УДК 577.113 + 582.61 *https://doi.org/10.31861/biosystems2025.01.022*

ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ІНВАЗІЙНИХ РОСЛИН РОДУ REYNOUTRIA НА ОСНОВІ ISSR-МАРКЕРІВ

Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Д.В. ЯКОБИШЕН, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Представники роду Reynoutria Houtt. — одні з найагресивніших інвазійних рослин у світі. У Європі поширені два види, R. japonica Houtt. та R. sachalinensis (F.Schmidt) Nakai, а також їхній гібрид R. × bohemica Chrtek & Chrtková. Незважаючи на поширення на Європейському континенті єдиної клональної лінії R. japonica з чоловічою стерильністю, гібридизація із R. sachalinensis та поява форм з різною плоїдністю сприяють зростанню генетичного різноманіття, що сприяє подальшій інвазії. Дослідження генетичної структури цих видів для популяцій з території України досі не проводились. Отже, метою цієї роботи було дослідження генетичного поліморфізму та гібридизації для українських зразків роду Reynoutria. Для порівняння із українськими зразками у дослідження було залучено зразки з території Румунії та Німеччини. ISSR-маркери були обрані для дослідження зважаючи на їх універсальність та можливість оцінювати поліморфізм по геному в цілому. На основі аналізу ISSR-маркерів, з використанням філогенетичного аналізу та методу основних координат, було показано вищі значення генетичних дистанцій між зразками R. sachalinensis, порівняно із дистанціями між зразками R. japonica. Для зразків, морфологічно визначених як гібридний вид R. × bohemica, за допомогою ISSR-аналізу не була виявлена присутність генетичного матеріалу одного з батьківських видів - R. sachalinensis. Проте, ці зразки показали близьку спорідненість між собою, так само, як і за морфологічними ознаками. У більше, як половини зразків, морфологічно визначених як R. japonica, знайдено домішки в геномах генетичного матеріалу R. sachalinensis, яка коливалась від 8,3 % до 57,6 %, що вказує на значну поширеність інтрогресивної гібридизації між цими видами інвазійних рослин.

Ключові слова: біологічне різноманіття, інвазійні види, міжвидова гібридизація, молекулярні маркери

Вступ. Представники роду *Reynoutria* Houtt. вважаються одними з найбільш успішних та небезпечних інвазійних рослин у світі (WFO, 2025). Два види зі Східної Азії, *R. japonica* Houtt. та *R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, природний ареал яких перекривається на території Японії та Сахаліну, протягом останніх десятиріч широко розселилися по території Євразії, Північної та Південної Америки, Південної Африки та Океанії (Henderson and Wilson, 2017; Miroshnyk et al., 202; GBIF, 2025; POWO, 2025). На основі історико-ботанічних (Del Tredici, 2017) та молекулярно-генетичних (Desjardinset al., 2023; Zhang et al., 2024) даних припускають декілька подій інтродукції *R. japonica* у Північну Америку та Нову Зеландію. В той же час, всі європейські популяції *R. japonica* вважаються нащадками єдиної форми, інтродукованої з Японії у середині XIX сторіччя (Hollingsworth and Bailey 2000; Del Tredici, 2017). Припускають, що інвазія на території Європи здійснюється нащадками єдиної завезеної клональної лінії з чоловічою стерильністю. Отже, вважається, що інвазійні популяції *R. japonica* розмножуються виключно вегетативним шляхом (Bailey et al., 2009).

Для іншого інвазійного виду, *R. sachalinensis*, задокументована інтродукція як лінії з чоловічою стерильністю, так і гермафродитної лінії, що забезпечує статеве розмноження цього виду в межах вторинного ареалу (Bailey et al., 2009).

На європейському континенті *R. japonica* представлена високоінвазійною октаплоїдною (2n= 8x=88) формою *R. japonica* var. *japonica* та дещо менш успішною тетраплоїдною (2n= 4x=44) формою *R. japonica* var. *compacta* (Bailey and Stace, 1992; Mandák et al., 2003). Для *R. sachalinensis* показана деяка варіабельність у рівні плоїдності, проте найбільш поширеною є тетраплоїдна (2n= 4x=44) форма (Mandák et al., 2003).

Гібридизація між октаплоїдною *R. japonica* var. *japonica* та тетраплоїдною *R. sachalinensis* в межах природного та інвазійного ареалів призводить до появи гексаплоїдних (2n=6x=66) гібридів, яких об’єднують під спільною таксономічною назвою *R.* × *bohemica* Chrtek & Chrtková (Mandák et al., 2003; Bailey & Wisskirchen, 2004). Ще один нещодавно описаний тетраплоїдний (2n=4x=44) вид *R.* × *moravica* (Hodálová & Mereďa) Olshanskyi & Antonenko походить від гібридизації

R. sachalinensis з тетраплоїдною *R. japonica* var. *compacta* (Hodálová et al., 2022; Olshanskyi and Antonenko, 2023). За допомогою молекулярно-генетичних методів виявлено також інтрогресійні форми, які містять в геномах генетичний матеріал батьківських видів у нетипових для первинних гібридів співвідношеннях (Jugieau at al., 2024; Tynkevich et al., 2024). Існування гібридних форм підвищує рівень генетичного різноманіття представників роду *Reynoutria* в межах вторинного ареалу, що може призводити до подальшої інтенсифікації інвазії.

В Україні поширені як обидві батьківські форми: *R. japonica* var. *japonica* та *R. sachalinensis*, так і гібридний вид *R.* × *bohemica* (Shevera, 2017; Olshanskyi & Antonenko, 2023). Проте, рівень поширеності та різноманітність гібридних форм на території України досі не досліджувались. Найбільш ефективними підходами для виявлення гібридних форм та аналізу генетичного різноманіття рослин є використання мультикопійних нуклеотидних послідовностей ядерної локалізації (Andreev et al., 2010; Rusak et al., 2016; Ishenko et al., 2020; Tynkevich et al., 2020) або методів генетичного профіліювання (Ivanovych and Volkov, 2018; Lucardi et al., 2020; Roshka et al., 2024).

У цій роботі ми проаналізували генетичний поліморфізм українських зразків інвазійних рослин роду *Reynoutria* за ISSR-маркерами. Для порівняння були використані зразки з Румунії та Німеччини.

Матеріали та методи**.** Індивідуальні зразки рослин роду *Reynoutria* були зібрані у п’яти областях заходу та центру України, а також у Румунії та Німеччині (табл. 1, рис. 1).

Геномну ДНК виділяли з гербарних та свіжих листків рослин (Porebski et al., 1997; Panchuk and Volkov, 2007). Якість отриманих препаратів ДНК перевіряли за допомогою гель-електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі.

Для ампліфікації ISSR-маркерів були застосовані шість стандартних праймерів з набору UBC (University of British Columbia). Для гібридизації праймерів були використані температури з статті Ivanovych et al. 2017. Характеристики використаних праймерів наведено у таблиці 2.

Реакційна суміш загальним об’ємом 15 мкл готувалась як описано раніше (Roshka et al., 2024). Отримані ПЛР-продукти аналізували в 2%-му агарозному гелі. Після електрофорезу ДНК зафарбовували розчином етидію броміду. Для визначення розмірів ПЛР-продуктів був використаний 100 bp маркер довжин (Biotium). Для аналізу генетичної структури досліджуваних зразків та виявлення можливих гібридів використовували програмне забезпечення STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), яке базується на байєсівській кластеризації. Цей метод використовувався для розрахунку відсотка подібності певного зразка до кожної з груп K - генетичних пулів, які об’єднують найбільш споріднені зразки.

Таблиця 1.

Географічне походження зразків роду Reynoutria

Table 1.

Geographical origin of Reynoutria plant accessions

Вид **Species**	**Зразок** **Accession**	**Походження зразку / Acc. origin**
R. × *bohemica*	Rey-151	м. Київ, Україна / Kyiv, Ukraine
	Rey-152	с. Немішаєве, Київська обл., Україна / Nemishaieve, Kyiv Oblast, Ukraine
	Rey-158	м. Боярка, Київська обл., Україна / Boiarka, Kyiv Oblast, Ukraine
R. japonica	Rey-1	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна / Chernivtsi, Chernivtsi Oblast, Ukraine
	Rey-2	м. Тімішоара, Тіміш, Румунія / Timișoara, Timiș, Romania
	Rey-31	м. Кременець, Тернопільська обл., Україна / Kremenets, Ternopil Oblast, Ukraine
	Rey-33	м. Ромни, Сумська обл., Україна / Romny, Sumy Oblast, Ukraine
	Rey-35	м. Київ, Україна / Kyiv, Ukraine
	Rey-44	с. Драгово, Закарпатська обл., Україна / Drahovo, Zakarpattia Oblast, Ukraine
	Rey-50	м. Кельн, Північний Рейн-Вестфалія, Німеччина / Cologne, North Rhine-Westphalia, Germany
	Rey-111	м. Чернівці, Чернівецька обл., Україна / Chernivtsi, Chernivtsi Oblast, Ukraine
	Rey-112	м. Сучава, Сучавський повіт, Румунія / Suceava, Suceava County, Romania
R. sachalinensis	Rey-104	м. Хотин, Чернівецька обл., Україна / Khotyn, Chernivtsi Oblast, Ukraine
	Rey-105	с. Путила, Чернівецька обл., Україна / Putyla, Chernivtsi Oblast, Ukraine
	Rey-114	с. Берегомет, Чернівецька обл., Україна / Berehomet, Chernivtsi Oblast, Ukraine

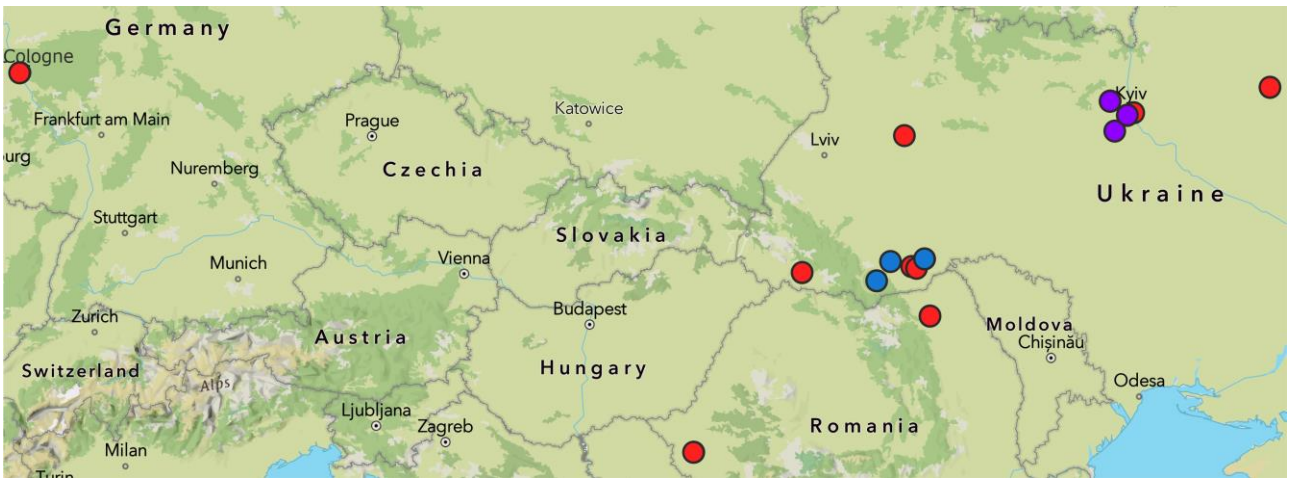

Рис. 1. Географічна локалізація досліджених рослин роду Reynoutria. Червоні, сині та фіолетові позначки відповідають зразкам R. japonica R. sachalinensis та R. × bohemica, відповідно.

Fig. 1. Geographical localization of the studied Reynoutria accessions. Red, blue, and purple markers correspond to the accessions of R. japonica, R. sachalinensis, and R. × bohemica, respectively.

Для розрахунку найкращого значення K було використано метод Evanno, реалізований у програмному забезпеченні STRUCTURE HARVESTER (Earl & von Holdt, 2012) (рис. 2). Матриця первинних бінарних даних перетворювалась в матрицю генетичних відстаней за допомогою коефіцієнта Дайса (Nei & Li, 1979) за допомогою програми DARwin 6.0.21 (Perrier et al., 2003).

Таблиця 2.

Характеристики праймерів, використаних для ампліфікації ISSR-маркерів.

Table 2.

Characteristics of primers used for the amplification of ISSR markers

Назва праймера **Primer name**	**Послідовність праймера** **Primer sequence**	**Температура гібридизації, °C** **Annealing temperature, °C**
UBC-807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
UBC-810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52
UBC-827	ACACACACACACACACG	52
UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	54
UBC-857	ACACACACACACACACYG	56

Аналіз методом основних координат (PCoA) проводився для п’яти осей із застосуванням програми DARwin (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006). Генетичну спорідненість між досліджуваними зразками оцінювали за допомогою методу приєднання сусідів - neiborgh-joining (Saitou & Nei, 1987).

Результати та їх обговорення. ISSR-маркери ампліфікували з використанням шести праймерів (табл. 2). В результаті аналізу отриманих електрофореграм вдалось виявити 86 чітких смуг ПЛР-ампліфікатів, довжина яких була в межах від 200 до 1200 нп. Кількість поліморфних алелів коливалась від двох (для праймеру UBC 810) до 11 (для праймеру UBC 857). Загалом для шести використаних праймерів ідентифіковано 39 поліморфних алелів.

Генетична структура зразків роду *Reynoutria* була проаналізована методом байєсівської кластеризації із використанням програми STRUCTURE. Обрахунок параметру delta K (ΔK) для визначення оптимальної кількості кластерів (K) показав найвище значення ΔK для K=2 (рис. 2A). Отже, 15 генотипів було розділено між двома кластерами, умовно названими “Japonica” та “Sachalinensis” (рис. 2B).

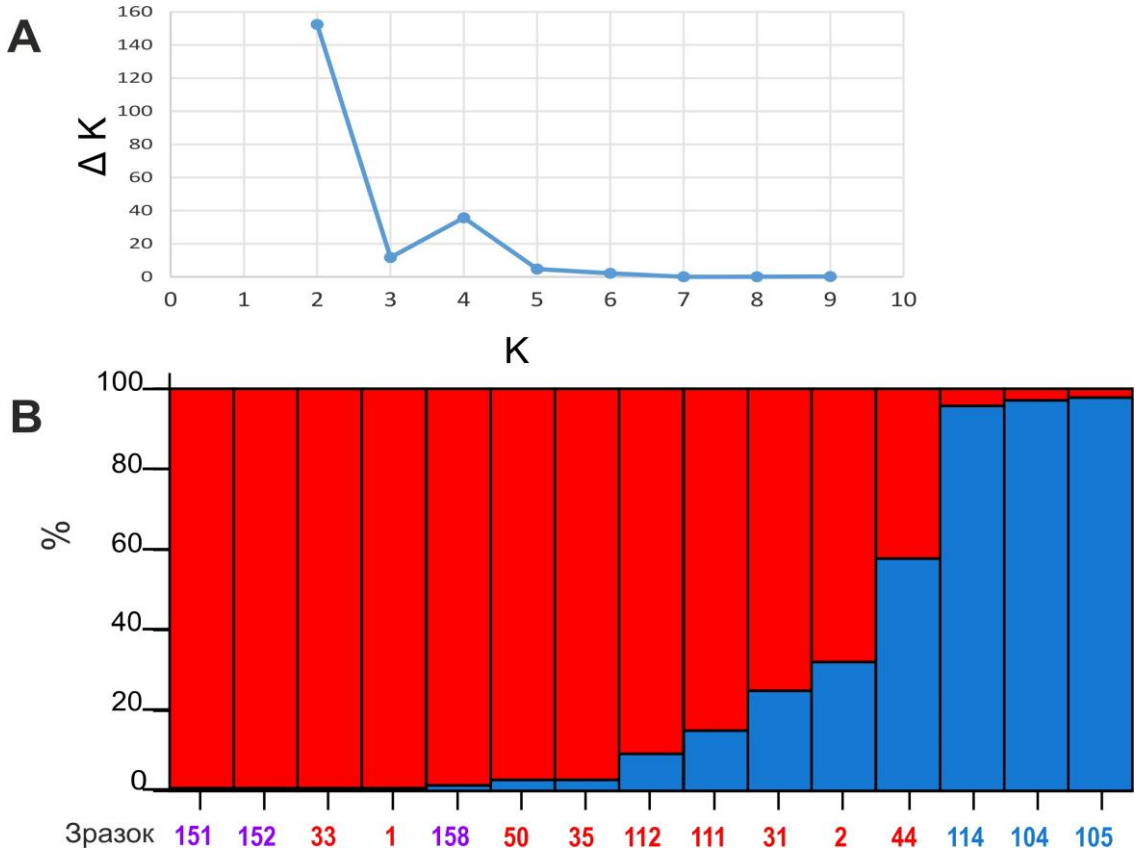

Рис. 2. Аналіз генетичних кластерів за розподілом ISSR-маркерів з використанням програми STRUCTURE. (A) - Залежність між ΔK та кількістю кластерів (K). (B) - генетична конституція зразків Reynoutria, представлених як вертикальні стовпчики. Червоним та синім показаний вміст генетичного матеріалу R. japonica та R. sachalinensis, відповідно. Номери зразків рослин, морфологічно ідентифікованих як R. japonica, R. sachalinensis та R. × bohemica, наведено червоним, синім та фіолетовим кольорами, відповідно.

Fig. 2. Analysis of genetic clusters based on the distribution of ISSR markers using the STRUCTURE program. (A) - The dependence between ΔK and the number of clusters (K). (B) - The genetic constitution of Reynoutria accessions is presented as vertical columns. Red and blue colors show the genetic material content of R. japonica and R. sachalinensis, respectively. Names of plant accessions morphologically identified as R. japonica, R. sachalinensis, and R. × bohemica are shown in red, blue, and purple, respectively.

Для чотирьох зразків *R. japonica* та трьох – *R. sachalinensis* домішки генетичного матеріалу іншого виду були або відсутні, або не перевищували 3%, що співставно із можливою похибкою експерименту. Проте, для інших чотирьох зразків (Rey-2, -31, -111, -112), визначених на основі морфологічних критеріїв як *R. japonica*, вміст генетичного матеріалу *R. sachalinensis* коливався від 8,3% у Rey-112 до 31,2% у Rey-2. Для цих чотирьох зразків раніше нами був ідентифікований хлоропластний гаплотип (Tynkevich et al., 2025), який співпадав із гаплотипом інших зразків *R. japonica* var. *japonica*. Ще один зразок, Rey-44, також визначений попередньо як *R. japonica* за морфологією, містив в геномі ще більшу частину - 57,6%, генетичного матеріалу *R. sachalinensis*. Хлоропластний гаплотип для Rey-44 раніше не ідентифікували.

Несподіваними виявились результати STRUCTURE-аналізу для трьох зразків (Rey-151, -152, -158), морфологічно-визначених як *R. × bohemica*. Для них не спостерігалась амплфікація ISSR-маркерів генетичного пулу *R. sachalinensis*, хоча цей вид є одним із батьківських для гібридної *R. × bohemica*. Можливим поясненням цього є ненадійність морфологічних критеріїв у таксономічній дискримінації видів *R. × bohemica* та *R. japonica* (Mereďa et al., 2019).

Тим не менш, як було сказано вище, для частини зразків показані домішки обох генетичних пулів у геномі, отже, ці зразки можуть мати гібридне походження. Виходячи з того, що *R. japonica* та *R. sachalinensis* є октаплоїдним (2n=8x) та гексаплоїдним (2n=4x) видами, відповідно, очікуване співвідношення їх генетичного матеріалу у геномі гібридного гексаплоїдного (2n=6x) виду

R. × *bohemica* має становити 2:1 (Kadlecová et al., 2024). Проте, для виявлених нами гібридних форм таке співвідношення спостерігалось лише в одному випадку, для зразку Rey-2, який можливо, і являє собою *R.* × *bohemica*. Для інших виявлених гібридних форм ми припускаємо, що вони походять внаслідок зворотних схрещувань між гексаплоїдними гібридами та їх батьківськими формами.

Для визначення генетичних дистанцій між досліджуваними зразками був проведений PCoA аналіз (рис. 3). за п'ятьма осями, які пояснюють 53,7%, 15,0%, 10,6%, 7,0% і 4,7% варіації, відповідно.

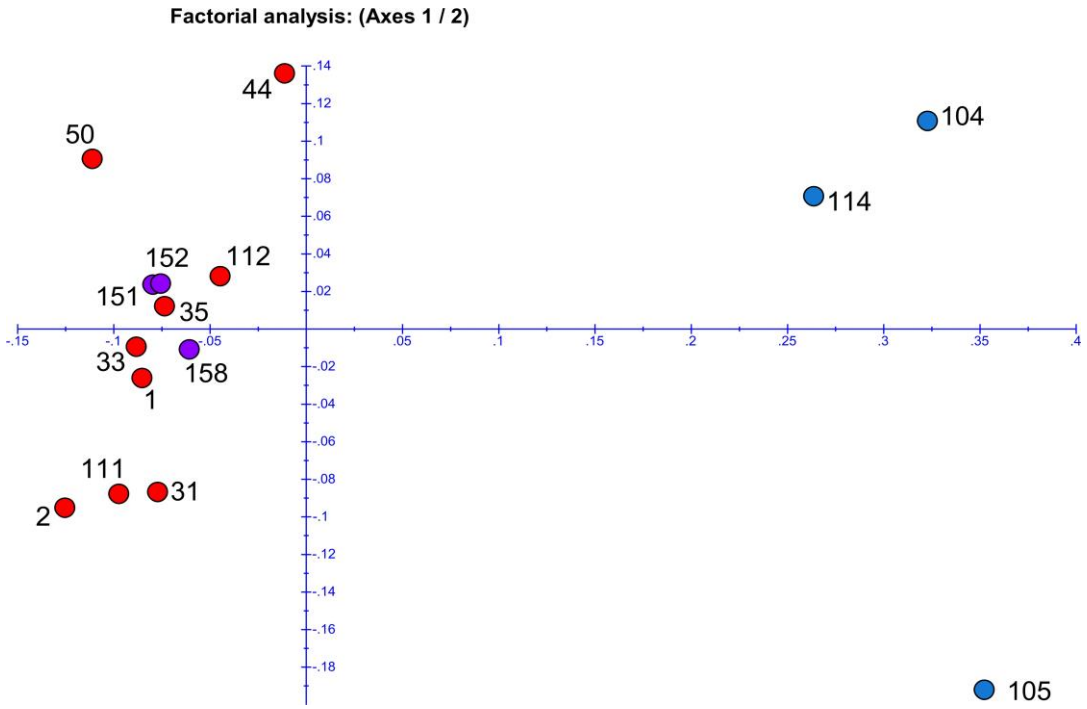

Рис. 3. Генетична подібність зразків роду Reynoutria за PCoA. Червоні, сині та фіолетові позначки відповідають зразкам R. japonica R. sachalinensis та R. × bohemica.

Fig. 3. Genetic similarity of Reynoutria accessions by the PCoA. Red, blue, and purple markers correspond to the accessions of R. japonica, R. sachalinensis, and R. × bohemica.

Групи зразків "Japonica" та "Sachalinensis" виявились розділеними значною дистанцією на графіку за осями 1/2 (рис. 3). Дистанції між зразками *R. sachalinensis* виявились вищими, порівняно до зразків *R. japonica*. Серед зразків, морфологічно визначених як *R. japonica*, три, із високим вмістом домішки генетичного матеріалу *R. sachalinensis* (Rey-2, -31, -111) групуються разом. Зразки, морфологічно визначені як *R.* × *bohemica* групуються у спільному кластері із найбільш "типовими" зразками *R. japonica*. Ізольоване положення займають зразки: Rey-44, в геномі якого, за результатами STRUCTURE-аналізу, виялено більше генетичного матеріалу *R. sachalinensis*, ніж *R. japonica* та найбільш географічно віддалений від інших зразків - Rey-50, з території Німеччини (рис. 1).

Подібне групування зразків спостерігалось і за результатами філогенетичного аналізу (рис. 4). На побудованій Neighbor-joining дендрограмі чотири клади мають середній та високий рівень статистичної підтримки. Найвищий рівень підтримки має клада, яка об'єднує всі три зразки *R. sachalinensis*. Вона відгалужується від спільної клади із зразоком Rey-44, в геномі якого зафіксований найбільший вміст генетичного матеріалу *R. sachalinensis* серед зразків, ідентифікованих морфологічно як *R. japonica* (рис. 2).

Ще одну відокремлену кладу, з середнім рівнем підтримки, утворюють три зразки із високим вмістом генетичного матеріалу *R. sachalinensis* (Rey-2, -31, -111). Крім того, в кладу із середньою підримкою групуються три зразки, морфологічно визначені як *R.* × *bohemica* (Rey-151, -152, -158). Не дивлячись на те, що за результатами STRUCTURE та PCoA аналізів ці три зразки поводили себе як типова *R. japonica*, для них спостерігається близька філогенетична спорідненість та морфологічна подібність, яка

виокремлює їх з поміж зразків *R. japonica*. Загалом, отримані результати вказують на поширення інтрогресивної гібридизації між інвазійними представниками роду *Reynoutria*.

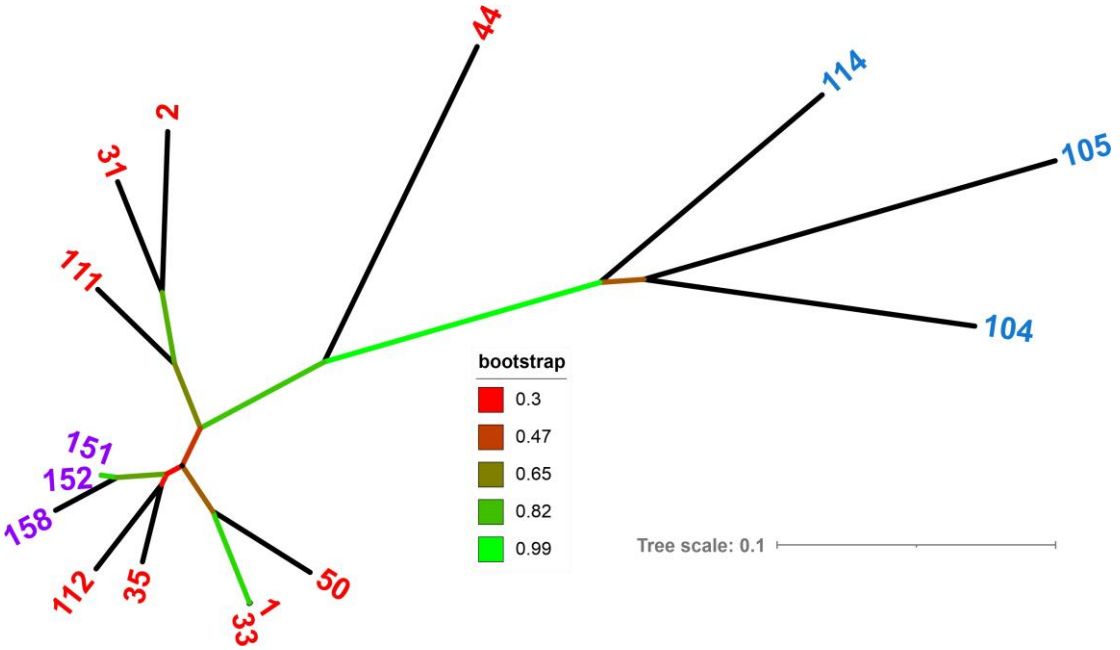

Рис. 4. Neighbor-joining дендрограма генетичної подібності зразків роду Reynoutria на основі поліморфізму ISSR-маркерів. Колір гілок відповідає значенням статистичної bootstrap підтримки відповідних груп (див. легенду). Назви зразків рослин, які за морфологічними ознаками були ідентифіковані як R. japonica, R. sachalinensis та R. × bohemica, наведено червоним, синім та фіолетовим кольорами, відповідно.

Fig. 4. Neighbor-joining dendrogram of Reynoutria accessions' genetic similarity, based on ISSR markers polymorphism. The branch colors correspond to bootstrap support values for the respective groups (see legend). Plant accession names that were morphologically identified as R. japonica, R. sachalinensis, and R. × bohemica are shown in red, blue, and purple, respectively.

Висновки. На основі аналізу ISSR-маркерів виявлені значні генетичні дистанції між зразками *R. sachalinensis* на противагу високій подібності між зразками *R. japonica*.

Для трьох зразків, морфологічно визначених як гібридний вид *R. × bohemica*, ISSR-аналіз показав їх високу подібність із батьківським видом *R. japonica*, тоді як генетичного матеріалу іншого батьківського виду, *R. sachalinensis*, не виявлено. Ці зразки показали близьку спорідненість між собою, як за морфологічними ознаками, так і за набором ISSR-маркерів.

У більшості зразків, морфологічно визначених як *R. japonica*, знайдено домішки в геномах генетичного матеріалу *R. sachalinensis*, що вказує на поширеність інтрогресивної гібридизації між цими інвазійними видами.

Конфлікт інтересів: *Автори заявляють, що дослідження проводилося за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які можна було б витлумачити як потенційний конфлікт інтересів.*

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

Подяки: *автори виражають подяку Олені Волуці, Олені Козак, Ігорю Ольшанському, Ліані Онук, Івану Роману, Маргариті Середенко, Анні Черказьяновій та Іллі Чорнею за наданий рослинний матеріал.*

Список використаної літератури / References:

1. Bailey, J. P., & Stace, C. A. (1992). Chromosome number, morphology, pairing, and DNA values of species and hybrids in the genus Fallopia (Polygonaceae). *Plant Syst. Evol.*, *180*(1), 29-52. https://doi.org/10.1007/BF00940396
2. Bailey, J. P., Bímová, K., & Mandák, B. (2009). Asexual spread versus sexual reproduction and evolution in Japanese Knotweed sl sets the stage for the “Battle of the Clones”. *Biol. Invasions*, *11*, 1189-1203. https://doi.org/10.1007/s10530-008-9381-4
3. Bailey, J., & Wisskirchen, R. (2004). The distribution and origins of *Faúopia × bohemica* (Polygonaceae) in Europe. *Nord. J. Bot.*, *24*(2),

173-199. https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2004.tb00832
4. Desjardins, S. D., Pashley, C. H., Bailey, J. P. (2023). A taxonomic, cytological and genetic survey of Japanese knotweed s.l. in New Zealand indicates multiple secondary introductions from Europe and a direct introduction from Japan. *NZ. J. Bot. 61*, 49–66. https://doi.org/10.1080/0028825X.2023.2162166
5. Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4, 359-361. https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7
6. Henderson, L., & Wilson, J. R. (2017). Changes in the composition and distribution of alien plants in South Africa: An update from the Southern African Plant Invaders Atlas. *Bothalia-African Biodiversity & Conservation*, *47*(2), 1-26. https://doi.org/10.4102/abc.v47i2.2172
7. Hodalová, I., Mártonfiová, L., Skokanová, K., Španiel, S., & Meredá Jr, P. (2022). *Fallopia* × *moravica* (Polygonaceae), a new hybrid between *Fallopia compacta* and *F. sachalinensis*. *Phytotaxa*, *572*(2), 123-143. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.572.2.1
8. Hollingsworth, M. L., & Bailey, J. P. (2000). Evidence for massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica* (Japanese Knotweed). *Bot. J. Linn. Soc.*, *133*(4), 463-472. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2000.tb01589.x
9. 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*, 505-513. https://doi.org/10.3103/S0095452720060055
10. Ivanovych, Y. I., Udovychenko, K. M., Bublyk, M. O., & Volkov, R. A. (2017). ISSR-PCR fingerprinting of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Cytol. Genet.*, 51, 40-47. https://doi.org/10.3103/s0095452717010066
11. Ivanovych, Y., & Volkov, R. (2018). Genetic relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from Ukraine determined by microsatellite markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *93*(1), 64-72. https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1342568
12. Jugieau, E., Talmot, V., Staentzel, C., Noir, S., & Hardion, L. (2024). A knot of hybrids: Differentiating Asian knotweeds in North-Eastern France using genetic, cytological, and morphological data. *J. Syst. Evol.*, *62*(6), 1218-1226. https://doi.org/10.1111/jse.13075
13. Kadlecová, M., Vojík, M., Vacula, J., & Berchová Bímová, K. (2024). Grab to fill the gap: key factors influencing *Reynoutria japonica* germination and seedling establishment in the secondary distribution range. *Plant Ecology*, *225*(8), 863-873. https://doi.org/10.1007/s11258-024-01438-1
14. Lucardi, R. D., Wallace, L. E., & Ervin, G. N. (2020). Patterns of genetic diversity in highly invasive species: Cogongrass (*Imperata cylindrica*) expansion in the invaded range of the southern United States (US). *Plants*, *9*(4), 423. https://doi.org/10.3390/plants9040423
15. Mereďa Jr, P., Koláriková, Z., & Hodálová, I. (2019). Cytological and morphological variation of *Fallopia* sect. *Reynoutria* taxa (Polygonaceae) in the Krivánska Malá Fatra Mountains (Slovakia). *Biologia*, *74*(3), 215-236. https://doi.org/10.2478/s11756-018-00168-w
16. Miroshnyk, N., Grabovska, T., & Roubík, H. (2025). The spread of the invasive species *Reynoutria japonica* Houtt. will both expand and contract with climate change: results of climate modelling for 14 European countries. *Pest Manag. Sci.* https://doi.org/10.1002/ps.8732
17. Nei M, Li W (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA 76(10):* 5269-5273. https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269
18. Olshanskyi, I. G., & Antonenko, S. I. (2023). A new nomenclatural combination in *Reynoutria* (Polygonaceae). *Ukr. Bot. J.*, *80*(2), 133-135. https://doi.org/10.15407/ukrbotj80.02.133
19. Panchuk, I. I., & Volkov, R. A. (2007). *A practical course in molecular genetics*. [Praktykum z molekuliarnoi henetyky] Chernivtsi: Ruta. 120 p. [In Ukrainian]
20. Perrier, X., Flori, A., Bonnot, F. (2003) Data analysis methods in genetic diversity of cultivated tropical plants (pp. 43-76). *Enfield: Science Publishers*.
21. Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J. P. (2006). DARwin software https://darwin.cirad.fr/.
22. Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular biology reporter*, *15*, 8-15. https://doi.org/10.1007/BF02772108
23. POWO *Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew.* 2025; *Published on the Internet.* http://www.plantsoftheworldonline.org/ Retrieved 3 May 2025.
24. Pritchard, J. K, Stephens, M, Donnelly, P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics 155(2):* 945-959. https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945
25. *Reynoutria* Houtt. in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset. accessed via GBIF org on 2025-05-03. https://doi.org/10.15468/39omei
26. Roshka, N, Tynkevich, Y. O., & Volkov, R. (2024). Use of ISSR markers in assessment of genetic diversity of Ukrainian representatives of the genus *Heracleum*. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*, *16*(3), 266-273. [In Ukrainian]. https://doi.org/10.31861/biosystems2024.03.266
27. Rusak, O. O., Petrashchuk, V. I., Panchuk, I. I., & Volkov, R. A. (2016). Molecular organization of 5S

rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr*, *14*(2), 216-220. [In Ukrainian]. https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.14.2.691
28. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
29. Shevera, M. V. (2017). *Reynoutria* × *bohemica* (Polygonaceae), a potentially invasive species of the Ukrainian flora. *Ukr. Bot. J.*, *74*(6), 548-555.
30. Tynkevich, Y. O., Bushyla, K. D., & Volkov, R. A. (2020). Organization of the 5S rDNA intergenic spacer of *Quercus rubra* L. and its relationship to the Ukrainian *Quercus* species. *Factors Experimental Evol. Organisms*, *26*, 125-131. [In Ukrainian] https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1254
31. Tynkevich, Y. O., Yakobyshen, D. V., Cherkazianova, A. S., Shelyfist, A. Y., & Volkov, R. A. (2024). Intragenomic polymorphism of the ITS1-5.8S-ITS2 region in invasive species of the genus *Reynoutria*. *Cytol. Genet.*, *58*(6), 536-546. https://doi.org/10.3103/S0095452724060112
32. Tynkevich, Y. O., Cherkazianova, A. S., Chorney, I. I., Panchuk I. I., & Volkov, R. A. (2025). Genetic polymorphism of invasive species of knotweed (*Reynoutria*) assessed by the *matK* and *rpl32-trnL* (UAG) regions of chloroplastic DNA. *Cytol. Genet.*, *59*(3), 259-269. https://doi.org10.3103/S0095452725030089
33. Tynkevich, Y. O., Ivanovych, Y. I., Roshka, N. M., Tokaryuk, A. I., Blyzniuk, K. G., Shelyfist, A. Y., & Volkov, R. A. (2025). Genetic diversity of Ukrainian populations of invasive species of the genus *Galinsoga* assessed by ISSR-markers. *Cytol Genet*, *59*(1), 11-23 https://doi.org/10.3103/S0095452725010141
34. WFO *World Flora Online.* 2023. Available from: http://www.worldfloraonline.org/ (accessed 5 May 2025).
35. Zhang, L., van Riemsdijk, I., Liu, M., Liao, Z., Cavé-Radet, A., Bi, J. et al. (2024). Biogeography of a Global Plant Invader: From the Evolutionary History to Future Distributions. *Glob. Change Biol.*, *30*(12), e17622. https://doi.org/10.1111/gcb.17622

GENETIC DIVERSITY OF INVASIVE PLANTS OF REYNOUTRIA GENUS BASED ON ISSR MARKERS

Y.O. Tynkevich, D.V. Yakobyshen, R.A. Volkov

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

Members of the genus Reynoutria Houtt. are recognized as some of the most invasive plant species worldwide. In Europe, two species, R. japonica Houtt. and R. sachalinensis (F.Schmidt) Nakai, as well as their hybrid R. × bohemica Chrtek & Chrtková, are widespread. Despite the spread of a single clonal lineage of R. japonica with male sterility across the European continent, hybridization with R. sachalinensis and the emergence of forms with different ploidy levels contribute to increased genetic diversity, promoting further invasion. To date, studies of the genetic structure of these species in populations from the territory of Ukraine have not been conducted. Therefore, this study aimed to investigate the genetic polymorphism and hybridization of Ukrainian accessions of the genus Reynoutria. For comparison with Ukrainian samples, specimens from Romania and Germany were also included in the study. ISSR markers were chosen for the study due to their universality and ability to assess polymorphism across the genome.

Based on the ISSR markers, using phylogenetic analysis and the principal coordinates method, higher genetic distance values were observed between R. sachalinensis samples compared to the distances between R. japonica samples. For samples morphologically identified as the hybrid species R. × bohemica, ISSR analysis did not reveal the presence of genetic material from one of the parental species, R. sachalinensis. However, these samples showed close relatedness to each other, both genetically and morphologically. In more than half of the samples morphologically identified as R. japonica, traces of genetic material from R. sachalinensis were found in their genomes, ranging from 8.3% to 57.6%, indicating a significant prevalence of introgressive hybridization between these invasive plant species.

Keywords: biodiversity, invasive species, interspecific hybridization, molecular markers.

Отримано редколегією 25.04.2025 р.

ORCID ID
Юрій Тинкевич: https://orcid.org/0000-0002-0222-8098
Даніель Якобишен: https://orcid.org/0009-0002-1799-7460
Роман Волков: https://orcid.org/0000-0003-0673-2598