

ВНУТРІШНЬОГЕНОМНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ДІЛЯНКИ ITS1-5.8S-ITS2 У ІНВАЗІЙНИХ ВИДІВ РОДУ *REYNOUTRIA*

Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Д.В. ЯКОБИШЕН, А.С. ЧЕРКАЗЬЯНОВА,
А.Є. ШЕЛИФІСТ, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Автор для кореспонденції – Волков Р.А., e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Ділянка ITS1-5.8S-ITS2 (ITS1-2) 35S рДНК широко використовується для молекулярного баркодингу та у філогенетиці рослин. Вважається, що завдяки концертній еволюції всі копії 35S рДНК у геномах еукаріот ефективно гомогенізуються. Проте, останнім часом показано існування внутрішньогеномного поліморфізму ділянки ITS1-2 в геномах рослин, що може бути наслідком внутрішньо- або міжвидової гібридизації. В цій роботі з використанням Пітіна секвенування ампліконів оцінено внутрішньогеномний поліморфізм ділянки ITS1-2 у зразків двох інвазійних видів роду *Reynoutria* з України та Румунії, *R. japonica* та *R. sachalinensis*, гібридизація між якими може призводити до появи більш агресивних інвазійних форм. Встановлено, що у досліджуваних видів послідовності ITS1-2 представлені кількома мажорними та міноними підкласами/варіантами, що свідчить про їх неповну гомогенізацію. Кількість мажорних варіантів коливається від двох у *R. japonica* до шести у *R. sachalinensis*. Варіанти ITS1-2, які широко представлені у геномі одного виду, можуть бути присутні у малій кількості у іншого виду, що вказує на імовірну міжвидову гібридизацію. Отримані результати свідчать, що внутрішньогеномний поліморфізм ITS1-2 необхідно враховувати при проведенні баркодингу, реконструкції філогенезу таксонів низького рівня та для ідентифікації гібридних форм.

Ключові слова: біоінформатичний аналіз, генетичний поліморфізм, молекулярна геноміка, молекулярна еволюція та філогенія, рибосомна ДНК.

Вступ. Локуси 35S рДНК, які кодують 5.8S, 18S та 28S рРНК присутні у геномах всіх рослин. Ці локуси являють собою набори тандемно організованих повторюваних одиниць (повторів), які розташовані на одній або декількох хромосомах. Хоча в геномах рослин можуть бути присутні від кількох сотень до

кількох тисяч копій 35S рДНК (Rogers & Bendich, 1987; Rosato et al, 2016), вони залишаються високоподібними протягом еволюції завдяки вирівнюванню різниці (гомогенізації) між індивідуальними повторами. Це явище відоме як концертна еволюція (Elder & Turner, 1995; Volkov et al, 2007; Naidoo et al, 2013).

Кожна повторювана одиниця 35S рДНК складається з кодувальних та спейсерних ділянок (Volkov et al, 2007; Komarova et al, 2008). Зокрема, між кодувальними ділянками (coding sequences – CDS) 18S, 5.8S та 28S рРНК знаходяться внутрішні транскрибовані спейсери 1 та 2 (internal transcribed spacers – ITS), відповідно. Кодувальні ділянки є висококонсервативними, тоді як ITS1 та ITS2 еволюціонують з високою швидкістю, завдяки чому вони широко застосовуються у філогенетичних, таксономічних та біогеографічних дослідженнях різних груп організмів (Leblond-Bourget et al, 1996; Iwen et al, 2002; Álvarez & Wendel, 2003; Schoch et al, 2012). Так, послідовність ITS1-5.8S-ITS2 (ITS1-2) використовується як частина корового баркоду, а також для метабаркодингу судинних рослин (China Plant BOL Group 1 et al, 2011; Kolter & Gemeinholzer, 2021).

Основною перевагою послідовностей ITS1 та ITS2 як генетичних баркодів є висока варіабельність цих ділянок, яка в більшості випадків дозволяє впевнено відрізнити близькоспоріднені види або навіть окремі популяції рослин (Volkov et al, 2010; China Plant BOL Group 1 et al, 2011; Simon et al, 2012). Важливо також, що ця варіабельність проявляється переважно через накопичення SNP, на противагу багатьом ядерним та хлоропластним маркерним послідовностям, для яких характерні масштабні структурні перебудови, зокрема, ін-

серції і делеції (індели), інверсії та дуплікації (Graham et al, 2000; Matthee et al, 2007).

З огляду на високий рівень внутрішньогеномної подібності індивідуальних повторів 35S рДНК, у таксономічних дослідженнях традиційно використовують пряме сиквенування за Сенгером ПЛР-продуктів ділянки ITS1-2 (China Plant BOL Group 1 et al, 2011). Здебільше такий підхід дозволяє отримувати сиквенс високої якості, але інколи на хроматограмах спостерігаються подвійні піки, що вказує на присутність у геномі кількох варіантів повторів 35S рДНК. Внутрішньогеномний поліморфізм 35S рДНК рослин продемонстровано і шляхом клонування та сиквенування індивідуальних повторів, проте такі дослідження порівняно малочисельні, тому що вони дуже трудомісткі та забирають багато часу (Feliner et al, 2004; Volkov et al, 2010; Vijayan et al, 2012). Отже, внутрішньогеномний поліморфізм 35S рДНК довгий час залишався недооціненим.

Із розвитком технологій сиквенування наступного покоління ці методи почали застосовувати для оцінки внутрішньогеномного поліморфізму спейсерів ITS1-ITS2. На загал ці дослідження показали, що у геномах рослин зазвичай присутні кілька варіантів повторів 35S рДНК (Song et al, 2012; Weitemier et al, 2015; Alanagreh et al, 2017; Wang et al, 2017; Shao et al, 2018; Osuna-Mascary et al, 2022).

Однією з причин внутрішньогеномного поліморфізму 35S рДНК може бути відносно нещодавня міжвидова гібридизація, наслідком якої є поєднання в геномі гібриду батьківських варіантів повторів рДНК (Volkov et al, 2007; Tang et al, 2015; Borowska-Zuchowska & Hasterok, 2017; Wang et al, 2023). Відповідно, дослідження внутрішньогеномного поліморфізму ділянки ITS1-2 може бути корисним для виявлення міжвидової гібридизації у групах споріднених видів рослин. Проте, на сьогодні такий підхід все ще застосовується недостатньо (Osuna-Mascary et al, 2022).

Міжвидова гібридизація відіграє важливу роль при видоутворенні у рослин (Alix et al, 2017). Зокрема, це явище є однією з причин, яка визначає успіх інвазійних видів. Показано, що схрещування адвентивних видів рослин з представниками місцевої флори (або різних адвентивних видів між собою) може при-

зводити до появи агресивних гібридних форм, які демонструють гетерозис та краще пристосовані до умов довкілля (Musiał et al, 2020; Irinia et al, 2021; Mounger et al, 2021; Gao et al, 2022; Uemura et al, 2022; Ruhsam et al, 2023).

Прикладом інвазійних видів, для яких характерна міжвидова гібридизація, є представники роду *Reynoutria*, *R. japonica* Houtt. та *R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, два види зі Східної Азії, природний ареал яких перекривається на території Японії та Сахаліну. *R. japonica* та *R. sachalinensis* широко розселилися по території Азії, Європи, Північної Америки, Австралії, Нової Зеландії, Південної Африки та Чілі (Henderson & Wilson, 2017; GBIF, 2024; Powo, 2024) та належать до найбільш успішних інвазійних видів рослин. Вважається, що як в межах природного ареалу, так і на території Європи, Північної Америки, Австралії та Нової Зеландії гібридизація між тетраплоїдною ($2n = 4x = 44$) *R. japonica* та октаплоїдною ($2n = 8x = 88$) формою *R. sachalinensis* призводила до неодноразової появи гексаплоїдних ($2n = 6x = 66$) гібридів, для яких використовують спільну таксономічну назву *R. × bohemica* Chrtek & Chrtková (Mandák et al, 2003; Clements & Jones, 2021; Bailey & Wisskirchen, 2024). Припускають, що завдяки високій фертильності ці гібридні форми можуть розповсюджуватись суттєво швидше, ніж переважно стерильна батьківська форма *R. japonica* (Clements & Jones, 2021). В Україні зустрічаються як вихідні батьківські види, так і міжвидовий гібрид *R. × bohemica* (Shevera, 2017). Проте, зразки роду *Reynoutria* з території України досі не були досліджені з використанням молекулярно-генетичних методів.

Перспективним підходом до генетичного аналізу гібридів рослин є ПЛР-ампліфікація та високопродуктивне сиквенування ділянок рДНК. Нещодавно такий підхід був успішно застосований для оцінки молекулярного поліморфізму міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS) 5S рДНК представників родів *Quercus* (Piredda et al, 2021) та *Fagus* (Cardoni et al, 2022), а також ділянки ITS1 *Fritillaria cirrhosa* (Wu et al, 2024). В цій роботі ми застосували високопродуктивне сиквенування ампліконів для аналізу внутрішньогеномного поліморфізму ділянки ITS1-2 та оцінили можли-

вість його використання для молекулярної ідентифікації внутрішньовидових форм та міжвидових гібридів у представників роду *Reynoutria*.

Матеріали і методи. Рослинний матеріал та виділення ДНК. Зразки рослин роду *Reynoutria* були зібрані в межах Чернівецької області, Україна та у м. Тімішоара, Румунія (табл. 1). Таксономічна приналежність зразків була визначена за морфологічними критеріями. Генотипу ДНК виділяли з гербарних зразків цетавлоновим методом (Porebski et al, 1997). На стадії лізису зразки ДНК додатково обробляли протеїназою K («Sigma-Aldrich», США) (Tynkevich et al, 2022b).

Ампліфікація та сиквенування. Ділянку ITS1-2 ампліфікували за допомогою праймерів, комплементарних до фланкуючих фрагментів кодуючих ділянок 18S та 25S рРНК. Загалом, використовували чотири праймери (табл. 2) в різних комбінаціях (табл. 1).

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

Довжина та концентрація ПЛР-продуктів аналізувалась методом електрофоретичного роз-

ділення у 2%-вому агарозному гелі. ПЛР-продукти ITS1-2 чотирьох зразків змішували в еквімолярній концентрації. Після чого суміш ампліконів очищали екстракцією з 2%-ного агарозного геля за допомогою набору Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Сиквенування ампліконів здійснювали методом Illumina з використанням сервісу Amplicon-EZ (GENEWIZ).

Біоінформатичні процедури. Контроль якості отриманих в результаті сиквенування парних Illumina рідів проводили з використанням програми fastp 0.23.4 (Chen et al, 2018). Контроль включав трімінг адаптерів, видалення коротких рідів, трімінг рідів за якістю та проводився за порівняно жорстких параметрів: -l 200, -cut_tail, -cut_front, cut_tail_window_size 1, cut_tail_mean_quality 30. За допомогою програми SeqKit 0.15.0 (Shen et al, 2016) «чисті» ріди були переведені у формат FASTA, після чого парні ріди були об'єднані без перекриття та сортовані за послідовностями праймерів на чотири файли відповідно до сиквенування зразків (табл. 1).

Вирівнювання послідовностей та філогенетичний аналіз. Вирівнювання послідовностей ділянки ITS1-2 проводили програмою MAFFT з використанням методу G-INS-i (Katoh & Standley, 2013). Філогенетичну сітку обрахували за

Таблиця 1. Зразки рослин роду *Reynoutria* та кількість ідентифікованих послідовностей ITS1-2

Вид	Зразок	Географічне походження	Кількість послідовностей TS1-2	Комбінація праймерів
<i>R. japonica</i> Houtt.	ReJap1	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	162	YT2001/ITSnewRev
	ReJap2	м. Тімішоара, повіт Тіміш, Румунія	108	ITSnewFd/ITSnewRev
<i>R. sachalinensis</i> (F. Schmidt) Nakai	ReSac1	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна	55	ITSnewFd/YT2004
	ReSac4	с. Грозинці, Чернівецька обл., Україна	152	YT2001/YT2004

Таблиця 2. Список використаних праймерів

Назва праймера	Напрямок праймера	Нуклеотидна послідовність
YT2001	Прямий	5'-aagtcattgaaccttatcatttagagg-3'
YT2004	Зворотній	5'-tccttgtaagttcttctcctccg-3'
ITSnewFd	Прямий	5'-gaacctgcggaaggatcattgtc-3'
ITSnewRev	Зворотній	5'-taaattcagcgggtagcccg-3'

алгоритмом Neighbor-Net, використовуючи програму SplitsTree5 (Huson & Bryant, 2006).

Модель найкращої відповідності нуклеотидних замін для вирівнювання основних варіантів ділянки ITS1-2 оцінювали за найменшим значенням Баєсового інформаційного критерію (BIC) за допомогою програми IQTree 2.3 (Minh et al, 2020). Maximum likelihood філогенетичне дерево було побудовано з використанням моделі GTR+F+G4. Значення bootstrap підтримки гілок було обраховано за 1000 реплікацій дерева.

Результати та обговорення. Сиквенування 35S рДНК. Ділянку ITS1-2 двох зразків *R. japonica* (ReJap1, ReJap2) та двох зразків *R. sachalinensis* (ReSac1, ReSac4 — див. табл. 1) було ампліфіковано та сиквенувано методом Illumina. Загалом було отримано 719 парних рідів довжиною 251 нп. Оскільки довжина повної ділянки ITS1-2 для представників роду *Reynoutria* складає приблизно 680 нп, центральна частина, яка містить ген 5.8S рДНК не покривалась при такому сиквенуванні. З огляду на те, що парні ріди не перекривались, ми застосували жорсткі критерії для трімінгу за якістю після чого формально збирали парні ріди без перекриття. В результаті залишилось 477 зібраних рідів, які задовольняли жорстким критеріям зборки. Сортуння за послідовностями праймерів, різні комбінації яких були використані для ПЛР-ампліфікації різних зразків, показало, що кількість отриманих послідовностей цільової ділянки становила від 55 для ReSac1 до 162 для ReJap1 (табл. 1).

Внутрішньогеномний поліморфізм ділянки ITS1-2. На основі вирівнювання були обраховані невідкориговані попарні відстані Геммінга та побудована NeighborNet філогенетична сітка (рис. 1). На отриманій сітці наявні два основні кластери, J та S, кожен з яких містить переважно послідовності одного з видів, *R. japonica* чи *R. sachalinensis*, хоча незначна кількість послідовностей іншого виду також присутня. Ці два кластера репрезентують два основні класи послідовностей ITS1-2, які присутні в геномах *R. japonica* та *R. sachalinensis*. Основні кластери/класи можна умовно розділити на чотири менших підкластери/підкласи, які ми назвали J1-J4 та S1-S4. При цьому, середня

дистанція між послідовностями, які належать до підкластерів J1-J2 і J3-J4 суттєво більша, ніж між послідовностями підкластерів S1-S4. Крім того, на дендрограмі присутні приблизно 20 послідовностей, які не увійшли до складу підкластерів J1-J4 та S1-S4. Послідовності з геномів різних зразків нерівномірно розподілились між кластерами. Лише для ReJap1 спостерігається групування всіх послідовностей виключно в межах кластеру J. Послідовності цього зразка присутні в усіх чотирьох підкластерах J1-J4, проте переважна більшість знаходиться в J1. Для ReJap2 послідовності локалізуються лише в трьох підкластерах J, але присутні також в незначній кількості і в трьох підкластерах S. Послідовності ITS1-2 обох зразків *R. sachalinensis* розподілені між чотирма підкластерами S і зустрічаються також в трьох підкластерах J1, J3 та J4.

Для сиквенсів кожного з підкластерів/підкласів J1-J4 та S1-S4 були генеровані консенсусні послідовності. Рівень подібності між цими послідовностями знаходиться в межах від 94,6 % для варіантів J4 та S1 до 99,3 % для варіантів J1 та J2 (табл. 3). Середня попарна подібність між консенсусними послідовностями J1-J4 становить 97,3 %, а між послідовностями S1-J4 — 99 %.

За кількістю індивідуальних послідовностей в кожному з основних восьми підкластерів на філогенетичній сітці (рис. 1) для кожного з чотирьох досліджених зразків був розрахований відносний вміст у геномі послідовностей, які належать до підкласів J1-J4 та S1-S4 (рис. 2). В геномах обох зразків *R. japonica* переважають послідовності підкласу J1, тоді як другим за вмістом є підклас J3. Сумарний вміст цих двох мажорних підкласів ITS1-2 в геномах ReJap1 і ReJap2 становить 93 та 87 %, відповідно.

На відміну від *R. japonica*, у *R. sachalinensis* відносний вміст жодного з підкласів ITS1-2 не сягає 50 %. Найбільшим виявився вміст підкласів S1 (39 %) і S3 (41 % — рис. 2) для зразків ReSac1 та ReSac4, відповідно.

У геномах досліджених зразків було також знайдено мінорні підкласи ITS1-2. Цікаво, що послідовності підкласу J4 становлять мінорну фракцію (4 %) в геномі ReJap1 з території України, але відсутні серед послідовностей, от-

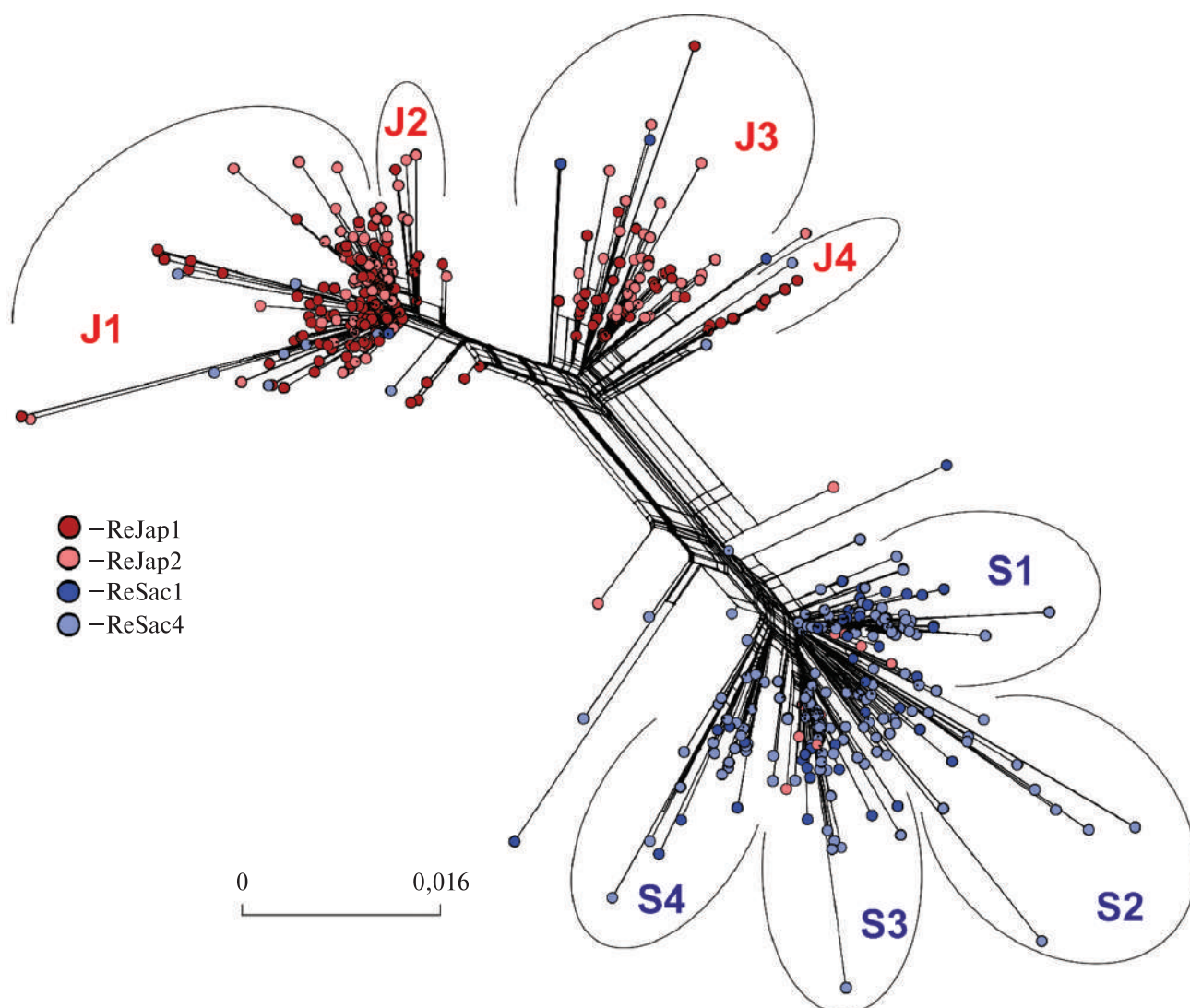


Рис. 1. Neighbour-net філогенетична сітка для послідовностей ITS1-2 чотирьох зразків роду *Reynoutria*. Характеристики зразків рослин наведено у таблиці 1

Таблиця 3. Рівень подібності (%) та показник дивергенції для консенсусних послідовностей основних варіантів ITS1-2

Консенсусна послідовність	J1	J2	J3	J4	S1	S2	S3	S4	Рівень подібності
J1		99,3	98,1	96,3	95,6	95,6	95,6	95,6	
J2	0,2		97,4	95,6	94,8	95,1	94,8	94,8	
J3	1,9	2,2		96,7	96,5	96,5	96,5	96,5	
J4	2,4	2,7	1,9		94,6	94,8	95,1	95,1	
S1	3,6	3,9	2,7	3,2		98,8	99,1	98,6	
S2	3,7	3,7	2,7	3,2	0,2		98,8	98,6	
S3	4,1	4,4	3,1	3,2	0,5	0,7		99,1	
S4	4,1	4,4	3,1	3,2	0,9	1,0	0,9		
Показник дивергенції									

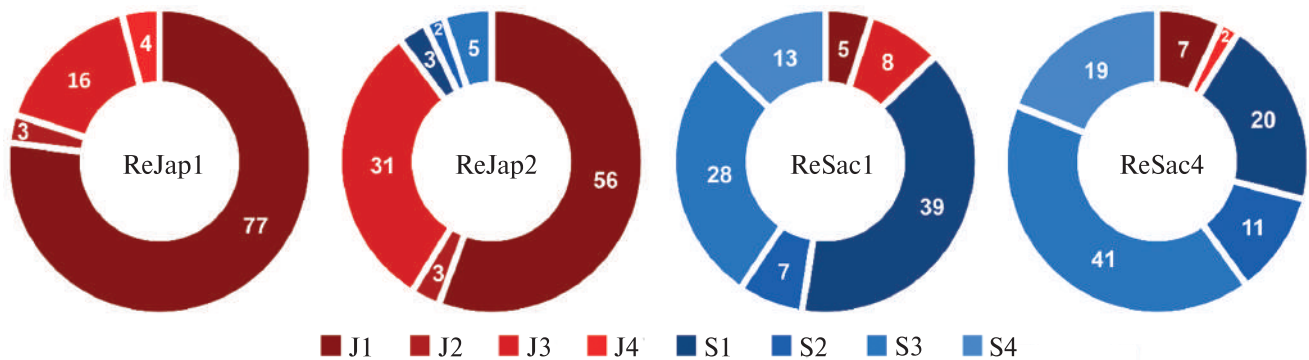


Рис. 2. Відносний вміст (%) основних варіантів послідовностей ITS1-2 (J1-J4, S1-S4) в геномах чотирьох зразків *Reynoutria japonica* (ReJap) та *R. sachalinensis* (ReSac)

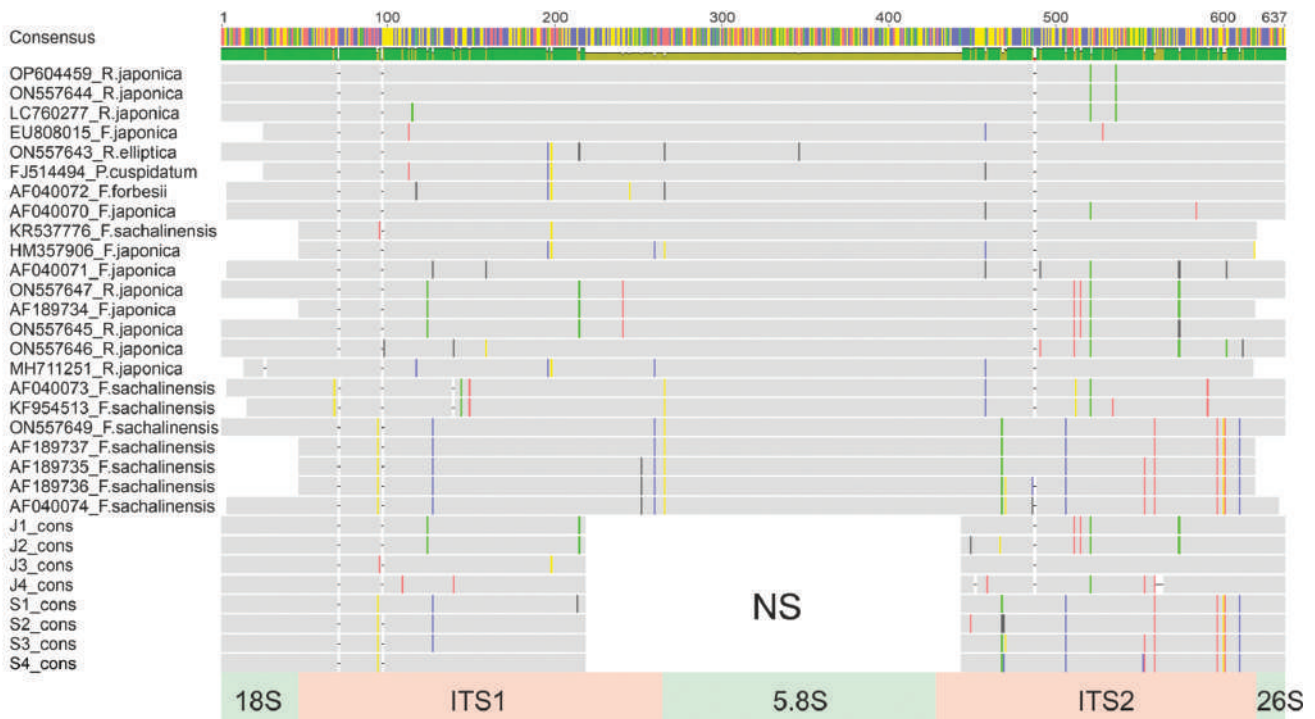


Рис. 3. Вирівнювання консенсусних послідовностей основних варіантів ділянки ITS1-2 (J1-J4, S1-S4) чотирьох зразків *Reynoutria* та послідовностей ITS1-2 зразків роду *Reynoutria* з бази даних GenBank. NS – несеквенована ділянка

риманих для зразка ReJap2 з Румунії. В той же час, підклас J4 складає 2 % в геномі зразка ReSac4 *R. sachalinensis*. Загалом, сумарний вміст типових для *R. japonica* підкласів J1-J4 в геномах зразків *R. sachalinensis* становить 13 і 9 % для ReSac1 і ReSac2, відповідно. Водночас, типові для *R. sachalinensis* послідовності підкласів S1-S3 знайдено у геномі *R. japonica*, ReJap2 (10 % – рис. 2). Таким чином, для всіх чотирьох проаналізованих нами зразків роду

Reynoutria виявлений внутрішньогеномний поліморфізм за послідовністю спейсерів ITS1 та ITS2. При цьому досліджені зразки відрізняються за відносним вмістом у геномі мажорних та мінорних варіантів ITS1-2.

Як було показано раніше з використанням технології піросеквенування, у геномах різних груп рослин в середньому наявні по три мажорні варіанти або підкласи ITS1-2 (Song et al, 2012). В якості мажорних розглядалися ва-

ріанти, відносний вміст яких становить принаймні 5 %. Подібна картина спостерігалась і у наших експериментах: для зразків *R. japonica* кількість мажорних підкласів складає два для ReJap1 та три для ReJap2. Для *R. sachalinensis* цей показник є дещо вищим і становить шість та п'ять, відповідно, для ReSac1 та ReSac4.

Привертає увагу, що деякі варіанти послідовностей ITS1-2, характерні для одного з досліджених видів, можуть бути присутні і у геномі іншого виду, що можна пояснити міжвидовою гібридизацією, яка була описана для роду *Reynoutria* (Bailey & Wisskirchen, 2004). Збереження батьківських варіантів повторів 35S рДНК у гібридних форм може бути пов'язано з відносно нещодавною гібридизацією та/або з низькою ефективністю гомогенізації повторів рДНК, які знаходяться на негомологічних хромосомах у поліплоїдних геномах (Volkov et al, 2007; Wang et al, 2023). Раніше ефективність використання ITS1-2 35S рДНК (Hugall et al, 1999; Ritz et al, 2005) та IGS 5S рДНК (Ishchenko et al, 2018; Ishchenko et al, 2021; Cardoni et al, 2022; Scoppola et al, 2022; Tynkevich et al, 2022a; Tynkevich et al, 2023) для відстеження ретикулярної еволюції була продемонстрована для різних груп рослин.

Використання ділянок ITS1-2 для ДНК-баркодингу та філогенетичного аналізу видів роду *Reynoutria*. Ми провели порівняння послідовностей, отриманих нами при сиквенованні ампліконів, з послідовностями ITS1-2, які доступні в базі даних GenBank для представників роду *Reynoutria*. Серед 23-х послідовностей з GenBank 12 анотовані як *Fallopia japonica* або *R. japonica*, а 8 — як *Fallopia sachalinensis*. Послідовності ще трьох зразків були анотовані під іншими таксономічними назвами: *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc. *R. elliptica* (Koidz.) Migo ex Nakai та *F. forbesii* (Hance) Yonek. & H. Ohashi. *P. cuspidatum* вважається синонімом до *R. japonica*, тоді як *R. elliptica* та *F. forbesii* є синонімами іншої визнаної видової назви *R. forbesii* (Hance) T. Yamaz. (WFO, 2024; POWO, 2024). В подальшому в описі результатів ми будемо використовувати лише визнані таксономічні назви.

Вирівнювання отриманих нами консенсусних послідовностей восьми підкласів ITS1-2 (J1-J4 та S1-S4) та 23-послідовностей з Gen-

Bank мало загальну довжину 637 нп (рис. 3). У невеликих фрагментах 18S і 26S CDS, які присутні у частині порівнюваних послідовностей, нуклеотидних замін не знайдено. У послідовностях 5.8S CDS з бази даних GenBank знайдена лише одна поліморфна позиція, транзиція А→Г. Для наших зразків ця ділянка сиквенована не була. На загал отримані дані цілком згоджуються з уявленнями про консервативність кодувальних ділянок у складі 35S рДНК.

У наших експериментах ми отримали майже повні послідовності обох ITS, за виключенням фрагментів довжиною 47 нп для ITS1 та 13 нп для ITS2, які межують із 5.8S CDS. В цих втрачених фрагментах наявно всього чотири нуклеотидні заміни, три з яких є парсимоній інформативними. Водночас, просиквеновані фрагменти ITS містять 16 варіабельних і 11 парсимоній інформативних позицій у ITS1 та, відповідно, 28 і 17 — у ITS2.

Для побудови філогенетичного дерева у якості зовнішніх груп використали послідовності ITS1-2 трьох видів роду *Fallopia* Adans., а також *Muehlenbeckia australis* (G. Forst.) Meisn. На отриманій ML-дендрограмі послідовності роду *Reynoutria* утворюють монофілетичну кладу з високою статистичною підтримкою (рис. 4). Клада *Reynoutria* розпадається на дві великі клади, перша з яких об'єднує виключно послідовності *R. sachalinensis*. В межах цієї клади групуються всі чотири консенсусні послідовності підкласів S1-S4 з геномів двох українських зразків *R. sachalinensis* та п'ять послідовностей з бази даних GenBank. Відповідно, цю кладу ми назвали «sachalinensis», тоді як інша велика клада отримала назву «japonica».

Клада «japonica», в свою чергу, розпадається на чотири субклади. В першій з них розташовані три зразки *R. japonica* з території Китаю, два зразки *R. forbesii* та один зразок із США, анотований як *R. sachalinensis*. Відповідно, ми назвали цю субкладу «forbesii» (рис. 4). До цієї субклади також належить консенсусна послідовність підкласу J3, одного з основних варіантів ITS у геномах українських зразків *R. japonica*.

Друга субклада включає два зразки *R. japonica* var. *compacta* з Японії та Кореї, тобто з природньої частини ареалу, а також зразок,

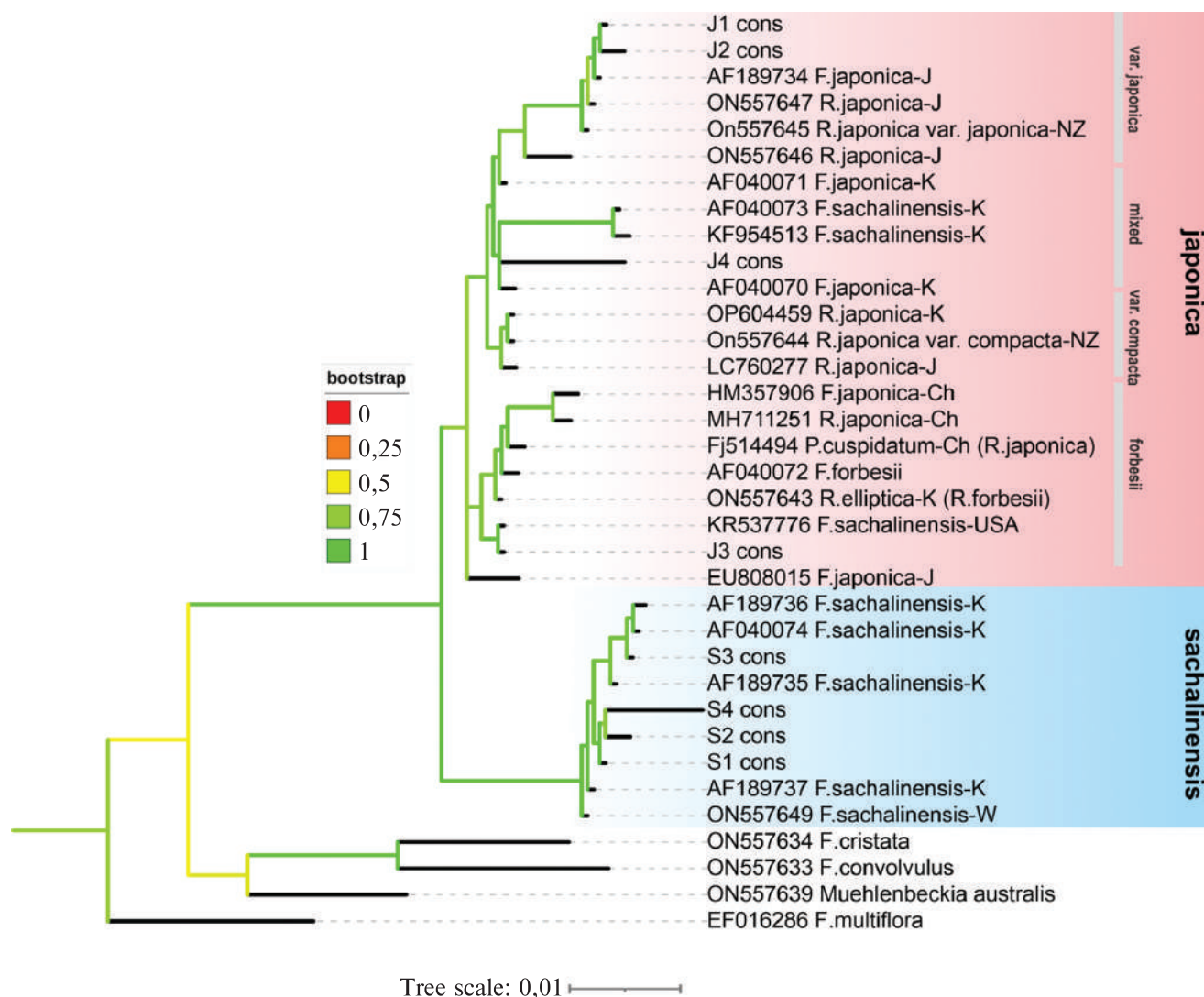


Рис. 4. Філогенетична дендрограма, отримана методом Maximum likelihood при порівнянні послідовностей ITS1-2 представників роду *Reynoutria*. Колір гілок на дереві відповідає значенням статистичної bootstrap підтримки відповідних груп (див. легенду). Наведено реєстраційні номери послідовностей у базі даних GenBank та географічне походження зразків (Ch – Китай; J – Японія; K – Корея; NZ – Нова Зеландія; W – Уельс, Великобританія; USA – Сполучені штати Америки)

анотований як *R. japonica* var. *compacta* (Hook.f.) Moldenke з інвазійної частини ареалу у Новій Зеландії. Всі три зразки є близькосторідними за послідовністю ділянки ITS1-2. Цю субкладу ми назвали «var. compacta».

Третя субклада об'єднує одну послідовність *R. japonica* та дві послідовності *R. sachalinensis* з GenBank, а також консенсусну послідовність мінорного підкласу J4, який був знайдений в геномах українських зразків ReJap1 і ReSac4. Цікаво, що підклас J4 представлений

на дендрограмі ізольованою довгою гілкою, тобто він помітно відрізняється від усіх інших досліджених послідовностей. З огляду на те, що у третій субкладі присутні послідовності, які представляють два різні види, вона отримала назву «змішана» («mixed»).

Четверта субклада об'єднує зразки *R. japonica* з Кореї та Японії, а також зразок з Нової Зеландії, анотований як *R. japonica* var. *japonica*. З огляду на це, ми назвали цю субкладу «var. japonica». Два варіанти ITS, J1 і J2, на які

припадає 80 та 59 % повторів у геномах зразків ReJap1 та ReJap2, відповідно, також локалізуються у четвертій субкладі. Всі послідовності в цій субкладі показують високу подібність і видаються типовими для різновиду *japonica*.

Загалом, філогенетичний аналіз виявив значні генетичні дистанції між зразками різних видів, *R. sachalinensis* і *R. japonica*. Відповідно, видовий статус цих таксонів не викликає сумнівів. Проте, слід зазначити, що три зразки анотовані у GenBank як *R. sachalinensis* на дендрограмі розміщуються в межах клади «*japonica*» (субклади «*forbesii*» та «*mixed*» – рис. 4). Найпростішим поясненням цього може бути помилкове визначення видової приналежності цих зразків. Іншим поясненням може бути те, що ці три зразки, анотовані у GenBank як *R. sachalinensis*, в дійсності являють собою гібридні форми між цим видом та *R. japonica*.

Два таксони, *R. forbesii* (POWO, 2024; WFO, 2024) та *R. compacta* (POWO, 2024), які інколи розглядаються як окремі види, при порівнянні послідовностей ITS1-2 демонструють високу подібність до *R. japonica* і, на нашу думку, можуть трактуватися скоріше як підвиди.

Консенсусні послідовності J1-J4 основних варіантів/підкласів ITS1-2, які присутні в геномах українських зразків *R. japonica*, на дендрограмі показують спорідненість із зразками з GenBank, які мають різне географічне походження (рис. 4). Можливим поясненням такої картини може бути те, що на територію України було неодноразово завезено декілька зразків цього виду з різних частин природного ареалу. Альтернативне пояснення полягає у тому, що для зразків з GenBank були сиквензовані лише основні (мажорні) варіанти ITS1-2, присутні в геномі. Для того, щоб остаточно підтвердити одне з цих пояснень, необхідні додаткові дослідження внутрішньогеномного поліморфізму ITS1-2 для більшої кількості зразків видів роду *Reynoutria*, які мають різне географічне походження.

Висновки. У видів роду *Reynoutria* послідовності спейсерних ділянок 35S рДНК, ITS1 та ITS2, представлені кількома мажорними та мінорними підкласами/варіантами, що свідчить про їх неповну гомогенізацію за дії механізмів концертної еволюції. Кількість мажорних варіантів коливається від двох у *R. japonica*

до шести *R. sachalinensis*. Набір та відносний вміст у геномі варіантів ITS1-2 можуть відрізнятися у представників різних популяцій. Варіанти ITS1-2, які широко представлені у геномі одного виду, можуть бути присутні у малій кількості у іншого виду, що вказує на імовірну міжвидову гібридизацію. Оцінка внутрішньогеномного поліморфізму ITS1-2 є необхідною при проведенні баркодингу та реконструкції філогенезу таксонів низького рівня, зокрема для виявлення випадків міжвидової гібридизації.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і хребетних тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження проводились за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (грант № 0124U000591).

INTRAGENOMIC POLYMORPHISM OF THE ITS1-5.8S-ITS2 REGION IN INVASIVE SPECIES OF THE GENUS *REYNOUTRIA*

Y.O. Tynkevich, D.V. Yakobyshen,
A.S. Cherkazianova, A.Y. Shelyfist, R.A. Volkov

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Kotsiubynsky str. 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine
E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

The ITS1-5.8S-ITS2 (ITS1-2) region of the 35S rDNA is widely used for molecular barcoding and in phylogenetics of plants. Due to concerted evolution, all copies of 35S rDNA in eukaryotic genomes are thought to be effectively homogenized. However, the existence of intragenomic polymorphism of the ITS1-2 region in plant genomes has recently been demonstrated, which may be a consequence of hybridization within or between species. In this study, the intragenomic polymorphism of the ITS1-2 region was evaluated using Illumina amplicon sequencing in accessions of two invasive species of the genus *Reynoutria*, *R. japonica* and *R. sachalinensis*, from Ukraine and Romania. Hybridization between these species can lead to the emergence of more aggressive invasive forms. The ITS1-2 sequences of the species studied were found to be represented by some major and minor subclasses/variants, indicating their incomplete homogenization. The number of major variants ranges from two in *R. japonica* to six in *R. sachalinensis*. ITS1-2 variants that are widespread in the genome of one species may be present at low

levels in another species, indicating possible interspecies hybridization. The obtained results indicate that ITS1-2 intragenomic polymorphism must be taken into account when performing barcoding, reconstructing the phylogeny of low-level taxa, and for the identification of hybrid forms.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ainouche AK, Bayer RJ (1999) Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Am J Bot* 86(4):590–607. <http://doi.org/10.2307/2656820>
- Alanagreh LA, Pegg C, Harikumar A, Buchheim M (2017) Assessing intragenomic variation of the internal transcribed spacer two: Adapting the Illumina metagenomics protocol. *PLoS One* 12(7):e0181491. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0181491>
- Alix K, Gérard PR, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (2017) Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. *Ann Bot* 120(2):183–194. <http://doi.org/10.1093/aob/mcx079>
- Álvarez I, Wendel J (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol* 29(3):417–434
- Bailey J, Wisskirchen R (2004) The distribution and origins of *Fallopia* × *bohemica* (Polygonaceae) in Europe. *Nord J Bot* 24(2):173–199
- Borowska-Zuchowska N, Hasterok R (2017) Epigenetics of the preferential silencing of *Brachypodium stacei*-originated 35S rDNA loci in the allotetraploid grass *Brachypodium hybridum*. *Sci Rep* 7(1):5260. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-05768-3>
- Cardoni S, Piredda R, Denk T, Grimm GW, Papageorgiou AC, Schulze ED, Scoppola A, Salehi Shanjani P, Suyama Y, Tomaru N, Worth JRP, Simeone CM (2022) 5S-IGS rDNA in wind-pollinated trees (*Fagus* L.) encapsulates 55 million years of reticulate evolution and hybrid origins of modern species. *Plant J* 109(4):909–926. <http://doi.org/10.1111/tpj.15601>
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34(17):i884–i890. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- China Plant BOL Group; Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW (2011) Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 108(49):19641–19646. <http://doi.org/10.1073/pnas.1104551108>
- Clements DR, Jones VL (2021) Rapid evolution of invasive weeds under climate change: present evidence and future research needs. *Front Agron* 3:664034. <http://doi.org/10.3389/fagro.2021.664034>
- Elder JF Jr, Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* 70(3):297–320. <http://doi.org/10.1086/419073>
- Gao L, Cai M, Zeng L, Zhang Q, Zhu H, Gu X, Peng C (2022) Adaptation of the invasive plant (*Sphagnetica trilobata* L. Pruski) to a high cadmium environment by hybridizing with native relatives. *Front Plant Sci* 13:905577. <http://doi.org/10.3389/fpls.2022.905577>
- Graham SW, Reeves PA, Burns AC, Olmstead RG (2000) Microstructural changes in noncoding chloroplast DNA: interpretation, evolution, and utility of indels and inversions in basal angiosperm phylogenetic inference. *Int J Plant Sci* 161(S6):S83–S96. <http://doi.org/10.1086/317583>
- Heeger F, Wurzbacher C, Bourne EC, Mazzoni CJ, Monaghan MT (2019) Combining the 5.8S and ITS2 to improve classification of fungi. *Methods Ecol Evol* 10(10):1702–1711. <http://doi.org/10.1111/2041-210X.13266>
- Henderson L, Wilson JR (2017) Changes in the composition and distribution of alien plants in South Africa: An update from the Southern African plant invaders atlas. *Bothalia* 47(2):1–26. <http://doi.org/10.4102/abc.v47i2.2172>
- Hollingsworth ML, Bailey JP (2000) Hybridisation and clonal diversity in some introduced *Fallopia* species (Polygonaceae). *Watsonia* 23(1):111–122
- Hugall A, Stanton J, Moritz C (1999) Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. *Mol Biol Evol* 16(2):157–164. <http://doi.org/10.1093/oxford-journals.molbev.a026098>
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23(2):254–267. <http://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- Irimia RE, Hierro JL, Branco S, Sotes G, Cavieres LA, Eren Ö, Lortie CJ, French K, Callaway RM, Montesinos D (2021) Experimental admixture among geographically disjunct populations of an invasive plant yields a global mosaic of reproductive incompatibility and heterosis. *J Ecol* 109(5):2152–2162. <http://doi.org/10.1111/1365-2745.13628>
- Ishchenko OO, Bednarska IO, Panchuk II (2021) Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol Genet* 55(1):10–18. <http://doi.org/10.3103/S0095452721010096>
- Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO, Kunakh VA, Volkov RA (2018) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol Genet* 52(6):416–421. <http://doi.org/10.3103/S0095452718060105>
- Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME (2002) Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to

- detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 40(1):87–109. <http://doi.org/10.1080/mmy.40.1.87.109>
- Jugieau E, Talmot V, Staentze C, Noir S, Hardion L (2024) A knot of hybrids: Differentiating Asian knot-weeds in North-Eastern France using genetic, cytological, and morphological data. *J Sys Evol* 00(0):1–9. <http://doi.org/10.1111/jse.13075>
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30(4):772–780. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kolter A, Gemeinholzer B (2021) Internal transcribed spacer primer evaluation for vascular plant metabarcoding. *Metabarcoding Metagenomics* 5:e68155. <http://doi.org/10.3897/mbmg.5.68155>
- Komarova NY, Grimm GW, Hemleben V, Volkov RA (2008) Molecular evolution of 35S rDNA and taxonomic status of *Lycopersicon* within *Solanum* sect. *Petota*. *Plant Syst Evol* 276(1):59–71. <http://doi.org/10.1007/s00606-008-0091-2>
- Krebs C (2009) Hybridization in the invasive *Fallopia* complex and its influence on sexual reproduction and herbivore resistance. <http://doi.org/10.17192/z2010.0360>
- Leblond-Bourget N, Philippe H, Mangin I, Decaris B (1996) 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int J Syst Evol Microbiol* 46(1):102–111. <http://doi.org/10.1099/00207713-46-1-102>
- Mandák B, Pyšek P, Lysák M, Suda J, Krahulcova A, Bímová K (2003) Variation in DNA-ploidy levels of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic. *Ann Bot* 92(2):265–272. <http://doi.org/10.1093/aob/mcg141>
- Matthee CA, Eick G, Willows-Munro S, Montgelard C, Pardini AT, Robinson TJ (2007) Indel evolution of mammalian introns and the utility of non-coding nuclear markers in eutherian phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol* 42(3):827–837. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.002>
- Meng L, Gao Y, Gong L (2022) Recombination and incomplete concerted evolution of the ribosomal 18S (partial)-ITS1-5.8 S-ITS2-28S (partial) rDNA in *Cynoglossus trigrammus* genome. *Biochem Syst Ecol* 105:104513. <http://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104513>
- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Von Haeseler A, Lanfear R (2020) IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol* 37(5):1530–1534. <http://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Mishra S, Sharma G, Das MK, Pande V, Singh OP (2021) Intragenomic sequence variations in the second internal transcribed spacer (ITS2) ribosomal DNA of the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One* 16(6):e0253173. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0253173>
- Mounger J, Ainouche ML, Bossdorf O, Cavé-Radet A, Li B, Parepa M, Salmon A, Yang J, Richards CL (2021) Epigenetics and the success of invasive plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 376(1826):20200117. <http://doi.org/10.1098/rstb.2020.0117>
- Musiał K, Pagitz K, Gudžinskas Z, Łazarski G, Pliszko A (2020) Chromosome numbers in hybrids between invasive and native *Solidago* (Asteraceae) species in Europe. *Phytotaxa* 471(3):273–282. <http://doi.org/10.11646/phytotaxa.471.3.8>
- Naidoo K, Steenkamp ET, Coetzee MP, Wingfield MJ, Wingfield BD (2013) Concerted evolution in the ribosomal RNA cistron. *PLoS One* 8(3):e59355. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059355>
- Nieto Feliner G, Gutiérrez Larena B, Fuertes Aguilar J (2004) Fine-scale geographical structure, intra-individual polymorphism and recombination in nuclear ribosomal internal transcribed spacers in *Armeria* (Plumbaginaceae). *Ann Bot* 93(2):189–200. <http://doi.org/10.1093/aob/mch027>
- Osuna-Mascary C, de Casas RR, Berbel M, Gyme JM, Perfectti F (2022) Lack of ITS sequence homogenization in congeneric plant species with different ploidy levels. *BioRxiv* 2022–05. <http://doi.org/10.1101/2022.05.29.493735>
- Piredda R, Grimm GW, Schulze ED, Denk T, Simeone MC (2021) High-throughput sequencing of 5S-IGS in oaks: Exploring intragenomic variation and algorithms to recognize target species in pure and mixed samples. *Mol Eco Resour* 21(2):495–510. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13264>
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15(1):8–15. <http://doi.org/10.1007/BF02772108>
- POWO (2024) Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
- Reynoutria* Hoult. in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset. accessed via GBIF org on 2024-05-14. <http://doi.org/10.15468/39omei>
- Ritz CM, Schmuths H, Wissemann V (2005) Evolution by reticulation: European dogroses originated by multiple hybridization across the genus *Rosa*. *J Hered* 96(1):4–14. <http://doi.org/10.1093/jhered/esi011>
- Rogers SO, Bendich AJ (1987) Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol Biol* 9(5):509–520. <http://doi.org/10.1007/BF00015882>
- Rosato M, Kovařík A, Garilleti R, Rosselli JA (2016) Conserved organisation of 45S rDNA sites and rDNA gene copy number among major clades of early land plants. *PLoS One* 11(9):e0162544. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0162544>
- Ruhsam M, Kohn D, Marquardt J, Leitch AR, Schnei-

- der H, Vogel J, Barrett SCH, Hulme PE, Squirrel J, Hollingsworth PM (2023) Is hybridisation with non-native congeneric species a threat to the UK native bluebell *Hyacinthoides non-scripta*? *Plants People Planet* 5(6):963–975. <http://doi.org/10.1002/ppp3.10387>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(16):6241–6246. <http://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Scoppola A, Cardoni S, Marcussen T, Simeone MC (2022) Complex scenarios of reticulation, polyploidization, and species diversity within annual pansies of subsect. *Bracteolatae* (*Viola* sect. *Melanium*, *Violaceae*) in Italy: Insights from 5S-IGS high-throughput sequencing and plastid DNA variation. *Plants* 11(10):1294. <http://doi.org/10.3390/plants11101294>
- Shao Y, Zhang M, Xu Y, Zhu YQ, Yonezawa T, Wang YG, Song ZP, Zhang WJ (2018) An improved metagenomic strategy reveals an unprecedentedly high level of intragenomic polymorphism of ribosomal DNA in three species of *Camellia*. *J Syst Evol* 56(3):250–258. <http://doi.org/10.1111/jse.12314>
- Shen W, Le S, Li Y, Hu F (2016) SeqKit: a cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PLoS One* 11(10):e0163962. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>
- Shevera MV (2017) *Reynoutria × bohemica* (Polygonaceae), a potentially invasive species of the Ukrainian flora. *Ukr Bot J* 74(6):548–555
- Simon UK, Trajanoski S, Kroneis T, Sedlmayr P, Guelly C, Guttenberger H (2012) Accession-specific haplotypes of the internal transcribed spacer region in *Arabidopsis thaliana* — a means for barcoding populations. *Mol Biol Evol* 29(9):2231–2239. <http://doi.org/10.1093/molbev/mss093>
- Song J, Shi L, Li D, Sun Y, Niu Y, Chen Z, Luo H, Pang X, Sun Z, Liu C, Lv A, Deng Y, Larson-Rabin Z, Wilkinson M, Chen S (2012) Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA. *PLoS One* 7(8):e43971. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043971>
- Tang L, Tang JM, Tan S, Li J, Ma X, Zhou ZQ (2015) ITS sequence variation and concerted evolution in the natural hybrid species *Malus toringoides*. *Nord J Bot* 33(1):109–119. <http://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2012.00108.x>
- Tynkevich YO, Novikov AV, Chorney II, Volkov RA (2022a) Organization of the 5S rDNA intergenic spacer and its use in the molecular taxonomy of the genus *Aconitum* L. *Cytol Genet* 56(6):494–503. <http://doi.org/10.3103/S0095452722060111>
- Tynkevich YO, Shelyfist AY, Kozub LV, Hemleben V, Panchuk II, Volkov RA (2022b) 5S ribosomal DNA of genus *Solanum*: molecular organization, evolution, and taxonomy. *Front Plant Sci* 13:852406. <http://doi.org/10.3389/fpls.2022.852406>
- Tynkevich YO, Valin MO, Moysiienko II, Panchuk II, Volkov RA (2023) 5S ribosomal DNA in the family Plumbaginaceae. *Cytol Genet* 57(6):524–537. <http://doi.org/10.3103/S0095452723060099>
- Uemura R, Asakawa A, Fujii S, Matsuo A, Suyama Y, Maki M (2022) Can *Rumex madaio* (Polygonaceae) be threatened by natural hybridization with an invasive species in Japan. *Nord J Bot* 2022(5):e03543. <http://doi.org/10.1111/njb.03543>
- Vijayan K, Chung MC, Tsou CH (2012) Dispersion of rDNA loci and its implications on intragenomic variability and phylogenetic studies in *Camellia*. *Sci Hortic* 137:59–68. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.01.021>
- Volkov RA, Komarova NY, Hemleben V (2007) Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression. *Syst Biodivers* 5(3):261–276. <http://doi.org/10.1017/S1477200007002447>
- Volkov RA, Kozeretska IA, Kyrachenko SS, Andreev IO, Maidanyuk DN, Parnikova IY, Kunakh VA (2010) Molecular evolution and variability of ITS1–ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the maritime Antarctic. *Polar Sci* 4(3):469–478. <http://doi.org/10.1016/j.polar.2010.04.011>
- Wang W, Zhang X, Garcia S, Leitch AR, Kovařík A (2023) Intragenomic rDNA variation — the product of concerted evolution, mutation, or something in between? *Heredity* 131(3):179–188. <http://doi.org/10.1038/s41437-023-00634-5>
- Wang X, Chen X, Yang P, Wang L, Han J (2017) Barcoding the *Dendrobium* (Orchidaceae) species and analysis of the intragenomic variation based on the internal transcribed spacer 2. *Biomed Res Int* 2017:7317632. <http://doi.org/10.1155/2017/2734960>
- Weitemier K, Straub SC, Fishbein M, Liston A (2015) Intragenomic polymorphisms among high-copy loci: a genus-wide study of nuclear ribosomal DNA in *Asclepias* (Apocynaceae). *PeerJ* 3:e718. <http://doi.org/10.7717/peerj.718>
- WFO World Flora Online (2023) Available from: <http://www.worldfloraonline.org/> (accessed 17 May 2024)
- Wu HY, Wong KL, Law ST, Nong W, Chan KT, Hui JH, Lin G, Chan WH, Shaw PC (2024) Determination of ITS1 haplotypes of *Fritillariae cirrhosae* bulbous by amplicon sequencing. *Chin Med* 19(1):33. <http://doi.org/10.1186/s13020-024-00911-3>

Надійшла в редакцію 17.06.2024
Після доопрацювання 03.07.2024
Прийнята до друку 18.11.2024