

МОЛЕКУЛЯРНА ФІЛОГЕНІЯ ТА ГЕНЕТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ КАРПАТСЬКИХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *MUSCARI* ЗА ПОСЛІДОВНОСТЯМИ ПЛАСТИДНОЇ ДНК

Ю.О. ТИНКЕВИЧ, С.В. БОЙЧУК, А.Є. ШЕЛИФІСТ, І.І. ЧОРНЕЙ, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Рід *Muscari* Mill. (*Asparagaceae* Juss.) включає близько 80 видів, поширених у Євразії, переважно у Середземноморському регіоні. Останні молекулярно-філогенетичні дослідження показали, що таксони, які належать до цієї групи утворюють монофілетичну кладу та є близько спорідненими. Проте, філогенія та статус деяких таксонів *Muscari sensu lato* є предметом дискусій. До цього часу в більшості філогенетичних досліджень роду *Muscari* використовувався майже виключно рослинний матеріал із Середземномор'я, тоді як представники роду з території Карпатського регіону все ще залишаються недослідженими. В цій роботі ми використали сиквенування трьох ділянок хлоропластної ДНК – *psbA-trnH*, *trnT-L* та *trnL-F* – для уточнення філогенетичних відносин в роді *Muscari*, оцінки генетичного поліморфізму і таксономічного статусу українських популяцій *M. botryoides*, а також зразків інших видів цього роду з Карпатського регіону. За результатами філогенетичного аналізу рід *Muscari* виявився монофілетичною групою, яка включає три підроди: *Muscari*, *Muscarimia* та *Pseudomuscari*. Види *Leopoldia* групувалися в межах підроду *Muscari*. Зразки *M. botryoides* з України і Австрії разом із *M. transsilvanicum* з Румунії та *M. serpentinicum*/*M. sandrasicum* з Туреччини формують кладу «*Botryoides*», одну з трьох основних клад, виявлених у підроді *Muscari*. Значна генетична дистанція між українськими зразками *M. botryoides*, зразками цього виду з інших місцезростань та іншими видами роду *Muscari* дозволяє розглядати українські зразки *M. botryoides* у якості нового, раніше неопisanого виду. Порівняння послідовностей досліджених ділянок хлоропластного геному виявило генетичні відмінності між двома групами українських популяцій *M. botryoides*, що можна трактувати як існування двох внутрішньовидових форм.

Ключові слова: біорізноманіття, генетичний поліморфізм, ДНК-баркодинг, молекулярна філогенія, хлоропластна ДНК, *psbA-trnH*, *trnT-L*, *trnL-F*, *Hyacinthinae*, *Muscari botryoides*.

Вступ. Рід *Muscari* Mill. (*Asparagaceae* Juss.) включає близько 80 декоративних та медоносних видів, поширених у Євразії, переважно у Середземноморському регіоні (Boychuk and Budzhak, 2020; Böhnert et al, 2023). Рід *Muscari* разом із *Scilla* L., *Bellevalia* Lapey., *Prospero* Salisb., *Hyacinthella* Schur, *Hyacinthoides* Heist. ex Fabr. та деякими менш чисельними родами включають до підтриби *Hyacinthinae*, триби *Hyacintheae* (Phosser and Speta, 1999, Ali et al, 2012, Nath et al, 2020). На сьогодні філогенія та таксономічний статус багатьох груп в межах *Hyacinthinae* залишаються суперечливими. Зокрема, зважаючи на морфологічні, каріологічні та молекулярні дані запропоновано розділити рід *Scilla* L. на декілька дрібніших родів (Speta, 1998; Phosser and Speta, 1999), частина з яких (*Fessia* Speta, *Zagrosia* Speta, *Pseudoprospetro* Speta, *Merwillia* Speta) визнається в базі даних The World Flora Online (WFO) як окремі, тоді як інші досі розглядаються як синоніми до *Scilla* (*Pfosseria* Speta, *Othocallis* Salisb., *Oncostema* Raf.) (WFO, 2023).

Статус деяких таксонів, які включають до складу *Muscari sensu lato* також є предметом дискусій (Jafari and Maassoumi, 2011). В WFO ця група розділена на три окремі роди: *Muscari* Mill., *Leopoldia* Parl. та *Pseudomuscari* Garbari et Greuter, кожен з яких включає, відповідно, 53, 15 та 7 видів (WFO, 2023). Kew World Checklist of Selected Plant Families визнає ок-

ремим родом *Muscarimia* Kostel. ex Losinsk. (WCSP, 2023). Проте, останні філогенетичні дослідження з використанням молекулярно-генетичних методів показали, що на отриманих дендрограмах *Leopoldia*, *Muscarimia* та *Pseudomuscari* разом з *Muscari* входять до складу єдиної монофілетичної групи (Dizkirici et al, 2019; Böhnert et al, 2023). Отже, їх розглядають у ранзі підродів. Крім того, на основі філогенетичного аналізу результатів повногеномного ddRAD-сиквенування виділяють підроди *Muscari* та *Pulchella* (Böhnert et al, 2023).

У флорі України *Muscari* s. l. представлений чотирма видами: *Muscari botryoides* (L.) Mill., *M. neglectum* Guss. ex Ten., *Leopoldia comosa* (L.) Parl., *L. tenuiflora* (Tausch) Heldr. Один з них, *M. botryoides* занесений до Червоної книги України в статусі зникаючого виду (Didukh, 2009). Також, для Закарпатської області згадується ще один вид – *M. transsilvanicum* Schur (Kricsfalussy, 1999; Peregryn, 2012; Kish, 2016). Цей таксон також наводиться для флори Румунії та Угорщини, проте його статус трактується по різному (Boychuk and Budzhak, 2021), оскільки в міжнародних базах даних *M. transsilvanicum* вважається синонімом до *M. botryoides* (WFO, 2023). Для *M. botryoides* в Україні відомо близько десяти місцезростань на території Закарпаття та Передкарпаття (Boychuk and Budzhak, 2020; Boychuk and Budzhak, 2021). До цього часу українські популяції *M. botryoides* досліджувались лише на онтогенетичному та морфологічному рівнях (Boychuk and Budzhak, 2021). Зважаючи на високу мінливість морфологічних ознак, характерну для цього виду (Boychuk and Budzhak, 2021), та залежність їх вираження від умов зростання, такий підхід не дозволяє оцінити генетичний поліморфізм та уточнити таксономічний статус цих рідкісних рослин української флори. Отже, для відповіді на ці питання необхідне використання молекулярно-філогенетичного аналізу.

За останні роки для уточнення філогенії роду *Muscari* було застосовано порівняння послідовностей хлоропластної та ядерної ДНК. Зокрема, Dizkirici et al (2019) використали чотири ділянки хлоропластної ДНК (хпДНК) при побудові дендрограми для 31 виду *Muscari*, проте серед них *M. botryoides* відсутній. Böhnert et al (2023) провели філогенетичний аналіз як

на основі поліморфізму ділянок хпДНК, так і з використанням даних повногеномного ddRAD-сиквенування. При цьому, єдиний досліджений зразок *M. botryoides* показав найближчу спорідненість до *M. neglectum* Guss. ex Ten. та інших видів підроду *Muscari*. Проте, потенційно близький до *M. botryoides* вид *M. transsilvanicum* (Kish, 2016; Boychuk and Budzhak, 2020) досі залишається неохарактеризованим з використанням молекулярно-філогенетичних методів.

Крім того, сиквенування ділянки *trnL-F* хпДНК *M. botryoides* було використано у філогенетичному та біогеографічному аналізі підроду *Hyacinthoideae* (Phosser and Speta, 1999; Ali et al, 2012). Проте, в цих роботах досліджувалась лише три види *Muscari*, що не дозволяє оцінити положення *M. botryoides* в межах роду.

Також актуальним питанням є залучення до філогенетичного аналізу представників роду *Muscari*, які походять з різних географічних регіонів. До цього часу в більшості досліджень роду *Muscari* використовувався майже виключно рослинний матеріал з Середземноморського регіону (Dizkirici et al, 2019; Böhnert et al, 2023). При цьому генетичний поліморфізм та таксономічний статус представників роду з території Східної Європи залишається невивченим. Особливо це стосується Карпатського регіону, який відрізняється багатою та специфічною флорою (Bojnanský and Fargašová, 2007).

Оскільки переважна більшість досліджень роду *Muscari* проводилась з використанням хлоропластних молекулярних маркерів (Phosser and Speta, 1999; Ali et al, 2012; Dizkirici et al, 2019; Böhnert et al, 2023), доцільним видається використовувати ці маркери і для характеристики українських популяцій *M. botryoides*. Однією з найбільш мінливих ділянок хлоропластного геному вважається міжгенний спейсер (intergenic spacer – IGS) *psbA-trnH* (Pang et al, 2012; Coissac et al, 2016; Mehmood et al, 2020). Його послідовність була успішно використана для філогенетичного аналізу багатьох груп дводольних та однодольних рослин (Simeone et al, 2018; Andrino et al, 2021; Oyundelger et al, 2022). Раніше сиквенування ділянки *psbA-trnH* хпДНК було застосовано нами для характеристики генетичної мінливості зразків *M. botryoides* з трьох українських популяцій (Tynkevich et al, 2022a). Іншими регіонами

хпДНК, які містять значну кількість варіабельних сайтів і можуть бути успішно використані у молекулярній філогенетиці роду *Muscari* є IGS *trnT-L* та *trnL-F* (Dizkirici et al, 2019).

В цій роботі ми використали три ділянки хпДНК – *psbA-trnH*, *trnT-L* та *trnL-F* – для аналізу генетичного поліморфізму українських популяцій *M. botryoides* та оцінки філогенетичного положення цього виду в межах роду *Muscari*.

Матеріали і методи. Рослинний матеріал. Насіння *M. botryoides* відібрали з дев'яти природних популяцій на території Західної України

(табл. 1, рис. 1, 2) Отримані з цього насіння рослини культивували в умовах відкритого ґрунту. Два зразки *M. armeniacum* H.J. Veitch були надані Ботанічним садом Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича та придбані на квітковому ринку. Крім того, для дослідження були використані зразки чотирьох видів роду *Muscari* з гербарію Чернівецького національного університету (CHER). Більш детальну інформацію про рослинні зразки наведено в табл. 1.

Морфологічний аналіз. Морфометричні заміри робились для 25–30-ти генеративних осо-

Таблиця 1. Рослинний матеріал та послідовностей хлоропластної ДНК, отримані у цій роботі

Назва зразка	Країна/регіон	GenBank Acc. No			Посилання
		<i>psbA-trnH</i>	<i>trnT-L</i>	<i>trnL-F</i>	
<i>Muscari botryoides</i> (L.) Mill.					
MuBot1	Україна/Івано-Франківська обл., с. Вишнівка	OQ831812	OQ831827	OQ831842	Ця стаття
MuBot2	Україна/Івано-Франківська обл., с. Красноставці	OQ831813	OQ831828	OQ831843	Ця стаття
MuBot3	Україна/Івано-Франківська обл., с. Пробабин	OQ831814	OQ831829	OQ831844	Ця стаття
MuBot4	Україна/Івано-Франківська обл., с. Поділля	OQ831815	OQ831830	OQ831845	Ця стаття
MuBot5	Україна/Чернівецька обл., с. Костинці	OQ831816	OQ831831	OQ831846	Ця стаття
MuBot6	Україна/Чернівецька обл., с. Валява	OQ831817	OQ831832	OQ831847	Ця стаття
MuBot7	Україна/Закарпатська обл., с. Буштино	OQ831818	OQ831833	OQ831848	Ця стаття
MuBot9	Україна/Закарпатська обл., с. Холмовець	OQ831819	OQ831834	OQ831849	Ця стаття
MuBot10	Україна/Тернопільська обл., с. Зелений Гай	OQ831820	OQ831835	OQ831850	Ця стаття
<i>Muscari transsilvanicum</i> Schur.					
MuTra1	Румунія/Клуж	OQ831821	OQ831836	OQ831851	Ця стаття
<i>Muscari armeniacum</i> H.J. Veitch					
MuArm1	Ботанічний сад Чернівецького університету	OQ831822	OQ831837	OQ831852	Ця стаття
MuArm2	Велика Британія/квітковий ринок	OQ831823	OQ831838	OQ831853	Ця стаття
<i>Muscari neglectum</i> Guss. ex. Ten.					
MuNeg1	Румунія/Ясси	OQ831824	OQ831839	OQ831854	Ця стаття
<i>Muscari commutatum</i> Guss.					
MuCom1	Греція	–	–	–	Ця стаття, PAFTOL, ERX4841081

Назва зразка	Країна/регіон	GenBank Acc. No			Посилання
		<i>psbA-trnH</i>	<i>trnT-L</i>	<i>trnL-F</i>	
<i>Leopoldia comosa</i> (L.) Parl.					
LeCom1	Комерційне джерело	—	—	—	Ця стаття, Somanathan and Baysdorfer, 2018; SRX3381817
LeCom3	Україна/Тернопільська обл., с. Колодрібка	OQ831826	OQ831841	OQ831856	Ця стаття
<i>Leopoldia tenuiflora</i> (Tausch) Heldr.					
LeTen2	Україна/Тернопільська обл., с. Добрівляни	OQ831825	OQ831840	OQ831855	Ця стаття
<i>Bellevalia dubia</i> (Guss.) Schult. et Schult.f.					
BeDub1	Греція/Пелопоннес	—	—	—	Ця стаття, PAFTOL, ERX4839897
<i>Prospero autumnale</i> (L.) Speta					
PrAut1	—	—	—	—	Ця стаття, PAFTOL, ERX4839913
<i>Scilla luciliae</i> (Boiss.) Speta					
ScLus1	Норвегія	—	—	—	Ця стаття, NAVF, ERX5335105

Примітка. PAFTOL, Plant and Fungal Trees of Life Project; NAVF, 1500 Genome Skims from the Norwegian Arctic Vascular Flora.

бин із кожної популяції за допомогою цифрового штангенциркуля Торех (31С628) та цифрового мікроскопу SIGETA Expert. Морфологічний аналіз здійснювався з дотриманням методики невиснажливої морфометрії.

У 10-и популяціях *M. botryoides* вимірювалися 17 морфологічних параметрів: Н — висота рослини (мм), LB — довжина цибулини (мм), WB — ширина цибулин (мм), NL — кількість листків (шт.), LL1 — довжина першого листка (мм), WL1 — ширина першого листка (мм), LL2 — довжина другого листка (мм), WL2 — ширина другого листка (мм), LL3 — довжина третього листка (мм), WL3 — ширина третього листка (мм), HS — висота квітконосу (мм), WS — ширина квітконосу (мм), LI — довжина суцвіття (мм), NF — кількість квіток у

суцвітті (шт.), LP — довжина оцвітини (мм), WP — ширина оцвітини (мм), LPLF — довжина квітконіжки нижньої квітки (мм).

Для оцінки міжпопуляційного поліморфізму застосували канонічний дискримінантний аналіз (Marhold, 2011). Статистичну обробку даних та візуалізацію отриманих результатів проводили за допомогою пакету програм Statistica 10.

Виділення ДНК, ПЛР-ампліфікація та секвенування. Геномну ДНК виділяли зі свіжих та гербарних зразків цетавлоновим методом (Porebski et al, 1997). На стадії лізису зразки ДНК додатково обробляли протеїназою К (Sigma-Aldrich, США).

ПЛР-ампліфікацію ділянки *psbA-trnH* проводили з використанням пари праймерів, комплементарних до фланкуючих міжгенний спей-

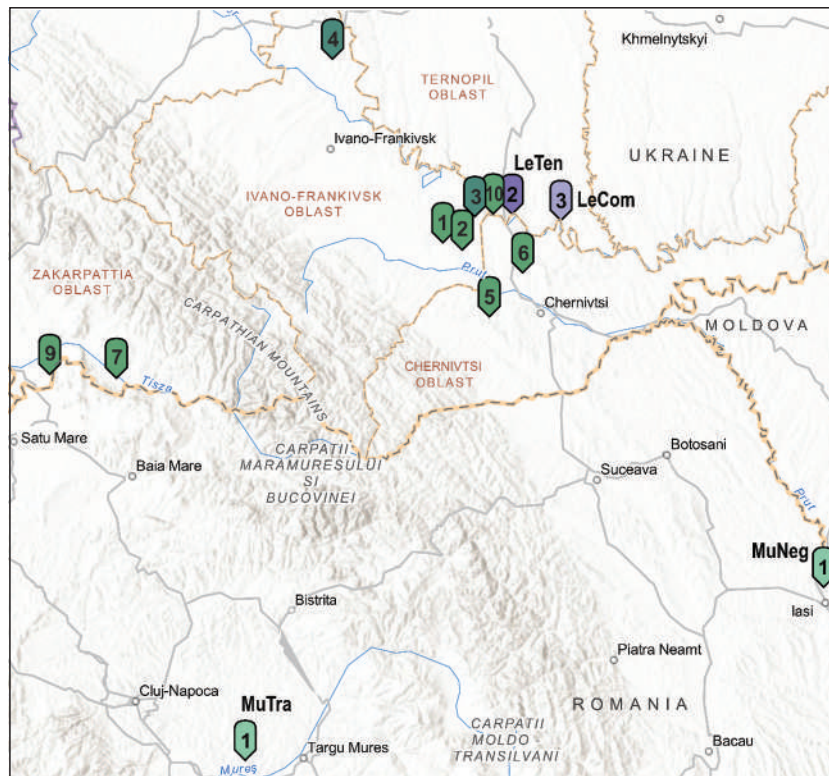


Рис. 1. Поширення досліджених популяцій *Muscari botryoides* (зелені позначки без підписів), *M. neglectum* (MuNeg), *M. transsilvanicum* (MuTra), *Leopoldia comosa* (LeCom) та *L. tenuiflora* (LeTen)

сер ділянок генів *psbA* та *trnH* (Tynkevich et al, 2022a). Ділянки міжгенних спейсерів *trnT-trnL* та *trnL-trnF* ампліфікували з використанням пар праймерів a (прямий) + b (зворотний) та e + f, відповідно (Taberlet et al, 1991).

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 50 мкл містила такі компоненти: 10–30 нг ДНК, 10 мкл 5× полімеразної суміші FIREPol (Solis BioDyne, Естонія) та 2,5 мкМ кожного з двох обраних праймерів. Результати ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу у 2%-вому агарозному гелі. ПЛР-продукти очищали екстракцією хлороформом та сиквенували із застосуванням праймерів, використаних для ампліфікації. Сиквенування зразків проводили на фірмі LGC Genomics (Німеччина). Перевірка якості, анотування нуклеотидних послідовностей та розрахунок рівня подібності послідовностей проводились з використанням програмного забезпечення Chromas та пакету програм DNASTAR (Burland, 1999). Отримані послідовності депонували в базі да-

них GenBank під номерами, зазначеними в табл. 1.

Асемблінг з коротких рідів Illumina. Для аналізу були також використані дані повногеномного Illumina сиквенування для двох видів роду *Muscari*, *M. commutatum* Guss. та *L. comosa* (L.) Parl., і для трьох представників підтриби Hyacinthinae, *Bellevalia dubia* (Guss.) Schult. et Schult. f., *Prospero autumnale* (L.) Speta та *Scilla luciliae* (Boiss.) Speta. Бібліотеки коротких рідів для цих таксонів доступні в базі даних Sequence Read Archive (SRA), NCBI.

Асемблінг ділянок хлоропластного геному був виконаний *de novo* з використанням попередньо відфільтрованих бібліотек парних рідів Illumina з необроблених геномних даних, доступних в базі даних Sequence Read Archive (SRA). Ріди фільтрували шляхом зіставлення з консервативними фрагментами послідовностей *psbA-trnH*, *trnT-trnL* та *trnL-trnF* довжиною 20 нп, використовуючи вбудований інструмент на сторінці завантаження послідовності: <https://>

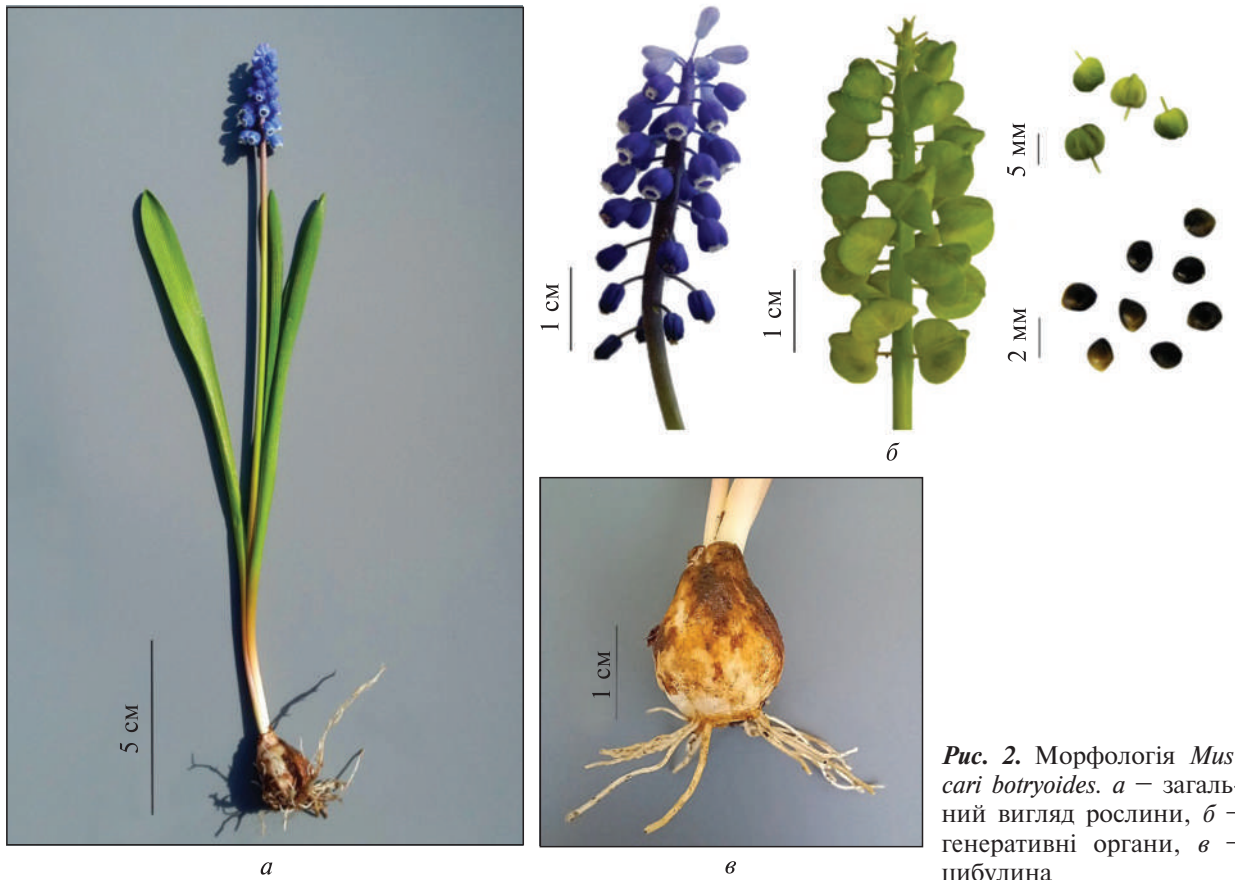


Рис. 2. Морфологія *Muscari botryoides*. а – загальний вигляд рослини, б – генеративні органи, в – цибулина

trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=search_seq_name. *De novo* асемблінг проводили за допомогою програми SeqMan NGen 14, DNASTAR (Burland, 1999). Для бібліотеки відфільтрованих рідів проводили автоматичний трімінг за якістю, застосовуючи наступні параметри асемблінгу: mer size – 31, мінімальний відсоток збігу (minimum match percentage) – 100 % та coverage threshold – 10 рідів.

Крім того, було використано послідовності хпДНК видів *Muscari*, оприлюдненні раніше (Phosser and Speta, 1999; Dizkirici et al, 2019; Vцhnert et al, 2023). Для представників підтриби Hyacinthinae послідовності досліджуваних ділянок було ідентифіковано в повних хлоропластних геномах, які доступні у базі даних GenBank або взято з роботи Grundmann et al (2010) (табл. 1).

Філогенетичний аналіз. Послідовності ділянок хлоропластного геному *psbA-trnH*, *trnT-trnL* та *trnL-trnF* для всіх використаних таксонів

були об'єднані та вирівняні методом E-INS-I, реалізованим на сервері MAFFT (Kato et al, 2019). Отримане вирівнювання перевірялося та коригувалося вручну за допомогою програми UGENE (Okonechnikov et al, 2012).

Для порівняння генетичних дистанцій між популяціями *M. botryoides* та іншими видами роду *Muscari* був використаний аналіз методом основних компонент (PCA – principal component analysis). PCA проводили в програмі Jalview (Waterhouse et al, 2009) на основі вирівнювання трьох ділянок хлоропластного геному для зразків з дев'яти популяцій *M. botryoides* та восьми зразків інших шести видів *Muscari* (табл. 1). Розрахунок здійснювали на основі попередньо анотованих особливостей сиквенсів, зокрема – нуклеотидних замін, інделів (інсерцій та делецій) та інверсій.

Модель найкращої відповідності нуклеотидних замін оцінювали за найменшим значенням Бассового інформаційного критерію (BIC)

за допомогою інструмента Find Best-Fit Substitution Model програми Mega X (Kumar et al, 2018). Філогенетичні дерева були обраховані методами Maximum Likelihood (ML) та Bayesian inference (BI) за допомогою плагінів PhyML 3.3.20180621 (Guindon et al, 2010) та MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001), відповідно. Обидва плагіни реалізовані в програмі Geneious Prime 2021.0.3.2. Для частини видів, досліджених раніше (Dizkirci et al, 2019; Böhnert et al, 2023) у базі даних GenBank відсутні послідовності ділянки *psbA-trnH*. В таких випадках відсутні послідовності оброблялися при аналізі як «missing data». Статистичну підтримку клад розраховували за допомогою aLRT-Chi2 тесту (Anisimova and Gascuel, 2006) для ML дерева та апостеріорної ймовірності для BI. Отримане ML дерево було експортоване у формат Newick та візуалізоване за допомогою онлайн-інструменту «Interactive Tree Of Life» (iTOL v6).

Результати та обговорення. Мінливість морфологічних ознак. Міжпопуляційну мінливість *M. botryoides* оцінювали за допомогою канонічного дискримінантного аналізу, проведеного з урахуванням 17-ти морфопараметрів. На діаграмі розсіювання (рис. 3) зображено розташування популяцій у просторі двох дискримінантних функцій, які пояснюють 80,8 % дисперсії ознак. Найбільш відмежована від інших популяція 1, яка приурочена до лучних ценозів. Особини у її складі менші за габітусом. Також значно відокремлена популяція 10, яка приурочена до лісових угруповань. Для неї навпаки характерні значно більші за розміром рослини. При цьому значення морфологічних параметрів особин з популяції 10 частково перекриваються з параметрами особин з популяції 8 та 9, які теж зростають в умовах лісових ценозів. Найбільш морфологічно подібними виявились рослини з популяції 5 та 6, які зростають у подібних умовах середовища, зближені географічно і, відповідно, групуються на діаграмі. На загал отримані результати свідчать, що факторами дискримінації виступили відмінності умов існування досліджуваних популяцій. Отже, вплив зовнішніх факторів на морфологічні параметри не дозволяє виявити генетичні відмінності між українськими популяціями *M. botryoides*.

Структурний поліморфізм хлоропластної ДНК. Три ділянки хпДНК, *psbA-trnH*, *trnT-trnL* та *trnL-trnF*, були ампліфіковані та сиквензовані нами для зразків з дев'яти українських популяцій *M. botryoides*, двох зразків *M. armeniacum*, а також зразків *M. neglectum*, *M. transsilvanicum*, *L. comosa* та *L. tenuiflora* (табл. 1). Крім того, ці три ділянки були зібрані нами для *M. commutatum* та *L. comosa* з повногеномних бібліотек коротких рідів Illumina, депонованих в базі даних SRA. Для всіх трьох маркерів було проведено вирівнювання та оцінено міжвидовий та міжпопуляційний поліморфізм (табл. 2).

Найбільшу довжину вирівнювання мала ділянка *trnT-L*, а найменшу – *trnL-F*. Довжина сиквензованих нами ділянок *psbA-trnH* у представників роду *Muscari* суттєво перевищує таку для представників більшості інших родів, як однодольних, так і дводольних рослин (Pang et al, 2012). Це пов'язано з інсерцією гена *rps19* у спейсер між генами *psbA* та *trnH*. Ця інсерція характерна для представників всіх родів родини Asparagaceae та для багатьох інших родів однодольних рослин (Pang et al, 2012). Вочевидь, низький темп еволюції нуклеотидної послідовності гена *rps19* призводить до високої подібності між ділянками IGS *psbA-trnH* у видів роду *Muscari* у порівнянні з цією ж ділянкою у інших родів дводольних та однодольних рослин (Pang et al, 2012; Coissac et al, 2016). Цим пояснюється і менша кількість варіабельних сайтів порівняно з двома іншими сиквендованими нами фрагментами хлоропластного геному представників роду *Muscari*.

У частини досліджених зразків в IGS *psbA-trnH* спостерігається інверсія послідовності, що відповідає петлі (stem-loop region) в районі 3' UTR мРНК *psbA* (Štorchová and Olson, 2007). Наявність двох варіантів цієї інверсії у представників різних популяцій *M. botryoides* призводить до появи дванадцяти SNP. Зважаючи на те, що інверсія являє собою єдину еволюційну подію, яка неодноразово відбувалась у різних представників в межах одного таксону (Štorchová and Olson, 2007; Pang et al, 2012), ці дванадцять SNP не можна вважати таксономічно інформативними. Відповідно, в подальшому аналізі ми уніфікували положення інвертованого фрагменту у всіх послідовностях *psbA-trnH*. Тим не менш, інверсія в ра-

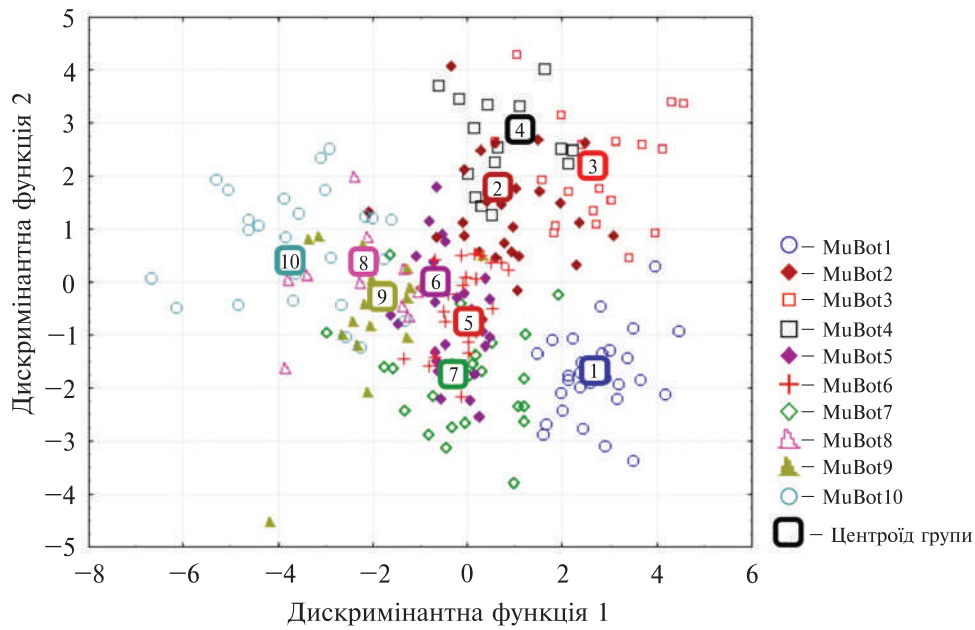


Рис. 3. Діаграма розсіювання морфологічних ознак для особин *M. botryoides* в просторі двох дискримінантних функцій

йоні 3' UTR мРНК *psbA* може бути використана як додатковий молекулярний маркер для мікроеволюційного аналізу популяцій *M. botryoides*. Зокрема, варіант інверсії, який ми назвали InvA наявний у зразках з популяції *M. botryoides* з Чернівецької області, MuBot5

Таблиця 2. Розраховані параметри ділянок хлоропластного геному та об'єднаних матриць для аналізу методом основних компонент (PCA) і філогенетичного аналізу

Параметр	<i>psbA-trnH</i> IGS	<i>trnT-L</i> IGS	<i>trnL-F</i> IGS	Об'єднані матриці
<i>Метод основних компонент</i>				
<i>Muscari/M. botryoides</i>				
Кількість зразків	17/9	17/9	17/9	17/9
Кількість таксонів	7/1	7/1	7/1	7/1
Довжина вирівнювання, нп	564	639	392	1595
Мінливі нуклеотидні позиції	8/0	27/1	11/2	46/3
Парсимоній-інформативні позиції	3/0	15/1	7/2	25/3
Кількість ознак для PCA	13/3	30/3	12/2	55/8
Середня попарна подібність, %	99,4/99,5	96,7/99,8	98,4/99,8	98,1/99,7
<i>Філогенетичний аналіз</i>				
<i>Scilloideae/Muscari</i>				
Кількість зразків	29/17	55/48	61/50	62/50
Кількість таксонів	18/7	41/34	44/34	45/34
Довжина вирівнювання, нп	591	747	419	1757
Варіабельні нуклеотидні позиції	30/8	112/49	77/26	219/83
Парсимоній-інформативні позиції	13/3	51/30	36/17	100/50
Середня попарна подібність, %	94,0/99,4	94,9/96,6	94,4/96,5	94,3/96,7

та з двох популяцій із Закарпатської області, MuBot7 та MuBot9, тоді як у представників решта популяцій цього виду виявлено варіант інверсії InvB. Представники трьох популяцій, які мають варіант InvA, демонструють відносну подібність і за морфологічними ознаками (рис. 3), хоча приурочені до різних біотопів: MuBot5 та MuBot7 до лучних, а MuBot9 до лісового. Разом ці дані можуть говорити про генетичну спорідненість цих популяцій.

В послідовності *psbA-trnH* також знайдений індел довжиною 7 нп, який відрізняє зразки з популяцій MuBot3 та MuBot4 від решти. Цей індел, як і більшість інделів у *psbA-trnH* є нестабільною ознакою, оскільки може багаторазово виникати у представників одного таксону (Štorchová and Olson, 2007). Проте, генетична відмінність рослин з популяцій MuBot3 та MuBot4 від решти українських популяцій *M. botryoides* підтверджується також наявністю одного SNP у ділянці IGS *trnT-L* та двох SNP у IGS *trnL-F*.

Аналіз методом основних компонент. Після об'єднання трьох сиквенованих ділянок та їх вирівнювання загальна довжина отриманої нуклеотидної матриці склала 1595 нп. Всі нуклеотидні заміни, індели та інверсія в послідовностях трьох хлоропластних ділянок були анотовані нами як окремі ознаки для проведення PCA. Отримані результати показують, що зразки підроду *Leopoldia* утворюють компактну групу. При цьому, генетична дистанція між цією групою та деякими видами підроду *Muscari* співставна з такою між представниками цього підроду (рис. 4). Цікаво, що зразок *L. comosa* (LeCom1) виявився ближче спорідненим до *L. tenuiflora* (LeTen2), ніж до іншого зразку *L. comosa* (LeCom3).

Види підроду *Muscari* демонструють значно більші дистанції між собою, ніж види підроду *Leopoldia*. Найбільш віддаленими за координатами основної компоненти виявились *M. botryoides* та *M. commutatum*. Найближче до зразків *M. botryoides* розташовується *M. transsilvanicum*. Проте, значна дистанція між ними відповідає статусу окремих видів. Зразки *M. botryoides* групуються разом. В межах цієї групи чітко відокремлюються зразки MuBot3 та MuBot4, які відрізняються від решти зразків цього виду наявністю специфічних ознак (SNP

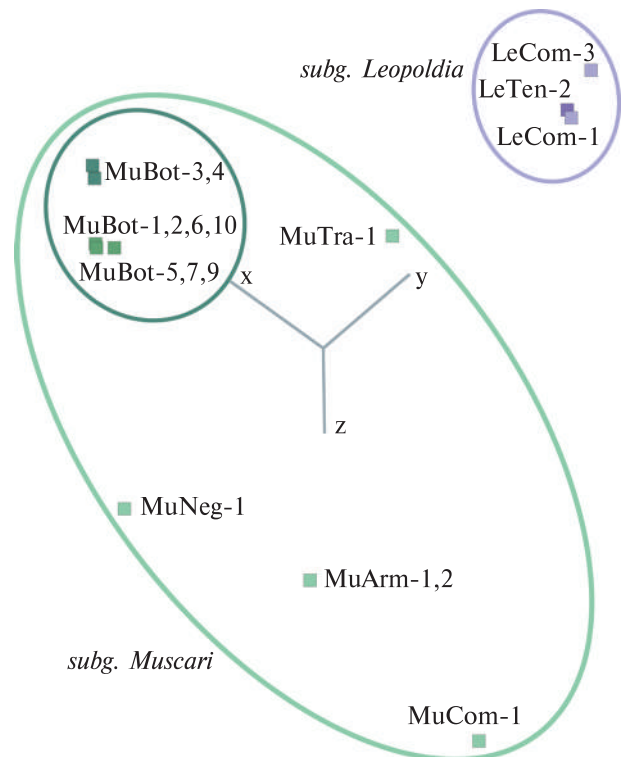


Рис. 4. Візуалізація результатів PCA аналізу генетичної спорідненості зразків роду *Muscari* за послідовностями ділянок хлоропластного геному *psbA-trnH*, *trnT-L*, *trnL-F*

та інделу) в усіх трьох ділянках хлоропластного геному.

Філогенетичний аналіз. В результаті вирівнювання отриманих нами та оприлюднених раніше послідовностей хпДНК видів роду *Muscari* та споріднених родів підтриби Hyacinthinae (Phosser and Speta, 1999; Grundmann et al, 2010; Dizkirici et al, 2019; Böhnert et al, 2023), була побудована нуклеотидна матриця довжиною 1757 нп. ML та BI філогенетичні аналізи продукували дендрограми з дуже подібною топологією (рис. 5). Визначення статистичної підтримки методами aLRT-Chi2 та апостеріорної ймовірності показало, що абсолютна більшість вузлів має рівень підтримки 90–100 % за обома методами.

Серед представників підтриби Hyacinthinae, використаних у філогенетичному аналізі в якості зовнішніх груп, привертає увагу поліфілетичне групування видів роду *Scilla*. Спроби таксономічної ревізії цього роду робились вже

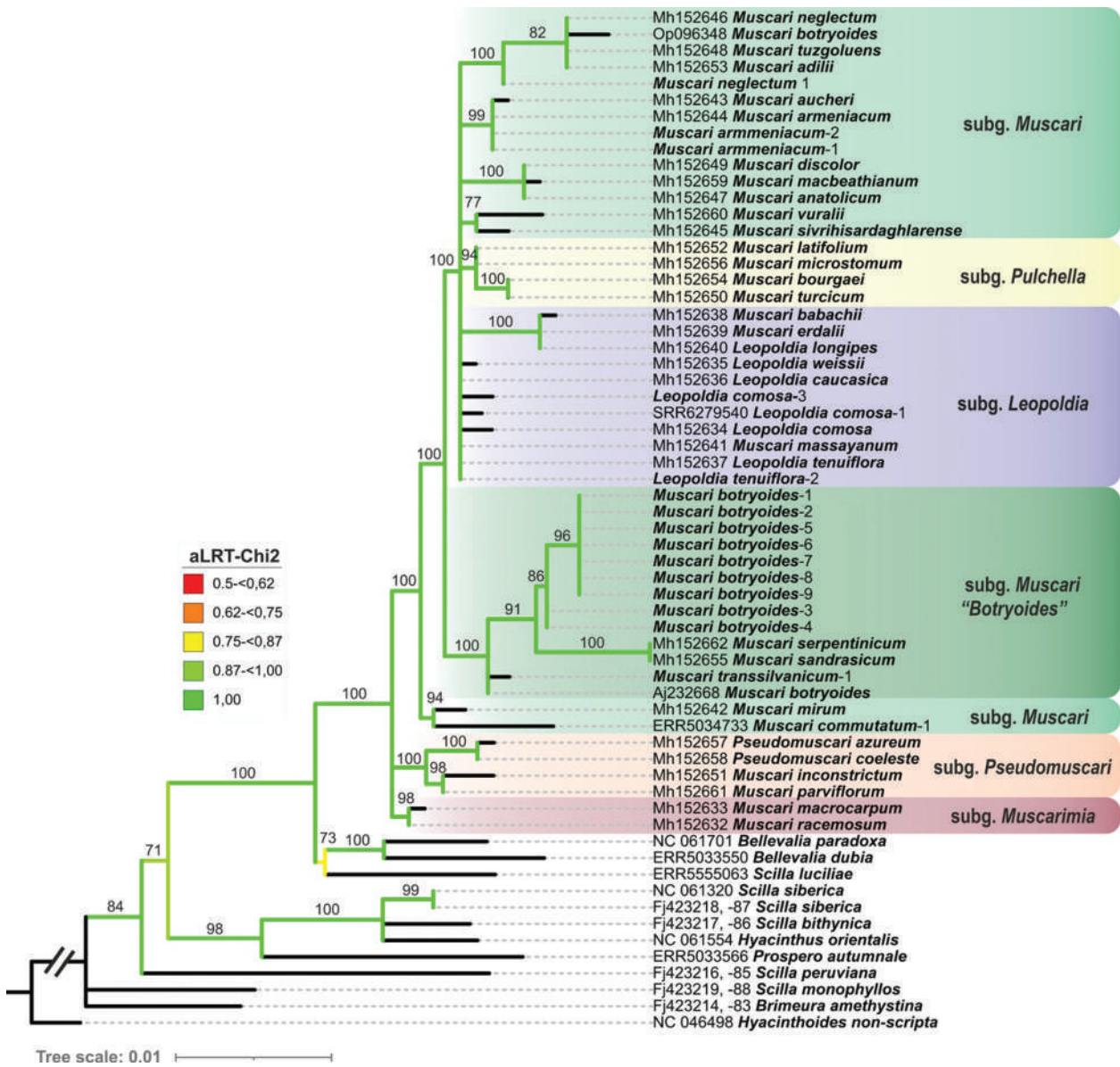


Рис. 5. Maximum Likelihood філогенетична дендрограма, отримана при порівнянні послідовностей ділянок хлоропластного геному *psbA-trnH*, *trnT-L*, *trnL-F* представників роду *Muscari*. Колір клад на дендрограмі відповідає значенням aLRT-Chi2 статистичної підтримки (див. легенду). Показані лише кледи з рівнем aLRT-Chi2 підтримки вище 0,5. Цифрами на дендрограмі вказано значення апостеріорної ймовірності, отримані для відповідних клад з використанням Bayesian Inference філогенетичного аналізу. Для послідовностей, завантажених з бази даних GenBank перед назвою таксону наведені номери доступу. Для послідовностей, отриманих в цій роботі номери доступу вказано у табл. 1. Таксономія роду *Muscari* наведена за Böhnert et al. (2023)

неодноразово (Speta, 1998; Phosser and Speta, 1999; Dashwood and Mathew, 2005). На загал молекулярні дослідження триби Hyacintheae показують, що багато таксонів в роді *Scilla* треба

підвищувати до статусу окремих родів, або приєднувати до інших, вже існуючих родів (Phosser and Speta, 1999; Özüdoğru et al, 2022). Наші результати підтверджують таку точку зору.

На противагу цьому, рід *Muscari* утворює чітко відокремлену монофілетичну групу, до складу якої у якості внутрішніх груп входять *Leopoldia* та *Pseudomuscari* (рис. 5). Таким чином, наші дані, як і дані попередніх досліджень (Dizkirici et al, 2019; Böhnert et al, 2023), не підтримують виділення цих двох груп у окремі роди.

В межах роду *Muscari* виявлено три клади, які мають високу статистичну підтримку: *Muscari*, *Leopoldia* і запропонований Böhnert et al (2023) новий підрід *Pulchella*. У філогенетичному аналізі Dizkirici et al. (2019) з використанням чотирьох хлоропластних локусів (*matK*, *trnT-trnL*, *trnL* intron та *trnL-trnF*) представники *Muscari* утворювали сестринську групу по відношенню до всіх інших груп роду *Muscari*. Аналогічний результат був отриманий Böhnert et al (2023) у філогенії на основі ddRAD-сиквенування. Проте, в цій же роботі використання для філогенетичного аналізу трьох хлоропластних локусів (*trnK(matK)-psbA*, *trnL-trnF*, *rpl16*) показало, що сестринською до інших *Muscari* є група *Pseudomuscari* (Böhnert et al, 2023). Таким чином, базальна топологія клади *Muscari* залежить від набору молекулярних даних і її остаточне визначення потребує подальших досліджень.

В межах клади *Muscari* – *Leopoldia* – *Pulchella* першою відгалужується невелика клада з двох видів: *M. mirum* та *M. commutatum* (рис. 5). Аналогічний результат був отриманий раніше із використанням інших комбінацій хлоропластних маркерів (Dizkirici et al, 2019; Böhnert et al, 2023). В аналізі за ddRAD-сиквенуванням з цих двох видів був представлений лише *M. commutatum*, який групувався разом з рештою видів підроду *Muscari*, що правда, з низькою підтримкою (Böhnert et al, 2023). На отриманій нами дендрограмі клада, яка містить більшість видів роду, розгалужується на кладу «Botryoides» та велику дистальну граду. Подібна града утворювалась і в інших дослідженнях з використанням хлоропластних маркерів та за результатами ddRAD-сиквенування (Dizkirici et al, 2019; Böhnert et al, 2023). Імовірною причиною проблем із розділенням груп у дистальній граді є ви-

сока подібність багатьох видів роду *Muscari* на молекулярному рівні.

До виявленої нами клади «Botryoides» відносяться всі українські та один австрійський зразок *M. botryoides*, *M. transsilvanicum* з Румунії, а також близько споріднені види *M. serpentinicum* та *M. sandrasicum* з Туреччини. Згідно з попередніми дослідженнями з використанням хлоропластних маркерів *M. serpentinicum* та *M. sandrasicum* знаходились у великій дистальній граді, але по-різному групувались з іншими видами підроду *Muscari* (Dizkirici et al, 2019; Böhnert et al, 2023). *M. transsilvanicum* вважається синонімом *M. botryoides* (WFO, 2023) або близьким до нього видом (Kricsfalussy, 1999; Peregrym, 2012; Kish, 2016). Наші результати підтримують цю точку зору, адже *M. transsilvanicum* групується з австрійським зразком *M. botryoides*. Проте, зразки *M. botryoides* з території України утворюють окрему кладу і виявляються генетично відмінними від зразку цього виду з Австрії. Ще більшою мірою вони відрізняються від зразку *M. botryoides* з території Греції, який групується разом з рештою видів підроду *Muscari* у складі дистальної гради. В свою чергу, українські зразки *M. botryoides* розподіляються між двома групами, до першої з яких належать зразки MuBot3 та MuBot4, а до другої – всі інші (рис. 5). На загал, наші результати свідчать, що досліджені зразки *M. botryoides* імовірно належать до трьох видів, які представлені (i) зразком з Греції, (ii) зразком з Австрії (+ *M. transsilvanicum*) та (iii) українськими зразками. Ми вважаємо, що генетична дистанція між двома основними варіантами *M. botryoides* з України дозволяє розглядати їх у якості підвидів.

Незважаючи на те, що на дендрограмі всі таксономічні групи в межах роду *Muscari* мають високу статистичну підтримку, ми вважаємо, що в подальшому результати, отримані з використанням послідовностей хпДНК варто перевірити із залученням молекулярних маркерів ядерної локалізації, які раніше успішно використовувались для реконструкції внутрішньородових філогенетичних відносин у інших групах рослин. До таких маркерів, зокрема, належать внутрішні транскрибовані спейсери ITS1/ITS2 (internal transcribed spacers) 35S

рДНК (Grimm et al, 2007; Borzatti von Loewenstern et al, 2013; Saha et al, 2019) та міжгенний спейсер 5S рДНК (Ishchenko et al, 2018; Tynkevich and Volkov, 2019; Ishchenko et al, 2021; Vozárová et al, 2021; Tynkevich et al, 2022b).

Висновки. Філогенетичний аналіз з використанням хпДНК свідчить, що рід *Muscari* являє собою монофілетичну групу, яка включає три підроди: *Muscari*, *Muscarimia* та *Pseudomuscari*. Види групи *Leopoldia* належать до підроду *Muscari*. Українські та австрійська популяції *M. botryoides* разом із *M. transsilvanicum* з Румунії та *M. serpentanicum/M. sandrasicum* із Туреччини утворюють добре підтриману кладу «*Botryoides*», яка є однією з трьох основних клад у складі підроду *Muscari*. Генетична відмінність українських зразків *M. botryoides* від зразків цього виду з інших місцезростань та від інших видів роду *Muscari* дозволяє розглядати українські зразки *M. botryoides* у якості нового, раніше неопisanого виду. Разом з цим, наявність генетичного поліморфізму між українськими популяціями можна трактувати як існування двох внутрішньовидових форм.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей або тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження проводились за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (грант № 0122U001335).

MOLECULAR PHYLOGENY AND GENETIC DIVERSITY OF CARPATHIAN MEMBERS OF THE GENUS *MUSCARI* INFERRED FROM PLASTID DNA SEQUENCES

Y.O. Tynkevich, S.V. Boychuk, A.Y. Shelyfist, I.I. Chorney, R.A. Volkov

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University
Kotsiubynsky str. 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine
E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Genus *Muscari* Mill. (Asparagaceae Juss.) includes about 80 species distributed in Eurasia, mainly in the Mediterranean region. Recent molecular phylogenetic studies have shown that the taxa belonging to this group form a monophyletic clade and are closely related. However, the phylogeny and status of some taxa of *Muscari* sensu lato remain controversial. So far, most phylogenetic stu-

dies of the genus *Muscari* have used almost exclusively Mediterranean plant material, while representatives of the genus from the Carpathian region still remain unexplored. In this work, we used the sequencing of three regions of chloroplast DNA, *psbA-trnH*, *trnT-L* and *trnL-F*, to clarify the phylogenetic relationships in the genus *Muscari*, to assess the genetic polymorphism and taxonomic status of Ukrainian populations of *M. botryoides*, as well as specimens of other *Muscari* species from the Carpathian region. According to the results of the phylogenetic analysis, the genus *Muscari* is a monophyletic group that includes three subgenera: *Muscari*, *Muscarimia* and *Pseudomuscari*. *Leopoldia* species have been placed in the subgenus *Muscari*. Specimens of *M. botryoides* from Ukraine and Austria together with *M. transsilvanicum* from Romania and *M. serpentanicum/M. sandrasicum* from Turkey form the clade «*Botryoides*», one of the three main clades identified in the subgenus *Muscari*. A significant genetic distance between Ukrainian specimens of *M. botryoides*, specimens of this species from other habitats, and other species of the genus *Muscari* allows us to consider the Ukrainian specimens of *M. botryoides* as a new, previously undescribed species. A comparison of the sequences of the investigated regions of the chloroplast genome revealed genetic differences between two groups of Ukrainian populations of *M. botryoides*, which can be interpreted as the existence of two intraspecific forms.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ali SS, Yu Y, Pfosser M, Wetschnig W (2012) Inferences of biogeographical histories within subfamily Hyacinthoideae using S-DIVA and Bayesian binary MCMC analysis implemented in RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies). *Ann Bot* 109(1):95–107. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr274>
- Andrino CO, Sano PT, Inglis PW, Hensold N, Costa FN, Simon MF (2021) Phylogenetics of *Paepalanthus* (Eriocaulaceae), a diverse Neotropical monocot lineage. *Bot J Linn Soc* 195(1):34–52. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa070>
- Anisimova, M., and Gascuel, O., Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative, *Syst. Biol.*, 2006, vol. 55 pp. 539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Böhnert T, Neumann M, Quandt D, Weigend M (2023) Phylogeny based generic reclassification of *Muscari* sensu lato (Asparagaceae) using plastid and genomic DNA., *Taxon* 72(2):261–277. <https://doi.org/10.1002/tax.12864>
- Bojnanský V, Fargašová A (2007) Atlas of seeds and fruits of Central and East-European flora: the Carpathian Mountains region. Springer Science and Business Media 1045 p. <https://doi.org/10.17221/18/2008-pps>
- Borzatti von Loewenstern A, Giordani T, Astuti G, An-

- dreucci A, Peruzzi L (2013) Phylogenetic relationships of Italian *Bellevalia* species (Asparagaceae), inferred from morphology, karyology and molecular systematics. *Plant Biosyst – Int J Dealing Aspects Plant Biol* 147(3):776–787. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.829884>
- Boychuk SV, Budzhak VV (2020) Modern views on phylogeny and systematic position of the genus *Muscari* (Asparagaceae) Miller. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biol Syst)* 12(2):312–318. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.02.312>
- Boychuk SV, Budzhak VV (2021) Intraspecific taxonomy of *Muscari botryoides* s. l. (Asparagaceae s.l./Hyacinthaceae s. str.): history of research and synonymy. *Ukr Bot J* 78(6):407–413. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj78.06.407>
- Burland TG (1999) DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Bioinformatics methods and protocols* 71–91 p. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:71>
- Coissac E, Hollingsworth PM, Lavergne S, Taberlet P (2016) From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. *Mol Ecol* 25(7):1423–1428. <https://doi.org/10.1111/mec.13549>
- Dashwood M, Mathew B (2005) Hyacinthaceae-little blue bulbs. *RHS Plant Trials and Awards. Bulletin Number 11*. Royal Horticultural Society, Wisley, 16 p.
- Didukh Y (2009) Red Data Book of Ukraine. *Roslynniy svit (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom)*, Kyiv: Globalconsulting
- Dizkirici A, Yigit O, Pinar M, Eroglu H (2019) Molecular phylogeny of *Muscari* (Asparagaceae) inferred from cpDNA sequences. *Biologia* 74:205–214. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-00164-0>
- Grimm GW, Denk T, Hemleben V (2007) Evolutionary history and systematics of *Acer* section *Acer* – a case study of low-level phylogenetics. *Plant Syst Evol* 267:215–253. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0572-8>
- Grundmann M, Rumsey FJ, Ansell SW, Russell SJ, Darwin SC et al (2010) Phylogeny and taxonomy of the bluebell genus *Hyacinthoides*, Asparagaceae [Hyacinthaceae]. *Taxon* 59(1):68–82. <https://doi.org/10.1002/tax.591008>
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59(3):307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinf* 17(8):754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO, Kunakh VA, Volkov RA (2018) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol Genet* 52(6):416–421. <https://doi.org/10.3103/S0095452718060105>
- Ishchenko OO, Bednarska IO, Panchuk II (2021) Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol Genet* 55:10–18. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010096>
- Jafari A, Maassoumi AA (2011) Synopsis of *Leopoldia*, *Muscari* and *Pseudomuscari* (Hyacinthaceae) in Iran, with *Leopoldia ghoushtchiensis* sp. nova. In *Annales Botanici Fennici* 48(5):396–400. <https://doi.org/10.5735/085.048.0502>
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinformatics* 20:1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kish R (2016) Chromosome numbers of bulbous monocotyledons of the Transcarpathian flora (Ukraine). *Thaizia* 26(1):21–26.
- Kricsfalussy VV (1999) Critical-systematic analysis of ephemeroide geophytes (Amaryllidales, Liliales) in the East Carpathian flora. *Scient Bul Uzhhorod Univ Ser Biol* 6:21–32.
- Kumar S, Stecher G, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35(635):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Marhold K (2011) Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraspecific levels. *Monographic plant systematics: fundamental assessment of plant biodiversity*. Ruggell: Gantner 73–99.
- Mehmood F, Ubaid Z, Shahzadi I, Ahmed I, Waheed MT, Pocza P, Mirza B (2020) Plastid genomics of *Nicotiana* (Solanaceae): insights into molecular evolution, positive selection and the origin of the maternal genome of Aztec tobacco (*Nicotiana rustica*). *PeerJ* 8:e9552. <https://doi.org/10.7717/peerj.9552>
- Nath S, Sarkar S, Patil SD, Saha PS, Lekhak MM et al (2022) Cytogenetic diversity in Scilloideae (Asparagaceae): a comprehensive recollection and exploration of karyo-evolutionary trends. *Bot Rev* 1–43. <https://doi.org/10.1007/s12229-022-09279-1>
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M (2012) Ugene Team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinf* 28(8):1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Oyundelger K, Harpke D, Herklotz V, Troeva E, Zheng Z (2022) Phylogeography of *Artemisia frigida* (Asteraceae, Asterales) based on genotyping-by-sequencing and plastid DNA data: Migration through Beringia. *J Evol Biol* 35(1):64–80. <https://doi.org/10.1111/jeb.13960/v2/review2>

- Özüdoğru B, Uler AD, Hacıoğlu TB, Yıldırım H (2022) Phylogeny, biogeography, and character evolution in the genus *Scilla* s.l. and its close relatives *Chionodoxa*, *Gemicia*, *Puschkinia*, and *Prospero* (Asparagaceae). *Plant Syst Evol* 308(6):44. <https://doi.org/10.1007/s00606-022-01835-x>
- Pang X, Liu C, Shi L, Liu R, Liang D et al (2012) Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. *PloS one* 7(11):e48833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>
- Peregrym MM (2012) Representation of bulb and bulb-tuberiferous species of the natural flora of Ukraine in protected plant lists of different levels. *Ukr Botan J* 69(6):832–846.
- Phosser M, Speta F (1999) Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences. *Ann Mo Bot Gard* 86(4):852–875. <https://doi.org/10.2307/2666172>
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15(1):8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Saha PS, Jha S (2019) A molecular phylogeny of the genus *Drimia* (Asparagaceae: Scilloideae: Urgineae) in India inferred from non-coding chloroplast and nuclear ribosomal DNA sequences. *Sci Rep* 9(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43968-z>
- Simeone MC, Cardoni S, Piredda R, Imperatori F, Avishai M, Grimm GW, Denk T (2018) Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* Section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *PeerJ* 6:e5793. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26995v1>
- Somanathan I, Baysdorfer C (2018) A bioinformatics approach to identify telomere sequences. *Biotechniques* 65(1):20–25. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0057>
- Speta F (1998) Hyacinthaceae. *Flowering Plants: Monocotyledons: Liliaceae (except Orchidaceae)*, 261–285 p. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7_35
- Štorchová H, Olson MS (2007) The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. *Plant Syst Evol* 268(1):235–256. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0582-6>
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17:1105–1109. <https://doi.org/10.1007/bf00037152>
- Tynkevich YO, Volkov RA (2019) 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol Genet* 53(6):459–466. <https://doi.org/10.3103/S0095452719060100>
- Tynkevich YO, Boychuk SV, Chorney II (2022a) Assessment of the possibility of using the chloroplast genome region *psbA-trnH* for the study of genetic polymorphism of Ukrainian populations of *Muscari botryoides* (L.) Mill. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biol Syst)* 14(2):124–128. <https://doi.org/10.31861/biosystems2022.02.124>
- Tynkevich YO, Shelyfist AY, Kozub LV, Hemleben V, Panchuk II, Volkov RA (2022b) 5S Ribosomal DNA of genus *Solanum*: molecular organization, evolution, and taxonomy. *Front Plant Sci* 13:852406. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.852406>
- Vozárová R, Herklotz V, Kovařík A, Tynkevich YO, Volkov RA, Ritz CM, Lunerová J (2021) Ancient origin of two 5S rDNA families dominating in the genus *Rosa* and their behavior in the Canina-type meiosis. *Front Plant Sci* 12(643548). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643548>
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinf* 25(9):1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- WCSP World Checklist of selected plant families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2023, Published on the Internet; available at <http://wcsp.science.kew.org/> (accessed 7 March 2023).
- WFO World Flora Online, 2023, Available from: <http://www.worldfloraonline.org/> (accessed 7 March 2023)

Надійшла в редакцію 13.05.23
Після доопрацювання 23.05.23
Прийнята до друку 18.09.23