

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра молекулярної генетики та біотехнології**

**ФІЛОГЕНЕТИЧНЕ ПОЛОЖЕННЯ УКРАЇНСЬКИХ
ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *HERACLEUM***

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

Студентка 4 курсу, групи 407

Спеціальність 162 Біології та біоінженерія

Гаврилюк Ірина Михайлівна

Керівники:

Кандидат біологічних наук,

асистент **Тинкевич Ю.О.**

До захисту допущено
на засідання кафедри
протокол №__ від _____ 2024 р.
Зав. кафедри _____ проф. Волков Р.А.

Чернівці – 2024

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1 Загальна характеристика <i>H. mantegazzianum</i>	6
1.2 Таксономія та історія інвазивних видів гераклеумів.....	7
1.3 Молекулярні маркери.....	11
1.4 Хлоропластні маркери.....	12
1.5 Ядерні ділянки. ITS.....	14
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	18
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	26
3.1. Поліморфізм українських видів роду <i>Heracleum</i> за послідовностями хлоропластних ділянок.....	26
3.2 Поліморфізм українських видів роду <i>Heracleum</i> за послідовністю ITS	31
ВИСНОВКИ	34
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	35
ДОДАТКИ.....	41

Анотація

У цій кваліфікаційній роботі наведено результати аналізу послідовностей ділянок хлоропластного геному: *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* та внутрішньо транскрибований спейсер ITS1-2 для представників роду *Heracleum*. Послідовності були ампліфіковані та секвензовані автором для зразків з території України, з різних ботанічних садів. Одержані дані були використані для обрахунків філогенетичної спорідненості та генетичного поліморфізму представників роду *Heracleum*.

Робота була виконана у 2023-2024 роках на базі кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету.

Ключові слова: *psbA-trnH*, *rpl32-trnL*, ITS1-2, *Heracleum*, генетичний поліморфізм.

Abstract

This qualification paper presents the results of the analysis of the sequences of the chloroplast genome regions: *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* and the internally transcribed spacer ITS1-2 for representatives of the genus *Heracleum*. The sequences were amplified and sequenced by the author for samples from the territory of Ukraine, from various botanical gardens. The obtained data were used to calculate the phylogenetic relationship and genetic polymorphism of representatives of the genus *Heracleum*.

The work was carried out in 2023-2024 at the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of Chernivtsi National University.

Key words: *psbA-trnH*, *rpl32-trnL*, ITS1-2, *Heracleum*, genetic polymorphism.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело. _____ .І.М. Гаврилюк

ВСТУП

Представники роду *Heracleum*, зокрема *H. mantegazzianum* Sommier & Levier та *H. sosnowskyi* Manden. які становлять комплекс так званих гігантських борщівників, є інвазивними рослинами у Європі, що впливають на здоров'я людини, рекреаційні та економічні інтереси, а також місцеве біорізноманіття. Борщівники були штучно завезені із свого рідного ареалу на Західному Великому Кавказі до ботанічних та приватних садів кількох європейських країн у 19 столітті (Ochsmann, 1996; Kowarik, 2003). У 20 столітті цей вид став популярною декоративною рослиною, а також активно розмножувався як кормова рослина. Таким чином, вид був широко поширений людьми (садівниками та бджолярами), що значно прискорило його поширення (Pyšek, 1991).

H. mantegazzianum неодноразово уникав культивування з моменту його появи (Ochsmann, 1996), але масове поширення спостерігалось в кількох європейських країнах лише з 1950-х років (наприклад, Чехія: Pyšek, 1991; Німеччина: Ochsmann, 1996; Великобританія: Clegg & Grace, 1974; Tiley et al., 1996; Wade et al., 1997).

Контакт з рослинами *H. mantegazzianum* має серйозні наслідки для здоров'я людини через фіто-фотодерматит, спричинений фурокумаринами, що містяться в соку рослини (Drever & Hunter, 1970; Jaspersen-Schib et al., 1996; Lagey et al., 1995). Крім того, масштабне розповсюдження борщівників суперечить рекреаційним та економічним інтересам, наприклад, рослина може закривати стежки та береги річок (Tiley & Philp, 1994), і може призводити до серйозної ерозії берегів річок (Caffrey, 1994). Також борщівники можуть зменшувати місцеве біорізноманіття, витісняючи

конкуруючі місцеві види рослин (Lundström, 1984; Manchester & Bullock, 2000). Тому *H. mantegazzianum* зазвичай розглядається як проблемна рослина, яка провокує дорогі та виснажливі заходи боротьби.

З огляду на існуючу проблематику, пов'язану з небезпекою представників роду *Heracleum*, метою нашої роботи було проаналізувати розповсюджені на території України борщівники, та оцінити їх генетичне різноманіття використовуючи існуючі молекулярні маркери.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Аналіз літературних даних, присвячених опису сучасного таксономічного статусу представників роду *Heracleum*.
2. Отримати рослинний матеріал з різних територій України та підготувати нативні ДНК-препарати.
3. Ампліфікувати та секвенувати наступні маркерні послідовності хлоропластного геному: *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* та ITS.
4. Здійснити біоінформатичний аналіз отриманих розшифрованих послідовностей та філогенетичну інтерпретацію результатів, оцінити можливість використання маркерних ділянок для уточнення філогенетичних відносин в межах роду *Heracleum*.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика *H. mantegazzianum*

Інвазивні види становлять значну загрозу екосистемам у всьому світі, і *H. mantegazzianum* не є винятком. Інтродукція та поширення рослин *H. mantegazzianum* в різних регіонах неодноразово викликало занепокоєння через їх шкідливий екологічний вплив, економічні наслідки та проблеми, пов'язані з їх контролем.

Однією з головних проблем є витіснення місцевих видів рослин. *H. mantegazzianum* мають конкурентну перевагу над місцевою рослинністю, що призводить до витіснення місцевої флори. Це порушення рослинного співтовариства може мати згубний вплив на всю екосистему, впливаючи на біорізноманіття та загальний баланс екосистеми. Як наслідок, інвазія *H. mantegazzianum* може призвести до значних змін у динаміці та функціях екосистеми, ставлячи під загрозу стабільність та стійкість екосистеми.

Розуміючи екологічний вплив, економічні наслідки та ефективні стратегії контролю, пов'язані з інвазією *H. mantegazzianum*, зацікавлені сторони можуть працювати над пом'якшенням поширення цих інвазійних рослин і захистом місцевих екосистем. Вкрай важливо визначити пріоритетність проактивних заходів, щоб запобігти інтродукції та розвитку *H. mantegazzianum* на нових територіях.

65 видів роду *Heracleum* L. (Apiaceae) поширені в помірних районах Європи, Азії, Африки та Північної Америки (Піменов і Леонов, 1993). Центрами найбільшого видового різноманіття є Китай (29 видів) та Кавказ (26 видів; Mandenova, 1950; Fading and Watson, 2006). Деякі з великих

представників роду культивуються як декоративні культури за межами їх рідного ареалу, а деякі також використовуються як кормові культури. Група тісно пов'язаних великих видів роду *Heracleum*, які були завезені в Європу, називаються «великими, високими або гігантськими» борщівниками (Nielsen et al., 2005). Найбільш відмінною характеристикою цих видів є їх розмір; вони можуть досягати висоти до 4-5 м, що ставить їх серед найвищих і найбільших трав у Європі. Три види стали інвазивними в Європі: *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier, *H. sosnowskyi* Manden. і *H. persicum* Desf. ex Fischer.

Лише нещодавно було визнано, що таксономія виду *Heracleum*, чужого для Європи, надзвичайно складна, і рослини, які раніше називалися *H. mantegazzianum*, насправді можуть належати не до одного виду, а до декількох (Holub, 1997). Комплексна таксономічна загальноєвропейська оцінка роду все ще відсутня.

1.2 Таксономія та історія інвазивних видів *Heracleum*

У скандинавських країнах (Данія, Фінляндія, Ісландія, Норвегія та Швеція) великі види *Heracleum* були відомі з першої третини 19 століття. Нещодавній перегляд роду в скандинавських країнах показав, що, крім рідного *H. sphondylium* L. subsp. *sphondylium* і subsp. *sibiricum* (L.) Simonkai, зустрічаються два широко поширені інтродуковані види: *H. mantegazzianum* та *H. persicum*. Окрім того, також було зібрано кілька морфотипів, які в даний час не можуть бути пов'язані з будь-яким з існуючих видів.

Heracleum mantegazzianum та *H. persicum* зустрічаються досить часто в Північній Європі, де також зустрічається кілька проміжних морфотипів.

Ці таксони також, ймовірно, досить мінливі в їх початковій зоні поширення. Цілком можливо, що кілька генотипів були завезені в Європу протягом останніх двох століть і, можливо, згодом схрещувалися, наприклад, у ботанічних садах, що призвело до великої мінливості, яку сьогодні можна спостерігати в Північній Європі. Однак ці спостереження базуються лише на гербарному матеріалі. Для більш чіткого розуміння важливо отримати повну картину, зокрема й проаналізувати генетичну структуру існуючих борщівників.

Генетичні дослідження *Heracleum* може покращити наше розуміння взаємозв'язків між спорідненими таксонами в межах цієї таксономічно групи. На початку 19 століття насіння гігантських видів *Heracleum*, зібраних у південно-західній Азії, були відправлені в кілька європейських ботанічних садів під різними назвами. Крім того, приватні особи могли купувати насіннєвий матеріал з садів, поширюючи рослини ще далі (Bruun et al., 2003). Перший запис гігантських видів *Heracleum* в скандинавських країнах - 1836 рік, коли насіння було відправлено на північ Норвегії (Альм і Дженсен, 1993). Перший підтверджений запис *H. mantegazzianum* у скандинавських країнах - 1903 рік. Однак більша кількість пізніших записів видів *Heracleum* у скандинавській області стосується *H. mantegazzianum*, і, таким чином, можна зробити висновок, що цей вид тепер повністю витіснив інші споріднені види, принаймні в південних частинах регіону.

У центральній і західній Європі *H. mantegazzianum* вже давно визнаний прикладом інвазивної рослини (Pysek, 1991; Tiley et al., 1996; Collingham et al., 2000; Wadsworth et al., 2000); однак його генетичний зв'язок з іншими великими таксонами *Heracleum*, які також є інвазивними в частинах Європи (*H. sosnowskyi* і *H. persicum*) було вивчено лише нещодавно (Nelsen et al. 2005). Jahodová et al. (2007) використовували

молекулярний маркер Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) для вивчення генетичних зв'язків між інвазивними таксонами *Heracleum* в Європі та їх рідними ареалами. Результати цього дослідження вказують на те, що в Європі є три генетично відмінні інвазивні види *Heracleum*: *H. mantegazzianum*, *H. sosnowskyi* та *H. persicum* (рис. 1).

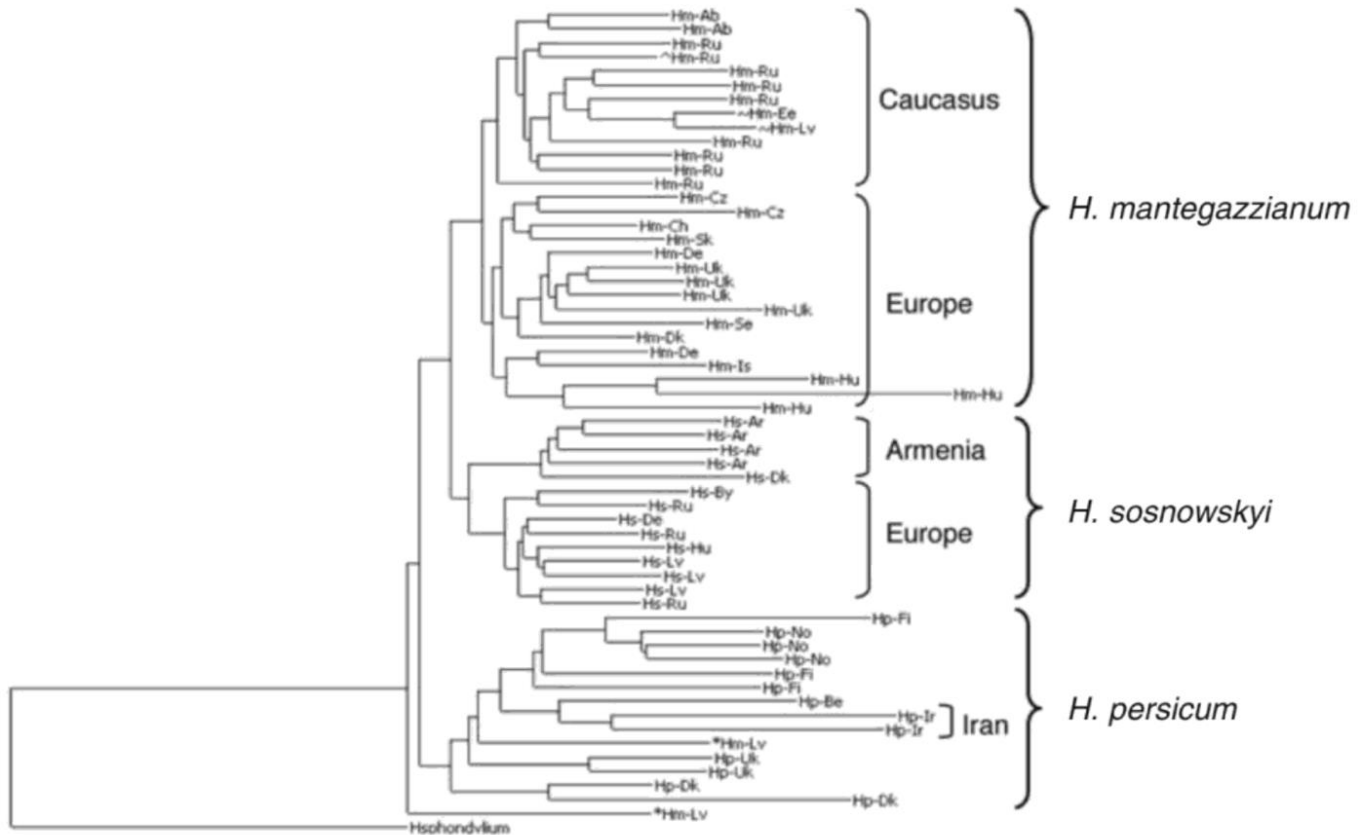


Рис. 1. (Jahodová et al., 2007)

Генетичні зв'язки між трьома інвазивними таксонами *Heracleum* в Європі, виявлені шляхом приєднання сусідів до аналізу даних AFLP. Дендрограма включає 58 популяцій як з місцевих, так і з захоплених ареалів *H. mantegazzianum* (Hm), *H. sosnowskyi* (Hs) та *H. persicum* (Hp). Були проаналізовані популяції з 19 різних країн: Абхазія (Ab), Вірменія (Ar), Бельгія (Be), Білорусь (Bv), Чехія (Ch), Німеччина (De), Данія (Данія), Естонія (Ee), Фінляндія (Fi), Франція (Fr), Голландія (No), Іран (Ir), Ісландія (Is), Латвія (Lv), Норвегія (No), Словаччина (Sk), Швеція (Se) та Велика Британія (Uk).

* Можливі гібриди

AFLP також дозволяє виявити різницю в розподілі нейтральних генетичних варіацій у *H. mantegazzianum*, *H. sosnowskyi* та *H. persicum* між їх нативними/аборигенними та захопленими «територіями». На «захопленій» території варіація всередині таксона вища (77,3%), ніж на аборигенних локалітетах (61,0%), залишаючи 22,7% та 39,0% варіацій, що пов'язані з відхиленнями таксонів відповідно (Рис.2).

Grouping	Number of samples	Number of populations	Number of taxon groups	Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	% variation
<i>H. mantegazzianum</i> , <i>H. sosnowskyi</i> and <i>H. persicum</i> (Europe and native ranges)	146	51	3	among taxa	2	795.45	7.18	17.72
				among populations	48	2909.96	14.73	36.34
				within populations	95	1768.92	18.62	45.94
<i>H. mantegazzianum</i> , <i>H. sosnowskyi</i> and <i>H. persicum</i> (Europe)	92	N/A	3	among taxa	2	664.74	9.28	22.65
				within taxa	95	3010.54	31.69	77.35
				among taxa	2	429.42	16.39	39.01
<i>H. mantegazzianum</i> , <i>H. sosnowskyi</i> and <i>H. persicum</i> (native ranges)	45	N/A	3	within taxa	42	1076.58	25.63	60.99
<i>H. mantegazzianum</i> (Europe)	41	15	1	among populations	14	754.12	14.71	51.61
				within populations	26	358.58	13.79	48.39
				among populations	9	324.87	5.79	22.51
<i>H. mantegazzianum</i> (native range)	28	10	1	within populations	18	359.17	19.95	77.49
				among populations	9	373.96	8.29	31.02
				within populations	18	332.00	18.44	68.98
<i>H. sosnowskyi</i> (Europe)	28	10	1	among populations	3	103.61	5.56	22.28
				within populations	7	135.67	19.38	77.72
				among populations				

Рис.2 Розподіл варіацій у популяціях (Jahodová et al., 2007).

Крім того, вторгнення та вкорінення популяції генетично відрізняються як у *H. mantegazzianum*, так і у *H. sosnowskyi*. Аналіз матриць схожості, зроблений на основі даних AFLP, відокремлює ці таксони на різні кластери, що відповідають їх походженню в результуючій дендрограмі (рис. 1) (Jahodová et al., 2007).

1.3 Молекулярні маркери

Штрих-кодування ДНК — це нова технологія, яка використовує стандартну послідовність ДНК для полегшення ідентифікації виду. Хоча не було досягнуто консенсусу щодо того, які послідовності ДНК можна використовувати як найкращі штрих-коди для рослин, спейсера область *psbA-trnH* була широко використовувана в останні роки.

Генетична варіація міжгенного спейсера *trnH-psbA* є ключовою сферою інтересу для дослідників, які вивчають еволюцію та адаптацію рослин. Міжгенний спейсер *trnH-psbA* є некодуючою ділянкою, розташованою між двома генами, що кодують білок, у геномі хлоропласту. Незважаючи на свою некодуючу природу, ця область є важливою для функціонування хлоропластів і виживання рослин.

Міжгенний спейсер *trnH - psbA* був обраним «штрих-кодом», оскільки він є найбільш широко використовуваною некодуючою послідовністю у молекулярній філогенетиці рослин після кодуючих послідовностей *rbcL* і *matK* (CBOL Plant Working Group, 2009, Hollingsworth et al., 2011), що забезпечує надійну ПЛР ампліфікацію з різноманітних таксонів рослин (Dong et al., 2012, Kress et al., 2005, Shaw et al., 2007, Shaw et al., 2005) і містять інформативні міжвидові поліморфізми INDEL (Kress et al., 2005, Liu et in., 2012, Махадані та Гош, 2014).

Універсальність праймера, безсумнівно, є критичним фактором, який визначає надійність ідентифікації видів за штрих-кодом. Оскільки міжгенний спейсер *trnH - psbA* є часто використовуваним штрих-кодом для філогенетичних реконструкцій, універсальність ПЛР-праймерів є одним із важливих факторів. Міжгенний спейсер *trnH-psbA* є одним із найбільш варіабельних штрих-кодів рослин (Dong et al., 2012, Shaw et al., 2007), що містить високий відсоток точок змінних даних і діагностичних поліморфізмів INDEL, але окрема геномна область не визначається як єдиний універсальний штрих-код. Таким чином, використання комбінацій штрих-кодів рекомендовано для покращення ефективності розрізнення у філогенетичних реконструкціях (CBOL Plant Working Group, 2009, Hollingsworth та ін., 2011, Kress та Erickson, 2007, Shaw та ін., 2014) та судовому аналізу харчових продуктів (Unsu та ін., 2015).

1.4 Хлоропластні маркери

Хлоропластні маркери в генетиці використовуються для вивчення хлоропластної спадковості та генетичного матеріалу, який міститься у хлоропластах рослин. Одним з найпоширеніших хлоропластних маркерів є гена рибосомної RNA (rRNA). Хлоропласти мають свій власний геном, що кодує рибосомну РНК. Цей ген може бути використаний для вивчення спадковості хлоропластів та виявлення генетичних взаємозв'язків між хлоропластними алелями. Інший поширений хлоропластний маркер - це ген ферменту пігментного забарвлення, такого як хлорофіл. Різні варіанти генів, які кодують пігменти хлоропластів, можуть бути використані для вивчення генетичних змін у хлоропластах і встановлення спадковості певних характеристик, пов'язаних з пігментним забарвленням (Sork, 2016).

Хлоропластні маркери грають важливу роль у вивченні еволюційних взаємозв'язків, філогенетики і генетичної дивергенції рослин. Вони можуть бути використані для вивчення процесів хлоропластної трансформації та генетичної модифікації рослин. Декілька особливостей, насамперед консервативний спосіб еволюції, роблять ДНК хлоропластів надзвичайно цінною молекулою для філогенетичних досліджень. Даний консерватизм також є його єдиним серйозним недоліком, оскільки це може обмежити кількість корисних варіацій ДНК на внутрішньовидовому рівні.

Гени рибосомної РНК, що розвиваються більш консервативно, мають найбільші перспективи для вирішення найглибших розгалужень еволюції рослин і, справді, вже вирішили остаточне питання еволюції хлоропластів, а саме його ендосимбіотичне походження. Третій підхід до отримання філогенетичної інформації з ДНК хлоропластів полягає в аналізі розподілу основних структурних перебудов, такі як інверсії та втрата або отримання генів та інтронів. Хоча такі перебудови є рідкісними порівняно з точковими мутаціями, їх велика рідкість і відсутність гомоплазії також роблять їх надзвичайно потужними характеристиками.

Хлоропластні маркери є інструментами, які використовуються для вивчення та візуалізації хлоропластів у живих організмах. Вони мають свої плюси та мінуси.

Плюси хлоропластних маркерів:

Специфічність: Хлоропластні маркери можуть бути дуже специфічними для хлоропластів, дозволяючи дослідникам точно визначити присутність та розташування хлоропластів у клітинах.

Візуалізація: Використання хлоропластних маркерів дозволяє візуалізувати хлоропласти за допомогою мікроскопії, що дозволяє дослідникам досліджувати їх структуру та динаміку.

Мінуси хлоропластних маркерів:

Токсичність: Деякі хлоропластні маркери можуть бути токсичними для клітин або організмів, що може вплинути на їх життєздатність або точність отриманих даних.

Некомерційність: Деякі хлоропластні маркери можуть бути досить дорогими або складними для отримання, що може ускладнювати їх використання в дослідженнях з обмеженими бюджетними ресурсами.

Обмежена доступність: Не всі хлоропластні маркери можуть бути ефективними для всіх типів організмів або клітин. Це може обмежувати

Можливі взаємодії з іншими компонентами: Деякі хлоропластні маркери можуть взаємодіяти з іншими молекулами або компонентами клітини, що може призводити до неочікуваних результатів або спотворення даних. (Daniell et al., 2001).

Проте, важливо пам'ятати, що вибір хлоропластного маркера залежить від конкретних дослідницьких потреб, типу організму і клітини, а також від обмежень і можливостей дослідника (Mayfield et al., 1995).

1.5 Ядерні ділянки. ITS

Мінливість ядерних ділянок виражається у різноманітності алельних варіантів генів у популяції або в межах індивіда. Саме така мінливість є основою для еволюційних змін і визначає різноманіття ознак і властивостей в окремих організмах. Зокрема, розташування на різних географічних регіонах/локалітетах може спонукати відмінності в генетичній структурі популяцій через такі фактори, як географічні бар'єри, міграцію та випадкові події. Це призводить до формування географічних патерів генетичної мінливості та розподілу алелей у різних популяціях.

У рослин також спостерігається генетична мінливість, яка може виявлятися у різних властивостях, таких як кольори квітів, розмір листків, час цвітіння тощо. Це може бути використано в сільському господарстві та селекції рослин для вибору поживних сортів (Sork, 2016).

Поліморфізм за послідовностями ядерних маркерів відображає наявність двох або більше алельних варіантів для конкретного гена в популяції. Це може включати однонуклеотидні поліморфізми (SNP), вставки або делеції, а також структурні зміни геному, такі як дуплікації або інверсії. Поліморфізми розглядаються як основа генетичної різноманітності і можуть бути пов'язані з різними фенотиповими характеристиками (Song et al., 2023). Наприклад, поліморфізми SNP часто використовуються як генетичні маркери для асоціаційних досліджень, що досліджують зв'язок міжгенетичними варіантами та фенотиповими характеристиками (Cornea-Cipcigan et al., 2023; Hua et al., 2023; Guo et al., 2023; Treccarichi et al., 2023).

SNP являють собою найбільш поширену маркерну систему як для рослин, так і для тварин. Маючи бінарний або кодомінантний статус, маркери такого типу дають змогу ефективно розрізняти гомозиготні та/або гетерозиготні алелі (Idrees & Irshad, 2014).

Багато локусів було перевірено на придатність в якості рослинних штрих-кодів, і було запропоновано багато комбінацій з декількома локусами: консорціум робочої групи зі створення штрих-кодів для рослин (PLWG) оцінив сім областей геному хлоропластів рослинного царства і виявив, що комбінація *matK* і *rbcL* було запропоновано як рослинний штрих-код. *rbcL* має високу універсальність, але низьку видову роздільну здатність, тоді як *matK* має високу роздільну здатність, але низьку

універсальність . Їх поєднання забезпечує максимальну ідентифікацію видів.

Однак для близькоспоріднених видів дискримінаційна здатність цих двох маркерів є низькою. Тому китайська група Plant BOL Group запропонувала додати ядерний ITS (Internal Transcribed Spacer) до комбінації mat K+ rbc L як рослинний штрих-код з максимальною дискримінаційною здатністю навіть для близькоспоріднених видів.

ITS являє собою ділянку некодувальної РНК, розташовану між структурними рибосомними РНК (рРНК) на спільному транскрипті-попереднику (De & Bandyopadhyay, 2008). Філогенетичний аналіз за послідовностями ITS дозволяє проводити розмежування не лише між різними видами, а навіть в межах таксонів низького рангу, зокрема, навіть географічних рас. Довжина та нуклеотидна послідовність ITS фігурують важливими параметрами для оцінки генетичного різноманіття. Порівняння послідовностей ITS широко використовується в таксономії та філогенії одразу з декількох причин:

1. *Висококопійність*, яка дозволяє отримати ПЛР продукт навіть з обмеженої кількості ДНК.
2. *Мінливість*, яка дозволяє часто розмежовувати між собою навіть близькоспоріднені види.

Ті чи інші особливості некодувальних ділянок можна пояснити відносно низьким еволюційним «тиском», що діє на ці нефункціональні послідовності. Проте, навіть не дивлячись на універсальність та зручність цієї ділянки, її використання передбачає також свої певні недоліки та обмеження. Одним із таких серйозних обмежень вважаються все ще невирішені питання стосовно шляхів еволюції рибосомальних генів,

зокрема спейсерних ділянок. Непередбачувана «еволюційна поведінка» цих послідовностей дещо знижує їх валідність в якості молекулярних маркерів.

Отож, можна зробити висновок, що двофокусні штрих-коди, або ж поєднання декількох молекулярних маркерів, можуть бути кращими для вирішення питань таксономії та філогенетики рослин. Не зважаючи на широкий вибір зручних маркерних послідовностей, саме комбінації штрих-кодів *rbcl* + *matK* на сьогоднішній день вважаються кращими.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Рослинний матеріал та екстракція ДНК. Матеріалом для нашого дослідження були відібрані гербарні зразки представників роду *Heracleum* (табл. 1). Такі зразки як *H. stevenii*, *H. transsilvanicum*, *H. shondilium*, *H. carpathicum* та *H. sosnovskii* були надані з Державного природознавчого музею НАН України. З ботанічного саду ЧНУ були надані зразки *H. mantegazzium*.

Таблиця 1

Місце збору зразків *Heracleum*, взятих до аналізу

<i>H. stevenii</i>	АР Крим
<i>H. transsilvanicum</i>	Івано-Франківська область
<i>H. shondilium</i>	Чернівецька область
<i>H. carpathicum</i>	Закарпатська область
<i>H. sosnovskii</i>	Львівська область
<i>H. mantegazzium</i>	Чернівецька область

Екстракцію ДНК проводили модифікованим цетавлоновим методом. Отримані препарати ДНК перевіряли методом гель-електрофорезу.

Виділення загальної ДНК із рослинного матеріалу:

З рослинного матеріалу було виділено ДНК за допомогою цетавлону як лізуючого агента, використовуючи наступну методику:

1. Рослинний матеріал гомогенізували стерильними ступкою та пестиком, після чого додали 1 мл попередньо підготовленого лізуючого буфера, що містить 100 мМ трис-НСl (рН 8,0), 1,4 М NaCl, 20 мМ ЕДТА, 3% цетавлон, 0,2% β -меркаптоетанол.

2. Гомогенат перенесли у 1,5 мл мікропробірку, додали рівний об'єм буфера та інкубували протягом 1 години при 65°C, 700 об/хв.

3. Для депротейнізації додали рівний об'єм суміші хлороформ-ізоамілового спирту, добре перемішали та центрифугували 7 хвилин при 13 000 об/хв, після чого обережно відбирали супернатант (верхню водну фазу). Цей етап повторювали двічі.

4. До супернатанту додавали двократний об'єм буфера для осадження, що містив 10% СТАВ, 5 М NaCl та бідистильовану воду, і інкубували при 22°C протягом 1 години.

5. Утворений осад ДНК центрифугували при 13 000 об/хв протягом 15 хвилин, після чого до відібраного супернатанту додавали рівний об'єм хлороформ-ізоамілового спирту та центрифугували 7 хвилин при 13 000 об/хв. Цей етап проводили двічі.

6. До відібраної верхньої фази додавали 0,6 об'єму ізопропанолу, добре перемішували та залишали зразки в мікропробірках на ніч у морозильній камері.

7. Для очищення ДНК від ізопропанолу зразки центрифугували 10 хвилин при 13 000 об/хв, відбирали верхню фазу та додавали 96% спирт, знову центрифугували при тих самих параметрах.

8. Обережно відбирали спирт, щоб не зачепити осад, та залишали мікропробірки відкритими в термоблоці при 56°C. Отриманий білий осад ДНК розчиняли у 14 мкл бідистильованої води.

9. Якість виділеної ДНК аналізували за допомогою електрофорезу у 1% агарозному гелі (Panchuk and Volkov, 2007).

Виділення загальної ДНК з рослинної тканини за допомогою набору DNeasy Plant Mini Kit:

1. Подрібнили рослинну тканину в буфері, використовуючи ступку і товкачик.

2. Додали 400 мкл буфера AP1 та 4 мкл РНКазу А (концентрація розчину 100 мг/мл) до максимум 100 мг подрібненої (микрої) або 20 мг (сухої) рослинної тканини та інтенсивно перемішали на вортексі.

3. Інкубували суміш протягом 10 хвилин при 65°C. Перемішали 2-3 рази під час інкубації, перевертаючи пробірку.

4. Додали 130 мкл буфера AP2 до лізату, змішали та інкубували протягом 5 хвилин на льоду.

5. Нанесли лізат на QIAshredder Mini Spin колонку (лілову) у 2 мл пробірку для збору та центрифугували протягом 2 хвилин при 14,000 об/хв.

6. Перенесли проточну фракцію з кроку 5 до нової пробірки без осаду.

7. Додали 1,5 об'єму буфера AP3/E до очищеного лізату та змішали піпетуванням.

8. Нанесли 650 мкл суміші з кроку 7, включаючи будь-який утворений осад, на DNeasy Mini Spin колонку в 2 мл пробірку для збору. Центрифугували протягом 1 хвилини при 8000 об/хв та відкинули проточну фракцію.

9. Повторили крок 8 з залишком зразка.

10. Помістили DNeasy Mini Spin колонку в нову 2 мл пробірку для збору, додали 500 мкл буфера AW до DNeasy Mini Spin колонки та

центрифугували протягом 1 хвилини при 8000 об/хв. Відкинули проточну фракцію та повторно використали пробірку для збору на кроці 11.

11. Додали 500 мкл буфера AW до DNeasy Mini Spin колонки та центрифугували протягом 2 хвилин при 14,000 об/хв для висушування мембрани.

12. Перенесли DNeasy Mini Spin колонку до мікроцентрифужної пробірки та додали 100 мкл попередньо нагрітого (65°C) буфера AE безпосередньо на мембрану DNeasy. Інкубували протягом 5 хвилин при кімнатній температурі (15-25°C), потім центрифугували протягом 1 хвилини при 8000 об/хв.

13. Повторили крок 12 ще раз.

Електрофорез ДНК у агарозному гелі:

1. Для електрофорезу ми використовували буферну систему 1×TBE (трис-борат ЕДТА: 0,089 М трис, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА, рН=8.0).

2. Для аналізу ПЛР-продуктів та продуктів рестрикції готували 2% агарозний гель, додаючи необхідну кількість агарози до 30 мл 1×TBE та нагріваючи в мікрохвильовій пічці (2-3 хв при потужності 300 Вт) до повного розчинення агарози (без осаду).

3. Охолоджували розчин до 50-55°C.

4. Після збирання форми для електрофорезу заливали в неї розчин агарози та вставляли гребінки необхідного розміру.

5. Після повного застигання гелю переносили форму в камеру для електрофорезу та заливали 1× буфером TBE, щоб гель був повністю покритий буфером.

6. Виймали спейсери та гребінку, намагаючись не пошкодити лунки.

7. Готували проби для нанесення, змішуючи розчинену ДНК з буфером для нанесення (1×TBE, 50% гліцерин, 0,25% розчин бромфенолового синього) у співвідношенні 5:1.

8. Наносили проби ДНК у лунки під буфером.

9. Використовували GeneRuler DNA Ladder Mix як ДНК-маркер.

10. Підключали прилад для електрофорезу до блоку живлення.

11. Електрофорез проводили при напруженості поля 5 В/см, поки лідуючий барвник не пройшов майже до кінця гелю.

12. Для візуалізації ДНК переносили гель на скло трансільюмінатора та переглядали й фотографували ДНК під УФ-світлом.

13. Квантифікацію ДНК проводили за допомогою програмного забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

ПЛР-ампліфікація:

Ділянку міжгенного спейсера ядерного геному ITS1-2 ампліфікували з використанням праймерів, які є комплементарними до кодувальних ділянок генів 18S та 26S рДНК.

Фрагмент хлоропластної ДНК *rpl32-trnL* ампліфікували з використанням праймерів, комплементарних до даної ділянки.

За паспортними даними застосованої нами ДНК-полімерази Red (Bioline), нами було розраховано склад реакційної суміші для ПЛР повторювальної ділянки ITS1-2, до якої входили такі компоненти: 1 мкл ДНК, двохкратний буфер Red – 5 мкл, праймери – по 0,12 мкл., б/д. води 3,75 мкл. Загальний об'єм становив 10 мкл. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора BioRad T100 (Тинкевич та ін., 2022).

З використанням, знову ж таки, ДНК-полімерази Red поставили ПЛР для хлоропластних ділянок *psbA-trnH*, *trnL-F*, *rpl32-trnL*. Однак загальний

об'єм становив 20 мкл. Відповідно, у реакційну суміш для ПЛР входили такі компоненти: 2 мкл ДНК, двохкратний буфер Red – 10 мкл, праймери – по 0,5 мкл., б/д. води 7 мкл.

Якість зразків після ампліфікації здійснювали в 2% агарозному гелі.

Очищення ПЛР-продуктів:

1. До отриманих продуктів ПЛР додавали рівний об'єм суміші хлороформу-ізоамілового спирту (24:1), інтенсивно перемішували та центрифугували протягом 3 хвилин.

2. Відбирали супернатант, після чого додавали 3 об'єми 96% етанолу і залишали суміш на 24 години при температурі -20°C.

3. Центрифугували протягом 10 хвилин, потім зливали супернатант.

4. Осад розчиняли в 14 мкл бідистильованої води.

Електрофоретичний аналіз очищених ПЛР-продуктів проводили в 2% агарозному гелі.

Сиквенування:

Отримані ПЛР-продукти очищали шляхом екстракції хлороформ-ізоаміловим спиртом у співвідношенні 24:1, після чого переосаджували трьома рівними об'ємами етилового спирту. Концентрацію ДНК у очищених зразках визначали за інтенсивністю флуоресценції відповідних смуг в агарозному гелі після електрофорезу, порівнюючи її з флуоресценцією маркерної ДНК відомої концентрації. Для цього використовували програмне забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad). Отримані ПЛР-продукти секвенували методом Сенгера на базі LGC Genomics, Німеччина. Первинну біоінформатичну обробку секвенованих нуклеотидних послідовностей

проводили за допомогою програмного забезпечення SnapGene (Тинкевич та ін., 2022).

Сиквенування методом *Illumina*:

Ділянки внутрішньотранскрибованого спейсеру ITS1-2 ампліфікували для: ReJap1, ReJap2, ReSac1 та ReSac4. Для підготовки зразків до сиквенування методом *Illumina* використовували набір Zymoclean Gel DNA Recovery Kits та виконали наступні дії:

1. Оптимізували ПЛР, щоб усунути небажані продукти.
 2. Провели електрофорез, щоб переконатися, що амплікони мають розмір 150-500 пар основ. Для оптимальних результатів подавали зразки, які утворювали лише одну смугу на гелі. Очистили продукти ПЛР для видалення праймерів і димерів. Використовували гелеву очистку - 3% агарозний гель.
 4. Кількісно визначили ДНК. Нормалізували концентрацію до 20 нг/мкл.
 5. Надали 500 нг дволанцюгової ДНК на зразок.
 6. Підготували зразки у мікроцентрифужних пробірках і чітко позначили кожен з них назвою зразка.
 7. Надали зображення ампліконів на гелі.
- Надіслали зразки до GENEWIZ на сиквенування.

Вирівнювання послідовностей та філогенетичний аналіз для ITS1-5.8S-ITS2.

Для вирівнювання послідовностей ділянки ITS1-5.8S-ITS2 використовували програму MAFFT з методом G-INS-i (Kato and Standley, 2013).

Філогенетичну сітку обчислили за алгоритмом Neighbor-Net за допомогою програми SplitsTree5 (Huson and Bryant, 2006).

Найкращу модель нуклеотидних замін для вирівнювання основних варіантів ділянки ITS1-5.8S-ITS2 визначали за найнижчим значенням Байесового інформаційного критерію (BIC) з використанням програми IQTree 2.3 (Minh et al., 2020).

Філогенетичне дерево методом максимальної правдоподібності було побудовано з використанням моделі GTR+F+G4. Значення bootstrap підтримки гілок було оцінено за 1000 реплікацій дерева.

Філогенетичний аналіз для хлоропластних ділянок:

Для отриманих результатів секвенування було виконано вирівнювання за допомогою програми MAFFT, а пошук гомологічних послідовностей здійснювали за допомогою інструменту BLAST. (Kato et al., 2019).

Філогенетичне дерево побудували методом Maximum likelihood (PHYML) із використанням ПО “Geneious” (Guindon and Gascuel, 2003).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Поліморфізм українських видів роду *Heracleum* за послідовностями хлоропластних ділянок

Для оцінки генетичного поліморфізму українських представників роду *Heracleum*, та встановлення їх філогенетичного статусу в межах роду, нами було використано метод ДНК-баркодингу за допомогою широко використовуваних молекулярних хлоропластних маркерів - *psbA-trnH* та *rpl32-trnL*.

Першим кроком в межах нашого дослідження був аналіз міжгенного спейсера *psbA-trnH* представників роду *Heracleum*, оскільки ця ділянка є досить широко розповсюдженим молекулярним маркером для рослин. Для порівняння використовували послідовності сиквеновані нами в лабораторії, а також здійснювали пошук гомологічних ділянок в БД GenBank для наявних представників роду *Heracleum*. Загалом вдалось отримати 22 послідовності ділянки *psbA-trnH* для різних видів досліджуваного роду.

Загальне вирівнювання всіх отриманих послідовностей та його наступну візуалізацію виконували за допомогою пакета комп'ютерних програм Lasergene (DNASTAR).

Детальний аналіз вирівнювання дозволив виявити в межах міжгенного спейсера *psbA-trnH* кілька поліморфних сайтів з однонуклеотидними замінами (SNP), за якими аналізовані види роду *Heracleum* поділяються на дві умовні групи (рис. 4).

Однак наявність якихось специфічних SNP, які були б індивідуальні для того, чи іншого виду, або ж дозволили б розмежувати

близькоспоріднені види з тими, які є для них віддаленими, нам виявити не вдалось. Послідовності *psbA-trnH* видів роду *Heracleum* демонструють досить високий рівень консервативності.

Окремо привертає увагу виявлена інверсія послідовності, що відповідає петлі (stem-loop region) (неспарені нуклеотиди) в районі 3' UTR мРНК *psbA* (рис. 4). Відомо, що таке явище характерне для цієї ділянки, проте філогенетична інформативність цієї ознаки викликає запитання, оскільки обидва варіанти цієї інверсії трапляються у межах більшості видів рослин. Можливо, однак, що ця ознака може бути використана як мікроеволюційний маркер для ідентифікації окремих популяцій борщівників.

Majority	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
HeSte1_psbA	GGACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTTAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTTTCTATCACTGTTCTA	93
HeTra2_psbA	GGACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTTAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	92
Heracleum_platytaeniumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	136
Heracleum_sphondylium_subsp._sibiricum	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	151
Heracleum_trachylomaGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	98
Heracleum_anisactisGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	75
Heracleum_antasiaticumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTTAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	151
Heracleum_cyclocarpumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTTAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	154
Heracleum_grandiflorumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	75
Heracleum_grossheimiiGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	151
Heracleum_persicumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGTT- STATCATTGTTCTA	151
Heracleum_pastinacifoliumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	152
Heracleum_paphlagonicumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTTAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	151
Heracleum_rechingeriGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	151
Heracleum_sibiricumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	151
Heracleum_sosnowskyiGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTTAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	154
Heracleum_transcaasicumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	153
Heracleum_dissectumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	75
Heracleum_freynianumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	96
Heracleum_ligusticifoliumGB	- GACC- - GGGTTTTAGT- ATATACGAGTTTTTTGAAATAAAAAAAGAAATACCGCCCTCTTGAT- AGAACAATGATAGA	150

Рис.3 (початок). Вирівнювання ділянки *psbA-trnH* представників роду *Heracleum* Червоним кольором позначені нуклеотиди, відмінні від консенсусу

Majority	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	
	170 180 190 200 210 220 230 240	
HeSte1_psbA	TCCAAATGGCTCTATTTCTTTTTTTATATTTCCACCTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	171
HeTra2_psbA	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	170
Heracleum_platytaeniumGB	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	214
Heracleum_sphondylium_subsp._sibiricum.	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	229
Heracleum_trachylomaGB	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	176
Heracleum_anisactisGB	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	153
Heracleum_antasiaticumGB	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	229
Heracleum_cyclocarpumGB	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTTTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	232
Heracleum_grandiflorumGB	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	153
Heracleum_grossheimiiGB	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	229
Heracleum_persicumGB	TCAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	229
Heracleum_pastinacifoliumGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	230
Heracleum_paphlagicumGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	229
Heracleum_rechingeriGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	229
Heracleum_sibiricumGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	229
Heracleum_sosnowskyiGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTTTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	232
Heracleum_transcaasicumGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	231
Heracleum_dissectumGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	153
Heracleum_freynianumGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	174
Heracleum_ligusticifoliumGB	ACAAGAGGGCGGTATTTCTTTTTTTATATTTTCAGACTGTTTTTAGATA- AACTATTTTTGAATG- ATCAAAAAGGAAT	228

Рис.3 (закінчення). Вирівнювання ділянки *psbA-trnH* представників роду *Heracleum* Червоним кольором позначені нуклеотиди, відмінні від консенсусу

Очевидно, що відсутність можливості дискримінувати види борщівників на основі аналізу послідовності міжгенного спейсера *psbA-trnH* пов'язана з недостатньою мінливістю цієї ділянки саме для представників роду *Heracleum*, незважаючи на те, що ефективність її використання була не раз доведена при дослідженні філогенетичних відносин та таксономічного статусу видів різних родин покритонасінних рослин. З огляду на це, нами було вирішено протестувати можливість використання інших маркерних ділянок, зокрема міжгенний спейсер *rpl32-trnL*.

Наступний аналіз та вирівнювання сиквенованих нами послідовностей *rpl32-trnL* обраних українських видів роду *Heracleum* (*H. sphondylium* та *H. mantegazzianum*) разом з азійськими видами, що були представлені для цієї ділянки в GenBank, показали присутність вже значно більшої кількості поліморфних сайтів порівняно з *psbA-trnH* (Рис. 5).



Рис. 4. Вирівнювання ділянки *rpl32-trnL* представників *Heracleum*

Зокрема, звертають на себе увагу деякі специфічні (заміни) SNP, які виявились характерними лише для тих видів, послідовності яких були сиквеновані особисто нами, а саме для українських видів *H. sphondylium* та *H. mantegazzium*. Зокрема, такий специфічний мінливий мотив було виявлено на початку спейсерної ділянки *rpl32-trnL* (рис. 5).

Однак, присутність специфічних замін лише для українських видів, в той час як переважна більшість азійських видів їх не демонструють, не дає можливості точно стверджувати, що виявлені SNP характерні лише для аналізованих, або ж українських видів борщівників загалом. Задля того, аби мати точну картину генетичного поліморфізму борщівників в межах роду *Heracleum* за спейсерною ділянкою *rpl32-trnL*, потрібно значно збільшити кількість секвенованих послідовностей *rpl32-trnL*, зокрема для представників, поширених на території України.

На основі аналізованого елайменту *rpl32-trnL* нами була побудована неукорінена ML-філодендрограма на сервері IQ-Tree (Efficient software for phylogenetic inference). Для візуалізації використовували онлайн-сервер iTOL (Interactive tree of life), зі стандартними налаштуваннями (рис. 5).

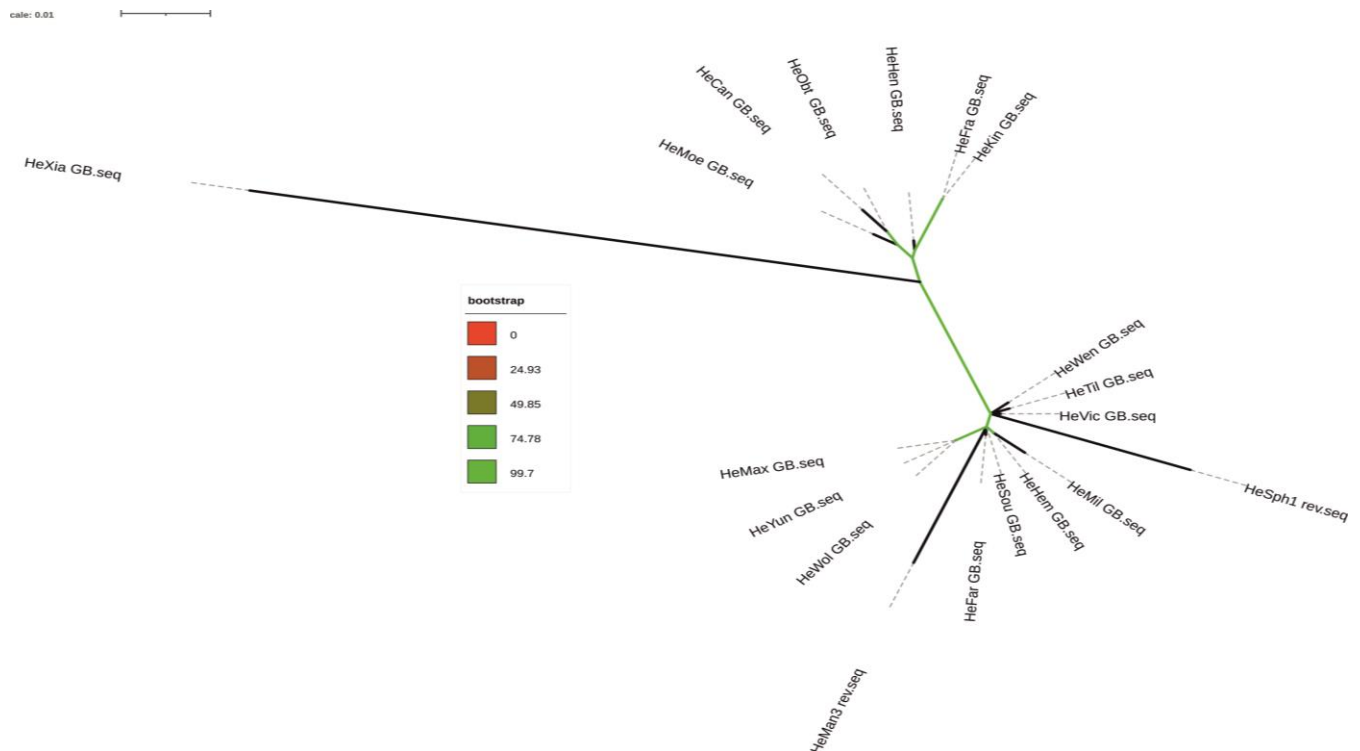


Рис. 5. Неукорінена ML-філодендрограма на основі вирівнювання ділянки *rpl32-trnL*

Аналіз утвореної ML-дендрограми показав, що досліджувані зразки видів *Heracleum* були поділені на дві основні клади/гілки, де зразки з наших територій, зокрема з Чернівецької області, хоч і були згруповані з тими, які поширені в Азії, проте все ж мають певні відмінності, завдяки яким вони виглядають дещо віддаленими. Особливості їх відмінностей вже згадувались раніше. Найбільш віддаленим виявився HeXia_GB, нещодавно описаний азійський вид, таксономічний статус якого все ще вимагає додаткового уточнення.

3.2. Поліморфізм українських видів роду *Heracleum* за послідовністю ITS

З огляду на те, що аналіз за послідовностями хлоропластних маркерів все ж не дає повної, вичерпної картини філогенетичних взаємозв'язків між видами в межах роду *Heracleum*, нами також було проаналізовано маркерну ділянку ядерного геному – внутрішнього транскрибованого спейсера ITS1-2. Як відомо, поряд з ділянками хлоропластної ДНК, ці локуси також вважаються ефективними та інформативними нуклеотидними послідовностями.

Міжгенний спейсер ITS1-2 є висококопійною повторюваною ділянкою, яка може бути представлена в межах одного геному різними варіантами, відмінними як за довжиною так і за нуклеотидною послідовністю.

Спершу, для сиквенування нами було підготовано сукупність ПЛР-продуктів даної ділянки для 4-х видів, два з яких вважаються найнебезпечнішими і становлять комплекс гігантських борщівників (*H. sosnovskii* та *H. mantegazzium*).

Наступне сиквенування цих продуктів, та подальший біоінформатичний аналіз всіх можливих варіантів ITS1-2, які вдалось зібрати орієнтуючись на референсні послідовності з БД GenBank, дозволив сформувати NeighborNet філогенетичну сітку, яка відображає їх поліморфізм та розподіл (рис. 6).

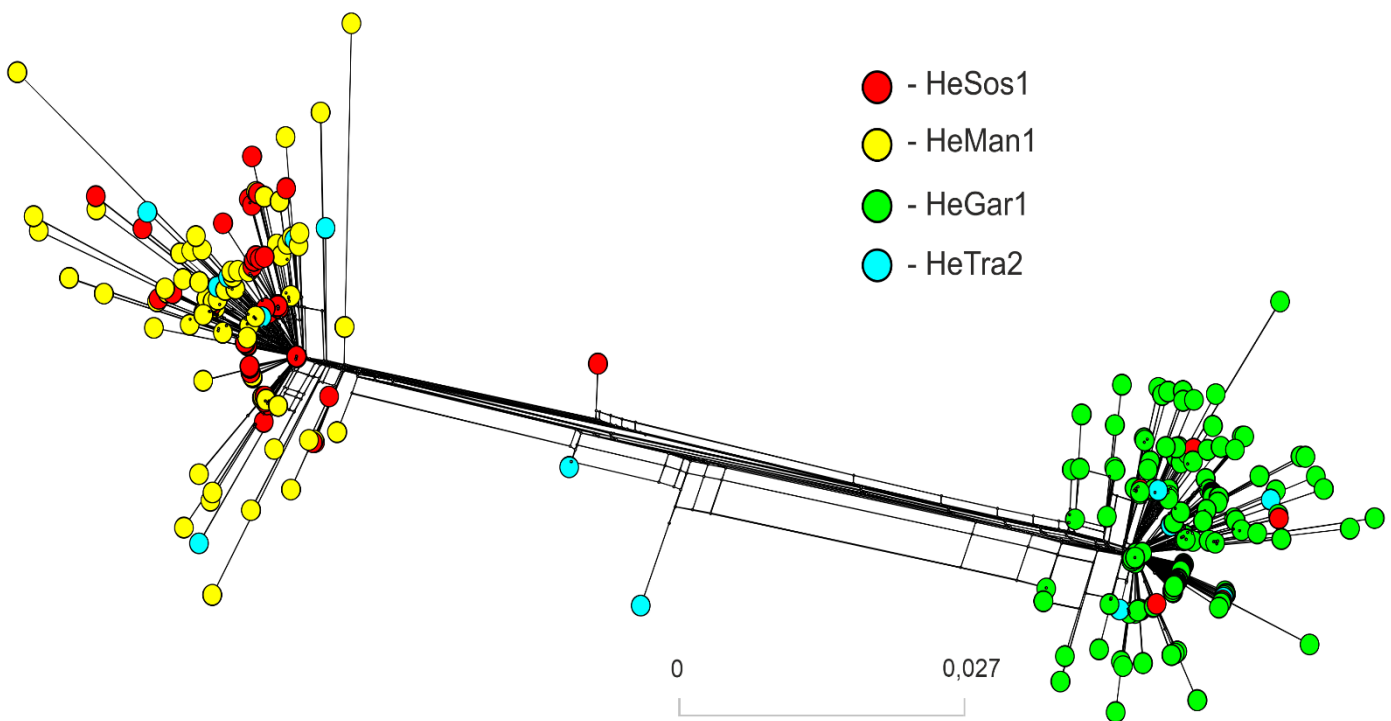


Рис. 6. Аналіз представників *Heracleum* за ділянкою ITS1-2

Загалом, було виявлено, що близькоспоріднені види *H. sosnovskii* та *H. mantegazzium*, що, як вже згадувалось, формують комплекс так званих «гігантських борщівників», утворюють одну спільну гілку. що, в цілому, було очікуваним. Водночас, два інших аналізованих нами українських види (*H. carpaticum* *H. transsilvanikum*) утворили іншу (рис. 6).

На загал, видається, що в геномах українських видів роду *Heracleum*, існує два основних класи міжгенних спейсерів ITS1-2, в межах яких гіпотетично можна виділити декілька структурних підкласів. Проте, з огляду на утворену філогенетичну сітку можна припустити, що виявлені варіанти ITS1-2 не є строго специфічними для аналізованих видів, оскільки ми можемо спостерігати варіанти з одного сектора, що групуються зі зразками в іншому, та навпаки. Однак, для кращого розуміння еволюції та поліморфізму ITS1-2 українських борщівників потрібно залучити значно більшу кількість послідовностей для аналізу, зокрема, з інших територій України.

ВИСНОВКИ

1. Нами було проаналізовано і оцінено потенціал використання у оцінці генетичного різноманіття представників роду *Heracleum* трьох маркерних нуклеотидних послідовностей таких, як *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* та ITS.
2. Найменш інформативною ділянкою виявилась послідовність міжгенного спейсера *psbA-trnH*, оскільки в межах цього локусу нам не вдалось виявити специфічні поліморфізми для різних видів *Heracleum*, які б дозволили розділяти окремі види, в тому числі близькоспоріднені.
3. Аналіз за послідовністю *rpl32-trnL* показав присутність значно більшої кількості поліморфних сайтів, проте також не дає змогу в повній мірі оцінити філогенетичний статус саме наших зразків, оскільки набір доступних видів в БД GenBank обмежений здебільшого азійськими видами.
4. Сиквенування та аналіз послідовностей ITS дозволив виявити та оцінити поліморфізм цієї ділянки в межах геномів аналізованих нами видів, та отримати уявлення про ймовірну кількість варіантів цієї спейсерної послідовності. Тому ми можемо зробити висновки що данна маркерна ділянка виявилась найінформативнішою для представників роду *Heracleum*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Протопопова, В. В., & Шевера, М. В. (2019). Інвазійні види у флорі України. І. Група високо активних видів. *Geo & Bio*, (17), 116-135.
2. Тинкевич, Ю. О., Бойчук, С. В., Шелифіст, А. Є., & Чорней, І. І. (2022). Оцінка можливості використання ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* для вивчення генетичного поліморфізму українських популяцій *Muscari botryoides* (L.) MILL. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 14(2), 124-128.
3. Callaway, R. M., Cipollini, D., Barto, K., Thelen, G. C., Hallett, S. G., Prati, D., ... & Klironomos, J. (2008). Novel weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology*, 89(4), 1043-1055.
4. Cornea-Cipcigan, M., Pamfil, D., Sisea, C. R., & Margaoan, R. (2023). Characterization of Cyclamen genotypes using morphological descriptors and DNA molecular markers in a multivariate analysis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1100099.
5. Daniell, H., Muthukumar, B., & Lee, S. B. (2001). Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Current Genetics*, 39, 109-116.
6. De, S., & Bandyopadhyay, S. (2008). Molecular taxonomy: an approach based on molecular markers. *Science and Culture*, 74, 397-496
7. Dostál, P. (2023). Reproductive strategies of native plant populations altered by a plant invasion. *Functional Ecology*, 37(9), 2500-2510.
8. Gioria, M., Hulme, P. E., Richardson, D. M., & Pyšek, P. (2023). Why are invasive plants successful?. *Annual Review of Plant Biology*, 74, 635-670.

9. Grzędzicka, E. (2022). Invasion of the Giant Hogweed and the Sosnowsky's Hogweed as a multidisciplinary problem with unknown future—A review. *Earth*, 3(1), 287-312.
10. Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), 696-704.
11. Guo, Y., Chen, Q., Qu, Y., Deng, X., Zheng, K., Wang, N., ... & Yan, G. (2023). Development and identification of molecular markers of GhHSP70-26 related to heat tolerance in cotton. *Gene*, 874, 147486.
12. Hansen, S. O., Hattendorf, J., Wittenberg, R., & Reznik, S. Y. (2006). Phytophagous insects of giant hogweed *Heracleum mantegazzianum* (Apiaceae) in invaded areas of Europe and in its native area of the Caucasus. *European Journal of Entomology*, 103(2), 387.
13. Hua, Z., Jiang, C., Song, S., Tian, D., Chen, Z., Jin, Y., ... & Yuan, Y. (2023). Accurate identification of taxon-specific molecular markers in plants based on DNA signature sequence. *Molecular Ecology Resources*, 23(1), 106-117.
14. Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23(2), 254-267.
15. Idrees, M. U. H. A. M. M. A. D., & Irshad, M. U. H. A. M. M. A. D. (2014). Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *European academic research*, 2(1), 1513-1540.
16. Jahodová, Š., Fröberg, L., Pyšek, P., Geltman, D., Trybush, S., & Karp, A. (2007). Taxonomy, identification, genetic relationships and distribution of large *Heracleum* species in Europe. *Ecology and management of giant hogweed*, 1-19.

- 17.Jahodová, Š., Trybush, S., Pyšek, P., Wade, M., & Karp, A. (2007). Invasive species of *Heracleum* in Europe: an insight into genetic relationships and invasion history. *Diversity and Distributions*, 13(1), 99-114.
- 18.Jandová, K., Klinerová, T., Müllerová, J., Pyšek, P., Pergl, J., Cajthaml, T., & Dostál, P. (2014). Long-term impact of *Heracleum mantegazzianum* invasion on soil chemical and biological characteristics. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 270-278.
- 19.Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- 20.Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1160-1166.
- 21.Lundström, H. (1989). New experiences of the fight against the giant hogweed, *Heracleum mantegazzianum*. In *Swedish Crop Protection Conference*. (Vol. 2, pp. 51-58).
- 22.Mayfield, S. P., Yohn, C. B., Cohen, A., & Danon, A. (1995). Regulation of chloroplast gene expression. *Annual review of plant biology*, 46(1), 147-166.
- 23.Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular biology and evolution*, 37(5), 1530-1534.
- 24.Müllerová, J., Pergl, J., & Pyšek, P. (2013). Remote sensing as a tool for monitoring plant invasions: Testing the effects of data resolution and image classification approach on the detection of a model plant species *Heracleum*

- mantegazzianum (giant hogweed). *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 25, 55-65.
25. Müllerová, J., Pyšek, P., Jarošík, V., & Pergl, J. A. N. (2005). Aerial photographs as a tool for assessing the regional dynamics of the invasive plant species *Heracleum mantegazzianum*. *Journal of Applied Ecology*, 42(6), 1042-1053.
 26. Nielsen, C., Hartvig, P., & Kollmann, J. (2008). Predicting the distribution of the invasive alien *Heracleum mantegazzianum* at two different spatial scales. *Diversity and Distributions*, 14(2), 307-317.
 27. Often, A., & Graff, G. (1994). Skillekarakterer for kjempebjørnekjeks (*Heracleum mantegazzianum*) og tromsøpalme (*H. laciniatum*). *Blyttia*, 52, 129-133.
 28. Oliveira, R. C., Oliveira, L. S., Franca, A. S., & Augusti, R. (2009). Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. *Journal of Food Composition and analysis*, 22(3), 257-261.
 29. Panchuk, I. I., & Volkov, R. A. (2007). A practical course in molecular genetics. *Chernivtsi: Ruta*.
 30. Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H., & Chen, S. (2012). Utility of the trnH-psbA intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis.
 31. Pergl, J., Perglová, I., Pyšek, P., & Dietz, H. (2006). Population age structure and reproductive behavior of the monocarpic perennial *Heracleum mantegazzianum* (Apiaceae) in its native and invaded distribution ranges. *American Journal of Botany*, 93(7), 1018-1028.

32. Pyšek, P. (1991). *Heracleum mantegazzianum* in the Czech Republic: dynamics of spreading from the historical perspective. *Folia geobotanica et phytotaxonomica*, 26, 439-454.
33. Pyšek, P., Jarošík, V., Müllerová, J., Pergl, J., & Wild, J. (2008). Comparing the rate of invasion by *Heracleum mantegazzianum* at continental, regional, and local scales. *Diversity and Distributions*, 14(2), 355-363.
34. Reinhart, K. O., & Callaway, R. M. (2006). Soil biota and invasive plants. *New phytologist*, 170(3), 445-457.
35. Rejmánek, M. (2000). Invasive plants: approaches and predictions. *Austral ecology*, 25(5), 497-506.
36. Shen, C., Wang, J., He, J. Z., Yu, F. H., & Ge, Y. (2021). Plant diversity enhances soil fungal diversity and microbial resistance to plant invasion. *Applied and environmental microbiology*, 87(11), e00251-21.
37. Song, L., Wang, R., Yang, X., Zhang, A., & Liu, D. (2023). Molecular markers and their applications in marker-assisted selection (MAS) in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agriculture*, 13(3), 642.
38. Sork, V. L. (2016). Gene flow and natural selection shape spatial patterns of genes in tree populations: implications for evolutionary processes and applications. *Evolutionary applications*, 9(1), 291-310.
39. Thiele, J., & Otte, A. (2008). Invasion patterns of *Heracleum mantegazzianum* in Germany on the regional and landscape scales. *Journal for Nature Conservation*, 16(2), 61-71.
40. Treccarichi, S., Ben Ammar, H., Amari, M., Cali, R., Tribulato, A., & Branca, F. (2023). Molecular markers for detecting inflorescence size of *Brassica oleracea* L. crops and *B. oleracea* complex species (n= 9) useful for breeding of broccoli (*B. oleracea* var. *italica*) and cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis*). *Plants*, 12(2), 407.

41. Uncu, A. T., & Uncu, A. O. (2018). Plastid trnH-psbA intergenic spacer serves as a PCR-based marker to detect common grain adulterants of coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Control*, *91*, 32-39.
42. Whitlock, B. A., Hale, A. M., & Groff, P. A. (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode. *PloS one*, *5*(7), e11533.

ДОДАТКИ

Додаток А

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях Вимоги безпеки перед початком роботи.

1. Лабораторія має знаходитись у прибраному та чистому стані; на робочих місцях мають знаходитись лише необхідні прилади та матеріали, запаси зберігаються у шафах або на складі.

2. Перед початком роботи потрібно:

- оглянути та упорядкувати робоче місце;
- перевірити витяжну систему;
- перевірити правильність підключення устаткування до електромережі;
- перевірити справність струмопровідних дротів і відсутність оголених ділянок;
- переконатися в наявності захисного заземлення приладів.

3. Забороняється приступати до роботи при виявленні пошкодження обладнання. Працівник зобов'язаний повідомити керівнику про виявлені пошкодження.

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Під час роботи у лабораторії слід дотримуватись таких правил:

1. Необхідно використовувати захисний одяг (лабораторний бавовняний халат, при необхідності гумові рукавички та окуляри; при роботі з дрібнодисперсними речовинами потрібно носити респіраторні маски);
2. Двері під час роботи мають бути зачинені;
3. При роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами потрібно дотримуватись запобіжних заходів. Зберігати вибухові та горючі речовини необхідно в окремих приміщеннях у невеликих кількостях і в місцях, захищених від світла, вологи і пилу;
4. При роботі з летючими речовинами слід користуватись витяжною шафою.

У приміщеннях кафедри **забороняється:**

- працювати без нагляду співробітника або лаборанта;
- працювати у верхньому одязі;
- користуватися косметикою, палити, їсти, пити та зберігати продукти харчування;
- викидати в раковини скло, сміття, виливати концентровані кислоти, луги, органічні розчинники, легкозаймисті та горючі рідини;
- користуватись електронагрівачами, джерелами відкритого вогню (сірниками, запальничками тощо);

- переносити обладнання без дозволу зав. кафедрою або зав. лабораторією;
- користуватись зіпсованими електроприладами;
- самостійно проводити ремонт розеток, вимикачів, запобіжників;
- користуватись витяжними шафами з розбитим склом або непрацюючою вентиляцією;
- зберігати реактиви у посуді без етикеток.

По закінченні роботи слід мити руки.

Робота з хімічними речовинами

Робота з хімічними речовинами має бути орієнтована на такі принципи: робота з шкідливими речовинами повинна відповідати вимогам техніки безпеки та захисту довкілля;

використання токсичних та потенційно канцерогенних речовин необхідно зводити до мінімуму. При можливості такі речовини замінюються на менш токсичні;

у лабораторії можна зберігати лише ті речовини, які необхідні для роботи найближчим часом;

у кожній лабораторії повинні бути списки небезпечних речовин.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

До аварійних ситуацій відносяться:

- розгерметизація технологічних трубопроводів, тари та обладнання з викидом продукту, його пари та пилу у виробниче та зовнішнє середовище;
- загоряння технологічних трубопроводів, обладнання, продукту;
- відключення електропостачання, яке живить засоби колективного захисту, обривання і коротке замикання електрокомунікацій, електрообладнання.

У разі розливу легкозаймистих та горючих рідин необхідно погасити газові пальники, вимкнути електроживлення загальним рубильником, розлитий продукт засипати піском, пісок зібрати і усунути у безпечне місце.

У випадку займання легкозаймистих та горючих рідин необхідно:

- негайно приступити до її гасіння, застосовуючи відповідні для даного випадку засоби гасіння (пісок, порошкові та інші вогнегасники);
- негайно вимкнути вентиляцію, пальники і нагрівальні прилади;
- винести з приміщення посудини з вогнебезпечними речовинами.

При виникненні іскріння (спалахування) струмоведучих частин електрообладнання, лаборант зобов'язаний його негайно знеструмити, повідомити про це електрику, завідувачому лабораторією.

У разі виявлення пожежі (ознак горіння) необхідно:

- припинити роботу;
- знеструмити електрообладнання;

- негайно повідомити про це телефоном пожежну охорону. При цьому необхідно назвати адресу об'єкта, вказати кількість поверхів будівлі, місце виникнення пожежі, обстановку на пожежі, наявність людей, а також повідомити своє прізвище;

- вжити (за можливістю) заходів до евакуації людей, гасіння (локалізації) пожежі та збереження матеріальних цінностей;

- повідомити про пожежу наукового керівника або працівників кафедри;

- у разі необхідності викликати інші аварійно-рятувальні служби (медичну, газорятувальну тощо);

- у випадку оголошення евакуації швидко й організовано покинути приміщення лабораторії та навчального корпусу.

Надання першої медичної допомоги

У випадку *ураження людини струмом* перш за все потрібно вимкнути рубильники та викликати «Швидку допомогу» за номером 103.

При легких *термічних опіках* шкіру слід промити етанолом, а потім змастити гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце після промивання концентрованим розчином перманганату калію та етанолом необхідно змастити засобом від опіків.

При *опіках кислотами* потрібно промити обпалене місце великою кількістю води протягом 10 хвилин, потім – 3% розчином соди.

При *опіках лугами* шкіру потрібно промити великою кількістю води, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження і навіть сліпоту.

При *отруєнні хімікатами* слід терміново викликати лікаря або відправити потерпілого в найближчий лікарський заклад. Дуже важливо визначити, отруєння якою речовиною мало місце. Перша допомога при будь-якому отруєнні полягає в швидкому видаленні отрути з організму, а якщо це не можливо, то у знешкодженні її в організмі. При попаданні отрути в організм через рот необхідно викликати блювання. Проте це не можна робити, якщо потерпілий знаходиться у несвідомому або напівсвідомому стані, а також при різкому порушенні кровообігу. Найпростіший спосіб викликати блювання – ввести пальці глибоко в рот. Щоб видалити отруту із шлунку, слід дати випити велику кількість (5-8 склянок) теплої (30-35°C) води, а після цього знов викликати блювання. Таке промивання шлунку слід повторити декілька разів. Якщо отрута відома, шлунок промивають чистою водою, або розчинами речовин, що нейтралізують отруту. При отруєнні кислотами для промивання шлунку застосовують воду (використання

розчину соди не допускається). При отруєнні лугами промивку проводять 2% оцтовою або лимонною кислотою. При отруєнні ртуттю або свинцем для промивання використовують молоко.

При отруєнні парами постраждалого слід вивести на свіже повітря. При послабленні дихання та нестачі кисню слід застосовувати штучне дихання і викликати лікаря.

При *попаданні хімікатів у очі* їх необхідно негайно промити великою кількістю води.

При *порізах* у разі необхідності видалити з рани уламки скла або інших матеріалів, промити рану, краї рани продезінфікувати 3% спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку. При сильних кровотечах слід накласти вище рани джгут і викликати лікаря або направити того, хто постраждав, у лікарню