

Centaurea borysthenica (Asteraceae): молекулярна анотація та популяційна гетерогенність

ІГОР ЮРІЙОВИЧ КОСТИКОВ
ВІТАЛІЯ ІВАНІВНА ДІДЕНКО
МІНЛЕЙ ЧЕНЬ

KOSTIKOV I.YU, DIDENKO V.I., CHEN M-L. (2022). *Centaurea borysthenica* (Asteraceae): molecular annotation and population heterogeneity. *Chornomors'k. bot. z.*, **18** (3): 222–245. doi: 10.32999/ksu1990-553X/2022-18-3-2

Centaurea borysthenica is a local endemic of Ukraine. The phylogenetic position, evolutionary history, and taxonomic status of this controversial species were clarified. The independent status of *Centaurea borysthenica* as a part of *C. arenaria* agg. was recognized based on molecular phylogenetic analysis of nuclear (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) and chloroplast (*rpl32-trnL*) sequences of four populations (including two from *locus classicus*). The species-specific features of *C. borysthenica* were updated. We recognize the hybridogenic origin of *C. borysthenica* from *C. arenaria* agg. (maternal genotype), and a hypothetical species with a unique endemic Eastern European ribotype (paternal genotype). The haplotype of all studied populations was identical to haplotype of *C. arenaria* and *C. odessana* that differs from all known haplotypes of *C. stoebe* s.l. By ribotype, *C. borysthenica* is an allopolyploid with a combination of two ITS alleles, one of them belongs to the so-called Balkan ribotype inherent of *C. arenaria* and *C. odessana* (reference sequence MW383495), the other belongs to the unique so-called Ukrainian ribotype 3 (reference sequence MW383493 with substitutions 83.Y>C, 458.Y>T). The studied specimens with the phenotype «*C. borysthenica*» from four populations of Zaporizhzhya, Mykolaiv, and Dnipropetrovsk regions were recognized as secondary hybrids between *C. borysthenica* and different species of the *Centaurea* section (especially *C. diffusa* and *C. stoebe* s.l.). All these secondary hybrids retain the *C. borysthenica* haplotype, and the ribotype contains at least one of the alleles of this species is either Balkan or Eastern Ukrainian (the so-called Ukrainian ribotype 3).

Key words: *Acrolophus*, clade, haplotype, hybrid, ITS1, ITS2, location, population, ribotype, *rpl32-trnL*

КОСТИКОВ І.Ю., ДІДЕНКО В.І., ЧЕНЬ М. (2022). *Centaurea borysthenica* (Asteraceae): молекулярна анотація та популяційна гетерогенність. *Чорноморськ. бот. ж.*, **18** (3): 222–245. doi: 10.32999/ksu1990-553X/2022-18-3-2

На основі молекулярно-філогенетичного аналізу ядерних (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) та хлоропластних (*rpl32-trnL*) послідовностей зразків чотирьох популяцій (в тому числі двох популяцій з району *locus classicus*) критичного в таксономічному відношенні виду *Centaurea borysthenica* (Asteraceae) підтверджено самостійний видовий статус даного таксону у складі *C. arenaria* agg. та поточнено його видоспецифічні ознаки. Встановлено, що *C. borysthenica* є видом гібридогенного походження, у якого вихідна материнська форма належить до *C. arenaria* agg., а вихідна батьківська форма – до гіпотетичного виду з унікальним ендемічним східно-європейським риботипом. Показано, що всі досліджені популяції *C. borysthenica* мають однаковий гаплотип, ідентичний до *C. arenaria* та *C. odessana*, який відмінний від усіх відомих гаплотипів *C. stoebe* s.l. За риботипом *C. borysthenica* є аллоплоїдом з комбінацією двох алелів ITS, одна з яких відповідає т.зв. балканському риботипу, притаманному *C. arenaria*



© Kostikov I.Yu.^{1,2}, Didenko V.I.², Chen M-L.³

^{1,3} Taras Shevchenko Kiev National University, Symon Petlura str., 1, Kyiv, 01032, на Volodymyrska str., 60, Kyiv, 01033

² National Scientific Center P.I. Prokopovich Beekeeping Institute

e-mail: narizzja@gmail.com, vitaliidadenko14@gmail.com, cmluakiev@163.com

Submitted 05 October 2022

Recommended by A. Khodosovtsev

Published 11 November 2022

та *C. odessana* (референтний сіквенс MW383495), друга – унікальному т.зв. українському риботипу 3 (референтний сіквенс MW383493 із замінами 83.Y>C, 458.Y>T). Досліджені екземпляри з фенотипом «*C. borysthena*» із чотирьох популяцій з території Запорізької, Миколаївської та Дніпропетровської областей були представлені вторинними гібридами між *C. borysthena* та різними видами секції *Centaurea* (в першу чергу, *C. diffusa* та *C. stoebe* s.l.). Всі такі вторинні гібриди зберігають гаплотип *C. borysthena*, а риботип – хоча б одну з алелей даного виду – або балканську, або східно-українську (т.зв. український риботип 3).

Ключові слова: слова: гаплотип, гібрид, клада, локалітет, популяція, риботип, *Acrolophus*, *ITS1*, *ITS2*, *rpl32-trnL*

Centaurea borysthena Gruner була описана у 1868 році за матеріалом, зібраним Леопольдом Ф. Грюнером 13.09.1865 року «на піднесених рівнинах біля Борисфену поблизу м. Олександрівськ» [GRUNER, 1868]. Хоча типовий локалітет наведено лише приблизно, стара назва м. Запоріжжя (Олександрівськ) вказує, що він знаходився на лівому березі Дніпра, а топографічна примітка дозволяє припустити, що збір типового матеріалу біля Запоріжжя був здійснений або на його північній околиці (місцевість Павло-Кічкас), або біля південної околиці поруч з гирлом річки Суха Московка. Обидві ці місцевості наразі забудовані та входять до промзони та «спального» району Запоріжжя. Голотип зберігається у Гербарії Ботанічного інституту ім. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) [SHYAN et al., 2010], ізотип – у Гербарії Музею природної історії м. Герліц, Німеччина (зразок VM001043218).

Д.М. Доброчаєва у Флорі УРСР [DOBROCHAEVA, 1965] розглядає *C. borysthena* як ендемічний вид пісків басейну Дніпра та Південного Бугу, який входить до підроду *Acrolophus* (Cass.) Dobrocz., і разом з *C. majorovii* Dumb., *C. odessana* Prodan та *C. savranica* Klok. утворює ряд «*Arenaria* (Hayek) Dumb.». Проте у європейських виданнях, зокрема, у монографічній оборобці роду *Centaurea* L., виконаної Досталем [Dostál, 1976], волошка дніпровська наводиться лише як один з підвидів *C. arenaria* M. Vieb. (*C. arenaria* subsp. *borysthena* (Grun.) Dostál).

В останньому варіанті системи роду *Centaurea*, запропонованому групою іспанських ботаніків під керівництвом N. Garcia-Jacas [HILPOLD et al., 2014b] на основі масштабного аналізу молекулярно-філогенетичних даних, *C. borysthena* провізорно віднесена до циркум-середземноморської клади (CMC-clade) підроду *Centaurea*, в межах якої включена до секції *Centaurea* (відповідає під родам *Acrolophus* та *Phalolepis* (Cass.) Dobrocz. у розумінні Д.М. Доброчаєвої) та збережена у статусі самостійного виду, незважаючи на відсутність як молекулярних, так і каріологічних даних. Також провізорно *C. borysthena* включена до агрегату *C. arenaria* agg.

Наразі один з українських ботаніків О. Шиндер [SHYNDER, 2021] на основі широкої екстраполяції результатів цитологічних та молекулярно-генетичних досліджень *C. stoebe* L. s.l. закордонних авторів [MRÁZ et al., 2012] та посилання на особисту думку одного з них (P. Mráz) про можливий генетичний зв'язок *C. arenaria* з деякими тетраплоїдними цитотипами «*C. stoebe* 4x», висловив спекулятивне припущення, по-перше, про належність *C. borysthena* до *C. stoebe* s.l., по друге, про ймовірну конспецифічність *C. borysthena* та тетраплоїдних цитотипів «*C. stoebe* 4x» і запропонував розглядати принаймні лісостепові популяції *C. borysthena* як *C. stoebe* 4x.

Таким чином, основні дискусійні питання, пов'язані з *C. borysthena*, стосуються наступного: 1) чи є *C. borysthena* підвидом *C. arenaria*; 2) чи входить вона до складу *C. arenaria* agg.; 3) чи можна розглядати даний таксон у складі *C. stoebe* s.l.; 4) чи є підстави вважати волошку дніпровську тетраплоїдним цитотипом «*C. stoebe* 4x». Пошуку відповідей на ці питання на основі молекулярно-генетичного аналізу хлоропластних послідовностей спейсеру *rpl32-trnL* та ядерних послідовностей локусу

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (надалі у сенсі «локус» він позначається як ITS) зразків з чотирьох локалітетів *C. borysthenica* з території степової зони України, два з яких розташовані в межах району, який за протологом включає *locus classicus*, присвячено це повідомлення.

Публікації з даними молекулярно-генетичного спрямування, які б дозволили хоча б частково з'ясувати наведені вище дискусійні питання щодо статусу *C. borysthenica*, наразі відсутні. Проте в NCBI депоновано чотири послідовності трьох зразків цього виду: а) хлоропластного гену матурази K (*matK*, код доступу KT249948) та ядерної послідовності ITS (KT249754) гербарного зразка GLM67657 (The Herbarium Senckenbergianum, Görlitz), зібраного у 1996 р. у Західній Європі (Germany, Sachsen) далеко за межами ареалу [СНОІ, THINES, 2015]; б) ядерні послідовності ITS (MW383494, MW383493) двох зразків зі степової зони України, отримані авторами даної статті.

Матеріали і методи досліджень

Матеріал. Зразки *C. borysthenica* (всі – у генеративному стані, під час цвітіння) були зібрані в чотирьох локалітетах.

Локалітет 1 (borGA). Зразок 14.07.14-33: Запорізька область, Національний природний парк «Великий Луг», острів Гусячий, 47.5496 N, 35.2061 E, 14.07.2014, зібрав І. Костіков. Незадерновані та слабо задерновані алювіальні піщані кучугури острова Гусячий у Каховському водосховищі, в типовому локалітеті рідкісної перлової волошки *C. konkae* Klok. Секвеновано послідовності ITS (двократна повторність, сіквенс borGA: MW383494) та *rpl32-trnL* (сіквенс borGA-h).

Локалітет 2 (borR). Зразок 13.07.14-б: Запорізька область, околиці села Лисогірка, правий берег Дніпра, 47.6608 N, 35.1080 E, 13.07.2014, збрала В. Діденко. Слабо задерновані піски суфозійного походження під крутими схилами на правому березі Дніпра в кількох сотнях метрів від локалітету рідкісної перлової волошки *C. appendicata* Klok. Секвеновано послідовності ITS (сіквенс borR) та *rpl32-trnL* (сіквенс borR-h).

Локалітет 3 (borK). Зразок 13.08.14-2: Дніпропетровська область, околиці селища міського типу Курилівка, 48.558 N, 34.608 E, 13.08.2014, збрали В. Діденко, І. Костіков. Незадерновані алювіальні піски на лівому березі Дніпра на піщаній арені, де зростають поодинокі екземпляри *C. konkae*. Секвеновано послідовності ITS (двократна повторність, сіквенс borK: MW383493) та *rpl32-trnL* (сіквенс borK-h).

Локалітет 4 (borBK). Зразок 12.07.14-14: Херсонська область, околиці села Бобровий Кут, 47.0878 N, 32.9236 E, 12.07.2014, збрала В. Діденко. Виходи підстилаючих піщаних порід на високому правому березі р. Інгулець неподалік від локалітетів, де зростає *C. paczoskii* Kotov ex Klok. та *C. diffusa* Lam. Секвеновано послідовність ITS (сіквенс borBK) та короткий (240 п.о.) стартовий 5'-фрагмент послідовності *rpl32-trnL*, ідентичний до borGA-h і до молекулярно-філогенетичного аналізу не включений.

Крім того, для з'ясування питань про зв'язки *C. borysthenica* з агрегатом *C. arenaria* agg. та з *C. stoebe* s.l. до аналізу було залучено послідовності ITS та *rpl32-trnL* зразків *C. odessana* та *C. stoebe* L. з території України:

Локалітет *C. odessana* (ode). Зразок 10.07.14-2: Херсонська область, Національний природний парк «Джарилгацький», острів Джарилгач, 46.0352 N, 32.9367 E, 10.07.2014, збрала В. Діденко. Приморські слабо задерновані піски. Секвеновано послідовності ITS (сіквенс ode: MW383495) та *rpl32-trnL* (сіквенс ode-h).

Локалітет *C. stoebe* (sto5). Зразок № 115: Хмельницька область, Кам'янець-Подільський район, село Вербка, Національний природний парк «Подільські Товтри», Товтра Вербецька, 48.8087 N, 26.6026 E, 11.07.2013, зібрав І. Мойсієнко. Степовий схил

з вапняковими відслоненнями. Секвеновано послідовність ITS (сіквенс sto5: MW383497).

Локалітет *C. stoebe* (sto6). Зразок № 116: Хмельницька область, Кам'янець-Подільський район, село Нігин, Національний природний парк «Подільські Товтри», Нігинська Товтра, 48.8464 N, 26.5853 E, 11.07.2013, зібрав І. Мойсієнко. Степовий схил з вапняковими відслоненнями. Секвеновано послідовності ITS (сіквенс sto6: MW383498) та *rpl32-trnL* (сіквенс sto6-h).

Ідентифікація зразків *C. borysthenica* та *C. odessana* в польових умовах була підтверджена авторитетними ботаніками І.І. Мойсієнком (Херсонський державний університет) та В.П. Коломійчуком (Київський національний університет імені Тараса Шевченка); зразки *C. stoebe* були зібрані, ідентифіковані та передані нам на аналіз проф. І.І. Мойсієнком. Опрацьовані зразки зберігаються у приватній колекції гербарних зразків В.І. Діденко.

Виділення ДНК, ампліфікація, секвенування. Тотальну ДНК виділяли з висушених до повітряно-сухого стану фрагментів листків СТАВ-методом [DOYLE, DOYLE, 1987] за модифікованою для гербарних зразків методикою [TARIEIEV et al., 2011]. Ампліфікацію проводили за [Chassot et al., 2001] на термоциклері Techne. Для ампліфікації послідовності ITS1-5.8S rRNA-ITS2 використовували традиційні праймери ITS1-F та ITS4-R [WHITE et al., 1990], для *rpl32-trnL* – праймери *rpl32-F* та *trnL* (UAG)-R [SHAW et al., 2007]. Секвенування здійснено в компанії Macrogen Inc. (<http://www.Macrogen.com/>, Нідерланди) за допомогою праймерів, використаних для отримання ампліконів.

Редагування здійснювали шляхом візуальної інспекції хроматограм за допомогою програми BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html), порівнюючи хроматограми прямої та зворотної послідовностей [HALL, 1999]. Неоднозначно ідентифіковані нуклеотиди наведені згідно до класифікації IUPAC [<https://iupac.org/>]. Поодинокі сайти з неоднозначно ідентифікованими нуклеотидами, які на хроматограмі знаходились в оточенні довгих (більше 10) фрагментів з однозначно ідентифікованими нуклеотидами, інтерпретували як сайти з однонуклеотидним поліморфізмом (SNP). Оскільки SNP спостерігались виключно на хроматограмах сіквенсів ITS, і були відсутні на хроматограмах *rpl32-trnL*, то наявність SNP надалі інтерпретували як прояв інтрагеномного поліморфізму, обумовленого гетерозиготністю ITS-локусу аналогічно до наведеного в літературі підходу [MATRYNIUK et al., 2018; KARPENKO et al., 2018].

Анотацію послідовностей ITS1-5.8S rRNA-ITS2 здійснювали згідно моделі запропонованої для Asteraceae [GOERTZEN et al., 2003]. Відповідно до цієї моделі, стартова анотуюча послідовність ITS1 відповідала 5'-TCGAASCCT. Кінцева анотуюча послідовність ITS2 5'-GATGYTTCGACC визначена за сайтом рестрикції C1 відповідно до моделі [CAISOVÁ et al., 2013]. Анотацію послідовностей *rpl32-trnL* здійснювали шляхом порівняння оригінальних послідовностей з повним пластидним геномом *C. diffusa* (KJ690264), для якого відомі послідовності генів та спейсерів [TURNER, GRASSA, 2014].

Формування масивів даних. Вибірку сіквенсів для молекулярно-філогенетичного аналізу формували наступним чином.

Для послідовностей *rpl32-trnL* у масив даних були включені: а) всі оригінальні сіквенси *C. borysthenica* та інших представників підсекції *Centaurea* з території України (*C. odessana*, *C. stoebe*); б) оригінальні сіквенси тих представників підсекції *Centaurea* та *Phalolepis*, які зростали в локалітетах разом або поруч із *C. borysthenica* (*C. konkae*, *C. appendicata*, *C. paczoskii*); в) депоновані в NCBI послідовності всіх представників підсекції *Centaurea* та *Phalolepis*, які за результатами BLAST-пошуку виявились ідентичними до *C. borysthenica*; г) депоновані в NCBI послідовності всіх видів підсекції *Centaurea*, які отримані з матеріалу інших країн, проте згідно до флористичних списків

Таблиця 1

Операційні таксономічні одиниці та їх сіквенс, включені до масиву даних ITS та rpl32-trnL

Table 1

Operational taxonomic units and their sequences included in the ITS and rpl32-trnL dataset

Вид, підсекція (в дужках, за Hilpold & al., 2014b), країна та/або ізолят	ITS: код доступу або оригінальний сіквенс	риботип або комбінація алелей риботипів (за наявності SNP)	rpl32-trnL: код доступу або оригінальний сіквенс	гаплотип
1	2	3	4	5
<i>C. affinis</i> Friv. (C): Болгарія	KJ665890	rbt1+rbt32	KJ679586	h2
<i>C. aggregata</i> DC. (C): Туреччина	-	-	KJ679592	h24
<i>C. alba</i> L. ssp. <i>alba</i> (W): Португалія	KJ665903	rbt51	KJ679599	h15
<i>C. ambigua</i> Guss. (C): Італія	KJ665906	rbt11	KJ679602	h11
<i>C. anthemifolia</i> Hub.-Mor. (C): Туреччина	KJ665910	rbt42+rbt43	KJ679606	h26
<i>C. aphrodisaea</i> Boiss. (P): Туреччина	-	-	KJ679607	h36
<i>C. appendicata</i> Klok. (P): Україна (l.cl.), S10	KX950819	rbt22+rbt29	app1-h	h8
<i>C. arenaria</i> Willd. (C): Туреччина (Балкани)	KJ665920	rbt1+rbt35	KJ679616	h4
<i>C. argentea</i> L. ssp. <i>argentea</i> (C): Крит	KJ665921	rbt13	KJ679617	h23
<i>C. aristata</i> Hoffmanns & Link (W): Іспанія	KJ665926	rbt51	KJ679622	h14
<i>C. aziziana</i> Rech.f. (P): Іран	DQ319089	rbt31	KJ679631	h4
<i>C. borysthenica</i> Gruner (C): Україна (Курилівка), borK	MW383493	rbt27+rbt24	borK-h	h4
<i>C. borysthenica</i> (C): Україна (Розумівка), borR2	borR2	rbt26+rbt27	borR-h	h4
<i>C. borysthenica</i> (C): Україна (о-в Гусячий), borGA	MW383494	rbt1+rbt13	borGA-h	h4
<i>C. borysthenica</i> (C): Україна (Бобровий Кут), borBK	borBK	rbt1	-	-
<i>C. borysthenica</i> (C): Німеччина (?)	KT249754	rbt55+rbt56	-	-
<i>C. breviceps</i> Пјин (P): Україна, Дніпропетровськ (?)	KJ665944	rbt20+rbt21	KJ679642	h6
<i>C. brulla</i> Greuter (P): Італія	KJ665945	rbt11+rbt13	KJ679643	h28
<i>C. calolepis</i> Boiss. (W): Туреччина	KJ665949	rbt44	KJ679647	h1
<i>C. cariensiformis</i> Hub.-Mor. (C): Туреччина	KJ665950	rbt43	KJ679649	h24
<i>C. cineraria</i> L. ssp. <i>cineraria</i> (C): Італія	KJ665962	rbt13+rbt11	KJ679661	h18
<i>C. corymbosa</i> Pourr. (C): Франція	KJ665968	rbt16	KJ679670	h12
<i>C. costae</i> Willk. (W): Іспанія	KJ665971	rbt50	KJ679673	h12
<i>C. cuneifolia</i> Sm. (C): Туреччина	KJ665976	rbt1+rbt34	KJ679679	h31
<i>C. cuneifolia</i> (C): Туреччина	KJ665976	rbt1+rbt34	KJ679679	h31
<i>C. deusta</i> Ten. (P): Болгарія	KJ665983	rbt11	KJ679686	h7
<i>C. deusta</i> (P): Греція	-	-	KT259451	h31
<i>C. deusta</i> (P): Італія	-	-	KJ679689	h28
<i>C. deusta</i> (P): Італія	KJ665987	rbt11	KJ679690	h35
<i>C. diffusa</i> Lam. (C): Армєнія	KJ665995	rbt11	KJ679698	h31
<i>C. diffusa</i> (C): Україна (Бобровий Кут), difBK	MW383496	rbt11+rbt12	-	-
<i>C. diffusa</i> (C): Туреччина	KJ665996	rbt13	KJ679699	h31
<i>C. donetzica</i> Klok. (P): Україна	JF913986 JF913987	rbt23 rbt25	KJ679701	h4
<i>C. grisebachii</i> (Nyman) Heldr. (C): Греція	KJ666007	rbt1	KJ679713	h30
<i>C. gymnocarpa</i> Moris & De Not. (C): Італія	KJ666008	rbt52	KJ679714	h10
<i>C. konkae</i> Klok.(P): Україна (l.cl.), konGA	KX950820	rbt22+rbt30	konGA-h	h19
<i>C. konkae</i> (P): Україна (Курилівка), konK	KX950821	rbt22+rbt30	konK-h	h4
<i>C. leucophaea</i> Jord. ssp. <i>leucophaea</i> (W): Іспанія	KJ666039	rbt53	KJ679747	h13
<i>C. limbata</i> ssp. <i>lusitana</i> (Arenès) E. López & Devesa (W): Португалія	KJ666044	rbt51	KJ679752	h16
<i>C. luschaniana</i> Heimerl ex Starf (W): Туреччина (Кип)	KJ666047	rbt44	KJ679755	h27
<i>C. lycia</i> Boiss. (P): Туреччина	KJ666048	rbt45+rbt43	KJ679756	h24
<i>C. maculosa</i> Lam. (C): США	-	-	MN228501	h31
<i>C. margarita-alba</i> Klok.(P): Україна	KJ666049	rbt21	KJ679758	h20
<i>C. margaritacea</i> Ten. (P): Україна	KJ666050	rbt20	KJ679759	h3
<i>C. odessana</i> Prodan (C): Україна (Джарилгач), ode	MW383495	rbt1	ode-h	h4

1	2	3	4	5
<i>C. paczoskii</i> Kotov ex Klok. (P): Україна (l.cl.)	KJ666058	rbt1+rbt32	KJ679768	h4
<i>C. paniculata</i> L. ssp. <i>paniculata</i> (W): Іспанія	-	-	KJ679773	h13
<i>C. pannonica</i> (Heuff.) Hayek (JP): Чехія?	MN918909	rbt56	-	-
<i>C. pentadactyli</i> Brullo & al. (P): Італія	-	-	KJ679785	h11
<i>C. phrygia</i> L. ssp. <i>phrygia</i> (JP): Румунія	KF721045	rbt55	-	-
<i>C. princeps</i> Boiss. & Heldr. (P): Греція	-	-	KJ679794	h29
<i>C. protogerberi</i> Klok. (P): Україна	KJ666081	rbt26	KJ679795	h21
<i>C. protomargaritacea</i> Klok. (P): Україна (l.cl.)	KJ666082	rbt20	KJ679796	h7
<i>C. pseudoleucolepis</i> (P): Україна (l.cl.)	KJ666084	rbt11+rbt36	KJ679798	h31
<i>C. pseudoleucolepis</i> Kleor. (P): Україна (l.cl.), plei	MW364632	rbt11+rbt14	plei-hpt	h21
<i>C. pseudomaculosa</i> Dobroc. (C): Росія	KJ666085	rbt13	KJ679799	h31
<i>C. sarandinakiae</i> Illar. (P): Україна (Крим, Карадаг)	KJ666093	rbt1	KJ679807	h9
<i>C. semijusta</i> Juz. (P): Україна (Крим, Чатир-Даг)	DQ319162	rbt3	KJ679811	h4
<i>C. spinosa</i> L. (C): Греція (Крит)	KJ666100	rbt11	KJ679815	h22
<i>C. sterilis</i> Steven (P): Україна (Крим, Планерське)	DQ319167	rbt28	KJ679823	h31
<i>C. stoebe</i> L. (C): Австрія	KJ666108	rbt13+rbt37	KJ679824	h29
<i>C. stoebe</i> (C): Італія	KJ666109	rbt38	KJ679825	h31
<i>C. stoebe</i> (C): Косово	-	-	KJ679827	h24
<i>C. stoebe</i> (C): Сербія	KJ666112	rbt1	KJ679828	h32
<i>C. stoebe</i> (C): Словенія	KJ666113	rbt13	KJ679829	h31
<i>C. stoebe</i> (C): Україна (Подільські Товтри), sto5	MW383497	rbt11+rbt13	-	-
<i>C. stoebe</i> (C): Україна (Подільські Товтри), sto6	MW383498	rbt13	sto6-h	h31
<i>C. stoebe</i> (C): Україна (Чутове), S23a_2x	JF914031	rbt46+rbt47	-	-
<i>C. stoebe</i> (C): Україна (Чутове), S23b_2x	JF914032	rbt48	-	-
<i>C. stoebe</i> ssp. <i>australis</i> (A. Kern.) Greuter (C): Угорщина	KJ666114	rbt13	KJ679830	h29
<i>C. tenoreana</i> Willk. (P): Італія	KF032420	rbt39+rbt40	KJ679834	h17
<i>C. vankovii</i> Klok. (P): Україна (Крим, Демерджи)	JF914074	rbt28	KJ679841	h5
<i>C. virgata</i> Lam. (W): Туреччина	KJ666123	rbt44	KJ679843	h25
<i>C. zeybekii</i> Wagenitz (C): Туреччина	KJ666127	rbt41	KJ679850	h34
<i>C. akamantis</i> T.Georgiadis & Hadjik. (<i>rpl32-trnL</i> outgroup)	-	-	KJ679593	outgroup
<i>C. benedicta</i> (L.) L. (ITS outgroup)	DQ319091	outgroup	-	-

зростають, у тому числі, в Україні; д) групу сіквенсів, які представляють основні клади підсекцій *Centurea* та *Phalolepis* світової флори на глобальному філогенетичному дереві гаплотипів [HILPOLD et al., 2014a] (табл. 1). Як зовнішню групу було обрано *C. akamantis* T. Georgiadis & Hadjik., KJ679593. Отримана вибірка без урахування зовнішньої групи включала 67 послідовностей 57 операційних таксономічних одиниць (ОТО), при цьому лише 36 послідовностей були унікальними.

До вибірки сіквенсів, використаної для молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності ITS було включено, по-перше, всі послідовності *C. borysthenica* (оригінальні та депоновані в NCBI послідовність KT249754 з Німеччини), по-друге, всі послідовності ITS тих зразків, які були використані при аналізі *rpl32-trnL*, за винятком послідовностей, які мали множинні SNP і не могли бути *in silico* розмежовані на алелі чистих ліній; по-третє, всі депоновані в NCBI сіквенси представників підсекції *Centaurea* з території України; по-четверте, депоновані в NCBI послідовності представників підсекцій *Centaurea* та *Phalolepis*, які за результатами BLAST-пошуку виявились ідентичними до *C. borysthenica*, але не були секвенсовані за *rpl32-trnL*; по-п'яте, депоновані в NCBI послідовності видів підсекції *Centaurea*, які отримані з матеріалу інших країн, проте згідно до флористичних списків зростають, у тому числі, в Україні; по-шосте, групу сіквенсів, які представляють основні клади підсекцій *Centurea* та *Phalolepis* світової флори на глобальному філогенетичному дереві риботипів

Референтні гаплотипи, їх назви за Hilpold et al. (2014a), представленість за кількістю відомих сіквенсів та таксонів, наявність у масиві даних (всього 35 гаплотипів, виявлених у 127 ОТО)

Table 2

Reference haplotypes, their names according to Hilpold et al. (2014a), representation by the number of known sequences and taxa, presence in the dataset (a total of 35 haplotypes detected in 127 OTs)

Код гапло-типу	Референтний сіквенс та назва гаплотипу за Hilpold & al. (2014)	Seq/Tax*	З них включені до масиву даних (таксон та сіквенс)
h1	KJ679647, CJP-E: Anatolian	1/1	<i>C. calolepis</i> KJ679647
h2	KJ679586, CJP-CM	1/1	<i>C. affinis</i> KJ679586
h3	KJ679759, CJP-CM: Ukraine	1/1	<i>C. margaritacea</i> KJ679759
h4	KJ679616, CJP-CM: Ukraine	10/8	<i>C. arenaria</i> KJ679616, <i>C. borysthenica</i> borGA-h, <i>C. borysthenica</i> borK-h, <i>C. borysthenica</i> borR-h, <i>C. odessana</i> ode-h, <i>C. konkae</i> konK-h, <i>C. paczoskii</i> KJ679768, <i>C. donetzica</i> KJ679701, <i>C. semijusta</i> KJ679811, <i>C. aziziana</i> KJ679631
h5	KJ679841, CJP-CM: Ukraine	1/1	<i>C. vankovii</i> KJ679841
h6	KJ679642, CJP-CM: Ukraine	1/1	<i>C. breviceps</i> KJ679642
h7	KJ679796, CJP-CM: Ukraine	2/2	<i>C. protomargaritacea</i> KJ679796, <i>C. deusta</i> KJ679686
h8	app1-h, CJP-CM	1/1	<i>C. appendicata</i> app1-h
h9	KJ679807, CJP-CM	1/1	<i>C. sarandinakiae</i> KJ679807
h10	KJ679714, CJP-CM	1/1	<i>C. gymnocarpa</i> KJ679714
h11	KJ679602, CJP-CM	6/6	<i>C. ambigua</i> KJ679602, <i>C. pentadactyli</i> KJ679785
h12	KJ679670, CJP-CM: Ligurian	8/6	<i>C. corymbosa</i> KJ679670, <i>C. costae</i> KJ679673
h13	KJ679773, CJP-CM: Ligurian	2/2	<i>C. paniculata</i> ssp. <i>paniculata</i> KJ679773, <i>C. leucophaea</i> ssp. <i>leucophaea</i> KJ679747
h14	KJ679622, CJP-CM: Iberian	7/7	<i>C. aristata</i> KJ679622
h15	KJ679599, CJP-CM: Iberian	22/15	<i>C. alba</i> ssp. <i>alba</i> KJ679599
h16	KJ679630, CJP-CM: Iberian	35/8	<i>C. limbata</i> ssp. <i>lusitana</i> KJ679752
h17	KJ679834, CJP-CM	1/1	<i>C. tenoreana</i> KJ679834
h18	KJ679669, CJP-CM	4/4	<i>C. cineraria</i> ssp. <i>cineraria</i> KJ679661
h19	konGA-h, CJP-CM	1/1	<i>C. konkae</i> konGA-h
h20	KJ679758, CJP-CM	1/1	<i>C. margarita-alba</i> KJ679758
h21	KJ679795, CJP-3	2/2	<i>C. protogerberi</i> KJ679795, <i>C. pseudoleucolepis</i> plei-h
h22	KJ679815, CJP-CR	1/1	<i>C. spinosa</i> KJ679815
h23	KJ679617, CJP-CR	4/2	<i>C. argentea</i> ssp. <i>argentea</i> KJ679617
h24	KJ679592, CJP-E: Anatolian	6/6	<i>C. aggregata</i> KJ679592, <i>C. stoebe</i> KJ679827, <i>C. lycia</i> KJ679756, <i>C. cariensiformis</i> KJ679649
h26	KJ679606, CJP-E: Anatolian	1/1	<i>C. anthemifolia</i> KJ679606
h25	KJ679843, CJP-E: Anatolian	1/1	<i>C. virgata</i> KJ679843
h27	KJ679755, CJP-E: Turkey-Cyprus	4/4	<i>C. luschaniana</i> KJ679755
h36	KJ679607, CJP-E: Turkey-Cyprus	1/1	<i>C. aphrodisea</i> KJ679607
h28	KJ679643, CJP-E: Greek	4/3	<i>C. brulla</i> KJ679643, <i>C. deusta</i> IT KJ679689
h29	KJ679794, CJP-E: Greek	8/8	<i>C. princeps</i> KJ679794, <i>C. stoebe</i> KJ679824, <i>C. stoebe</i> ssp. <i>australis</i> KJ679830
h30	KJ679713, CJP-E: Greek	1/1	<i>C. grisebachii</i> KJ679713
h31	KJ679799, CJP-E: Eastern-European	32/24	<i>C. pseudomaculosa</i> KJ679799, <i>C. diffusa</i> KJ679698, KJ679699, <i>C. cuneifolia</i> KJ679679, <i>C. stoebe</i> sto6-h, KJ679825, KJ679829, <i>C. pseudoleucolepis</i> KJ679798, <i>C. deusta</i> KT259451, <i>C. sterilis</i> KJ679823, <i>C. maculosa</i> MN228501
h32	KJ679828, CJP-E: Eastern-European	1/1	<i>C. stoebe</i> KJ679828
h33	KJ679826, CJP-E: Eastern-European	1/1	<i>C. stoebe</i> KJ679826
h34	KJ679850, CJP-E: Eastern-European	1/1	<i>C. zeybekii</i> KJ679850
h35	KJ679690, CJP-E: Eastern-European	1/1	<i>C. deusta</i> KJ679690

Скорочення (відповідно до назв гаплотипів за Hilpold et al., 2014a): CJP – гаплотипи групи *Centaurea* & *Jacea-Phrygia* (*Centaurea* & *Jacea-Phrygia* group); CJP-E – східні гаплотипи CJP-групи (Eastern haplotypes), CJP-CM – циркум-середземноморські гаплотипи CJP-групи (C-Mediterranean haplotypes), CJP-CR – критський гаплотип CJP-групи (Crete haplotype).

* Seq/Tax – кількість виявлених послідовностей даного гаплотипу (ориг. та депонованих в NCBI) та кількість таксонів, у яких виявлено даний гаплотип

[NILPOLD et al., 2014a; MOYSIYENKO et al., 2014] (табл. 1). Як зовнішню групу було обрано *C. benedicta* (L.) L., DQ319091.

Наявність SNP вважали ознакою потенційного аллоплоїда [SOLTIS, SOLTIS, 2009]. Згідно до поглядів вказаних дослідників, операційні таксономічні одиниці з різними алелями розглядаються як аллоплоїди, а ОТО без SNP – як автоплоїди [SOLTIS, SOLTIS, 2009]. Терміни аллоплоїд та автоплоїд вжиті згідно «A Dictionary of Genetics» [KING et al., 2007]. Послідовності, які мали більше двох SNP, з аналізу видаляли. Ті послідовності, які мали лише поодинокі SNP, розмежовували на алелі з альтернативними варіантами нуклеотидів у поліморфному сайті [MARTYNIUK et al., 2018]. Кожну алель при філогенетичному аналізі обробляли як самостійну послідовність (сіквенс алелей позначені після коду доступу або оригінального коду послідовності індексом «-a1» або «-a2»).

Ідентичні послідовності *rpl32-trnL* або ITS різних ОТО об'єднували в гаплотипи або риботипи, відповідно. Кожний унікальний гаплотип та риботип отримували порядковий номер з префіксом «h» (haplotype) або «rbt» (ribotype) (табл. 2–3).

Молекулярно-філогенетичні дерева будували за методом Байєсівського аналізу висновку за допомогою програмного пакета MrBayes 3.2 [RONQUIST, HUELSENBECK, 2003]. Оптимальну модель еволюції послідовностей, яка описує масиви даних *rpl32-trnL* та ITS обирали на основі аналізу кожного масиву за критерієм BIC [Lukashov, 2009] у програмах MEGA6 та MEGA10 [TAMURA et al., 2013; KUMAR et al., 2018]. Для масиву *rpl32-trnL* оптимальною виявилась модель GTR+G, для ITS – K2+G. При аналізі кількість ітерацій становила 4 млн, базові установки, відмінні від default settings, включали samplefreq = 100, diagnfreq = 1000. Для візуалізації дендритів використовували FigTree v.1.4.3 [RAMBAUT, 2016].

Моделювання вторинної структури ITS1 та ITS2. Моделі вторинної структури ITS1 та ITS2 будували прямим складанням транскриптів за допомогою mFOLD [ZUKER, 2003] шляхом послідовної збірки спіралей у відповідності до моделі, запропонованої для Asteraceae [GOERTZEN et al., 2003]. Отримані моделі вторинних структур ITS1 та ITS2 візуалізували за допомогою Pseudoviewer 3.0 [BYUN, KYUNGSOOK, 2006].

При аналізі отриманих даних були використані три підходи: а) прямий пошук ідентичних або близьких сіквенсів у базі нуклеотидних послідовностей, депонованих в NCBI (BLAST-пошук за алгоритмом MEGABLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>]); б) аналіз положення отриманих послідовностей *C. borysthenica* на молекулярно-філогенетичних деревах риботипів та гаплотипів волошок секції *Centaurea* [в розумінні NILPOLD et al., 2014a], що зростають в Україні та на «великому» філогенетичному дереві підроду *Centaurea*, опублікованому групою іспанських ботаніків [NILPOLD et al., 2014a]; в) порівняльний аналіз вторинної структури транскриптів ITS1 та ITS2 риботипів *C. borysthenica* з іншими, потенційно близькими представниками підсекцій *Acrolophus* та *Phalolepis*.

Результати досліджень

Морфологічна гетерогенність *C. borysthenica*. Хоча всі чотири зразки відповідали опису *C. borysthenica*, проте вони не були повністю ідентичними. Найсуттєвіше відрізнявся зразок з села Лисогірка (borR) – ширшими та коротшими листочками обгортки, більшою кількістю торочок на зовнішніх та середніх листочках обгортки, досить великими плівчастими вушками. Кошики та обгортки трьох інших зразків були досить схожими і в цілому нагадували *C. odessana*, особливо зразок з острова Гусячий (за темними, майже чорними верхівками придатків) (Рис. 1–2). Проте від *C. odessana* всі зразки відрізнялись меншими насінинами та коротшим чубчиком (Рис. 3).

Таблиця 3

Референтні риботипи, їх назви за Hilpold et al. (2014a), представленість за кількістю відомих сіквенсів та таксонів, наявність у масиві даних (167 сіквенсів, всього 36 риботипів, представлених у 110 ОТО)

Table 3

Reference ribotypes, their names according to Hilpold et al. (2014a), representation by the number of known sequences and taxa, presence in the dataset (167 sequences, a total of 36 ribotypes, represented in 110 OTs)

Код риботипу	Референтний сіквенс та назва риботипу за Hilpold & al. (2014)	Seq/Tax*	З них включені до масиву даних (таксон та сіквенс)
1	2	3	4
rbt23	JF913986, Eastern ribotype: Ukraine-1	1/1	<i>C. donetzica</i> JF913986
rbt22	JF913988, Eastern ribotype: Ukraine-1	4/3	<i>C. appendicata</i> KX950819-a1 <i>C. konkae</i> KX950820-a1 konGA <i>C. konkae</i> KX950821-a1 konK
rbt26	KJ666081, Eastern ribotype: Ukraine-1	3/2	<i>C. protogerberi</i> KJ666081 <i>C. borysthenica</i> borR2-a1
rbt25	JF913987, Eastern ribotype: Ukraine-1		<i>C. donetzica</i> JF913987
rbt27	MW383493-a1 (83.C, 458.T) (Eastern ribotype: <i>C.borysthenica</i>)	2/1	<i>C. borysthenica</i> MW383493-a1, <i>C. borysthenica</i> borR2-a2
rbt24	MW383493-a2 (83.T, 458.C) (Eastern ribotype: <i>C.borysthenica</i>)	1/1	<i>C. borysthenica</i> MW383493-a2
rbt21	KJ666049, Eastern ribotype: Ukraine-2	2/2	<i>C. margarita-alba</i> KJ666049 <i>C. breviceps</i> KJ665944-a2
rbt20	KJ666082, Eastern ribotype: Ukraine-2	4/2	<i>C. protomargaritacea</i> KJ666082, <i>C. margaritacea</i> KJ666050, <i>C. breviceps</i> KJ665944-a1
rbt29	KJ961608, Eastern ribotype: Ukraine-2	2/2	<i>C. appendicata</i> KX950819-a2
rbt30	KX950820-a2, Eastern ribotype: Ukraine-2	2/1	<i>C. konkae</i> KX950820-a2, <i>C. konkae</i> KX950821-a2
rbt43	KJ665950, Eastern ribotype: Turkey	3/3	<i>C. cariensiformis</i> KJ665950, <i>C. lycia</i> KJ666048-a2, <i>C. anthemifolia</i> KJ665910-a2
rbt42	KJ665910-a1 (392.Y>C), Eastern ribotype: Turkey	1/1	<i>C. anthemifolia</i> KJ665910-a1 (C) TR (rbt42)
rbt45	KJ666048-a1 (41.Y>C), Eastern ribotype: Turkey	1/1	<i>C. lycia</i> KJ666048-a1
rbt28	DQ319167, Eastern ribotype	5/4	<i>C. sterilis</i> DQ319167, <i>C. vankovii</i> JF914074
rbt31	DQ319089, Eastern ribotype	1/1	<i>C. aziziana</i> DQ319089
rbt1	MW383495, Eastern ribotype: Balkan	18/15	<i>C. arenaria</i> KJ665920-a1, <i>C. odessana</i> MW383495, <i>C. borysthenica</i> borBK, <i>C. borysthenica</i> MW383494-a1, <i>C. grisebachii</i> KJ666007, <i>C. stoebe</i> KJ666112, <i>C. affinis</i> KJ665890-a1, <i>C. cuneifolia</i> KJ665976-a1, <i>C. paczorskii</i> KJ666058-a1, <i>C. sarandinakiae</i> KJ666093
rbt3	DQ319162, Eastern ribotype: Balkan	1/1	<i>C. semijusta</i> DQ319162
rbt34	KJ665976-a2 (178.Y>T), Eastern ribotype: Balkan	3/3	<i>C. cuneifolia</i> KJ665976-a2, <i>C. affinis</i> KJ665890-a2, <i>C. paczorskii</i> KJ666058-a2
rbt35	KJ665920-a2 (540.Y>T), Eastern ribotype: Balkan	1/1	<i>C. arenaria</i> KJ665920-a2
rbt11	KJ666100, Eastern ribotype	17/11	<i>C. diffusa</i> KJ665995, <i>C. diffusa</i> MW383496-a1, <i>C. spinosa</i> KJ666100, <i>C. cineraria</i> ssp. <i>cineraria</i> KJ665962-a1, <i>C. ambigua</i> KJ665906, <i>C. stoebe</i> MW383497-a1, <i>C. deusta</i> KJ665987, <i>C. deusta</i> KJ665983, <i>C. brulla</i> KJ665945-a1, <i>C. pseudoleucolepis</i> KJ666084-a1, <i>C. pseudoleucolepis</i> MW364632-a1
rbt10	AM114328, Eastern ribotype	2/1	<i>C.pseudoleucolepis</i> AM114328
rbt39	KF032420-a1 (45.Y>C), Eastern ribotype: Adriatic	1/1	<i>C. tenoreana</i> KF032420-a1
rbt40	KF032420-a2 (45.Y>T), Eastern ribotype: Adriatic	1/1	<i>C. tenoreana</i> KF032420-a2

1	2	3	4
rbt13	KJ665996, Eastern ribotype (базальна «гребінка»)	37/12	<i>C. borysthenica</i> MW383494-a2, <i>C. pseudomaculosa</i> KJ666085, <i>C. stoebe</i> MW383498, <i>C. stoebe</i> MW383497-a2, <i>C. stoebe</i> KJ666113, <i>C. stoebe</i> KJ666108-a1, <i>C. stoebe</i> ssp. <i>australis</i> KJ666114, <i>C. stoebe</i> JF914031-a2, <i>C. cineraria</i> ssp. <i>cineraria</i> KJ665962-a2, <i>C. argentea</i> ssp. <i>argentea</i> KJ665921, <i>C. diffusa</i> KJ665996, <i>C. brulla</i> KJ665945-a2
rbt12	MW383496-a2 (141.Y>C, 261.Y>T), Eastern ribotype (базальна «гребінка»)	1/1	<i>C. diffusa</i> MW383496-a2
rbt47	JF914031-a1 (610.Y>C), <i>C. stoebe</i> , Eastern ribotype (базальна «гребінка»)	1/1	<i>C. stoebe</i> JF914031-a1
rbt48	JF914032, Eastern ribotype (базальна «гребінка»)	2/1	<i>C. stoebe</i> JF914032
rbt14	MW364632-a2 (157.Y>C, 472.R>A), Eastern ribotype (базальна «гребінка»)	1/1	<i>C. pseudoleucolepis</i> MW364632-a2
rbt36	KJ666084-a2 (105.Y>C, 420.K>T), Eastern ribotype (базальна «гребінка»)	1/1	<i>C. pseudoleucolepis</i> KJ666084-a2
rbt44	KJ665949, Eastern ribotype (базальна «гребінка», інсерція 40.G)*	5/5	<i>C. luschaniana</i> KJ666047, <i>C. virgata</i> KJ666123, <i>C. calolepis</i> KJ665949
rbt50	KJ665971, Western ribotype: Iberian	5/1	<i>C. costae</i> KJ665971 (WR rbt Lig.)
rbt51	KJ666044, Western ribotype: Iberian	29/18	<i>C. limbata</i> ssp. <i>lusitana</i> KJ666044, <i>C. aristata</i> KJ665926, <i>C. alba</i> ssp. <i>alba</i> KJ665903
rbt52	KJ666008, Western ribotype	1/1	<i>C. gymnocarpa</i> KJ666008
rbt53	KJ666039, Western ribotype	2/2	<i>C. leucophaea</i> ssp. <i>leucophaea</i> KJ666039
rbt55	KF721045, Jacea-Phrygia group	8/7	<i>C. phrygia</i> ssp. <i>phrygia</i> KF721045, <i>C. borysthenica</i> KT249754-a1
rbt56	MN918909, Jacea-Phrygia group	1/1	<i>C. pannonica</i> MN918909
rbt57	KT249754-a2 (13.Y>T, 91-92.YY>CT), Jacea-Phrygia group	1/1	<i>C. borysthenica</i> KT249754-a2

* rbt44 – ймовірний химерний риботип з комбінацією ознак західного риботипу (Western ribotype, subsect. Willkommia) за ITS1 (інсерція 40.G) та східного риботипу rbt13 (Eastern ribotype, subsect. *Centaurea* та subsect. *Phalolepis*) базальної «гребінки».

Від *C. stoebe* зразки *C. borysthenica* та *C. odessana* добре відрізнялись як за кошиками, листочками обгортки та придатками, так і за насінинами (Рис. 1–4).

Гаплотип *C. borysthenica*. Наразі за літературними та оригінальними даними для представників секції *Centaurea* з території України відома 21 хлоропластна послідовність *rpl32-trnL* (табл. 2). Ця вибірка охоплює 3 види підсекції *Centaurea*: *C. borysthenica* (3 сіквенси), *C. odessana* (1) та *C. stoebe* (1) та 14 видів підсекції *Phalolepis* (16 сіквенсів). Окремі хлоропластні послідовності не є цілком видоспецифічними – всього ці послідовності представляють лише 11 унікальних гаплотипів і в межах вибірки не лише різні види однієї підсекції, але й представники різних підсекцій нерідко мають ідентичний гаплотип. Зокрема, гаплотип «h1» всіх трьох секценованих зразків *C. borysthenica* є ідентичним до гаплотипу *C. odessana* з *Centaurea* subsect. та *C. konkae* з околиць Курилівки, *C. paczorskii* з *locus classicus*, *C. donetzica* Клок., *C. semijusta* Juz. з *Phalolepis* subsect. Філогенетичний аналіз за маркерною послідовністю *rpl32-trnL* показує, що гаплотипи видів підсекції *Centaurea* та *Phalolepis* входять щонайменше до восьми умовно-сестринських клад та ліній (рис. 5).

Гаплотип *C. borysthenica* з високою підтримкою включається в кладу 1, яка у NILPOLD et al. (2014a) названа «Ukraine haplotype». Всі носії гаплотипів цієї кледи з підсекції *Centaurea* належать виключно до *C. arenaria* agg. (*C. arenaria* з Балканської частини Туреччини, *C. borysthenica*, *C. odessana*). В підсекції *Phalolepis* гаплотипи кледи «Ukraine haplotype» виявляються у більшій кількості видів. Окрім шести видів з гаплотипом, ідентичним до *C. borysthenica* (*C. paczorskii*, *C. konkae*, *C. donetzica*, *C. semijusta*,

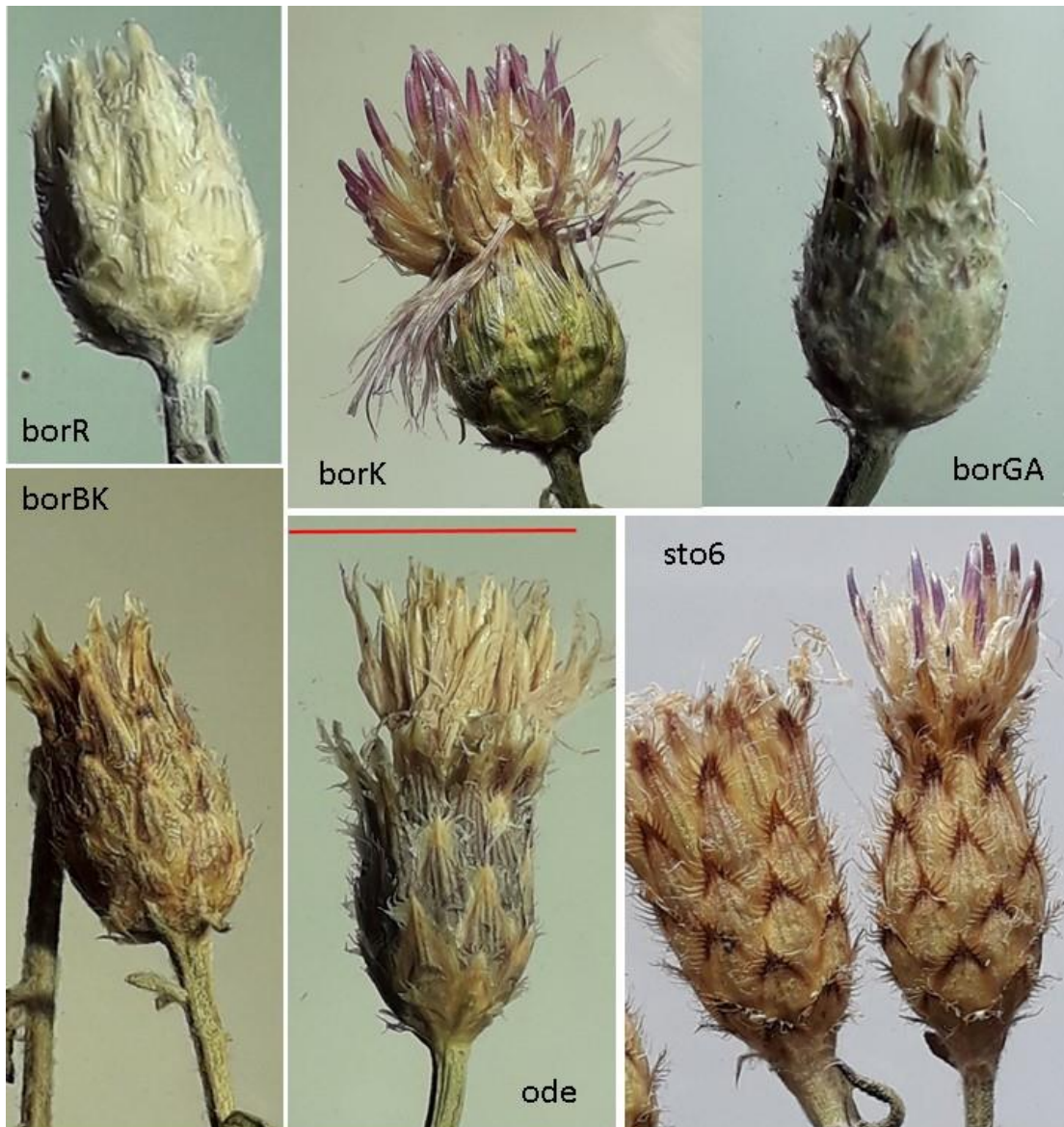


Рис. 1. Кошики досліджених зразків: borR, borK, borGA, borBK – *C. borysthenica* (Лисогірка, Курилівка, острів Гусячий, Бобровий Кут, відповідно); ode – *C. odessana* (Джарилгач); sto6 – *C. stoebe* (Нігинська Товтра). Шкала 1 см.

Fig. 1. Baskets of the studied samples: borR, borK, borGA, borBK – *C. borysthenica* (Lysohirka, Kurylivka, Husyachy Island, Bobrovyy Kut, respectively); ode – *C. odessana* (Dzharylgach); sto6 – *C. stoebe* (Niginska Tovtra). Scale 1 cm.

C. vankovii Klok. та *C. aziziana* Rech. з іранської провінції Східний Азербайджан), до даної клади входять зразки трьох видів перлових волошок з басейну Інгульця та Дніпра (*C. margaritacea* Ten., *C. protomargaritacea* Klok., *C. breviceps* Pjin.) та одного з Балкан (популяція *C. deusta* Ten., KJ679686 з території Болгарії). Жодний представник групи *C. stoebe* s.l. до клади «Ukraine haplotype» не потрапляє.

Натомість *C. stoebe* s.l. представлена гаплотипами трьох підклад клади 7. Більшість ОТО з «*C. stoebe* s.l.», включаючи єдиного секвенованого за *rpl32-trnL* представника *C. stoebe* з території України (ізолят sto6 з Подільських Товтр) входить до підклади «Східно-Європейський гаплотип». Інші ОТО *C. stoebe* s.l. потрапляють до субклад «Грецький гаплотип» та «Анатолійський гаплотип».



Рис. 2. Зовнішні, середні та внутрішні листочки обгортки досліджених зразків: borR, borK, borGA, borBK – *C. borysthenica* (Лисогірка, Курилівка, острів Гусячий, Бобровий Кут, відповідно); ode – *C. odessana* (Джарилгач); sto6 – *C. stoebe* (Нігинська Товтра). Шкала 1 см.

Fig. 2. Outer, middle and inner leaves of the wrapper of the studied samples: borR, borK, borGA, borBK – *C. borysthenica* (Lysohirka, Kurylivka, Husyachy Island, Bobrovy Kut, respectively); ode – *C. odessana* (Dzharylgach); sto6 – *C. stoebe* (Niginska Tovtra). Scale 1 cm.

Таким чином, філогенетичний аналіз хлоропластної послідовності *rpl32-trnL* показує наступне. По-перше, за гаплотипом підтверджується належність *C. borysthenica* разом з *C. odessana* до агрегату *C. arenaria* aggr. По-друге, повністю не підтверджується належність *C. borysthenica* до *C. stoebe* s.l., що, в свою чергу, заперечує припущення про належність *C. borysthenica* до тетраплоїдного цитотипу *C. stoebe* 4x. По-третє, ідентичність гаплотипів волошок агрегату *C. arenaria* aggr. з гаплотипами цілого ряду волошок підсекції *Phalolepis* не дозволяє отримати відповідь на питання, чи є *C. borysthenica* самостійним видом, чи вона є одним з підвидів *C. arenaria*.

Риботипи *C. borysthenica*. Послідовність ITS представників підсекції *Centaurea* з території України наразі встановлена лише для 10-и зразків 4-х видів (*C. borysthenica*, *C. odessana*, *C. stoebe*, *C. diffusa*), з яких 5 зразків представлені ймовірними автоплоїдами, у яких даний маркер не містить SNP. У решти (5 зразків) ITS містить 1-3 SNP, і, таким чином, демонструє ознаки аллоплоїдних ОТО. З урахуванням послідовностей автоплоїдів та алелей аллоплоїдів загалом у представників підсекції *Centaurea* з території України виявлено 9 риботипів (rbt26, rbt27, rbt24, rbt1, rbt13, rbt11, rbt12, rbt47, rbt48) (табл. 3).

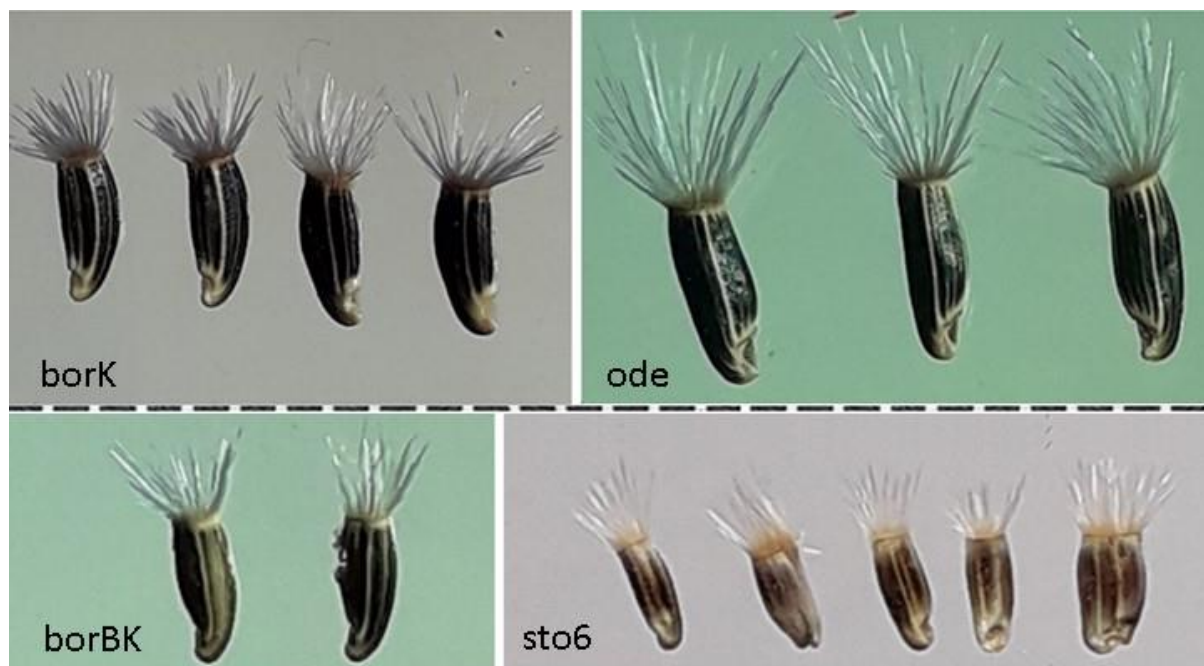


Рис. 3. Насінини досліджених зразків: borK, borBK – *C. borysthenica* (Курилівка, Бобровий Кут, відповідно); ode – *C. odessana* (Джарилгач); sto6 – *C. stoebe* (Нігинська Товтра). Ціна поділки – 1 мм.
Fig. 3. Seeds of the studied samples: borK, borBK – *C. borysthenica* (Kurylivka, Bobrovyy Kut, respectively); ode – *C. odessana* (Dzharylgach); sto6 – *C. stoebe* (Niginska Tovtra). The price of division is 1 mm.

Послідовності ITS у секвенованих зразків *C. borysthenica* не були ідентичними і мали відміни у кожного зразка. Перевірка унікальності отриманих сіквенсів за допомогою BLAST показала, що дві популяції: з околиць села Лисогірки та з околиць селища міського типу Курилівки – є унікальними і не ідентичні до жодної з депонованих у NCBI послідовностей *Centaurea*.

У двох інших зразків – з острова Гусячий та з околиць села Бобровий Кут – послідовності ITS, отримані з тотальної ДНК, не унікальні. Зокрема, *C. borysthenica* з окол. с. Бобровий Кут має ITS, ідентичну до багатьох ізолятів *Centaurea* з обох підсекцій (*Centaurea* subsect. та *Phalolepis* subsect.): загалом виявлено 25 ідентичних сіквенсів, включаючи *C. arenaria* (KJ665920) та *C. odessana* (MW383495), які відповідали риботипу rbt1 (табл. 3).

Послідовність ITS у зразка з острова Гусячий є ідентичною до трьох зразків *C. paczoskii* з окол. с. Бобровий Кут (MW369988, MW369992, MW369993) та зразка *Centaurea* sp. (MW374121) з плато Ак-Кайя у Криму. Відмітимо, в околицях села Бобровий Кут, де зростала популяція *C. paczoskii* (rbt1+rbt13), зростали також *C. diffusa* з комбінацією риботипів rbt1+rbt12 та *C. borysthenica* з риботипом rbt1. На плато Ак-Кайя, де абсолютним домінантом була *C. diffusa*, зразок *Centaurea* sp. мав морфологічні ознаки гібриду *C. diffusa* × *C. sterilis* Steven з комбінацією риботипів rbt1+rbt13.

За наявності SNP в ITS більшість зразків *C. borysthenica* з території України була представлена аллоплоїдами. Так, зразок з Гусячого острова мав комбінацію риботипів rbt1+rbt13, зразок з околиць села Лисогірки – комбінацію rbt26+rbt27, з околиць селища міського типу Курилівки – rbt24+rbt27. Лише зразок з околиць села Бобровий Кут мав ознаки автоплоїда з риботипом rbt1.

Філогенетичний аналіз за маркерною послідовністю ITS показує, що риботипи *C. borysthenica* входять до двох великих клад та базальної «гребінки» риботипів секції *Centaurea* (рис. 6).



Рис. 4. *Centaurea borysthena* з околиць Курилівки – найунікальніший варіант *C. borysthena* з гаплотипом h4, характерним для *C. arenaria* agg. та унікальним третім українським риботипом (rbt27+rbt24) – один з трьох первинних варіантів даного виду.

Fig. 4. *Centaurea borysthena* from the vicinity of Kurylivka is the most unique variant of *C. borysthena* with haplotype h4, characteristic of *C. arenaria* agg. and a unique third Ukrainian ribotype (rbt27+rbt24) – one of the three primary variants of this species.

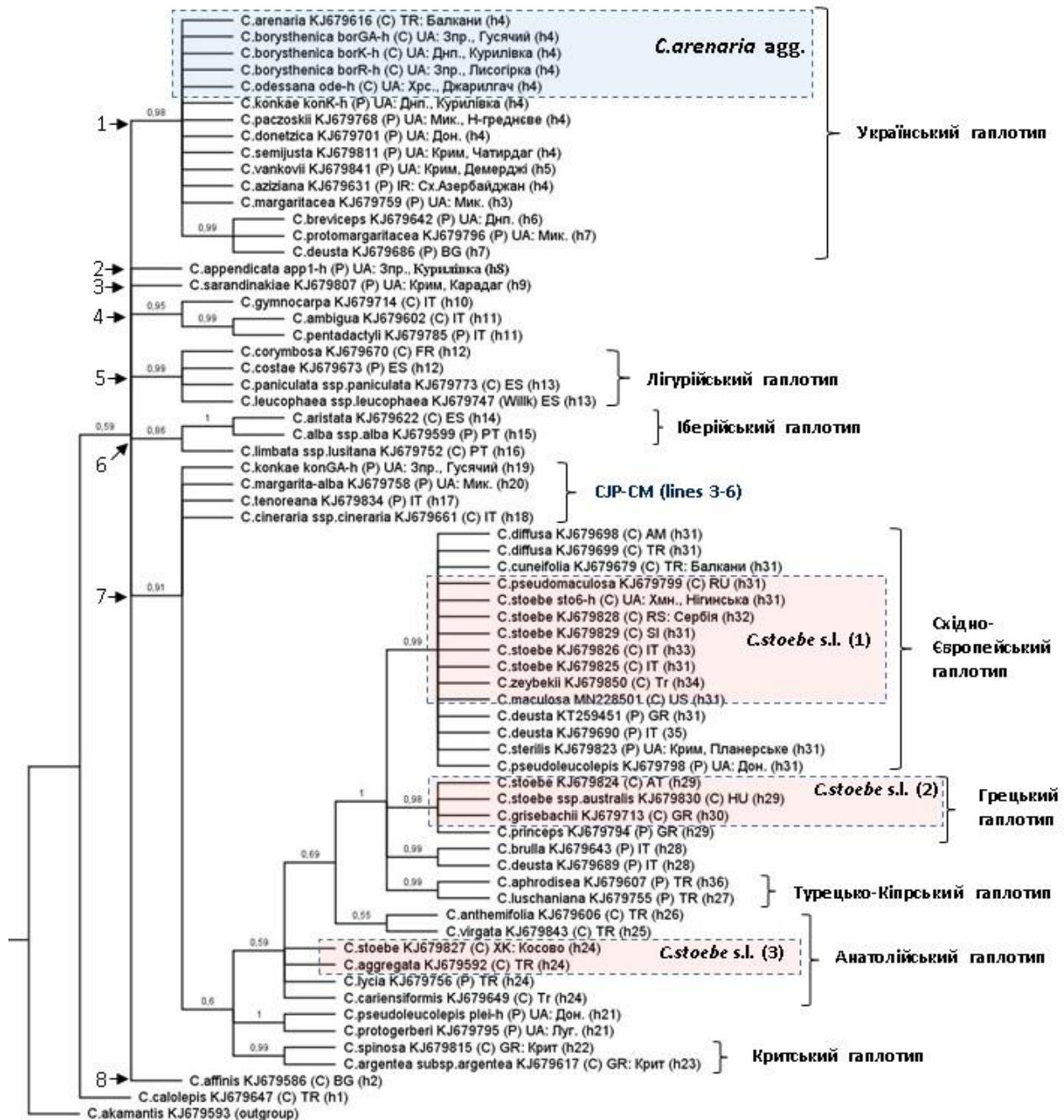


Рис. 5. Положення *C. borysthenea* на молекулярно-філогенетичному дереві гаплотипів підсекції *Centaurea* та *Phalolepis* (sect. *Centaurea*) представників флори України та основних клад світової флори за хлоропластною послідовністю *gpl32-trnL* (Байєсівський аналіз, модель GTR+G). Номерами зі стрілкою позначено умовно-сестринські основні кледи та лінії. Назви гаплотипів наведені за Hilpold et al., 2014a. У рамках позначено послідовності таксонів з *C. arenaria* agg. та *C. stoebe* s.l. В дужках після назви таксону та коду доступу або оригінального коду сіквенсу вказано підсекцію, до якої належить наведена операційна таксономічна одиниця (C – *Centaurea*, P – *Phalolepis*), код країни (для ізолятів з України – скорочення області та пункт збору), в дужках – номер унікального гаплотипу після літери «h». На гілках дендриту наведена підтримка клад за значенням постеріорної ймовірності.

* Підсекції *Centaurea* та *Phalolepis* секції *Centaurea* за системою Hilpold et al. (2014a) відповідають підпрадам *Acrolophus* та *Phalolepis* систем Д.М. Доброчасової (1965) та J. Dostal (1976).

**Автори видів та внутрішньовидових таксонів, позначених на рис. 5 та рис.6, наведені у табл. 1

Fig. 5. The position of *C. borysthena* on the molecular phylogenetic tree of haplotypes of subsections *Centaurea* and *Phalolepis* (sect. *Centaurea*) of representatives of the flora of Ukraine and the main clades of the world flora according to the chloroplast sequence rpl32-trnL (Bayesian analysis, GTR+G model). Numbers with an arrow indicate conditional sister major clades and lineages. Haplotype names are given according to Hilpold et al., 2014a. Sequences of taxa from *C. arenaria* agg and *C. stoebe* s.l. are marked in the frames. and *C. stoebe* s.l. In parentheses after the name of the taxon and the accession code or the original sequence code, the subsection to which the given operational taxonomic unit belongs (C – *Centaurea*, P – *Phalolepis*), the country code (for isolates from Ukraine – region abbreviation and collection point) is indicated in parentheses, in parentheses – unique haplotype number after the letter "h". On the branches of the dendrite, the support of the clades is indicated by the value of the posterior probability.

* The subsections *Centaurea* and *Phalolepis* of the section *Centaurea* according to the system of Hilpold et al. (2014a) correspond to the subgenera *Acrolophus* and *Phalolepis* of the systems of D.M. Dobrochaeva (1965) and J. Dostal (1976).

**The authors of the species and intraspecific taxa marked in Fig. 5 and Fig. 6, given in Table 1.

Перша клада, ареал якої охоплює південне, східне та північне Причорномор'я, включає кілька субклад та ліній. Носії риботипів однієї субклади (Турецькі риботипи – «Turkey ribotype» за Hilpold et al., 2014a) зростають в Анатолії, окремих ліній – у південно-східній частині Кавказу (*C. aziziana*) та в Криму (*C. vankovii*, *C. sterilis*), а трьох субклад (Українські риботипи 1, 2, 3) – на території степової зони України [Hilpold et al., 2014a; DIDENKO et al., 2017]. Цікаво, що ані *C. stoebe* s.l., ані *C. arenaria* не мають риботипів та алелей, які б належали до першої клади.

З п'яти риботипів, виявлених у *C. borysthena*, до першої клади потрапляє три риботипи. Риботип rbt26 представляє субкладу «Українські риботипи 1» («Eastern ribotype: Ukraine 1» за Hilpold et al., 2014a). До цієї субклади належать риботипи перлових волошок, які М.В. Клоков [KLOKOV, 1935] та Д.М. Доброчаєва [DOBROCHAЕVA, 1965] віднесли до рядів «*Gerberianae* Клок.» та «*Appendicatae* Клок.». Риботип rbt26 має *C. protogerberi* Клок., і він же представляє першу алель *C. borysthena* з окол. с. Лисогірка. Цікаво, що в цьому ж локалітеті зростала популяція *C. appendicata*, яка мала комбінацію риботипів «Український риботип 1» та «Український риботип 2» [DIDENKO et al., 2018]. Тому не виключено, що донором першого українського риботипу *C. borysthena*, яка за морфологією додатків мала деякі ознаки гібриду з представником підсекції *Phalolepis*, виступав саме пилко *C. appendicata*.

Два інші риботипи – rbt24 та rbt27 утворюють нову субкладу «Українські риботипи 3». Виявлені виключно у *C. borysthena*, де представлені або однією алеллю (rbt27 у зразка з окол. Лисогірки), або обома алелями (rbt27 та rbt24 у зразка з окол. Курилівки).

Відміни між rbt24 та rbt27 обумовлені мутаціями в сайтах 67 ITS1 (helix 1) (рис. 7) та 22 ITS2 (helix 1) (рис. 8), при яких, тим не менш, обидва риботипи об'єднуються в одну кладу (рис. 5-6). Це вказує, що дивергенція rbt24 та rbt27 відбулась саме через мутації в цих сайтах в межах даної лінії, а SNP 83.Y та 458.Y послідовності MW383493, що відповідають ITS1 68.Y та ITS2 22.Y, у зразка з окол. Курилівки мають негібридну природу (non-hybrid SNP, в розумінні KARBSTEIN et al., 2022).

Друга клада, до якої потрапляють риботипи *C. borysthena*, за Hilpold et al. (2014) – це «Eastern ribotypes: Balkan». Проте ареал носіїв риботипів даної клади значно ширший, і, окрім Балкан, включає північно-західне Причорномор'я та Крим. Найбільш масовий риботип клади – rbt1. У *C. borysthena* з окол. с. Бобовий Кут виявлено лише rbt1. У *C. borysthena* з о-ва Гусячий риботипом rbt1 представлена одна з двох алелей. Риботип rbt1 мають всі секвеновані види *C. arenaria* agg. (*C. arenaria*, *C. odessana*, *C. borysthena* з о-ва Гусячий та з окол. с. Бобровий Кут). Цей риботип виявлений також у балканських популяцій *C. stoebe* s. l., але не знайдений у *C. stoebe* з території України.

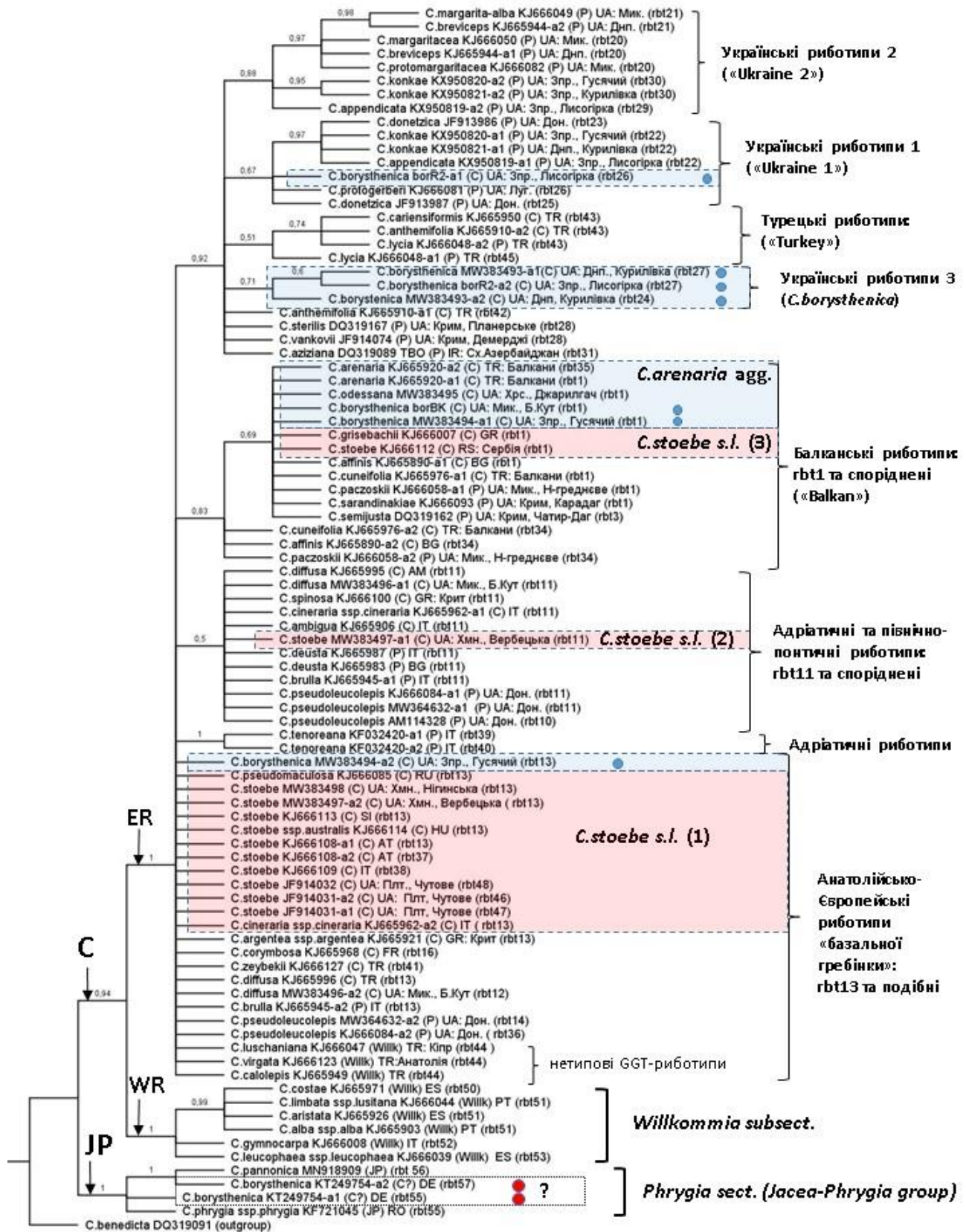


Рис. 6. Положення *C. borysthena* на молекулярно-філогенетичному дереві риботипів підроду *Centaurea* в межах секцій *Centaurea* та *Phrygia* за ядерною послідовністю ITS (Байєсівський аналіз, модель K2+G). Назви риботипів наведені за Hilpold et al., 2014a. В рамках позначено послідовності таксонів з *C. arenaria* agg. та *C. stoebe* s.l. В дужках після назви таксону вказано код доступу або оригінальний код сіквенсу (алелі – з позначкою «-a1» або «-a2»), підсекцію, до якої належить наведена операційна таксономічна одиниця (C – *Centaurea*, P – *Phalolepis*, Willk – *Willkommia*, JP – *Phrygia*), код країни (для ізолятів з України – скорочення області та пункт збору), в дужках – номер унікального риботипу з індексом «rbt». На гілках дендриту наведена підтримка клад за значенням постеріорної ймовірності, коди груп та субклад риботипів: C – *Centaurea* group (sect. *Centaurea*), JP – *Jacea-Phrygia* group (sect. *Phrygia*), ER – Eastern ribotypes (subsect. *Centaurea*, subsect. *Phalolepis*), WR – Western ribotypes (subsect. *Willkommia*).

* Підсекції *Centaurea* та *Phalolepis* секції *Centaurea* за системою Hilpold et al. (2014a) відповідають підродом *Acrolophus* та *Phalolepis* систем Д.М. Доброчаєвої (1965) та J. Dostal (1976).

**Автори видів та внутрішньовидових таксонів, позначених на рис. 5 та рис. 6, наведені у таблиці 1.

Fig. 6. The position of *C. borysthena* on the molecular phylogenetic tree of ribotypes of the subgenus *Centaurea* within the sections *Centaurea* and *Phrygia* according to the nuclear ITS sequence (Bayesian analysis, model K2+G). Ribotype names are given according to Hilpold et al., 2014a. Sequences of taxa from *C. arenaria* agg and *C. stoebe* s.l. are indicated in the frames, and *C. stoebe* s.l. In parentheses after the name of the taxon is the accession code or the original sequence code (alleles are marked "-a1" or "-a2"), the subsection to which the given operational taxonomic unit belongs (C – *Centaurea*, P – *Phalolepis*, Willk – *Willkommia*, JP – *Phrygia*), country code (for isolates from Ukraine – region abbreviation and collection point), unique ribotype number with index “rbt” in brackets. On the branches of the dendrite, the support of clades according to the value of the posterior probability, the codes of groups and subclades of ribotypes are indicated: C – *Centaurea* group (sect. *Centaurea*), JP – *Jacea-Phrygia* group (sect. *Phrygia*), ER - Eastern ribotypes (subsect. *Centaurea*, subsect. *Phalolepis*), WR – Western ribotypes (subsect. *Willkommia*).

* The subsections *Centaurea* and *Phalolepis* of the section *Centaurea* according to the system of Hilpold et al. (2014a) correspond to the subgenera *Acrolophus* and *Phalolepis* of the systems of D. M. Dobrochaeva (1965) and J. Dostal (1976).

**The authors of the species and intraspecific taxa marked in Fig. 5 and Fig. 6, given in Table 1.

Група риботипів так званої базальної «гребінки», до якої увійшла одна алель *C. borysthena* з острова Гусячий, притаманна великій кількості локальних популяцій різних видів як з підсекції *Centaurea*, так і з підсекції *Phalolepis*, що зростають в Малій Азії та Західній, Центральній та Східній Європі. Найбільш масовий риботип у цій групі – це rbt13. Він виявлений у більшості ОТО базальної «гребінки». Інші риботипи в базальній групі представлені у незначній кількості ОТО, і, ймовірно, є варіантами rbt13. Риботип rbt13 – це основний риботип, який представлений у *C. stoebe* s.l., та один з двох основних риботипів *C. diffusa* – тобто найбільш масових видів підсекції *Centaurea*, які, до того ж показали високий інвазійний потенціал, і в багатьох країнах входять до переліку небезпечних карантинних об'єктів.

Стосовно послідовності ITS гербарного зразка GLM67657, зібраного у 1996 році у Західній Європі (Germany, Sachsen), депонованої у NCBI як *C. borysthena* з кодом доступу KT249754 [СНОІ, ТНІНЕС, 2015], то результати філогенетичного аналізу однозначно не підтверджують належності даного зразка ані до *C. borysthena*, ані до секції *Centaurea* взагалі. Послідовність «*C. borysthena*» KT249754 належить представнику секції *Phrygia* Pers. (т.зв. *Jacea-Phrygia* group), близького до *C. phrygia* L. або *C. pannonica* (Heuff.) Hayek, який був або помилково ідентифікований, або помилково етикетований. Висновок підсилюється і тим, що зразок GLM67657 був зібраний далеко за межами ареалу *C. borysthena*, яка вважається локальним українським ендеміком [ДОБРОЧАЄВА, 1965]. Таким чином, філогенетичний аналіз ядерної послідовності ITS показує наступне.

По-перше, за субкладами ITS *C. borysthena* розділяється на дві групи популяцій:

а) гомоплоїди та гетероплоїди прийнятні з однією алеллю з субклади «Українські риботипи 3» (rbt24 та rbt27); риботипи цієї субклади виявлені наразі лише у *C. borysthena*;

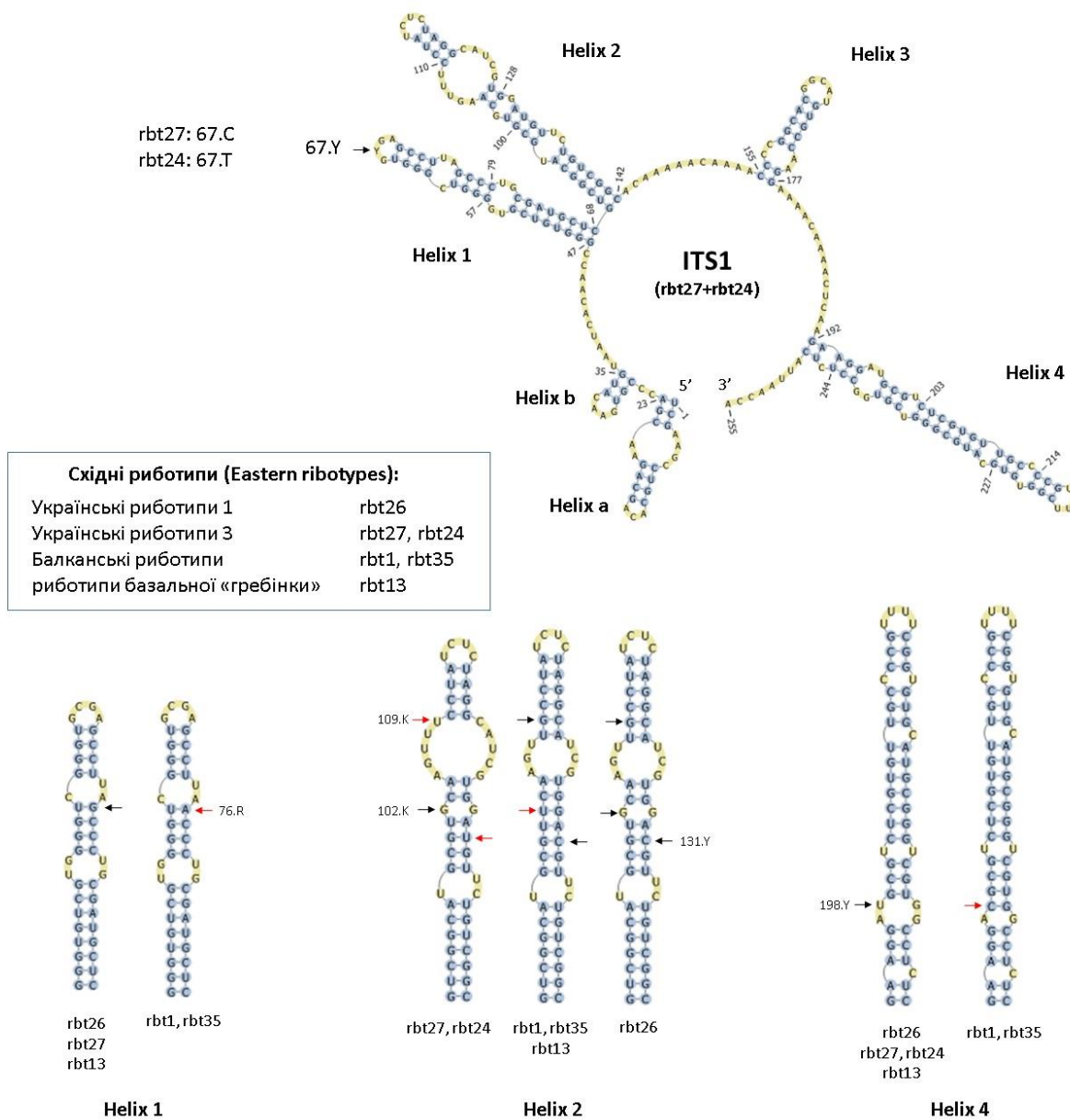


Рис. 7. Модель вторинної структури ITS1 риботипів субклади «Українські риботипи 3» та її відміни за окремими спіралями від інших риботипів, виявлених у зразків *C. arenaria* agg. та її гібридів.

Fig. 7. The model of the secondary structure of ITS1 ribotypes of the subclade "Ukrainian ribotypes 3" and its separation by individual helices from other ribotypes found in samples of *C. arenaria* agg. and its hybrids.

б) гомоплоїди та гетероплоїди з масовим риботипом rbt1 з субклади «Балканські риботипи» (виявлений у різних видів, в т.ч. з *C. arenaria* agg.).

По-друге, у гетероплоїдних зразків *C. borysthena* друга алель може бути представлена або ендемічним риботипом субклади «Українські риботипи 1» (rbt26), характерним для східно-українських перлових волошок та похідним від них гібридогенним ОТО, або масовим риботипом базальної «гребінки» (rbt13), характерним для багатьох видів, включаючи *C. stoebe* s.l. та *C. diffusa*.

Обговорення

Питання про те, чи входить *C. borysthena* в *C. arenaria* agg., має однозначно позитивну відповідь, оскільки в межах підсекції *Centaurea* гаплотип h4 (так звана клада «Ukraine haplotype» за NILPOLD et al., 2014a) притаманний лише видам цього агрегату і не притаманний *C. stoebe* s.l.

Питання про те, чи є *C. borysthena* самостійним видом в межах цього агрегату, чи це самостійний підвид *C. arenaria*, пов'язаний з питанням про специфіку риботипів цих ОТО. Так, для *C. arenaria* та спорідненою з нею *C. odessana* характерною ознакою є наявність принаймні однієї алелі так званої балканського риботипу rbt1. При цьому *C. arenaria* має дві алелі балканського риботипу (rbt1 та rbt35), які відрізняються унікальною напівкомпенсаторною заміною ITS2 140.C>T (hCBC) в третій спіралі ITS2 (Рис. 8). *C. odessana* є гомоплоїдом, у якого обидві алелі представлені риботипом rbt1. SNP ITS2 140.Y, за яким *C. arenaria* відрізняється від *C. odessana*, не має ознак гібридної: по-перше, автоплоїди з риботипом rbt35 або аллоплоїди з алеллю rbt35 наразі не виявлені; по-друге, rbt1 та rbt35 потрапляють в одну молекулярну кладу – до т.зв. балканського риботипу. Наявність у *C. arenaria* алелі rbt35, яка є похідною від rbt1 і характеризується мутацією, що має досить високий таксономічний статус – hCBC – відмежовує дану ОТО від *C. odessana* на видовому рівні.

Якщо припустити, що *C. borysthena* є підвидом *C. arenaria*, то треба очікувати, що її риботип також має бути представленим алелями, що належать до балканської групи риботипів, споріднених з rbt1. Проте ситуація у випадку *C. borysthena* складніша.

Так, популяція з Бобрового Кута (басейн Інгульця), подібно до *C. odessana*, має виключно rbt1, хоча морфологічно відрізняється від останньої меншими розмірами сім'янок та коротшими чубками. За фенотипом представники цієї популяції добре узгоджуються з описом *C. borysthena*, за винятком світлого, а не жовтуватого-бурого, забарвлення центальної твердої частини придатків (рис. 2).

Популяція з окол. смт. Курилівка (рис. 4), розташованої поблизу м. Кам'янське, має зовсім інший риботип з алелями rbt24 та rbt27 з субклади «Українські риботипи 3», яка філогенетично віддалена від клади балканських риботипів і не показує прямого зв'язку з ними. Від опису *C. borysthena* ця популяція практично не відрізняється і морфологічно подібна до популяції з околиць села Бобровий Кут.

Популяція з околиць села Лисогірки під Запоріжжям за морфологією придатків має ознаки гібриду з носієм морфотипу *Phalolepis*, ймовірно – з *C. appendicata*, яка зростала поруч (рис. 2). Обидві ОТО: *C. borysthena* та *C. appendicata* – аллоплоїди, мають одну схожу алель ITS, яка представляє риботип субклади «українські риботипи 1», характерну для автоплоїдів ряду «Gerberianae», виділеного М.В. Клоковим [КЛОКОВ, 1935] та Д.М. Доброчаєвою [ДОВРОСНАЕВА, 1965]. Проте за гаплотипом та другою алеллю риботипу популяції суттєво відрізняються: *C. borysthena* має український гаплотип h4 та алель rbt27 з субклади «Українські риботипи 3», тоді як *C. appendicata* – унікальний гаплотип h8 та алель з субклади «Українські риботипи 2», характерну для ряду «Eumargaritaceae Klok.».

Популяція з острова Гусячий в Каховському водосховищі за морфологією відрізняється від опису *C. borysthena* за темним, майже чорним забарвленням центальної твердої частини придатків, що надає кошикам деяких рис схожості з *C. odessana* та *C. stoebe* s.s. (рис. 1–2). Досліджений екземпляр цієї популяції мав український гаплотип h4 та риботип аллоплоїда з комбінацією алелей балканського риботипу rbt1, характерного для *C. arenaria* agg. та масового анатолійсько-європейського риботипу rbt13, характерного для більшості автоплоїдів з *C. stoebe* s.l. та *C. diffusa*. Тобто фенотип та риботип *C. borysthena* з острова Гусячий вказували на

походження цієї популяції внаслідок гібридизації між представниками *C. arenaria* agg. з одного боку, та *C. stoebe* s.l. або *C. diffusa*, з іншого. Донором яйцеклітини, виходячи з гаплотипу h4, була ОТО з *C. arenaria* agg.

Якщо з аналізу виключити популяції, які за фенотипом та за риботипом мають ознаки рецентних гібридів (тобто з острова Гусячий та околиць села Лисогірка), то можна окреслити правдоподібний сценарій еволюційної історії *C. borysthenica* та пояснити її популяційну гетерогенність. За цим сценарієм *C. borysthenica* виникла внаслідок гібридизації ОТО, що належала до *C. arenaria* agg. (можливо, близької до *C. odessana*) з «Асcolorphus»-подібним носієм унікального риботипу субклади «Українські риботипи 3», який був донором пилку – гіпотетичною прото-дніпровською волошкою, гаплотип якої невідомий. Як наслідок, утворилась аллоплоїдна популяція з гаплотипом h4 та комбінацією «Балканський риботип» (rbt1) + «Український риботип 3» (типу rbt27).

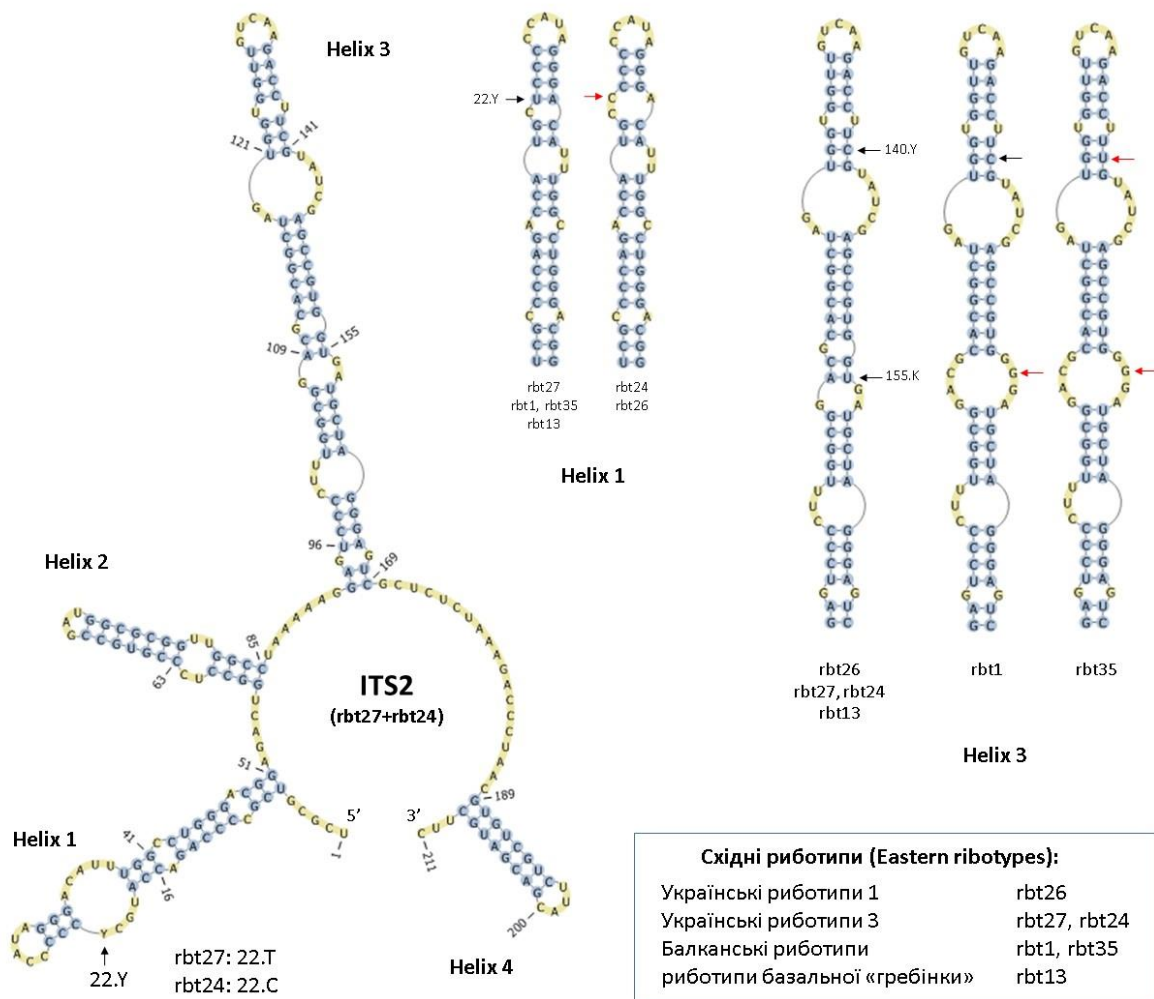


Рис. 8. Модель вторинної структури ITS2 риботипів субклади «Українські риботипи 3» та її відмінні за окремими спіралями від інших риботипів, виявлених у зразків *C. arenaria* agg. та її гібридів.

Fig. 8. The model of the secondary structure of ITS2 ribotypes of the subclade "Ukrainian ribotypes 3" and its separation by separate helices from other ribotypes found in samples of *C. arenaria* agg. and its hybrids.

Автогенетичні процеси в межах цієї популяції при однаковому виживанні гомозиготних та гетерозиготних за ITS нащадків мали сформувати гетерогенну за ITS популяцію з особин з гаплотипом h4 та трьома варіантами риботипів: гомозигот з rbt1, гетерозигот з rbt1+rbt27 та гомозигот з rbt27. Розселення вихідної популяції та пов'язані з ним адаптивна радіація та дрейф генів мали привести до розмежування вихідної популяції на три похідні варіанти зі схожими фенотипами та ідентичними гаплотипами, але відмінними за частотами ITS-алелей риботипами, що, власне, і спостерігається наразі.

Варіант з переважанням гомозигот з балканським риботипом rbt1 виявлений у південно-західній частині на пісках Інгульця (окол. с. Бобровий Кут), варіант з переважанням гомозигот з третім українським риботипом (rbt27 та rbt24) – на північ від *locus classicus* – на Дніпровських пісках біля м. Кам'янське (околиці селища міського типу Курилівка). Можливо, поблизу *locus classicus* слід очікувати і знахідок третього варіанта – з комбінацією балканського та третього українського риботипів. На це вказують знахідки вторинних гібридів *C. borysthena* поблизу Запоріжжя: в гібридогенних популяціях алель *C. borysthena* на острові Гусячому представлена балканським риботипом rbt1, а на правому березі в околицях села Курилівка – третім українським риботипом rbt27. Проте наразі третій варіант існує лише «на кінчику пера».

Таким чином, *C. arenaria* та *C. borysthena* мають різну еволюційну історію. Зокрема, *C. borysthena* виникла як гібридогенна ОТО, де донором яйцеклітини виступала ОТО, близька або ідентична до *C. arenaria*, проте донором пилку була ОТО з унікальним третім українським риботипом, який не має відношення до *C. arenaria* agg. Тобто *C. borysthena* не може вважатися підвидом *C. arenaria*.

Ані за гаплотипом, ані за риботипами *C. borysthena* не демонструє з *C. stoebe* s.l. ніякої спорідненості, яка б дозволила розглядати першу у складі другої. Різні ОТО з морфотипом *C. stoebe* мають Анатолійські, Грецькі або Східно-Європейські гаплотипи з клади, яка в межах секції *Centaurea* однозначно відмежована від клади, до якої належить гаплотип *C. borysthena*. Крім того, у *C. stoebe* s.l. основним є rbt13 та споріднені з ним риботипи «базальної гребінки», у *C. borysthena* – балканські риботипи та «Українські риботипи 3». У межах *C. stoebe* s.l. риботип rbt1 мали лише балканський ендемік *C. grisebachii* (Nyman) Heldr. (з гаплотипом h30) та один з ізолятів *C. stoebe* з Сербії (з гаплотипом h32), які не пов'язані з *C. borysthena* ані за гаплотипом, ані за ареалом.

Оскільки ніякої спорідненості *C. borysthena* з *C. stoebe* не простежується, немає підстав вважати першу ані тетраплоїдним, ані будь-яким іншим цитотипом останньої.

Висновки

1. *Centaurea borysthena* є самостійним видом, що належить до агрегату *C. arenaria* agg. і за системою Nilpold et al. (2014b) входить до підсекції *Centaurea* Циркум-середземноморської клади (СМС-clade) підроду *Centaurea*.

2. За хлоропластною послідовністю *rpl32-trnL* для *C. borysthena* характерний т.зв. український гаплотип h4, ідентичний до *C. arenaria* та *C. odessana*, що відповідає референтному сіквенсу KJ679616 *C. arenaria*; у представників *C. stoebe* s.l. цей гаплотип відсутній.

3. За ядерною послідовністю ITS для *C. borysthena* характерні комбінації алелей балканського риботипу rbt1 (референтний сіквенс MW383495 *C. odessana*) та видоспецифічного риботипу rbt27 (референтний сіквенс MW383493 *C. borysthena*: алель 83.C, 458.T) нової субклади «Українські риботипи 3». Ці комбінації за ITS можуть бути представлені гомозиготами з rbt1, гетерозиготами з rbt1+rbt27 та

гомозиготами з *rbt27*, при цьому гомозиготи за морфологією не відрізняються і відповідають опису *C. borysthena*.

4. *Centaurea borysthena* є гібридогенним видом, у якого вихідна материнська форма належала до *C. arenaria* agg. (донор гаплотипу та балканської алелі риботипу), вихідна батьківська форма була представлена ОТО з третім українським риботипом (донор алелі «Українські риботипи 3»).

5. У *C. stoebe* s.l. риботипи субклади «Українські риботипи 3» не виявлені, риботипи балканської клади відомі лише у двох представників з території Балкан, які, проте, мають інші, ніж *C. borysthena*, гаплотипи. Таким чином, *C. borysthena* філогенетично віддалена від будь-яких операційних таксономічних одиниць *C. stoebe* s.l. і пропозиція розглядати будь-які локальні популяції *C. borysthena* як тетраплоїдні цитотипи *C. stoebe* є помилковою.

6. *Centaurea borysthena* здатна утворювати міжвидові гібриди з носіями риботипів субклади «Українські риботипи 1» (зокрема, з *C. appendicata* підсекції *Phalolepis*) та риботипу базальної «гребінки» *rbt13*, який в підсекції *Centaurea* характерний для *C. stoebe* s.l. та *C. diffusa*.

References

- BYUN YA., KYUNGSOOK H. (2006). Pseudoviewer: Web application and web service for visualizing RNA pseudoknots and secondary structures. *Nucleic Acids Res.*, **1**(34): 416–422. doi: 10.1093/nar/gkl210
- CAISOVÁ L., MARIN B., MELKONIAN M. (2013). A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*, **164**(4): 482–496. doi: 10.1016/j.protis.2013.04.005
- CHASSOT P., NEMOMISSA S., YUAN Y.-M., KUPHER P. (2001). High paraphyly of *Swertia* L. (Gentianaceae) in the gentianella-lineage as revealed by nuclear and chloroplast DNA sequence variation. *Plant Syst. Evol.*, **229**: 1–21. doi: 10.1007/s006060170015
- CHOI Y.-J., THINES M. (2015). Host jumps and radiation, not co-divergence drives diversification of obligate pathogens. A case study in Downy mildews and Asteraceae. *PLOS ONE*, July31: 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0133655
- DIDENKO V., KOSTIKOV I., KARPENKO N. (2017) Molecular genetic specifics of *Centaurea pseudoleucolepis* Kleopow (Asteraceae, Magnoliophyta) inferring to the analysis of chloroplast and nuclear DNA. *Natural and historical and cultural heritage of the reserve area "Stone Graves" (to the 90th anniversary of the creation of the "Stone Graves" nature reserve): Scientific works of the All-Ukrainian Scientific and Practical Conference, Nazarovka, Donetsk region, Ukraine, May 25-27, 2017*: 133–140. (in Ukrainian)
- DIDENKO V.I., MOYSIYENKO I.I., KOLOMIYCHUK V.P., KARPENKO N.I., KOSTIKOV I.YU., MANYUK V.V. (2018). *Centaurea konkae* and *C. appendicata* (Asteraceae, Magnoliophyta): features of ITS1 and ITS2 sequences secondary structure. *Wulfenia*, **25**: 70–80.
- DOBROCHAIEVA D.M. (1965). Rid Voloshka – *Centaurea* L. In: Visiulina O.D. [ed.]: Flora URSR 12: 37–165. Kyiv: Vyd-vo AN URSR. (in Ukrainian)
- DOSTÁL J. (1976). *Centaurea* L. In: Flora Europaea, vol. 4 (eds Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. Cambridge University Press: Cambridge- London-New York-Melbourne, p. 254–301.
- DOYLE J. J., DOYLE J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: 13–15.
- GOERTZEN L.R., CANNONE J.J., GUTELL R.R., JANSEN R.K. (2003). ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **29**: 216–234. doi: 10.1016/s1055-7903(03)00094-0
- GRUNER L. (1868). Enumeratio plantarum, quas anno 1865 ad flumina Borysthenem et Konkam Inferiorem in Rossiae australis provinciis Catherinoslaviensi et Taurica. *Bulletin de la Société impériale des naturalistes de Moscou*, **41**(3): 426–427
- HALL T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequene alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95–98
- HILPOLD A., VILATERSANA R., SUSANNA A., MESEGUER A.S., BORŠIĆ I., CONSTANTINIDIS T., FILIGHEDDU R., ROMASCHENKO K., SUÁREZ-SANTIAGO V.N., TUGAY O., UYSAL T., PFEIL B.E., GARCIA-JACAS N. (2014a). Phylogeny of the *Centaurea* group (*Centaurea*, Compositae) – geography is a better predictor than morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **77**: 195–215. doi: 10.1016/j.ymp.2014.04.022
- HILPOLD A., GARCIA-JACAS N., VILATERSANA R., SUSANNA A. (2014b). Taxonomical and nomenclatural notes on *Centaurea*: A proposal of classification, a description of new sections and subsections, and a

- species list of the redefined section *Centaurea*. *Collectanea Botanica*, **33** (e001): 1–29. doi: 10.3989/collectbot.2013.v33.001
- KARBSTEIN K., TOMASELLO S., HODAC L., WAGNER N., MARINČEK P., BARKE B.H., PAETZOLD C., HÖRANDL E. (2022). Untying Gordian knots: Unraveling reticulate polyploid plant evolution by genomic data using the large *Ranunculus auricomus* species complex. *New Phytologist*, **235**: 2081–2098. doi: 10.1111/nph.18284
- KARPENKO N., MARTYNIUK V., TYSHCHENKO O., TARIEIEV A., TEKPINAR A., DIDENKO V., KOSTIKOV I. (2018). Resolving position of *Astragalus borysthenicus* Klokov within *Astragalus* L. species. *Turkish journal botany*, **42**(5): 623–635. doi: 10.3906/bot-1712-52
- KING R.C., STANSFIELD W.D., MULLIGAN P.K. (2007). *A Dictionary of Genetics*. Oxford: Oxford University Press, 608 p.
- KLOKOV M.V. (1935). Analiz grupy perlovykh voloshok (*Centaurea margaritacea* Ten. sensu amplo). *Trudy Inst. Bot. Kharkivs'k Derzhavn. Univ.* **1**: 78–105. (In Ukrainian)
- KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., TAMURA K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.*, **35**(6): 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- LUKASHOV V.V. (2009). *Molekuliarnaia evoliutsiia i filogeneticheskii analiz*. M.: BIOM Laboratoriia znanii, 256 p. (in Russian)
- MARTYNIUK V.O., KARPENKO N.I., TARIEIEV A.S., KOSTIKOV I.YU. (2018). Differences of *Atocion lithuanicum* from *A. armeria* and their hybrid (Sileneae, Caryophyllaceae) by ITS1-ITS2 sequences and secondary structure of their transcripts. *Ukr. Botan. Journ.*, **75**(4). 322–334. doi: 10.15407/ukrbotj75.04.322
- MOYSIYENKO I.I., TARIEIEV A.S., DIDENKO V.I., KARPENKO N.I., KOSTIKOV I.YU. (2014). *Centaurea breviceps* Iljin (Asteraceae, Magnoliophyta): neotype and its annotation according to ITS1 and ITS2 secondary structures. *Chornomors'k. bot. z.*, **10**(3): 276–286. doi: 10.14255/2308-9628/14.103/1
- MRÁZ P., GARCIA-JACAS N., GEX-FABRY E., SUSANNA A., BARRES L., MÜLLER-SCHÄRER H. (2012). Allopolyploid origin of highly invasive *Centaurea stoebe* s.l. (Asteraceae). *Molekular Phylogenetics and Evolution*, **62**(2): 612–623. doi: 10.1016/j.jympev.2011.11.006
- RAMBAUT A. (2016). FigTree, version 1.4.3. Computer program distributed by the author. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- RONQUIST F., HUELSENBECK J.P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
- SHAW J., LICKEY E.B., SCHILLING E.E., SMALL R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.*, **94**: 275–288. doi: 10.3732/ajb.94.3.275
- SHIYAN N.M., MOSYAKIN S.L., FEDORONCHUK M.M. (2010). Typification of taxa of Asteraceae in the flora of Ukraine: genera *Centaurea* L. *Ukr. Botan. Journ.*, **67**(6): 818–831. (in Ukrainian)
- SHYNDER O. (2021). The taxonomic complex *Centaurea stoebe* s. l. (Asteraceae) in the flora of Ukraine. *Novitates Theriologicae*, **12**: 237–251 (in Ukrainian). doi: 10.53452/nt1236
- SOLTIS P.S., SOLTIS D.E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **60**: 561–588. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092039
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, **30**(12): 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- TARIEIEV A.S., GIRIN A.I., KARPENKO N.I., TYSHCHENKO O.V., KOSTIKOV I.YU. (2011). Modified method of DNA extraction from herbarium specimens. *Chornomors'k. bot. z.*, **7**(4): 309–317 (in Ukrainian).
- TURNER K.G., GRASSA C.J. (2014). Complete plastid genome assembly of invasive plant, *Centaurea diffusa*. [PRE-PRINT] bioRxivdoi: doi: 10.1101/005900
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications (Eds) Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T. Academic Press: San Diego, 315–322.
- ZUKER M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**: 3406–3415. doi: 10.1093/nar/gkg595