

**ВАРІАНТИ ГЕНА *LEAFY* В ГЕНОМАХ УКРАЇНСЬКИХ ЗРАЗКІВ  
ІНВАЗІЙНОГО ВИДУ *REYNOUTRIA SACHALINENSIS***Д. В. ЯКОБИШЕН  0009-0002-1799-7460Ю. О. ТИНКЕВИЧ  0000-0002-0222-8098Р. А. ВОЛКОВ  0000-0003-0673-2598

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,  
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58002, Україна  
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Високоваріабельні ядерні гени, такі як *LEAFY*, є ефективним інструментом для ідентифікації гібридних / гетерозиготних форм. Проте, популярний метод прямого сиквенування ПЛР-продуктів непридатний для виявлення можливих внутрішньогеномних варіантів цих генів. Альтернативні підходи, такі як *Illumina* сиквенування ампліконів, роблять гени *LEAFY* перспективними маркерами для баркодингу гібридних та поліплоїдних рослин. Важливим об'єктом таких досліджень є інвазійні види роду *Reynoutria*, які представлені поліплоїдними формами гібридного походження. **Мета.** Охарактеризувати поліморфізм другого інтрону гена *LEAFY* в українських зразках *R. sachalinensis*. **Методи.** ПЛР-ампліфікація, сиквенування ампліконів методом *Illumina*, біоінформатичний аналіз. **Результати.** В геномах трьох зразків *R. sachalinensis* ідентифіковано шість гаплотипів, один з яких, H2, є спільним, а решта – специфічними для окремих зразків. Гаплотипи H1 та H2 відповідають варіантам S1 і S2, раніше виявленим у північноамериканських зразках. Гаплотипи H3–H6 містять мутацію, яка зустрічається в окремих популяціях первинного ареалу виду на Хоккайдو та Сахаліні, але відсутня у північноамериканських зразках. **Висновки.** Аналіз послідовностей другого інтрону гена *LEAFY* виявив внутрішньогеномний поліморфізм цієї ділянки в українських зразках *R. sachalinensis*. Використання *Illumina* сиквенування ампліконів другого інтрону гена *LEAFY* є перспективним методом баркодингу інвазійних популяцій видів роду *Reynoutria*.

**Ключові слова:** біорізноманіття, генетичний поліморфізм, інвазійні види, молекулярний баркодинг, *LEAFY*, *Reynoutria*.

**Вступ.** За останні десятиріччя розроблено багато молекулярно-генетичних підходів до таксономічних досліджень та ДНК-баркодингу рослин. Тим не менш, одним із найбільш розповсюджених залишається порівняння нуклеотидних послідовностей окремих ділянок геному, для чого зазвичай застосовують пряме сиквенування ПЛР-продуктів. Перевагами такого підходу є відносно невелика вартість, зручність зіставлення отриманих даних із результатами, що зберігаються у базах даних, зокрема у GenBank, та відтворюваність результатів, отриманих у різних лабораторіях (Letsiou et al., 2024). Найбільш популярними ділянками є кодувальні та спейсерні послідовності хлоропластної ДНК, на кшталт *matK*, *rpl32-trnL(UAG)* і *psbA-trnH* (Park et al., 2015; Tynkevich et al., 2022). Також у молекулярній таксономії широко застосовують некодувальні ділянки повторюваних послідовностей ядерного геному, такі як внутрішні транскрибовані спейсери (ITS1-2) і 5' зовнішній транскрибований спейсер (5' ETS) 35S рДНК (Andreev et al., 2010; Rodrigues et al., 2017; Tynkevich et al., 2023) та міжгенний спейсер (IGS) 5S рДНК (Ishchenko et al., 2021; Tynkevich et al., 2020; Andreev et al., 2023). Однак, наявність внутрішньогеномного поліморфізму може ускладнювати їх аналіз із використанням прямого сиквенування ПЛР-продуктів.

Унікальні та малокопійні послідовності ядерного геному використовуються як маркери набагато рідше, незважаючи на їх високу чутливість та інформативність.

Зокрема, наявність алейних варіантів у геномі дозволяє застосовувати їх для виявлення гетерозигот та гібридних форм. Проте, досягнення такої мети технічно неможливе при прямому сиквенуванні ПЛР-продуктів та вимагає використання процедури молекулярного клонування із подальшим сиквенуванням індивідуальних клонів, що значно підвищує тривалість та вартість досліджень (Zhang et al., 2012). Альтернативним підходом для виявлення внутрішньогеномного поліморфізму є залучення сучасних методів NGS (next generation sequencing), напр., сиквенування ампліконів методом Illumina.

Одним з найбільш популярних малокопійних маркерів є послідовності інтронів гена *LEAFY*, які успішно використовувалися для дослідження філогенії (Zheng et al., 2011) та ДНК-баркодингу гібридних форм (Ma et al., 2020). Ген *LEAFY* (*LFY*), відомий також як *FLORICAULA/FLO*, кодує регулятор транскрипції, залучений у розвиток квіткової меристеми (Mougeon et al., 2009). *LEAFY* вважається унікальним геном у більшості рослин. Проте, у геномах представників кількох еволюційних ліній виявлено гомологи цього гена, зокрема, у палеополіплоїдів, таких як *Zea mays*, *Glycine max* (Gao et al., 2019) та деякі види *Cucurbita* (Wang et al., 2018). Структурна організація *LEAFY* консервативна у покритонасінних рослин і включає три екзони та два інтрони (Weigel et al., 1992). Найчастіше сиквенують другий інтрон, який завдяки достатнім розмірам і високій мінливості є ефективним інструментом молекулярно-таксономічних досліджень.

До об'єктів, для баркодингу яких успішно застосовують ген *LEAFY*, належать інвазійні представники роду *Reynoutria*. Поза межами природного ареалу у Східній Азії цей рід представлений октаплоїдним ( $2n = 8x$ ) видом *R. japonica* Houtt., тетраплоїдним ( $2n = 4x$ ) *R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai та похідними від них гібридними гексаплоїдними ( $2n = 6x$ ) формами, виділеними в окремий вид *R. × bohémica* Chrtek & Chrtková (Mandák et al., 2003). В Україні зафіксована активна інвазія всіх трьох видів (Shevera, 2017; Tynkevich et al., 2025), причому, за підрахунком знахідок у базі даних GBIF (GBIF, 2025),

частка *R. sachalinensis* серед представників роду *Reynoutria* в Україні та в решті країн Східної Європи є значно вищою, порівняно з іншими частинами Європейського континенту.

Раніше з використанням гена *LEAFY* було охарактеризовано Північноамериканські популяції роду *Reynoutria* і показано існування п'ятох основних варіантів послідовності другого інтрону, три з яких (J1, J2, J3) характерні для *R. japonica*, а два інші (S1, S2) — для *R. sachalinensis*. Було виявлено багато форм із кількома варіантами послідовності другого інтрону, що пояснюється високим рівнем плідності та/або гібридним походженням цих рослин. Для успішного сиквенування варіантів послідовності *LEAFY* для таких зразків було використано молекулярне клонування та розроблено специфічні праймери для ампліфікації (Tipperly et al., 2021; 2025).

Для дослідження поліморфізму другого інтрону гена *LEAFY* в українських зразках *R. sachalinensis* ми використали в цій роботі Illumina сиквенування ампліконів. Такий підхід раніше був успішно випробований для ділянки ITS1-2 35S рДНК зразків *Reynoutria* (Tynkevich et al., 2024) та дає можливість не тільки ідентифікувати всі варіанти послідовності у поліплоїдних зразках, але й обрахувати їх кількісне співвідношення в геномі.

## Матеріали і методи

**Рослинний матеріал та виділення ДНК.** Зразки *R. sachalinensis* з Чернівецької і Тернопільської областей України були відібрані з гербарію Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (CHER) та надані науковцями Кременецького ботанічного саду (табл. 1). Таксономічну приналежність зразків визначали за морфологічними критеріями. Геному ДНК виділяли з гербарних зразків цетавлоновим методом (Porebski et al., 1997).

**Ампліфікація та сиквенування.** Другий інтрон гена *LEAFY* ампліфікували за допомогою праймерів, комплементарних до фланкуючих ділянок другого та третього екзонів. Загалом, застосовували два прямих та два зворотних праймери в різних комбінаціях. ПЛР-ампліфікацію проводили з використанням 5× полімеразної суміші FIREPol Master Mix (Solis BioDyne) згідно рекомендацій виробника. Температура гібридації для всіх комбінацій праймерів складала

## Варіанти гену *LEAFY* в геномах українських зразків інвазійного виду *Reynoutria sachalinensis*

61 °C. Кількість ДНК на 20 мкл реакційної суміші становила 10–20 нг.

ПЛР-продукти аналізували методом електрофоретичного розділення у 2 %-вому агарозному гелі. ПЛР-продукти *LEAFY* трьох зразків змішували в еквімолярній концентрації. Після чого змішаний амплікон очищали екстракцією з 2 %-вого агарозного геля за допомогою набору ZymoClean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Сиквенування ампліконів здійснювали методом Illumina з використанням сервісу Amplicon-EZ (GENEWIZ).

*Обробка результатів сиквенування.* Контроль якості отриманих в результаті сиквену-

вання парних Illumina рідів проводили з використанням програми fastp 0.23.4 (Chen et al, 2018). Контроль включав трімінг адаптерів, видалення коротких рідів, трімінг рідів за якістю та проводився за порівняно жорстких параметрів: -l 200, -cut\_tail, -cut\_front, cut\_tail\_window\_size 1, cut\_tail\_mean\_quality 30. За допомогою програми SeqKit 0.15.0 «чисті» ріди були переведені у формат FASTA, після чого парні ріди були об'єднані без перекриття та сортовані за послідовностями праймерів на три fasta файли відповідно до сиквенованих зразків (табл. 1).

Таблиця 1. Проаналізовані в роботі зразки *R. sachalinensis*

Назва зразка	Походження зразка	Кількість послідовностей
Rey-104	с. Грозинці, Хотинський р-н, Чернівецька обл., Україна	79
Rey-105	с. Мариничі, Путильський р-н, Чернівецька обл., Україна	132
Rey-115	м. Кременець, Кременецький р-н, Тернопільська обл., Україна	86

*Аналіз гаплотипів.* Всі унікальні послідовності дереплікували за допомогою програми vsearch з автоматичним підрахунком їх частоти (--derep\_fulllength, --sizeout). Гаплотипи з частотою менше 3 копій відфільтровували для виключення можливих помилок сиквенування та рідкісних артефактів ампліфікації. Далі всі прочитані послідовності картували на отриману базу гаплотипів з використанням vsearch (--usearch\_global, --id 0.97) для визначення їх приналежності. Відсоткове співвідношення гаплотипів у кожному зразку розраховували як частку рідів, що відповідають певному гаплотипу, від загальної кількості успішно картованих рідів. Обробку результатів картування та розрахунок відсотків проводили за допомогою власного Python скрипту з використанням бібліотек pandas та collections.

*Множинне вирівнювання та аналіз гаплотипів.* Для порівняння із ідентифікованими нами

гаплотипами ми провели пошук послідовностей гену *LEAFY* по базі даних GenBank методом blastn. Номери доступу послідовностей із повним другим інтроном наведено в таблиці 2. Послідовності гаплотипів вирівнювали в програмі MAFFT методом G-INS-i (Katoh & Standley, 2013). Середню попарну подібність між послідовностями розраховували з використанням програми Geneious Prime 2026.0.1. Щоб включити інформацію про індели у філогенетичний аналіз, використали метод кодування інделів як дискретних ознак (Simmons and Ochoterena, 2000). Кодування проводили за допомогою інструменту FastGap 1.2 (Borchsenius, 2009). Для обрахунку мережі гаплотипів використовували median-joining метод, реалізований в програмі POPART-1.7 (Leigh et al., 2015).

Таблиця 2. Послідовності гена *LEAFY* для зразків *Reynoutria*, отримані з бази даних GenBank

Назва послідовності	№ доступу GenBank
<b><i>R. japonica</i></b>	
R.japonica_Reyn34_S1	MW771258
R.japonica_Reyn15_S1	MW771249
R.japonica_Reyn25_S1	MW771251
R.japonica_Reyn02_S1	MW771243
R.japonica_Reyn27_S1	MW771211
R.japonica_Reyn06_S1	MW771247
R.japonica_Reyn29_S1	MW771255
R.japonica_Reyn04_S1	MW771245
R.japonica_Reyn05_S1	MW771246
R.japonica_Reyn07_S2	MW771259
R.japonica_Reyn08_S2	MW771260
R.japonica_Reyn20_S2	MW771266
R.japonica_Reyn16_S2	MW771263
R.japonica_Reyn17_S2	MW771264
<b><i>R. sachalinensis</i></b>	
R.sachalinensis_JF56	JF831356
R.sachalinensis_R093_S2	PQ642563
R.sachalinensis_Reyn24_S2	MW771270
R.sachalinensis_R060_S2	PQ642557
R.sachalinensis_R071_S2	PQ642561
R.sachalinensis_Rsac1	ON586879
<b><i>R. × bohemica</i></b>	
R.x_bohemica_R027_S1	PQ642533
R.x_bohemica_R102_S2	PQ642544
R.x_bohemica_R019_S1	PQ642531
R.x_bohemica_R054_S1	PQ642541
R.x_bohemica_R102_S1	PQ642530
R.x_bohemica_R041_S1	PQ642539
R.x_bohemica_R018_S2	PQ642545
R.x_bohemica_R250_S2	PQ642548
R.x_bohemica_R030_S2	PQ642553
R.x_bohemica_R302_S2	PQ642550
R.x_bohemica_R046_S2	PQ642551
R.x_bohemica_R048_S2	PQ642555

### Результати і обговорення

Сиквенування другого інтрону *LEAFY*. Ділянку другого інтрону гена *LEAFY* для трьох зразків *R. sachalinensis* (Rey-104, Rey-105 і Rey-115 — див. табл. 1) було ампліфіковано та сиквеновано методом Illumina. Загалом було отримано 439 парних рідів довжиною 251 + 251 нп. Оскільки повна довжина другого інтрону для *R. sachalinensis* становить приблизно 600 нп,

його центральна частина не покривалась при такому сиквенуванні. З огляду на це, ми застосували жорсткі критерії для трімінгу за якістю після чого формально збирали парні риди без перекриття. В результаті залишилось 297 зібраних рідів, які задовольняли жорстким критеріям зборки. Сортування за послідовностями праймерів, різні комбінації яких були використані для ПЛР-ампліфікації різних зразків, показало, що

## Варіанти гену *LEAFY* в геномах українських зразків інвазійного виду *Reynoutria sachalinensis*

кількість отриманих послідовностей цільової ділянки становила від 79 для Rey-104 до 132 для Rey-105 (табл. 1).

*Внутрішньогеномний поліморфізм гену LEAFY у зразках R. sachalinensis.* Дереплікація об'єднаної вибірки рідів для трьох зразків *R. sachalinensis* показала значне переважання у зустрічальності послідовностей перших шести гаплотипів, на які припадає 259 рідів, тоді як на решту 11 — лише 38 рідів. Отже, ці мінорні варіанти послідовності ймовірно являють собою артефакти сиквенування. Відповідно, вони були виключені з подальшого аналізу.

Пошук методом blastn по базі даних GenBank показав, що два з шести знайдених нами гаплотипів ідентичні раніше виявленим у Північноамериканських зразків варіантам другого інтрону *LEAFY* S1 і S2 (Tippergy et al., 2025). Для зручності подальшого порівняння результатів ми назвали ці два гаплотипи, відповідно, H1(S1) і H2(S2). Послідовностей, ідентичних іншим чотирьом гаплотипам, у GenBank знайдено не було. Специфічні для *R. japonica* варіанти J1-J3 не були виявлені в жодному з трьох досліджених зразків, що підтверджує їх видову належність до *R. sachalinensis*. Це узгоджується з результатами попереднього аналізу хлоропластних ділянок *rpl32-trnL(UAG)* і *matK* для цих трьох зразків (Тункевич et al., 2025), а також аналізу ISSR-маркерів для зразків Rey-104 і Rey-105 (Якобюшен et al., 2025). Проте, в геномі Rey-104 раніше була зафіксована незначна домішка варіантів ITS1-2 *R. japonica*, що є можливим наслідком інтрогресивної гібридизації (Тункевич et al., 2024).

Використання шести отриманих гаплотипів у якості референтних послідовностей для картування рідів, що належали до різних зразків,

дозволило вирахувати відсоток, який складають послідовності кожного гаплотипу у геномах досліджених нами зразків *R. sachalinensis* (табл. 3).

Єдиним гаплотипом, який присутній у геномах усіх трьох зразків, виявився H2(S2); його частка варіює від 43 % для Rey-104 до 51 % для Rey-105. Гаплотипи H1 та H3 зустрічаються тільки у Rey-115, тоді як H4, H5 і H6 знайдені у геномах зразків Rey-104 і Rey-105 у майже однаковому співвідношенні і відсутні у Rey-115. На відміну від наших зразків, S2 був єдиним гаплотипом, виявленим у північноамериканських зразках *R. sachalinensis* (Tippergy et al., 2021; 2025). Проте, це може бути пов'язане із тим, що використані авторами методи не дозволяють достатньо детально проаналізувати внутрішньогеномне різноманіття варіантів *LEAFY* (Tippergy et al., 2025).

Присутність гаплотипу H2(S2) у всіх українських зразках із подібною частотою, близькою до 50 %, може вказувати на наявність цього варіанта гену у двох з чотирьох хромосомних наборів тетраплоїдної *R. sachalinensis*. Відповідно, у двох інших хромосомних наборах можна було б очікувати наявність ще одного або максимум двох гаплотипів. Саме така картина спостерігається для зразка Rey-115. Проте, у зразках Rey-104 та Rey-105 виявлено по три гаплотипи на додаток до H2(S2). Цей результат видається дещо несподіваним і потребує подальшого вивчення. Можливим поясненням може бути те, що зразки Rey-104 та Rey-105 мали рівень плоідності вищий за 4, або у геномі *Reynoutria* наявна більше, ніж одна копія гену *LEAFY*. На сьогодні для видів *Reynoutria* копійність гену *LEAFY* все ще невідома.

Таблиця 3. Відсоток гаплотипів *LEAFY* у геномах зразків *R. sachalinensis*

Назва зразка	% гаплотипу в геномі					
	H1(S1)	H2(S2)	H3	H4	H5	H6
Rey-104	—	43	—	29	17	12
Rey-105	—	51	—	23	17	9
Rey-115	33	46	21	—	—	—

*Філогенетичний аналіз послідовностей другого інтрону LEAFY.* Для порівняння гаплотипів українських зразків із послідовностями зі зразків іншого географічного походження ми провели пошук в GenBank і виявили 33 послі-

довності специфічних для *R. sachalinensis* варіантів повного другого інтрону гену *LEAFY*, з яких 30 належить зразкам з Північної Америки (Tippergy et al., 2021; 2025). Вирівнювання всіх послідовностей інтрону 2 містить вісім нукле-

отидних замін, з яких чотири є парсимоній-інформативними, та чотири варіанти одного інделу, в залежності від кількості аденінів в полі-А

ланцюжку. Крім того, присутні три нуклеотидні заміни у фланкуючих інтрон ділянках другого і третього екзонів (рис. 1).

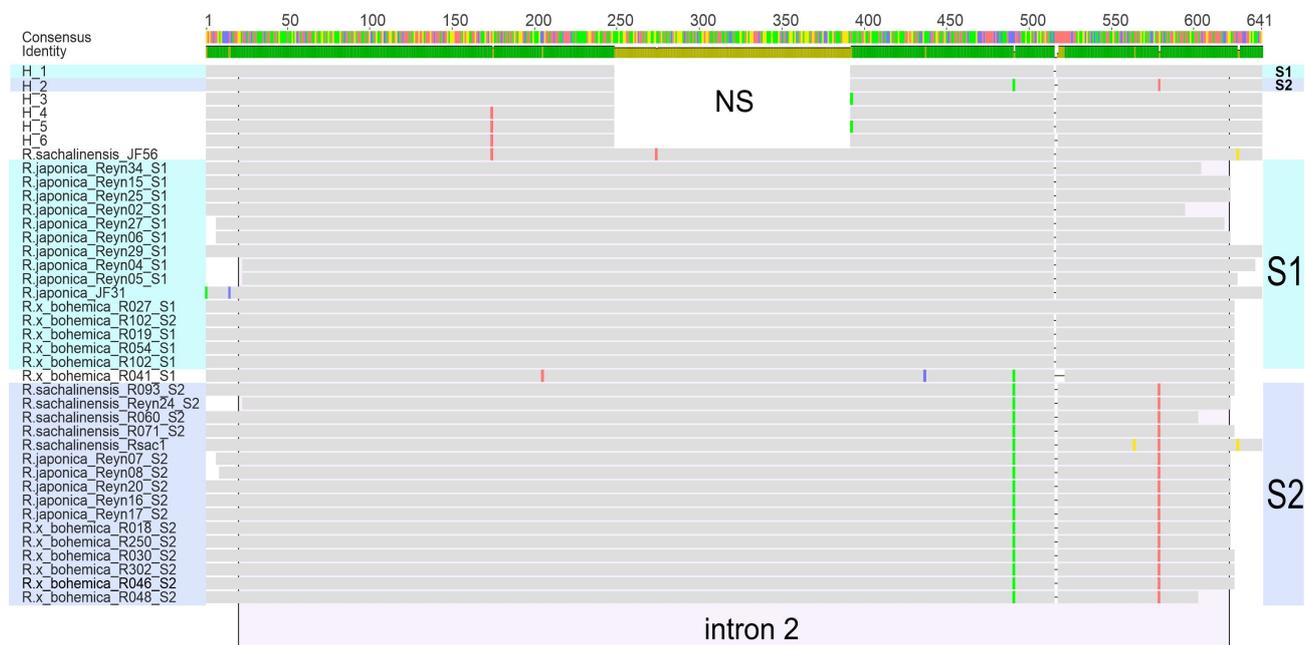
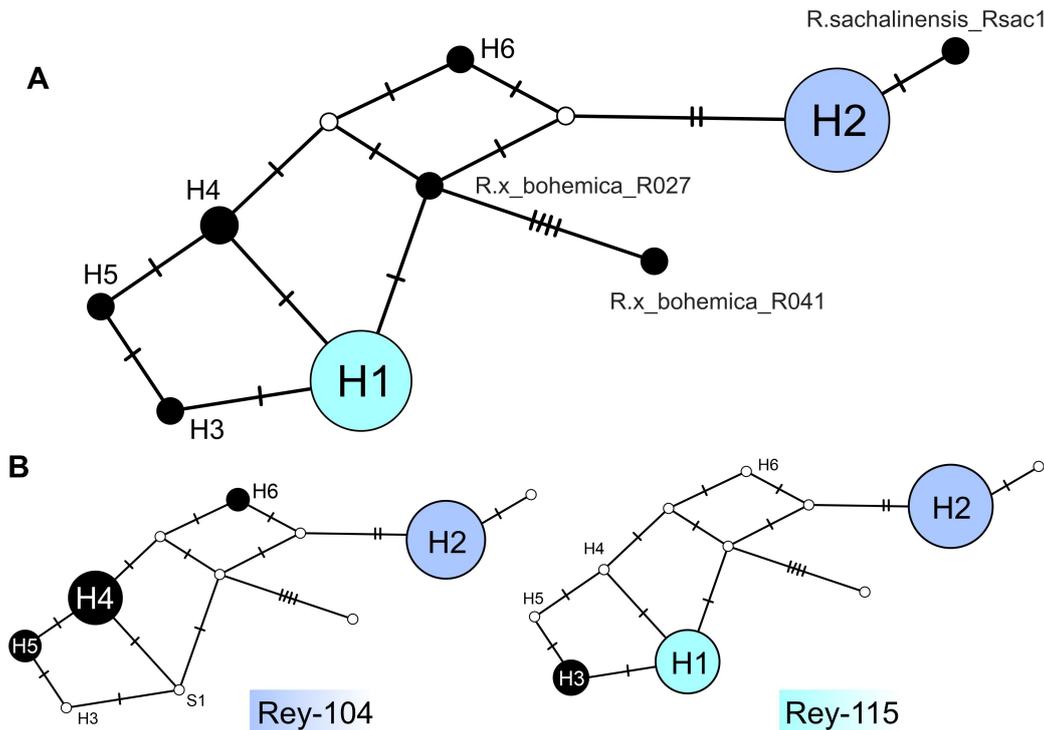


Рис. 1. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей другого інтрону гена *LEAFY* представників роду *Reynoutria*. Світло- та темно-синім кольорами виділено варіанти послідовностей S1 і S2, відповідно. NS — несіквенувана ділянка.

На основі вирівнювання була побудована філогенетична сітка гаплотипів (рис. 2), аналіз якої показує, що специфічні для українських зразків гаплотипи H3-H6 є похідними від варіанту H1(S1). Три гаплотипи H4-H6, які наявні в геномах зразків Rey-104 та Rey-105 відрізняються спільною транзицією G→A. Додатковий пошук методом blastn в GenBank дозволив ідентифікувати лише три послідовності, в яких наявна зазначена мутація. Для однієї з них (JF831356), яка містить повну послідовність інтрону 2 і наведена на рисунку 1, географічне походження невідоме, тоді як дві інші, не включені в цей аналіз через неповністю сиквенувану послідовність інтрону 2, походять з первинної частини ареалу *R. sachalinensis* на японському острові Хоккайдо (PQ179398) та з Сахаліну (PQ179443). Таким чином, гаплотипи H4-H6 імовірно походять з однієї із генетичних ліній *R. sachalinensis*, яка була занесена до Європи, але не виявлена у Північній Америці.

### Висновки

Аналіз послідовностей другого інтрону гена *LEAFY* показав значний внутрішньогеномний поліморфізм та відмінності за частотами різних гаплотипів цієї ділянки у геномах українських зразків інвазійного виду *R. sachalinensis*. З шести ідентифікованих гаплотипів лише один виявився спільним для всіх зразків, а інші п'ять — специфічними для окремих зразків. В гаплотипах *LEAFY* українських зразків виявлена мутація, яка характерна для деяких зразків *R. sachalinensis* з первинного ареалу і відсутня у зразків з Північної Америки. Сиквенування ампліконів другого інтрону гена *LEAFY* методом Illumina є перспективним підходом для баркодингу інвазійних популяцій видів роду *Reynoutria*.



**Рис. 2.** Median-joining мережа гаплотипів другого інтрону гену *LEAFY*, зображених як кола. Розмір кола пропорційний кількості послідовностей цього гаплотипу. Пусті кола відображають гіпотетичні гаплотипи. Світло- та темно-синім кольорами позначено варіанти послідовності H1(S1) і H2(S2). Кількість рисок на гілках відповідає кількості мутацій, які відрізняють гаплотипи. **A** — гаплограма всіх проаналізованих послідовностей: для унікальних гаплотипів, отриманих з GenBank, наведено повну назву відповідного зразка; **B** — представлений гаплотипів в геномах окремих зразків.

### Перелік літератури

1. Andreev I. O., Melnyk V. M., Parnikova I. Y., Kunakh V. A. Molecular organization and intragenomic variability of intergenic spacer of 5S rRNA genes in *Colobanthus quitensis*. *Cytol. Genet.* 2023. Vol. 57(5). P. 399–405. doi: 10.3103/S0095452723050018
2. Andreev I. O., Spiridonova E. V., Kyryachenko S. S., Parnikova I. Y., Maidanyuk D. N., Volkov R. A., Kozeretka I. A., Kunakh V. A. Population-genetic analysis of *Deschampsia antarctica* from two regions of maritime Antarctica. *Moscow University Biological Sciences Bulletin.* 2010. Vol. 65(4). P. 208–210. doi: 10.3103/s0096392510040243
3. Borchsenius F. FastGap 1.2, Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark, 2009. Published online at [http://www.aubot.dk/FastGap\\_home.htm](http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm)
4. Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018. Vol. 34(17). P. i884–i890. doi: 10.1101/274100
5. Gao B., Chen M., Li X., Zhang J. Ancient duplications and grass-specific transposition influenced the evolution of *LEAFY* transcription factor genes. *Commun. Biol.* 2019. Vol. 2(1). P. 237. doi: 10.1038/s42003-019-0469-4
6. Ishchenko O. O., Bednarska I. O., Panchuk I. I. Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol. Genet.* 2021. Vol. 55(1). P. 10–18. doi: 10.3103/s0095452721010096
7. Katoh K., Standley D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30(4). P. 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
8. Leigh J. W., Bryant D., Nakagawa S. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* 2015. Vol. 6(9). P. 1110–1116. doi: 10.1111/2041-210x.12410
9. Letsiou S., Madesis P., Vasdekis E., Montemurro C., Grigoriou M. E., Skavdis G., Tzakos A. G. DNA barcoding as a plant identification method. *Appl. Sci.* 2024. Vol. 14(4). P. 1415. doi: 10.3389/fpls.2019.00987
10. Ma Y. P., Zhao L., Zhang W. J., Zhang Y. H., Xing X., Duan X. X., Wen J. Origins of cultivars of *Chrysanthemum* — evidence from the chloroplast genome and nuclear *LFY* gene. *J. Syst. Evol.* 2020. Vol. 58(6). P. 925–944. doi: 10.1111/jse.12682
11. Mandak B., Pysek P., Lysak M., Suda J., Krahulcova A., Bimova K. Variation in DNA ploidy levels of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic. *Ann. Bot.* 2003. Vol. 92(2). P. 265–272. doi: 10.1093/aob/mcg141
12. Moyroud E., Tichtinsky G., Parcy F. The *LEAFY* floral regulators in angiosperms: conserved proteins with diverse roles. *J. Plant Biol.* 2009. Vol. 52(3). P. 177–185. doi: 10.1007/s12374-009-9028-8
13. Park H., Yoon C. Y., Kim J. S., Kim J. H. Molecular identification of *Reynoutria japonica* Houtt. and *R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai using SNP sites. *Korean J. Plant Res.* 2015. Vol. 28(6). P. 743–751. doi: 10.7732/kjpr.2015.28.6.743
14. Porebski S., Bailey L. G., Baum B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997. Vol. 15(1). P. 8–15. doi: 10.1007/bf02772108
15. *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. 2023. Checklist

- dataset accessed via GBIF.org on 2025-11-29. doi: 10.15468/39omei
16. *Rodrigues J., Viegas W., Silva M.* 45S rDNA external transcribed spacer organization reveals new phylogenetic relationships in *Avena* genus. *PLoS One*. 2017. Vol. 12(4). P. e0176170. doi: 10.1371/journal.pone.0176170
  17. *Shevera M. V.* *Reynoutria* × *bohemica* (Polygonaceae), a potentially invasive species of the Ukrainian flora. *Ukr. Bot. J.* 2017. Vol. 74(6). P. 548-555. doi: 10.15407/ukrbotj74.06.548
  18. *Simmons M. P., Ochoterena H.* Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 2000. Vol. 49(2). P. 369–381. doi: 10.1093/sysbio/49.2.369
  19. *Tippery N. P., Olson A. L., Wendtlandt J. L.* Using the nuclear *LEAFY* gene to reconstruct phylogenetic relationships among invasive knotweed (*Reynoutria*, Polygonaceae) populations. *Invasive Plant Sci. Manag.* 2021. Vol. 14(2). P. 92–100. doi: 10.1017/inp.2021.14
  20. *Tippery N. P., Sabol M. M., Koehler J. G., Topol C. E., Crossgrove K.* Assessing the genetic composition of invasive knotweeds (*Reynoutria*, Polygonaceae) using data from the first intron and second exon of the nuclear *LEAFY* gene. *Invasive Plant Sci. Manag.* 2025. Vol. 18. P. e1. doi: 10.1017/inp.2024.36
  21. *Tynkevich Y. O., Bushyla K. D., Volkov R. A.* Organization of the 5S rDNA intergenic spacer of *Quercus rubra* L. and its relationship to the Ukrainian *Quercus* species. *Factors Exp. Evol. Organisms*. 2020. Vol. 26. P. 125–131. [In Ukrainian] / Тинкевич, Ю. О., Бушила, К. Д., Волков, Р. А. Організація міжгенного спейсера 5S рДНК *Quercus rubra* L. та його спорідненість з українськими видами роду *Quercus*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 2020. Т. 26. С. 125–131. doi: 10.7124/FEEO.v26.1254
  22. *Tynkevich Y. O., Cherkazianova A. S., Chorney I. I., Panchuk I. I., Volkov R. A.* Genetic polymorphism of invasive species of knotweed (*Reynoutria*) assessed by the *matK* and *rpl32-trnL* (UAG) regions of chloroplast DNA. *Cytol. Genet.* 2025. Vol. 59(3). P. 259–269. doi: 10.3103/S0095452725030089
  23. *Tynkevich Y. O., Moysiienko I. I., Volkov R. A.* The use of the intergenic spacer region *psbA-trnH* of the chloroplast genome for the analysis of the taxonomic position and genetic polymorphism of the Ukrainian populations of *Tulipa quercetorum* Klokov et Zoz. *Bull. Ukr. Soc. Genet. Breed.* 2022. Vol. 20(1–2). P. 8–15. [In Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Мойсієнко І. І., Волков Р. А. Використання міжгенної спейсера *psbA-trnH* хлоропластного геному для аналізу таксономічного положення та генетичного поліморфізму українських популяцій *Tulipa quercetorum* Klokov et Zoz. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2022. Т. 20(1–2). С. 8–15. doi: 10.7124/visnyk.utgis.20.1-2.1508
  24. *Tynkevich Y. O., Nord K. V., Ivanovych Y. I., Moysiienko I. I., Panchuk I. I.* Analysis of the taxonomic status of *Limonium caspium* (Willd.) P. Fourn. using the ITS1-5.8S-ITS2 region. *Chernivtsi Univ. Sci. Herald. Biol. (Biol. Syst.)*. 2023. Vol. 15(2). P. 165–170. [In Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Норд К. В., Іванович Ю. І., Мойсієнко І. І., Панчук І. І. Аналіз таксономічного статусу *Limonium caspium* (Willd.) P. Fourn. з використанням ділянки ITS1-5.8S-ITS2. *Наук. вісн. Чернівець. ун-ту. Біологія (Біологічні системи)*. 2023. Т. 15(2). С. 165–170. doi: 10.31861/biosystems2023.02.165
  25. *Tynkevich Y. O., Yakobysheva D. V., Cherkazianova A. S., Shelyfist A. Y., Volkov R. A.* Intragenomic polymorphism of the ITS1-5.8S-ITS2 region in invasive species of the genus *Reynoutria*. *Cytol. Genet.* 2024. Vol. 58(6). P. 536–546. doi: 10.3103/s0095452724060112
  26. *Wang J., Sun P., Li Y., Liu Y., Yang N., Yu J., ... Wang X.* An overlooked paleotetraploidization in Cucurbitaceae. *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35(1). P. 16–26. doi: 10.2307/2666612
  27. *Weigel D., Alvarez J., Smyth D. R., Yanofsky M. F., Meyerowitz E. M.* *LEAFY* controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*. 1992. Vol. 69(5). P. 843-859. doi: 10.1016/0092-8674(92)90295-n
  28. *Yakobysheva D., Tynkevich Yu., Volkov R.* Genetic polymorphism of invasive plants of the genus *Reynoutria* based on ISSR markers. *Chernivtsi Univ. Sci. Herald. Biol. (Biol. Syst.)*. 2025. Vol. 17(1). P. 22–29. [In Ukrainian] / Якобишен Д., Тинкевич Ю., Волков Р. Генетичний поліморфізм інвазійних рослин роду *Reynoutria* на основі ISSR-маркерів. *Наук. вісн. Чернівець. ун-ту. Біологія (Біологічні системи)*. 2025. Т. 17(1). С. 22–29. doi: 10.31861/biosystems2025.01.022
  29. *Zhang N., Zeng L., Shan H., Ma H.* Highly conserved low copy nuclear genes as effective markers for phylogenetic analyses in angiosperms. *New Phytol.* 2012. Vol. 195(4). P. 923–937. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04212.x
  30. *Zheng X., Hu C., Spooner D., Liu J., Cao J., Teng Y.* Molecular evolution of *Adh* and *LEAFY* and the phylogenetic utility of their introns in *Pyrus* (Rosaceae). *BMC Evol. Biol.* 2011. Vol. 11(1). P. 255. doi: 10.1186/1471-2148-11-255

Стаття надійшла до редакції 1.10.2025  
прийнята до друку 18.10.2025

### LEAFY GENE VARIANTS IN THE GENOMES OF UKRAINIAN SAMPLES OF THE INVASIVE SPECIES REYNOUTRIA SACHALINENSIS

D. V. Yakobysheva, Y. O. Tynkevich, R. A. Volkov

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,  
2 Kotsiubynskoho St., Chernivtsi, Ukraine, 58002  
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Highly variable nuclear genes, such as *LEAFY*, are an effective tool for identifying hybrid/heterozygous forms. However, the widely used method of direct sequencing of PCR products is not suitable for detecting possible intragenomic variants of these genes. Alternative approaches, such as Illumina sequencing of amplicons, make *LEAFY* genes promising markers for barcoding hybrid and polyploid plants. Important objects of such studies are invasive species of the *Reynoutria* genus, which include polyploid forms of hybrid origin. **Aim.** To characterize the polymorphism of the second intron of the *LEAFY* gene in Ukrainian samples of *R. sachalinensis*. **Methods.** PCR amplification, amplicon sequencing using the Illumina method, bioinformatic analysis. **Results.** Six haplotypes were identified in the genomes of three *R. sachalinensis* samples. One of these, H2, is common, while the others are specific to individual samples. Haplotypes H1 and H2 correspond to variants S1 and S2 previously identified in North American specimens. Haplotypes H3–H6 contain a mutation present in certain populations of the species primary range, on Hokkaido and Sakhalin, but is absent in North American specimens. **Conclusions.** Analysis of the second intron sequences of the *LEAFY* gene revealed intragenomic polymorphism in this region in Ukrainian *R. sachalinensis* specimens. The use of Illumina amplicon sequencing of the second intron of the *LEAFY* gene is a promising method for barcoding invasive populations of *Reynoutria* species.

**Keywords:** biodiversity, genetic polymorphism, invasive species, molecular barcoding, *LEAFY*, *Reynoutria*.