

ТИНКЕВИЧ Ю.О., БЛЯЙ Д.В., ВОЛКОВ Р.А.✉

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

✉ r.volkov@chnu.edu.ua, (0372) 58-47-93

ВИКОРИСТАННЯ ДІЛЯНКИ *psbA-trnH* ДЛЯ ДНК-БАРКОДІНГУ
ACONITUM ANTHORA L. ТА СПОРІДНЕНИХ ТАКСОНІВ

Мета. Рід *Aconitum* представлений значною кількістю ендемічних видів у Карпатському регіоні. Частина з цих видів, зокрема *A. pseudanthora* та *A. jacquinii*, занесені до Червоної книги України, проте їх таксономічний статус і, відповідно, важливість збереження природних ресурсів залишаються досі не визначеними. Допомогти у з'ясуванні цих питань можуть методи ДНК-баркодингу, зокрема використання молекулярних маркерів на основі мінливих ділянок хлоропластного геному. **Методи.** Виділення ДНК, ПЛР-ампліфікація, сиквенування ПЛР-продуктів, філогенетичний аналіз. **Результати.** Ампліфіковано та сиквенувано послідовності міжгенного спейсера *psbA-trnH* для зразків *A. pseudanthora* та *A. jacquinii* з території Західної України. З'ясовано, що послідовності спейсера для цих двох видів є ідентичними, проте відрізняються точковими інделами та нуклеотидними замінами від послідовностей *psbA-trnH* зразків *A. anthora* s.l. з територій Західної Європи та Китаю. Філогенетичний аналіз продемонстрував спорідненість представників комплексу *A. anthora* до підроду *Lycoctonum*. **Висновки.** Використання для ДНК-баркодингу міжгенного спейсера *psbA-trnH* дозволяє чітко відрізнити зразки *A. jacquinii* та *A. pseudanthora* з території Західної України від зразків *A. anthora* s.l. іншого географічного походження. Отримані результати підтверджують сітчастий характер еволюції представників роду *Aconitum*.

Ключові слова: *psbA-trnH*, ДНК-баркодинг, *Aconitum*.

Aconitum L. – рід трав'янистих рослин родини жовтецевих (Ranunculaceae). Представники роду являють собою багаторічні або псевдоднорічні рослини. Завдяки високому вмісту алкалоїдів значна частина видів є отруйними рослинами, проте з цієї ж особливості аконіти активно використовуються як в конвенційній, так і в народній, зокрема східній, медицині [1; 2]. За різними оцінками рід *Aconitum* налічує від

250 до 400 видів, які раніше об'єднували в межах трьох підродів: *Aconitum*, *Lycoctonum* та *Gymnaconitum*. Пізніші дослідження за використання молекулярних маркерів показали, що *A. gymnantrum* утворює сестринську кладу до всіх інших представників роду *Aconitum* і, отже, був винесений у монотиповий рід *Gymnaconitum* [3]. Характерними рисами роду є міжвидова гібридизація та значна морфологічна мінливість, що роблять *Aconitum* таксономічно складною групою [4–7].

Рід *Aconitum* поширений переважно в помірних регіонах північної півкулі [8]. У Карпатах знаходиться один із основних центрів родового різноманіття в Європі [9; 10]. У Східних Карпатах трапляється 13 видів, зокрема: шість ендеміків Південно-Східної частини Карпат, один ендемік Карпат загалом та три субендемічні види [9]. Для агрегатного комплексу *A. anthora* L. s.l., який поширений у Лісостеповій зоні Євразії, характерне значне варіювання морфологічних ознак, у зв'язку з чим із його складу виділено низку підвидів і рас, які іноді розглядаються як окремі види. Зокрема, це стосується *A. jacquinii* Rchb. (високогір'я Українських Карпат) та *A. pseudanthora* Włoski ex Pacz Wissjul. (Західне Поділля), які занесені до Червоної книги України в ранзі видів [11]. Проте, за Euro+Med PlantBase, обидва ці види розглядаються як синоніми *A. anthora*. Для визначення рівня їх спорідненості необхідне застосування методів ДНК-баркодингу.

Одним із найчастіше використовуваних для ДНК-баркодингу фрагментів хлоропластного геному є ділянка спейсера між генами *psbA* та *trnH* (*psbA-trnH*). Ця ділянка є однією з найбільш варіабельних у хлоропластному геномі покритонасінних рослин. Аналіз структурної організації *psbA-trnH* у різних груп квіткових рослин показав, що 5'-ділянка спейсера, розташована безпосередньо після гена *psbA*, більш консервативна за довжиною (порівняно з 3'-ділянкою). Ця закономірність може бути

© ТИНКЕВИЧ Ю.О., БЛЯЙ Д.В., ВОЛКОВ Р.А.

пов'язана із еволюційною консервативністю елементів вторинної структури транскриптів 5'-ділянки спейсера, необхідних для посттранскрипційної регуляції експресії гена *psbA* [12]. Послідовність спейсера *psbA-trnH* особливо популярна у дослідженнях рослин на низькому таксономічному рівні, він використовувався, зокрема, для ДНК-баркодингу представників роду *Aconitum*. Використання такої маркерної ділянки дозволяло успішно ідентифікувати представників більшості видів цього роду та вдосконалити його філогенію і таксономію [3; 2; 13]. Виходячи з вищезазначеного, ми використали порівняння нуклеотидної послідовності спейсерної ділянки *psbA-trnH* для ДНК-баркодингу *A. anthora* L. та споріднених таксонів.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були гербаризовані листки *A. jacquinii* та *A. pseudanthora* з гербарію кафедри ботаніки, лісового та садово-паркового господарства Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Географічне походження зразків наведено в таблиці 1. Загальну ДНК екстрагували за модифікованою методикою з використанням цетавлону в якості детергенту [14; 15].

Для ампліфікації ділянки *psbA-trnH* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували пару праймерів, які комплементарні до генів *psbA* та *trnH*. Ці праймери забезпечують ампліфікацію повного міжгенного спейсера та фланкуючих спейсер ділянок цих генів.

Реакційна суміш для ПЛР містила такі компоненти: 10 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, 12 хв.; (2) денатурація ДНК – 95°C, 20 с; (3) гібридизація праймерів – 57°C, 30 с; (4) синтез ДНК – 72°C, 30 с; (5) завершення ампліфікації – 72°C, 8 хв; припинення реакції – 4°C; загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Результати ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу у 2 % агарозному гелі.

Отримані ПЛР-продукти очищали екстракцією хлороформом. Для сиквенування ПЛР-продуктів застосовували праймери, використані

за ампліфікації. Сиквенування зразків проводили на фірмі LGC genomics (Німеччина).

Первинний аналіз результатів сиквенування проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм для обробки даних DNASTAR. Для пошуку гомологічних послідовностей застосували програму BLAST [16]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали методом G-INS-I, імплементованим на сервері MAFFT [17]. Найбільш відповідна модель нуклеотидних замін була визначена за найнижчим значенням Баєсівського інформаційного критерію (Bayesian Information Criterion – BIC) із використанням інструменту Find Best-Fit Substitution Model в програмі Mega X [18]. Філогенетичний аналіз проводили методом Bayesian inference в плагіні MrBayes 2.2.4 програми Geneious Prime 2021.0.3. Чотири незалежні Монте-Карло марковські ланцюги (MCMCs) були запущені по 1,000,000 ітерацій кожен. Древа відбиралися кожні 500 генерацій. Результуюче дерево експортували у форматі Newick та анотували з використанням онлайн інструменту «Interactive tree of life» (iTOL v6).

Результати та обговорення

У результаті ПЛР було отримано *psbA-trnH* ампліфікати для зразків *A. pseudanthora* та *A. jacquinii*. Отримані ПЛР-продукти включали повний спейсер та фланкуючі ділянки кодувальних послідовностей. Їхня довжина, визначена нами за результатами електрофоретичного розділення, складала ~ 330 нп.

Аналіз отриманих сиквенсів показав, що спейсер *psbA-trnH* обох таксонів має однакову довжину 247 нп і є ідентичним за нуклеотидною послідовністю. Пошуковий запит методом BLAST за повною послідовністю спейсера сиквендованих нами зразків у базі даних Genbank повернувся з результатом 878 послідовностей, які належать до 99 таксонів із родовим ім'ям *Aconitum*, із покриттям не менше 50 % від довжини послідовності-запиту. Частина зі знайдених послідовностей була ідентифікована у повних хлоропластних геномах. Як показали результати пошуку, ділянки *psbA-trnH* для *A. pseudanthora* та *A. jacquinii* у базі даних Genbank відсутні. Також не було знайдено жодної послідовності, ідентичної до сиквендованих нами. Найбільшу схожість із отриманими нами сиквенсами показали дві послідовності для зразків *A. anthora* з території Франції та Італії та одна послідовність для *A. anthoroideum* DC. з території

Китаю (табл. 1). Відсоток схожості, визначений алгоритмом BLAST між згаданими послідовностями і сиквенсами *A. pseudanthora* та *A. jacquini*, складав 98,5 % для обох зразків *A. anthora* та 99,5 % для *A. anthoroideum*.

Обидві послідовності *A. anthora* та послідовність *A. anthoroideum* ми порівняли з отри-

маними нами сиквенсами. Оскільки депоновані в Genbank послідовності *A. anthora* не містили приблизно 20 нп на 5'-кінці та 30 нп на 3'-кінці спейсера, було проведено вирівнювання лише наявної частини для всіх послідовностей.

Таблиця 1. Походження послідовностей *psbA-trnH*, використаних у роботі

Вид/зразок	Географічне походження	Походження послідовності	GenBank Acc.No	Посилання
<i>A. jacquini</i> Rchb.	Ukraine: Ivano-Frankivsk region	ПС	-	Ця стаття
<i>A. pseudoanthora</i> Błocki ex Pacz.	Ukraine: Chernivtsi region	ПС	-	Ця стаття
<i>A. anthora</i> L./1	France: Hautes-Pyrenees	Genbank	AF216570.1	[19]
<i>A. anthora</i> L./2	Italy: Lombardy	Genbank	FN675821.1	[1]
<i>A. anthoroideum</i> DC.	China	Genbank	MH195695.1	Unpublished
<i>A. gigas</i> Lév. & Vaniot	Japan	Genbank	LC036503.1	Unpublished
<i>A. lycoctonum</i> L. subsp. <i>vulparia</i>	-	Genbank	KX931249.1	Unpublished
<i>A. chrysotrichum</i> W.T.Wang	-	Genbank	KX931260.1	Unpublished
<i>A. pseudolaeva</i> var. <i>erectum</i>	South Korea	Genbank, геном	KY407562.1	[20]
<i>A. flavum</i> Hand.-Mazz.	-	Genbank, геном	MW839582.1	Unpublished
<i>A. bulleyanum</i> Diels	-	Genbank, геном	OK323949.1	Unpublished
<i>A. pendulum</i> Busch	-	Genbank, геном	MW839578.1	Unpublished
<i>A. coreanum</i> (H.Lév.) Rapaics	South Korea	Genbank, геном	MN400660.1	[8]
<i>A. brachypodium</i> Busch	-	Genbank, геном	NC_041579.1	Unpublished
<i>A. stylosum</i> Stapf	China	Genbank, геном	NC_061704.1	Unpublished
<i>A. nemorum</i> M.Pop.	-	Genbank	FJ821187.1	Unpublished
<i>A. nagarum</i> Stapf,	China	Genbank, геном	NC_061321.1	Unpublished
<i>A. napellus</i> L.	Italy: Lombardy	Genbank	FN675819.1	[1]
<i>A. nipponicum</i> Nakai	Japan	Genbank	LC228523.1	Unpublished
<i>A. kusnezoffi</i> Rchb.	-	Genbank, геном	MK569468.1	[21]
<i>A. chiisanense</i> L.	South Korea	Genbank, геном	KT820665.1	[22]
<i>Delphinium anthriscifolium</i> L.	China: Huixian, Henan	Genbank, геном	MK253461.1	[23]
<i>Gymnaconitum gymnantrum</i> (Stapf) Wei Wang & Z.D.Chen	-	Genbank, геном	KT964697.1	Unpublished

Примітки. ПС – пряме сиквенування; Genbank, геном – ідентифіковано в повному хлоропластному геномі, депонованому в базі даних Genbank.

У результаті вдалося встановити, що послідовності *A. anthora* з Genbank відрізняються від сиквенонаних нами послідовностей однонуклеотидною інсерцією в центральній частині спейсера, трансверсією в позиції 193 вирівнювання для зразка з Франції та двома однонуклеотидними інсерціями в інших позиціях центральної частини спейсера і делецією в тій самій позиції 193 для зразка з Італії. Остання позиція є найбільш мінливою для послідовностей *psbA-trnH* комплексу *A. anthora*. У *A. anthoroideum* з території Китаю у цій позиції спостерігається двонуклеотидна делеція, яка відрізняє його послідовність від українських зразків.

Для того, щоб порівняти мінливість ділянки *psbA-trnH* зразків, які відносяться до комплексного виду *A. anthora*, з її мінливістю для інших груп аконітів та роду загалом, ми завантажили з бази даних Genbank 16 послідовностей IGS *psbA-trnH* для представників різних внутрішньородових груп *Aconitum*. Також для філогенетичного аналізу ми використали послідовності представників двох споріднених родів: *Delphinium* L. та *Gymnaconitum* (Stapf) Wei Wang & Z.D. Chen (табл. 1).

Вирівнювання часткової послідовності IGS всіх використаних для аналізу таксонів *psbA-trnH* виявило високий рівень подібності цієї ділянки як в межах роду, так і відносно представників споріднених родів (рис. 1). Із 220 сайтів вирівнювання 138 виявилися ідентични-

ми для всіх послідовностей. Середня попарна подібність послідовностей дорівнювала 93 %.

На основі вирівнювання був розрахований відсоток подібності між послідовностями спейсерів *psbA-trnH* (табл. 2). Для представників роду *Aconitum* цей показник коливається в межах від 89,5 % до 100 %.

Найнижчий рівень подібності стосовно більшості видів був виявлений для *A. napellus*, що здебільшого пов'язано із восьминуклеотидною делецією, характерною для цього виду. Повністю ідентичні ділянки спейсера, крім *A. pseudanthora* та *A. jacquinii*, були виявлені ще для трьох видів: *A. flavum*, *A. bulleyanum*, *A. pendulum*, а також для *A. brachypodum* і *A. stylosum*. Такий результат виглядає несподіваним, адже ці види відносять до двох філогенетично віддалених секцій підроду *Aconitum*: *A. flavum*, *A. pendulum*, *A. brachypodum* – до sect. *Napellus*, тоді як *A. bulleyanum*, *A. stylosum* – до sect. *Aconitum* [24]. Рівень подібності ділянки *psbA-trnH* між видами *Aconitum* та представниками інших родів складав 85,5–89,1 % для *D. anthriscifolium* та 71,4 %–77,3 % *G. gymnandrum*. Загалом цей показник для *Aconitum* знаходиться в межах, типових для інших родів покритонасінних рослин [25], але є суттєво вищим, порівняно з ядерними маркерами, які використовуються для таксонів низького рангу, зокрема IGS 5S рДНК [26, 27, 28, 29, 30] та ITS 35S рДНК [31, 32, 33].

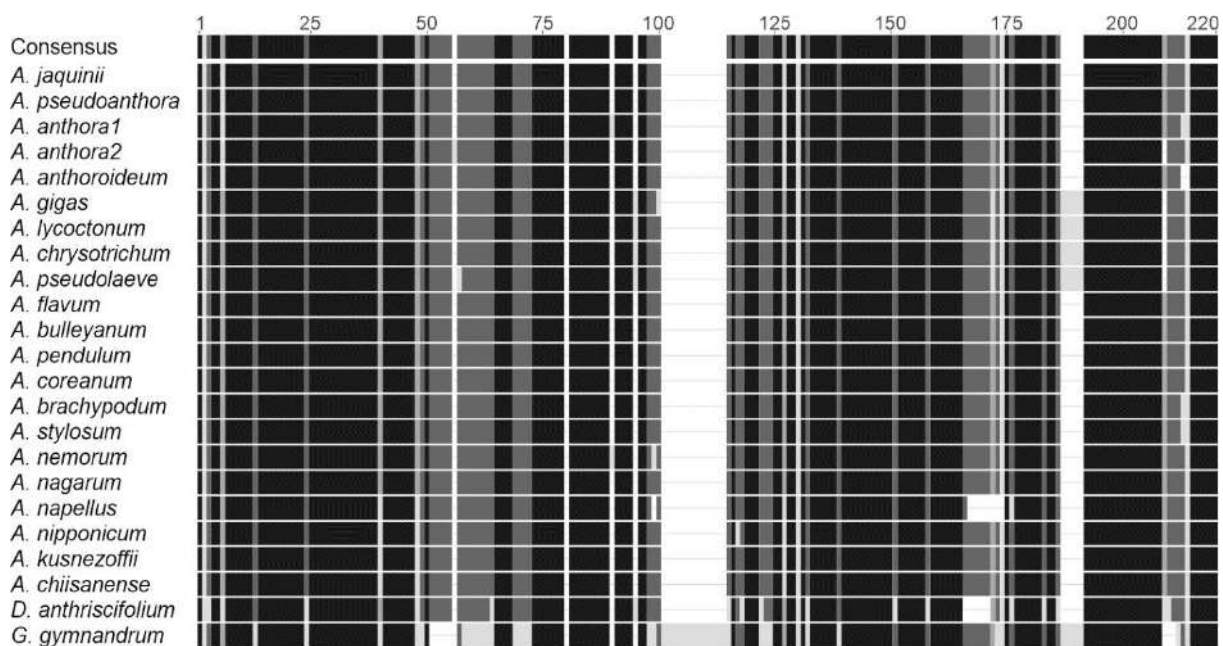


Рис. 1. Схема вирівнювання нуклеотидної послідовності міжгенного спейсера *psbA-trnH* ділянки хлоропластного геному для представників роду *Aconitum*.

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

	<i>A. jaquinii</i>	<i>A. pseudoanthora</i>	<i>A. anthora1</i>	<i>A. anthora2</i>	<i>A. anthoroideum</i>	<i>A. gigas</i>	<i>A. lycoctonum</i>	<i>A. chrysochloricum</i>	<i>A. pseudolaevae</i>	<i>A. flavum</i>	<i>A. bulleyanum</i>	<i>A. pendulum</i>	<i>A. coreanum</i>	<i>A. brachypodium</i>	<i>A. stylosum</i>	<i>A. nemorum</i>	<i>A. nagarum</i>	<i>A. napellus</i>	<i>A. nipponicum</i>	<i>A. kasnezoffii</i>	<i>A. chitsanense</i>	<i>D. anthriscifolium</i>	<i>G. gymnantrum</i>		
	100																								
		98.6																							
			98.6																						
				97.3																					
					98.2																				
						94.1																			
							94.5																		
								94.5																	
									94.1																
										99.5															
											99.5														
												99.5													
													99.5												
														94.1											
															100										
																100									
																	99.1								
																		99.5							
																			99.5						
																				98.6					
																					98.6				
																						97.7			
																							97.3		
																								97.3	
																									96.4
																									96.4
																									96.4
																									96.8
																									97.3
																									88.6
																									88.6
																									75.0
																									75.0
																									73.6
																									74.5
																									74.1
																									76.4
																									76.8
																									77.3
																									76.8
																									74.5
																									74.5
																									74.5
																									75.5
																									71.4
																									74.1
																									15
																									16
																									17
																									18
																									19
																									20
																									21
																									22
																									23

Вирівнювання послідовностей IGS було використано для проведення філогенетичного аналізу методом Bayesian inference (рис. 2).

На філогенетичній дендрограмі, отриманій для всіх порівнюваних послідовностей IGS *psbA-trnH*, у межах роду *Aconitum* наявні дві базові клади із середнім рівнем статистичної підтримки. Одна з них об'єднує лише представників підроду *Aconitum*, тоді як друга розпадається на дві дочірні клади із високим рівнем підтримки. Одна з цих клад об'єднує всіх використаних для аналізу представників підроду *Lycoctonum*, а інша – послідовності зразків, що належать до комплексу *A. anthora*. Вища спорідненість представників цього комплексу до підроду *Lycoctonum*, а не до інших представників підроду *Aconitum*, виглядає несподіваною. Раніше представники комплексу *A. anthora* та спорі-

дженні види лише в поодиноких випадках включалися у філогенетичні дослідження роду *Aconitum*. Результати таких досліджень відрізнялися залежно від використаних молекулярних маркерів [19, 34, 35]. Також за морфологічними ознаками *A. anthora* s.l. інколи розглядали у якості окремого підроду *Anthora* [9]. Суперечливі дані стосовно філогенетичного положення представників комплексу *A. anthora*, отримані з використанням морфологічних методів та різних молекулярних маркерів, можуть бути пов'язані з сітчастою еволюцією цього таксону, а саме гібридизацією між представниками різних груп роду *Aconitum* [4]. Таким чином, внутрішньородова таксономія *Aconitum* досі залишається дискусійною, зокрема і відносно статусу *A. anthora*, який вимагає подальшого прояснення із залученням ширшого набору молекулярних маркерів.

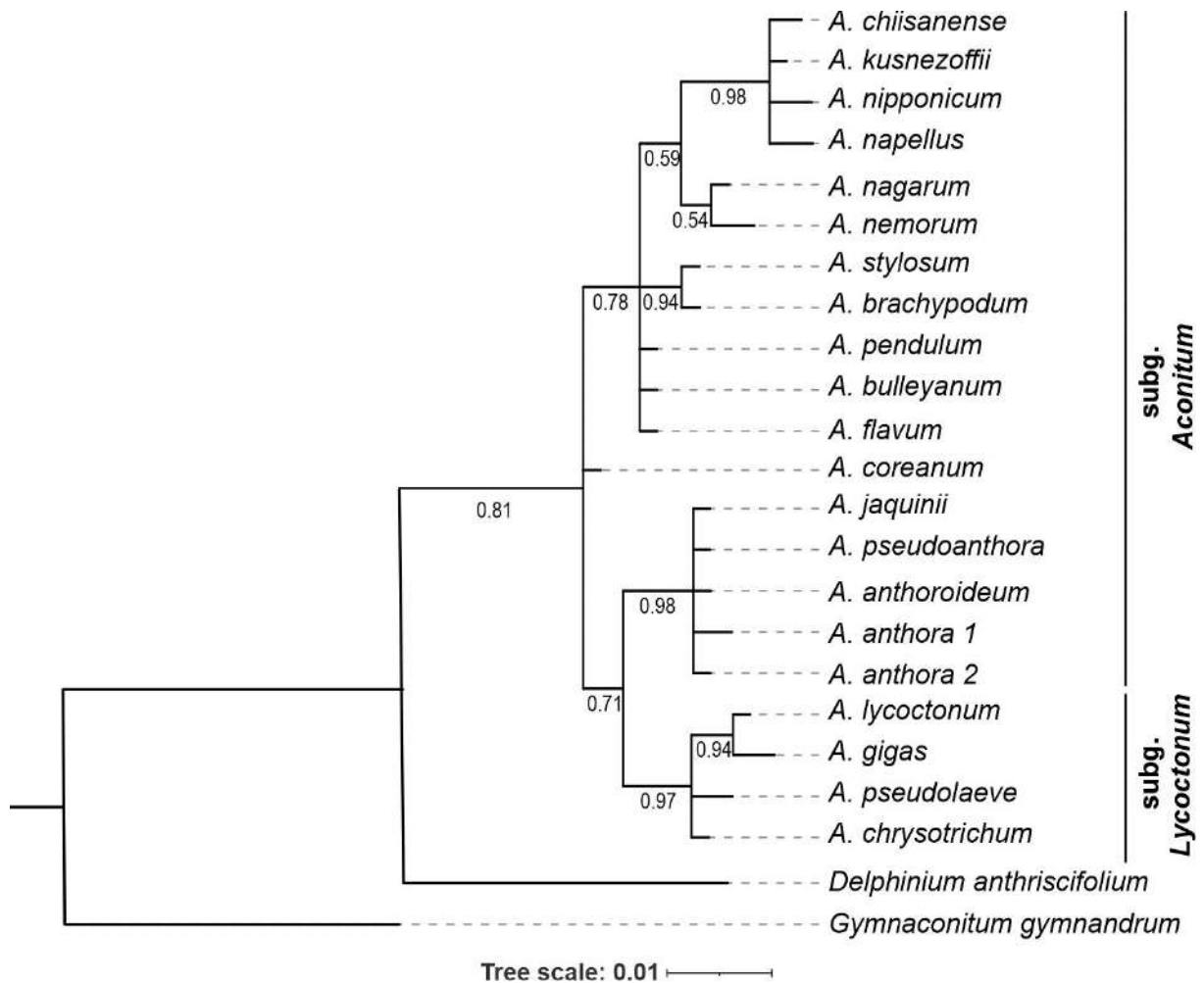


Рис. 2. Bayesian inference філогенетичне дерево роду *Aconitum* за послідовностями IGS *psbA-trnH*. Використана NKY85 модель заміщення. Цифри статистичної підтримки біля вузлів дерева відповідають значенням апостеріорної ймовірності.

Висновки

Ділянка міжгенного спейсера *psbA-trnH* у представників роду *Aconitum* характеризується достатньою мінливістю, яка дозволяє її використання як для філогенетичних досліджень, так і для ДНК-баркодингу близько споріднених видів. Зразки *A. jacquinii* та *A. pseudoanthora* з території Західної України мають унікальну послідовність цієї ділянки хлоропластного геному та чітко

відрізняються від зразків *A. anthora* s.l. іншого географічного походження.

Автори висловлюють щире подяку завідувачу кафедри ботаніки, лісового та садово-паркового господарства Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, професору Чорнею І.І. за наданий рослинний матеріал.

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

References

1. Bruni I., De Mattia F., Galimberti A., Galasso G., Banfi E., Casiraghi M., Labra M. Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. *Int. J. Legal Med.* 2010. Vol. 124 (6). P. 595–603. doi: 10.1007/s00414-010-0447-3
2. He J., Wong K.L., Shaw P.C., Wang H., Li D.Z. Identification of the medicinal plants in *Aconitum* L. by DNA barcoding technique. *Planta medica.* 2010. Vol. 76 (14). P. 1622–1628. doi: 10.1055/s-0029-1240967
3. Wang W., Liu Y., Yu S.X., Gao T.G., Chen Z.D. *Gymnaconitum*, a new genus of Ranunculaceae endemic to the Qinghai–Tibetan Plateau. *Taxon.* 2013. 62 (4). P. 713–722. doi: 10.12705/624.10
4. Mitka J., Sutkowska A., Pnicksi T., Joachimiak A. Reticulate evolution of high-alpine *Aconitum* (Ranunculaceae) in the Eastern Carpathians (Central Europe). *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica.* 2007. Vol. 49 (2).

5. Ziman S.M., Bulakh O.V. Genus *Aconitum* L. (Ranunculaceae Juss.) within the flora of the Ukrainian Carpathians: comparative-morphological and taxonomic study. *Biol. syst.* 2011. Vol. 3 (2). P. 142–149. [in Ukrainian]
6. Garrido-Cardenas J.A., Mesa-Valle C., Manzano-Agugliaro F. Trends in plant research using molecular markers. *Planta*. 2018. Vol. 247 (3). P. 543–557. doi: 10.1007/s00425-017-2829-y.
7. Kumari K., Bhargava S., Singh R. Molecular depiction of thirteen Indian toxic plants with ITS markers. *Arab J. Forens. Sci. & Forens. Med.* 2020. Vol. 2 (2). P. 159–169. doi: 10.26735/YGUY5295.
8. Kim Y., Yi J.S., Min J., Xi H., et al. The complete chloroplast genome of *Aconitum coreanum* (H. Lév.) Rapaics (Ranunculaceae). *Mitochondrial DNA Part B*. 2019. Vol. 4 (2). P. 3404–3406. doi: 10.1080/23802359.2019.1674213.
9. Novikoff A.V., Mitka J. Taxonomy and ecology of the genus *Aconitum* L. in the Ukrainian Carpathians. *Wulfenia* 2011. Vol. 18. P. 37–61.
10. Boron P., Wróblewska A., Binkiewicz B., Mitka J. Phylogeny of *Aconitum* subgenus *Aconitum* in Europe. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2020. Vol. 89 (3). doi: 10.5586/asbp.8933.
11. Didukh Y. Red Data Book of Ukraine. Vegetable Kingdom Afterword. *Biodiversity Research and Conservation*. 2010. Vol. 19. P. 87–92.
12. Storchova 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. doi: 10.1007/s00606-007-0582-6.
13. Hong Y., Luo Y., Gao Q., Ren C., Yuan Q., Yang Q.E. Phylogeny and reclassification of *Aconitum* subgenus *Lycocotnum* (Ranunculaceae). *Plos One*. 2017. Vol. 12 (1). e0171038. doi: 10.1371/journal.pone.0171038.
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. Panchuk I.I., Volkov R.A. Practical course in molecular genetics. Chernivtsi: Ruta. 2007. 120 p. [in Ukrainian]
16. Ye J., McGinnis S., Madden T.L. BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic acids research*. 2006. Vol. 34 (2). P. 6–9. doi: 10.1093/nar/gkl164.
17. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinformatics*. 2019. Vol. 20. P. 1160–1166. doi: 10.1093/bib/bbx108.
18. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35 (635). P. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
19. Utelli A.B., Roy B.A., Baltisberger M. Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae). *Plant Syst. Evol.* 2000. Vol. 224 (3). P. 195–212. doi: 10.1007/BF00986343.
20. Park I., Kim W.J., Yang S., Yeo S.M., Li H., Moon B.C. The complete chloroplast genome sequence of *Aconitum coreanum* and *Aconitum carmichaelii* and comparative analysis with other *Aconitum* species. *Plos ONE*. 2017. Vol. 12 (9). e0184257. doi: 10.1371/journal.pone.0184257.
21. Zhai W., Duan X., Zhang R., Guo C., et al. Chloroplast genomic data provide new and robust insights into the phylogeny and evolution of the Ranunculaceae. *Mol. Phyl. Evol.* 2019. Vol. 135. P. 12–21. doi: 10.1016/j.ympev.2019.02.024.
22. Lim C.E., Kim G.B., Baek S., Han S.M., et al. The complete chloroplast genome of *Aconitum chiisanense* Nakai (Ranunculaceae). *Mitochondrial DNA Part A*. 2017. Vol. 28 (1). P. 75–76.
23. He J., Yao M., Lyu R.D., Lin L.L. Structural variation of the complete chloroplast genome and plastid phylogenomics of the genus *Asteropyrum* (Ranunculaceae). *Scientific reports*. 2019. Vol. 9 (1). P. 1–13.
24. Luo Y., Zhang F.M., Yang Q.E. Phylogeny of *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae) inferred from ITS sequences. *Plant Syst. Evol.* 2005. Vol. 252 (1). P. 11–25. doi: 10.1007/s00606-004-0257-5.
25. 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.
26. Rusak I.I., Petrashchuk V.I., Panchuk I.I., Volkov R.A. Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2016. Vol. 14 (2). P. 216–220. doi: 10.7124/visnyk.utgis.14.2.691. [in Ukrainian]
27. Shelyfist A.Y., Tynkevich Y.O., Volkov R.A. Molecular organization of 5S rDNA of *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2018. Vol. 16 (1). P. 61–68. doi: 10.7124/visnyk.utgis.16.1.903 [in Ukrainian]
28. Tynkevich Y., Bushyla K., Volkov R. Organization of the 5S rDNA intergenic spacer of *Quercus rubra* L. and its relationship to the Ukrainian *Quercus* species. *Factors Experimental Evol. Organisms*. 2020. Vol. 26. P. 125–131. doi: 10.7124/FEEO.v26.1254. [in Ukrainian]
29. 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.
30. Tynkevich Y.O., Kozub L.V., Volkov R.A. Organization and polymorphism of intergenic spiny 5S rDNA spacer of *Prunus spinosa* L. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2021. Vol. 19 (1–2). P. 40–46. doi: 10.7124/visnyk.utgis.19.1-2.1439. [in Ukrainian]
31. Grimm G.W., Schlee M., Komarova N.Y., Volkov R.A., Hemleben V. Low-level taxonomy and intrageneric evolutionary trends in higher plants. From plant taxonomy to evolutionary biology. *Nova Acta Leopoldina*. 2005. 92 (342). P. 129–145.
32. Liu Z.W., Gao Y.Z., Zhou J. Molecular authentication of the medicinal species of *Ligusticum* (*Ligustici Rhizoma et Radix*, “Gao-ben”) by integrating non-coding internal transcribed spacer 2 (ITS2) and its secondary structure. *Front. Plant Sci.* 2019 Vol. 10. P. 429. doi: 10.3389/fpls.2019.00429.
33. Coughlan P., Carolan J.C., Hook I.L., Kilmartin L., Hodkinson T.R. Phylogenetics of *Taxus* using the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and plastid *trnL-F* regions. *Horticulturae*. 2020. Vol. 6 (1). P. 19. doi: 10.3390/horticulturae6010019.

34. Jabbour F., Renner S.S. A phylogeny of Delphinieae (Ranunculaceae) shows that *Aconitum* is nested within *Delphinium* and that Late Miocene transitions to long life cycles in the Himalayas and Southwest China coincide with bursts in diversification. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012. Vol. 62 (3). P. 928–942. doi: 10.1016/j.ympev.2011.12.005.
35. Shyryn A., Ivaschenko A., Kaparbay R., Myrzagalieva A., Turuspekov Y. Phylogenetic assessment of tree species of *Aconitum* L. from Kazakhstan by using ITS and *matK* markers. *Eurasian Union of Scientists*. 2020. Vol. 10 (2). P. 79.

TYNKEVICH Y.O., BILIAI D.V., VOLKOV R.A.

*Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynski str., 2*

UTILITY OF THE *trnH-psbA* REGION FOR DNA BARCODING OF *ACONITUM ANTHORA* L. AND RELATED TAXA

Aim. The genus *Aconitum* is represented in the Carpathian region by a significant number of endemic species. Some of these species, in particular *A. pseudanthora* and *A. jacquinii*, are included in the Red List of Ukraine. However, their taxonomic status and consequently the importance of conserving their natural resources remain uncertain. DNA barcoding techniques, e.g., the application of molecular markers based on variable regions of the chloroplast genome can help clarify these questions. **Methods.** DNA isolation, PCR amplification, sequencing of PCR products, phylogenetic analysis. **Results.** The *psbA-trnH* intergenic spacer region of *A. pseudanthora* and *A. jacquinii* specimens from Western Ukraine was amplified and sequenced. It is shown that the spacer sequences for these two species are identical, but differ in short indels and nucleotide substitutions from the *psbA-trnH* sequences of *A. anthora* s.l. specimens from Western Europe and China. Phylogenetic analyzes showed the phylogenetic affinity of the members of the *A. anthora* complex to the subgenus *Lycotomum*. **Conclusions.** The use of the *psbA-trnH* intergenic spacer region for DNA barcoding makes it possible to unambiguously distinguish samples of *A. jacquinii* and *A. pseudanthora* from western Ukraine from samples of *A. anthora* s.l. of other geographical origins. The results obtained confirm the reticular nature of the evolution in the genus *Aconitum*.

Keywords: *psbA-trnH*, DNA barcoding, *Aconitum*.