

ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ДІЛЯНКИ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМУ *psbA-trnH* ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ УКРАЇНСЬКИХ ПОПУЛЯЦІЙ *MUSCARI BOTRYOIDES* (L.) MILL.

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

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
вул. Коцюбинського, 2, Україна, 58012,
e-mail: y.tynkevich@chnu.edu.ua

Рід *Muscari* представлений в Україні трьома видами. Один з них, *M. botryoides*, занесений в Червону книгу України. *M. botryoides* є морфологічно поліморфним видом, який протягом тривалого часу намагаються розділити на кілька окремих видів. Одним з аргументів на користь такого поділу є каріологічні відмінності між популяціями з різних частин ареалу. Зокрема, в Закарпатській області було знайдено диплоїдні популяції, на відміну від типових для цього виду тетраплоїдних. Проте, для підтвердження генетичного поліморфізму необхідно проведення молекулярно-генетичних досліджень. В цій роботі ми вивчили можливість використання ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* для ДНК-баркодингу українських популяцій *M. botryoides*. Ми ампліфікували та секвенували послідовності *psbA-trnH* для зразків *M. botryoides* з трьох різних, географічно віддалених українських популяцій та порівняли їх з наявними в базі даних GenBank послідовностями *psbA-trnH* для зразків *M. botryoides* з Південно-Західної Європи та *M. artemiacum*. На основі аналізу вирівнювання всіх використаних в роботі послідовностей встановлено, що дванадцять нуклеотидних замін на початку спейсера є наслідком однієї еволюційної події, інверсії ділянки, яка відповідає петлі (*stem-loop region*) в районі 3' UTR мРНК *psbA*. Уніфікація положення цієї інверсії призводить до значної зміни показника подібності. Крім цієї інверсії проаналізовані послідовності *psbA-trnH* відрізняються також однонуклеотиною заміною та двома інделами довжиною 1 нп та 7 нп. Інверсія та індел довжиною 7 нп є поліморфними на внутрішньовидовому рівні *M. botryoides*, що обмежує їх філогенетичне використання, проте, може бути корисним для мікроеволюційного аналізу. Так, всі три зразки *M. botryoides* з трьох різних областей Західної України відрізняються між собою за комбінацією цих ознак. Ці дані дають можливість говорити про наявність генетичного поліморфізму у представників українських популяцій *M. botryoides*.

Ключові слова: *psbA-trnH*, ДНК-баркодинг, *Muscari*

Вступ. Представники роду *Muscari* Mill. використовуються як декоративні та медоносні рослини (Boychuk and Budzhak, 2020). До складу цього роду відносять 53 види (WFO, 2022). Внутрішньородова систематика роду *Muscari* залишається предметом дискусій. Дослідження, з використанням *trnL-F* ділянки хлоропластної ДНК дозволило розділити рід на чотири підроди, *Muscari*, *Leopoldia*, *Muscarimia* та *Pseudomuscari* (Speta, 1989). Проте, в найбільш авторитетних базах даних по світовій флорі частина цих груп продовжують визнаватись як окремі роди. Так Kew World Checklist of selected plant families визнає таким рід *Muscarimia* Kostel. ex Losinsk. (WCSP, 2022), тоді як World Flora Online розглядає в родовому статусі дві інші групи: *Leopoldia* Parl. та *Pseudomuscari* Garbari & Greuter (WFO, 2022).

В Україні трапляються п'ять види роду *Muscari* проте, таксономічний статус частини з них залишається дискусивним (Kish, 2016, Boychuk and Budzhak, 2020; Onyshchenko et al., 2022). *M. botryoides* вважається типовим видом для підроду

Muscari (Speta, 1989). Цей вид занесений до Червоної книги України у статусі зникаючого виду (Didukh, 2009). Наразі відомо до десяти місцезростань *M. botryoides* на території України в Івано-Франківській, Чернівецькій та Закарпатській областях (Boychuk, 2019; Boychuk and Budzhak, 2020).

M. botryoides вважається поліморфним видом, який у різні часи намагалися розділити на декілька окремих видів (Boychuk and Budzhak, 2021b). Зокрема, на території Угорщини та Румунії трапляється морфологічно відмінна форма *M. botryoides* var. *transsilvanicum* (Boychuk and Budzhak, 2021a). Аналіз каріотипу цих рослин показав, що вони є диплоїдами, на відміну від інших тетраплоїдних зразків *M. botryoides*. Крім того, вони мали незначні відмінності у формі окремих хромосом (Somlyay et al., 2006). Ці каріотипічні особливості дозволили запропонувати надання видового статусу (*Muscari transsilvanicum* Schur) для цих рослин. Деякі автори наводять дані, щодо розповсюдженості *M. transsilvanicum* і на території Закарпатської області України (Kricsfalusy,

1999; Kish, 2016). Проте, досі українські популяції *M. botryoides* досліджувались лише на морфологічному рівні (Boychuk and Budzhak, 2021b), що не дає можливості оцінити їх генетичний поліморфізм та уточнити таксономічний статус. Отже, для відповіді на ці питання необхідне використання молекулярних маркерів.

У дослідженнях з молекулярного баркодингу найбільш активно використовують різноманітні ділянки хлоропластного геному (Ren et al. 2010; Intharuksa et al. 2020). Останніми роками популярності набуває дослідження ділянки *psbA-trnH*, завдяки вищому рівню її поліморфізму, порівняно з іншими частинами хлоропластної ДНК (Coissac et al., 2016). В наших попередніх дослідженнях була показана ефективність використання цієї ділянки для ДНК-баркодингу українських представників родів *Aconitum* (Tynkevich et al., 2022a), *Lathyrus* (Tynkevich et al., 2022b) та *Tulipa* (Tynkevich et al., 2022c). В цій роботі ми провели аналіз представників трьох популяцій *M. botryoides* з трьох географічно віддалених локалітетів на території Західної України з використанням ділянки *psbA-trnH*.

Матеріали та методи. Насіння *M. botryoides* було зібрано в природних популяціях (табл. 1), та в подальшому культивувалось в умовах закритого ґрунту. ДНК виділяли з свіжих листків модифікованим цетавлоновим методом (Porebski et al.,

2007; Panchuk et al., 2007).

Ампліфікацію ділянки *psbA-trnH* проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовуючи пару праймерів, комплементарних до фланкуючих міжгенний спейсер ділянок генів *psbA* та *trnH* (Tynkevich et al., 2022c). Результати ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі. ПЛР-продукти очищали екстракцією хлороформом та сиквенували із застосуванням праймерів, використаних для ампліфікації. Сиквенування зразків проводили на фірмі LGC Genomics (Німеччина). Результати сиквенування аналізували за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм DNASTAR. Пошук гомологічних послідовностей проводили програмою BLAST (Boratyn et al., 2013) у базі даних GenBank. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали методом G-INS-I, реалізованим на сервері MAFFT (Katoh et al., 2019).

Результати та їх обговорення. Ми просиквенували ПЛР-продукти ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* для трьох зразків *M. botryoides*, які представляють різні частини ареалу цього виду в Україні (табл. 1). Довжина сиквенування послідовностей міжгенного спейсера становить 558 нп для зразків MuBot2 і MuBot5 та 565 нп для MuBot6.

Таблиця 1.

Список зразків використаних в цій роботі

Table 1.

List of accessions used in this study

Вид / синонім Species / synonym	Назва зразку Accession name	Країна / область Country / region	Номер в GenBank Genbank acc.	Reference Посилання
<i>Muscari botryoides</i> (L.) Mill. / <i>Muscari transsilvanicum</i> Schur.	MuBot2	Ukraine / Zakarpattia Oblast, Bushtyno	-	Ця стаття
	MuBot5	Ukraine / Chernivtsi Oblast, Kostyntsi	-	Ця стаття
	MuBot6	Ukraine / Ivano-Frankivsk Oblast, Probabyn	-	Ця стаття
<i>Muscari armeniacum</i> H.J.Veitch	AD7LM28	USA / US Botanic Garden, Washington	MF348747	Zúñiga et al., 2017
<i>Muscari comosum</i> (L.) Mill. / <i>Leopoldia comosa</i> (L.) Parl.	BM000904044	Portugal / Algarve region, Faro	FJ423284	Grundmann et al., 2010
	MIB:ZPL:03124	Italy / Friuli Venezia Giulia, Trieste	HE966715	Bruni et al., 2012
	BM000904044	Italy / Milan Botanical Garden	HF572805	Federici et al., 2015

Використовуючи послідовності сиквенування нами ПЛР-продуктів для пошукового запитання методом Blast, ми знайшли депоновані в базі даних GenBank послідовності *psbA-trnH* для одного зразку *M. armeniacum* H.J.Veitch та трьох зразків *M. comosum*. У GenBank два зразки *M. comosum* з території Італії ановані під назвою *Leopoldia*

comosa (L.) Parl. (табл. 1). Вирівнювання всіх наявних спейсерів *psbA-trnH* для представників роду *Muscari* показало ідентичність більшої частини їх послідовності (рис. 1). Загальна довжина вирівнювання складає 566 нп, причому, мутації присутні лише в першій чверті, до позиції 138. Аналіз

вирівнювання дозволяє говорити про чотири окремі еволюційні події: однонуклеотидна заміна у позиції 50 спейсера *M. armeniacum*; інверсія послідовності, що відповідає петлі (stem-loop region) в районі 3' UTR мРНК *psbA*; та два індели, довжиною 1 нп та 7 нп (рис. 1А). Однонуклеотидна інсерція в позиції 115 вирівнювання присутня лише у зразків *M. comosum* з території Італії, отже, ймовірно, є специфічною як для цього виду, так і для географічного регіону, з якого походять зразки (рис. 1С). Інсерція довжиною 7 нп являє собою дуплікацію мікросателітного повтору «ТТААТТА». Дві копії цього повтору присутні як у зразку *M. comosum* з Португалії, так і у сиквено-

ваному нами зразку *M. botryoides* з Івано-Франківської області. Враховуючи, що *M. comosum* і *M. botryoides* належать до двох різних підродів, а відповідні зразки походять з географічно віддалених регіонів Європи, а також те, що у інших зразків обох видів є лише одна копія мікросателітного повтору, можна припустити, що інсерція другого повтору може виникати декілька разів в еволюції спейсера. Такий характер еволюції є типовим для мікросателітних послідовностей і пояснюється відносно частими подіями «проковзування» полімерази (polymerase slippage) під час реплікації повторів, або нерівним кросинговером (Li et al., 2002).

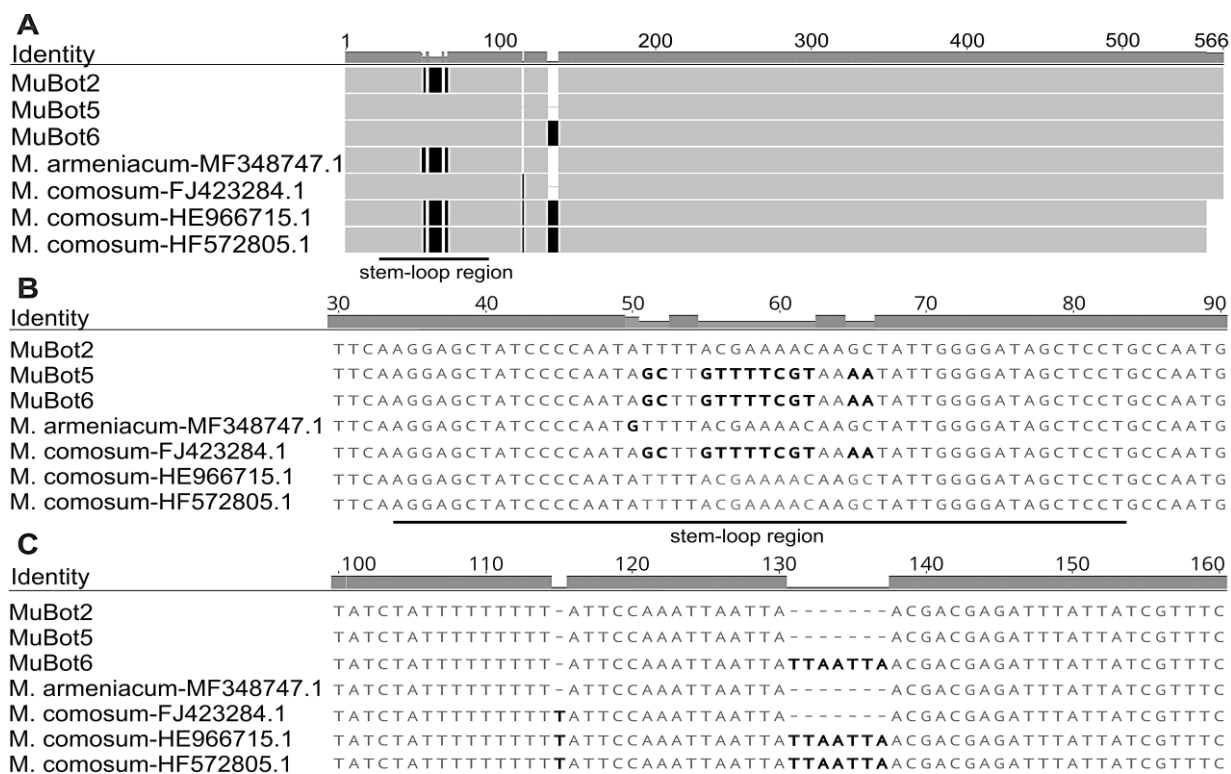


Рис. 1. Вирівнювання послідовностей *psbA-trnH* представників роду *Muscari*. (А) Схема представлення вирівнювання. (В) Фрагмент вирівнювання, що містить stem-loop ділянку. (С) Фрагмент вирівнювання, що містить індели.

Fig. 1. Alignment of the *psbA-trnH* sequences of the genus *Muscari* members. (A) Schematic representation of sequence alignment. (B) The portion of the alignment that contains stem-loop region. (C) The portion of the alignment that contains indels.

Для абсолютної більшості інделів, які раніше спостерігали в спейсері *psbA-trnH*, був показаний внутрішньовидовий поліморфізм, так само, як і для інверсії stem-loop області (Štorchová and Olson, 2007). В проаналізованих нами послідовностях *psbA-trnH* представників роду *Muscari* один варіант цієї інверсії (InvA) наявний у зразку *M. botryoides* з Закарпатської області, а також у *M. armeniacum* та італійських зразків *M. comosum* (рис. 1В). В той же час, у зразків *M. botryoides* з Чернівецької та Івано-Франківської області і *M. comosum* з Португалії наявний другий варіант інсерції (InvB). Наявність цієї інсерції призводить до утворення 12 SNP, що

може критично впливати на результати філогенетичного аналізу за цією ділянкою хлоропластного геному. Тому для філогенетичних досліджень положення інверсії stem-loop області, зазвичай, уніфікують (Whitlock et al., 2010). Вплив положення інсерції на значення подібності спейсерної послідовності *psbA-trnH* для представників роду *Muscari* можна оцінити за різницею у цьому показнику до та після розвороту послідовності інверсії (табл. 2).

Нестабільний характер інверсії та інделів в *psbA-trnH* лімітує їх філогенетичне використання,

проте, може бути корисним для мікроеволюційного аналізу. Так, всі три зразки *M. botryoides* з трьох різних областей Західної України відрізняються між собою за комбінацією цих ознак. Ці дані дають можливість говорити про наявність генети-

чний поліморфізму у представників різних популяцій *M. botryoides*. Проте, для підтвердження цього висновку необхідно як розширення вибірки для аналізу з використанням ділянки *psbA-trnH*, так і залучення додаткових молекулярних маркерів, бажано ядерної локалізації.

Таблиця 2.

Список зразків використаних в цій роботі

Table 2.

List of accessions used in this study

Рівень подібності (%) після розвороту послідовності інверсії	MuBot2	MuBot5	MuBot6	<i>M. armeni-acum</i>	<i>L. comosa</i> FJ423284	<i>L. comosa</i> HE966715	<i>L. comosa</i> HF572805	Рівень подібності (%) без розвороту послідовності інверсії
	1	2	3	4	5	6	7	
1		97,8	96,6	99,8	97,6	98,6	98,6	1
2	100,0		98,7	97,6	99,8	96,4	96,4	2
3	98,7	98,7		96,4	98,6	97,6	97,6	3
4	99,8	99,8	98,6		97,5	98,4	98,4	4
5	99,8	99,8	98,6	99,6		96,6	96,6	5
6	98,6	98,6	99,8	98,4	98,7		100,0	6
7	98,6	98,6	99,8	98,4	98,7	100,0		7

Висновки. В результаті порівняння послідовностей спейсерної ділянки між генами *psbA* та *trnH* для представників роду *Muscari*, було продемонстровано внутрішньовидовий поліморфізм більшості мутацій в її послідовності, що робить цю ділянку перспективним маркером для мікроеволюційного аналізу, зокрема для генетичного аналізу українських популяцій *M. botryoides*.

Подяки. Автори висловлюють щире подяку проф. Р.А. Волкову (Чернівецький національний університет) за участь у обговоренні отриманих результатів.

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

Список літератури:

1. Beam SC, VanGessel MJ, Vollmer KM, Flessner ML. Grape hyacinth [*Muscari botryoides* (L.) Mill] control in a wheat-soybean rotation. *Weed Techn.* 2019. 33(4): 578-585. doi: 10.1017/wet.2019.29
2. Boychuk S.V. Distribution of *Muscari botryoides* (Asparagaceae) in Ukraine. *Biol. syst.* 2019; 11(1): 81–86. doi:10.31861/biosystems2019.01.081
3. Boychuk SV, Budzhak VV. Intraspecific taxonomy of *Muscari botryoides* s.l. (Asparagaceae s.l./Hyacinthaceae s. str.): history of research and synonymy. *Ukr. Bot. J.* 2021a, 78(6): 07-413. doi:10.15407/ukrbotj78.06.407
4. Boychuk SV, Budzhak VV. Modern views on phylogeny and systematic position of the genus *Muscari* (Asparagaceae) Miller. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*. 2020; 12(2): 312-318. doi: 10.31861/biosystems2020.02.312

5. Boychuk SV, Budzhak VV. Ontogenetic and vitality structure of *Muscari botryoides* (L.) Mill. (Asparagaceae Juss.) populations at the northeastern limit of its nature area. *Chornomors'k. bot. z.* 2021b; 17(2): 107–118. doi:10.32999/ksu1990-553X/2021-17-2-2
6. Bruni I, De Mattia F, Martellos S, et al. DNA barcoding as an effective tool in improving a digital plant identification system: a case study for the area of Mt. Valerio, Trieste (NE Italy). *PLoS One.* 2012; 7(9): e43256. doi:10.1371/journal.pone.0043256
7. Coissac E, Hollingsworth PM, Lavergne S, Taberlet P. From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. *Molecular Ecology.* 2016; 25(7): 1423–8. doi:10.1111/mec.13549
8. Didukh YP, Chervona knyha Ukrainy. Roslynni svit (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom), Kyiv: Globalconsulting, 2009.
9. Federici S, Fontana D, Galimberti A, et al. A rapid diagnostic approach to identify poisonous plants using DNA barcoding data. *Plant Biosyst.* 2015; 149(3): 537-545. doi:10.1080/11263504.2014.941031
10. Grundmann M, Rumsey F J, Ansell SW, et al. Phylogeny and taxonomy of the bluebell genus *Hyacinthoides*, Asparagaceae [Hyacinthaceae]. *Taxon.* 2010; 59(1): 68-82. doi:10.1002/tax.591008
11. Intharuksa A, Sasaki Y, Ando H, et al. The combination of *ITS2* and *psbA-trnH* region is powerful DNA barcode markers for authentication of medicinal *Terminalia* plants from Thailand. *J. of Nat. Medicines.* 2019; 74(1): 282–93. doi:10.1007/s11418-019-01365-w.
12. Kish R. Chromosome numbers of bulbous monocotyledons of the Transcarpathian flora (Ukraine). *Thaiszia.* 2016; 26(1): 21–26.
13. Kricsfalusy VV. Critical-systematic analysis of ephemeroidean geophytes (Amaryllidales, Liliales) in the

- East Carpatian flora. *Scient. Bul. Uzhhorod Univ. Ser. Biol.* 1999; 6: 21–32.
14. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 2005; 11(12): 2453–2465. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x
 15. Onyshchenko VA, Mosyakin SL, Korotchenko IA, et al. IUCN Red List categories of vascular plant species of the Ukrainian flora. FOP Huliaeva V.M., Kyiv, 2022; 198 pp.
 16. Panchuk II, Volkov RA. Practical course in molecular genetics. Chernivtsi: Ruta. 2007; 120 p.
 17. Porebski S, Bailey LG, Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997; 15(1): 8–15. doi:10.1007/bf02772108
 18. Ren B, Xiang X, Chen Z. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Mol. Ecol. Res.* 2010; 10(4): 594–605. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02815.x
 19. Somlyay L, Pinter I, Csontos P. Taxonomic studies of the *Muscari botryoides* complex in Hungary. *Folia Geobot.* 2006. 41: 213–228.
 20. Speta F. *Muscari* (subg. *Leopoldia*) Speta, spec. nova, im Kreise seiner nächsten Verwandten. *Phyton.* 1989; (29): 105–117.
 21. Štorchová H, Olson MS. The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. *Plant Syst. Evol.* 2007; 268(1): 235–256.
 22. Tynkevich YO, Biliay DV, Volkov RA. Utility of the *trnH-psbA* region for DNA barcoding of *Aconitum anthora* L. and related taxa. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv.* 2022a; 31: 134–141. doi:10.7124/feeo.v31.1500
 23. Tynkevich YO, Derevenko TO, Chorney II. 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. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems).* 2022b; 14(1): 135–140. doi: 10.31861/biosystems2022.01.039
 24. Tynkevich YO, Moysiienko II, Volkov RA. 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. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv.* 2022c; in press
 25. WCSP (n.d.). 2022. World checklist of selected plant families published update. *Facilitated by the Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.* <http://apps.kew.org/wcsp/> (accessed 7 December 2022)
 26. WFO World Flora Online. 2022. Available from: <http://www.worldfloraonline.org/> (accessed 7 December 2022)
 27. Whitlock BA, Hale AM, Groff PA. Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode. *PloS one.* 2010; 5(7): e11533. doi:10.1371/journal.pone.0011533
 28. Zúñiga JD, Gostel MR, Mulcahy DG, et al. Data release: DNA barcodes of plant species collected for the Global Genome Initiative for Gardens program, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. *PhytoKeys.* 2017; (88): 119–122. doi:10.3897/phytokeys.88.14607

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.

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

The genus Muscari is represented in Ukraine by three species. One of them is M. botryoides, listed in the Red Data-Book of Ukraine. M. botryoides is a morphologically polymorphic species that has been trying to be divided into several separate species for a long time. One of the arguments in favor of this division is the karyological differences between populations from different parts of the range. In particular, in the Transcarpathian region of Ukraine, diploid populations were found in contrast to the typical tetraploid ones for this species. However, molecular genetic studies are needed to confirm genetic polymorphism. In this work, we studied the possibility of using the chloroplast genome region psbA-trnH for DNA barcoding of Ukrainian populations of M. botryoides. We amplified and sequenced the psbA-trnH for M. botryoides accessions from three different geographically distant Ukrainian populations and compared them with the psbA-trnH sequences available in the GenBank database for M. botryoides accessions from Southwestern Europe and M. armeniacum. Twelve nucleotide substitutions at the beginning of the spacer were shown to be a result of a single evolutionary event, the inversion of the region corresponding to the stem-loop region in the 3' UTR of psbA mRNA. The unification of the position of this inversion leads to a significant change in the similarity index. In addition to this insertion, the analyzed psbA-trnH sequences also differ by one SNP and two indels of 1 bp and 7 bp in length. The inversion and the 7-bp indel are polymorphic at the intraspecific level in M. botryoides, which limits their phylogenetic use, but may be useful for microevolutionary analysis. Thus, all three accessions of M. botryoides from three different regions of Western Ukraine differ in the combination of these characters. These data allow us to talk about the genetic polymorphism of Ukrainian populations of M. botryoides.

Keywords: psbA-trnH, DNA barcoding, Muscari

Отримано редколегією 11.08.2022