

## 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*

Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Т.О. ДЕРЕВЕНКО, І.І. ЧОРНЕЙ

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

Представник роду *Lathyrus* чина ряба (*L. venetus*) занесена до Червоної книги України у статусі вразливого виду. Аналіз чисельності чини рябої ускладнюється розповсюдженням гібридних форм цього виду з іншим українським представником роду *Lathyrus* – чиною весняною (*L. vernus*). Такі гібридні популяції часто помилково визначаються як популяції чини рябої, завдяки їх морфологічній подібності. Для вивчення генетичних ресурсів чини рябої необхідне використання молекулярних маркерів, як ядерної (безпосередньо для ідентифікації гібридних форм), так і пластидної (для визначення напрямку гібридизації) локалізації. Одним із найбільш перспективних маркерів на основі хлоропластної ДНК є IGS між генами *psbA-trnH*, який досі не був просиквенований для *L. venetus* та *L. vernus*. Отже, в цій роботі ми вивчили можливість використання ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* для ідентифікації батьківських форм гібридів між *L. venetus* та *L. vernus*. Ми ампліфікували та сиквенували послідовності *psbA-trnH* для зразків *L. venetus* та *L. vernus* зібраних на території України. Для порівняння були використані послідовності *psbA-trnH* з бази даних GenBank, які представляють види з філогенетично віддалених секцій роду *Lathyrus*, а також, споріднені до *L. venetus* та *L. vernus* види секції *Orobis*. На основі аналізу вирівнювання всіх використаних в роботі послідовностей було показано, що рівень мінливості *psbA-trnH* перевищує такий для інших ділянок хлоропластної ДНК, які використовувались у філогенетичних дослідженнях роду *Lathyrus*. На побудованому нами філогенетичному дереві рід *Lathyrus* з високою статистичною підтримкою утворює монофілетичну групу. Порівняння сиквенованих послідовностей IGS *psbA-trnH* показало наявність значних відмінностей між IGS *psbA-trnH* чини рябої та весняної та підтвердило ефективність використання цієї ділянки для молекулярної ідентифікації цих видів та для визначення напрямку гібридизації у підтверджених гібридних форм.

Ключові слова: *psbA-trnH*, ДНК-баркодинг, *Lathyrus*, гібридизація

**Вступ.** До червоної книги України занесено три види роду *Lathyrus* L.: чина трансільванська (*L. transsilvanicus* (Spreng.) Rchb.), чина гладенька (*L. laevigatus* Areh. & Chav.) та чина ряба (*L. venetus* (Mill.) Wohlf.). Останній вид поширений в Україні у Правобережному та дуже рідко у Лівобережному Лісостепу. Реальний характер поширення чини рябої дуже важко оцінити через те, що багато її знахідок можуть бути гібридними формами з іншим видом роду *Lathyrus* української флори – чиною весняною (*L. vernus* (L.) Bernh.) (Червона книга України, 2009; Tynkevich et al., 2015). Таким чином, використання морфологічних критеріїв для визначення *L. venetus* може часто призводити до помилкової ідентифікації особин цього виду. Для того, щоб ефективно оцінювати природні ресурси чини рябої в Україні необхідно розробити для неї систему молекулярної ідентифікації. Раніше в якості молекулярного маркера для таких досліджень розглядалась нуклеотидна послідовність міжгенного спейсера (intergenic spacer - IGS) генів 5S рРНК (Tynkevich et al., 2015). Цей маркер неодноразово успішно використовувався у філо-

генетичних та молекулярно-еволюційних дослідженнях завдяки його високій мінливості (Ishchenko et al., 2020; Mel'nyk et al., 2020; Tynkevich et al., 2020; Grabiele et al., 2021; Fehrer et al., 2021; Senderowicz et al., 2022). Проте, необхідність клонування послідовностей 5S рДНК перед сиквенуванням суттєво ускладнює використання цього маркеру, особливо у масових рутинних дослідженнях. Крім того, для *L. venetus* був показаний внутрішньогеномний поліморфізм за послідовністю IGS 5S рДНК (Tynkevich et al., 2015), внаслідок чого результати філогенетичного аналізу можуть бути трактовані неоднозначно. Більш доцільним для ДНК-баркодингу представників роду *Lathyrus* виглядає використання послідовностей внутрішніх транскрибованих спейсерів (internal transcribed spacers – *ITS1-2*) генів 35S рРНК або ділянок хлоропластного геному, тобто, послідовностей, для яких можливе пряме сиквенування ПЛР-продуктів. На відміну від *L. vernus*, який неодноразово ставав об'єктом досліджень із використанням молекулярних маркерів (Kenicer et al., 2005; Oskoueiyani et al., 2010; Chubukova et al.,

2011; Schaefer et al., 2012; Neumann et al., 2015; Mienna et al., 2020), для *L. venetus* раніше було сиквенувано лише одну ділянку хлоропластного геному - *trnS-trnG* та одну ділянку ядерного геному - *ITS1-2* (Schaefer et al., 2012).

Для ДНК-баркодингу найчастіше використовуються ділянки хлоропластного геному (Coissac et al., 2016). Проте, часто рівень мінливості хлоропластної ДНК є недостатнім для однозначної ідентифікації видів. Ще одним їх недоліком є успадкування лише по материнській лінії, що не дає можливість розмежувати гібридні таксони та їх материнську предкову форму. Проте, якщо гібридна природа таксона вже визначена з використанням ядерних маркерів, хлоропластні маркери можуть бути корисними для визначення напряму гібридизації. Останнім часом в багатьох дослідженнях використовується спейсерна послідовність (IGS) між двома хлоропластними генами: *psbA* та *trnH* (Castro et al., 2015; Intharuksa et al., 2020; Frigerio et al., 2021; Tynkevich et al., 2022). Для багатьох таксонів ця ділянка виявилась найбільш мінливим та інформативним фрагментом хлоропластного геному (Bruyns et al. 2006, Ren et al. 2010, Intharuksa et al. 2020). Однак, для *L. vernus*, та *L. venetus* ця ділянка ще не була сиквенувана. Тому, метою нашої роботи було сиквенування IGS *psbA-trnH* хлоропластного геному *L. vernus*, та *L. venetus* та аналіз можливості використання її для молекулярної ідентифікації цих видів.

**Матеріали та методи.** Матеріалом для дослідження були гербаризовані листки *L. venetus* та *L. vernus* з гербарію Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (СНЕР), зібрані у різних локаціях на території Чернівецької області. Загальну ДНК екстрагували за модифікованим цетавлоновим методом (Porebski et al., 2007; Panchuk et al., 2007).

Для ампліфікації ділянки *psbA-trnH* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували пару праймерів, які комплементарні до фланкуючих міжгенний спейсер 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. Отримані

ПЛР-продукти очищали екстракцією хлороформом. Для сиквенування ПЛР-продуктів застосовували праймери, використані при ампліфікації. Сиквенування зразків проводили на фірмі LGC genomics (Німеччина).

Аналіз результатів сиквенування проводили з використанням комп'ютерної програми Chromas та пакету програм DNASTAR. Для пошуку гомологічних послідовностей застосували програму BLAST (Boratyn et al., 2013). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали методом G-INS-I, реалізованим на сервері MAFFT (Kato et al., 2019). Найбільш відповідна модель нуклеотидних заміни була визначена за найнижчим значенням Баєсівського інформаційного критерію (Bayesian Information Criterion - BIC) з використанням інструменту Find Best-Fit Substitution Model в програмі Mega X (Kumar et al., 2018). 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 повною послідовністю спейсера сиквенуваних нами зразків у базі даних Genbank повернувся з результатом 146 послідовностей, із покриттям не менше 50% від довжини послідовності запиту. З них 16 були ідентифіковані у повних хлоропластних геномах. Для того, щоб уточнити філогенетичне положення та рівень спорідненості між собою українських зразків *L. venetus* та *L. vernus*, ми завантажили з бази даних Genbank 35 послідовностей *psbA-trnH* для представників роду *Lathyrus*. Частина завантажених послідовностей була обрана з урахуванням систематичного положення відповідних видів, з метою представити максимальну кількість секцій. В цьому ми спиралися на роботу Schaefer et al. (2012). Інша частина послідовностей була відібрана за принципом максимальної подібності до сиквенуваних нами зразків. Також, для філогенетичного аналізу, у якості зовнішніх груп ми використали послідовності представників трьох родів триби Fabeae: *Pisum* L., *Vavilovia* Fed. та *Vicia* L. Вирівнювання послідовностей IGS *psbA-trnH* всіх використаних для аналізу таксонів виявило помірно високий рівень подібності цієї ділянки в межах роду *Lathyrus* (рис. 1). Послідовності різних видів відрізняються між собою як нуклеотидними замінами, з яких 45 виявились парсимоній-інформативними, так і рядом олігонуклеотидних інделів. Середній рівень подібності між послідов-

ностями становить 89,5%. Повністю дані аналізу вирівнювання представлені у таблиці 1. Загалом, рівень мінливості для IGS *psbA-trnH* перевищує такий для всіх інших ділянок хлоропластного геному за співвідношенням загальної кількості нуклеотидних сайтів до кількості варіабельних та інформативних сайтів (Kenicer et al., 2005;

Schaefer et al., 2012). Разом із легкістю ампліфікації та сиквенування це робить *psbA-trnH* одним із найбільш перспективних молекулярних маркерів для філогенетичного аналізу та ДНК-баркодингу представників роду *Lathyrus*.

Таблиця 1.  
Параметри матриці та модель нуклеотидних замінів для вирівнювання *psbA-trnH*

Table 1.

Matrix parameters and models of *psbA-trnH* alignment

Кількість зразків (number of samples)	41
Кількість видів (number of species)	40
Довжина вирівнювання, нп (aligned length, bp)	297
Попарна подібність, % (pairwise identity, %)	89,5
Мінливі нуклеотидні сайти, нп (variable sites, bp)	83
Парсимоній-інформативні нуклеотидні сайти, нп (parsimony informative sites, bp)	45
Модель нуклеотидних замінів (nucleotide substitution model)	T92+G

Побудоване на основі вирівнювання IGS *psbA-trnH* філогенетичне дерево (рис. 2) містить 20 вузлів з рівнем статистичної підтримки вище 0.90 та за загальною топологією узгоджується із

філогенією на основі комбінованого набору даних ITS 35S рДНК та хлоропластних послідовностей (Schaefer et al., 2012).

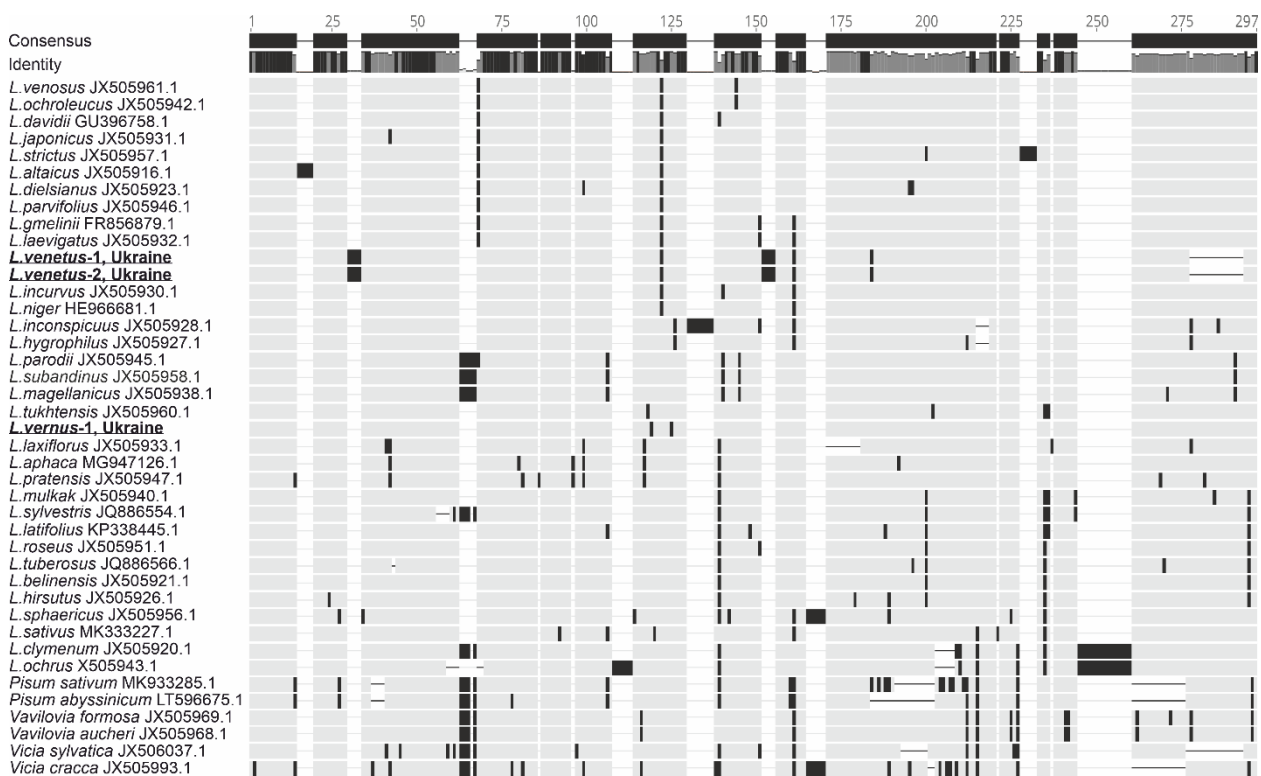


Рис. 1. Схематичне представлення вирівнювання послідовностей *psbA-trnH* представників роду *Lathyrus*. Послідовності, отримані в цій роботі, позначані жирним шрифтом та підкреслені.

Fig. 1. Schematic representation of sequence alignment of the *psbA-trnH* of the genus *Lathyrus* members. Sequences obtained in this work are shown in bold and underlined.

Проте, на отриманому нами дереві рід *Lathyrus* є монофілетичною групою, на відміну від даних філогенетичних аналізів на основі комбінованих наборів даних (Oskoueian et al., 2010; Schaefer et al., 2012), де секція *Clymenum* утворювала сестри-

нську групу до всіх інших секцій роду *Lathyrus* разом з родами *Pisum* та *Vavilovia*. Положення *L. venetus* на отриманому нами дереві в межах клади секції *Orobanchaceae* відповідає систематичному положенню цього виду (Schaefer et al., 2012). Натомість

мість, положення *L. vernus*, який також належить до секції *Orobus* відрізняється. За даними філогенії на основі *psbA-trnH* *L. vernus* займає відокрем-

лене положення в межах спільної гради з представниками секції *Orobus* та трьох інших секцій.

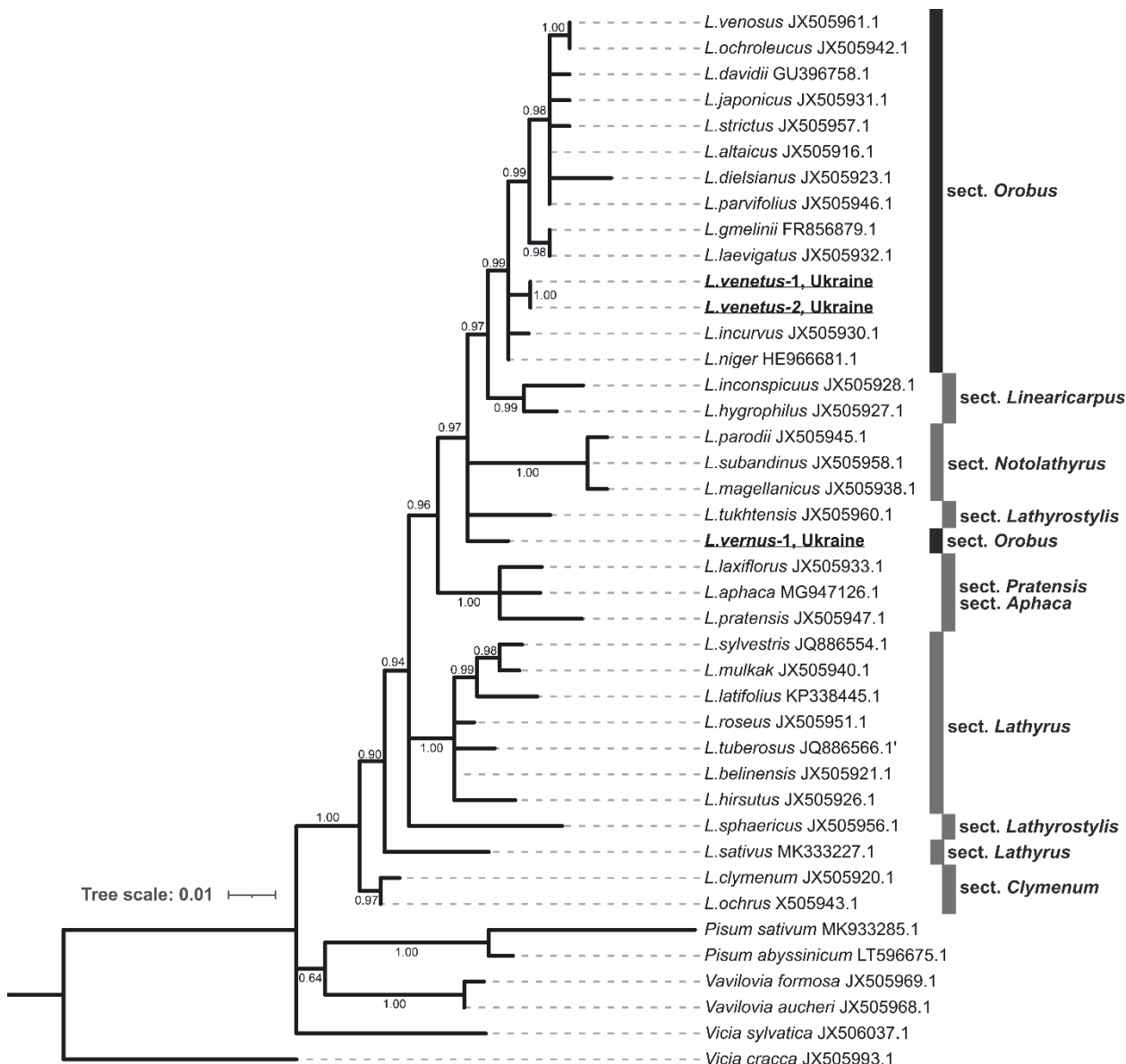


Рис. 2. ML філогенетичне дерево роду *Lathyrus*, генероване на підставі порівняння нуклеотидної послідовності *psbA-trnH*. Значення aLRT статистичної підтримки показані числами біля гілок дерева. Послідовності, отримані в цій роботі, показані жирним шрифтом та підкреслені.

Fig. 2. ML phylogenetic tree of the genus *Lathyrus* generated from the *psbA-trnH* nucleotide sequence data. The aLRT statistical support is represented by numbers near tree branches. Sequences obtained in this work are shown in bold and underlined.

**Висновки.** Результати аналізу послідовностей *psbA-trnH* для видів *L. venetus* та *L. vernus* показують, що обидва види можуть бути успішно ідентифіковані за цим маркером, завдяки наявності значної кількості характеристичних нуклеотидних замін та інделів. Отже використання *psbA-trnH* може бути корисним при вивченні гібридних форм між цими двома видами, дозволяючи встановити напрям гібридизації.

**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. 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

2. Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41(W1): W29–33. doi.org:10.1093/nar/gkt282
3. Bruyns P.V., Mapaya R.J., Hedderson T.J. A new subgeneric classification for *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and *psbA-trnH* sequence data. *Taxon*. 2006; 55(2): 397–420. doi:10.2307/25065587
4. Castro C, Hernandez A, Alvarado L, Flores D. DNA barcodes in fig cultivars (*Ficus carica* L.) Using ITS regions of ribosomal DNA, the *psbA-trnH* spacer and the *matK* coding sequence. *American Journal of Plant Sciences*. 2015; 06(01): 95–102. doi:10.4236/ajps.2015.61011
5. Chubukova OV, Baymiev AIKh, Baymiev AnKh. Polymorphism of lectin genes in *Lathyrus* plants. *Russian Journal of Genetics*. 2011; 47(7): 813–8. doi:10.1134/s1022795411070040.
6. 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
7. Didukh, Y.P., Chervona knyha Ukrainy. Roslynnnyi svit (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom), Kyiv: Globalconsulting, 2009.
8. Fehrer J, Slavíková R, Pařtová L, Josefiová J, Mráz P, Chrtek J, et al. Molecular Evolution and Organization of Ribosomal DNA in the Hawkweed Tribe Hieracinae (Cichorieae, Asteraceae). *Frontiers in Plant Science*. 2021; 12. doi:10.3389/fpls.2021.647375
9. Frigerio J, Agostinetto G, Mezzasalma V, De Mattia F, Labra M, Bruno A. DNA-based herbal teas' authentication: AN ITS2 and *psbA-trnH* multi-marker DNA metabarcoding approach. *Plants*. 2021; 10(10): 2120. doi:10.3390/plants10102120.
10. Gao F. Faculty Opinions recommendation of MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature. 2017; doi:10.3410/f.731078852.793536612
11. Grabiele M, Aguilera PM, Ducasse DA, Debat HJ. Molecular characterization of the 5S rDNA non-transcribed spacer and reconstruction of phylogenetic relationships in *Capsicum*. *Rodriguésia*. 2021; 72. doi:10.1590/2175-7860202172071
12. 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.
13. Intharuksa A, Sasaki Y, Ando H, Charoensup W, Suksathan R, Kertsawang K, et al. The combination of ITS2 and *psbA-trnH* region is powerful DNA barcode markers for authentication of medicinal *Terminalia* plants from Thailand. *Journal of Natural Medicines*. 2019; 74(1): 282–93. doi:10.1007/s11418-019-01365-w.
14. Ishchenko OO, Mel'nyk VM, Parnikoza IY, Budzhak VV, Panchuk II, Kunakh VA, et al. Molecular organization of 5S ribosomal DNA and taxonomic status of *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (Poaceae). *Cytology and Genetics*. 2020; 54(6): 505–13. doi:10.3103/s0095452720060055.
15. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. 2017; 20(4): 1160–6. doi:10.1093/bib/bbx108
16. Kenicer GJ, Kajita T, Pennington RT, Murata J. Systematics and biogeography of *Lathyrus* (Leguminosae) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data. *American Journal of Botany*. 2005; 92(7): 1199–209. doi:10.3732/ajb.92.7.1199.
17. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Battistuzzi FU, editor. *Molecular Biology and Evolution*. 2018; 35(6): 1547–9. doi:10.1093/molbev/msy096
18. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*. 2021; 49(W1):W293–6. doi:10.1093/nar/gkab301.
19. Mel'nyk VM, Andreev IO, Myryuta GYu, Shelyfist AY, Volkov RA, Kunakh VA. Molecular organization of 5S rDNA intergenic spacer in *Gentiana pneumonanthe* L. and *G. punctata* L. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetikiv i selekcioneri*. 2021; 18(1–2): 9–15. doi:10.7124/visnyk.utgis.18.1-2.1349
20. Mienna IM, Speed JDM, Bendiksby M, Thornhill AH, Mishler BD, Martin MD. Differential patterns of floristic phylogenetic diversity across a post-glacial landscape. *Journal of Biogeography*. 2019; 47(4): 915–26. doi:10.1111/jbi.13789
21. Neumann P, Pavlíková Z, Koblížková A, Fuková I, Jedličková V, Novák P, et al. Centromeres Off the Hook: massive changes in centromere size and structure following duplication of CenH3 gene in Fabaeae species. *Molecular Biology and Evolution*. 2015; 32(7): 1862–79. doi:10.1093/molbev/msv070
22. Oskoueian R, Kazempour Osaloo S, Maassoumi AA, Nejadstari T, Mozaffarian V. Phylogenetic status of *Vavilovia formosa* (Fabaceae-Fabaeae) based on nrDNA ITS and cpDNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2010; 38(3): 313–9. doi:10.1016/j.bse.2010.01.011
23. Panchuk II, Volkov RA. 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.
24. Porebski S, Bailey LG, Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997; 15(1): 8–15. doi:10.1007/bf02772108
25. Ren B, Xiang X, Chen Z. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Molecular Ecology Resources*. 2010; 10(4): 594–605. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02815.x
26. Schaefer H, Hechenleitner P, Santos-Guerra A, de Sequeira MM, Pennington RT, Kenicer G, et al. Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabaeae with special focus on the middle-

- Atlantic island lineages. *BMC Evolutionary Biology*. 2012; 12(1): 250. doi:10.1186/1471-2148-12-250
27. Senderowicz M, Nowak T, Weiss-Schneeweiss H, Papp L, Kolano B. Molecular and cytogenetic analysis of rDNA evolution in *Crepis sensu lato*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(7): 3643. doi:10.3390/ijms23073643
28. 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*. 2022; 31: 134–41. doi:10.7124/feeo.v31.1500
29. Tynkevich YO, Bushyla KD, Volkov RA. Organization of the 5S rDNA intergenic spacer of *Quercus rubra* L. and its relationship to the Ukrainian *Quercus* species. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*. 2020; 26: 125–31. doi:10.7124/feeo.v26.1254
30. Tynkevich YO, Nevelska AO, Chorney II, Volkov RA. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv*. 2015; 13(1): 81–7. doi:10.7124/visnyk.utgis.19.1-2.1439
- Ación Fernández FG, García Camacho F, Chisti Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Progress in Industrial Microbiology*. 1999; 35: 231–247.

## 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

**Y.O. Tynkevich, T.O. Derevenko, I.I. Chorney**

*The member of the genus Lathyrus, L. venetus is listed in the Red Data Book of Ukraine as a vulnerable species. Estimation of L. venetus abundance is complicated by the prevalence of interspecies hybrids with L. vernus. These hybrid populations are often misidentified as populations of the L. venetus due to their morphological similarity. The study of genetic resources of L. venetus requires the use of molecular markers, both nuclear (to identify hybrid forms) and plastid (to determine the direction of hybridization) localization. One of the most promising chloroplast markers, the IGS region between the psbA and trnH genes, has not yet been sequenced for L. venetus and L. vernus. In this work, we evaluated the possibility of using the psbA-trnH region of the chloroplast genome to identify the parental forms of hybrids between L. venetus and L. vernus. We amplified and sequenced the psbA-trnH IGS for the collected in Ukraine accessions of L. venetus and L. vernus. For comparison, psbA-trnH sequences from the GenBank database were used that represent species from phylogenetically distant sections of the genus Lathyrus, as well as species of the Orobus section closely related to L. venetus and L. vernus. Based on the analysis of alignment of all sequences used, we found that the level of variability of psbA-trnH exceeds that of other chloroplast DNA regions used in phylogenetic studies of the genus Lathyrus. On the phylogenetic tree constructed by us, the genus Lathyrus forms a monophyletic group with high statistical support. The sequences analysis showed significant differences between the psbA-trnH IGS of L. venetus and L. vernus and confirmed the effectiveness of using this region for molecular identification of these species and for determining the direction of hybridization in the hybrid forms.*

*Keywords: psbA-trnH, DNA barcoding, Lathyrus, hybridization*

*Отримано редакцією 11.05.2022р.*