

[https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).292999](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).292999)

УДК 577.113.5 + 582.675.1

**Ю. О. Тинкевич**<sup>1</sup>, к.б.н., асистент  
**Д. В. Біляй**<sup>1</sup>, магістрантка  
**О. В. Череватов**<sup>1</sup>, к.б.н., асистент  
**О. О. Кагало**<sup>2</sup>, к.б.н., завідувач відділу  
**Р. А. Волков**<sup>1</sup>, д.б.н., завідувач кафедри

<sup>1</sup> Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Кафедра молекулярної генетики та біотехнології, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2, 58012, Україна, e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

<sup>2</sup> Інститут екології Карпат НАН України, Відділ охорони природних екосистем, Львів, вул. Козельницька, 4, 79026, Україна, e-mail: o.kagalo@nas.gov.ua

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАЇНСЬКИХ ПРЕДСТАВНИКІВ КОМПЛЕКСНОГО ВИДУ *ACONITUM ANTHORA* НА ОСНОВІ ДІЛЯНКИ ITS1-5.8S-ITS2 ЯДЕРНОГО ГЕНОМУ

В складі комплексного виду *Aconitum anthora* L. s. l. деякі таксономісти нараховують чотири окремі види: *A. anthora*, *A. eulophum*, *A. jacquinii*, *A. pseudanthora*. Останні два види занесені до Червоної книги України. Щоб перевірити спорідненість між цими таксонами та філогенетичне положення групи *A. anthora* s. l. ми використали маркерну ділянку ядерного геному ITS1-5.8S-ITS2 35S рДНК. Отримані нами сиквенси для представників всіх чотирьох таксонів з території України виявилися високоподібними, що підтверджує припущення про необхідність вважати видові епітети *A. eulophum*, *A. jacquinii*, *A. pseudanthora* синонімами до *A. anthora*. Філогенетичний аналіз показав значну дистанцію *A. anthora* s. l. до підродів *Aconitum* та *Lycostonum*. Отже, *A. anthora* s. l. варто розглядати як третій підрид в роді *Aconitum*.

**Ключові слова:** генетичний поліморфізм; біорізноманіття; філогенія; таксономія; *Aconitum*; молекулярні маркери; рДНК

Проблема визначення границь біологічних видів є одним із питань, що викликають довготривалу дискусію та досі не мають однозначної відповіді [8, 13, 32]. Особливо складним є визначення границь видів для рослин, у яких часто відбувається міжвидова та навіть міжродова гібридизація [14, 27]. Крім віддаленої гібридизації додатковими факторами, що ускладнюють визначення видів рослин є системи безстатевого та вегетативного розмноження, ало- та автополіплоїдія [28]. Важливим суб'єктивним фактором є неоднозначне трактування різними дослідниками таксономічної ваги певних морфологічних ознак, що призводить до численних суперечностей щодо визначення та дискримінації видів рослин [28]. Проблема визначення границь виду має і важливий практич-

ний аспект у ракурсі природоохоронної діяльності та збереження біологічного різноманіття. Відсутність чіткого розмежування видів у складі комплексних таксонів ускладнює впровадження необхідних заходів по захисту та збереженню рідкісних і зникаючих форм [31].

Одним з перспективних шляхів вирішення проблеми ідентифікації видів та визначення границь між ними є використання молекулярно-генетичних підходів до таксономії та ДНК-баркодингу рослин [18]. Активне впровадження цих методів впродовж останніх десятиріч дозволило краще зрозуміти границі видів для багатьох складних у таксономічному відношенні груп рослин [12, 20, 31]. Проте, для флори України молекулярно-таксономічні дослідження залишаються епізодичними і охоплюють лише незначну кількість груп Покрито-насінних [1, 4, 5, 15, 21, 29].

Однією з важливих та недостатньо охарактеризованих груп рослин є агрегатний комплекс *A. anthora* L. s. l., представники якого поширені в Українських Карпатах та лісостеповій зоні [23, 24]. В межах цього комплексу у флорі України виділяють до чотирьох окремих видів: *A. anthora* L., *A. eulophum* Rchb., *A. jacquinii* Rchb., *A. pseudanthora* Błocki ex Pacz. Останні два види занесені до Червоної книги України [9]. Також, *A. pseudanthora* та *A. jacquinii* (у якості підвиду *A. anthora*) наведені і в IUCN Red List у статусі рідкісних рослин [25]. Проте, в базі даних World Flora Online усі згадані вище назви наводяться як синоніми до *A. anthora*.

В проведених раніше дослідженнях ми оцінили можливість використання молекулярних маркерів ядерної (міжгенний спейсер 5S рДНК) та хлоропластної (*psbA-trnH*) локалізації для уточнення таксономічного статусу представників комплексу *A. anthora* s. l. [3, 30]. Однак, найбільш популярним маркером для молекулярної таксономії рослин залишається ділянка ядерного геному ITS1-5.8S-ITS2 [10, 16]. Відповідно, у цій роботі для зразків з території України, які були попередньо ідентифіковані на основі морфологічних даних як *A. anthora*, *A. eulophum*, *A. jacquinii*, *A. pseudanthora* ми ампліфікували і сиквенували послідовності ITS1-5.8S-ITS2 та порівняли їх між собою та з послідовностями з геномів інших видів роду *Aconitum*.

### Матеріали та методи дослідження

Зразки представників комплексного виду *A. anthora* s. l. були зібрані протягом польових сезонів 1995, 2007 та 2009 років (табл. 1). Геномну ДНК виділяли з гербаризованих листків модифікованим цетавлоновим методом [2, 26].

Ампліфікацію ділянки ITS1-5.8S-ITS2 проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовуючи пару праймерів, комплементарних до фланкуючих внутрішні транскрибовані спейсери 1 та 2 (internal transcribed spacers: ITS1 та ITS2) ділянок генів 18S та 26S рРНК. ПЛР-продукти очищали екстракцією хлороформом та сиквенували із застосуванням праймерів, вико-

ристаних для ампліфікації. Сиквенування очищених ПЛР-продуктів проводили за Сенгером на фірмі LGC Genomics (Німеччина).

Первинний аналіз сиквенування послідовностей проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм DNASTAR Lasergene 14. Пошук гомологічних послідовностей у базі даних GenBank здійснювали з використанням програми BLAST [7]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали методом G-INS-i, реалізованим на сервері MAFFT [17].

Параметри отриманої матриці, зокрема, модель найкращої відповідності нуклеотидних замін, кількість варіабельних та парсимоній-інформативних сайтів оцінювали за допомогою програми Mega X [19].

Генетичні дистанції між зразками візуалізували за допомогою методу основних компонент (principal component analysis – PCA). PCA проводили в програмі Jalview [33] на основі вирівнювання послідовностей ділянки ITS1-5.8S-ITS2. Філогенетичний аналіз проводили методом Maximum Likelihood за допомогою плагіна PhyML для Geneious Prime 2023.2.1 [11]. Статистична підтримка гілок була розрахована за допомогою тесту aLRT Chi2 [6]. Обраховане дерево експортували у форматі Newick та анутовали з використанням онлайн інструменту iTOL v6 – Interactive tree of life.

### Результати дослідження та їх обговорення

Для чотирьох зразків (табл. 1), які за морфологічними ознаками було визначено як *A. anthora*, *A. eulophum*, *A. jacquinii* та *A. pseudanthora*, ми просиквенували ділянку ITS1-5.8S-ITS2, довжина якої для всіх чотирьох зразків виявилась однаковою і складає 630 нп.

Таблиця 1

#### Характеристика використаного у роботі рослинного матеріалу

Назва виду	Синонім	Назва зразку	Походження зразку	Період збору матеріалу
<i>A. anthora</i> L.	<i>A. anthora</i> L. s. str.	AcAnt2	Закарпатська обл., Ужгородський р-н.	Серпень, 2009
	<i>A. eulophum</i> Rchb.	AcEul5	Тернопільська обл., Підволочиський р-н.	Серпень, 1995
	<i>A. jacquinii</i> Rchb.	AcJac5	Закарпатська обл., Рахівський р-н.	Серпень, 2007
	<i>A. pseudanthora</i> Błocki ex Pacz.	AcPse6	Тернопільська обл., Бережанський р-н.	Серпень, 2007

В деяких позиціях у отриманих послідовностях на хроматограмах спостерігались подвійні піки, що свідчить про наявність всередині геномів зразків AcAnt2, AcJac5 та AcPse6 двох варіантів ITS1-5.8S-ITS2 35S, які відрізняються між собою наявністю від однієї до трьох транзицій.

Використовуючи сиквенувані нами послідовності ділянки ITS1-5.8S-ITS2 для пошукового запиту методом BLAST, ми виявили депоновані в базі даних

GenBank послідовності для 963 зразків роду *Aconitum*, із рівнем подібності до запиту від 82,9 до 97,6%. Для подальшого аналізу ми обрали 26 репрезентативних послідовностей, які мають різний ступінь подібності до *A. anthora* та представляють обидва загально визнані підроди роду *Aconitum*: *Aconitum* та *Lycoctonum*. Як зовнішню групу використали послідовність ITS1-5.8S-ITS2 представника близькоспорідненого роду *Delphinium*, *D. balansae*. Завантажені з GenBank послідовності разом із сиквенованими нами були вирівняні і довжина отриманого вирівнювання склала 641 нп (рис. 1). При цьому середня парна подібність між всіма вирівняними послідовностями (рис. 1) становить 95,4% (табл. 2).



Рис. 1. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей ділянки ITS1-5.8S-ITS2 для зразків родів *Aconitum* та *Delphinium*.

Найбільш варіабельною виявилась ділянка ITS1, яка містить 93 поліморфні позиції, 52 з яких – парсимоній-інформативні. Найменш мінливою очікувано виявилась кодувальна ділянка 5.8S рДНК, де наявні лише 5 варіабельних сайтів, з яких лише один інформативний. Останній відрізняє всі три використані для аналізу послідовності представників підроду *Lycoctonum* від інших видів *Aconitum*. Загалом, повна ділянка ITS1-5.8S-ITS2 містить 164 варіабельні сайти, з яких 82 є парсимоній-інформативними (табл. 2). Цей показник значно перевищує мінливість для таких популярних у таксономії локусів хлоропластної ДНК, як *psbA-trnH*, *trnT-trnL*, *trnL-trnF* [5, 29]. Крім нуклеотидних замін, наявні також 14 однонуклеотидних інсерцій/делецій (інделів), дев'ять в ділянці ITS1 та п'ять в ITS2.

Таблиця 2

**Параметри вирівнювання нуклеотидних послідовностей ділянки ITS1-5.8S-ITS2**

Параметр / ділянка	ITS1	5,8S	ITS2	ITS1-5,8S-ITS2
Довжина вирівнювання, нп	256	164	221	641
Середня попарна подібність послідовностей,%	92,7	99,7	95,3	95,4
Кількість варіабельних сайтів, нп	93	5	66	164
Кількість парсимоній-інформативних сайтів, нп	52	1	29	82

Послідовності зразків *A. anthora*, *A. eulophum*, *A. jacquinii*, *A. pseudanthora* виявились майже ідентичними, рівень подібності між ними знаходиться в межах 99,6–99,8%. При цьому, зразки, які відносять до комплексного виду *A. anthora* s. l. відрізняються між собою лише у п'яти позиціях. Так, зразок AcEul5 відрізняється від трьох інших трансверсією G→C у позиції 34 вирівнювання. Інші чотири сайти є поліморфними, зокрема, і між послідовностями ITS1-5.8S-ITS2 всередині геномів окремих зразків.

Для оцінки генетичних дистанцій між зразками, які відносять до комплексного виду *A. anthora* s. l., та іншими видами роду *Aconitum*, ми використали аналіз методом основних компонент. На отриманому графіку чотири зразки *A. anthora* s. l. утворюють щільний кластер, добре відокремлений від двох інших, які утворені видами підродів *Aconitum* та *Lycostonum* (рис. 2). В той же час, висока подібність зразків *A. anthora*, *A. eulophum*, *A. jacquinii* та *A. pseudanthora* між собою узгоджується із поглядами про приналежність цих рослин до одного виду – *A. anthora* L., і, відповідно, синонімічний характер згаданих видових епітетів [3, 23, 30, 34]. Проте, утворення подібних щільних кластерів спостерігаються (рис. 3) і для деяких визнаних у міжнародній систематиці видів підроду *Aconitum*. Отже, проблема визначення границь видів є актуальною і для інших таксонів роду *Aconitum*.

На наступному етапі дослідження з використанням вирівнювання послідовностей ITS1-5.8S-ITS2 було побудовано філогенетичну дендрограму, на який присутні дві основні клади (рис. 3). Перша клада містить всі три обрані для дослідження види підроду *Lycostonum*, тоді як друга клада об'єднує представників підроду *Aconitum* та групи *A. anthora* s. l. При цьому *A. anthora* s. l. формує окрему групу, яка є сестринською до всіх представників підроду *Aconitum*. Обидва загально визнані підроди, так само, як і *A. anthora* s. l. утворюють монофілетичні клади з високою статистичною підтримкою.

Значні дистанції між кластерами підродів *Aconitum* та *Lycostonum*, а також групою *A. anthora* s. l., які були виявлені за результатами PCA аналізу (рис. 2), та монофілетичний характер відповідних клад на філогенетичному дереві

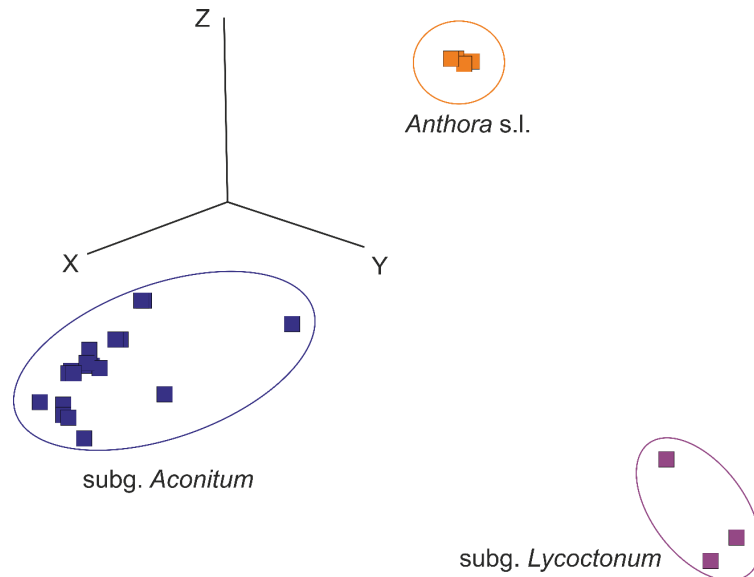


Рис. 2. Візуалізація результатів PCA аналізу генетичної спорідненості зразків роду *Aconitum* за послідовностями ділянки ITS1-5.8S-ITS2.

(рис. 3) свідчать на користь надання групі *A. anthora* s. l. статусу підроду, разом з підродами *Aconitum* та *Lycoctonum*.

Аналогічний висновок було зроблено і у наших попередніх дослідженнях з використанням ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* [1] та ділянки ядерного геному, міжгенного спейсеру 5S рДНК [30]. Проте, на відміну від цих двох попередніх робіт, де зразки *A. anthora* s. l. демонстрували вищу спорідненість із видами підроду *Lycoctonum*, у філогенії, відтвореній шляхом аналізу ділянки ITS1-5.8S-ITS2 група *A. anthora* s. l. виявилась більш наближеною до підроду *Aconitum*. Часткові протиріччя у топології філогенетичних дерев роду *Aconitum*, отриманих з використанням різних маркерів можуть свідчати про успадкування відповідних послідовностей від різних предкових видів у результаті міжвидової гібридизації в еволюційному минулому таксонів роду *Aconitum*. Тобто складається враження, що внаслідок міжвидової гібридизації еволюція роду мала сітчастий (ретикулярний) характер.

### Висновки

Використання ділянки ITS1-5.8S-ITS2 35S рДНК для філогенетичного аналізу підтверджує необхідність надання групі *A. anthora* s. l. статусу окремого підроду в межах роду *Aconitum*. Висока генетична спорідненість між зразками *A. anthora* s. l. з території України свідчить про те, що видові епітети *A. eulophum*, *A. jacquinii* та *A. pseudanthora* варто розглядати як синоніми до *A. anthora*.

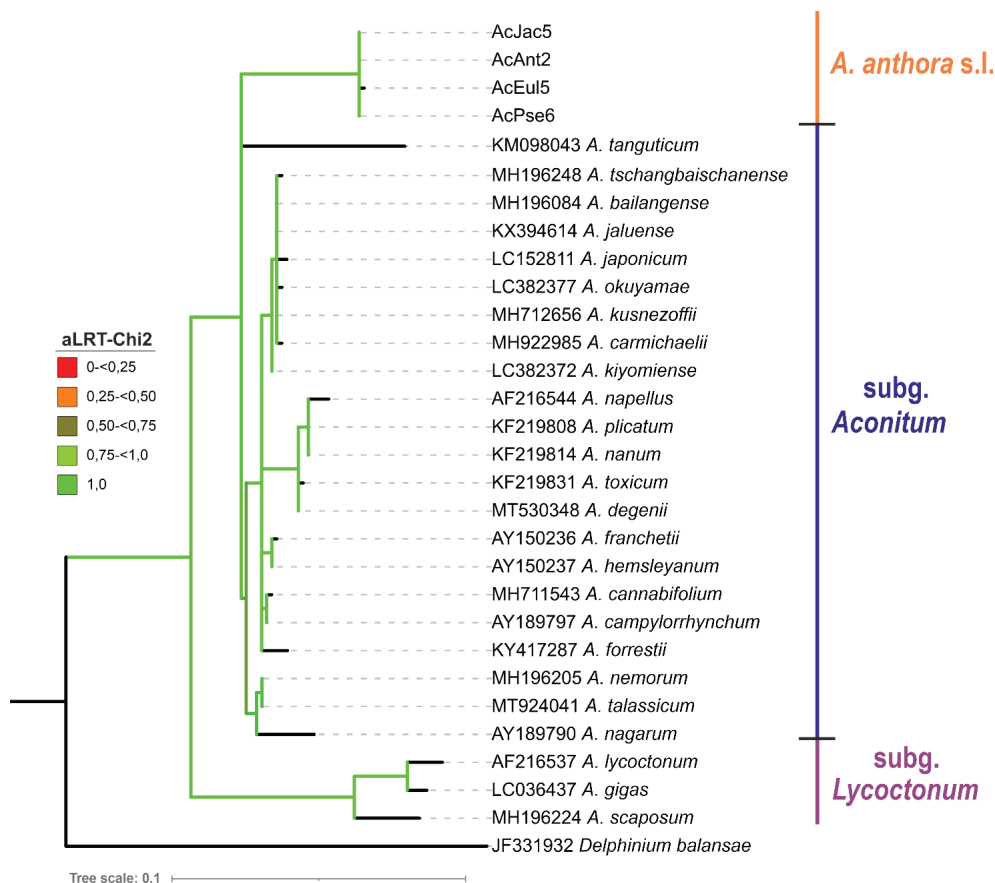


Рис. 3. Maximum Likelihood філогенетична дендрограма, отримана при порівнянні послідовностей ділянки ITS1-5.8S-ITS2 представників роду *Aconitum*. Колір гілок на дендрограмі відповідає значенням aLRT-Chi2 статистичної підтримки (див. легенду). Показані лише гілки з рівнем aLRT-Chi2 підтримки вище 0,5. Для послідовностей, завантажених з бази даних GenBank перед назвою таксону наведені номери доступу. Поділ роду *Aconitum* на підроди наведений за Jabbour et al., 2012 [16].

**Подяки.** Автори висловлюють щире подяку старшому науковому співробітнику Національного науково-природничого музею НАН України Новікову А. В. за наданий рослинний матеріал.

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

Стаття надійшла до редакції 15.11.2023

### Список використаної літератури

1. Андреев І. О., Мельник В. М., Кунах В. А. Поліморфізм міжгенного спейсера генів 5S рРНК деяких видів роду *Gentiana* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. 20, 42–46. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v20.731>
2. Панчук І. І., Волков Р. А. *Практикум з молекулярної генетики*. Чернівці: Рута. 2007. 120 с.
3. Тинкевич Ю. О., Біляй Д. В., Волков Р. А. Використання ділянки *psbA-trnH* для ДНК-баркодингу *Aconitum anthora* L. та споріднених таксонів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2022. 31, 134–41. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v31.1450>
4. Тинкевич Ю. О., Валін М. О., Волков Р. А. Організація та поліморфізм ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* у представників роду *Goniolimon* Boiss. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. 2022. 14 (2), 137–142. <https://doi.org/10.31861/biosystems2022.02.124>
5. Тинкевич Ю. О., Деревенко Т. О., Чорней І. І. Філогенетична спорідненість українських зразків чини рябощи (*Lathyrus venetus* (Mill.) Wohlf.) та чини весняної (*L. vernus* (L.) Vernh.) за даними аналізу ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH*. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. 2022. 14 (1), 135–140. <https://doi.org/10.31861/biosystems2022.02.124>
6. Anisimova M., Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 2006. 55, 539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
7. Boratyn G. M., Camacho C., Zaretskaya I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucl. Acid Res.* 2013. 41 (W1), W29–33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt282>
8. De Queiroz K. Different species problems and their resolution. *BioEssays*, (2005). 27 (12), 1263–1269. <https://doi.org/10.1002/bies.20325>
9. Didukh, Y.P. Chervona knyha Ukrainy. Roslynni svit (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom). 2009. Kyiv: Global consulting. Didukh, Ya. P. (2010). The «Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom». *Ukraine botanical journal*, 67 (4), 481–503.
10. Grimm G. W., Schlee M., Hemleben, V. Low-level taxonomy and intrageneric evolutionary trends in higher plants. From plant taxonomy to evolutionary biology. *Nova Acta Leopold., NF*. 2005. 92 (342), 129–145.
11. Guindon S., Gascuel O.A. Simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 2003. 52 (5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
12. Hajrudinović-Bogunić A., Frajman B., Bogunić F. Apomictic mountain whitebeam (*Sorbus austriaca*, Rosaceae) comprises several genetically and morphologically divergent lineages. *Biology*. 2023. 12 (3), 380. <https://doi.org/10.3390/biology12030380>
13. Hey J. The mind of the species problem. *Trends Ecol. Evol.* 2001. 16 (7), 326–329. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02145-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02145-0)
14. Hong D.Y. Gen-morph species concept – A new and integrative species concept for outbreeding organisms. *J. Syst. Evol.* 2020. 58 (5), 725–742. <https://doi.org/10.1111/jse.12660>
15. Ishchenko O. O., Bednarska I. O., Panchuk I. I. Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol. Genet.* 2021. 55, 10–18. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010096>
16. Jabbour F., Renner S.S. A phylogeny of Delphinieae (Ranunculaceae) shows that *Aconitum* 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. 62 (3), 928–942. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.005>
17. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinf.* 2017. 20 (4), 1160–6. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
18. Kress, W.J. Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *J. Syst. Evol.*, 55. 2017. (4), 291–307. <https://doi.org/10.1111/jse.12254>
19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018. 35 (635), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
20. Lakušić D., Liber Z., Stefanović S. Molecular phylogeny of the *Campanula pyramidalis* species complex (Campanulaceae) inferred from chloroplast and nuclear non-coding sequences and its taxonomic implications. *Taxon*. 2013. 62 (3), 505–524. <https://doi.org/10.12705/623.1>
21. Lykholat Y. V., Rabokon A. M., Blume Y. B. Characterization of  $\beta$ -tubulin genes in *Prunus persica* and *Prunus dulcis* for fingerprinting of their interspecific hybrids. *Cytol. Genet.* 2022. 56 (6), 481–493. <https://doi.org/10.3103/S009545272206007X>



22. Mitka J., Sutkowska A., Joachimiak A. Reticulate evolution of high-alpine *Aconitum* (Ranunculaceae) in the Eastern Carpathians (Central Europe). *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 2007. 49 (2), 15–26.
23. Novikov A., Mitka J. Nomenclature, history and taxonomic identity of *Aconitum pseudanthora* Blocki (Ranunculaceae). *Adansonia*. 2023. 45 (23), 363–371. <https://doi.org/10.5252/adansonia2023v45a23>
24. Novikov A., Prylutskiy O. Genus *Aconitum* (Ranunculaceae) in the Ukrainian Carpathians and adjacent territories. *Biodivers. Data J.* 2023. 11, e98828. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e98828>
25. Onyshchenko V. A., Mosyakin S. L., Protopopova V. V. IUCN Red List categories of vascular plant species of Ukrainian flora. *M. G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kyiv*, 2022. 197.
26. 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. 15 (1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/bf02772108>
27. Rieseberg L. H. Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1997. 28 (1), 359–389. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.28.1.359>
28. Rieseberg L. H., Wood T. E., Bawa E. J. The nature of plant species. *Nature*. 2006. 440 (7083), 524–527. <https://doi.org/10.1038/nature04402>
29. Tynkevich Y. O., Boychuk S. V., Volkov R. A. Molecular phylogeny and genetic diversity of Carpathian members of the genus *Muscari* inferred from plastid DNA sequences. *Cytol. Genet.*, 2023. 57 (5), 387–398. <https://doi.org/10.3103/S0095452723050079>
30. Tynkevich Y. O., Novikov A. V., Volkov R. A. Organization of the 5S rDNA intergenic spacer and its use in the molecular taxonomy of the genus *Aconitum* L. *Cytol. Genet.* 2022. 56 (6), 494–503. <https://doi.org/10.3103/S0095452722060111>
31. Wagner N. D., Clements M. A., Nargar K. Conservation in the face of hybridisation: genome-wide study to evaluate taxonomic delimitation and conservation status of a threatened orchid species. *Conserv. Genet.*, 2021. 22 (1), 151–168. <https://doi.org/10.1007/s10592-020-01325-y>
32. Wang X., He Z., Wu C. I. Genes and speciation: is it time to abandon the biological species concept? *Natl. Sci. Rev.* 2020. 7 (8), 1387–1397. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwz220>
33. Waterhouse A. M., Procter J. B., Barton G. J. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinf.* 2009. 25 (9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
34. *WFO World Flora Online*. (2023, October 7). URL: <http://www.worldfloraonline.org/>

**Ю. О. Тинкевич<sup>1</sup>, Д. В. Біляй<sup>1</sup>, О. В. Череватов<sup>1</sup>, О. О. Кагало<sup>2</sup>,  
Р. А. Волков<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Кафедра молекулярної генетики та біотехнології, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2, 58012, Україна, e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

<sup>2</sup>Інститут екології Карпат НАН України, Відділ охорони природних екосистем, Львів, вул. Козельницька, 4, 79026, Україна, e-mail: o.kagalo@nas.gov.ua

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАЇНСЬКИХ ПРЕДСТАВНИКІВ КОМПЛЕКСНОГО ВИДУ *ACONITUM ANTHORA* НА ОСНОВІ ДІЛЯНКИ ITS1-5.8S-ITS2 ЯДЕРНОГО ГЕНОМУ**

### **Резюме**

**Проблема.** Питання визначення границь виду поруч із фундаментальними аспектами має практичне значення у природоохоронній діяльності. Однією із проблемних у таксономічному плані груп є комплексний вид *A. anthora* s. l. У флорі України в його межах виділяють чотири таксони із суперечливим

статусом: *A. anthora* L., *A. eulophum* Rchb., *A. jacquinii* Rchb., *A. pseudanthora* Włoski ex Racz. Останні два види занесені до Червоної книги України та списку IUCN. Визначення таксономічного положення цих близькоспоріднених форм потребує використання молекулярно-генетичних підходів. Найбільш популярним та інформативним маркером для таксономії та баркодингу рослин вважається ділянка ITS1-5.8S-ITS2 35S рДНК.

**Мета.** Уточнити таксономічний статус та філогенетичні зв'язки представників *A. anthora* s. l. з використанням молекулярного маркеру ITS1-5.8S-ITS2 35S рДНК.

**Методика.** Гербарні зразки чотирьох представників групи *A. anthora* s. l. були зібрані на території Західної України. ДНК було виділено модифікованим цетавлоновим методом, після чого використано для ПЛР-ампліфікації ділянки ITS1-5.8S-ITS2. ПЛР-продукти очищали та сиквенували за Сенгером. Отримані нами послідовності вирівнювали разом з депонованими у базі даних GenBank послідовностями для представників двох підродів роду *Aconitum*: номінативного підроду та підроду *Lycoctonum*. Отриману матрицю використовували для аналізу методом основних компонент (PCA) та філогенетичного аналізу методом Maximum Likelihood.

**Основні результати.** Сиквеновані нами послідовності ITS1-5.8S-ITS2 для зразків *A. anthora*, *A. eulophum*, *A. jacquinii* та *A. pseudanthora* виявились майже ідентичними. Вони відрізнялися між собою лише у п'яти з 641-ї позиції вирівнювання. Причому, чотири з п'яти позицій виявились поліморфними і в межах окремих геномів. За результатами PCA аналізу всі чотири зразки *A. anthora* s. l. утворювали щільний кластер, відокремлений значними дистанціями від кластерів утворених представниками підродів *Aconitum* та *Lycoctonum*. На отриманому філогенетичному дереві наявні три основні монофілетичні клади, що відповідають підродам *Aconitum* і *Lycoctonum* та групі *A. anthora* s. l. Клада *Lycoctonum* виявилась сестринською до інших представників роду, а клади *Aconitum* та *A. anthora* s. l. – сестринськими між собою.

**Висновки.** Використання ділянки ITS1-5.8S-ITS2 35S рДНК для філогенетичного аналізу підтверджує необхідність надання групі *A. anthora* s. l. статусу окремого підроду в межах роду *Aconitum*. Висока генетична спорідненість між зразками *A. anthora* s. l. з території України свідчить про те, що видові епітети *A. eulophum*, *A. jacquinii* та *A. pseudanthora* варто розглядати як синоніми до *A. anthora*.

**Ключові слова:** генетичний поліморфізм; біорізноманіття; філогенія; таксономія; *Aconitum*; молекулярні маркери; рДНК

**Y. O. Tynkevich<sup>1</sup>, D. V. Biliai<sup>1</sup>, O. V. Cherevatov<sup>1</sup>, O. O. Kagalo<sup>2</sup>, R. A. Volkov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Chernivtsi, Kotsiubynski str., 2, 58012, Ukraine, e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

<sup>2</sup>Institute of Ecology of the Carpathians of The National Academy of Sciences of Ukraine, Department of Natural Ecosystems, Lviv, Kozelnytska str., 4, 79026, Ukraine, e-mail: o.kagalo@nas.gov.ua

## **MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF UKRAINIAN REPRESENTATIVES OF THE COMPLEX SPECIES *ACONITUM ANTHORA* BASED ON THE ITS1-5.8S-ITS2 REGION OF THE NUCLEAR GENOME**

### **Summary**

**Problem.** The question of determining the boundaries of a species, in addition to the fundamental aspects, is of practical importance for nature conservation activities. One of the taxonomically problematic groups is the complex species *A. anthora* s. l. In the flora of Ukraine, four taxa with controversial status are distinguished within its borders, *A. anthora* L., *A. eulophum* Rchb., *A. jacquinii* Rchb. and *A. pseudanthora* Błocki ex Pacz. The last two species are included in the Red Book of Ukraine and the IUCN list. Determining the taxonomic position of these closely related forms requires the use of molecular genetic approaches. The ITS1-5.8S-ITS2 region of 35S rDNA is considered the most popular and informative marker for plant taxonomy and barcoding.

**Aim.** To clarify the taxonomic status and phylogenetic relationships of representatives of *A. anthora* s. l. using the molecular marker ITS1-5.8S-ITS2 of 35S rDNA.

**Methods.** Herbarium specimens of four representatives of the group *A. anthora* s. l. were collected on the territory of Western Ukraine. DNA was isolated by a modified CTAB method and then used for PCR amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 region. PCR products were purified and Sanger sequenced. The sequences obtained were aligned with the sequences deposited in the GenBank database for representatives of two subgenera of the genus *Aconitum*, i.e. the nominative subgenus and the subgenus *Lycocotnum*. The resulting matrix was used for principal component analysis (PCA) and phylogenetic analysis using the Maximum Likelihood method.

**Main results.** The sequences of ITS1-5.8S-ITS2 that we obtained for *A. anthora*, *A. eulophum*, *A. jacquinii*, and *A. pseudanthora* samples were found to be almost identical. They differed from each other in only five of the 641 alignment positions. Among them, four out of five positions appeared to be polymorphic even within individual genomes. According to the results of PCA analysis, all four samples of *A. anthora* s. l. formed a dense cluster separated by significant distances from the clusters formed by representatives of the subgenera *Aconitum* and *Lycocotnum*. In the generated phylogenetic tree, three main monophyletic clades are present, which correspond to the subgenera *Aconitum* and *Lycocotnum* and the *A. anthora* s. l. group. The *Lycocotnum* clade was sister to other members of the genus, and the *Aconitum* and *A. anthora* s. l. clades were sister to each other.

**Conclusions.** The use of the ITS1-5.8S-ITS2 region of 35S rDNA for phylogenetic analysis confirms the need to grant the *A. anthora* s. l. group the status of a separate subgenus within the genus *Aconitum*. The high genetic affinity between samples of *A. anthora* s. l. from the territory of Ukraine indicates that the species names *A. eulophum*, *A. jacquinii*, and *A. pseudanthora* should be considered synonyms of *A. anthora*.

**Key words:** genetic polymorphism; biodiversity; phylogeny; taxonomy; *Aconitum*; molecular markers; rDNA

## References

1. Andreev, I. O., Melnyk, V. M., & Kunakh, V. A. (2017). Polymorphism of 5S rDNA intergenic spacer in some *Gentiana* species. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, (20), 42–46. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v20.731>
2. Panchuk, I. I., & Volkov, R. A. *Practical course in molecular genetics*. Chernivtsi: Ruta. 2007; 120 p.
3. Tynkevich, Y. O., Biliay, D. V., & Volkov, R. A. (2022). Utility of the *trnH-psbA* region for DNA barcoding of *Aconitum anthora* L. and related taxa. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, (31), 134–41. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v31.1450>
4. Tynkevich, Y. O., Valin, M. O., & Volkov, R. A. (2022). Organization and polymorphism of the chloroplast genome region *psbA-trnH* in representatives of the *Goniolimon* Boiss. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*, 14 (2), 137–142. <https://doi.org/10.31861/biosystems2022.02.124>
5. Tynkevich, Y. O., Derevenko, T. O., & Chorney, I. I. (2022). 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)*, 14 (1), 135–140. <https://doi.org/10.31861/biosystems2022.02.124>
6. Anisimova, M., & Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.*, 55, 539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
7. Boratyn, G. M., Camacho, C., & Zaretskaya, I. I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucl. Acid Res.*, 41 (W1), W29–33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt282>
8. De Queiroz, K. (2005). Different species problems and their resolution. *BioEssays*, 27 (12), 1263–1269. <https://doi.org/10.1002/bies.20325>
9. Didukh, Y. P. *Chervonaknyha Ukrainy. Roslynnnyi svit (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom)*. 2009. Kyiv: Global consulting.
10. Grimm, G. W., Schlee, M., & Hemleben, V. (2005). Low-level taxonomy and intrageneric evolutionary trends in higher plants. From plant taxonomy to evolutionary biology. *Nova Acta Leopold.*, NF, 92 (342), 129–145.
11. Guindon, S., & Gascuel, O. A. (2003). Simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.*, 52 (5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
12. Hajrudinović-Bogunić, A., Frajman, B., & Bogunić, F. (2023). Apomictic mountain whitebeam (*Sorbusaustriaca*, Rosaceae) comprises several genetically and morphologically divergent lineages. *Biology*, 12 (3), 380. <https://doi.org/10.3390/biology12030380>
13. Hey, J. (2001). The mind of the species problem. *Trends Ecol. Evol.*, 16 (7), 326–329. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02145-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02145-0)
14. Hong, D. Y. (2020). Gen-morph species concept – A new and integrative species concept for outbreeding organisms. *J. Syst. Evol.*, 58 (5), 725–742. <https://doi.org/10.1111/jse.12660>
15. Ishchenko, O. O., Bednarska, I. O., & Panchuk, I. I. (2021). Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol. Genet.*, 55, 10–18. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010096>
16. Jabbour, F., & Renner, S. S. (2012). 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.*, 62 (3), 928–942. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.005>
17. Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinf.* 20 (4), 1160–6. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

18. Kress, W. J. (2017). Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *J. Syst. Evol.*, 55 (4), 291–307. <https://doi.org/10.1111/jse.12254>
19. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.*, 35 (635), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
20. Lakušić, D., Liber, Z., & Stefanović, S. (2013). Molecular phylogeny of the *Campanula pyramidalis* species complex (Campanulaceae) inferred from chloroplast and nuclear non-coding sequences and its taxonomic implications. *Taxon*, 62 (3), 505–524. <https://doi.org/10.12705/623.1>
21. Lykholat, Y. V., Rabokon, A. M., & Blume, Y. B. (2022). Characterization of  $\beta$ -tubulin genes in *Prunus persica* and *Prunus dulcis* for fingerprinting of their interspecific hybrids. *Cytol. Genet.*, 56 (6), 481–493. <https://doi.org/10.3103/S009545272206007X>
22. Mitka, J., Sutkowska, A., & Joachimiak, A. (2007). Reticulate evolution of high-alpine *Aconitum* (Ranunculaceae) in the Eastern Carpathians (Central Europe). *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.*, 49 (2), 15–26.
23. Novikov, A., & Mitka, J. (2023). Nomenclature, history and taxonomic identity of *Aconitum pseudanthora* Blocki (Ranunculaceae). *Adansonia*, 45 (23), 363–371. <https://doi.org/10.5252/adansonia2023v45a23>
24. Novikov, A., & Prylutskyi, O. (2023). Genus *Aconitum* (Ranunculaceae) in the Ukrainian Carpathians and adjacent territories. *Biodivers. Data J.*, 11, e98828. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e98828>
25. Onyshchenko, V. A., Mosyakin, S. L., & Protopopova, V. V. (2022). IUCN Red List categories of vascular plants species of Ukrainian flora. *M. G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kyiv*, 197.
26. Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 15 (1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/bf02772108>
27. Rieseberg, L. H. (1997). Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 28 (1), 359–389. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.28.1.359>
28. Rieseberg, L. H., Wood, T. E., & Baack, E. J. (2006). The nature of plant species. *Nature*, 440 (7083), 524–527. <https://doi.org/10.1038/nature04402>
29. Tynkevich, Y. O., Boychuk, S. V., & Volkov, R. A. (2023). Molecular phylogeny and genetic diversity of Carpathian members of the genus *Muscari* Inferred from Plastid DNA Sequences. *Cytol. Genet.*, 57 (5), 387–398. <https://doi.org/10.3103/S0095452723050079>
30. Tynkevich, Y. O., Novikov, A. V., & Volkov, R. A. (2022). Organization of the 5S rDNA intergenic spacer and its use in the molecular taxonomy of the genus *Aconitum* L. *Cytol. Genet.*, 56 (6), 494–503. <https://doi.org/10.3103/S0095452722060111>
31. Wagner, N. D., Clements, M. A., & Nargar, K. (2021). Conservation in the face of hybridisation: genome-wide study to evaluate taxonomic delimitation and conservation status of a threatened orchid species. *Conserv. Genet.*, 22 (1), 151–168. <https://doi.org/10.1007/s10592-020-01325-y>
32. Wang, X., He, Z., & Wu, C. I. (2020). Genes and speciation: is it time to abandon the biological species concept? *Natl. Sci. Rev.*, 7 (8), 1387–1397. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwz220>
33. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinf.*, 25 (9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
34. *WFO World Flora Online*. (2023, October 7). Available from: <http://www.worldfloraonline.org/>