



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **163963** (13) **U**  
(51) МПК  
**C12Q 1/683** (2018.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

|                                                                                        |                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2026 01379</b>                                          | <b>(72)</b> Винахідник(и):<br><b>Тинкевич Юрій Олегович (UA),</b><br><b>Якобишен Даніель Вікторович (UA),</b><br><b>Волков Роман Анатолійович (UA)</b>                  |
| <b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>13.03.2026</b>                                     |                                                                                                                                                                         |
| <b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>13.08.2026</b>  | <b>(73)</b> Володілець (володільці):<br><b>ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ</b><br><b>УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА,</b><br>вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58002 (UA) |
| <b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>12.08.2026, Бюл.№ 32</b> |                                                                                                                                                                         |

**(54) СПОСІБ ДЕТЕКЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ ДРУГОГО ІНТРОНА ГЕНА LEAFY ДЛЯ ДНК-БАРКОДИНГУ ІНВАЗІЙНИХ ВИДІВ РОДУ REYNOUTRIA**

**(57) Реферат:**

Спосіб детекції поліморфізму другого інтрона гена LEAFY для баркодингу інвазійних видів роду Reynoutria 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. 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.

UA 163963 U

UA 163963 U

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 bohemica* 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](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<sub>m</sub> 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, T <sub>m</sub> °C | GC-ВМІСТ, % | Довжина праймера, нп |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------------------|-------------|----------------------|
| IfyR-F-AA      | 5'-aaggagacaagtgtcccaactaagg-3'   | прямий                | 69,0                                     | 66,5        | 24                   |
| IfyR-F-GG      | 5'-ggggagacaagtgtcccaactaagg-3'   | прямий                | 69,0                                     | 66,5        | 24                   |
| IfyR-R-AA      | 5'-aactgaacactgtgtgtgtacacctgg-3' | зворотній             | 67,2                                     | 63,9        | 26                   |
| IfyR-R-GG      | 5'-ggctgaacactgtgtgtgtacacctgg-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 гел-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., Ни, 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.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

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, який відрізняється тим, що в реакційні суміші додають універсальні для всіх варіантів LEAFY праймери: IfyR-F-AA-5'-AAG-

5 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 секвнують змішані амплікони методом Illumina.