

РОЗРОБКА СИСТЕМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДЕТЕКЦІЇ АРГЕМОНИ (*ARGEMONE* spp.)

Г.І. СЛІЩУК, Н.Е. ВОЛКОВА, О.О. ЗАХАРОВА

ТОВ «КОТЕКНА УКРАЇНА ЛІМІТЕД»

140-А, вул. Люстдорфська дорога, Одеса, 65114, Україна

E-mail: natalia.volkova@cotecna.com

Автор для кореспонденції – Волкова Н.Е., e-mail: natalia.volkova@cotecna.com

Аналіз нуклеотидних послідовностей представників роду Аргемона за допомогою біоінформатичних методів спрямований на дослідження філогенетичних взаємовідносин видів в межах роду, на розробку родо-специфічних пар праймерів і TaqMap-зонду і перевірку їх *in silico*. Молекулярно-генетичні дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі «реального часу» (РЧ-ПЛР) присвячені перевірці «працездатності» та специфічності розробленої системи праймерів і TaqMap-зонду з використанням зразків восьми видів аргемони і 11 видів інших рослин. Філогенетичний аналіз з використанням послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера 1 (ITS1) підтвердив попередні філогенетичні дослідження та покращив розуміння взаємозв'язків усередині роду. Перед *in vitro*-перевіркою розробленої системи праймерів і TaqMap-зонду проведено перевірку здатності екстрагованої ДНК до ампліфікації методом РЧ-ПЛР з використанням системи праймерів та TaqMap-зонду до гену 18S rRNA еукаріот для виключення псевдонегативних результатів при подальшій перевірці специфічності. Проведено добір умов РЧ-ПЛР, а саме температур та часу денатурації, гібридизації та елонгації, кількості циклів. Розроблена система праймерів і TaqMap-зонду для РЧ-ПЛР-методу продемонструвала родоспецифічність і високу чутливість. Відмічено ампліфікацію тільки в зразках ДНК восьми видів аргемони, тоді як при ПЛР-аналізі інших видів рослин та негативних контролів ампліфікація відсутня. Визначено межу детектування розробленої системи, яка склала 0,01 %. Запропоновано дану маркерну систему використовувати для виявлення фальсифікації у харчових та інших продуктах, зокрема, виявлення в гірчичній олії контамінацію аргемоною.

Ключові слова: Аргемона, біоінформатика, ПЛР у реальному часі, молекулярна детекція.

Вступ. Аргемона (лат. *Argemone*) — род трав'янистих рослин родини Макові (лат. Рара-

veraceae) налічує 32 види, типовим є вид Аргемона мексиканська (*A. mexicana* L.) (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30017455-2>).

Род *Argemone* включає дикорослі види, які мають велике значення в традиційній медицині завдяки біологічній активності вторинних метаболітів, головним чином алкалоїдам (Slisshchuk et al, 2023), розподіленим у всіх тканинах рослини. Крім того, насіння аргемони містить велику кількість олії (30–40 %). В зв'язку з цим в науковій літературі обговорюється потенціал цього роду як неїстівного джерела для виробництва багатоцільової сировини та недорогої культури, наприклад, для виробництва біопалива (Martínez-Delgado et al, 2022). До переваг роду також відноситься той факт, що аргемона росте на бідних ґрунтах з низькими потребами у воді та поживних речовинах. За даними літератури рослини роду Аргемона мають великий потенціал і є економічним та екологічно чистим кандидатом для виробництва високоцінних фармацевтичних продуктів, для деяких промислових цілей, таких як виробництво мила та мастильних матеріалів, для виробництва біодизелю, а також для боротьби зі шкідниками рослин (Khan, 2018; Denou et al, 2020).

Але незважаючи на значення аргемонової олії в традиційній медицині для лікування різних захворювань, ця олія отруйна для тварин і людей через наявність токсичних алкалоїдів, таких як сангвінарин (*sanguinarine*) і дигідросангвінарин (*dihydrosanguinarine*), при попаданні в організм при поїданні або через шкіру. Отже завдяки токсичній природі використання аргемонової олії як харчового інгредієнта заборонено в багатьох країнах (Mandal et al, 2018).

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2024

Симптоми отруєння аргемоновою олією можуть відрізнятися залежно від кількості спожитої олії та індивідуальної чутливості, але зазвичай впродовж кількох годин після вживання з'являються: біль у шлунку, блювота та діарея, запаморочення та сплутаність свідомості, галюцинації, подразнення очей, респіраторні симптоми (кашель, утруднене дихання та стиснення в грудях). Отрута може призвести до конвульсій, коми і навіть смерті у важких випадках. Отруєння олією аргемони в основному спричинене споживанням або вдиханням олії або продуктів, отриманих із рослини. Одним із способів, яким це може статися, є вживання фальсифікованої олії, наприклад, гірчиної олії, в якій аргемонова олія використовується як допоміжна речовина (Anjana, Sarangi, 2021).

Отже важлива своєчасна детекція аргемони в різних продуктах, зокрема, у харчових оліях. Існує кілька лабораторних тестів (тест на азотну кислоту, тест на хлорид заліза, тест на ацетат міді), недоліками яких, зокрема, є можливість виявити тільки високі концентрації (вище 0,25 %) та значна кількість хибнопозитивних результатів. Більш чутливим методом є метод паперової хроматографії, за допомогою якого можливо виявити до 0,0001 % аргемонової олії. Але цей процес трудомісткий, часовитратний і складний, особливо при обробці великої кількості зразків (Lamba, Kaur, 2021). Сучасні методи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і, зокрема, її різновиду – ПЛР у режимі «реального часу», є більш ефективною альтернативою і можуть забезпечити високу специфічність, швидкість, точність, чутливість, можливість автоматизації.

Молекулярно-генетичні дослідження аргемони методом РЧ-ПЛР, в основному, присвячені аналізу експресії генів, що кодують алкалоїди (Gesell et al, 2011; Vázquez-Flota et al, 2018). Мета наших досліджень полягала в аналізі нуклеотидних послідовностей представників роду Аргемона біоінформатичними методами, дизайні пари праймерів та зонду, специфічних до видів роду Аргемона, та перевірці *in vitro* специфічності добраних послідовностей.

Матеріали і методи. Рослинним матеріалом слугували вісім видів аргемони, три види цієї

ж родини Papaveraceae: *Chelidonium majus*, *Eschscholzia californica*, *Papaver croceum* та 11 видів інших рослин. Насіння зразків *Argemone mexicana*, *A. mexicana* subsp. *ochroleuca*, *A. squarrosa* subsp. *glabrata* люб'язно надано Національним ботанічним садом імені М.М. Гришка (Київ, Україна); насіння зразків *Arachis hypogaea*, *Argemone albiflora*, *A. aurantiaca*, *A. hispida*, *A. munita*, *A. polyanthemus*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus* spp., *Oryza sativa*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum* люб'язно надано Міністерством сільського господарства США (United States Department of Agriculture (USDA-ARS) Germplasm Resources Information Network (GRIN). Зразки *Glycine max* та *Zea mays* є сертифікованим референтним матеріалом European Reference Materials consortium (ЄС) та American Oil Chemists' Society (США), відповідно. Насіння *Chelidonium majus*, *Eschscholzia californica*, *Papaver croceum*, *Ricinus communis* є контрольними зразками ТОВ «КОТЕКНА УКРАЇНА ЛІМІТЕД».

Екстрагування та очищення ДНК виконували ЦТАБ-методом з 7-добових проростків (два повтори по 10 проростків) (Rogers, Bendich, 1989). Вимірювання концентрації та оцінку якості екстрагованої ДНК здійснювали методом спектрофотометрії на спектрофлуориметрі NanoDrop DeNovix DS-11 FX + («DeNovix», США).

Ампліфікацію здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі «реального часу» (РЧ-ПЛР) на термоциклері «QuantStudio 5 Real-Time PCR System» («Applied Biosystem», США) в двох повторах кожного зразка екстрагування. Температурно-часові умови ампліфікації: 10 хв 95 °С – перша денатурація і активація Taq-полімерази, 40 циклів 95 °С 15 с/60 °С 1 хв – зчитування флуоресцентного сигналу, температурний інкремент 1,6 °С/с. Реакційна суміш містила 1× iTaq Universal Probes Supermix («BioRad», США), по 150 нМ прямого та зворотного праймерів, 50 нМ зонду («Metabion», Німеччина), 250 нг ДНК.

Для оцінки можливої контамінації на стадіях екстрагування ДНК та ампліфікації використовували контроль порожнього екстрагування (для якого виконано всю процедуру екстрагування без додавання аналізованого зразка) та контроль реагентів ПЛР (суміш, що містить всі ПЛР-реагенти, крім ДНК).

Здатність екстрагованої ДНК до ампліфікації (тобто перевірку відсутності інгібіторів) оцінювали методом ПЛР в режимі «реального часу» з використанням TaqMan-системи праймерів та зонду до гену 18S rRNA еукаріот (Lopez-Calleja et al, 2014).

Матеріалом для біоінформатичних досліджень слугували 45 нуклеотидних послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсеру

1 (англ. internal transcribed spacer 1, ITS1) представників роду Аргемона та дві послідовності – *Papaver croceum* й *Meconopsis pseudointegrifolia* в якості зовнішніх таксонів, отримані з бази даних Національного центру біотехнологічної інформації (англ. National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (табл. 1). Ці послідовності використано для дослідження філогенетичних

Таблиця 1. Нуклеотидні послідовності ITS1 представників роду Аргемона та зовнішніх таксонів

Вид	Номер доступу нуклеотидних послідовностей ITS1 *
<i>Argemone albiflora</i> Hornem	AF057662.1, AF057663.1, AF057668.1, AF057670.1, AF057673.1, AF057685.1, AF057686.1
<i>A. albiflora</i> Hornem voucher TEX:W.Xiao 090515	JX078976.1
<i>A. arida</i> Rose	AF057664.1
<i>A. aurantiaca</i> Ownbey	AF057667.1
<i>A. arizonica</i> Ownbey	AF057665.1, AF057666.1
<i>A. corymbosa</i> subsp. <i>arenicola</i> Greene	AF057660.1
<i>A. corymbosa</i> subsp. <i>corymbosa</i> Greene	AF057661.1
<i>A. echinata</i> Ownbey	AF057671.1, AF057689.1
<i>A. fruticosa</i> Thurb. Ex. A. Gray	AF057650.1
<i>A. glauca</i> (Nutt. Ex Prain) Pope	AF057651.1
<i>A. grandiflora</i> Sweet	AF057674.1
<i>A. hispida</i> A. Gray	AF057675.1
<i>A. hunnemannii</i> A. Dietr.	AF057659.1
<i>A. mexicana</i> subsp. <i>mexicana</i> subsp. <i>mexicana</i> L.	AF057652.1, AF057653.1
<i>A. mexicana</i> subsp. <i>ochroleuca</i> Ownbey	AF057654.1
<i>A. mexicana</i> L. voucher FS012	MH734909.1
<i>A. mexicana</i> L. voucher TuTY1485	MH768272.1
<i>A. mexicana</i> L. specimen-voucher Yuan 2000607	AY328303.1
<i>A. munita</i> Durand & Hilg. isolate CBP197	MF963932.1
<i>A. munita</i> subsp. <i>argentea</i> Durand & Hilg.	AF057676.1
<i>A. munita</i> subsp. <i>gracilenta</i> Durand & Hilg.	AF057672.1
<i>A. munita</i> subsp. <i>robusta</i> Durand & Hilg.	AF057677.1
<i>A. platyceras</i> Link & Otto	AF057681.1
<i>A. pleiakantha</i> subsp. <i>ambigua</i> Greene	AF057683.1
<i>A. pleiakantha</i> subsp. <i>pinnatisecta</i> Greene	AF057682.1
<i>A. pleiakantha</i> subsp. <i>pleiakantha</i> Greene	AF057684.1
<i>A. rosea</i> Hook.	AF057658.1
<i>A. rotundata</i> Rydb.	AF057678.1, AF057679.1
<i>A. squarrosa</i> Greene	AF057688.1
<i>A. subfusiformis</i> Ownbey	AF057656.1
<i>A. subinermis</i> (Fedde) Sorarú	AF057657.1
<i>A. subintegrifolia</i> Ownbey	AF057647.1
<i>A. superba</i> Ownbey	AF057655.1
<i>A. turnerae</i> subsp. <i>ownbeyana</i> A.M. Powell	AF057649.1
<i>A. turnerae</i> subsp. <i>turnerae</i> A.M. Powell	AF057648.1
<i>Papaver croceum</i> Ledeb.	DQ250266.1
<i>Meconopsis pseudointegrifolia</i> Prain	MH293152.1

Примітка. * Дата пошуку 08.07.2024 р.

взаємозв'язків та розробки дизайну праймерів і зонду для РЧ-ПЛР.

Побудову філогенетичної дендрограми за результатами вирівнювання проводили методом максимальної правдоподібності і моделі Тамури-Неї за допомогою програми «MEGA11» (ліцензія не потрібна) (Tamura, Nei, 1993; Tamura et al, 2004; Tamura et al, 2021). Глобальне вирівнювання здійснювали за допомогою підпрограми «clustalW» програми «MEGA 11». Дизайн праймерів та TaqMan-зонду здійснювали за допомогою програми «Primer3» (ліцензія не потрібна) (Untergasser et al, 2012).

Результати та обговорення. *Філогенетичний аналіз.* ITS1 є одним із найбільш популярних локусів у філогенетичних дослідженнях рослин, враховуючи консервативність регіону, простоту та високу економічну ефективність його секвенування (Edger et al, 2014). Регіон ITS1 має вищу дискримінаційну здатність і бажані характеристики для вирішення таксономічних проблем у рослин, що робить його локусом вибору для дослідження філогенетичних зв'язків (Mishra et al, 2016). Комплексне дослідження представників роду Аргемона за допомогою комбінації секвенування регіону ITS1 та вивчення морфологічних ознак дозволило уточнити філогенетичні взаємовідносини всередині роду, довести, що ознака одеревіння не є монофілетичною у роді, спростували уявлення про те, що у представників роду Аргемона колір квітки є адаптацією до специфічних запилювачів, підкреслити роль форми плода та вмісту алкалоїдів для делінеаризації видів (Schwarzbach, Kadereit, 1999). Це обумовило вибір даного регіону для наших досліджень.

Проведено вирівнювання 45 нуклеотидних послідовностей ITS1 регіону представників роду Аргемона, серед яких є 40 представників з дослідження (Schwarzbach, Kadereit, 1999), та побудована філогенетична дендрограма (рис. 1).

Філогенетична реконструкція в цілому співпадає із таксономією роду і морфологічними реконструкціями, за виключенням деяких відхилень. Так, зразки *A. munita* розподілилися одразу між трьома кластерами. Припускаємо, що зразок *A. munita* isolate CBP197 (MF963932.1) є некоректно ідентифікованим видом *A. squarrosa*, з яким вирівнювання показало майже

тотожність; розташування на дендрограмі зразка *A. munita* subsp. *robusta* (AF057677.1) вказує на доцільність виділення його в окремий вид. Також філогенетична реконструкція свідчить, що назви таксонів *A. superba* та *A. mexicana* слід вважати синонімами. Представники роду *Argemone* достовірно утворили окремий кластер, що підтверджується результатами бутстреп-тесту. Незважаючи на те, що послідовності ITS1 продемонстрували низькі значення бутстрепу (<50) у філогенетичному дереві представників роду *Argemone*, результати вирівнювання все ж підтверджують можливість використання ITS1 для детекції ДНК представників цього роду. Це свідчить про те, що ITS1 може слугувати ефективним маркером для виявлення ДНК представників роду *Argemone* за допомогою ПЛР. Характер мінливості цієї ділянки геному обмежує її застосування для достовірної реконструкції філогенії всередині роду, однак, для задач ідентифікації та детекції, ITS1 є цілком придатним. В результаті вирівнювання нуклеотидних послідовностей із представниками зовнішньої групи (*Papaver croceum* та *Meconopsis pseudointegrifolia*) знайдено ділянки, які унікальні саме для представників роду Аргемона, що дозволило розробити дизайн праймерів та TaqMan-зонду.

Дизайн праймерів і TaqMan-зонду та ПЛР in silico. Розроблено дизайн праймерів та TaqMan-зонду для аналізу ДНК представників роду Аргемона методом РЧ-ПЛР (AF057653.1) (рис. 2, табл. 2).

У ПЛР *in silico* продукт розміром 132 п.н. генерувався лише у представників роду Аргемона і не генерувався ані у представників родини Макові, ані у інших, філогенетично більш віддалених таксонів. Це свідчить про специфічність обраної системи праймерів і TaqMan-зонду.

Наступний етап дослідження — перевірка розробленого дизайну праймерів і TaqMan-зонду в РЧ-ПЛР *in vitro*.

РЧ-ПЛР in vitro. Здатність екстрагованої ДНК до ампліфікації оцінили методом РЧ-ПЛР з використанням системи праймерів та TaqMan-зонду до гену 18S rRNA еукаріот. Для всіх зразків ДНК рослин відмічено наявність ампліфікації (значення Cycle Threshold (Ct) варіювали

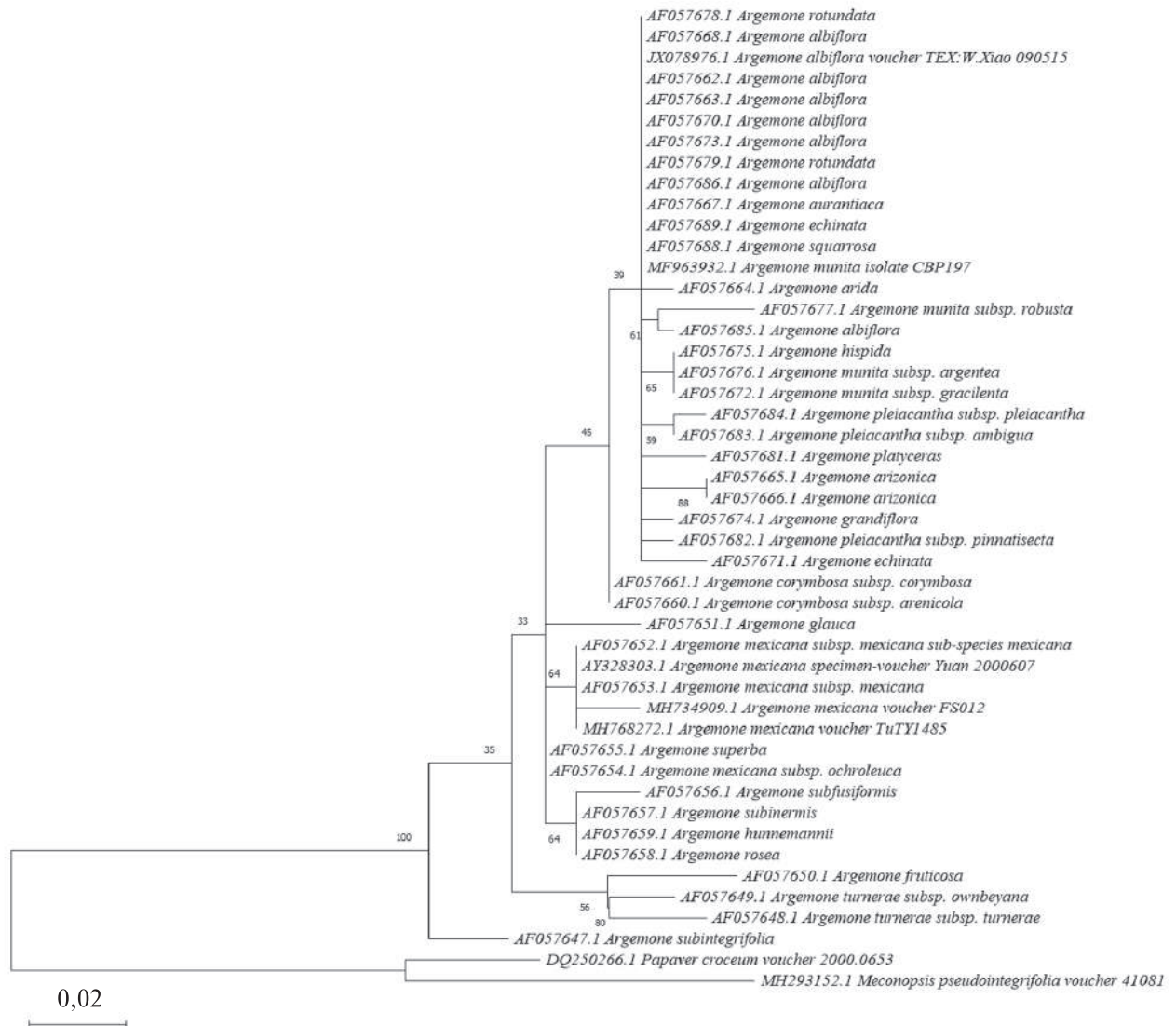


Рис. 1. Філодендрограма 45 представників роду Аргемона та двох представників зовнішніх таксонів. Еволюційна історія виведена за допомогою методу максимальної правдоподібності і моделі Тамури-Неї. Показано оптимальне дерево; масштаб гілок у тих же одиницях, що й еволюційні відстані, використані для висновку філогенетичного дерева. Продемонстровано дерево з найвищою логарифмічною правдоподібністю (–633.39). Відсоток дерев, у яких відповідні таксони групувалися разом, показаний поруч із гілками. Початкові дерева для евристичного пошуку отримані автоматично за алгоритмами Neighbor-Join і BioNJ до матриці парних відстаней, оцінених за моделлю Тамури-Неї, а потім з вибором топології з вищим значенням логарифмічної правдоподібності. Дерево накреслено в масштабі, де довжини гілок вимірюються в кількості замін на сайт. Всі позиції, що містять пропуски (гепи) і відсутні дані, вилучені (опція повного видалення). Кінцевий набір даних містив 152 позиції

в діапазоні 23–25), тоді як в негативних контролях ампліфікація відсутня. Отже, зразки ДНК придатні для подальшого аналізу за системою добраних праймерів і TaqMan-зонду, псевдонегативні результати при цьому будуть виключено.

Для перевірки *in vitro* добраних *in silico*-методами послідовностей праймерів і зонду

оцінювали їх родоспецифічність, тобто здатність виявляти тільки представників роду *Argemone*. Відмічено ампліфікацію тільки в зразках ДНК восьми видів аргемони (Ст 16,895–23,921, табл. 3), тоді як при ПЛР-аналізі інших видів рослин та негативних контролів ампліфікація відсутня.

	
	10 20 30 40 50
AF057653.1	CATTGTCGAA ACCTGCCTAG CAGAACGACC CGTGAACACG TGAAGCCAAG
	
	60 70 80 90 100
AF057653.1	TTCAGTGGGA CGGCAAGGGG AGTGATCCCA <u>TTCGCTTACCGCTTCGGCCG</u>
	
	110 120 130 140 150
AF0576 53.1	GGACTT <u>GGGT GTGAGCCCAC TGTTCTTTC</u> CGAACAACGA ACCCAAGGCG
	
	160 170 180 190 200
AF057653.1	CGGCAAGCGC CAAGGAACAA ACAACGGAA ACGACGCGGT <u>GCCCCCGTTC</u>
	
	210 220 230 240 250
AF057653.1	<u>TCTGGCCTCG GCGGGAGAGC</u> GACGGTGGCA TCGTGAACCA TCCGATCTCA

Рис. 2. Сайти праймерів (жирним шрифтом із підкресленням) та TaqMan-зонду (курсив із підкресленням) для аналізу ДНК представників роду *Аргемона* методом РЧ-ПЛР (AF057653.1)

Таблиця 2. Нуклеотидні послідовності (5'–3') праймерів та TaqMan-зонду для детекції представників роду *Аргемона*

Праймер/зонд	Умовна назва	Нуклеотидна послідовність (5'–3')	Позиція на ITS1 <i>Argemone mexicana</i> (AF057653.1), п.н.
Праймер прямий	AsppF	tgccctaccgcttcggcc	82–99
Праймер зворотний	AsppR	ccgccgaggccagagaacg	196–214
TaqMan-зонд	Aspp Probe	FAM-gggtgcgagcccactgttcc-TAMRA	107–126

Таблиця 3. Результати перевірки специфічності системи праймерів і TaqMan-зонду для детекції регіону ITS1 у різних видів рослин

Вид рослини родини Paraveraceae	Середнє значення Ct	Вид рослини інших родин	Середнє значення Ct
<i>Argemone albiflora</i>	22,016	<i>Arachis hypogaea</i>	—
<i>A. aurantiaca</i>	16,895	<i>Brassica napus</i>	—
<i>A. hispida</i>	24,487	<i>Glycine max</i>	—
<i>A. mexicana</i>	23,921	<i>Helianthus annuus</i>	—
<i>A. mexicana</i> subsp. <i>ochroleuca</i>	22,458	<i>Hordeum vulgare</i>	—
<i>A. munita</i>	17,672	<i>Lupinus spp.</i>	—
<i>A. polyanthemus</i>	20,015	<i>Oryza sativa</i>	—
<i>A. squarrosa</i> subsp. <i>glabrata</i>	21,051	<i>Ricinus communis</i>	—
<i>Chelidonium majus</i>	— *	<i>Secale cereale</i>	—
<i>Eschscholzia californica</i>	—	<i>Triticum aestivum</i>	—
<i>Papaver croceum</i>	—	<i>Zea mays</i>	—

Примітка. * — відсутність ампліфікації.

Межу детектування розраховано шляхом визначення наявності флуоресцентного сигналу для 10 повторів п'яти серій розчинів ДНК, що є сумішами розчинів ДНК аргемони з ДНК кукурудзи, концентраціями 1,0; 0,1; 0,01; 0,005; 0,0025 % *Argemone mexicana*. В результаті не менше 95 % позитивних результатів відмічено лише за концентраціях *A. mexicana* 0,01 % і вище. Отже, межа детектування розробленої системи праймерів та TaqMan-зонду становить 0,01 %.

Висновки. Результати філогенетичного аналізу регіону ITS1 представників роду *Argemone* на розширеній виборці збігаються з попередніми даними та уточнюють їх, зокрема щодо вірогідної конспецифічності *A. superba* та *A. mexicana* та необхідності виділення *A. munita* subsp. *robusta* у окремий таксон. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей регіону ITS1 представників роду Аргемона дозволило ідентифікувати ділянки, специфічні саме для Аргемони, та розробити дизайн праймерів та TaqMan-зонду. За результатами ПЛР *in silico* з розробленою системою праймерів і зонду продукт розміром 132 п.н. генерувався виключно при використанні у якості матриці послідовностей регіону ITS1 представників роду Аргемона, що свідчить про їх родоспецифічність. Результати РЧ-ПЛР *in vitro* при дослідженні представників роду Аргемона, інших представників сімейства Макові та рослин, що належать до інших таксонів, підтвердили родоспецифічність системи праймерів та TaqMan-зонду. Межа детектування складає 0,01 %. Дану маркерну систему можливо використовувати для детектування ДНК представників роду Аргемона у харчових та інших продуктах, зокрема, оліях.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-яких конфліктів інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

DEVELOPMENT OF MOLECULAR DETECTION SYSTEM FOR ARGEMONE SPP.

H.I. Slishchuk, N.E. Volkova, O.O. Zakharova

COTECNA UKRAINE LIMITED

140-A, Lustdorf'ska doroga Str., Odesa, 65114, Ukraine

E-mail: natalia.volkova@cotecna.com

The analysis of nucleotide sequences of the *Argemone* genus samples by bioinformatics methods was aimed at the study of phylogenetic relationships of species within the genus, at the development of genus-specific primer pairs and TaqMan-probe and their verification *in silico*. Molecular genetic studies by the polymerase chain reaction method in the «real-time» mode (RT-PCR) were devoted to checking the «performance» and specificity of the developed system of primers and TaqMan-probe using samples of eight species of *Argemone* and 11 species of other plants. Phylogenetic analysis using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences confirmed previous phylogenetic studies and improved understanding of relationships within the genus. Before the *in vitro* test of the developed system of primers and TaqMan-probe, the ability of the extracted DNA to be amplified by the RT-PCR method using the system of primers and the TaqMan-probe to the 18S rRNA gene of eukaryotes was checked to exclude pseudo-negative results during the further verification of specificity. The conditions for RT-PCR were selected, namely, temperatures and times of denaturation, hybridization, elongation, and the number of cycles. The developed system of primers and TaqMan-probe for the RT-PCR method demonstrated high species specificity and sensitivity. Amplification was noted only in DNA samples of eight *Argemone* species, while PCR analysis of other plant species and negative controls showed no amplification. The detection limit of the developed system was determined to be 0.01 %. It is proposed that this marker system be used to detect adulteration in food and other products, particularly argemone contamination in mustard or coconut oil.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Anjana M, Sarangi S (2021) Detection of adulterants in mustard oil. *Int J Chem Studies* 9(5):01–03.
- Denou A, Abubakar A, Dafam D et al (2020) Pharmacognostic, physicochemical and phytochemical investigations on aerial parts of *Argemone mexicana* L. *Res J Pharmac* 7(3):15–24. <https://doi.org/10.22127/rjp.2020.220380.1559>
- Edger P, Edger P, Tang M et al (2014) Secondary structure analyses of the nuclear rRNA internal transcribed spacers and assessment of its phylogenetic utility across the *Brassicaceae* (Mustards). *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101341>
- Gesell A, Chávez M, Kramell R et al (2011) Heterologous expression of two FAD-dependent oxidases

- with (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase activity from *Argemone mexicana* and *Berberis wilsoniae* in insect cells. *Planta* 233:1185–1197. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1357-4>
- Khan A (2018) Analysis of medicinally important phytochemicals from *Argemone mexicana*. *J King Saud Univ Science* 31:4. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.009>
- Lamba S, Kaur R., Rawal M, Pujari U (2021) Epidemic dropsy outbreak in localized community of Haryana, India. *Ind J Sci Res* 12(1):121. <https://doi.org/10.32606/IJSR.V12.I1.00022>
- Lopez-Calleja I, la Cruz S, Gonzalez I et al (2014) Survey of undeclared allergenic pistachio (*Pistacia vera*) in commercial foods by hydrolysis probe real-time PCR. *Food Control* 39:49e55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.034>
- Mandal P, Tewari P, Kumar S et al (2018) Argemone oil, an edible oil adulterant, induces systemic immunosuppression in Balb/c mice in an oral 28 days repeated dose toxicity study. *Chemico-Biol Interact* 287:57–69. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.04.013>
- Martínez-Delgado A, de Anda J, Leyn-Morales J et al (2022) Argemone species: Potential source of biofuel and high-value biological active compounds. *Environ Eng Res* 27(2):200619. <https://doi.org/10.4491/eer.2020.619>
- Mishra P, Kumar A, Rodrigues V et al (2016) Feasibility of nuclear ribosomal region ITS1 over ITS2 in barcoding taxonomically challenging genera of subtribe *Cassiinae* (*Fabaceae*). *PeerJ* 4:e2638. <https://doi.org/10.7717/peerj.2638>
- Rogers S, Bendich A (1989) Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (eds). *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9>
- Schwarzbach A, Kadereit J. (1999). Phylogeny of prickly poppies, *Argemone* (*Papaveraceae*), and the evolution of morphological and alkaloid characters based on ITS nrDNA sequence variation. *Plant Syst Evol* 218(3–4):257–279. <https://doi.org/10.1007/bf01089231>
- Slisichuk H, Meshcheryakov V, Volkova N, Zakharova O (2023) Mexican argemone (*Argemone mexicana* L.) CYP719A14 protein bioinformatic analysis. *Faktori eksperimentalnoi evolucii organizmiv* 32:155–159. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v32.1553>
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10:512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(30):11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar K et al (2012) Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nuc Acids Res* 40(15):e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vazquez-Flota F, Rubio-Pica J, Xool-Tamayo J et al (2018) Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzyloquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L. (*Papaveraceae*). *Rev Fitotec Mex* 41(1):13–21. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.1.13-21>
- Rogers S, Bendich A (1989) Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (eds). *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9>

Надійшла в редакцію 11.04.2024
Після доопрацювання 25.07.2024
Прийнята до друку 18.11.2024