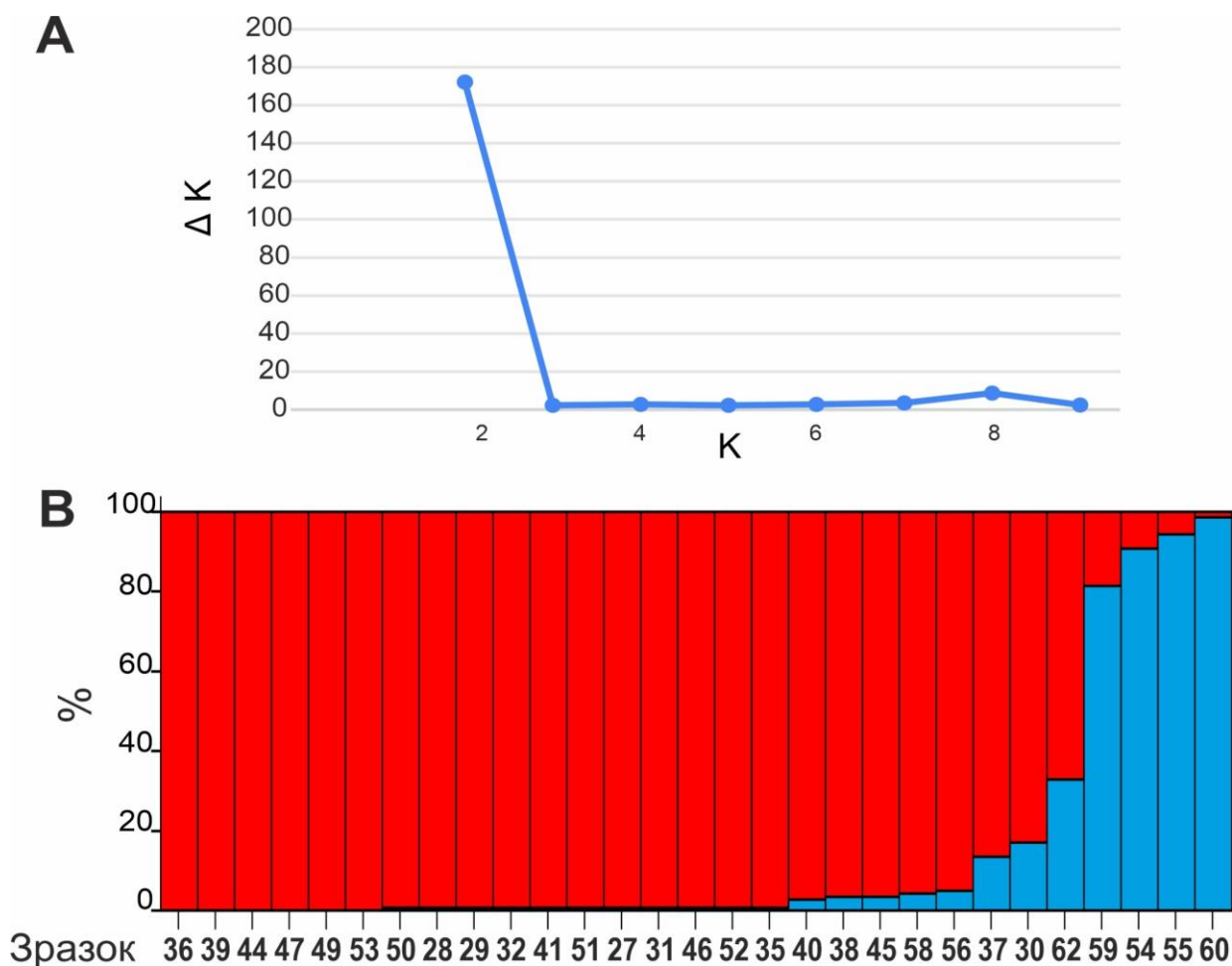


Рисунок 8. Аналіз ISSR-поліморфізму за допомогою програми STRUCTURE.

А - залежність параметру ΔK від кількості кластерів (K).

В - генетична конституція зразків *I. parviflora*, які представлені як вертикальні стовпчики.

Червоним та синім кольорами показаний вміст генетичного матеріалу двох основних варіантів, 1 та 2, відповідно.

На отриманому графіку (рис.9.) було позначено нами зеленим кольором положення зразків другого варіанту, видно що частина з них також має домішки варіанту 3.

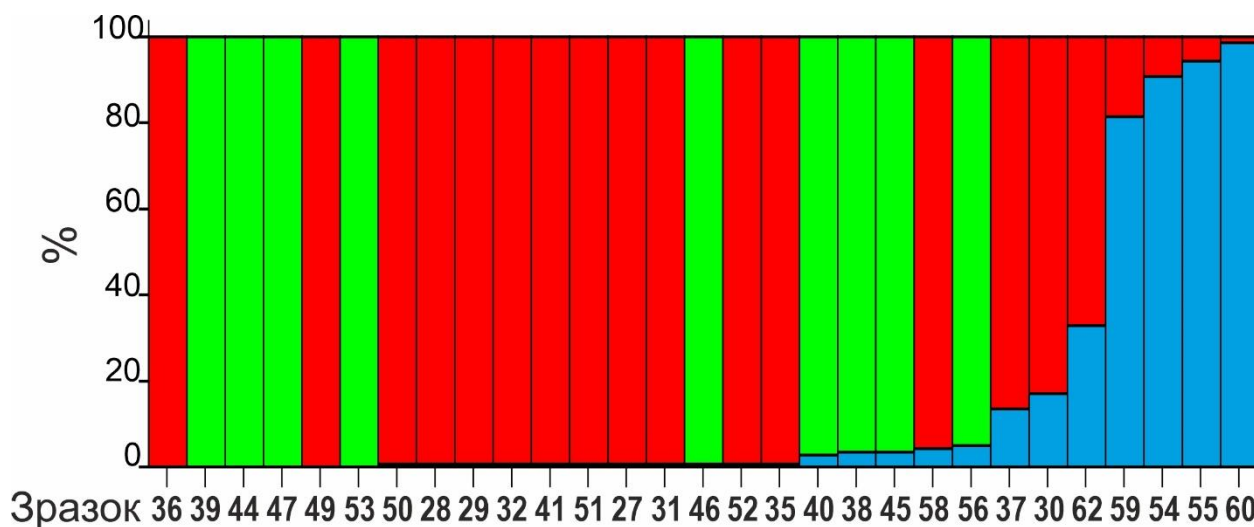


Рисунок 9. STRUCTURE-аналіз для всіх зразків. Червоним кольором позначено 1 кластер, зеленим кольором - 2 кластер, синім кольором - 3 кластер

Для оцінки ступеня подібності між зразками було здійснено аналіз методом основних компонент (PCoA), у якому враховувались дві основні осі, що пояснюють 40,4% та 24,19 %, в загальному 64,6 % загальної варіації. Графік за осями 1/2 показав, що всі зразки 1 та 2 варіанту групуються дуже щільно, але зразки 3 варіанту (ImPar54, ImPar55, ImPar59, ImPar60) розділяє значна відстань, як від інших зразків так і між собою (рис.10.). Таким чином, правильніше вважати, що кожен з них являє собою окремий рідкісний варіант унікальності яких можливо обумовлено гібридизацією з іншими видами.

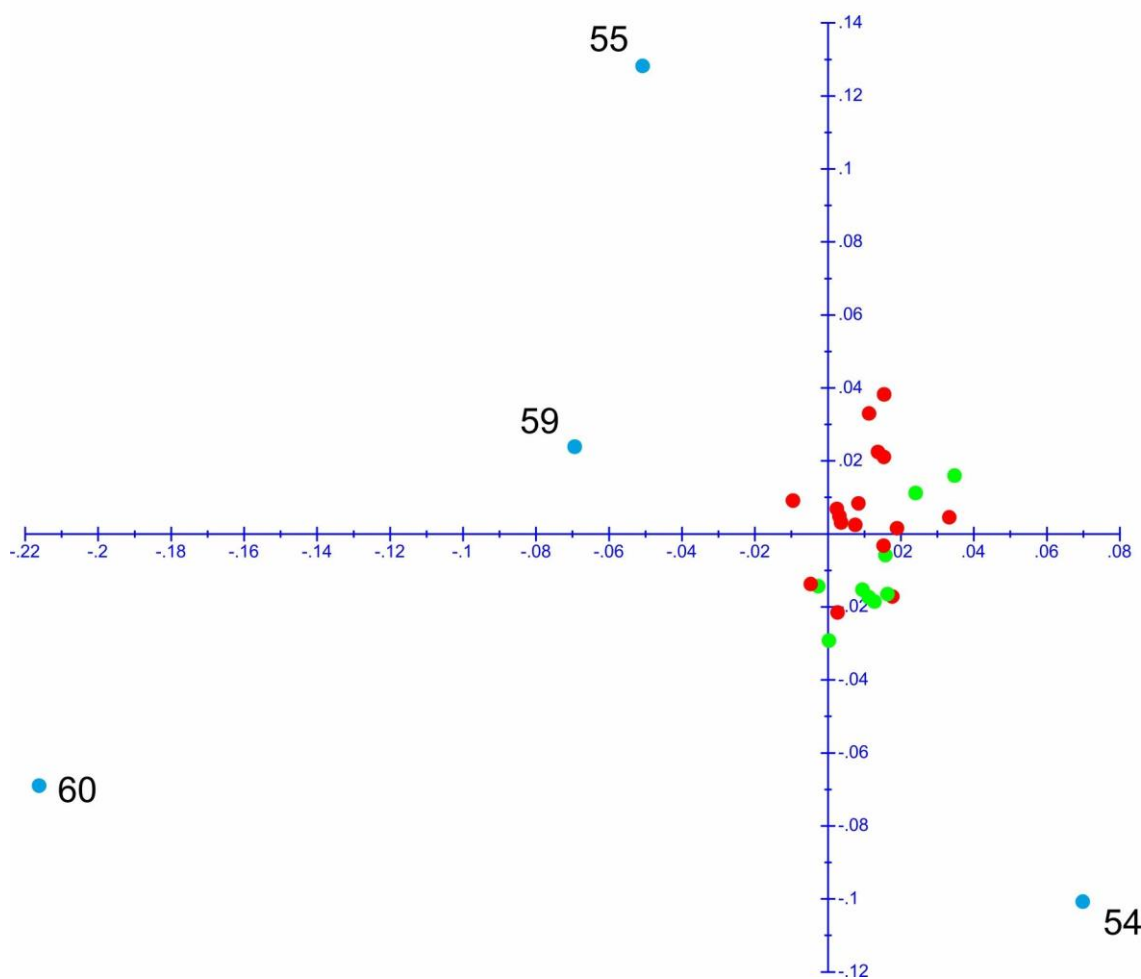


Рисунок 10. Результати аналізу генетичної подібності зразків *I. parviflora* методом основних координат.

Червоним, зеленим та синім кольорами позначено приналежність зразків до генетичних кластерів 1, 2 та 3, відповідно.

Наш аналіз не виявив закономірності між географічною віддаленістю досліджених зразків та генетичною дистанцією між ними (рис.11.). Наприклад, зразки, зібрані в різних регіонах України - ImPar38, ImPar39, ImPar44 та ImPar47 - виявились найбільш схожими між собою за генетичними ознаками (рис.6 та 7). Водночас зразки ImPar46 та ImPar52, які належать до різних генетичних варіантів, були зібрані в межах однієї популяції в селі Мигалки Київської області. Проте 3 зразки з третього кластеру походять з Закарпатської області. Така ситуація - одночасна наявність різних генотипів у

межах однієї території та поширення окремих генотипів на значних відстанях - є типовою для інвазивних видів, поширення яких відбувається внаслідок антропогенного впливу (Smith et al., 2020; Tynkevich et al., 2025). Водночас, збільшення кількості проаналізованих зразків у майбутньому може сприяти виявленню закономірностей у поширенні *I. parviflora* на території України та сусідніх регіонах.

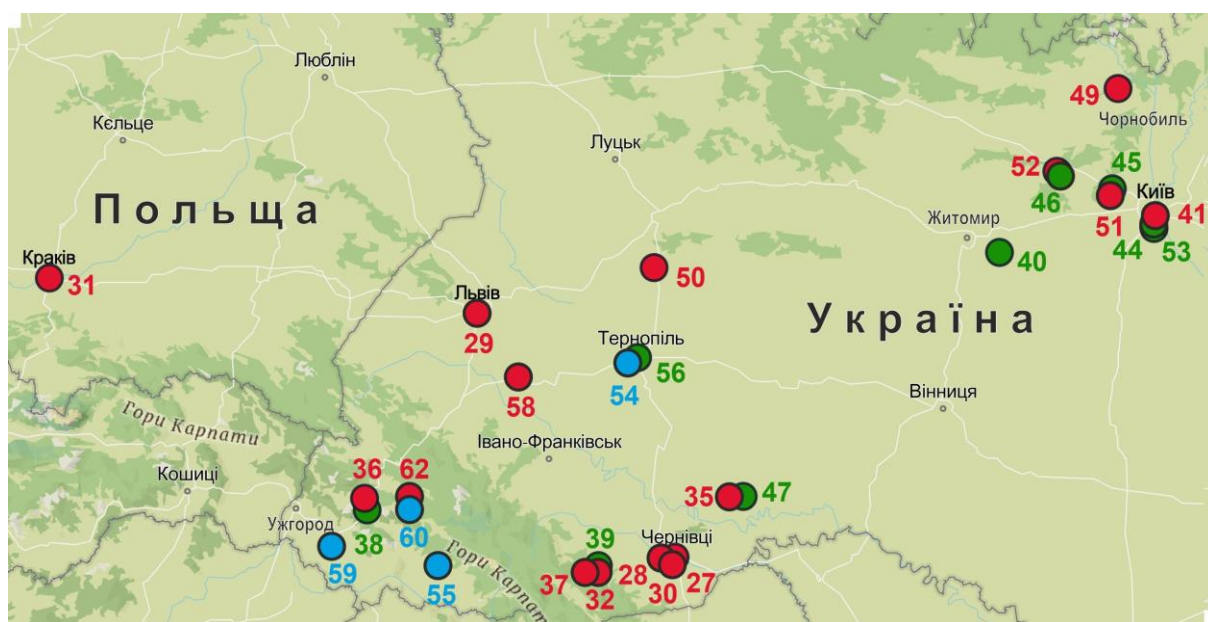


Рисунок 11. Карта розповсюдження генотипів. Червоним, зеленим та синім кольорами позначено приналежність зразків до генетичних кластерів 1, 2 та 3, відповідно.

ВИСНОВКИ

1. ISSR-баркодинг *I. parviflora* показує низький рівень генетичного поліморфізму для більшості зразків цього інвазійного виду з території України.
2. Чотири індивідуальних рослини демонструють значні генетичні дистанції від інших зразків, і ймовірно, представляють специфічні варіанти або гібридні форми з іншими представниками роду *Impatiens*.
3. Для виявлених генотипів *I. parviflora*, в цілому, не спостерігається географічного структурування, хоча, три з чотирьох зразків із специфічними генотипами знайдено у Закарпатській області.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wilcove, D. S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A., & Losos, E. (1998). Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience*, 48(8), 607–615
2. Rai, P. K., & Singh, J. (2020). Invasive alien plant species: Their impact on environment, ecosystem services and human health. *Ecological Indicators*, 111, 106020.
3. Schmidt, O., Padel, S., & Levidow, L. (2012). The Bio-Economy concept and knowledge base in a public goods and farmer perspective. *DOAJ* (DOAJ: Directory of Open Access Journals).
4. Krokaitė, E., Janulionienė, R., Jocienė, L., Rekašius, T., Rajackaitė, G., Paulauskas, A., Marozas, V., & Kupčinskienė, E. (2022b). Relating Invasibility and Invasiveness: Case Study of *Impatiens parviflora*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10.
5. Coakley, S., & Petti, C. (2021). Impacts of the Invasive *Impatiens glandulifera*: Lessons Learned from One of Europe's Top Invasive Species. *Biology*, 10(7), 619.
6. WFO World Flora Online, 2024, Available from: <http://www.worldfloraonline.org/> (accessed 25 November 2024)
7. POWO. "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Retrieved 25 November 2024.
8. Chen, Y., Zhu, J., Wang, L., Ning, P., Huang, W., & Zou, Z. (2024). Research Overview and development of *Impatiens* L.: A bibliometric Analysis (1987–2023). *Horticulturae*, 10(11), 1208
9. DA, D. (2023). *Impatientetum noli-tangere-parviflorae* ass. nova – new syntaxon of the ruderal vegetation from the left-bank forest-steppe zone of

- ukraine. Scientific Bulletin of Natural Sciences (Biological Sciences), 34, 5–13.
10. Pires, E. O., Caleja, C., Garcia, C. C., Ferreira, I. C., & Barros, L. (2021). Current status of genus *Impatiens*: Bioactive compounds and natural pigments with health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 117, 106–124.
 11. Uchneat, M. S. (2007). *Impatiens*. In Springer eBooks (pp. 277–299).
 12. Renčo, M., Jurová, J., & Čerevková, A. (2024). Invasiveness of *Impatiens parviflora* in Carpathian Beech Forests: Insights from Soil Nematode Communities. *Diversity*, 16(7), 393.
 13. Martin, P. H., Canham, C. D., & Marks, P. L. (2008). Why forests appear resistant to exotic plant invasions: intentional introductions, stand dynamics, and the role of shade tolerance. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(3), 142–149.
 14. Trepl, L. (1984). Über *Impatiens parviflora* DC. als Agriophyt in Mitteleuropa. *Diss. Bot.* 73, 1–400.
 15. Chmura, D., & Sierka, E. (2006). Relation between invasive plant and species richness of forest floor vegetation: a study of *Impatiens parviflora* DC. *Polish Journal of Ecology*, 54(3), 417–428.
 16. Florianová, A., & Münzbergová, Z. (2018). Drivers of natural spread of invasive *Impatiens parviflora* differ between life-cycle stages. *Biological Invasions*, 20(8), 2121–2140.
 17. Godefroid, S., & Koedam, N. (2010). Comparative ecology and coexistence of introduced and native congeneric forest herbs: *Impatiens parviflora* and *I. noli-tangere*. *Plant Ecology and Evolution*, 143(2), 119–127.
 18. Dostál, P., Weiser, M., & Koubek, T. (2012). Native jewelweed, but not other native species, displays post-invasion trait divergence. *Oikos*, 121(11), 1849–1859.

19. Galera, H., & Sudnik-Wójcikowska, B. (2011). Central European botanic gardens as centres of dispersal of alien plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 79(2), 147–156.
20. Weiss V. The triumphant advance of the small-flowered touch-me-not *Impatiens parviflora* in Central Europe 1830-2021. Preprint. 2021. P. 1-7.
21. Coombe, D. E. (1956). *Impatiens parviflora* A DC. *Journal of Ecology*, 44(2), 701.
22. Vervoort, A., Cawoy, V., & Jacquemart, A. (2011). Comparative Reproductive Biology in Co-Occurring Invasive and Native *Impatiens* Species. *International Journal of Plant Sciences*, 172(3), 366–377.
23. Yu, S., Janssens, S. B., Zhu, X., Lidén, M., Gao, T., & Wang, W. (2015). Phylogeny of *Impatiens* (Balsaminaceae): integrating molecular and morphological evidence into a new classification. *Cladistics*, 32(2), 179–197.
24. Van Valkenburg, J., Schoenenberger, N., Van De Vossenberg, B., Veld, W. M. I. '., Westenberg, M., & Boer, E. (2019). A natural hybrid of *Impatiens*, in the introduced range, demonstrated by sequence analysis of the nuclear ribosomal DNA-gene repeat. *Botany Letters*, 166(2), 144–152.
25. Schmitz, U., & Dericks, G. (2010). Spread of alien invasive *Impatiens balfourii* in Europe and its temperature, light and soil moisture demands. *Flora*, 205(11), 772–776.
26. Русак, О. О., Петрашук, В. І., Панчук, І. І., & Волков, Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (*Acer pseudoplatanus*). Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2016. Т. 14(2). С. 216-220.
27. Ishchenko, O. O., Mel'nyk, V. M., Parnikoza, I. Y., Budzhak, V. V., Panchuk, I. I., Kunakh, V. A., & Volkov, R. A. (2020). Molecular Organization of 5S Ribosomal DNA and Taxonomic Status of *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (Poaceae). *Cytology and Genetics*, 54(6), 505–513.

- 28.Hailu, G., & Asfere, Y. (2020). The role of molecular markers in crop improvement and plant breeding programs: *a. Agric. J*, 15, 171-175.
- 29.Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10), e08093.
- 30.Yang, M., Abdalrahman, H., Sonia, U., Mohammed, A. I., Vestine, U., Wang, M., Ebadi, A. G., & Toughani, M. (2020). The application of DNA molecular markers in the study of *Codonopsis* species genetic variation, a review. *Cellular and Molecular Biology*, 66(2), 23–30.
- 31.Dar, A. A., Mahajan, R., & Sharma, S. (2019). Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 89(11).
- 32.Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PLoS ONE*, 7(4), e35071.
- 33.Dunning, L. T., & Savolainen, V. (2010). Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164(1), 1–9.
- 34.Yu, J., Xue, J., & Zhou, S. (2011). New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 176–181.
- 35.Whitlock, B. A., Hale, A. M., & Groff, P. A. (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the TRNH-PSBA plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 5(7), e11533.
- 36.Ng, W. L., & SG, T. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? *ASM Science Journal*, 9(1).
- 37.Wolfe, A. D. (2005). ISSR Techniques for Evolutionary Biology. *Methods in Enzymology on CD-ROM/Methods in Enzymology*, 134–144.
- 38.Tanner, R. (2022). *Impatiens parviflora* (small balsam) [Dataset]. In CABI Compendium.

- 39.Thakur, S., Singh, S., & Dutt, H. C. (2023b). *Impatiens parviflora* DC. (Balsaminaceae): An Addition to the Indian Flora. *National Academy Science Letters*, 46(3), 219–222.
- 40.Tokarska-Guzik, B., Węgrzynek, B., Urbisz, A., Urbisz, A., Nowak, T., & Bzdęga, K. (2010). Alien vascular plants in the Silesian Upland of Poland: distribution, patterns, impacts and threats. *Biodiversity Research and Conservation*, 19(2010), 33–54.
- 41.Nybom, H., Weising, K., & Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investigative Genetics*, 5(1).
- 42.Younis, A., Ramzan, F., Ramzan, Y., Zulfiqar, F., Ahsan, M., & Lim, K. B. (2020). Molecular markers Improve abiotic stress tolerance in crops: a review. *Plants*, 9(10), 1374.
- 43.Handley, L. L., Estoup, A., Evans, D. M., Thomas, C. E., Lombaert, E., Facon, B., Aebi, A., & Roy, H. E. (2011). Ecological genetics of invasive alien species. *BioControl*, 56(4), 409–428.