

УДК 577.113.5 + 582.57

<https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.20.1-2.1508>**ВИКОРИСТАННЯ МІЖГЕННОЇ СПЕЙСЕРНОЇ ДІЛЯНКИ
psbA-trnH ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМУ
ДЛЯ АНАЛІЗУ ТАКСОНОМІЧНОГО ПОЛОЖЕННЯ
ТА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ
УКРАЇНСЬКИХ ПОПУЛЯЦІЙ ТЮЛЬПАНУ ДІБРОВНОГО
(*Tulipa quercetorum* Klokov et Zoz)**Ю. О. ТИНКЕВИЧ¹, І. І. МОЙСІЄНКО^{1,2}, Р. А. ВОЛКОВ¹¹ Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2² Херсонський державний університет
Україна, 73000, м. Херсон, вул. Університетська, 27
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Ціль. Тюльпан дібровний (*Tulipa quercetorum*) — включена до Червоної книги України у статусі вразливого виду рослина. Міжнародна ботанічна таксономія вважає *T. quercetorum* синонімом *T. sylvestris*, широкоареального поліморфного виду. Необхідність та характер природоохоронних заходів, спрямованих на збереження українських популяцій *T. quercetorum* залежить від його таксономічного трактування. Відповідно, ми використали хлоропластний маркер *psbA-trnH* для аналізу таксономічного статусу українських популяцій тюльпану дібровного. **Методи.** ПЛР-ампліфікація, сиквенування спейсерної ділянки *psbA-trnH*, біоінформатичний аналіз. **Результати.** Нами сиквеновано чотири послідовності *psbA-trnH* для зразків тюльпану дібровного з різних частин його українського ареалу. Порівняння з послідовностями *psbA-trnH* *T. sylvestris* s. l. показало, що відмінності у спейсерній послідовності *psbA-trnH* пов'язані у першу чергу із олігонуклеотидними інделами. Три з чотирьох зразків *T. quercetorum* з українських популяцій містять в спейсері *psbA-trnH* специфічний варіант інверсії в районі петлі 3' UTR мРНК *psbA*, який не характерний для зразків *T. sylvestris* s. l. **Висновки.** Отримані нами данні свідчать про генетичну унікальність українських популяцій *T. quercetorum*, проте для точного визначення його таксономічного статусу потрібно використання додаткових молекулярних маркерів, бажано ядерної локалізації.

Ключові слова: *psbA-trnH*, ДНК-баркодинг, *Tulipa quercetorum* Klokov et Zoz, *Tulipa sylvestris* s. l.

Вступ. Інтрогресійна селекція тюльпанів з використанням дикорослих видів останнім часом стає основним методом підвищення морфологічної мінливості культурних сортів та привнесення нових корисних ознак (Magasek-Ciolkowska et al., 2012, Qu et al., 2018, Xing et al., 2020, Miri, 2020). Отже, генетичні ресурси дикорослих представників роду *Tulipa* являють собою резервуар потенційно важливих рис для селекції культурних тюльпанів та потребують різностороннього вивчення та збереження. Рід *Tulipa* розповсюджений від Південно-Західної Європи до Південно-Західного Китаю (Wilford, 2006). Основними центрами різноманіття роду вважаються Тянь-Шань, Паміро-Алай та Кавказькі гори (Botschantzeva, 1962). Генетичні ресурси тюльпанів в різних регіонах вивчені дуже нерівномірно. Особливо це стосується використання методів молекулярної філогенії та таксономії. Останнім часом з'явилися дослідження місцевих форм роду з Туреччини (Turktas et al., 2013), Балканського регіону (Hajdari et al., 2021), Ірану (Pourkhaloee et al., 2018, Asgari et al., 2020), Китаю (Li et al., 2021, Liu et al., 2022) та деяких інших регіонів (Kritskaya et al., 2020, Nikitina et al., 2021). Проте, для багатьох територій молекулярна характеристика місцевих форм досі відсутня.

Зокрема, це актуально і для України, територією якої проходить північна межа поширення роду *Tulipa* у Європі (Botschantzeva, 1962).

Найбільше різноманіття тюльпанів в Україні спостерігається у південних областях прилеглих до узбережжя Азовського моря. Загалом в Україні зростає сім видів роду, які занесені у Червону книгу України у статусі вразливих або зникаючих видів (Didukh, 2009; Перегрим, 2012). Зниження чисельності цих рослин пов'язане з агро- та урботрансформацією природних ареалів, а наразі, і з веденням військових дій в їх межах. Таке становище робить збереження біорізноманіття українських представників роду *Tulipa* особливо актуальним. Для вирішення цієї задачі необхідно охарактеризувати рівень унікальності генетичних ресурсів українських тюльпанів. Адже п'ять з семи видових епітетів українських тюльпанів в міжнародній ботанічній номенклатурі вважаються синонімами *T. sylvestris* L. subsp. *australis* (Link) Pamp. (Christenhusz et al., 2013, WFO, 2022). Один з цих видів — тюльпан дібровний (*T. quercetorum* Klokov et Zoz), найбільш широко розповсюджений в Україні (Didukh, 2009).

Використання молекулярних маркерів на основі порівняння послідовностей ДНК за останні 30 років стало методом вибору у філогенетичних та таксономічних дослідженнях рослин (Small et al., 2004; Grimm et al., 2005; Smith and Brown, 2018; Zhuang et al., 2022). Найчастіше використовуються послідовності хлоропластного геному, завдяки простоті їх ампліфікації та можливості прямого сиквенування ПЛР-продуктів (Kelchner et al., 2013; Wang et al., 2020). Для більшості досліджених таксонів вищих рослин найбільш мінливою ділянкою хлоропластного геному виявився міжгенний спейсер (intergenic spacer — IGS) *psbA-trnH*, що зумовило активне використання цього маркеру у таксономічних та філогенетичних дослідженнях рослин в останні роки (Jenks et al., 2013; Simeone et al., 2018; Idrees et al., 2021; Тункевич et al., 2022a, Тункевич et al., 2022b.). В цій роботі ми використали IGS *psbA-trnH* у якості молекулярно-генетичного маркеру для визначення таксономічного статусу тюльпану дібровного.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал з чотирьох географічно-віддалених популяцій *T. quercetorum* був зібраний з природних місцезнаходжень навесні 2022 року (табл. 1). Номенклатуру таксону на-

ведено за Перегрим (2012) та WFO (2022). Загальну геномну ДНК з гербарних зразків виділяли з використанням цетавлону у якості детергенту (Porebski et al., 1997; Panchuk et al., 2007). Для ампліфікації ділянки IGS *psbA-trnH* використовували праймери, з послідовністю, комплементарною до фланкуючих спейсер кодуючих ділянок генів *psbA* та *trnH*. Реакційна суміш для ПЛР містила наступні компоненти: 30 нг ДНК, 4 мкл полімеразної суміші FIREPol 5× Green та 0.5 мкМ кожного з двох праймерів. Загальний об'єм складав 20 мкл. ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора BioRad T100 (BioRad, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази та денатурація ДНК — 95 °C, 2 хв; (2) денатурація ДНК — 95 °C, 30 с; (3) гібридизація праймерів — 57 °C, 30 с; (4) синтез ДНК — 72 °C, 30 с; (5) завершення ампліфікації — 72 °C, 7 хв; припинення реакції — 4 °C; загальна кількість циклів ампліфікації — 37. Результати ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу у 2 % агарозному гелі. ПЛР-продукти очищали екстракцією хлороформом. Для сиквенування зразків застосовували праймери, використані при ампліфікації. Сиквенування проводили на фірмі LGC genomics (Німеччина).

Перевірку якості, анотування нуклеотидних послідовностей та розрахунок рівнів подібності послідовностей проводили за допомогою програмного забезпечення Chromas та пакету програм DNASTAR. Отримані послідовності були депоновані в базу даних GenBank під номерами, наведеними в таблиці 1.

Для геномів видів *Tulipa*, доступних в базі даних повногеномних сиквенування послідовностей (Sequence Read Archive — SRA), був виконаний *de novo* асемблінг ділянок *psbA-trnH* з використанням бібліотек попередньо відфільтрованих рідів, які фільтрували шляхом зіставлення з фланкуючими міжгенний спейсер фрагментами генів *psbA* та *trnH* довжиною 20–25 нп. Фільтрацію рідів проводили за допомогою вбудованого інструменту на сторінці завантаження послідовностей. *De novo* асемблінг здійснювали за допомогою програми SeqMan NGen 14 (пакет DNASTAR Lasergene). Відфільтровані ріди були автоматично обрізані за якістю. Асемблінг проводився за наступних параметрів: k-mer size — 31, minimum match percentage — 100 %, minimum coverage — 50 рідів. В отриманих контігах було ідентифіковано та анотовано по одному

варіанту ділянки *psbA-trnH* для кожного аналізованого геному.

Для порівняння з сиквенсами, отриманими в цій роботі ми використали всі наявні в базі даних GenBank послідовності *psbA-trnH* для *T. sylvestris* L., які депоновані як під визнаним ботанічним ім'ям, так і під синонімічним *T. patens* Agardh. ex Schult.f. Алгоритм E-INS-I використовували для вирівнювання послідовностей *psbA-trnH* в онлайн-версії програми MAFFT v7 (Katoh et al., 2017). Згенероване вирівнювання було перевірене та відредаговане вручну за допомогою програмного забезпечення UGENE (Okonechnikov et al., 2012).

Результати та обговорення

Нами було сиквеновано ПЛР-продукти ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* для чотирьох зразків *T. quercetorum*, які репрезентують центральну частину його ареалу в Україні (Запорізька обл.), крайню західну (Чернівецька обл.) та крайню східну межі (Луганська обл. — табл. 1).

Довжина сиквенованих послідовностей IGS *psbA-trnH* для трьох зразків (TuQue2, TuQue3, TuQue4) дорівнює 386 нп, тоді як для TuQue1 вона становить 371 нп. Різниця у довжині пов'язана із інделом довжиною 15 нп в першій половині послідовності спейсера.

Послідовності зразків TuQue2–4 виявились ідентичними по всій довжині (Рис. 1, табл. 2).

Таблиця 1. Походження використаних в роботі послідовностей *psbA-trnH*

Вид	Підвид чи синонім	Назва зразку	Географічне походження зразку	Genbank / SRA асс.	Посилання
<i>Tulipa sylvestris</i> L.	Syn. <i>T. quercetorum</i> Klokov et Zoz	TuQue1	Ukraine / Luhansk Oblast	OP806294.1	Ця стаття
		TuQue2	Ukraine / Chernivtsi Oblast	OP806295.1	Ця стаття
		TuQue3	Ukraine / Zaporizhzhia Oblast	OP806296.1	Ця стаття
		TuQue4	Ukraine / Luhansk Oblast	OP806297.1	Ця стаття
	subsp. <i>australis</i> (Link) Pamp.	T22	Kosovo	MZ147064.1	Hajdari et al., 2021
		T21	Kosovo	MZ147063.1	Hajdari et al., 2021
		T23	Kosovo	MZ147065.1	Hajdari et al., 2021
	—	TUAUAR01-210514	Northwest Italy	MF543700.1	Unpublished
		—	Germany / Saxony-Anhalt	AJ585047.1	Peterson et al., 2004
		—	—	MT261172.1	Do et al., 2020
		TROM_V_96623	Norway	ERR5555064	Unpublished
	Syn. <i>Tulipa patens</i> Agardh. ex Schult.f.	—	—	NC_061194.1	Unpublished
		—	China / Buerjing County, Xinjiang Province	MT327740.1	Ju et al., 2021
		LJ20190515-2	China / Yuming county, Xinjiang Uygur Autonomous Region	MW077739.1	Li et al., 2021
		CL; SRA: SRS12884261	China / Shenyang, Liaoning Province	SRR19070079	Unpublished
<i>Tulipa gesneriana</i> L.	—	—	China / Yunnan province, Kunming	ON041137.1	Yuan et al., 2022
<i>Tulipa clusiana</i> Redouté	—	—	—	EU939290.1	Zarrei et al., 2009
<i>Tulipa uniflora</i> Besser ex Baker	—	—	—	EU939292.1	Zarrei et al., 2009

Використання міжгенної спейсерної ділянки *psbA-trnH* хлоропластного геному для аналізу...

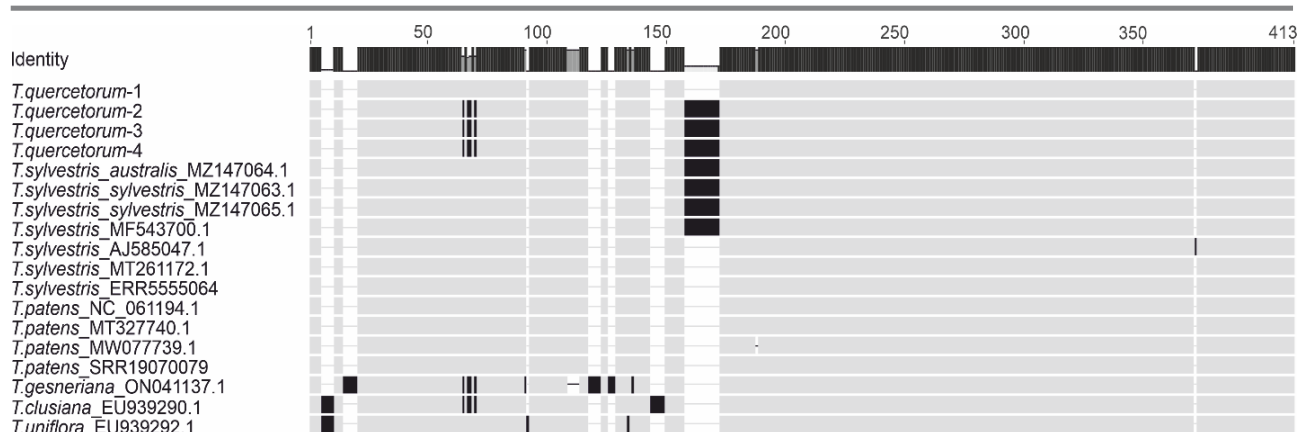


Рис. 1. Схема вирівнювання нуклеотидної послідовності IGS *psbA-trnH* для представників роду *Tulipa*.

Таблиця 2. Рівень подібності (%) IGS *psbA-trnH* видів роду *Tulipa*

<i>T. quercetorum</i> 1	<i>T. quercetorum</i> 2	<i>T. quercetorum</i> 3	<i>T. quercetorum</i> 4	<i>T. sylvestris_australis_MZ147064.1</i>	<i>T. sylvestris_sylvestris_MZ147063.1</i>	<i>T. sylvestris_sylvestris_MZ147065.1</i>	<i>T. sylvestris_MF543700.1</i>	<i>T. sylvestris_AJ585047.1</i>	<i>T. sylvestris_MT261172.1</i>	<i>T. sylvestris_ERR5555064</i>	<i>T. patens_NC_061194.1</i>	<i>T. patens_MT327740.1</i>	<i>T. patens_MW077739.1</i>	<i>T. patens_SRR19070079</i>	<i>T. gesneriana_ON041137.1</i>	<i>T. clusiana_EU939290.1</i>	<i>T. uniflora_EU939292.1</i>	
	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	94.9	97.1	98.3	1
		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	96.1	96.4	96.4	96.4	96.4	96.1	96.4	91.3	93.5	94.7	2
			100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	96.1	96.4	96.4	96.4	96.4	96.1	96.4	91.3	93.5	94.7	3
				100.0	100.0	100.0	100.0	96.1	96.4	96.4	96.4	96.4	96.1	96.4	91.3	93.5	94.7	4
					100.0	100.0	100.0	96.1	96.4	96.4	96.4	96.4	96.1	96.4	91.3	93.5	94.7	5
						100.0	100.0	96.1	96.4	96.4	96.4	96.4	96.1	96.4	91.3	93.5	94.7	6
							100.0	96.1	96.4	96.4	96.4	96.4	96.1	96.4	91.3	93.5	94.7	7
								96.1	96.4	96.4	96.4	96.4	96.1	96.4	91.3	93.5	94.7	8
									99.8	99.8	99.8	99.8	99.5	99.8	94.7	96.9	98.1	9
										100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	94.9	97.1	98.3	10
											100.0	100.0	99.8	100.0	94.9	97.1	98.3	11
												100.0	99.8	100.0	94.9	97.1	98.3	12
													99.8	100.0	94.9	97.1	98.3	13
														99.8	94.7	96.9	98.1	14
															94.9	97.1	98.3	15
																92.0	93.2	16
																	97.8	17
																		18

TuQue1 крім згаданого інделу відрізняється від решти зразків чотирьома нуклеотидними замінами, які виникли внаслідок інверсії послідовності, що відповідає петлі в районі 3'UTR *psbA* мРНК. Інверсії в цій позиції часто трапляються в різних групах рослин і можуть відбуватися багаторазово у одній і тій же еволюційній лінії, наприклад, в межах одного виду (Štorchová, H., and Olson, 2007; Logacheva et al., 2008; Whitlock et al., 2010; Pang et al., 2012). Відповідно, утворені в результаті таких інверсій множинні нуклеотидні заміни можуть призводити до хибних висновків у філогенетичному аналізі (Whitlock et al., 2010; Pang et al., 2012). Проте, наявність інверсій у близькоспоріднених внутрішньовидових груп вказує на їх генетичну гетерогенність і може бути корисним маркером для баркодингу. Таким чином, можна констатувати наявність генетичного поліморфізму в українських популяціях *T. quercetorum* за послідовністю *psbA-trnH*. Несподіваною виглядає присутність обох виявлених нами варіантів спейсера на території Луганської області. Можливим поясненням цього може бути участь людини у розселенні лісового тюльпану, адже інтродукція цього виду на території Центральної та Північної Європи була поширена ще у IV сторіччі (Kowarik and Wohlgemuth, 2006; Christenhusz et al., 2013; Stefanaki et al., 2022). На території України зустрічаються природній ареал лісового тюльпану з інтродукованим (Stefanaki et al., 2022).

Оскільки в сучасній таксономії *T. quercetorum* вважається синонімом *T. sylvestris*, ми вирішили порівняти українські зразки тюльпану дібровного зі зразками тюльпану лісового різного географічного походження. Для цього ми провели пошук в базі даних GenBank використавши метод Blast. Серед результатів пошуку шість послідовностей *psbA-trnH* були анотовані в базі даних як *T. sylvestris* (з них дві як subsp. *sylvestris* та одна як subsp. *australis*). Також, три зразки були анотовані синонімічною назвою *T. patens* (табл. 1). Крім того, спейсерна послідовність *psbA-trnH* була зібрана нами з коротких Illumina рідів повногеномних бібліотек, депонованих в SRA для двох зразків *T. sylvestris* та *T. patens* (табл. 1). Для порівняння ми використали послідовності спейсера трьох представників інших підродів роду *Tulipa*, а саме: subgenus *Orithyia* — *T. uniflora* Besser ex Baker, subgenus *Clusianae* — *T. clusiana* Redouté та subgenus *Tulipa* — *T. gesneriana* L.

Аналіз вирівнювання отриманого набору послідовностей показав, що різниця між ними в більшості випадків пов'язана із наявністю олігонуклеотидних інделів. В цілому, вирівнювання містить десять таких інделів при лише трьох точкових нуклеотидних замінах. Довжина інделів складає від однієї до 15 нп, проте, найбільш розповсюдженою є довжина 5-6 нп, яка зустрічається у п'яти випадках. Середній попарний рівень подібності між всіма вирівняними послідовностями становить 96,5 %, при цьому, найнижчий рівень подібності — 92,0 % виявлений між *T. gesneriana* та *T. clusiana* (табл. 2). В той же час, окремо між послідовностями *T. sylvestris* s. l. середній попарний рівень подібності дорівнює 97,5 %.

Всі мутації, наявні в IGS *psbA-trnH*, крім однієї одонуклеотидної інсерції, присутньої виключно в послідовності *T. sylvestris*-MT261172.1, розташовані в частині спейсерної послідовності до позиції 200 нп. Знайдені нами для *T. quercetorum* два варіанти інверсії послідовності (InvA та InvB), яка відповідає петлі в районі 3'UTR *psbA*, присутні також і у віддалено споріднених видів роду *Tulipa*. Так варіант InvA, характерний для TuQue1, знайдений і у представника найбільш базальної групи роду — *T. uniflora*. Варіант InvB, характерний для більшості зразків тюльпану дібровного, знайдений також у представників двох інших підродів роду тюльпан: *T. clusiana* та *T. gesneriana*, однак відсутній у всіх інших зразків *T. sylvestris* s. l. Таким чином, наш аналіз підтверджує думку про недоцільність використання інверсії в *psbA-trnH* як ознаки для філогенетичного аналізу, як в межах роду *Tulipa*, так і *T. sylvestris* s. l. зокрема. Проте, наявність цієї ознаки лише у представників українських популяцій *T. sylvestris* s. l. є свідченням їх генетичної унікальності.

Окрім описаної інверсії, в послідовності IGS *psbA-trnH* присутня лише одна спільна для декількох зразків ознака — 15 нп індел в позиції 158 вирівнювання. Оскільки інсерція в цій позиції характерна лише для частини зразків *T. sylvestris* s. l., можна припустити, що вона відбулась вже після відокремлення цього виду. Крім українських зразків тюльпану дібровного ця інсерція трапляється лише у представників лісового тюльпану з території Косово та Північно-Західної Італії (Рис. 1, табл. 1). Послідовності *psbA-trnH* зразків *T. sylvestris* s. l. з Центральної та Північної Європи, а також, з Китаю не містять цієї інсерції. Отже, гіпотетично, цю ознаку мож-

на в подальшому використовувати в якості молекулярного маркера для аналізу процесів міграції тюльпану лісового.

Висновки

Отримані нами данні на основі порівняння нуклеотидної послідовності *psbA-trnH* представників українських популяцій *T. quercetorum* з представниками *T. sylvestris* s. l. свідчать про генетичну відмінність / унікальність популяцій тюльпану дібровного, проте для точного визначення його таксономічного статусу потрібно використання додаткових молекулярних маркерів, бажано ядерної локалізації.

Перелік літератури

1. Asgari D., Babaei A., Naghavi M. R., Kiani M. Biodiversity status of *Tulipa* (Liliaceae) in Iran inferred from molecular characterization. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2020. Vol. 61(3). P. 559–567. doi: 10.1007/s13580-019-00158-0
2. Christenhusz M. J., Govaerts R., David J. C., Hall T. et al. Tiptoe through the tulips—cultural history, molecular phylogenetics and classification of *Tulipa* (Liliaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 2013. Vol. 172(3). P. 280–328. doi: 10.1111/boj.12061
3. Darras A. Overview of the dynamic role of specialty cut flowers in the international cut flower market. *Horticulturae.* 2021. Vol. 7(3). P. 51. doi: 10.3390/horticulturae7030051
4. Didukh Y. P. Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom 2009. Kyiv: Globalconsulting. [In Ukrainian] / Дідух Я. П. Червона книга України. Рослинний світ. 2009. Київ : Глобалконсалтинг
5. Do H. D. K., Kim C., Chase M. W., Kim J. H. Implications of plastome evolution in the true lilies (monocot order Liliales). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2020. Vol. 148. e106818. doi: 10.1016/j.ympev.2020.106818
6. Grimm G. W., Schlee M., Komarova N. Y., Volkov R. A. et al. Low-level taxonomy and intrageneric evolutionary trends in higher plants. From plant taxonomy to evolutionary biology. *Nova Acta Leopold.* 2005. Vol. 92(342). P. 129–145.
7. Hajdari A., Pulaj B., Schmiderer C., Mala X., Wilson B. et al. A phylogenetic analysis of the wild *Tulipa* species (Liliaceae) of Kosovo based on plastid and nuclear DNA sequence. *Adv. Genet.* 2021. Vol. 2(3). e202100016. doi: 10.1002/ggn2.202100016
8. Idrees M., Wang H., Mitra L. P., Zhang Z. Y. et al. Phylogenetic study of *Eriobotrya* (Rosaceae) based on combined cpDNA *psbA-trnH* and *atpB-rbcL* markers. *J. Trop. For. Sci.* 2021. Vol. 33(3). P. 343–348. doi: 10.26525/jtfs 2021.33.3.343
9. Jenks A. A., Walker J. B., Kim S. C. Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (*psbA-trnH*) and nrDNA (ITS) sequence data. *J. Plant Res.* 2013. Vol. 126(4). P. 483–496. doi: 10.1007/s10265-012-0543-1
10. Ju X., Shi G., Chen S., Dai W. et al. Characterization and phylogenetic analysis of the complete chloroplast genome of *Tulipa patens* (Liliaceae). *Mitochondrial DNA Part B.* 2021. Vol. 6(9). P. 2750–2751. doi: 10.1080/23802359.2021.1967799
11. Kato K., Rozewicki J., Yamada K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings Bioinf.* 2017. Vol. 20(4). P. 1160–1166. doi: 10.1093/bib/bbx108
12. Kelchner S. A., Group B. P. Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013. Vol. 67(2). P. 404–413. doi: 10.1016/j.ympev.2013.02.005
13. Kowarik I., Wohlgemuth J. O. *Tulipa sylvestris* (Liliaceae) in northwestern Germany: a non-indigenous species as an indicator of previous horticulture. *Polish Botanical Studies.* 2006. Vol. 22. P. 317–331.
14. Li J., Price M., Su D. M., Zhang Z., et al. Phylogeny and comparative analysis for the plastid genomes of five *Tulipa* (Liliaceae). *Biomed Res. Int.* 2021. Vol. 2021. P. 1–10. doi: 10.1155/2021/6648429
15. Liu G., Lan Y., Qu L., Zhao Y. et al. Analyzing the genetic relationships in *Tulipa* based on karyotypes and 5S rDNA sequences. *Sci. Hortic.* 2022. Vol. 302. e111178 doi: 111178. 10.1016/j.scienta.2022.111178
16. Logacheva M. D., Valiejo-Roman C. M., Pimenov M. G. ITS phylogeny of West Asian *Heracleum* species and related taxa of Umbelliferae–Tordylieae WDJ Koch, with notes on evolution of their *psbA-trnH* sequences. *Plant Syst. Evol.* 2008. Vol. 270(3). P. 139–157. doi: 10.1007/s00606-007-0619-x
17. Marasek-Ciolakowska A., Ramanna M. S., Arens P., Van Tuyl J. M. Breeding and

- cytogenetics in the genus *Tulipa*. *Floricult. Ornam. Biotechnol.* 2012. Vol. 6. P. 90–97.
18. Miri S. M. Artificial polyploidy in the improvement of horticultural crops. *J. Plant Physiol. Breed.* 2020. Vol. 10(1). P. 1–28. doi: 10.22034/JPPB.2020.12490
 19. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Ugene Team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinf.* 2012. Vol. 28(8). P. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
 20. Panchuk I. I., Volkov R. A. A practical course in molecular genetics. Chernivtsi: Ruta. 2007. 120 p. [In Ukrainian] / Панчук І. І. Волков Р. А. Практикум з молекулярної генетики. Чернівці: Рута. 2007. 120 с.
 21. Pang X., Liu C., Shi L., Liu R., et al. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. *PLoS one.* 2012. Vol. 7(11). e48833. doi: 10.1371/journal.pone.0048833
 22. Peregrym M. M. Representation of bulb and bulbotuberiferous species of the natural flora of Ukraine in protected plant lists of different levels. *Ukr. Botan. Journ.* 2012. Vol. 69(6). P. 832–846 [In Ukrainian] / Перегрим М. М. Репрезентативність цибулинних і бульбоцибулинних видів рослин природної флори України в охоронних списках різних рівнів. *Укр. ботан. журн.* 2012. Т. 69(6). С. 832–846.
 23. Peterson A., John H., Koch E., Peterson J. A molecular phylogeny of the genus *Gagea* (Liliaceae) in Germany inferred from non-coding chloroplast and nuclear DNA sequences. *Plant Syst. Evol.* 2004. Vol. 245(3). P. 145–162. doi: 10.1007/s00606-003-0114-y
 24. 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.
 25. Pourkhaloee A., Khosh-Khui M., Arens P., Salehi H. et al. Molecular analysis of genetic diversity, population structure, and phylogeny of wild and cultivated tulips (*Tulipa* L.) by genic microsatellites. *Hort. Environ. Biotech.* 2018. Vol. 59(6) P. 875–888. doi: 10.1007/s13580-018-0055-6
 26. Qu L., Xue L., Xing G., Zhang Y. et al. Karyotype analysis of eight wild *Tulipa* species native to China and the interspecific hybridization with tulip cultivars. *Euphytica.* 2018. Vol. 214(4). P. 1–12. doi: 10.1007/s10681-018-2151-1
 27. Simeone M. C., Cardoni S., Piredda R., Imperatori F. et al. Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *PeerJ.* 2018. Vol. 6. e5793. doi: 10.7287/peerj.preprints.26995
 28. Small R. L., Cronn R. C., Wendel J. F. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Aust. Syst. Bot.* 2004. Vol. 17(2). P. 145–170. doi: 10.1071/SB03015
 29. Smith S. A., Brown J. W. Constructing a broadly inclusive seed plant phylogeny. *Am. J. Bot.* 2018. Vol. 105(3). P. 302–314. doi: 10.1002/ajb2.1019
 30. Stefanaki A., Walter T., van Andel T. Tracing the introduction history of the tulip that went wild (*Tulipa sylvestris*) in sixteenth-century Europe. *Sci. Rep.* 2022. Vol. 12(1). P. 1–18. doi: 10.1038/s41598-022-13378-9
 31. Štorchová H., Olson M. S. The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. *Plant Syst. Evol.* 2007. Vol. 268(1). P. 235–256
 32. Turktas M., Metin Ö. K., Baştuğ B., Ertuğrul F. et al. Molecular phylogenetic analysis of *Tulipa* (Liliaceae) based on noncoding plastid and nuclear DNA sequences with an emphasis on Turkey. *Bot. J. Linn. Soc.* 2013. Vol. 172(3). P. 270–279. doi: 10.1111/j.0024-4074.2004.00194.x
 33. Tynkevich Y. O., Biliay D. V., Volkov R. A. Utility of the *trnH-psbA* region for DNA barcoding of *Aconitum anthora* L. and related taxa. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv.* 2022a. Vol. 31. P. 134–41. [In Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Біляй Д. В., Волков Р. А. Використання ділянки *psbA-trnH* для ДНК-баркодингу *Aconitum anthora* L. та споріднених таксонів. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2022а. Т. 31. С. 134–141. doi: 10.7124/feeo.v31.1500
 34. Tynkevich Y. O., Derevenko T. O., Chorney I. I. Phylogenetic relationships of Ukrainian accessions of *Lathyrus venetus* (Mill.) Wohlf. and *L. vernus* (L.) Bernh. based on the analysis of the *psbA-trnH* region of the chloroplast genome. *Biol. Syst.* 2022b. Vol. 14(1), P. 135–140. [In Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Деревенко Т. О., Чорней І. І. Філогенетична спорідненість українських зразків чини рябої (*Lathyrus venetus* (Mill.) Wohlf.) та чини весняної

- (*L. vernus* (L.) Bernh.) за даними аналізу ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH*. *Біологічні системи*. 2022b Т. 14(1), С. 135–140. doi: 10.31861/biosystems2022.01.039
35. Wang Y. B., Liu B. B., Nie Z. L., Chen H. F. et al. Major clades and a revised classification of *Magnolia* and Magnoliaceae based on whole plastid genome sequences via genome skimming. *J. Syst. Evol.* 2020. Vol. 58(5). P. 673–695. doi: 10.1111/jse.12588
36. WFO World Flora Online. 2022. Available from: <http://www.worldfloraonline.org/> (accessed 27 November 2022)
37. Whitlock B. A., Hale A. M., Groff P. A. Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode. *PLoS one*. 2010. Vol. 5(7). e11533. doi: 10.1371/journal.pone.0011533
38. Wilford R. Tulips: Species and hybrids for the gardener. 2006. Portland, OR: Timber Press, 212 pp.
39. Xing G., Qu L., Zhang W., Zhang Y. et al. Study on interspecific hybridization between tulip cultivars and wild species native to China. *Euphytica* 2020. Vol. 216(4). P. 1–17. doi: 10.1007/s10681-020-02594-x
40. Yuan L., Yan X., Chen X., Zhu X. The complete chloroplast genome of *Tulipa gesneriana* (Liliaceae) and its phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B*. 2022. Vol. 7(7). P. 1255–1256. doi: 10.1080/23802359.2022.2093676
41. Zarrei M., Wilkin P., Fay M. F., Ingrouille M. J. et al. Molecular systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae; Liliales): implications of analyses of nuclear ribosomal and plastid DNA sequences for infrageneric classification. *Ann. Bot.* 2009. Vol. 104(1). P. 125–142. doi: 10.1093/aob/mcp103
42. Zhuang Y., Wang X., Li X., Hu J. et al. Phylogenomics of the genus *Glycine* sheds light on polyploid evolution and life-strategy transition. *Nat. Plants*. 2022. Vol. 8(3). P. 233–244. doi: 10.1038/s41477-022-01102-4

Стаття надійшла до редакції 03.11.2022,
прийнята до друку 24.11.2022

**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**

Y. O. Tynkevich¹, I. I. Moysiienko^{1,2}, R. A. Volkov¹

¹ Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsyubynsky str. 2

² Kherson State University
Ukraine, 73000, Kherson, University str. 27
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua.

Aim. *Tulipa quercetorum* is included in the Red Data Book of Ukraine as a vulnerable species. The International Botanical Taxonomy considers *T. quercetorum* synonymous with *T. sylvestris*, a wide-ranging polymorphic species. The necessity and type of conservation measures aimed at preserving Ukrainian populations of *T. quercetorum* depend on its taxonomic interpretation. Accordingly, we used the chloroplast marker *psbA-trnH* to analyze the taxonomic status of the Ukrainian populations of *T. quercetorum*. **Methods.** PCR amplification, sequencing of the *psbA-trnH* spacer region, and bioinformatic analysis. **Results.** We have sequenced *psbA-trnH* of four accessions of *T. quercetorum* representing different regions of its distribution area in Ukraine. Comparison with the sequences of *T. sylvestris* s. l. showed that the differences in the *psbA-trnH* spacer are mainly represented by oligonucleotide indels. Three out of four samples of *T. quercetorum* from Ukrainian populations contain a specific variant of inversion in the loop region of the 3' UTR of *psbA* mRNA, which is not characteristic for samples of *T. sylvestris* s. l. **Conclusions.** The data obtained indicate the genetic uniqueness of Ukrainian populations of *T. quercetorum*, however, for the accurate determination of its taxonomic status additional molecular markers, preferably of nuclear localization, are required.

Keywords: *psbA-trnH*, DNA-barcoding, *Tulipa quercetorum*, *Tulipa sylvestris* s. l.