

ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ПОЛІМОРФІЗМ ДІЛЯНКИ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМУ *psbA-trnH* У ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *GONIOLIMON* BOISS.

Ю.О. ТИНКЕВИЧ¹, М.О. ВАЛІН¹, І.І. МОЙСІЄНКО², Р.А. ВОЛКОВ¹

¹Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, Україна, 58012,
e-mail: y.tynkevich@chnu.edu.ua

²Херсонський державний університет,
вул. Університетська, 27, м. Херсон, Україна, 73000

З двадцяти двох видів роду *Goniolimon* (Кермечник) на території України зустрічаються чотири: *G. besserianum*, *G. graminifolium*, *G. rubellum* та *G. tataricum*. Два з них: *G. graminifolium* і *G. rubellum* занесені до червоної книги України у статусі вразливих видів. Частина популяції обох цих видів інколи наводяться під окремими видовими назвами, зокрема, *G. desertorum* (Trautv.) Klokov. та *G. rubellum* (S. G. Gmel.) Klokov. Для уточнення цих таксономічних питань необхідне використання методів молекулярної філогенії. Серед хлоропластних маркерів у молекулярній таксономії останнім часом особливо активно почали використовувати фрагмент між генами *psbA* та *trnH*. В цій роботі ми вивчили можливість застосування ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* для філогенетичного аналізу та ДНК-баркодингу представників роду *Goniolimon*. Ми ампліфікували та секвенували послідовності *psbA-trnH* для зразків всіх чотирьох розповсюджених в Україні видів цього роду та порівняли їх з наявними в базі даних GenBank послідовностями *psbA-trnH* для видів кермечників і споріднених родів. На основі аналізу вирівнювання всіх використаних в роботі послідовностей встановлено, що представники роду *Goniolimon* відрізняються між собою дванадцятьма варіабельними нуклеотидними позиціями, з яких сім є парсимоній-інформативними, а також одним олігонуклеотидним інделом та інверсією послідовності, яка відповідає петлі (*stem-loop region*) в районі 3' UTR мРНК *psbA*. Відмінність ділянки *psbA-trnH* видів роду *Goniolimon* від представників споріднених родів виявилась значно вищою. Крім численних SNP їх відрізняє також полінуклеотидний індел. Такі значні відмінності вказують на підвищену швидкість еволюції ділянки *psbA-trnH* при дивергенції роду *Goniolimon*, порівняно з іншими ділянками хлоропластного геному. На філогенетичній дендрограмі, заснованій на порівнянні послідовностей *psbA-trnH*, види *Goniolimon* із Центральної Азії утворюють окрему групу, що, ймовірно, пов'язано з перенесенням хлоропластного генома в результаті гібридизації на спільній території поширення. Загалом виявлена у нашому дослідженні висока варіабельність ділянок *psbA-trnH* у представників роду *Goniolimon* дозволяє використовувати цю ділянку для уточнення положення суперечливих таксонів у групі.

Ключові слова: *psbA-trnH*, філогенія, ДНК-баркодинг, *Goniolimon*

Вступ. До роду *Goniolimon* Boiss або Кермечник відносять 22 види трав'янистих рослин (WFO, 2022). П'ять видів кермечнику використовуються з декоративними цілями, зокрема, як ґрунтопокривні рослини, а також для компонування квіткових букетів (Kubitzki et al., 2013). Сучасна систематика відносить рід *Goniolimon* до триби Limoniaceae підродини Limonioideae родини Plumbaginaceae (Koutroumpa et al., 2018). Інколи *Goniolimon* разом з родом *Limonium* та ще кількома групами об'єднували у єдиний рід *Statice* L. (Ovsiyenko et al., 2015; Ovsiyenko, 2017), проте, молекулярно-філогенетичні дослідження дозволили однозначно розділити ці групи (Ovsiyenko et al., 2015; Lledó et al., 2005; Koutroumpa et al., 2018). Крім того, було показано парафілетичний характер роду *Goniolimon* в сучасній систематиці, адже клада, яку він утворює, включає монофілетичний рід *Ikonnikovia* Lincz (Koutroumpa et al., 2018).

Рід *Goniolimon* представлений в Україні чотирима видами: *G. besserianum* Nyman, *G. graminifolium* Boiss., *G. rubellum* (S.G.Gmel.) Klokov та *G. tataricum* Boiss (Moysiyyenko, 2008). Два з них, *G. graminifolium* і *G. rubellum* занесені до Червоної книги України у статусі вразливих видів (Didukh, 2009). Стосовно таксономічної характеристики українських представників роду *Goniolimon* залишається ряд невизначених моментів. Так, зокрема, широколисті популяції *G. graminifolium* приурочені до вапнякових ґрунтів наводяться під назвою *G. desertorum* (Trautv.) Klokov. Кримські та північноприсиваські популяції *G. rubellum* були описані М.В. Клоковим як *G. orae-syvashicae* Klokov (Ekoflora, 2010). Позбавлені опушення рослини *G. tataricum* поширені в південній частині Північного Причорномор'я були описані, як *Goniolimon tauricum*.

Для прояснення цих таксономічних питань потрібне використання молекулярно-генетичних методів. Найбільш популярними маркерними

послідовностями для ДНК-баркодингу є ділянки хлоропластного геному із високою еволюційною мінливістю (Dong et al., 2012; Li et al., 2015). Останніми роками популярності набуває дослідження ділянки *psbA-trnH*, завдяки вищому рівню її поліморфізму, порівняно з іншими частинами хлоропластної ДНК (Coissac et al., 2016; Tynkevich et al., 2022a; Tynkevich et al., 2022b). Проте, використання певних генетичних баркодів завжди потребує попередніх досліджень їх поліморфізму для кожної конкретної групи рослин. В цій роботі ми сиквенували ділянку *psbA-*

trnH для всіх чотирьох розповсюджених в Україні видів роду *Goniolimon* та порівняли отримані послідовності з доступними в базі даних GenBank послідовностями цієї ділянки для інших видів роду *Goniolimon* та представників близьких родів.

Матеріали та методи. Зразки представників роду *Goniolimon* були зібрані протягом польових сезонів 2009, 2010 та 2014 років (табл. 1). ДНК виділяли з гербаризованих листків модифікованим цетавлоновим методом (Porebski et al., 2007; Panchuk et al., 2007).

Таблиця 1.

Список зразків використаних в цій роботі

Table 1.

List of accessions used in this study

Рід	Вид / синонім Species / synonym	Назва зразку Acc. name	Країна / область Country / region	Номер в GenBank / Genbank acc.	Reference Посилання
<i>Goniolimon</i>	<i>G. besserianum</i> Nyman	GoBes1	Ukraine / Kherson Oblast, Ivanivka	-	Ця стаття
	<i>G. graminifolium</i> Boiss. / <i>G. desertorum</i> (Trautv.) Klokov	GoGra1	Ukraine / Kherson Oblast, Bobrovyi Kut	-	Ця стаття
	<i>G. rubellum</i> (S.G. Gmel.) Klokov / <i>G. orae-syvashicae</i> Klokov	GoOra1	Ukraine / Republic of Crimea, Tarkhankut Peninsula	-	Ця стаття
	<i>G. tataricum</i> Boiss. / <i>G. tauricum</i> Klokov	GoTat1	Ukraine / Kherson Oblast, Strohanyivka	-	Ця стаття
	<i>G. tataricum</i> Boiss.	isolate 54	Russia / Voronezh region	LT220106	Volkova et al., 2017
	<i>G. dshungaricum</i> O.Fedtsch. & B.Fedtsch.	isolate 30	Kazakhstan / Semipalatinsk region	LT220132	Volkova et al., 2017
	<i>G. elatum</i> Boiss.	isolate 16	Russia / Orenburg region	LT220133	Volkova et al., 2017
	<i>G. speciosum</i> Boiss.	isolate 26	Russia / Altai, Ust-Kansky district	LT220140	Volkova et al., 2017
	<i>G. speciosum</i> Boiss.	isolate 55	Russia / Irkutsk region	LT220148	Volkova et al., 2017
	<i>G. speciosum</i> Boiss.	isolate 49	Russia / Krasnoyarsk region, Idrinsky district	LT220147	Volkova et al., 2017
	<i>G. speciosum</i> Boiss.	isolate 0	Mongolia	LT220125	Volkova et al., 2017
<i>G. speciosum</i> Boiss.	isolate 14	Russia / Yakutia, Verkhoyansky district	LT220118	Volkova et al., 2017	
<i>Limonium</i>	<i>L. aureum</i> (L.) Hill ex Kuntze	-	-	KM357266	Unpublished
<i>Limoniastrum</i>	<i>L. monopetalum</i> Boiss.	4825/95	Southern Morocco	HE659571	Kool et al., 2012
<i>Armeria</i>	<i>A. atlantica</i> Pomel	assem88.0.2	Morocco / Marrakech	EU531718	Kruger, 2008

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). ПЛР-продукти очищали екстракцією хлороформом та сиквенували із застосуванням праймерів, використаних для ампліфікації. Сиквенування зразків проводили на фірмі LGC Genomics (Німеччина).

Первинний аналіз сиквенованих послідовностей проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм DNASTAR. Пошук гомологічних послідовностей у базі даних GenBank проводили програмою BLAST (Boratyn et al., 2013). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали методом E-INS-I, реалізованим на сервері MAFFT (Katoh et al., 2019). Філогенетичний аналіз проводили методом Maximum likelihood за допомогою плагіна PhyML для Geneious Prime 2021.0.3.2 (Guindon and Gascuel, 2003). Статистична підтримка гілок була розрахована за допомогою тесту aLRT Chi2 (Anisimova and Gascuel, 2006). Результуюче дерево експортували у форматі Newick та анотували з використанням онлайн інструменту iTOL v6 - Interactive tree of life (Letunic and Bork, 2021).

Результати та їх обговорення. Пошуковий запит методом BLAST за послідовностями сиквенованих нами зразків в базі даних GenBank повернувся з результатом 43 послідовності для зразків роду *Goniolimon*, з яких 36 для *G. speciosum* Boiss., чотири для *G. elatum* Boiss., два для *G. tataricum* Boiss. та один для *G. dshungaricum* O. Fedtsch. & B. Fedtsch. Ці послідовності, як і послідовності двох представників роду *Acantholimon* мали покриття 100% від довжини

послідовності запиту. В той же час результати BLAST-пошуку для представників роду *Limonium* та інших родів з підродини Limonioideae мали покриття не більше 71%. Більша частина наявних в базі даних GenBank послідовностей *psbA-trnH* представників роду *Goniolimon* має певну кількість невизначених нуклеотидів. Особливо велика кількість невизначених нуклеотидів наявна в двох послідовностях представників роду *Acantholimon*. Останній факт не дозволив нам використати послідовності цього роду для порівняння, хоча за довжиною та рівнем подібності вони були найближчі до *psbA-trnH* кермечників.

Для порівняння з сиквенованими нами зразками ми відібрали послідовності всіх наявних в базі даних видів роду *Goniolimon*. Для *G. speciosum* було відібрано послідовності п'яти зразків, які відрізнялися між собою точковими нуклеотидними замінами (SNP). Також, у якості зовнішньої групи, ми використали *psbA-trnH* представників трьох родів: *Limonium*, *Limoniastrum* та *Armeria*. Вирівнювання всіх відібраних ділянок *psbA-trnH* показало високу подібність цих послідовностей представників роду *Goniolimon* (рис. 1). В той же час, ці ділянки представників всіх трьох зовнішніх груп відрізнялись від *psbA-trnH* кермечників значною кількістю SNP та інделом, який на вирівнюванні має загальну довжину 112 нп.

Загальна довжина вирівнювання складає 270 нп, з яких ідентичних позицій - 85 (32.7%). Середній попарний показник подібності становить 69,9%.

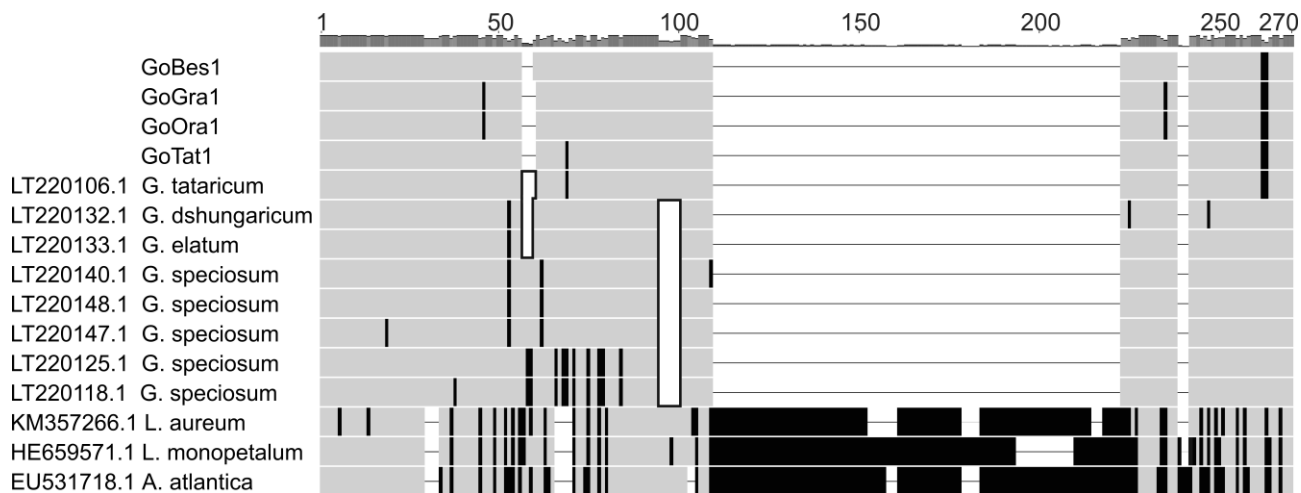


Рис. 1. Схематичне представлення вирівнювання послідовностей *psbA-trnH* представників родини *Plumbaginaceae*. Рамками окреслені фрагменти вирівнювання з невизначеними нуклеотидами.

Fig. 1. Schematic representation of alignment of the *psbA-trnH* sequences of the family *Plumbaginaceae* members. Frames outline alignment fragments with undetermined nucleotides.

Вирівнювання *psbA-trnH* представників роду *Goniolimon* без зовнішньої групи має довжину 155 нп, з яких 125 позицій є ідентичними

(86,2%). Показник середньої попарної подібності становить 95,5%. Кількість ідентичних нуклеотидів та рівень подібності розраховувались без

урахування позицій вирівнювання, які містять невизначені нуклеотиди. Послідовності *psbA-trnH* представників роду *Goniolimon* відрізняються між собою дванадцятьма варіабельними нуклеотидними позиціями (з яких сім є парсимоній-інформативними), одним олігонуклеотидним інделом та інверсією послідовності, що відповідає петлі (stem-loop region) в районі 3' UTR мРНК *psbA*. Більшість зразків кермечників мають один варіант згаданої інверсії (InvA), тоді як для зразків *G. speciosum* з номерами LT220118 та LT220125 характерний другий варіант (InvB). Ця інверсія продукує значну кількість варіабельних нуклеотидних сайтів (10 сайтів на ділянці між 58-83 нп вирівнювання), проте, оскільки їх виникнення є наслідком однієї еволюційної події, ми не брали до уваги ці сайти при підрахунку загальної кількості варіабельних та парсимоній-інформативних позицій. Внутрішньовидовий поліморфізм інверсії stem-loop області був показаний раніше для багатьох груп рослин (Štorchová and Olson, 2007; Tynkevich et al., 2022b; Tynkevich et al., 2022d). Враховуючи нестабільний характер цієї ознаки, використання її у філогенетичних дослідженнях є недоцільним. Тому, ми вилучили послідовності *G. speciosum* з варіантом інверсії InvB з вирівнювання використаного для філогенетичного аналізу.

На побудованому методом Maximum-Likelihood філогенетичному дереві спостерігається шість вузлів з високою та середньою статистичною підтримкою. Довжина кладу роду *Goniolimon* є суттєво більшою, порівняно до клад представників зовнішніх груп. Це спостереження свідчить про значну швидкість еволюції ділянки *psbA-trnH* при дивергенції роду *Goniolimon*. За іншими використаними для філогенетичного аналізу ділянками хлоропластного та ядерного геному такої значної дистанції цієї групи від інших

представників підродини Limonioideae не спостерігалось (Lledó et al., 2005; Koutroumpa et al., 2018). Враховуючи незначну кількість досліджень філогенетичних зв'язків між представниками роду *Goniolimon* з використанням молекулярних маркерів, наш аналіз може стати важливим кроком в напрямку розуміння внутрішньородової системи цього роду. Найбільш базальну кладу в межах роду утворюють види *G. graminifolium* та *G. rubellum*. Їх зразки мають ідентичну послідовність *psbA-trnH*, що може свідчити на користь близької спорідненості цих видів. Також ідентичну послідовність мають два зразки *G. tataricum* з Херсонської області України та Воронежської області Росії, хоча, раніше для рослин цього виду різного географічного походження був показаний значний поліморфізм за послідовністю 3'*rps16-5'trnK* та *rpl32-trnL* ділянок хлоропластної ДНК (Buzurović et al., 2020). Зразки з Херсонської області позбавлені опушення і у вузькому розумінні відносяться до *G. tauricum* Klokov. Таким чином, наші дослідження показують недоцільність відокремлення цього таксону у видовому статусі, принаймні на основі аналізу *psbA-trnH*. Близьку спорідненість до *G. tataricum* показує *G. besserianum*. На побудованому нами філогенетичному дереві окрему кладу утворюють види, які представляють Центральну-Азійський регіон (*G. speciosum*, *G. dshungaricum* та *G. elatum*). Таке групування на дендрограмі спостерігалась і раніше при аналізі двох ділянок хлоропластної ДНК, проте, не підтверджувалась на основі аналізу ядерного маркеру *ITS 1-2* (Volkova et al., 2017). Можна припустити, що спільна таксономічна позиція вказаних видів може бути результатом перенесення хлоропластного геному внаслідок гібридизації на спільній території поширення.

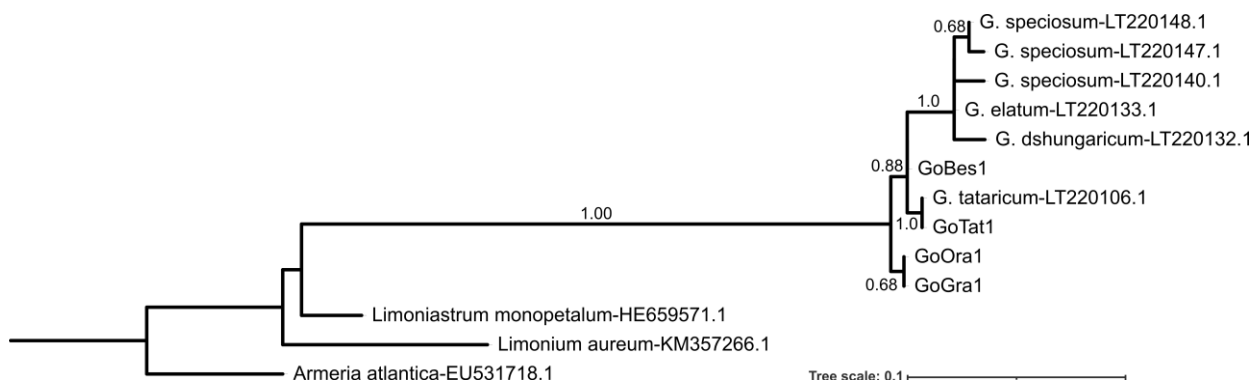


Рис. 2. Філогенетичне дерево представників роду *Goniolimon* на основі послідовностей *psbA-trnH*.

Fig. 2. Phylogenetic tree of genus *Goniolimon* based on the *psbA-trnH* sequences.

Висновки. Аналіз ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* показав можливість використання її для філогенетичних досліджень та ДНК-баркодингу представників роду *Goniolimon* завдяки високому рівню мінливості та наявності достатньої кількості філогенетично-інформативних нуклеотидних сайтів. Отримані нами дані показують, що позбавлені опущення рослини з Півдня України, які були описані, як *G. tauricum* і які продовжують визнаватись в якості окремого виду рядом ботанічних ресурсів, за ділянкою *psbA-trnH* показують ідентичність до *G. tataricum*.

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

Список літератури / References:

- Anisimova M, and Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology*. 2006; 55: 539-552. doi:10.1080/10635150600755453
- Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucl Acid Res*. 2013; 41(W1): W29–33. doi.org:10.1093/nar/gkt282
- Buzurović U, Tomović G, Niketić M, Bogdanović S, Aleksić JM. Phylogeographic and taxonomic considerations on *Goniolimon tataricum* (Plumbaginaceae) and its relatives from south-eastern Europe and the Apennine Peninsula. *Plant Syst. Evol*. 2020; 306(2): 1-22. doi: 10.1007/s00606-020-01636-0
- 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
- Didukh YP, Chervona knyha Ukrainy. Roslynni svit (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom), Kyiv: Globalconsulting, 2009.
- Dong W, Liu J, Yu J, Wang L, Zhou S. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PloS one*. 2012; 7(4): e35071. doi: 10.1371/journal.pone.0035071
- Ekoflora Ukrayiny 2010. Kiev. 6: 6–43. [Екофлора України. (2010). Київ. 6: 6–43]
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*. 2003; 52(5): 696-704. doi: 10.1080/10635150390235520.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinf*. 2017; 20(4): 1160-6. doi: 10.1093/bib/bbx108
- Kool A, de Boer HJ, Krüger Å, Rydberg A, Abbad A, Björk L, Martin G. Molecular identification of commercialized medicinal plants in Southern Morocco. *PloS one*. 2012; 7(6): e39459. doi: 10.1371/journal.pone.0039459
- Koutroumpa K, Theodoridis S, Warren BH et al. An expanded molecular phylogeny of Plumbaginaceae, with emphasis on *Limonium* (sea lavenders): Taxonomic implications and biogeographic considerations. *Ecol. Evol*. 2018; 8(24): 12397-12424. doi: 10.1002/ece3.4553
- Kruger Å. DNA-Barcoding identification of medicinal roots from Morocco. *Degree project in biology, Master of science, Uppsala University*. 2008; 28 p.
- Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V. (Eds.). *Flowering Plants Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families* (Vol. 2). Springer Science & Business Media. 2013; 652 p.
- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucl. Acid. Res*. 2021; 49(W1):W293–6. doi:10.1093/nar/gkab301.
- Li X, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang Y, Chen S. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biol. Rev*. 2015; 90(1): 157-166. doi: 0.1111/brv.12104
- Lledó MD, Crespo MB, Fay MF, Chase MW. Molecular phylogenetics of *Limonium* and related genera (Plumbaginaceae): biogeographical and systematic implications. *Am. J. Botany*. 2005; 92(7): 1189-1198. doi: 10.3732/ajb.92.7.1189
- Moysiyenko II. A review of the family Limoniaceae Lincz. in Ukraine. *Chornomors'k. bot. z*. 2008; 4(2): 161-174.
- Ovsiyenko VM, Moysiyenko II, Kostikov IY. Molecular annotation for secondary structure ITS2 genus *Goniolimon* and his place in the Plumbagitiaceae family. *Proceedings of the International conference «Advances in Botany and Ecology»*, Poltava, 15-20 September 2015; P. 56.
- Ovsiyenko VM. The taxonomic history of family Plumbaginaceae Juss. of the Ukrainian flora. *Chornomors'k. bot. z*. 2017; 13(2): 175–183. doi: 10.14255/2308-9628/17.132/4.
- Panchuk II, Volkov RA. *Practical course in molecular genetics*. Chernivtsi: Ruta. 2007; 120 p.
- 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
- POWO "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. 2022, Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Retrieved 10 December 2022."
- Štorchová H, Olson MS. The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. *Plant Syst. Evol*. 2007; 268(1): 235-256.
- 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 evolucionii organizmiv*. 2022a; 31: 134–141. doi:10.7124/feeo.v31.1500

25. Tynkevich YO, Boychuk SV, Chorney II. Оцінка можливості використання ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* для вивчення генетичного поліморфізму українських популяцій *Muscari botryoides* (L.) Mill. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*. 2022b; 14(2):124–128. doi: 10.31861/biosystems2022.02.124
26. 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)*. 2022c; 14(1):135–140. doi: 10.31861/biosystems2022.01.039
27. 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*. 2022d; 20 (1-2): 8–15. doi: 10.7124/visnyk.utgis.20.1-2.1508
28. Volkova PA, Herden T, Friesen N. Genetic variation in *Goniolimon speciosum* (Plumbaginaceae) reveals a complex history of steppe vegetation. *Bot. J. Linn. Soc.* 2017; 184(1): 113–121. doi: 10.1093/botlinnean/box011
29. WFO *World Flora Online*. 2022. Available from: <http://www.worldfloraonline.org/> (accessed 11 December 2022)

ORGANIZATION AND POLYMORPHISM OF THE CHLOROPLAST GENOME REGION *psbA-trnH* IN REPRESENTATIVES OF THE *GONIOLIMON* BOISS.

Y.O. Tynkevich, M.O. Valin, I.I. Moysiienko, R.A. Volkov

Four out of twenty-two species of the genus *Goniolimon* are common in Ukraine: *G. besserianum*, *G. graminifolium*, *G. rubellum* and *G. tataricum*. Two of them, *G. graminifolium* and *G. rubellum*, are listed as vulnerable species in the Red Data Book of Ukraine. Some populations of both species are sometimes reported under different species names, mainly as *G. desertorum* (Trautv.) Klokov. and *G. rubellum* (S.G. Gmel.) Klokov. To clarify these taxonomic questions, the application of molecular phylogenetic methods is necessary. Recently, the fragment between the *psbA* and *trnH* genes has been particularly actively used for similar purposes. In this work, we tested the use of the *psbA-trnH* chloroplast genomic region for phylogenetic analysis and DNA barcoding of representatives of the genus *Goniolimon*. We amplified and sequenced the *psbA-trnH* sequences for samples of all four species of this genus distributed in Ukraine and compared them with the *psbA-trnH* sequences available in the GenBank database for species of *Goniolimon* and related genera. The comparison of the available sequences showed that the representatives of the genus *Goniolimon* differ in twelve variable nucleotide positions, seven of which are parsimony-informative. They also differ in one oligonucleotide indel and a sequence inversion corresponding to the stem-loop region in the 3' UTR region of *psbA* mRNA. The difference between the *psbA-trnH* regions of *Goniolimon* species and representatives of related genera was much higher. In addition to numerous SNPs, they also differ by a polynucleotide indel. Such significant differences indicate a higher rate of evolution of the *psbA-trnH* region during the divergence of the genus *Goniolimon* compared to other regions of the chloroplast genome. On the phylogenetic dendrogram based on the comparison of *psbA-trnH* sequences, the *Goniolimon* species from Central Asia form a distinct group, which is probably due to chloroplast genome transfer as a result of hybridization in a common distribution area. In general, the high variability of the *psbA-trnH* regions in representatives of the genus *Goniolimon* found in our study allows us to use this region to clarify the position of controversial taxa in the group.

Keywords: *psbA-trnH*, molecular phylogeny, DNA barcoding, *Goniolimon*

Отримано редколегією 08.10.2022