

Корисна модель належить до галузі молекулярної генетики та може бути використана для таксономічної ідентифікації видів і гібридних форм інвазійних представників роду *Reynoutria*, визначення генетичної композиції поліплоїдних форм, а також у екологічних, природоохоронних, ботанічних дослідженнях та інших сферах практичної діяльності, які потребують високоточної ідентифікації близькоспоріднених форм та гібридів інвазійних рослин.

Ген LEAFY(LFY), також відомий як FLORICAULAIFLO, кодує регулятор транскрипції, залучений у розвиток квіткової меристеми. LEAFY вважається унікальним або низькокопійним геном у більшості покритонасінних рослин. Структурна організація LEAFY є консервативною і включає три екзони та два інтрони. Другий інтрон гена LEAFY завдяки високій мінливості є ефективним інструментом філогенетичних досліджень [1].

Наявність алельних варіантів у геномі дозволяє застосовувати унікальні та низькокопійні послідовності ядерного геному для виявлення гетерозигот та гібридних форм. Послідовності інтронів гена LEAFY неодноразово успішно використовувалися для дослідження філогенії та ДНК-баркодингу гібридних форм різних таксонів рослин [7].

Представники роду *Reynoutria* належать до найбільш агресивних інвазійних видів рослин у світі та включені Міжнародним союзом охорони природи (IUCN) до списку 100 найнебезпечніших інвазійних видів [2]. Ці багаторічні трав'янисті рослини родини Polygonaceae характеризуються надзвичайно швидким вегетативним ростом, здатністю утворювати щільні зарості та високою конкурентоспроможністю. Інвазія видів *Reynoutria* призводить до витіснення аборигенних видів рослин, зниження біорізноманіття, порушення структури природних екосистем, а також завдає значних економічних збитків через пошкодження інфраструктури, зниження продуктивності сільськогосподарських угідь та необхідність проведення коштовних заходів з контролю їх поширення.

Поза межами природного ареалу у Східній Азії цей рід представлений октаплоїдним ($2n=8x$) видом *R. japonica* Houtt, тетраплоїдним ($2n=4x$) *R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai та похідними від них гібридними гексаплоїдними ($2n=6x$) формами, виділеними в окремий вид *R. x bohémica* Chrtek & Chrtkova [5]. Гібридні форми часто характеризуються підвищеною життєздатністю та інвазійним потенціалом порівняно з батьківськими видами, що робить їх особливо небезпечними для природних екосистем. В Україні зафіксована активна інвазія всіх трьох видів, причому частка *R. sachalinensis* серед представників роду *Reynoutria* в Україні та в решті країн Східної Європи є значно вищою, порівняно з іншими частинами Європейського континенту [3].

Ефективний контроль інвазії представників роду *Reynoutria* потребує точної ідентифікації видів та гібридних форм, оскільки різні таксони можуть характеризуватися різною екологією та чутливістю до методів контролю. Морфологічна ідентифікація видів роду *Reynoutria* є складною через високу подібність та фенотипічну пластичність, особливо у випадку гібридних форм. Тому розробка надійних молекулярно-генетичних методів ідентифікації є критично важливою для моніторингу інвазійних популяцій, планування природоохоронних заходів та наукових досліджень біології інвазійних процесів.

Зважаючи на високу генетичну подібність видів роду *Reynoutria* та поширеність гібридних форм між ними, актуальним завданням є розробка інформативного молекулярного маркера, використання якого дозволило б не лише розрізняти близькоспоріднені види, але й ідентифікувати наявність у геномі множинних варіантів послідовності, що є характерним для поліплоїдних та гібридних форм. Оптимальним кандидатом на роль такого маркера є послідовність другого інтрона гена LEAFY, яка була раніше розшифрована для великої кількості зразків *Reynoutria* різного географічного походження [1; 4; 5, 6]. Порівняння доступних в базах даних послідовностей цієї ділянки виявляє численні індели (інсерції/делеції) та інформативні нуклеотидні заміни, які дозволяють розрізняти як геноми окремих видів, так і субгеноми.

Найбільш близьким аналогом, є використання для детекції внутрішньогеномного поліморфізму другого інтрона гена LEAFY наборів специфічних праймерів для селективної ПЛР-ампліфікації окремих варіантів послідовності з подальшим прямим секвенуванням ПЛР-продуктів за Сенгером [6]. Цей підхід передбачає створення специфічних пар праймерів для кожного з відомих варіантів послідовності (J1, J2, J3 для *R. japonica* та S1, S2 для *R. sachalinensis*) та проведення окремих ПЛР-реакцій для кожної пари праймерів.

Недоліками близького аналогу є необхідність попереднього аналізу всіх можливих варіантів послідовності, неможливість виявлення нових варіантів, потреба у множинних паралельних ПЛР-реакціях, неможливість отримати інформацію стосовно кількісного співвідношення варіантів в геномі.

З огляду на вищезазначені недоліки прототип не дозволяє ефективно проводити масштабні дослідження генетичної структури інвазійних популяцій *Reynoutria*.

Задачею корисної моделі є створення ефективного, швидкого та економічно доступного методу для комплексного аналізу внутрішньогеномного поліморфізму другого інтрона гена LEAFY у представників роду *Reynoutria* з можливістю кількісної оцінки співвідношення різних варіантів послідовності в геномі та виявлення нових, раніше не описаних варіантів.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб детекції поліморфізму другого інтрона гена LEAFY для баркодингу інвазійних видів роду *Reynoutria*, що включає приготування реакційної суміші,

активацію полімерази, гібридизацію праймерів, котрі комплементарні до фланкуючих другий інтрон ділянок другого та третього екзонів, очистку та секвенування отриманих ПЛР-продуктів, згідно з корисною моделлю, в реакційні суміші додають універсальні для всіх варіантів LEAFY праймери: IfyR-F-AA-5'-AAG-GAG-ACA-AGT-GCC-CCA-CTA-AGG-3', IfyR-F-GG-5'-GGG-GAG-ACA-AGT-GCC-CCA-CTA-AGG-3', IfyR-R-AA-5'-AAC-TGA-ACA-CTT-GGT-TTG-TTA-CCT-GG-3' і IfyR-R-GG-5'-GGC-TGA-ACA-CTT-GGT-TTG-TTA-CCT-GG-3' у чотирьох різних комбінаціях, після ампліфікації змішують ПЛР-продукти, ампліфіковані на різних комбінаціях праймерів в еквімолярній концентрації та секвенують змішані амплікони методом Illumina.

Завдяки використанню ПЛР-ампліфікації з подальшим NGS-секвенуванням ампліконів методом Illumina, яка включає наступні етапи: 1) виділення геномної ДНК; 2) ПЛР-ампліфікацію другого інтрона гена LEAFY з використанням універсальних праймерів IfyR-F та IfyR-R, які комплементарні до консервативних ділянок другого та третього екзонів гена LEAFY і здатні ампліфікувати всі можливі варіанти послідовності другого інтрона; 3) очищення ПЛР-продуктів; 4) секвенування ампліконів методом Illumina; 5) біоінформатичний аналіз отриманих послідовностей для ідентифікації гаплотипів та визначення їх кількісного співвідношення.

Дизайн праймерів. Для ампліфікації другого інтрона гена LEAFY використовували розроблену нами пару універсальних олігонуклеотидних праймерів IfyR-F та IfyR-R, які гібридизуються з консервативними ділянками другого та третього екзонів, відповідно.

Місця гібридизації праймерів обирали на основі аналізу вирівнювання послідовностей гена LEAFY з геномів представників роду *Reynoutria*, отриманих з бази даних GenBank. Для того, щоб забезпечити ампліфікацію всіх відомих для представників роду *Reynoutria* варіантів послідовності другого інтрона, обирали ділянки, у яких відсутні варіант-специфічні нуклеотидні заміни та індели. Для можливості секвенування ампліконів від різних зразків в одній реакції, на 5'-кінці праймерів були додані динуклеотидні послідовності-баркоди (GG та AA), які не комплементарні до матриці, а отже, не впливають на специфічність ампліфікації, проте дозволяють розрізняти зразки при біоінформатичному аналізі результатів секвенування.

Праймери створювались за правилами молекулярного дизайну з використанням вбудованого інструменту "Pick primers" на сторінці нуклеотидної послідовності в базі даних GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=86778&INPUT_SEQUENCE=AB021027.1&LINK_LOC=nucore).

Характеристики запропонованих програмою пар праймерів додатково аналізували онлайн-інструментами "T_m Calculator" та "Multiple Primer Analyzer" на сервері ThermoFisher Scientific

(<https://www.thermofisher.com/ua/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>) та (<https://www.thermofisher.com/ua/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>).

Таблиця

Характеристики розроблених праймерів для ампліфікації другого інтрона гена LEAFY

Назва праймера	Послідовність праймера	Напрямок ампліфікації	Температура плавлення, Т _т °C	GC-ВМІСТ, %	Довжина праймера, нп
IfyR-F-AA	5'-aaggagacaagtgtcccactaagg-3'	прямий	69,0	66,5	24
IfyR-F-GG	5'-ggggagacaagtgtcccactaagg-3'	прямий	69,0	66,5	24
IfyR-R-AA	5'-aactgaacacttggtttgttacctgg-3'	зворотній	67,2	63,9	26
IfyR-R-GG	5'-ggctgaacacttggtttgttacctgg-3'	зворотній	67,2	63,9	26

Розроблені нуклеотидні послідовності продукувались методом хімічного синтезу праймерів та використовувались для проведення ПЛР. Оптимальні умови ПЛР-ампліфікації, які забезпечували ефективність та високу специфічність, підбирались експериментально. ПЛР-продукти після завершення реакції аналізували методом гель-електрофорезу.

Розроблений нами метод детекції внутрішньогеномного поліморфізму другого інтрона гена LEAFY для представників роду *Reynoutria* відрізняється від прототипів місцем гібридизації праймерів та методом секвенування ампліконів.

Приклад конкретного виконання.

Виділення загальної клітинної ДНК гербаризованих тканин двох зразків *R. japonica* та двох зразків *R. × bohemica* проводили модифікованим цетавлоновим методом [8]. Полімерність виділених препаратів ДНК оцінювали методом електрофорезу у 1 % агарозному гелі. Концентрацію ДНК та чистоту відносно таких забруднювачів, як білки та полісахариди, визначали спектрометричним

методом за допомогою приладу NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США). Полімерні препарати ДНК високої чистоти застосовували у якості матриці для ПЛР-ампліфікації з використанням праймерів чотирьох можливих комбінацій праймерів IfyR-F-AA, IfyR-F-GG, IfyR-R-AA і IfyR-R-GG та полімеразної суміші 5x FIREPol (Solis BioDyne, Естонія) згідно з рекомендаціями виробника та з урахуванням параметрів праймерів.

Візуалізацію отриманих ПЛР-продуктів проводили методом електрофорезу у 2 % агарозному гелі. В результаті аналізу ПЛР-продуктів для всіх зразків була виявлена єдина смужка ДНК довжиною приблизно 600 нп. Чотири ПЛР-продукти змішували в еквімолярній концентрації і секвенували методом Illumina, з використанням сервісу Amplicon-EZ (GENEWIZ).

Отримані послідовності рідів переводили у формат FASTA за допомогою програми SeqKit 0.15.0, після чого парні риди об'єднували без перекриття та сортували за послідовностями праймерів на чотири файли у форматі fasta відповідно до секвенованих зразків. Всі отримані послідовності дереплікували за допомогою програми vsearch з автоматичним підрахунком їх частоти (--derep_fulllength, --sizeout). Варіанти з частотою менше 3 копій відфільтровували для виключення можливих помилок секвенування. Далі всі послідовності картували на отриману базу гаплотипів з використанням vsearch (--usearch_global, --id 0.97) для визначення їх приналежності. Відсоткове співвідношення варіантів у кожному зразку розраховували як частку рідів, що відповідають певному варіанту, від загальної кількості успішно картованих рідів.

В результаті для обох зразків *R. japonica* був виявлений єдиний варіант послідовності другого інтрона LEAFY, тоді як в геномах двох зразків *R. × bohemica* виявлено по три однакові варіанти у співвідношеннях 50 %:29 %:21 % та 46 %:28 %: 26 %.

Джерела інформації:

1. Desjardins, S. D., Bailey, J. P., Zhang, B., Zhao, K., & Schwarzacher, T. (2023). New insights into the phylogenetic relationships of Japanese knotweed (*Reynoutria japonica*) and allied taxa in subtribe Reynoutriinae (Polygonaceae). *PhytoKeys*, 220, 83.
2. Luque, G. M., Bellard, C., Bertelsmeier, C., Bonnaud, E., Genovesi, P., Simberloff, D., & Courchamp, F. (2014). The 100th of the world's worst invasive alien species. *Biol. Invasions*, 76(5), 981-985.
3. *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. 2023. Checklist dataset accessed via GBIF.org on 2025-11-18.
4. Schuster, T. M., Wilson, K. L., & Kron, K. A. (2011). Phylogenetic relationships of *Muehlenbeckia*, *Fallopia*, and *Reynoutria* (Polygonaceae) investigated with chloroplast and nuclear sequence data. *Int. J. Plant Sci.*, 772(8), 1053-1066.
5. Tippery, N. P., Olson, A. L., & Wendtlandt, J. L. (2021). Using the nuclear LEAFY gene to reconstruct phylogenetic relationships among invasive knotweed (*Reynoutria*, Polygonaceae) populations. *Invasive Plant Sci. Manag.*, 14(2), 92-100.
6. Tippery, N. P., Sabol, M. M., Koehler, J. G., Topol, C. E., & Crossgrove, K. (2025). Assessing the genetic composition of invasive knotweeds (*Reynoutria*, Polygonaceae) using data from the first intron and second exon of the nuclear LEAFY gene. *Invasive Plant Sci. Manag.*, 18, el.
7. Zheng, X., Ni, C., Spooner, D., Liu, J., Cao, J., & Teng, Y. (2011). Molecular evolution of Adh and LEAFY and the phylogenetic utility of their introns in *Pyrus* (Rosaceae). *BMCEvol. Biol.*, 77(1), 255.
8. Панчук, І. І., & Волков, Р. А. (2007). Практикум з молекулярної генетики. Чернівці: Рута, 120.