

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

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

**ХАРАКТЕРИСТИКА НУКЛЕОТИДНОЇ
ПОСЛІДОВНОСТІ ITS1-5.8S рРНК-ITS2 ДІЛЯНКИ 35S рДНК
У ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *HERACLEUM***

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконав:

студент 4 курсу, групи 407
спеціальність 162 Біотехнології та
біоінженерія

Дрогобецький Ігор Олегович

Керівник:

Кандидат біологічних наук,
доцент **Шелифіст А.Є.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № ____ від _____ 2025 р.

Зав. кафедри _____ проф. Волков Р.А.

Чернівці – 2025

Анотація

Кваліфікаційна робота Дрогобецького Ігоря присвячена дослідженню аналізу нуклеотидної послідовності ITS1-5,8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК представників роду *Heracleum*. Робота виконана в 2024-2025 роках в рамках наукової теми кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету. Для виконання даної роботи використовували методи: виділення ДНК, ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), сиквенування за методом Illumina. Бакалаврська робота містить порівняльний аналіз міжгенних спейсерів ITS1, ITS2 та гену 5,8S рРНК. Послідовності були ампліфіковані та сиквеновані автором для 9 зразків з території України та Румунії.

Обсяг роботи складає 46 сторінок, що включає 5 таблиць, 10 рисунків. У роботі використано 39 літературних джерел.

Ключові слова: молекулярний маркер, ядерний геном, міжгенний спейсер, інвазивна рослина.

Annotation

The qualification work of Drohobetskyi Ihor is devoted to the study of the analysis of the nucleotide sequence ITS1-5.8S rRNA-ITS2 of the 35S rDNA region of the genus *Heracleum*. The work was carried out in 2024-2025 within the framework of the scientific topic of the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of Chernivtsi National University. To perform this work, the following methods were used: DNA extraction, PCR (polymerase chain reaction), Illumina sequencing. The bachelor's thesis contains a comparative analysis of the intergenic spacers ITS1, ITS2 and the 5,8S rRNA gene. The sequences were amplified and sequenced by the author for 9 samples from Ukraine and Romania.

The volume of the work is 46 pages, including 5 tables and 10 figures. The work is based on 39 references.

Key words: molecular marker, nuclear genome, intergenic spacer, invasive plant.

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

_____ І.О. Дрогобецький

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Різновиди молекулярних маркерів та їх використання.....	6
1.1.1. Загальна характеристика маркерів.....	6
1.1.2. Застосування ITS послідовностей при ДНК-баркодингу.....	8
1.2. Вивчення та характеристика представників роду <i>Heracleum</i>	9
1.2.1. Загальна характеристика <i>Heracleum sphondylium</i>	9
1.2.2. Вплив інтродукції <i>Heracleum mantegazzianum</i> на навколишнє середовище.....	11
1.2.3. Небезпека інвазії <i>Heracleum sosnowskyi</i>	13
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	16
2.1. Об'єкт та матеріал для дослідження.....	16
2.2. Методи дослідження.....	20
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	24
3.1. Аналіз нуклеотидних послідовностей ITS1-5,8SpРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК представників роду <i>Heracleum</i> з бази даних Genbank.....	24
3.2. Аналіз нуклеотидних послідовностей ITS1-5,8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК представників роду <i>Heracleum</i> , сиквенованих методом Illumina.....	30
ВИСНОВКИ	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	36
ДОДАТКИ	41

ВСТУП

Ера застосування молекулярних маркерів, зокрема для аналізу геному рослин розпочалась у 80-х роках минулого століття (Nadeem et al., 2018). Вони є дуже корисними інструментами, що на сьогодні є доступними для проведення досліджень у рослинній галузі (Collard et al., 2005). Використання послідовностей ДНК з метою ідентифікації організмів було запроваджено як більш дієвий підхід, на відміну від традиційної таксономічної практики (Tautz et al., 2003; Blaxter et al., 2004).

Представники роду *Heracleum* є широко поширеними і таксономічно складними. Аналіз їхнього геному дає змогу зрозуміти взаємозв'язки та вивчити їх філогенію (Porrello et al., 2024). Молекулярні дослідження показали, що рід *Heracleum* не є монофілетичним. Також простежується міжвидова варіація, що пов'язана з генетичними, хімічними та морфологічними ознаками (Luo et.al, 2025).

Хоча міжвидова гібридизація для представників роду *Heracleum* є рідкістю, на території Європи неодноразово фіксувались гібридні форми між *H.mantegazzianum* та *H. sphondylium* L. Це пояснюється частковим перекриттям видів у місцях зростання (Weimarck et al., 1979; Tutin & Davis, 1980; Ochsmann, 1996). З точки зору морфології ці гібриди займають проміжне положення між батьківськими видами, проте їхня здатність до розмноження є низькою (Weimarck et al., 1979; Stewart & Grace, 1984; Bhowmik & Chandran, 2015).

Використання послідовностей ядерного геному, таких як внутрішній транскрибований спейсер (ITS) може бути дієвим інструментом для ДНК-баркодингу у рослин (Kress et al., 2005). На сьогодні, ITS ділянка використовується в якості ДНК-штрихкоду близько для 21000 виду рослин. ДНК-баркодування надає швидкий та дієвий спосіб ідентифікації організмів (Saddhe & Kumar, 2018). ITS область може бути чудовим доповненням для результатів генів пластид. Такий метод дозволяє створити більш компактний

ДНК-штрихкод, що суттєво допомагає для аналізу та таксономії видів (Chase et al., 2005).

У зв'язку з цим **метою** роботи було провести порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей ITS1-5.8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК різних популяцій роду *Heracleum*.

Для досягнення мети були поставлені такі **завдання**:

1. Проаналізувати нуклеотидні послідовності ITS1-5.8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК з бази даних Genbank.
2. Отримати препарати ДНК представників роду *Heracleum* із різних місць природного зростання.
3. Ампліфікувати ITS1-5.8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК за допомогою ПЛР, використовуючи специфічні до них праймери.
4. Сиквенувати отримані ПЛР-продукти різних представників роду *Heracleum* та провести їх порівняльний аналіз за допомогою відповідного програмного забезпечення.

РОЗДІЛ І.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Різновиди молекулярних маркерів та їх застосування

1.1.1. Загальна характеристика маркерів.

Завдяки впровадженню застосування у дослідженнях молекулярних маркерів, сучасна таксономія живих організмів зазнає суттєвих змін, оскільки маркери дають можливість більш точно оцінити генетичне різноманіття. Через відсутність універсального ДНК-маркера, у більшості досліджень поєднують використання кількох маркерів (Junli et al., 2000; Zhang et al., 2000). Зокрема, маркери, на основі одонуклеотидних поліморфізмів (SNP) і методів ПЛР, демонструють високу ефективність в ідентифікації та моніторингу такого явища як інвазійність (Hyun et al., 2019).

Молекулярні маркери – специфічні, локалізовані у ДНК послідовності, що успадковуються згідно законів Менделя. Вони здатні кодувати певні ознаки, і водночас не бути пов'язаними з ними. При цьому, дане явище не залежить від впливу навколишнього середовища.

Для того, щоб маркер був якісним інструментом для проведення досліджень, йому мають бути притаманні такі критерії: висока результативність за одне дослідження, доступність у собівартості, мати відносно низький рівень похибок та здатність ідентифікувати велику кількість алелів (Kumar та ін., 2009). Зазвичай, поліморфізм молекулярних маркерів в організмах спричинені наявністю SNP, внаслідок перебудов, що включають в себе транзиції, делеції та інсерції, а також помилками у реплікації ділянок ДНК, що повторюються тандемно (Selvakumari et al., 2017).

AFLP-маркери є цінним інструментом для молекулярно-систематичних досліджень завдяки високій геномній поширеності та поліморфізму, а також можливості застосування між видами без необхідності знань послідовності ДНК. Проте, їх використання є обмеженим у визначенні гомології послідовностей, зокрема можливістю певної появи чи втрати фрагментів та

труднощами в розпізнаванні гетеро- і гомозигот (Oorman, 2005). AFLP-маркери ефективно використовуються для побудови генетичних карт і дають можливість працювати з меншими фрагментами ДНК порівняно з RFLP. Однак їхнє використання має і свої недоліки: методика досить складна у виконанні через високу чутливість до змін у використовуваних матеріалах та реактивах. Крім того, результати AFLP часто важко відтворити, а для досягнення високої точності потрібні дуже якісні праймери (Sarwat, 2012; Robarts & Wolfe, 2014; Yu et al., 2018).

В плані систематики та філогенії морфологічні маркери мають здатність зберігати свою незмінність. Водночас їхнє використання ускладнюється відсутністю чітких результатів для статистичного аналізу та частими відмінностями у гомологічних параметрах. Як наслідок, це обмежує їхнє використання.

Ураховуючи, що маркери RFLP відіграють вагому роль у селекційних дослідженнях видів рослин, їхнім основним недоліком є обмежена ефективність у визначенні генотипів із низьким ступенем спорідненості та вагома складність проведення відповідних досліджень (Wunsch & Normaza, 2002). Цей вид маркерів використовували для генотипування колекції *Pennisetum purpureum* (перистого проса) з метою оцінки генетичного різноманіття, гетерозиготності та виявлення гібридизації.

Було встановлено, що маркери RAPD та RFLP мають відповідні обмеження щодо застосувань. Це спонукало дослідників до створення нових, альтернативних систем маркерів, наприклад AFLP та мікросателітних маркерів SSR. Порівняно з іншими типами, ці типи маркерів виокремлюються високою надійністю та результативністю у філогенетичних дослідженнях за рахунок своєї варіабельності та ефективної відтворюваності результатів. Крім того, AFLP, так і SSR-маркери забезпечують всебічне охоплення геному. Це підвищує ймовірність того, що отримані дані та побудовані філогенетичні дерева будуть відображати справжню еволюційну міжвидову спорідненість, а не лише подібність окремих ознак (Golczer et. al., 2015).

Для покритонасінних рослин, що мають гібридне походження, у багатьох досліджень із філогенії при аналізі 5S рДНК використовують метод графічної кластеризації RepeatExplorer (Garcia et al., 2020; Vozárová et al., 2021a).

1.1.2. Застосування ITS послідовностей при ДНК-баркодингу.

Баркодування ДНК є важливим у використанні щодо заходів по збереженню рідкісних видів та ендеміків (Safhi et. al., 2023), а саме для збереження видового різноманіття, що перебуває під загрозою через антропогенні чинники (Saddhe, & Kumar, 2018).

Внутрішній транскрибований спейсер є одним із провідних маркерів для ДНК-баркодингу, оскільки є ефективним для визначення певних таксонів, так і для аналізу сумішей видів для зразків із навколишнього середовища (“екологічний ДНК-баркодинг”) (Nilsson et. al., 2009).

Для достовірності результатів при баркодингу рослин, окрім основних ДНК-штрихкодів залучаються також ще і додаткові молекулярні маркери, наприклад ITS (Saddhe & Kumar, 2018). Використання послідовностей ITS з метою видової ідентифікації рослин є корисним для тих представників, які в ході еволюції втратили свої пластидні геноми. Зокрема це голопаразитичні рослини та деякі зелені водорості (Molina & Hazzouri et. al., 2014)

Таким чином, послідовність ITS1-ITS2 використовується також для баркодування ядерних послідовностей та ДНК-баркодингу судинних рослин (China Plant BOL Group 1 et al., 2011; Kolter & Gemeinholzer, 2021).

Перевагою використання даних послідовностей в ролі генетичного штрихкоду обумовлена високою мінливістю міжгенних спейсерів, що дозволяє чітко розрізнити тісно споріднені види або окремі рослинні популяції (Volkov et al, 2010; China Plant BOL Group 1 et al, 2011; Simon et al, 2012).

Водночас, є припущення про наявність недоліків щодо широкого застосування ITS як головного додаткового баркодуючого маркера для

ідентифікації рослин. Найчастіше, пара праймерів може помилково ампліфікувати грибкову ДНК за її наявності.

Проведення сиквенування методом Сенгера має суттєвий недолік. Так, у одного виду може бути кілька потенційно відмінних копій ITS області, що ускладнює отримання вичерпної інформації та достовірних результатів. При сильній деградації області ITS, відновлення послідовностей є доволі складним процесом (Fazekas & Kuzmina et. al. 2012).

Ампліфікація маркерів методом ПЛР може певною мірою змінити результати у дослідженнях, пов'язані з баркодингом (Tedesoo et al., 2018). Це може статися при умові що ДНК-шаблони будуть мати низьку кількість GC, або вони є коротшими послідовностями (Benjamini & Speed, 2012; Ihrmark et al., 2012).

Підбір праймерів та маркерів також впливає на те, які таксони будуть першочергово ампліфікуватися або не будуть взагалі (Tedesoo & Lindahl, 2016; Nilsson et al., 2019). Якщо в ході дослідження застосовуються дегенеровані праймери, велика кількість циклів ПЛР може призвести до ампліфікації тих шаблонів, що відповідають ще не виснаженим праймерам (Lindahl et al., 2013).

1.2. Вивчення та характеристика представників роду *Heracleum*

1.2.1. Загальна характеристика *Heracleum sphondylium*.

Heracleum sphondylium (борщівник звичайний) – багаторічна полікарпічна рослина-гемікриптофіт (Rabotnov, 1956; Sheppard, 1991). Залежно від середовища проживання, висота квітконосного пагона може сягати до 3 метрів. Наявне порожнисте стебло з волосками, особливо біля її основи. Листки дуже мінливі за формою та розміром: від простих (підвид *Pyrenaicum*) до потрійних і перисторозсічених, зазвичай густо волосистих з обох боків. Така мінливість у поділі листків часто спостерігається серед особин однієї популяції (Gawłowska, 1961; Brummitt, 1971; Zych, 2003).

Поширення *H. sphondylium* охоплює більшість країн Європи, за винятком дальньої півночі, а також окремі регіони Середземномор'я та деякі атлантичні та середземноморські острови (Brummitt, 1968; Sheppard, 1991). На території Європи розповсюдження борщівника переважає у районах із середньою кількістю опадів, від 700 до 5000 мм, та середньорічною температурою від 5 до 15 °C (Sheppard, 1991).

Деякі автори стверджують про поширення на Центральну та Північну Азію, включаючи Японію, та Північну Америку (Hiroe & Constance, 1958; Brummitt, 1968; Sheppard, 1991; Meades & Meades, 2019). Водночас, такі твердження є ймовірно помилковими, внаслідок помилкової ідентифікації та синонімізації *H. sphondylium* з такими видами, як *H. lanatum* Michx. (Азія та Північна Америка), *H. moellendorffii* Hance (Азія) та *H. maximum* Bartr. (Північна Америка) (Brummitt, 1971). Незважаючи на морфологічну подібність, представлені таксони філогенетично відрізняються (Logacheva et al., 2008; Yu et al., 2011).

Подібно до інших представників роду, корені, стебла та насіння у *H. sphondylium* мають здатність накопичувати фуранокумарини та ефірні олії, серед яких переважають моно- та сесквітерпени, а також фенілпропаноїдні сполуки (Matarrese & Renna, 2023). Серед фуранокумаринів переважають бергаптен, імператорин, сфондин, ксантотоксин та ізопмпінелін (Ode et al., 2004). Деякі із фуранокумаринів, які борщівник синтезує для захисту від патогенів та травоядних тварин, також мають здатність виявляти фототоксичні властивості. У поєднанні з впливом сонячних променів дані сполуки можуть провокувати фітодерматити у тварин та людини (Melough et al., 2018). Такі випадки характерні переважно для гігантських борщівників (*H. mantegazzianum*, *H. persicum* або *H. sosnowskyi*). Проте, враховуючи факт, що концентрація фуранокумаринів у *H. sphondylium* вища, порівняно із гігантськими борщівниками, були зареєстровані випадки фітодерматиту, коли людська шкіра, контактуючи із соком рослини, піддавалась ушкодженню ультрафіолетовим випромінюванням (Paathak et al., 1962).

1.2.2. Вплив інтродукції *Heracleum mantegazzianum* на навколишнє середовище.

Вплив інтродукуючих рослин на процеси та властивості екосистеми, супроводжується впливом на структуру та склад місцевих рослинних угруповань (Levine et al., 2003; Wolfe & Klironomos, 2005; Hejda et al., 2009; Ehrenfeld, 2010; Pyšek et al., 2012). Також на сьогоднішній день недостатньо вивчено, чи механізми, що сприяють домінуванню інвазійних видів, пов'язані з механізмами скорочення чисельності інших місцевих популяцій (Allison & Vitousek, 2004). Зниження видового різноманіття серед рослин та зміна складу рослинних угруповань, тісно пов'язана з механізмами після вторгнення інвазійного виду. Зокрема, як приклад, зміна мікробного складу у ґрунтах або зміною частоти пожеж (Levine et al., 2003).

Борщівник Мантегацці (*Heracleum mantegazzianum*) - окружкова, монокарпічна, багаторічна рослина, що походить із Західного Великого Кавказу. З часом вона інтродукувалась у низці європейських країн (Tilley et al., 1996; Pyšek et al., 2007b, 2008), Канаді (Page et al., 2006) та США (Kartesz & Meacham, 1999). Цей вид здатний утворювати великі зарості, що може загрожувати видовому різноманіттю інших рослин (Pyšek & Pyšek, 1995; Pergl et al., 2006; Thiele & Otte, 2007; Hejda et al., 2009). Рослина багата на вторинні метаболіти, що виконують функцію захисту від трав'яїдних тварин (Berenbaum, 1981; Hattendorf et al., 2007), та слугують механізмом захисту від патогенних мікроорганізмів (Ivie, 1978; Fischer et al., 1978). Її інвазійність обумовлена алелопатичним ефектом (Myras & Junttila, 1981), але ймовірно, алелопатія має менше значення для інвазійності борщівника (Wille et al., 2013).

Чеськими науковцями було проаналізовано, яким чином інтродукція *Heracleum mantegazzianum* в різних проміжках часу, буде впливати на біологічні та хімічні характеристики ґрунту, порівняно з ділянками, що не підлягали впливу борщівника.

Вторгнення *H. mantegazzianum* певним чином вплинуло на кислотність ґрунту, зробивши його менш кислим, порівняно з ділянками, де не відбулась інтродукція. Рівень рН ґрунту (KCl) був вищим (5.67 ± 0.10) порівняно з незайманими ділянками (5.07 ± 0.21).

Значення щільності фотосинтетичного активного випромінювання (ΔPAR) у заростях борщівника в середньому знизився на 56%, порівняно з ділянками за його відсутності. Такі зміни суттєво залежали від часової тривалості інвазії. Зокрема, на ділянках, інтродукованих протягом 11 років показник ΔPAR значно падав. Водночас він збільшувався на ділянках, з більш тривалим терміном інтродукції. Такі результати узгоджуються, з іншими задокументованими результатами, що демонструють зниження рівня освітленості як наслідок поширення інвазійних видів рослин (Standish et al., 2001; Reinhart et al., 2006).

Співвідношення грибів та бактерій в досліджуваних зразках протягом 28 років вторгнення борщівника значно збільшувалось, проте з часом це співвідношення почало стрімко падати, посиляючись на агресивне поширення борщівника.

На видове різноманіття популяцій інших видів, досліджуване в польових умовах, здебільшого впливали два фактори: зменшення видового різноманіття що зменшувалось із зменшенням кислотності ґрунту (KCl), та збільшувалось із зростанням показника ΔPAR .

Існують декілька ознак, що можуть відокремлювати *H. mantegazzianum* від інших місцевих видів рослин, за рахунок яких, вони можуть сприяти змінам спостережень в екосистемі. Спочатку, жоден місцевий вид не досягає такої великої біомаси: із стеблами у 200-500 см в висоту та листками у 250 см у довжину, що робить *H. mantegazzianum* однією із найбільших дводольних рослин у Європі (Tilley et al., 1996), обмежуючи доступ до сонячних променів для місцевих видів.

По-друге, борщівник після інтродукції на нові ділянки займає домінуюче положення, покриваючи до 75% площі вторгнення (Dostál et al.,

2013). Це за рахунок того, що борщівник є монокарпною та глибокореневою рослиною у якої домінує вегетативне розмноження, в той час як ділянки, що не зазнали інвазії, домінуються переважно клональними багаторічними злаками (наприклад, *Dactylis glomerata*, *Festuca spp.*, *Poa spp.*). Такі зміни в життєвому циклі, ймовірно пов'язані з різною швидкістю розкладу рослинних відходів, відмінностями у філогенії чи розподілі поживних речовин, хоча прямі дослідження щодо цих процесів у домінуючих місцевих популяцій, так і для борщівника, наразі не проводились.

До того ж, *H. mantegazzianum* здатен синтезувати велику кількість вторинних метаболітів, зокрема флавоноїди, фуранокумарини та ефірні олії, що ймовірно для деяких інвайзійних екосистем є новизною (Tiley et al., 1996; Hattendorf et al., 2007). Такі відмінні риси, а й можливо і інші, могли призвести до змін ґрунтового біорізноманіття.

Також результати науковців свідчать, що видалення борщівника із біоценозу попри можливі складнощі, які пов'язані із високим потенціалом поширеності насіння (Moravcová et al., 2006), можуть покращити доступ до освітленості місцевих популяцій, сприяючи відновленню різноманіття нативних видів рослин. На відміну із світлових умов, відновлення ґрунтового різноманіття після видалення борщівника може бути ускладненим, ймовірно продовжить остаточне відновлення місцевих біоценозів (Zavaleta et al., 2001; Elgersma et al., 2011).

1.2.3. Небезпека інвазії *Heracleum sosnowskyi*.

Види, що були штучно перенесені внаслідок діяльності людини в нові середовища зростання та мають здатність інтенсивно поширюватись, порушуючи біоценоз та людське здоров'я, функціонують за рахунок нових екологічних та генетичних умов (Prentis et al., 2008). Тому вивчення генетичного різноманіття, та еволюційних процесів, таких як дрейф генів, адаптація та гібридизація є основою у вивченні причин інвазії (Lee, 2002; Bock

et al., 2015; Hodgins et al., 2018).

Борщівник Сосновського (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) – небезпечна отруйна рослина з родини *Apiaceae*. Є багаторічною, інтродукованою та карантинною рослиною на території України та Європи, проти якої ведеться активна боротьба відносно її поширення (<https://uk.wikipedia.org/wiki>). Цей інвазійний вид був завезений із Кавказького регіону як силосна рослина для рогатої худоби (Jakubska-Busse et al., 2013). Проте з часом було виявлено, що вирощування борщівника в якості кормової культури є недоречним та ускладненим, через високий вміст відповідних фуранокумаринів. Після ліквідації колгоспів, сільські угіддя, що вже не використовувались, дозволили *H. sosnowskyi* інтенсивно поширюватись на необроблювальні землі, узбіччя доріг, садові ділянки та лісові масиви (Baležentienė & Bartkevičius, 2013a; Egorov et al., 2020). Інвазійність цього виду пояснюється його поширенням на значні території та витісненні інших видів рослин (Baležentienė & Bartkevičius, 2013a). *H. sosnowskyi* демонструє швидкий ріст рослин та поширення на території, яке оцінюється в 60м на рік (Baležentienė & Bartkevičius, 2013a). Найбільш гострим питанням за останні десятиліття є поширення рослини у східноєвропейському регіоні, де була інтродукована у великих масштабах (Nielsen et al., 2005).

H. sosnowskyi, що заввишки близько трьох метрів, має здатність пригнічувати ріст та розвиток інших видів місцевих рослин. У місцях, де він інтродукувався, стає швидко домінуючою рослиною. Причини агресивного поширення борщівника та загроза видовому різноманіттю пов'язані з біологічними та екологічними властивостями рослини. Зміни місцевості, спричинені інтродукцією є вкрай негативними (Roshka et.al, 2024).

Фуранокумарини, що викликають опіки, у рослині здебільшого зосереджені в надземній частині, в листках та стеблі (Weryszko-Chmielewska & Chwil, 2012). Контактуючи із шкірою, цей вид здатен викликати фотохімічні опіки і як наслідок, спровокувати бульозний дерматит. Симптоматика включає в себе набряк, підвищенну температуру та почервоніння уражених ділянок

(Jakubowicz et al., 2012, Tanirbergenov et al., 2018). Ступінь симптомів залежить від глибини опіку та часу контакту із рослиною (Zdrojewicz et al., 2016). Також однією із властивостей фуранокумаринів є перешкодження процесам репарації та копіювання ДНК за дії ультрафіолетового випромінювання(Ebrahimi et al., 2023).

Дані сполуки широко розповсюджені серед рослинного світу та відіграють різні біологічні ролі та функції, як і з корисними, так і негативними наслідками (Ebrahimi et al., 2023). На сьогоднішній день, уся відома інформація поновлюється з різних баз даних в онлайн режимі, таких як: Google Scholar, ScienceDirect, Springer, Web of Science, Plant of the World Online і PubMed.

Наразі докладаються зусилля з метою зменшення поширення борщівника на великі території, зокрема з використанням гербіцидів та механічним видаленням рослин (Panasenko et al., 2013, Egorov et al., 2020), або більш радикальним методом, термічною обробкою (Ebrahimi et al., 2023).

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкт та матеріал для дослідження

Об'єктом досліджень слугували нуклеотидні послідовності ядерних ITS1-5,8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК різних популяцій *Heracleum sphondylium*, *H. carpaticum*, *H. sosnowskyi*.

Матеріалом для проведення досліджень були гербаризовані зразки представників роду *Heracleum*, що були зібрані з природних місць зростання на території України та Румунії. Серед загального пакету матеріалу було п'ять зразків, з невизначеною видовою належністю:

Таблиця 1.

Місця зростання видів роду *Heracleum*, використаних в роботі

Вид	Легенда	Місце збору
<i>H. carpaticum</i>	HeCar5	Івано-Франківська обл., Верховинський р-н, околиці селища Перкалаба.
<i>H. sphondylium</i>	HeSph1, HeSph6	Чернівецька обл., Путильський р-н, Чивчинські гори, г. Великий камінь
<i>H. sosnowskyi</i>	HeSos32	м. Чернівці, Садгірський р-н, Стара Жучка
<i>Heracleum spp.</i>	He29, He30, He31, He37, He38	м. Хмельницький; м. Хмельницький; Румунія; Кам'янець-Подільський; с. Сойми, Закарпатська обл. (відповідно)

Також для порівняльного аналізу ITS1-ITS2 були задіяні 20 повногеномних послідовностей різних представників роду *Heracleum*, що були взяті із бази даних GenBank :

Heracleum carpaticum (рис. 1) – вид квіткових рослин родини *Ariaceae*. Це багаторічна трав'яниста рослина 20–60 см заввишки. Стебло густо запушене, порожнисте, реберисте, зазвичай просте. Прикореневі листки серцеподібно-пальчасті, 5- або 7-лопатові, з пильчасто-зубчастими лопатями. Квітки яскраво-рожеві. Плоди яйцеподібні, 7–8 мм завдовжки, голі, тільки на ребрах іноді щетинно запушені. Поширені на території Румунії та України. В

Україні вид зростає на схилах у субальпійському й альпійському поясах - у Карпатах, звичайно (<https://uk.wikipedia.org/wiki>). Період цвітіння настає на червень-липень. У цей період його збирають в якості салату, із більш старого листя варять борщ та роблять пюре. Не являється інвазійним видом, є ендеміком Карпат, виражається низькою фототоксичністю. Зазвичай проростає на гірських та передгірських луках, на узліссі та долинах річок (рис. 1).

Таблиця 2.

Дані про види роду *Heracleum* з бази даних GenBank

Код	Назва виду	Автор
DQ427045.1	<i>Heracleum antasiaticum</i>	Logacheva et. al., 2008
DQ468077.1	<i>Heracleum asperum</i>	Logacheva et. al., 2008
EU594892.1	<i>Heracleum austriacum</i>	Zych, 2008
EU594893.1	<i>Heracleum carpaticum</i>	Zych, 2008
DQ427049.1	<i>Heracleum chorodanum</i>	Logacheva et. al., 2008
HQ686400.1	<i>Heracleum dissectifolium</i>	Li et.al, 2011
OL473021.1	<i>Heracleum dissectum</i>	Wang, 2021
MT359999.1	<i>Heracleum fargesii</i>	Wen,J., 2020
EU001372.1	<i>Heracleum forrestii</i>	He & Wang, 2007
HQ686407.1	<i>Heracleum franchetii</i>	Li et.al, 2011
FJ812111.1	<i>Heracleum hemsleyanum</i>	Yu & He, 2009
EU594923.1	<i>Heracleum lanatum</i>	Zych, 2008
EU594897.1	<i>Heracleum ligusticifolium</i>	Zych, 2008
HQ686415.1	<i>Heracleum moellendorffii</i>	Li et.al, 2011
HQ686460.1	<i>Heracleum oreocharis</i>	Li et.al, 2011
DQ427047.1	<i>Heracleum ponticum</i>	Logacheva et. al., 2008
EU594915.1	<i>Heracleum sphondylium</i>	Zych, 2008
EU594916.1	<i>Heracleum stevenii</i>	Zych., 2008
FJ812149.1	<i>Heracleum subtomentellum</i>	Yu & He, 2009
HQ686404.1	<i>Heracleum yungningense</i>	Li et.al, 2011



Рис. 1. *Heracleum carpathicum*

Борщівник звичайний (*Heracleum sphondylium* L.) – трав'яниста, багаторічна дикоросла рослина, що походить з Європи та Азії, є дикорослою рослиною що поширена на пасовищах, луках, на узбіччях доріг, пустирях та залізничних насипах (рис. 2). Зустрічається на території Європи, Азії та Північної Африки (Senejoux & Demougeot, 2013).

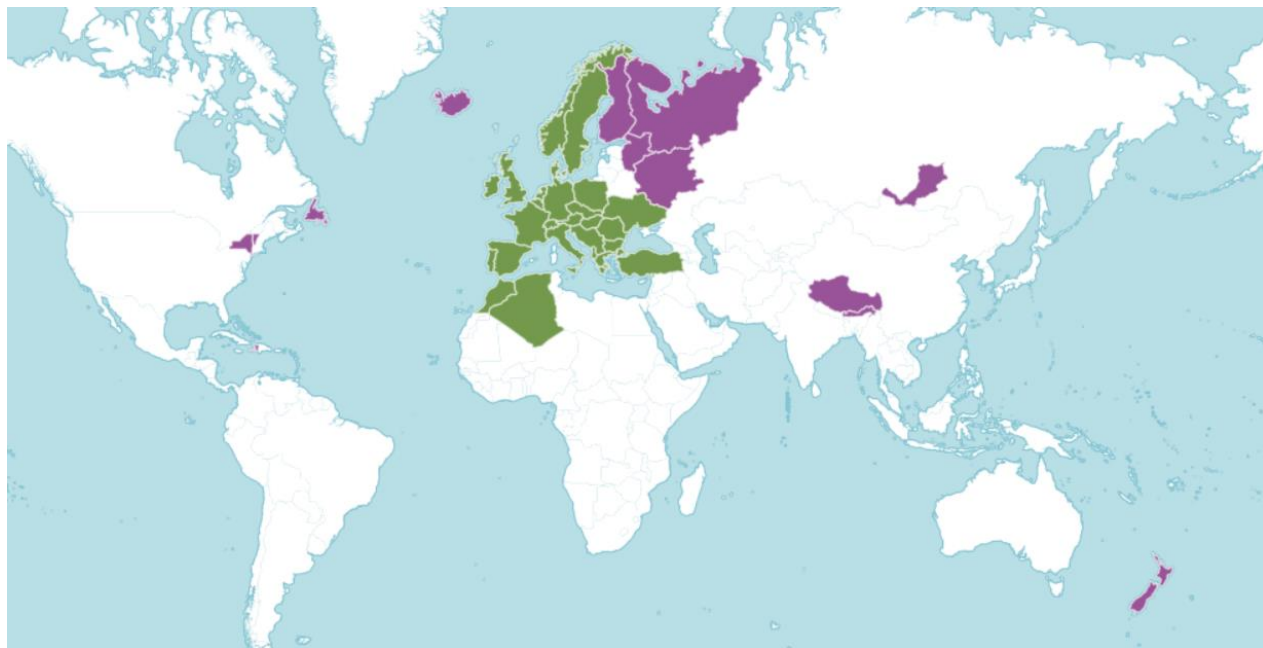


Рис. 2. *Heracleum sphondylium*

Зазвичай, *H. sphondylium* зростає на родючих, глинистих, алювіально-лугових ґрунтах з рН 6-7 та відсутній на крейдових та вапнякових ґрунтах, долериті та базальті. В умовах сільського господарства (пасовища та луки), NPK-добрива збільшують чисельність борщівника. Рослина має високий

діапазон толерантності до атмосферної солоності, вологості та впливу вітру, а також доволі низькі вимоги до освітлення (Sheppard, 1991).

Світове поширення видів *H. carpaticum* (А) та *H. sphondylium* (Б) наведені на рис. 3



А



Б

Рис. 3. Ареал поширення видів *H. carpaticum* (А) та *H. sphondylium*
(<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:843179-1>)

У деяких частинах світу даний вид рослин застосовували у їжу, наприклад у борщ. Його готували із стебел, листя та парасольок борщівника. Також повідомляються випадки про додавання борщівника в якості інгредієнту лікеру у Франції та харчової добавки серед азійських країн (Işcan et.al., 2003). Окрім цього, даний вид використовувався у традиційній медицині як засіб від проблем із травленням, заспокійливий, судиннорозширювальний та антигіпертонічний засіб (Uysal et.al., 2019).

2.2. Методи дослідження

Виділення ДНК

Із гербарних зразків екстракцію ДНК здійснювали за допомогою цетавлонового методу з осадженням згідно пропису:

1. Наважку: 0,3-0,4 г рослинного матеріалу заморожують з використанням рідкого азоту, розминають в ступці і, не даючи розморозитися, додають підігрітий до 65°C буфер для лізису, що містить: 10% цетавлон, 1 М трис-НСІ (рН 8,0), 0,5 М ЕДТА, 5 М NaCl, протеїназа (20 мкл на 3-4 мл), 0,1% β-меркаптоетанол.
2. Лізис: здійснюють на водяній бані за 60°C протягом 2 год.
3. Потім додають до лізату рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), пробірки струшують і центрифугують за 13000 g, 5 хв.
4. Надалі використовують супернатант, до якого додають 0,6 об'єму попередньо охолодженого ізопропанолу та залишають на 10 хв. при -20°C для утворення осаду, який концентрують за допомогою центрифугування протягом 10 хв. при 13000 g.
5. Осад очищають 80% етанолом, центрифугують при 13000 g протягом 5 хв., сушать за кімнатної температури до зникнення запаху етанолу.
6. Осад розчиняють у 100 мкл буферу TE (10 mM трис-НСІ, 1 mM ЕДТА) .

Оцінюють чи якісно були виділені зразки за допомогою електрофорезу у 1% агарозному гелі, а кількість – завдяки вимірювання оптичної густини

розчину при довжині хвилі 260 нм (1 од. – 50 нг ДНК) на спектрофотометрі СФ-46 (Ломо, СРСР).

Електрофорез ДНК в агарозному гелі

1. Використовують для електрофорезу 1×TBE буферну систему (трис-борат ЕДТА: 0,089 М трис, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА, рН 8.0).
2. Аналіз геномної ДНК здійснюють на агарозному гелі концентрацією 1%, а для аналізу ПЛР-продуктів та продуктів рестрикції – 2%. До визначеної кількості агарози додають 30 мл 1× TBE і нагрівають в МХП (5-7 хв за потужності 300-450 Вт) до повного розчинення агарози.
3. Охолоджують розчин до температури 50-55°C.
4. Розчин агарози заливають у форму для електрофорезу та вставляють гребінку.
5. Після того як, агароза застигла та охолола форму поміщають в камеру для проведення електрофорезу та заливають 1×буфером TBE так, щоб гель був повністю покритий буфером на 2-3 мм.
6. Обережно, щоб не пошкодити лунки, витягують спейсери та гребінку.
7. Готують проби для нанесення. Для цього до буферу для нанесення додають розчинену ДНК (1×TE, 50% гліцерин, 0,25% розчин бромфенолового синього). Співвідношення об'єму проб і буферу – 5:1.
8. Вносять проби ДНК на гель у лунки під буфер.
9. Як ДНК-маркер використовують GeneRuller DNA Leader Mix, SMO 3310, 1 mg DNA/ml (Thermo scientific) та BS II KS (+) / Msp I.
10. Приєднують прилад для електрофорезу до блоку живлення.
11. Електрофорез здійснюють при напруженості поля 5 V/см², так щоб головний барвник дійшов майже до кінця гелю.
12. Після закінчення електрофорезу, забарвлюють гель у 200 мл 1× буферу TBE із бромистим етидієм в концентрації 10 мг/мл.
13. Щоб візуально побачити ДНК, гель переносять на скло трансільюмінатора та в ультрафіолетовому світлі фотографують ДНК.
14. Квантифікацію ДНК проводять за допомогою програмного забезпечення

приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, PCR)

Для ампліфікації ITS1-5,8S рРНК-ITS2 послідовності 35S рДНК застосовували специфічні праймери, у яких присутні комплементарні до кодувальних ділянок генів 18S та 26S рРНК відповідно мотиви (табл. 3).

Таблиця 3.

Праймери, використані для ПЛР-ампліфікації

Позначення праймера	Напрямок праймера	Послідовність
ITS-Fd-TC	Прямий	5'-TCACCTGCGGAAGGATCATTGTCG-3'
ITS-Rev-TC	Зворотний	5'-TCCCCCGCCTGACCTGGGGTC-3'
ITS-Fd-TT	Прямий	5'-TTACCTGCGGAAGGATCATTGTCG-3'
ITS-Rev-TT	Зворотний	5'-TTCCCCGCCTGACCTGGGGTC-3'

Компоненти для проби додають у певній послідовності, відображені в таблиці 4.

Таблиця 4.

Компоненти	Об'єм, мкл
H ₂ O, бідистильована	4,2
MyTaq™ HS Red Mix 5 x	7,44
Priimer Fd	0.18
Primer Rev	0.18
Препарат ДНК (10 ng)	3
Загальний об'єм реакційної суміші	15

Температурний профіль реакції був наступним:

Кількість циклів ПЛР – 35.

- 1) Активація полімерази при 95°C протягом 2 хвилин
- 2) Денатурація ДНК при 95°C, 20с.
- 3) Гібридизація праймерів при 63°C, 20с.
- 4) Елонгація ДНК при 72°C, 35с.
- 5) Фінальна елонгація при 72°C, 1хв.

6) Охолодження до 12°C.

Для перевірки на вміст продуктів ПЛР проводять електрофоретичний аналіз в агарозному гелі 2% концентрації.

Очистка ПЛР-продуктів

1. До ПЛР-продуктів додають рівну кількість суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), інтенсивно збовтують та центрифугують 5 хв при 13000 g.
2. Опісля працюють з супернатантом у мікропробірці: додають 3 об'єми 96% етанолу залишають суміш на 20-30 хв. для утворення осаду при $t = -20^{\circ}\text{C}$ і центрифугували 8 хв. 13000 g.
3. Осад промивають 50 мкл 80% етанолу, та центрифугують 2 хв за 13000 g.
4. Осад сушать 20-25 хв при $t = 55^{\circ}\text{C}$.
5. Осад розчиняють в 10-12 мкл бідистильованої води.

Сиквенування та аналіз сиквенсів

ПЛР-продукти ядерної ДНК сиквенували на фірмі Genewiz, Німеччина. Первинну обробку та аналіз фрагменту, що був отриманий, здійснювали за використання комп'ютерної програми FASTP та пакетів програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR, Lasergene 14.

Суть методу Illumina

Суть цього методу сиквенування зводиться до визначення послідовності ДНК шляхом паралельного зчитування численних коротких фрагментів. Довгі фрагменти ДНК, що підлягають зчитуванню певним чином фрагментуються на короткі фрагменти, зазвичай 100-150 нп. До обох кінців кожного фрагмента, при'єднуються адаптери, що необхідні для закріплення фрагментів на поверхні для ампліфікації. Фрагменти ДНК з адаптерами закріплюються на проточній комірці, яка покрита олігонуклеотидами, комплементарні до адаптерів. Завдяки поступовому приєднанню кожен фрагмент зчитується повністю. На основі отриманих даних, за допомогою комп'ютерних програм можна відтворити послідовність ДНК повністю.

Збирання повторів ITS1-5,8SpPHK-ITS2 із Illumina підів

Асемблінг повних ділянок послідовностей ITS1-5,8SpPHK-ITS2 *de novo* видів *H. carpaticum*, *H. sphondylium* та *H. sosnowskyi* проводили, використовуючи гербарні зразки з природніх місць зростання та п'ять видів із видовою неналежністю. У подальшому ці послідовності, тобто так звані бібліотеки сиквенсів, використовували як вихідні бази даних для обробки програмою SeqMan NGen з пакету Lasergene 14, за допомогою якої власне здійснювали асемблінг. Параметри, які задавали під час запуску програми були наступні наступні: mer size – 21, minimum match percentage – 97%. Серед отриманих контігів обирали такі, що виявляли найвище покриття. В подальшому, отримані контіги, анотували та аналізували за допомогою програми Megalign (Clustal W метод).

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз нуклеотидних послідовностей ITS1-5,8SpPHK-ITS2 ділянки 35S рДНК представників роду *Heracleum* з бази даних Genbank

Розповсюдження інвазійних видів рослин є однією із найбільших екологічних і соціально-економічно важливих проблем (Vitousek et al. 1996). Інвазійні види здатні створювати доволі стійкі популяції в навколишньому середовищі (Richardson et al., 2011), та за рахунок швидкого поширення, завдавати збитків видовому різноманіттю, що супроводжується економічними витратами (Marais et al., 2008; Angulo et al., 2021; Haubrock et al., 2021).

Рід *Heracleum* належить до родини *Apiaceae*, представники цього роду поширені в багатьох частинах світу (Pergl & Perglová, 2006). Центрами найбільшого видового різноманіття його представників є Китай, де зростають 29 видів, та Кавказ, де зростають 26 видів. У певний період кілька видів роду *Heracleum* були інтродуковані на територію Європи в якості декоративної та кормової рослини (Jahodová et al., 2007b; Anibaba et al., 2022).

Попри високу токсичність, *H. sosnowskyi* розглядається науковцями як потенційно лікарська рослина. Підставою для цього є наявність в борщівниках фуранокумаринів. Дані сполуки входять до складу багатьох лікарських препаратів, оскільки виявляють заспокійливу, кардіостимулювальну, протитуберкульозну, а також дерматопротекторну дії (Комісаренко, 1995).

Водночас, інтродуковані в нові середовища зростання людиною, що набули інвазійного потенціалу, можуть надзвичайно негативно впливати на нові біоценози та людське здоров'я (Prentis et al., 2008). Отже існує нагальна потреба вивчення їх генетичного різноманіття та еволюційних процесів, що становлять основу виникнення інвазії (Lee, 2002; Bock et al., 2015; Hodgins et al., 2018).

Широкі можливості розкриття молекулярних основ і розуміння природи явища інвазії сьогодні відкриваються завдяки розробці нових методів аналізу.

Наразі для аналізу геному та ідентифікації гібридних та батьківських форм рослин широко застосовуються різноманітні молекулярні маркери (Yu et al., 2011; Eidi et al., 2021). Зокрема ті, що локалізовані у ядерному геномі (Eidi et al., 2019). У зв'язку з цим, було вирішено охарактеризувати послідовності ITS1-5,8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК.

На першому етапі проведення досліджень для отримання більш глибокої характеристики послідовності нами було проаналізовано 20 повногеномних послідовностей ITS1-5,8S рРНК-ITS2, наявних у базі даних Genbank. Для опрацювання зібраних даних використовували програмне забезпечення MegAlign із пакету програм Lasergene 14. На загальне було отримано консенсусну послідовність розміром 606 нп. В ній наділі ідентифікували області, що належать окремим ділянкам ITS1-5,8S рРНК-ITS2 послідовності 35S рДНК. Було з'ясовано, що першу спейсерну область формують 218, ген 5.8S рРНК – 164, а другу спейсерну – 224 нп. Нуклеотидні послідовності кожної із проаналізованих ділянок, не виключаючи кодувальну область, були виявлені точкові мутації. Слід зауважити, що послідовності спейсерних областей містять набагато більше різноманітних SNP, порівняно з власне областю гену, що є закономірним.

Щодо фрагменту ITS1, найбільшу увагу до себе привертає спейсерна ділянка в діапазоні у діапазоні 70-80 нуклеотидних пар консенсусної послідовності. В цій області майже у половини порівнюваних зразків виявили SNP. В цілому їхня кількість у ITS1 є незначною, порівняно з другою спейсерною ділянкою (рис. 4). На загальне, виходячи з різних можливих варіантів модифікацій нуклеотидної послідовності (транзицій / трансверсій / інделів), ми виявили наступні SNP: наявність тиміну – вісімнадцять подій, цитозину – тринадцять, аденіну – вісім і п'ять гуаніну. В основі переважної кількості виявлених відмінностей лежать трансверсії. Більшість із них пов'язана із замінами $C \leftrightarrow T$, що узгоджується з літературними даними, оскільки відомо про залучення у даний процес метилування / деметилування залишку азотистої основи.

Majority	GGTCCCC-TGTTA	GC-GAAACCCCTGGTAGGTGGCCTCCCTTTTTTGGGG
	-----+-----+	-----+-----+-----+
	70 80	90 100 110
H_antasiaticum	-.....	C.....
H_asperum	-.....	
H_austriacum	-.....	T.....C.....
H_carpaticum	-.....	A.....C.....
H_chorodanum	T-.....	C.....T.....
H_dissectifolium	-.....	
H_dissectum	-A.....	A.....
H_fargesii	-.....	
H_forrestii	T-.....	
H_franchetii	C.....	
H_hemsleyanum	-.....	
H_lanatum	-A.....	A.....
H_ligusticifolium	-.....	C.....
H_moellendorffii	T-.....	
H_oreocharis	-.....	
H_ponticum	-.....	
H_sphondylium	T-.....	C.T.....
H_stevenii	-.....	T.C.....
H_subtomentellum	-.....	C.....
H_yungningense	C.....	

Рис. 4. Фрагмент міжгенного спейсеру ITS1 ділянки 35S рДНК із найбільшим вмістом SNP видів роду *Heracleum*

Кодувальна ділянка містить власне інформацію нуклеотидну послідовність гену 5,8S рРНК. Враховуючи важливість збереження її сталості, такі області жорстко контролюються в ході еволюційного процесу. Водночас, і в таких областях можуть виникати поодинокі точкові мутації. При порівняльному аналізі цієї ділянки для чотирьох видів нами було виявлено по одній одонуклеотидній заміні в кодувальній області (рис. 5).

Majority	GCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCAI
	-----+-----+-----+-----+
	340 350 360 370 380
H_antasiaticum	
H_asperum	
H_austriacum	A.....
H_carpaticum	
H_chorodanum	
H_dissectifolium	
H_dissectum	
H_fargesii	T.....
H_forrestii	
H_franchetii	T.....
H_hemsleyanum	
H_lanatum	
H_ligusticifolium	
H_moellendorffii	
H_oreocharis	
H_ponticum	
H_sphondylium	
H_stevenii	
H_subtomentellum	
H_yungningense	T.....

Рис. 5. Фрагмент нуклеотидної послідовності гену 5.8S рРНК видів роду *Heracleum*

В ході аналізу спейсерної ділянки ITS2 було встановлено, що в даній ділянці було виявлено найбільшу кількість SNP порівняно з іншими ділянками (рис.6). Це свідчить про високий ступінь генетичної варіабельності даної ділянки рибосомальної РНК. Цікавим фактом є те, що однонуклеотидні заміни є спільними для різних видів одного роду. Така повторюваність SNP свідчить про ймовірні спільні еволюційні зв'язки або спільні мутації, що могли закріпитись у філогенезі.

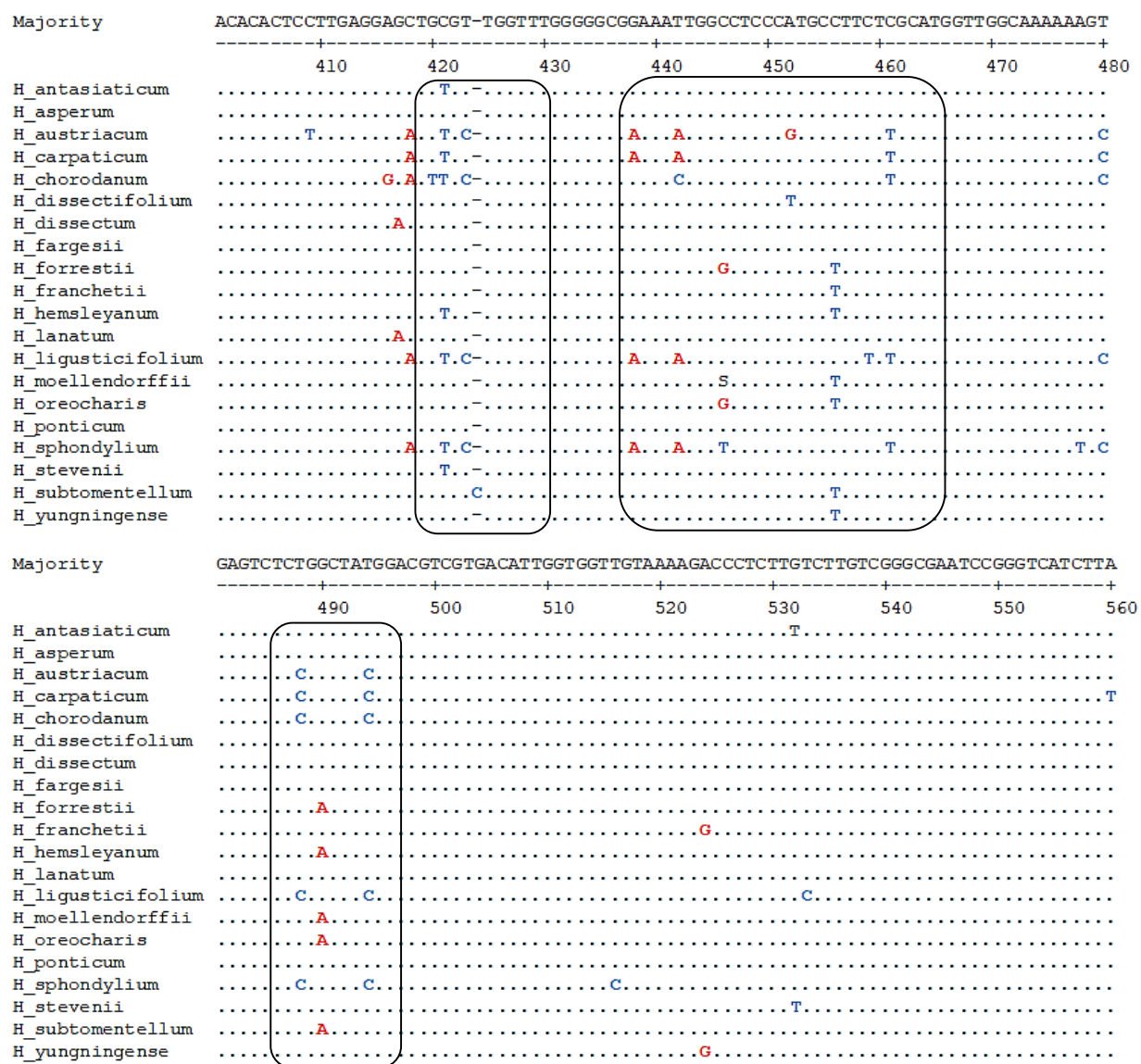


Рис. 6. Фрагмент нуклеотидної послідовності міжгенного спейсеру ITS2 ділянки 35S рДНК видів роду *Heracleum*

Як видно з представлених результатів, у даній області спостерігаються часті пуринові SNP A→G та G→A заміни. Транзиції даного типу є поширеними

формами мутаціями, порівняно із трансверсіями, такі мутації є менш деструктивними і часто не призводять до сильних структурних змін.

Під час дослідження була встановлена певна закономірність: спейсерна ділянка ITS2 є більш мінливим порівняно із першою. Особливість такої мінливості може свідчити про еволюційну пластичність ITS2 та ймовірний потенціал її використання як дієвого молекулярного маркера для ідентифікації близькоспоріднених таксонів і вивчення внутрішньо- та міжвидової гібридизації видів.

Згодом, з використанням відповідного програмного забезпечення, була розрахована ступінь подібності між досліджуваними зразками (табл. 5) та побудоване філогенетичне дерево (рис. 6). Показники показали високий ступінь подібності, що свідчить про високу консервативність послідовностей, з мінімальним показником 95,5%. Дві пари видів *H. lanautm* і *H. dissectum* та *H. franchetii* і *H. yungningense* показали стовідсоткову подібність, що свідчить про близькоспорідненість цих видів або нещодавнє розходження цих таксонів.

Табл. 5.

Ступінь подібності (%) ITS1-5,8SpPHK-ITS2 області 35S рДНК
видів роду *Heracleum*

<i>H. asperu</i> m.	<i>H. austriac</i> um.	<i>H. carpat</i> um.	<i>H. choroda</i> num.	<i>H. dissectif</i> olium.	<i>H. dissectu</i> m.	<i>H. fargesii.</i>	<i>H. forrestii.</i>	<i>H. franchet</i> ii.	<i>H. hemsley</i> anum.	<i>H. lanatum</i> .	<i>H. ligustici</i> folium.	<i>H. moellen</i> dorffii.	<i>H. oreocha</i> rls.	<i>H. ponticu</i> m.	<i>H. sphond</i> ylium.	<i>H. stevenii.</i>	<i>H. subtom</i> entellum.	<i>H. yungnin</i> gense.	Представники роду <i>Heracleum</i>
99.2	96.2	97.5	97.2	98.7	98.5	99.0	98.7	98.8	99.2	98.5	97.3	98.7	98.8	99.3	96.7	99.8	99.0	98.8	<i>H. antasiaticum.</i>
***	96.0	97.3	97.0	99.2	99.0	99.5	99.2	99.3	99.3	99.0	97.2	99.2	99.3	99.8	96.5	99.0	99.5	99.3	<i>H. asperum.</i>
	***	97.8	96.7	95.7	95.3	95.8	95.5	95.7	96.0	95.3	97.8	95.5	95.8	96.2	97.2	96.0	95.8	95.8	<i>H. austriacum.</i>
		***	97.7	96.8	96.7	97.2	96.8	97.0	97.3	96.7	98.8	96.8	97.0	97.5	98.2	97.3	97.2	97.0	<i>H. carpaticum.</i>
			***	96.5	96.3	96.8	96.8	96.7	97.0	96.3	97.8	96.8	96.7	97.2	97.5	97.0	96.8	96.7	<i>H. chorodanum.</i>
				***	98.5	99.0	98.7	98.8	98.8	98.5	96.7	98.7	98.8	99.3	96.3	98.5	99.0	98.8	<i>H. dissectifolium.</i>
					***	98.8	98.5	98.7	98.7	100.0	96.5	98.5	98.7	99.2	95.8	98.5	98.8	98.7	<i>H. dissectum.</i>
						***	99.0	99.5	99.2	98.8	97.0	99.0	99.2	99.7	96.3	98.8	99.3	99.5	<i>H. fargesii.</i>
							***	99.2	99.5	98.5	96.7	99.8	99.8	99.3	96.5	98.5	99.7	99.2	<i>H. forrestii.</i>
								***	99.3	98.7	96.8	99.2	99.3	99.5	96.2	98.7	99.5	100.0	<i>H. franchetii.</i>
								***	98.7	97.2	99.5	99.7	99.5	96.5	99.0	99.8	99.3	99.3	<i>H. hemsleyanum.</i>
									***	96.5	98.5	98.7	99.2	95.8	98.5	98.8	98.7	98.7	<i>H. lanatum.</i>
										***	96.7	96.8	97.3	98.3	97.2	97.0	96.8	96.8	<i>H. ligusticifolium.</i>
											***	99.7	99.3	96.5	98.5	99.7	99.2	99.2	<i>H. moellendorffii.</i>
												***	99.5	96.3	98.7	99.8	99.3	99.3	<i>H. oreocharis.</i>
													***	96.7	99.2	99.7	99.5	99.5	<i>H. ponticum.</i>
														***	96.5	96.3	96.2	96.2	<i>H. sphondylium.</i>
															***	98.8	98.7	98.7	<i>H. stevenii.</i>
																	***	99.5	<i>H. subtomentellu</i> <i>m.</i>

На філогенетичному дереві (рис. 7), можна побачити що найбільш еволюційно віддаленим серед аналізованих видів виявився *H. austriacum*. Він формує сестринську гілку по відношенню до решти досліджуваних зразків, що свідчить про раннє відгалуження від спільного предка. Види *H. carpaticum* та *H. sphondylium* формують окремий кластер, що розміщений на інших гілках.

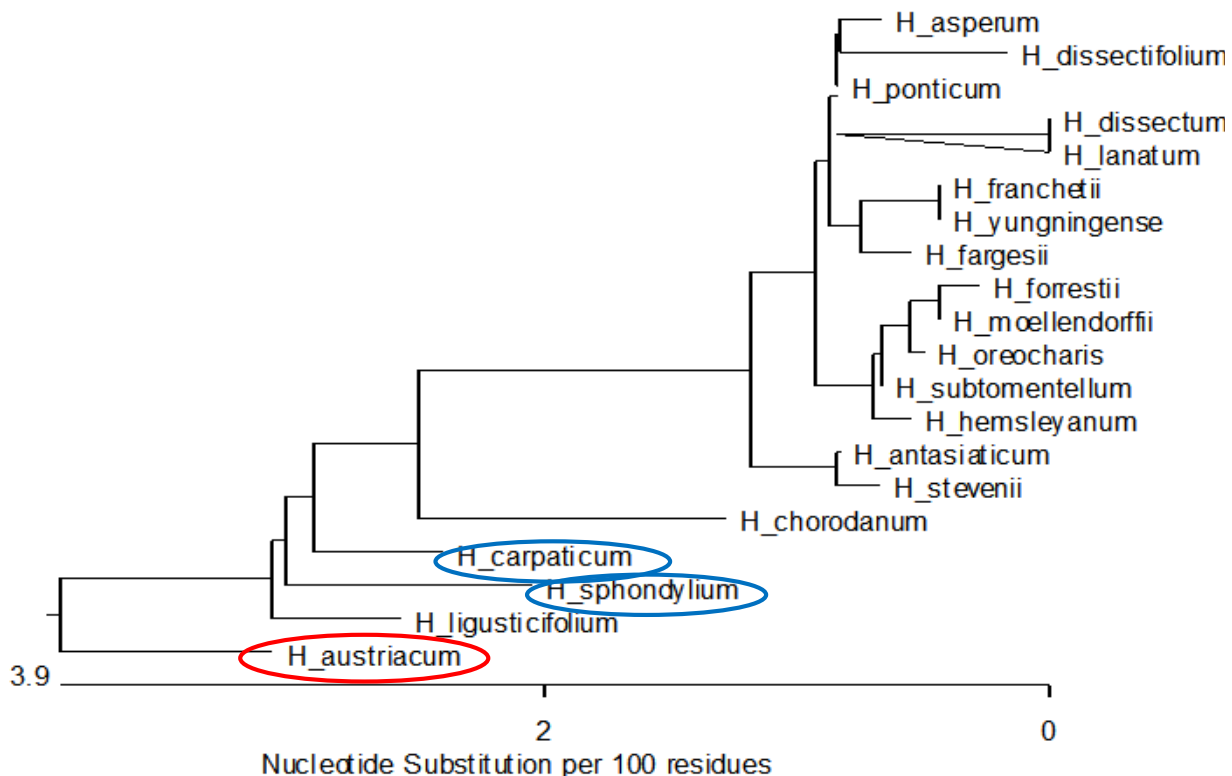


Рис. 7. Філогенетичне дерево представників роду *Heracleum*, побудоване на основі порівняння ITS1-5,8S рРНК-ITS2 області 35S рДНК послідовностей з бази даних Genbank

Отже, порівняно із іншими досліджуваними зразками, *H. carpaticum* та *H. sphondylium* проявляють більшу генетичну спорідненість до предкової групи, що вказує на можливе збереження деяких давніх генетичних ознак.

3.2. Аналіз нуклеотидних послідовностей ITS1-5,8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК представників роду *Heracleum*, сиквенованих методом Illumina

На другому етапі досліджень, нами були отримані препарати ДНК з гербарних зразків різних представників роду *Heracleum*, що зростають на

території України та Румунії. Для досягнення мети ми використовували цетавлоновий метод, який успішно зарекомендував себе для інших видів рослин. На наявність в них нуклеїнової кислоти, зразки перевірялись за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі, проявляючи за допомогою бромистого етидію (рис. 8).

Як видно з представлених результатів (рис. 8), у всіх препаратах наявна ДНК. Зразки, що привернули найбільший інтерес із високомолекулярними фрагментами підлягали постановці полімеразної ланцюгової реакції.

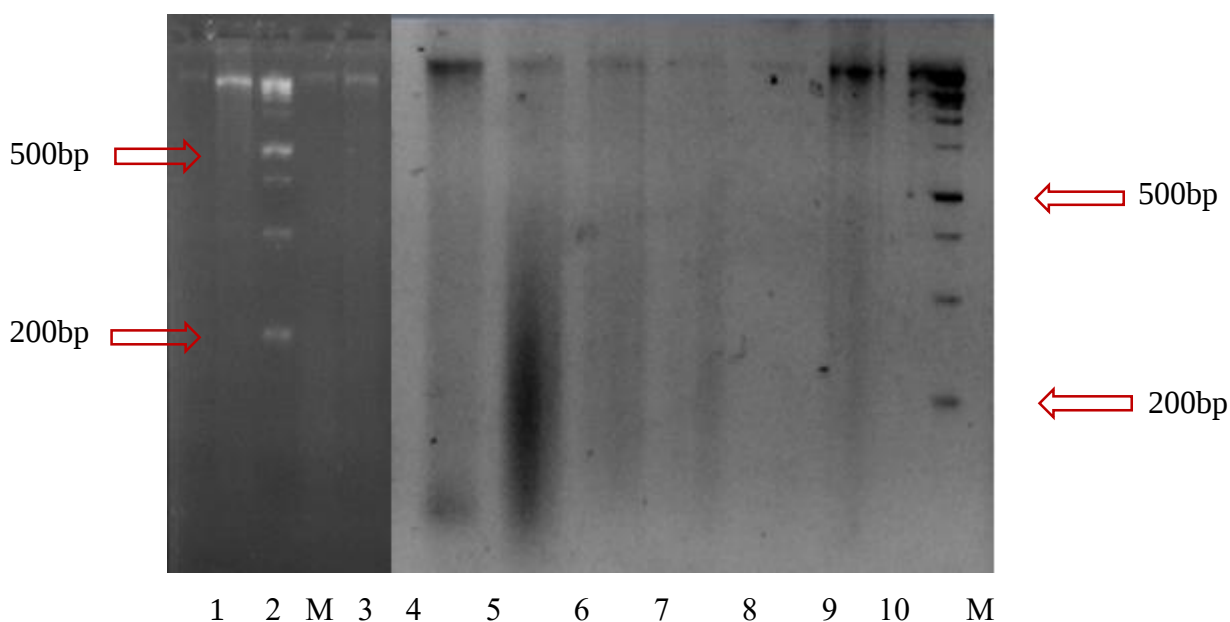


Рис. 8. Електрофореграма препаратів ДНК різних представників роду *Heracleum*, де де: 1 - HeCar_5; 2 - HeSph_6; 3 - He_31; 4 - HeSos_32; 5 - He_29; 6 - He_30; 7 - HeSph_1; 8 - He_37; 9 - He_38; 10 - He_35

Для постановки ПЛР нами були використані у роботі дві пари праймерів, що комплементарні до генів 18S та 26S рРНК. При використанні пари праймерів, нами вдалося повноцінно ампліфікувати ITS1-5,8S-ITS2 ділянку 35S рДНК, як представлено на рис. 9. Проте, надіючись на наявність слідових фрагментів ампліфікованих послідовностей, зразки підлягали сиквенуванню.

Після проведення очистки, ПЛР-продукти підлягали сиквенуванню за методом Illumina. Отриманні ріди піддавались якісній перевірці з використанням програмного забезпечення FASTP з подальшим видаленням низькоякісних рідів та адаптерних послідовностей. За допомогою програмного забезпечення SeqMan NGen було отримано 92 контіги, що слугували основою для проведення подальшого аналізу спейсерної ділянки.

Через специфіку обраних праймерів та особливості методу Illumina охопити центральну частину досліджуваної області, яка містить власне послідовність гену 5.8S рРНК, не вдалося. Дана особливість звузила можливість аналізу всіх областей досліджуваної ділянки.

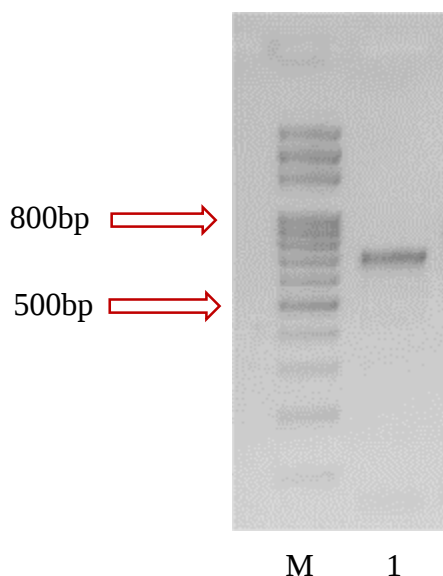


Рис. 9. Електрофоретичний профіль ПЛР-продуктів ITS1-5,8SpРНК-ITS2 області 35S рДНК зразкаHe_38

Зібрані контіги та анотовані послідовності інших видів роду, взяті з генбанку, наділі вирівнювали за допомогою програмного забезпечення. Це дозволило розширити порівняльний спектр та більш точно визначити взаємоз'язки між досліджуваними зразками роду *Heracleum*. На основі отриманого вирівнювання було побудоване філогенетичне дерево (рис. 10).

Згідно з отриманим філогенетичним деревом (рис. 10), усі досліджувані зразки формують дві сестринські гілки. Перша з яких включає п'ять представників, послідовності яких взяті з генбанку: *H. chorodanum*, *H.*

austriacum, *H. carpaticum*, *H. ligusticifolium* та *H. sphondylium*, а також два контігі зразка №30. Водночас, таке розміщення останніх є швидше винятковим, оскільки переважна кількість зібраних для нього контігів групується з іншими зразками. Таке розміщення може мати що найменше два пояснення. Перше – про гібридне походження цього зразка, друге – існування внутрішньовидової варіабельності.

Tree scale: 0.01

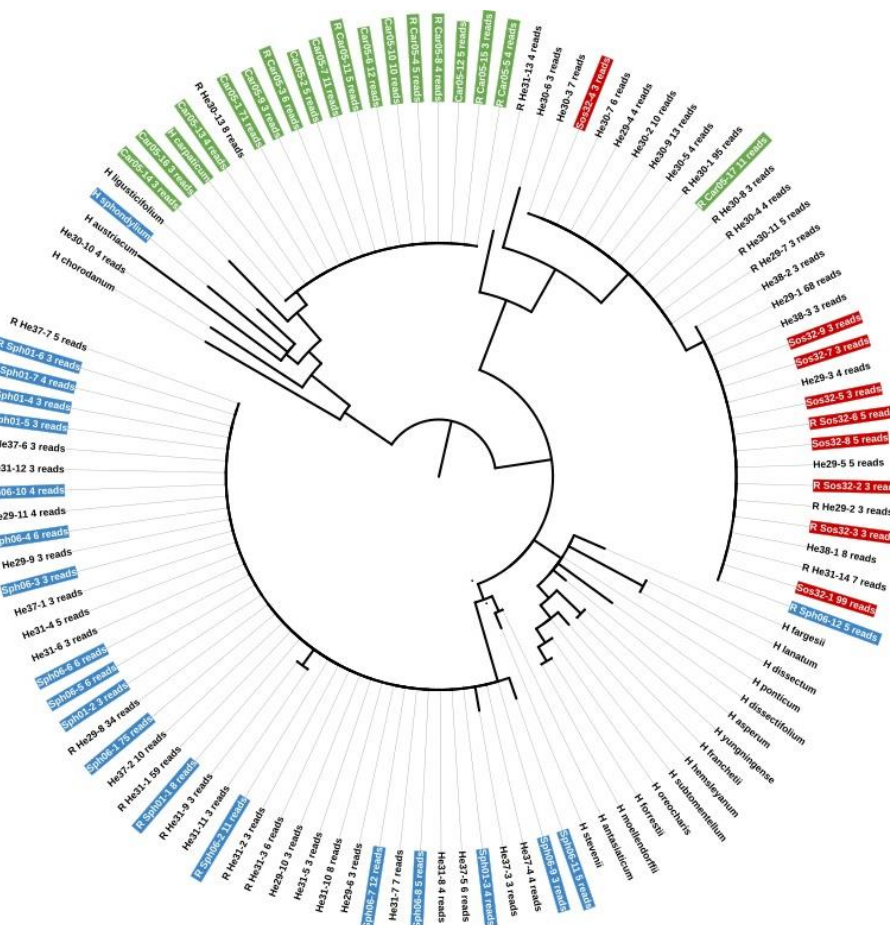


Рис. 10. Філогенетичне дерево представників роду *Heracleum*, побудоване на основі вирівнювання міжгенних спейсерів ITS1-5,8S рРНК-ITS2 області 35S рДНК

Друга гілка чітко поділяється на три кладистичні групи. Перша з яких об'єднує послідовності представників *H. sosnowskyi*. Слід зауважити, що дана гілка виявилася неоднорідною. В її формуванні приймають участь також зразки, для яких видова належність не встановлена. Це, зокрема, He29 (6 контігів), He30 (10 контігів), He31 (2 контігів) та He38 (3 контігів). Нами

виявлена певна особливість – всі зібрані для зразків He30 та He38 контігі групуються зі зразками *H. sosnowskyi*, тоді як для інших двох це «правило» не працює.

Третю кладистичну групу формують зразки *H. sphondylium* та контігі трьох зразків борщівників, видова належність яких не встановлена. Це стосується He29 (5 контігів), He31 (12 контігів) та He37 (7 контігів). Як бачимо, перші два зразки вже згадувалися з огляду їх наявності серед послідовностей *H. sosnowskyi*. Враховуючи, що така подія носить не поодинокій характер, напрошується думка про можливий гібридний статус рослин, з яких відбирали матеріал для дослідження.

Центральна кладистична група представлена виключно п'ятнадцятьма референтними послідовностями, взятих з бази даних Genbank, що демонструє певну їх генетичну віддаленість від досліджуваних нами зразків.

В цілому, аналіз ITS1-5,8S рРНК-ITS2 ділянки 35S рДНК виявився достатньо інформативним для характеристики та оцінки видового різноманіття представників роду *Heracleum*.

ВИСНОВКИ

1. Розмір ділянки ITS1-5.8-ITS2 35S рДНК становить 606 нп., де ITS1 формують 218, 5.8S рДНК – 164 та ITS2 – 224 нп. Із двох внутрішніх транскрибованих спейсерів 35S рДНК більш мінливим є ITS2. Ступінь подібності досліджуваних зразків знаходиться в межах 95.5-100%.
2. На філогенетичному дереві *Heracleum sphondylium* та *H. carpathicum* групуються на одній гілці і розміщені ближче до предкової групи, на відміну від більшості інших досліджуваних видів роду.
3. Природні зразки *H. sphondylium*, *H. carpathicum* та *H. sosnowskyi*, ITS1-5.8-ITS2 35S рДНК яких сиквеновані методом Illumina, на філогенетичному дереві, побудованому за допомогою програмного забезпечення ITOL, формують три окремі групи.
4. Зразки *Heracleum* spp. групуються переважно з *H. sphondylium* та *H. Sosnowskyi*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ali, M. A., Gyulai, G., Hidvégi, N., Kerti, B., Hemaïd, F. M. A., Pandey, A. K., & Lee, J. (2014). The changing epitome of species identification – DNA barcoding. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(3), 204–231. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.03.003>
2. Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10), e08093. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093>
3. Behera, U. K. (2019). Integrated farming systems for prosperity of marginal farmers and sustainable agriculture: a roadmap for India. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 89(11). <https://doi.org/10.56093/ijas.v89i11.95287>
4. Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10(1), 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
5. Boluda, C. G., Christe, C., Naciri, Y., & Gautier, L. (2022). A 638-gene phylogeny supports the recognition of twice as many species in the Malagasy endemic genus *Capurodendron*(Sapotaceae). *Taxon*, 71(2), 360–395. <https://doi.org/10.1002/tax.12676>
6. Bruni, R., Barreca, D., Protti, M., Brighenti, V., Righetti, L., Anceschi, L., et. al (2019). Botanical Sources, Chemistry, Analysis, and Biological Activity of Furanocoumarins of Pharmaceutical Interest. *Molecules*, 24(11), 2163. <https://doi.org/10.3390/molecules24112163>
7. Castaño, C., Berlin, A., Durling, M. B., Ihrmark, K., Lindahl, B. D., Stenlid, J., et. al (2020). Optimized metabarcoding with Pacific biosciences enables semi-quantitative analysis of fungal communities. *New Phytologist*, 228(3), 1149–1158. <https://doi.org/10.1111/nph.16731>
8. Dwiningasih, Y., Rahmaningsih, M., & Alkahtani, J. (2020). Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers in tropical crops. *Advance*

Sustainable Science, Engineering and Technology, 2(2).
<https://doi.org/10.26877/asset.v2i2.6279>

9. Ebrahimi A., Aghbabayi M., Rashidi-Monfared S., Falahi-Charkhabi N., Gharanjik S., & Ahmadi N. (2023). Furanocoumarins from *Heracleum persicum* L.: Unveiling their biosynthesis and gene expression. *Industrial Crops and Products*, 203, 117160.
10. Eidi M, Ebadi M-T, Falahati-Anbaran M, & Shojaeiyan A. (2021): Phylogenetic relationships in the *Heracleum* sp. species Complex from Iran by using nuclear ribosomal DNA (ITS) and rpl32-trnL. *J Cell Mol Res*, 34(3), 469-482.
11. Elgersma, K. J., & Ehrenfeld, J. G. (2010). Linear and non-linear impacts of a non-native plant invasion on soil microbial community structure and function. *Biological Invasions*, 13(3), 757–768. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9866-9>
12. Grzędzicka, E. (2023b). Assessment of Habitat Selection by Invasive Plants and Conditions with the Best Performance of Invasiveness Traits. *Diversity*, 15(3), 333. <https://doi.org/10.3390/d15030333>
13. *Heracleum sphondylium* (bears breech). (2022). CABI Compendium, CABI Compendium. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.26912>
14. Hodgins, K. A., Battlay, P., & Bock, D. G. (2025). The genomic secrets of invasive plants. *New Phytologist*, 245(5), 1846–1863. <https://doi.org/10.1111/nph.20368>
15. Hyun, J., Khoa, H. D., DO, Jung, J., & Kim, J. (2019). Development of molecular markers for invasive alien plants in Korea: a case study of a toxic weed, *Cenchrus longispinus* L., based on next generation sequencing data. *PeerJ*, 7, e7965. <https://doi.org/10.7717/peerj.7965>
16. 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. *Divers Distrib*, 13(1):99–114.
17. Jandová, K., Klinerová, T., Müllerová, J., Pyšek, P., Pergl, J., Cajthaml, T., & Dostál, P. (2013). Long-term impact of *Heracleum mantegazzianum* invasion on

- soil chemical and biological characteristics. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.014>
18. Lemos, R. P. M., Matielo, C. B. D., Beise, D. C., Da Rosa, V. G., Sarzi, D. S., Roesch, L. F. W., & Stefenon, V. M. (2018). Characterization of Plastidial and Nuclear SSR Markers for Understanding Invasion Histories and Genetic Diversity of *Schinus molle* L. *Biology*, 7(3), 43. <https://doi.org/10.3390/biology7030043>
 19. Letsiou, S., Madesis, P., Vasdekis, E., Montemurro, C., Grigoriou, M. E., Skavdis, et al. (2024). DNA Barcoding as a Plant Identification Method. *Applied Sciences*, 14(4), 1415. <https://doi.org/10.3390/app14041415>
 20. Levine, J. M., Vilà, M., Antonio, C. M. D., Dukes, J. S., Grigulis, K., & Lavorel, S. (2003). Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1517), 775–781. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2327>
 21. Luo, X., Qiaohui, Z., Zhang, Z., Lin, L., Zhanghui, Q., Zhenxing, Z., & Fu, W. (2025). The complete chloroplast genome of *Heracleum hemsleyanum* Diels (Apiaceae), a traditional medicinal herb in China. *Mitochondrial DNA Part B*, 10(2), 114–118. <https://doi.org/10.1080/23802359.2025.2449718>
 22. Matarrese, E., & Renna, M. (2023). Prospects of Hogweed (*Heracleum sphondylium* L.) as a New Horticultural Crop for Food and Non-Food Uses: A Review. *Horticulturae*, 9(2), 246. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020246>
 23. Mirzaei, S. (2021). Application of molecular markers in plant sciences; An overview. *Central Asian Journal of Plant Science Innovation*, 1(4), 192–200.
 24. Molina J, Hazzouri KM, Nickrent D, Geisler M, Meyer RS, Pentony MM, et al. (2014). Possible loss of the chloroplast genome in the parasitic flowering plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). *Mol Biol Evol*, 31(4):793–803.
 25. Paramonova, K., Chaloupková, V., & Ivanova, T. A. (2024). Invasive *Heracleum sosnowskyi* as a potential feedstock for biorefineries: A review. *Industrial Crops and Products*, 216, 118754. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118754>

26. Ramesh, P., Mallikarjuna, G., Sameena, S., Kumar, A., Gurulakshmi, K., Reddy, B. V., et al. (2020). Advancements in molecular marker technologies and their applications in diversity studies. *Journal of biosciences*, 45, 123.
27. Rijal, D. P., Falahati-Anbaran, M., Alm, T., & Alsos, I. G. (2015). Microsatellite markers for *Heracleum persicum* (Apiaceae) and allied taxa: Application of next-generation sequencing to develop genetic resources for invasive species management. *Plant molecular biology reporter*, 33, 1381-1390.
28. Roshka, N., Derevenko, T., & Chorney, I. (2024). Use of the rpl32-trnI region of the chloroplast genome in the molecular taxonomy of *Heracleum* species. *Biologichni Systemy*, 16(1). <https://doi.org/10.31861/biosystems2024.01.058>
29. Roshka, N., Tynkevich, Y., & Volkov, R. (2024). Use of ISSR markers in assessment of genetic diversity of ukrainian representatives of the genus *Heracleum*. *Biologichni Systemy*, 16(3). <https://doi.org/10.31861/biosystems2024.03.266>
30. Saddhe, A. A., & Kumar, K. (2018). DNA barcoding of plants: Selection of core markers for taxonomic groups. *Plant Science Today*, 5(1), 9-13. <https://dx.doi.org/10.14719/pst.2018.5.1.356>
31. Safhi, F. A., Alshamrani, S. M., Bogmaza, A. F. M., & El-Moneim, D. A. (2023). DNA Barcoding of Wild Plants with Potential Medicinal Properties from Faifa Mountains in Saudi Arabia. *Genes*, 14(2), 469. <https://doi.org/10.3390/genes14020469>
32. Segatto, A. L. A., Cazé, A. L. R., Turchetto, C., Klahre, U., Kuhlemeier, C., Bonatto, S. L., & Freitas, L. B. (2014). Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.011>.
33. Sîrbu, C., Anastasiu, P., Urziceanu, M., Camen-Comănescu, P., Sîrbu, I., Popa, A., et al. (2021). Invasive alien plant species in Romania of European Union concern. *Environmental & Socio-economic Studies*, 9(4), 32–44. <https://doi.org/10.2478/environ-2021-0023>

34. Świechowski, K., Rosik, J., Bednik, M., Szatkowska, B., Tomczak-Wandzel, R., & Stegenta-Dąbrowska, S. (2024). Heracleum sosnowskyi pyrolysis – Energy and environmental aspects of biochar utilization. *Bioresource Technology*, 408, 131169. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131169>
35. Timpano, E. K., Scheible, M. K. R., & Meiklejohn, K. A. (2020). Optimization of the second internal transcribed spacer (ITS2) for characterizing land plants from soil. *PloS one*, 15(4), e0231436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231436>
36. Tynkevich, Y. O., Roshka, N. M., Timkanych, E. E., Moysiienko, I. I., & Volkov, R. A. (2024). The use of the 5S rDNA IGS region for DNA barcoding and molecular taxonomy of two Ukrainian species of the genus Tulipa L. *Visnik Ukrainskogo Tovaristva Genetikiv I Selekcioneriv*, 21(1-2), 6–14. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.21.1-2.1596>
37. Tynkevich, Y. O., Yakobyshen, D. V., Cherkazyanova, A. S., Shelyfist, A. E. & Volkov, R. A. (2024). Intragenomic polymorphism of the ITS1-5.8 S-ITS2 region in invasive species of the genus Reynoutria. *Cytology and Genetics*, 58(6), 15-26.
38. Visockienė, J. S., Tumelienė, E., & Maliene, V. (2020). Identification of Heracleum Sosnowskyi-Invaded land using Earth Remote sensing data. *Sustainability*, 12(3), 759. <https://doi.org/10.3390/su12030759>
39. Zhang, D., & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3), 563–584. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01773.x>

ДОДАТКИ

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:

1. Робота з шкідливими речовинами повинна відповідати вимогам техніки безпеки та захисту довкілля.
2. Використання токсичних та потенційно канцерогенних речовин необхідно зводити до мінімуму. При можливості такі речовини замінюються на менш токсичні.
3. У лабораторії можна зберігати лише ті речовини, які необхідні для роботи найближчим часом.
4. У кожній лабораторії повинні бути списки небезпечних речовин.

Вимоги безпеки після закінчення роботи

По закінченні роботи кожний працівник зобов'язаний:

- привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру;
- виходячи останнім, зачинити вікна (квартирки), вимкнути світло, газ,

перевірити чи вимкненні всі електроприлади та закриті крани, зачинити приміщення на ключ. Ключі передаються черговому охоронцю, про що робиться запис у журналі.

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 вогнєнебезпечними 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 продезинфікувати 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.



**Студентська наукова конференція
присвячена 150 річниці університету**

**НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ
БІОЛОГІЇ, ХІМІЇ ТА БІОРЕСУРСІВ**



12-15 травня, 2025
Чернівці



Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ
студентської наукової конференції
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

**НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ
БІОЛОГІЇ, ХІМІЇ ТА БІОРЕСУРСІВ**

12-15 травня 2025 року



Чернівці
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича
2025

Дрогобецький Ігор
Наукова керівниця – доц. Шеліфст А.Є.

Характеристика ITS1-5.8S-ITS2 ділянки представників роду *Heptaclethra*

За останні десятиліття інвазійні рослини стали однією з головних загроз біорізноманіттю, витісняючи місцеві види та змінюючи екосистеми. Гібридизація з аборигенними видами рослин може сприяти появі агресивніших форм. Окрім впливу на біорізноманіття рослин, представники роду *Heptaclethra* можуть накопичувати речовини, що здатні викликати фотохімічні опіки при контакті зі шкірою.

Серед представників роду особливо агресивними вважають *H. tantigastatum* Sommier & Levier та *H. zosterifolia* Manden. Урховаючи однаковий інвазійний потенціал, токсичність і морфологічні особливості, їх часто об'єднують під однією назвою «саванські борщівники», поширюючись на їх природний ареал.

Нині для аналізу філогенетичних зв'язків і розуміння причин інвазії рослин з успіхом застосовують ITS1-5.8S-ITS2 (або ITS1-2) області 35S рДНК. У геномі рослин, вони представлені тандемними повторами, в яких кодувальні ділянки розділені міжгенними спейсерами (ITS1 та ITS2). Існування внутрішньогеномного поліморфізму ITS2, який є результатом внутрішньо- та міжвидової гібридизації, підтвердили нещодавні дослідження цієї області [1]. Це, вочевидь, підтверджує, що явище гібридизації може призвести до виникнення більш агресивних форм рослин і, як наслідок, стрімкого розповсюдження інвазійних видів.

Нами проведений порівняльний аналіз ITS1-ITS2 області двох представників роду *H. antasiaticum*, *H. asperum*, *H. austriacum*, *H. capricum*, *H. chorodatum*, *H. dissectifolium*, *H. dissectum*, *H. fargesii*, *H. forrestii*, *H. franchetii*, *H. hemisphaeratum*, *H. lanatum*, *H. ligusticum*, *H. moellendorffii*, *H. oreocharis*, *H. ponticum*, *H. sphondylium*, *H. stevenii*, *H. submontellum*, *H. yunnanense* (DQ427045.1, DQ468077.1, EU594892.1, EU594893.1, DQ427049.1, HQ686400.1, OL473021.1, MT359999.1,

EU001372.1, HQ686407.1, FJ812111.1, EU594923.1, EU594897.1, HQ686415.1, HQ686460.1, DQ427047.1, EU594915.1, EU594916.1, FJ812149.1, HQ686404.1 відповідно), нуклеотидні послідовності яких наведені у базі даних GenBank.

Після вирівнювання послідовностей за допомогою програмного забезпечення MegAlign (Clustal W метод) отримали консенсусну послідовність розміром 606 нп, в якій ITS1 формують 218, 5.8S рДНК – 164 та ITS2 – 224 нп. У кожній із цих областей, навіть у послідовності гену, виявлені різноманітні точкові мутації, загальна характеристика яких наведена у таблиці.

Зауважимо, що в усіх випадках мали місце онуклеотидні заміни, і лише в кількох – онуклеотидні делеції або інсерції. Значну частину виявлених мутацій становили транзиції C→T та T→C. Зокрема їх кількість у ITS1 відповідно 14 та 8 подій відповідно, а у ITS2 – 24 та 22. Чотири події транзиції C→T серед усіх досліджуваних зразків виявлені у послідовностях гену 5.8S рДНК та по одній A→T та T→A.

Як уже зазначалося, друга спейсерна ділянка більш мінлива, з чим узгоджуються й отримані нами результати. В цій ділянці достатньо частими є транзиції пуринів A→G та G→A (11 та 7 подій відповідно), тоді як у ITS1 їх виявлено значно менше (1 та 5 відповідно). Події трансверсій на загальне виявлено значно менше. Волночас простежується закономірність: у ITS1 їх, на відміну від ITS2, виявлено незначна кількість.

На основі досліджуваних нуклеотидних послідовностей побудоване філогенетичне дерево. Найбільш віддаленим серед аналізованих видів виявився *H. austriacum*, який формує сестринську кляду до всіх інших досліджуваних видів роду *Heptaclethra*.

Література

1. Tynkevich, Y. O., Yakobyshen, D. V., Cherkazianova, A. S., Shelyfist, A. Y., & Volkov, R. A. (2024). Intra-genomic Polymorphism of the ITS1-5.8S-ITS2 Region in Invasive Species of the Genus *Reynoutria*. *Cytology and Genetics*, 58(6), 536–546. DOI: 10.3103/s0095452724060112